

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の
エンドサイトーシスを介したタンパク質分解機構

棚橋 亮弥
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス領域 ストレス微生物科学研究室
(高木 博史 教授)

令和3年1月18日提出

目次

序章	3
第1章 Rsp5 による Agp1 の基質アミノ酸依存的なエンドサイトーシス機構	
1-1. 序論	28
1-2. 材料と方法.....	29
1-2-1. 菌株とプライマー、プラスミド	
1-2-2. 培地	
1-2-3. GFP 融合タンパク質の作製	
1-2-4. Agp1-EGFP および Gap1-EGFP, Put4-EGFP, Gnp1-GFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察	
1-2-5. Agp1-EGFP 融合タンパク質の免疫沈降	
1-2-6. 生育試験	
1-2-7. ウェスタンブロットティング	
1-2-8. その他	
1-3. 結果	35
1-3-1. Rsp5 による基質依存的な Agp1 のエンドサイトーシス	
1-3-2. AZC を用いたスクリーニング系の構築	
1-3-3. Bul1 依存的な Agp1 のユビキチン化を介したエンドサイトーシス	
1-4. 考察	49
第2章 Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構	
2-1. 序論	52
2-2. 材料と方法.....	53
2-2-1. 菌株とプライマー、プラスミド	
2-2-2. 培地	
2-2-3. 部位特異的変異導入法によるアミノ酸置換の導入	
2-2-4. Gap1-EGFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察	
2-2-5. Gap1-EGFP、および Rvs167-HA 融合タンパク質の免疫沈降	
2-2-6. 生育試験	
2-2-7. Rvs167-HA 融合タンパク質と Rsp5 の共免疫沈降	
2-2-8. シクロヘキシミドを用いた Rvs167-HA 融合タンパク質量の経時的な解析	
2-2-9. ウェスタンブロットティング	
2-2-10. Lucifer Yellow 染色細胞の蛍光顕微鏡観察	
2-2-11. Rvs167-HA 融合タンパク質の免疫沈降と LC-MS/MS によるユビキチン化部位の同定	
2-2-12. その他	
2-3. 結果	61

2-3-1. Rsp5 の C2 ドメインに依存したエンドサイトーシス	
2-3-2. Rsp5 の C2 ドメインにおけるフォスファチジルイノシトール結合能を介したエンドサイトーシス	
2-3-3. アダプタータンパク質と独立した C2 ドメインを介したエンドサイトーシス	
2-3-4. エンドサイトーシス関連タンパク質の Rvs167 を介した Gap1 および液相エンドサイトーシス	
2-3-5. Rsp5 における C2 ドメインの機能を介した Rvs167 のユビキチン化	
2-3-6. ユビキチン化修飾による Rvs167 の安定化	
2-4. 考察	93
第 3 章 Rsp5 による神経変性疾患の発症に関わる凝集タンパク質の分解機構	
3-1. 序論	97
3-2. 材料と方法.....	98
3-2-1. 菌株とプライマー、プラスミド	
3-2-2. 培地	
3-2-3. 遺伝子破壊株の作製	
3-2-4. 生育試験	
3-2-5. TDP-43-EGFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察	
3-2-6. 凝集タンパク質画分の調製	
3-2-7. TDP-43 の経時的分解評価	
3-2-8. TDP-43 と Rsp5 の共免疫沈降	
3-2-9. ウェスタンブロッティング	
3-2-10. その他	
3-3. 結果	103
3-3-1. ヒト TDP-43 を用いた酵母の ALS モデル実験系の構築	
3-3-2. Rsp5 を介した TDP-43 の分解誘導	
3-3-3. エンドサイトーシスを介した TDP-43 の毒性緩和	
3-4. 考察	112
総括	120
まとめ	121
謝辞	122
参考文献	123

序章

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高等真核生物のモデルとして広く研究が進められていると同時に、様々な有用物質の発酵生産にも用いられる学術上・産業上重要な微生物である。生物は、環境変化に巧みに応答し適応する機構を備えており、それらの多くは単細胞生物である *S. cerevisiae* にも保存されている。当研究室では酵母の多様なストレスに対する応答機構に関する研究を行っており、本研究ではその中の一つであるユビキチン化を介したタンパク質分解機構に着目した。

環境変化への適応機構

1) 環境成分の取り込みと細胞毒性

酵母は、環境中の成分を細胞内に取り込み、自身の生育や香気成分などの二次代謝産物の生産に利用する。グルコースなどの炭素源は解糖系による ATP の合成に利用されるため重要な環境成分であるが、アミノ酸などの窒素源も酵母の生育に大きく影響を及ぼす (1)。1950 年頃から現在までに、原核生物を用いた解析により、環境中の過剰なアミノ酸が細胞の増殖を阻害すること、あるいは細胞死を引き起こすことが報告されている (2-6)。また、酵母を用いた解析により、これらの生育抑制および細胞死は細胞内のアミノ酸レベルの上昇と相関があることが示された (7, 8)。単細胞生物に加えて、ヒトにおいても細胞内アミノ酸レベルの増加は、例えばフェニルケトン尿症の発症に強く関与している (9)。アミノ酸含量の増加が細胞毒性を引き起こすメカニズムについては未だに明らかになっていないが、細胞内代謝の変化、あるいはミトコンドリアの機能阻害がその可能性として考えられている (10)。上記のように、アミノ酸は細胞の生育に不可欠な反面、負の側面を併せ持つことが明らかになりつつある。

環境中のアミノ酸については、細胞膜上のアミノ酸トランスポーターを通じて細胞内に取り込まれるため、アミノ酸トランスポーター活性の厳密な制御が過剰なアミノ酸による細胞毒性を防ぐ上で重要となる。アミノ酸トランスポーターの活性は、大きく Nitrogen catabolite repression (NCR) と Nitrogen catabolite inactivation (NCI) の 2 つのメカニズムにより調節されている (図 1)。NCR は、環境中の窒素源の資化し易さに依存して、特定の遺伝子の発現が抑制、あるいは活性化される機構である (11)。一例として、窒素源が豊富なワイン醸造条件において、NCR によりいくつかのアミノ酸トランスポーターの発現が抑制される (12)。NCR が遺伝子発現の調節機構である一方、NCI は既に存在する細胞膜上のタンパク質をエンドサイトーシスにより不活性化する機構である (13)。これにより、細胞膜上のタンパク質が細胞内に取り込まれ、その機能が抑制される。また、NCI は環境中の窒素源の資化し易さに依存して誘導されることに加え、トランスポーターの基質アミノ酸が環境中に過剰に存在しても引き起こされる (14, 15)。このように、細胞膜上のアミノ酸トランスポーターは、遺伝子発現および細胞内局在の 2 つのメカニズムによりその働きが制御され、細胞内のアミノ酸含量を厳密に調節している。

Nitrogen catabolite repression

Nitrogen catabolite inactivation

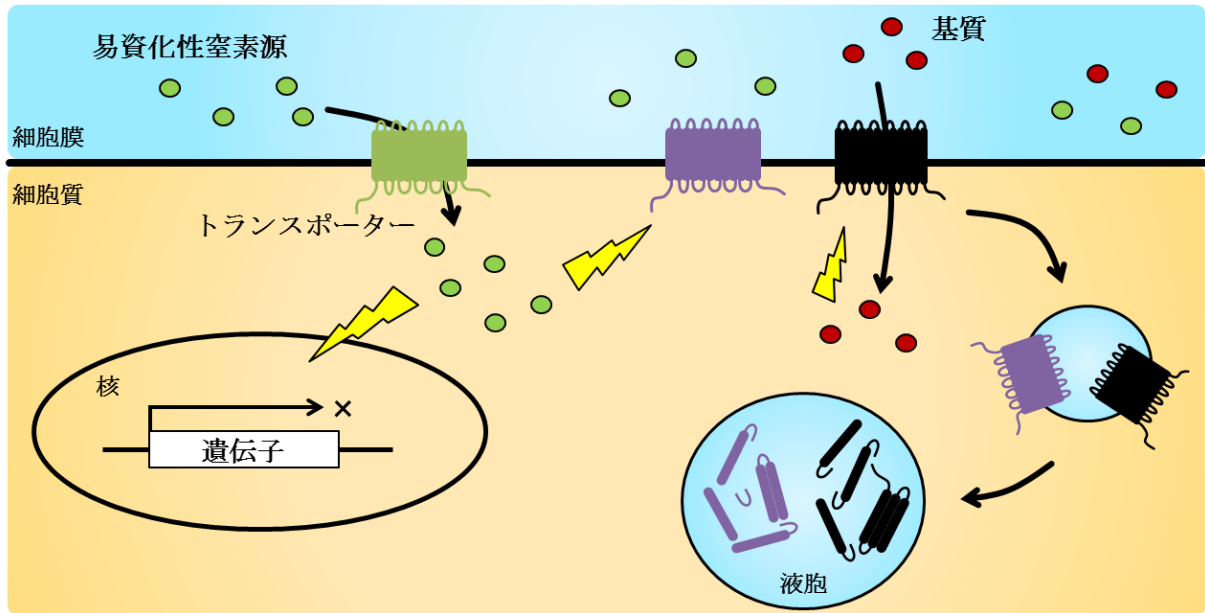


図1 NCR および NCI

資化し易い窒素源が環境中に存在すると、細胞膜上のトランスポーターにより易資化性の窒素源が細胞内に取り込まれる。取り込まれた窒素源、あるいはその代謝産物がシグナルとなり、窒素源の取り込みに関わる遺伝子の転写を抑制する (NCR)。また、このシグナルは、細胞膜に既存の異なるトランスポーターのエンドサイトーシスを誘導する (NCI)。NCI は、窒素源の資化し易さのみだけでなく、トランスポーターの基質アミノ酸に応答して特異的に引き起こされる条件も存在する。この場合、トランスポーターによる基質の過剰な取り込みを防ぐため、役割を終えたトランスポーターをエンドサイトーシスにより細胞膜から取り除く。

2) タンパク質の変性/凝集と細胞毒性

高温などの大幅な環境の変化は、細胞にとってストレスとなり、細胞内でタンパク質の変性が引き起こされる (16)。また、細胞は環境の変化に適応するためにタンパク質を新たに合成するが、新生タンパク質の折りたたみに欠陥が生じると、これらも変性タンパク質として細胞内に蓄積する。このような変性タンパク質のほとんどは、小胞体によるタンパク質品質管理機構、あるいはプロテアソームやオートファジーを介したタンパク質分解機構により除去されるものの、一部のタンパク質はこれらの過程を通り抜けて細胞内に蓄積し、タンパク質の凝集体を形成する (17-21)。凝集タンパク質の特徴として、 β -シートが規則的に配列した構造体を形成することが知られており、非エネルギー依存的にタンパク質の凝集を促進する (22)。したがって、一度タンパク質の凝集体が生成されると、凝集タンパク質を取り除かない限り、その肥大化が進行する (図2)。ヒトの神経細胞においては、このような凝集タンパク質の蓄積は神経変性疾患であるアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側

索硬化症 (ALS) などの発症に関与している (23)。これら凝集したタンパク質が細胞毒性を示すメカニズムは未だ明らかになっておらず、タンパク質分解システムであるプロテアソーム、オートファジー、エンドサイトーシスを阻害すること、さらにミトコンドリアの機能阻害など細胞内の恒常性を破綻させることが要因であると考えられている (24-27)。また近年、細胞質で凝集したタンパク質が細胞膜孔を形成し、細胞膜の透過性に影響を及ぼすことも報告され、凝集タンパク質と細胞膜の恒常性維持に注目が集まっている (28, 29)。

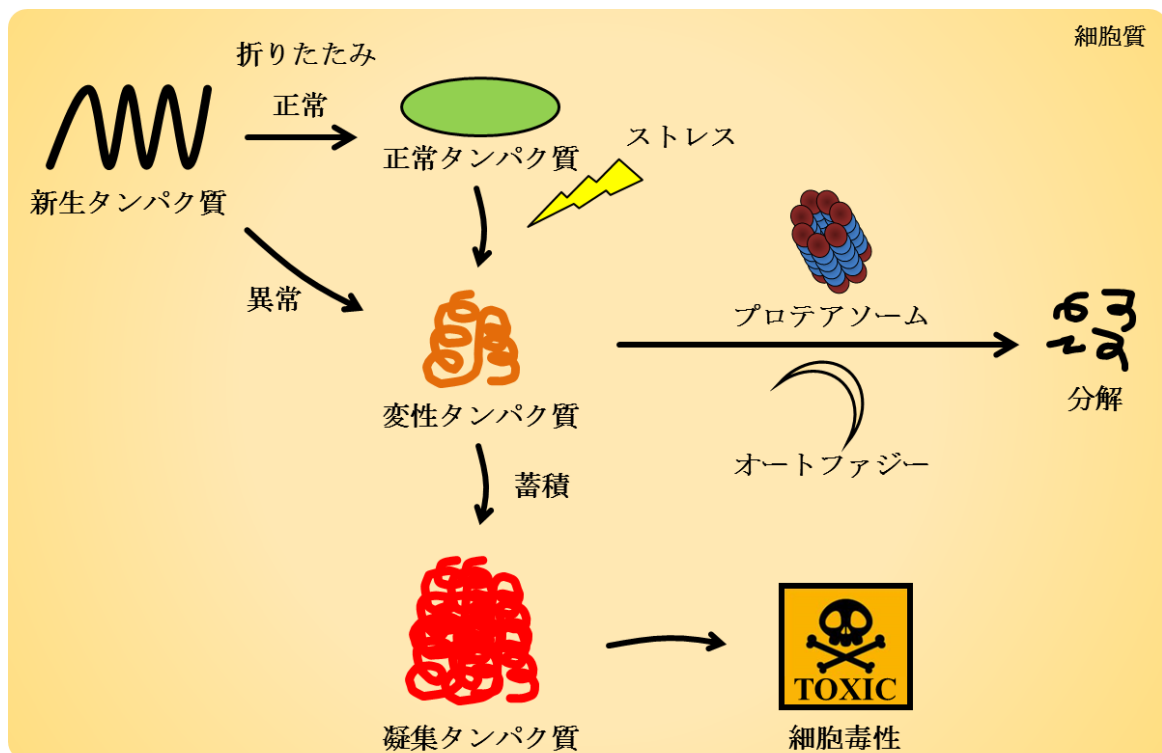


図2 タンパク質の変性/凝集と細胞毒性

リボソームにより合成された新生タンパク質は、シャペロンタンパク質により正常に折りたたまれ、酵素としての役割を果たす。一方、折りたたみに異常が生じた場合や、正常なタンパク質に高温などのストレスが加えられた場合は、タンパク質の構造が不安定となり、変性したタンパク質が生成する。この変性タンパク質は、通常、プロテアソームやオートファジーにより迅速に分解されるが、これらタンパク質分解経路に欠損が生じるとタンパク質の凝集体が形成される。この凝集体が細胞の様々な機能を阻害する結果、生育阻害や細胞死などの細胞毒性を示す。

エンドサイトーシスと小胞輸送

エンドサイトーシスの機構は真核生物において広く保存されており、生育環境中の栄養分や、細胞膜および細胞膜タンパク質などを細胞内に取り込む際に重要な役割を果たしている。エンドサイトーシスは、その取り込みの様子からピノサイトーシス(液相エンドサイトーシス)とファゴサイトーシスに大別され、前者はさらにダイナミン依存性と非依存性に分けられる。クラスリン依存性エンドサイトーシスは、ダイナミン依存的なエンドサイトーシスの一つであり、エンドサイトーシスの中で最も解析が進められている。エンドサイトーシス(ピノサイトーシス)には、約60種のタンパク質が関与し、時間的、空間的に厳密に制御されていることに加え、互いのタンパク質の機能重複性も相まって複雑な機構となっている(30-33)。エンドサイトーシスは大きく、1) 初期被覆形成、2) 被覆成熟、3) アクチン重合を伴う小胞形成、4) 細胞膜からの小胞の切断と被覆の脱離の4つの過程を経て完了する(図3)。まず1) 初期被覆形成過程では、初期コートタンパク質である積み荷タンパク質の認識に関わるEde1やクラスリンタンパク質(Chc1, Clc1)などがエンドサイトーシスの生じる領域に集積する。その後、後期コートタンパク質のSla2, Ent1, Ent2などがこの区画に集まることにより2) 被覆成熟が起こる。3) アクチン重合を伴う小胞形成過程では、Sla1, End3, Pan1などの因子がさらに集積するとともに、アクチン骨格の形成も生じる。この過程では、Myo3, Myo5といったミオシンタンパク質や、アクチン重合の活性化因子であるa homolog of human Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) 様タンパク質のLas17および各タンパク質と相互作用することで空間的なアクチンフィラメントの組み立てに関わるBbc1などのタンパク質がエンドサイトーシスの生じる領域に集積し、アクチン骨格の形成に働く(34-40)。これらコートタンパク質とアクチンによる細胞膜陥入が開始すると、4) アンフィフィジンを介した小胞の切断が順次誘導される。*S. cerevisiae*では、アンフィフィジン様タンパク質であるRvs161およびRvs167がエンドサイトーシスの生じる領域へリクルートされ、細胞膜の湾曲の制御を行う(41, 42)。また、ダイナミン様GTPaseであるVps1も膜の脱離に関与するとされている。上記の過程を経て細胞内に出芽した小胞は、アクチンフィラメントにより初期エンドソームへと運ばれる。

初期エンドソームでは、その後5つのEndosomal sorting complex required for transport (ESCRT) 複合体により、積み荷タンパク質を含むエンドソーム膜が小胞内腔にさらに出芽し、多胞体小胞(Multivesicular body; MVB)を形成する(図4)(43-45)。エンドソーム膜陥入の初期過程で働くESCRT-0, ESCRT-IおよびESCRT-IIは、積み荷タンパク質の認識を行い、ESCRT-IIIの足場となる。ESCRT-IIIは、ESCRT機能の中心的な役割を担っており、エンドソーム内腔への脂質膜陥入とそれによって生じる膜間の切り離しを行う。ESCRT-IIIにより形成した陥入膜は、ESCRT-IVが有するATPase活性により切り離され、エンドソーム内腔に乖離する。ESCRT複合体による多胞体小胞の形成を経て成熟したエンドソームを後期エンドソームと呼び、後期エンドソームは最終的に液胞/リソソームに運ばれる。多胞体小胞と液胞/リソソームが融合すると、多

胞体小胞の内部小胞が持つ脂質とタンパク質は、リソソーム内腔に局在する Pep4 などの加水分解酵素によって分解される。上記に示す一連の過程を経て、不要になった細胞膜上のタンパク質は液胞/リソソームに運ばれ、分解される。

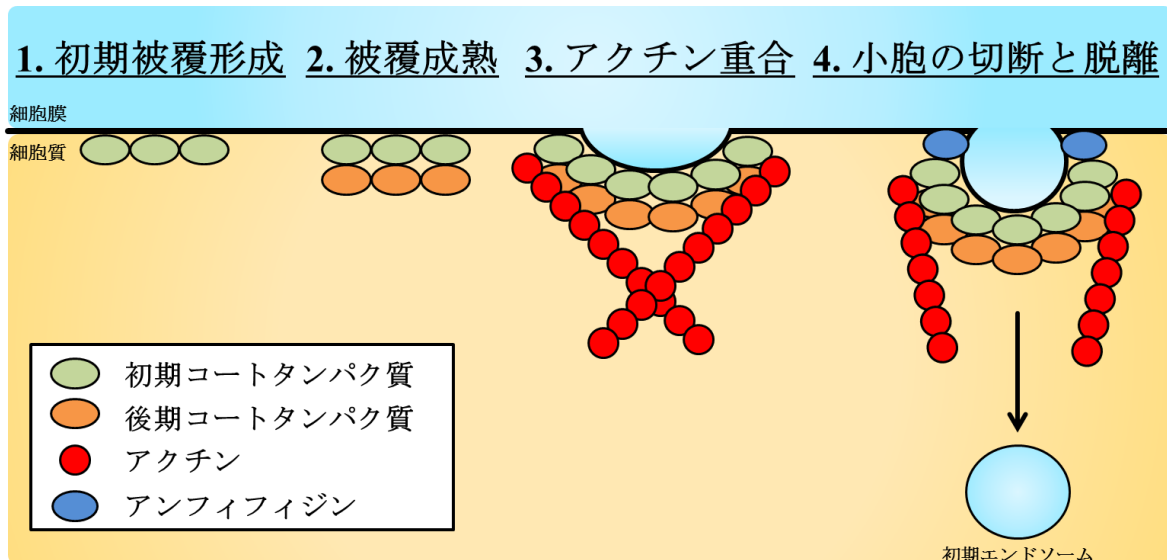


図3 エンドサイトーシス

エンドサイトーシスが生じる初期段階として、細胞膜が陥入する膜区画に初期コートタンパク質が集積し、初期被覆が形成される。その後、後期コートタンパク質が当膜区画へリクルートされ、被覆が成熟する。被覆成熟が完了すると、アクチンフィラメントの形成と膜の陥入が始まる。細胞内に陥入した膜区画は、アンフィフィジンタンパク質により切除され、小胞が出芽する。この出芽小胞は、その後初期エンドソームへ輸送される。

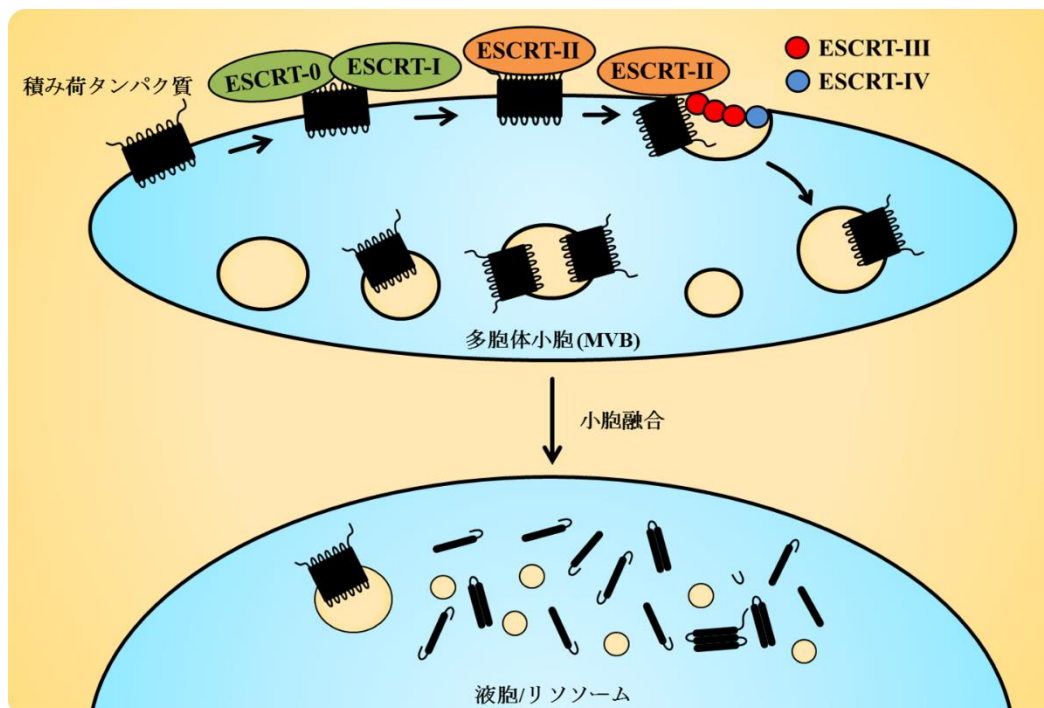


図4 多胞体小胞形成と液胞への小胞輸送

初期エンドソームに輸送された基質タンパク質は、ESCRT-0 および ESCRT-Iにより識別され、ESCRT-IIに渡される。ESCRT-IIは、膜陥入を制御するESCRT-IIIの足場として小胞形成に関与する。エンドソーム内腔に陥入した膜区画は、ESCRT-IVにより切り離され、小胞が出芽する。この過程を経て形成された多胞体小胞は、最終的に液胞/リソソームと融合する。これにより、多胞体小胞の内腔に局在する基質タンパク質や小胞は、液胞/リソソーム内腔に放出され、分解される。

ユビキチン化修飾

エンドサイトーシスを含む様々なタンパク質分解機構において、ユビキチンと呼ばれる低分子タンパク質による翻訳後修飾は、分解する基質の選択、あるいは分解装置自体の制御に関与する重要な因子である。ユビキチン化のメカニズムは、真核生物に広く保存されたタンパク質の翻訳後調節機構として広く知られており、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) から構成された複合酵素系が、76 アミノ酸残基からなるユビキチンの基質タンパク質への共有結合 (ユビキチン化) を触媒する (46) (図 5)。ユビキチンは基質の Lys 残基に結合するが、その結合様式は大きく 3 つのタイプに分別され、1 つの Lys 残基にユビキチン 1 分子が結合するモノユビキチン化、複数の Lys 残基に 1 つずつユビキチン分子が結合するマルチユビキチン化、そして 1 つの Lys 残基に鎖状のユビキチン多量体が結合するポリユビキチン化がある(47-49) (図 6)。基質への結合様式によってユビキチンが有する

役割がそれぞれ異なっており、タンパク質のモノユビキチン化は、ポリユビキチン鎖形成の足場として、あるいはエンドサイトーシスや DNA 修復のシグナルとして用いられる (50, 51)。モノユビキチン化と同様に、マルチユビキチン化もポリユビキチン鎖形成の足場となることに加え、エンドサイトーシスのシグナルとして機能する (52)。

ポリユビキチン化においては、既に基質に結合したユビキチン分子内の 7 つの Lys 残基 (K6/K11/K27/K29/K33/K48/K63) および N 末端に位置する Met 残基 (M1) のどのアミノ酸残基に新たなユビキチンが修飾するかによって、その結合様式が多数存在する。最も広く知られているユビキチン化修飾は K48 ユビキチン鎖であり、基質のプロテアソーム分解のシグナルとなる (53)。また、K63 ユビキチン鎖も解析が進められており、主にエンドサイトーシスなどの細胞内小胞輸送のシグナル因子として用いられる (54-57)。さらに近年、K63 ユビキチン鎖が DNA 修飾や免疫応答にも関与する知見が得られており (58-61)、このユビキチン鎖に関わる生命現象の全体像解明が求められている。

K6 ユビキチン鎖については、UV による DNA ダメージ応答に関与することや、マイトファジーの誘導に関与することが報告されているものの、詳細なメカニズムは明らかになっていない (62-65)。また、病原微生物感染の際に、細菌から動物細胞内に放出されるエフェクター分子である E3 ユビキチンリガーゼが、K6 ユビキチン鎖を形成することも報告されている (66, 67)。

K11 ユビキチン鎖は、細胞周期においてプロテアソームによる分解シグナルとしての役割を有している。これまでに、K11 ユビキチン鎖を形成する E3 ユビキチンリガーゼとして、APC/C ユビキチンリガーゼが報告されている (68, 69)。また、このユビキチン修飾は、他のユビキチン化修飾パターンを組み合わせたヘテロ型で検出されることが多い。

K27 ユビキチン鎖については、RING 型ユビキチンリガーゼの RNF168 と HECT 型ユビキチンリガーゼの HACE1 が、このユビキチン鎖を形成することが報告されている (70-72)。RNF168 は、DNA 損傷応答の際に、ヒストン H2A のユビキチン化に関わることから、核内に局在すると考えられている。また、HACE1 は Optineurin のユビキチン化を介してオートファジーの制御に関与すると考えられている。上記のように K27 ユビキチン鎖を形成するユビキチンリガーゼは同定されたものの、このユビキチン鎖の役割については、ほとんど明らかになっていない。

K29 および K33 ユビキチン鎖は、近年発見されたユビキチン修飾構造であり、双方ともプロテアソームによる分解に関与することが示唆されている (73, 74)。なお、K29 ユビキチン鎖は主に免疫応答に関与すること、K33 ユビキチン鎖はプロテアソーム分解のシグナルに加え、ゴルジ体からの小胞輸送に関与することが報告されている (75, 76)。

M1 ユビキチン鎖は、ユビキチン分子内の Lys 残基を介さないユビキチン化修飾であり、ユビキチン鎖が直鎖状に連なった特徴的な構造となっている。このユビキチン鎖はヒトの免疫反応に関与しており、RING 型ユビキチンリガーゼである LUBAC に

より形成される (77–81)。基質の M1 ユビキチン鎖はタンパク質複合体形成の足場となることで、タンパク質間相互作用を促進させ、NFκB シグナルを効率良く伝達する。

上記に示したユビキチン鎖は全てホモ型であるが、近年、複数の修飾パターンを組み合わせたヘテロ型の分岐鎖ユビキチンが相次いで発見された。これまでに、HACE1 ユビキチンリガーゼによる K27/K48 分岐鎖ユビキチン、UBE3C ユビキチンリガーゼによる K29/K48 分岐鎖ユビキチン、APC/C ユビキチンリガーゼによる K11/K48 分岐鎖ユビキチンなどが報告されている (66, 72, 75, 82–86)。この分岐鎖ユビキチンは、ホモ型ユビキチン鎖の役割をそれぞれ併せ持っており、基質の効率的なプロテアソーム分解、あるいは迅速なシグナル伝達を可能にする。この分岐鎖ユビキチンについては、現在盛んに研究が進められている。

これらのユビキチン化修飾は、ユビキチン結合ドメイン (UBD) を持つタンパク質により認識され、その下流にシグナルが伝達される。ユビキチン分子内の Ile44 は、プロテアソームや脱ユビキチン化酵素との相互作用に関わることが知られている (87)。上記の例に加え、Leu8、Ile36、Val70 などの疎水性アミノ酸残基が、UBD を有するタンパク質に認識されることが報告されている (77, 88–90)。

また、興味深いことに、ユビキチン分子の翻訳後修飾も近年発見されており、これまでに、Thr14 および Ser20/57/65 がリン酸化されることが報告された (91, 92) (図 7)。特に Ser65 は、PINK1 キナーゼによりリン酸化され、ミトファジーに関与することが示されている (93, 94)。これらのアミノ酸残基のリン酸化に加え、Lys6/48/63 のアセチル化が質量分析計を用いた解析により同定されている (95)。これらアミノ酸残基のアセチル化は、ユビキチン鎖形成を阻害する役割を担うと考えられている。

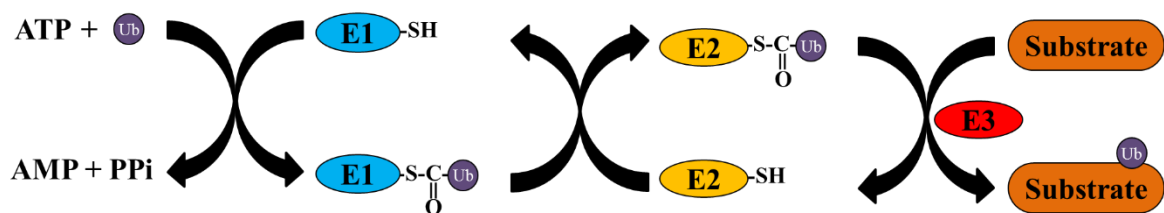


図 5 ユビキチンシステム

ユビキチン化活性化酵素 (E1) によって ATP 依存的に活性化されたユビキチン (Ub) が、ユビキチン結合酵素 (E2) に渡され、ユビキチンリガーゼ (E3) が E2 から基質へのユビキチンの共有結合を触媒することによりユビキチン化が生じる。

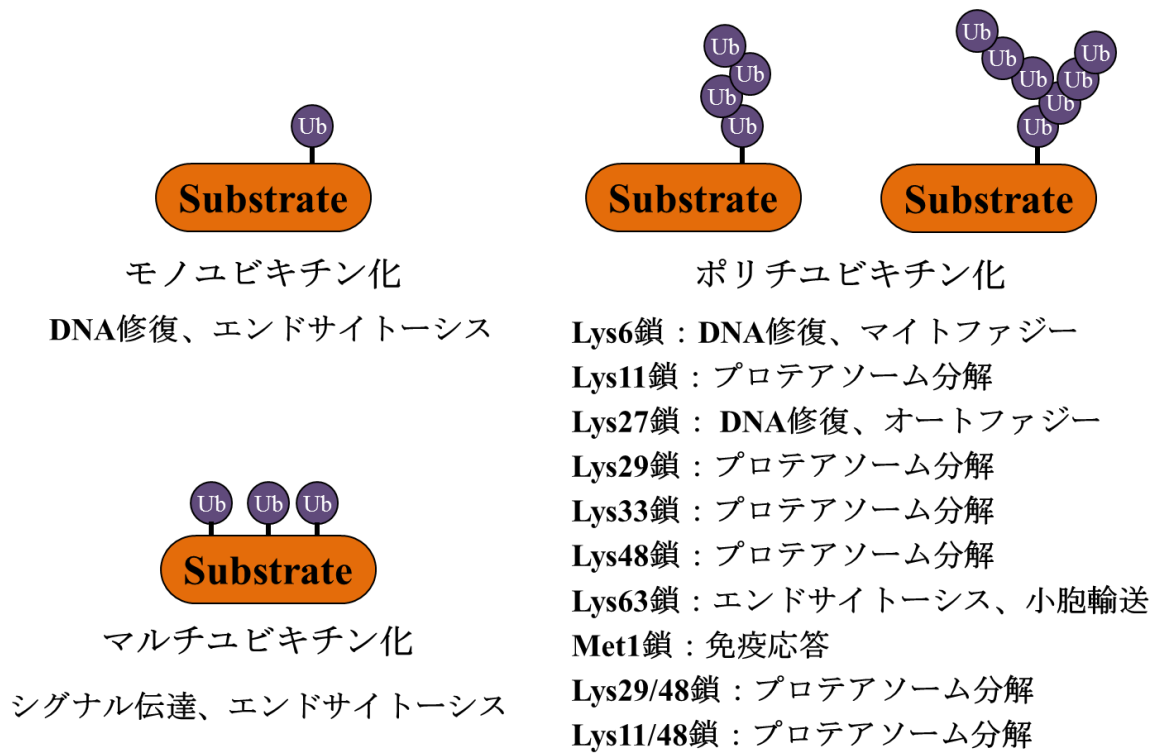


図6 ユビキチンシグナル

ユビキチン (Ub) の結合様式は、モノユビキチン化、マルチユビキチン化およびポリユビキチン化に分けることができる。ポリユビキチン化は、既に基質と結合したユビキチン分子内のどの Lys 残基に新たなユビキチンが修飾するかによって、さらにホモ型とヘテロ型に分けられる。基質に対するユビキチンの結合様式により、細胞内での役割がそれぞれ異なる。図は (48) を参考にして作製。

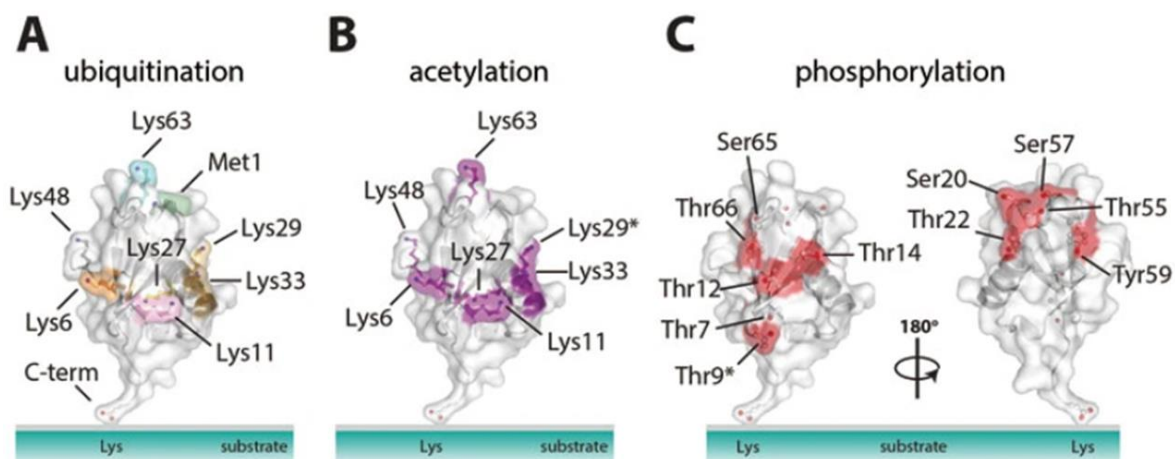


図7 ユビキチンの翻訳後修飾部位

A) ユビキチン化修飾部位。これらのアミノ酸残基のユビキチン化により、ポリユビキチン鎖が形成される。B) アセチル化修飾部位。これら Lys 残基のアセチル化により、ポリユビキチン鎖の形成が阻害される。C) リン酸化修飾部位。基質に結合したリン酸化状態のユビキチンは、特定のシグナルを伝達する役割を持つ。図は、(91) から引用。

HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5

上記のように、多様なユビキチン化修飾が様々な生命現象の引き金となるため、対象となる基質タンパク質に応じて、ユビキチン化修飾を厳密に使い分ける必要がある。したがって、ユビキチン化の最終ステップを担当する E3 には、ユビキチン化の基質を選択的に認識し、E2 から基質にユビキチンを転移させる働きがあるため、ユビキチン化の反応の中で最も重要な酵素である。*S. cerevisiae* における E3 ユビキチンリガーゼの一つである Rsp5 は、タンパク質をユビキチン化することで、環境応答やタンパク質品質管理などの重要な生命現象に深く関わっている。Rsp5 は、真核生物において広く保存された Nedd4 ファミリーに属する Homologous to the E6-AP carboxyl terminus (HECT) 型ユビキチンリガーゼであり、N 末端に膜との結合に関与する C2 ドメイン、中央部分に基質タンパク質上の認識配列である Pro-Pro-X-Tyr から成る配列 (PY モチーフ) と結合する WW ドメイン、C 末端にユビキチンリガーゼ触媒部位である HECT ドメインを有している (96) (図 8, 9)。

C2 ドメインは、哺乳類プロテインキナーゼ C 内の保存性の高い 4 つのドメインの内、2 番目のドメインとして同定された。現在までに、プロテインキナーゼ C における C2 ドメインの機能として、Ca²⁺ との結合を介してリン脂質と相互作用し、プロテインキナーゼ C の膜区画へのリクルートに関与することが報告されている (97)。Rsp5 の C2 ドメインにおいては、ドメイン内に存在する 5 つの Lys 残基 (K44/K45/K75/K77/K78) が生体膜の成分の一つであるリン脂質のフォスファチジル

イノシトールと直接相互作用する (98)。したがって、Rsp5 は、C2 ドメインの機能を介して膜区画に局在移行すると考えられている。一方で、C2 ドメインはタンパク質間の相互作用にも関与する。Rsp5 のヒトオルソログである Nedd4 において、C2 ドメインが HECT ドメインと物理的に分子内相互作用することでユビキチンリガーゼ活性を抑制するという新規な機能が報告された (99)。さらに、Rsp5 の C2 ドメインが小胞輸送に必須な Sec7 タンパク質と直接的に相互作用することからも (100)、C2 ドメインが有する多様な機能が、細胞内における Rsp5 の役割を制御する上で重要であると考えられている。

WW ドメインは、Trp-Trp 残基が並ぶおよそ 20 アミノ酸残基からなるドメインであり、Rsp5 は 3 つの WW ドメインを有している。これら WW ドメインは、逆並行 β -シートをそれぞれ形成し、それぞれの疎水性ポケットにより、I-IV のグループに属するモチーフを認識する (101-104)。グループ I は、一次配列上の Pro-X-Tyr、Leu-Pro-X-Tyr あるいは Pro-Pro-X-Tyr を認識し、グループ II および III は Pro-Pro-Leu-Pro、Pro-Pro-Arg をそれぞれ認識するグループである。また、グループ IV は、Pro に続くリン酸化された Ser あるいは Thr 残基を認識することが知られている。Rsp5 に存在する 3 つの WW ドメインは、グループ I に属するとされているが、これまでにプロリン残基が富んだ配列を認識することも報告されており (105)、WW ドメインの認識機構には未だに不明な点が多く残っている。Rsp5 は、PY モチーフを持たない基質をユビキチン化することも知られており、この場合、PY モチーフを有するアダプタータンパク質を介して基質を認識する。この WW ドメインの立体構造は、基質の選択性を生み出す上で重要な役割を有しており、これまでにマウスにおける Nedd4 ファミリーの Itch において、WW ドメインのリン酸化が PY モチーフを有する基質との相互作用を減弱させることが報告された (106)。また、Rsp5 においても Thr357 が Ala に置換した変異 (*RSP5*^{T357A}) により、Arrestin-related trafficking (Art) ファミリータンパク質である Bul2 との相互作用が強化された (107)。さらに、Rsp5 の Thr255 を Ala に置換した変異 (*RSP5*^{T255A}) は、塩ストレスに耐性を付与することや、Pro343 が Ser に置換 (*RSP5*^{P343S}) することにより、異種タンパク質であるヒト α -シヌクレインの細胞毒性を緩和することが報告されている (108, 109)。これらの翻訳後修飾やアミノ酸置換は、WW ドメインの立体構造を変化させた結果、基質との親和性に影響が生じたものと考えられているが、その分子メカニズムは明らかになっておらず、詳細な機構の解明が求められている。

HECT ドメインは、Rsp5 分子内で最も解析が進んだドメインである。HECT ドメインは E2 に結合した活性化ユビキチン分子を活性中心である Cys777 に転移し、基質タンパク質のユビキチン化を行う (96)。したがって、活性中心の Cys 残基を Ala に置換 (*rsp5*^{C777A}) すると、Rsp5 の活性が完全に失われる。また、HECT ドメイン内の Leu733 が Ser に置換した Rsp5 の変異 (*rsp5*^{L733S} / *rsp5-1*) は、Rsp5 の温度感受性変異として広く用いられている (110-112)。当変異体は、非制限温度下 (30 °C) ではユビキチンリガーゼ活性を有するが、制限温度下 (38 °C) ではタンパク質の安定性が低下し、

Rsp5 の活性が失われる。したがって、HECT ドメインが Rsp5 の酵素活性を決定付ける最も重要なドメインである。

上記のように Rsp5 は各ドメインの機能を協調的に用いることで、多様な基質をユビキチン化する。これに加え、リン酸化やユビキチン化による Rsp5 の翻訳後修飾、あるいは脱ユビキチン化酵素の働きも Rsp5 のユビキチン化活性に大きな影響を及ぼすことが知られている (図 10)。これまでに、Rsp5 の Thr761 がプロテインキナーゼ A によりリン酸化され、ユビキチン化活性が低下することが報告されている (113)。また、Rsp5 の脱リン酸化状態を模した変異 (*RSP5*^{T357A}) は、恒常的に Gap1 を液胞へ輸送することから、Rsp5 のリン酸化は Rsp5 の活性を抑制すると考えられている (114)。Rsp5 のユビキチン化については、Lys432 のユビキチン化が知られている (115)。このユビキチン化は、Rsp5 のホモ多量体化を誘導し、Rsp5 を不活性化することが示されている。また、Rsp5 の脱ユビキチン化には、Ubp2 が主に拮抗酵素として関与する (116–118)。Ubp2 は、ユビキチン結合ドメインを有する Rup1 を介して Rsp5 と相互作用し、Rsp5^{Rup1/Ubp2} 複合体を形成すると考えられている (119)。この複合体形は、Rsp5 が標的とする基質タンパク質の脱ユビキチン化およびユビキチン鎖の種類を決定付ける。Rsp5 は K63 ユビキチン鎖を形成するユビキチンリガーゼとして知られているものの、熱ショックストレス時には、細胞質中のタンパク質を K48 ポリユビキチン化する (112)。この機構では、Ubp2 および Ubp3 から成る脱ユビキチン化酵素の複合体が、Rsp5 による基質の K63 ポリユビキチン化を阻害するため、結果として K48 ユビキチン鎖が形成され、基質のプロテアソーム分解を促進する (120)。上記のような、Rsp5 の機能制御は Rsp5 が関わる様々な生命現象を厳密に調節する上で重要な役割を担うと考えられている。

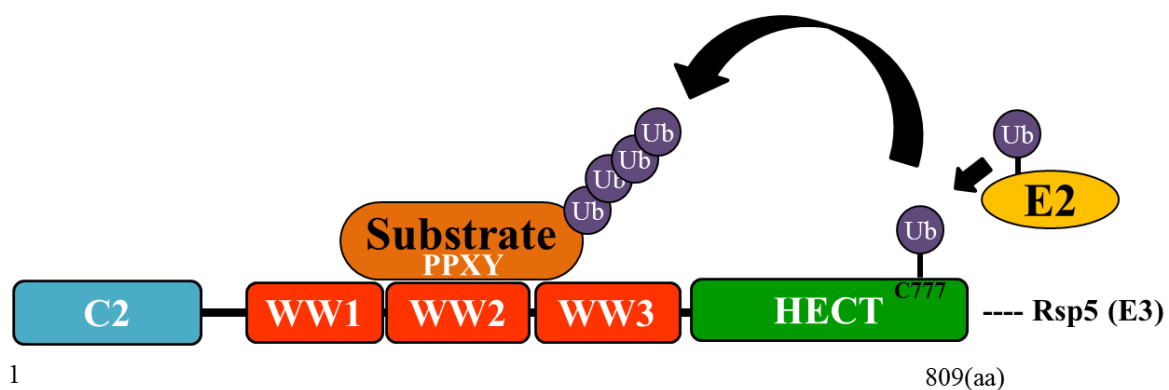


図8 Rsp5によるユビキチン化反応の概略

HECT型ユビキチンリガーゼ Rsp5 は、E2 に結合しているユビキチン (Ub) を HECT ドメインに位置する活性中心である Cys 残基にチオエステル結合させた後、基質タンパク質の Lys 残基に転移させる。この際、WW ドメインは、基質タンパク質が有する PY モチーフと結合することで標的の認識を行う。また、PY モチーフを有していないタンパク質を基質とする際、PY モチーフを有しているアダプタータンパク質を介して基質と結合する。

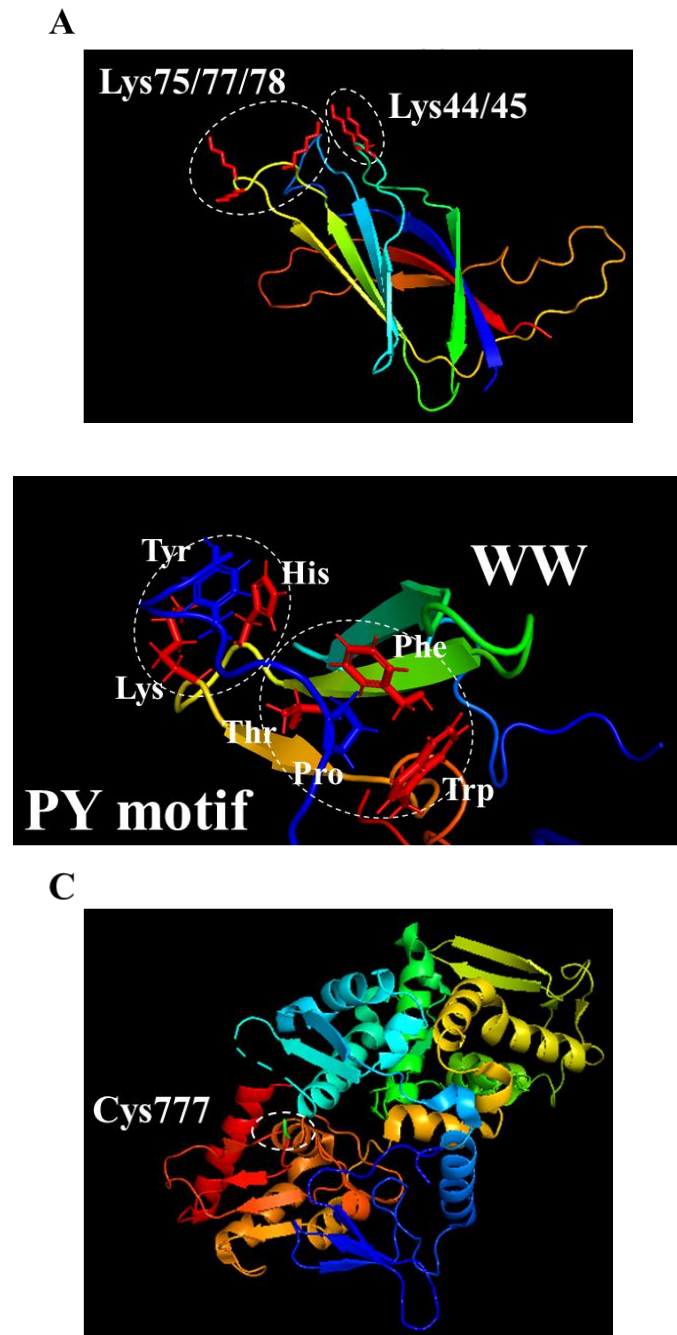


図9 Rsp5におけるC2ドメイン、WWドメイン、HECTドメインの各立体構造

A) C2ドメインの立体構造。Rsp5のC2ドメインのアミノ酸配列(1-140 a.a.)とNedd4のC2ドメインの構造(Protein Data Bank no. 3B7Y.1.A)をもとに、SWISS-MODELソフトウェアを用いてモデルを作製した。作製したモデル構造は、PyMOLソフトウェアを用いて表示した。赤色で示す5つのLys残基が生体膜との相互作用に必要である。B) WWドメインの立体構造。Nedd4のWW3ドメインとPYモチーフを有する基質(Protein Data Bank no. 1I5H)をPyMOLソフトウェアにより作製した。基質認識に関わるWWドメイン内のアミノ酸残基(Phe, His, Lys, Thr, Trp)を赤色で示し、基質ペプチドを青色で示す。C) HECTドメインの立体構造。(Protein Data Bank no. 4LCD)をPyMOLソフトウェアにより作製した。活性中心のCys残基を緑色で示す。

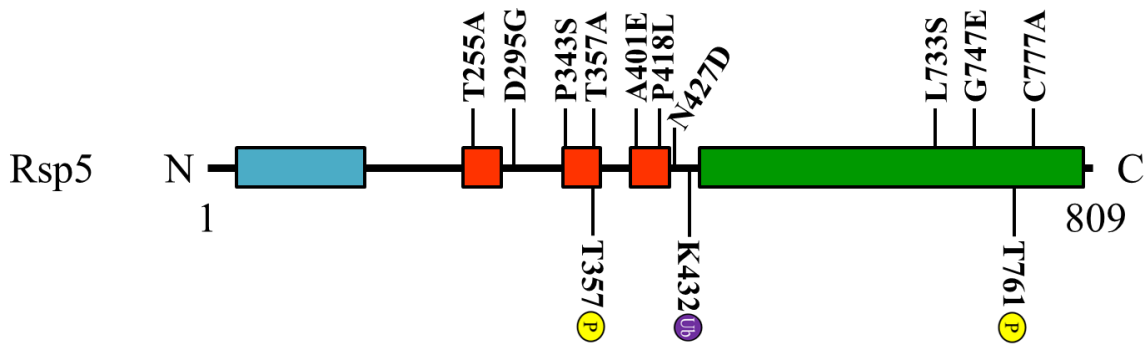


図 10 Rsp5 における既知の一アミノ酸置換と翻訳後修飾部位

Rsp5 のドメイン構造を示しており、N 末端から順に C2 ドメイン (■)、WW ドメイン (■)、HECT ドメイン (■) が並ぶ。それぞれのアミノ酸置換は、Rsp5 の基質選択性やユビキチンリガーゼ活性に影響を及ぼす。リン酸化およびユビキチン化による翻訳後修飾は、Rsp5 の活性を抑制すると考えられている。(Ub; ユビキチン, P; リン酸)。

Rsp5 が関わる生命現象

1) Rsp5 による不飽和脂肪酸合成の制御

Rsp5 の最も重要な生理的役割の一つは、生育に不可欠なオレイン酸を合成することである。酵母における不飽和脂肪酸は、脂肪酸不飽和化酵素 Ole1 により合成され、OLE1 遺伝子の発現は小胞膜結合型の転写因子である Spt23 および Mga2 により調節されている (121, 122)。Spt23 および Mga2 が OLE1 の転写を活性化するためには、Rsp5 によりユビキチン化される必要がある。このユビキチン化は、プロテアーゼを未成熟の Spt23 および Mga2 にリクルートし、それぞれの細胞質領域の部分的な分解を引き起こすことで、分子量 120 kDa (120p) の Spt23 および Mga2 から分子量 90 kDa (90p) の活性型 Spt23 および Mga2 を生成する。また、部分分解により生じた 90p は、Rsp5 により付加されたユビキチン鎖を有しており、これを目印に Cdc48^{Npl4/Ufd1} セグレターゼ複合体がリクルートされる (123, 124)。この複合体は、90p の核内移行を促進し、OLE1 遺伝子の転写を活性化させる。したがって、RSP5 遺伝子の欠損、あるいは Rsp5 の活性中心のアミノ酸置換 (*rsp5*^{C777A}) は、培地に不飽和脂肪酸を供給するか、あるいは酵母に OLE1 遺伝子を導入しなければ生育が困難である。

2) 細胞膜での役割

最もよく研究されている Rsp5 の機能は、細胞膜に局在するタンパク質のユビキチン化を介したエンドサイトーシスの誘導である。まず、 α -ファクター受容体の Ste2 については古くから研究が進められており、Ste2 の細胞内局在を指標に Rsp5 の各ドメインの機能や、重要なアミノ酸残基について解析が進められた (125)。また、Rsp5 は

様々な環境変化によりエンドサイトーシスを誘導することが知られており、アミノ酸パーミアーゼ **Gap1** は、窒素源の変化およびエタノールや過酸化水素などのストレスに応答したエンドサイトーシスのモデル基質として用いられてきた (14, 126–128)。さらに、**Gap1** の細胞内局在を指標に、**Npr1** キナーゼおよびフォスファターゼの **Sit4** など、**Rsp5** の活性を制御する因子についても同定された (127)。**Rsp5** はメチオニンパーミアーゼ **Mup1** を基質とすることも知られており、**Mup1** を用いた解析を通じて、**Art** ファミリータンパク質の発見、および **Art** ファミリーに保存された機能について研究が進められている (129–132)。アルギニンパーミアーゼ **Can1** は、過剰なアルギニンが環境中に存在すると、**Rsp5** によりユビキチン化される (14, 15)。**Can1** の様々な変異体を用いて、**Can1** の立体構造の変化が **Rsp5** によるユビキチン化とエンドサイトーシスに及ぼす影響が解析された。ヘキソーストランスポーターの **Hxt1** および **Hxt3** を用いた研究では、AMP-activated protein kinase (AMPK) の **Snf1** が **Art** ファミリータンパク質のリン酸化を介して、**Rsp5** の機能を制御することが明らかにされている (133)。また、これらのタンパク質は哺乳類にも保存されており、糖尿病の発症機構を解明するモデルにも用いられている (134)。これら細胞膜上のタンパク質のエンドサイトーシスには **K63** ユビキチン鎖を必要とすることから、**Rsp5** は **K63** ユビキチン鎖の形成を介して細胞膜の恒常性維持に関与すると考えられている (116, 120, 135–138)。

一方、細胞膜上の基質以外にも、**Rsp5** はエンドサイトーシスの進行を調節するエンドサイトーシス関連タンパク質である **Chc1**, **Ent2**, **Rvs167** をユビキチン化することや、**Sla1/2**, **Las17**, **Crn1**, **Ede1** と直接相互作用することがそれぞれ報告されている (139–142)。また、**Rsp5** は液相エンドサイトーシスの調節に関与することから、**Rsp5** がエンドサイトーシス関連タンパク質の制御を介してエンドサイトーシス全体を調節する可能性も考えられている。しかしながら、これらタンパク質のユビキチン化の意義は未だ明らかになっていない。

3) 小胞体/ゴルジ体での役割

Rsp5 は小胞体膜およびゴルジ体膜上において、基質タンパク質のユビキチン化により、小胞輸送を調節する。これまでに、**Rsp5** が Coat protein complex II (COPII複合体) を構成する GTPase の **Sec23** をユビキチン化することが報告されている (143)。このユビキチン化はポリユビキチン鎖形成の足場となり、ポリユビキチン化された **Sec23** はプロテアソームにより分解される。一方で、**Rsp5** による **Sec23** のユビキチン化が、脱ユビキチン化酵素の **Ubp3** から構成される **Cdc48^{Ubp3/Bre5}** 複合体をリクルートすることから、**Rsp5** は **Sec23** のユビキチン化を介してそのタンパク質量を調節し、小胞体からゴルジ体への小胞輸送を制御していると考えられている。また、アクチンフィラメントを構成する **Sla1** と COPI構成因子から成る複合体が、**Rsp5** と相互作用することから、ゴルジ体から小胞体間への小胞輸送の調節にも関与していると考えられている (144)。さらに、**Rsp5** は **C2** ドメインを介して、**Arf** GTPase の **Sec7** と相互作用する (100)。この相互作用はフォスファチジルイノシチド-3-キナーゼの **Vps34** により促

進されるが、Rsp5 と Sec7 の相互作用の意義については、未だ不明である。現在のところ、Sec7 がゴルジ体に局在するために必要なのではないかと考えられている。上記に示すように、Rsp5 は小胞体-ゴルジ体間の膜輸送タンパク質の制御を介して小胞輸送に関与しているものの、未だに報告は少なく、不明な点が多く残る。

一方、ゴルジ体からエンドソームを介した液胞へのタンパク質の輸送は、モデル基質である液胞カルボキシペプチダーゼ S の Cps1 およびポリフォスファターゼの Phm5 を用いて解析が進められている (145)。Rsp5 はこれらの積み荷タンパク質をユビキチン化し、基質を効率良く液胞に輸送している。

4) エンドソーム/多胞体小胞での役割

細胞膜上のタンパク質、あるいはゴルジ体から分泌される一部のタンパク質は、エンドソームを介して多胞体小胞に輸送される。これらのタンパク質は、Rsp5 により K63 ポリユビキチン化されており、このユビキチン化を目印に ESCRT 複合体がエンドソームの成熟を促進する (146)。一方、基質の中にはユビキチン化修飾を受けていないタンパク質も存在し、このような場合、Rsp5 がエンドソーム膜上に局在するアダプタータンパク質の Sna3 を介してエンドソーム膜上の基質を認識し、ユビキチン化する (147-150)。エンドソーム膜に局在する基質のユビキチン化については、Cps1 や Phm5 を用いて解析が進められており、ユビキチン化に欠損が生じると、これらの基質が液胞膜上に局在する (145)。さらに、Rsp5 は、Vps17 および Vps23 などのユビキチン結合ドメインを有する ESCRT 複合体構成因子のユビキチン化にも関与することから、エンドサイトーシス関連タンパク質のユビキチン化と同様に、何らかの機能を付与する修飾であると考えられている (136)。

5) 液胞での役割

液胞/リソソームはタンパク質の分解あるいはアミノ酸の貯蔵などの役割を担い、細胞の恒常性を維持する上で必須な細胞小器官である。Rsp5 は液胞膜上に局在するタンパク質の分解にも関与しており、この場合、アダプタータンパク質である Ssh4 を介して基質を認識する。これまでに、この Rsp5^{Ssh4} から構成される Vacuole anchored ubiquitin ligase (VAcUL) 複合体が液胞膜上に局在するアミノ酸トランスポーターの Ypq1 をユビキチン化することが報告されている (151)。このユビキチン化により、Ypq1 を含む液胞膜画分は一度液胞膜から細胞質へ出芽し、初期エンドソームとの融合を介して、多胞体小胞の内腔へと輸送される。そして、Ypq1 を含む多胞体小胞が再び液胞へ運ばれ、Ypq1 が分解される。

ほとんどの細胞膜タンパク質は、エンドサイトーシスおよびエンドソーム内腔への局在移行を経て液胞内に輸送されるが、多胞体小胞形成過程で何らかの欠陥が生じ、多胞体小胞の外膜側に膜タンパク質が局在した結果、液胞での分解を逃れて液胞膜上に局在する細胞膜タンパク質も存在する。このようなタンパク質のモデルとして Mup1、細胞壁センサーの Wsc1、リジンパーミアーゼ Lyp1 を用いて解析が進められ

ており、これらの分解にも上記に示した VAcUL 複合体が基質のユビキチン化を担っている (152)。

6) 細胞質での役割

これまでに、42 °Cの熱ショックストレスにより、Rsp5 依存的に細胞質のピルビン酸キナーゼ Cdc19 やピルビン酸脱炭酸酵素 Pdc1、翻訳終了因子の Sup45 がユビキチン化されることが報告されている (153)。これらのユビキチン化では、Rsp5 が熱ショックストレスより変性したタンパク質の PY モチーフを直接認識する機構、およびアダプタータンパク質である Ydj1 を介して認識する機構の 2 つの方法で基質を選択する。Rsp5 はアクチンフィラメントの形成を調節する Lsb1 のユビキチン化も行うことが報告されており、おそらく Lsb1 の細胞内局在に関与すると考えられている (154)。また、Lsb1 のユビキチン化は、翻訳終了因子の Sup35 を核としたプリオン形成にも影響を及ぼすことから、Rsp5 による Lsb1 の機能制御がタンパク質の凝集を防ぐ上で重要な役割を担うことが示唆されている。

さらに、Rsp5 はリボソームの安定性にも関与する。これまでに、Rsp5 における Pro418 が Leu に置換した変異 (*rsp5^{P418L}/rsp5-19*) により、富栄養条件でのリボソーム分解が促進されること、あるいは逆に、Rsp5 が窒素源飢餓時のリボファジー誘導に関与することが報告されている (155, 156)。しかしながら、どのようなメカニズムで Rsp5 がリボソームの安定性に関与するかについては不明である。

上記に加え、細胞質における Rsp5 の大きな役割として、ミトコンドリアタンパク質の品質管理機構がある。ミトコンドリアに局在するタンパク質のおよそ 15 %は細胞質で翻訳が行われ、ミトコンドリアへと輸送される。これまでに、Rsp5 はミトコンドリア間隙に局在するシトクロムオキシダーゼを構成する Cox12 を細胞質中でユビキチン化し、Cox12 の分解を引き起こすことが報告されており、Rsp5 の細胞質での機能はミトコンドリアの恒常性維持にも寄与することが示されている (157)。

7) 核での役割

Rsp5 は HECT ドメイン内に 1 つの核移行シグナル (NSL) と 2 つの核局在シグナル (NLS) を持つことが報告されており (158)、Rsp5 は核内においても何らかの役割を担うと考えられている。核内での Rsp5 の働きは、RNA の転写調節、RNA の核外輸送、クロマチンのリモデリングに分けられる。

まず、mRNA の転写調節については、RNA ポリメラーゼII複合体を構成する Rpb1 のユビキチン化が最も解析されている (159–163)。mRNA の転写途中において、RNA ポリメラーゼII複合体が損傷を負った DNA 部位に遭遇すると、mRNA の伸長が停止する。Rsp5 は停止状態にある RNA ポリメラーゼII複合体の中から、Rpb1 の C 末端側に位置する PY モチーフを認識し、Rpb1 をユビキチン化する。これにより、RNA ポリメラーゼII複合体が DNA から脱離し、Cdc48^{Ubx5} セグレターゼ複合体によりプロテアソームに運ばれ、分解される。このような一連の過程を経て、Rsp5 は RNA ポリメ

ラーゼII複合体の機能を制御していると考えられている。さらに、Rsp5 は RNA ポリメラーゼI複合体やRNA ポリメラーゼIII複合体の構成因子である Rrn3 や Rrn5などを基質とすることも報告されており (139, 140)、RNA ポリメラーゼ複合体の機能制御を介して、mRNA の転写調節に関与している。

rRNA の調節においては、*rsp5*^{P418L} 変異により、核内に未成熟の 60S リボソームサブユニットが蓄積すること、35S rRNA の切断によって生じる 20S rRNA や 27S rRNA の量が減少することが報告されている (155)。また、Thr104/Glu673/Gln716 が、それぞれ Ala/Gly/Pro に置換した変異 (*rsp5*^{T104A/E673G/Q716P}/*rsp5-3*) や *rsp5*^{L733S} 変異により、細胞内の成熟 rRNA 量およびリボソームタンパク質量自体が減少することからも、Rsp5 は rRNA の成熟に必要であると考えられている (164)。さらに、rRNA の核外輸送に関与する Crm1 や Nmd3 は Rsp5 の基質であることから、rRNA の輸送にも関与していることが推測されている (164)。

なお、RNA の核外輸送については、mRNA に関しても rRNA と同様の知見が報告されている。これまでに、*rsp5*^{L733S} 変異株において、核内に poly (A)⁺RNA が蓄積していることや、解糖系の代謝酵素である Pkg1、Ssa heat shock タンパク質の Ssa1, Ssa2, Ssa3 をコードする mRNA が核内に蓄積していることが示されている (165)。また、*rsp5*^{A401E} 変異株において、熱ストレスに応答した転写因子の Hsf1 および Msn2/4 をコードする mRNA が、核内に蓄積することが報告された (166)。上記に加え、Rsp5 が mRNA の核外輸送因子である THO 複合体を構成する Hpr1 をユビキチン化し、プロテアソームにより分解することや、mRNA の核外輸送に関わる Mex67 および Mtr2 を Rsp5 がユビキチン化することも知られている (167)。

tRNA においても、mRNA および rRNA と同様に、成熟や核外輸送の過程で Rsp5 が関与する。これまでに、tRNA の成熟に関わる Trz1 や Lhp1、あるいは tRNA の核外輸送に関わる Mrt10, Tef2, Los1 が Rsp5 の基質として報告されている (168)。さらに、*rsp5*^{P418L} 変異により tRNA^{Leu} や tRNA^{Tyr} などの様々な tRNA が核内に蓄積することが示されている (164)。しかしながら、tRNA の成熟および輸送に関する詳細な機構については、ほとんど明らかになっていない。

Rsp5 の核内での役割の一つであるクロマチンリモデリングについては、Rsp5 がユビキチンリガーゼの APC 複合体と共にクロマチンリモデリングを制御することが明らかにされている (169–171)。また近年、Rsp5 と Bull1 の複合体がコヒーシンの Smc1/3 ユビキチン化し、複製フォークの進行を調節することが示された (172)。これらの知見から、Rsp5 は核内で DNA および RNA の恒常性維持に重要な役割を担うと考えられている。

8) ミトコンドリアでの役割

Rsp5 のミトコンドリアにおける役割は、約 25 年前から遺伝学的に示されていたものの、どのようなメカニズムでミトコンドリアの恒常性維持に関わるかについては不明であった (173, 174)。近年、Rsp5 がミトコンドリア外膜に局在する Mdm12 および

Mdm34 をユビキチン化し、窒素源飢餓時のミトファジーを効率良く誘導することが示された (175)。また、Rsp5 がユビキチンリガーゼ複合体の SCF^{Mdm30} と共にミトコンドリア外膜上のミトフシン GTPase である Fzo1 をユビキチン化し、分解することが報告されている (176–178)。この Fzo1 のユビキチン化を介した分解調節は、ミトコンドリアの融合や機能維持に影響を及ぼすことが考えられており、細胞老化により液胞の機能が低下した場合は、Fzo1 の分解がミトコンドリアの機能を保つために必要であることが示されている。したがって、Rsp5 がミトコンドリア外膜の恒常性を調節することにより、ミトコンドリアの機能を維持していると推測されている。

アダプタータンパク質を介した膜タンパク質の認識

生体膜に局在する多くのタンパク質は PY モチーフを有しておらず、Rsp5 が直接的に相互作用することは困難である。したがって、Rsp5 は Art ファミリータンパク質を基質認識のアダプターに用いることにより、細胞膜上に局在するタンパク質のユビキチン化を行う。Art ファミリータンパク質は、N 末端に膜タンパク質との相互作用に必要なアレスチンドメインを有していること、および C 末端側に Rsp5 により認識される PY モチーフを有していることが特徴である (129, 179)。Art ファミリータンパク質は、アレスチンドメインを介して細胞膜上に局在する基質タンパク質の酸性領域を認識することで Rsp5 を基質ヘリクルートし、Rsp5 によるユビキチン化を手助けする (131)。近年、このアレスチンドメインは、いくつかのループ構造を有することが見出され、このループ領域のリン酸化および脱リン酸化が Art ファミリータンパク質の機能の特徴づける重要なドメインであることが報告された (180)。また、Art ファミリータンパク質は、Npr1 や calcineurin などの様々なキナーゼおよびフォスファターゼにより翻訳後修飾を受けており、Art ファミリータンパク質の脱リン酸化状態が活性化のシグナルであると考えられている。リン酸化による翻訳後修飾に加え、Art ファミリータンパク質がユビキチン化されることも報告されている (118, 129, 181)。この Art ファミリーのユビキチン化修飾状態は、その機能を制御する上で重要であり、過剰なユビキチン化修飾は Art ファミリータンパク質の分解が誘導され、Rsp5 のアダプターとしての役割を果たさなくなる。一方、Art ファミリータンパク質のモノユビキチン化状態は、Rsp5 との相互作用を増大し、効率的な基質のユビキチン化を引き起こす (182)。このユビキチン化状態は、脱ユビキチン化酵素である Ubp2 および Ubp15 によって調節されていることが見出されている。

表 1 に示すように、酵母には 14 種類の Art ファミリータンパク質が存在しており、それぞれのタンパク質が異なる基質を認識すること、一方、Gap1 の認識における Bul1 と Bul2、あるいは Fur4 の認識における Art1 と Art2 のように基質認識に冗長性があることが報告されている (134, 147, 183–187)。

表1 Art ファミリータンパク質とその基質

遺伝子名	基質
<i>ART1/LDB19</i>	Mup1, Ste2, Ste3, Can1, Lyp1, Tat2, Fur4
<i>ART2/ECM21</i>	Tat2, Fur4, Lyp1, Smf1, Thi7
<i>ART3/ALY2</i>	Gap1, Dip5, Ste3, Put4, Acr3
<i>ART4/Rod1</i>	Hxt1, Hxt3, Hxt6, Jen1, Acr3, Chc3, Ste2
<i>ART5</i>	Itr1
<i>ART6/ALY1</i>	Gap1, Dip5, Ste3
<i>ART7/ROG3</i>	Hxt3, Ste2
<i>ART8/CSR2</i>	Hxt6, Hxt7, Hxt2, Hxt4
<i>ART9/RIM8</i>	Rim21, Pma1
<i>ART10</i>	Not Known
<i>BUL1/SMM2/DAG1/RDS1</i>	Jen1, Gap1, Ptr2, Tat1, Tat2, Ctr1, Put4, Dal5
<i>BUL2</i>	Gap1, Ptr2, Tat1, Tat2, Ctr1, Put4, Dal5
<i>BUL3</i>	Not known
<i>SPO23</i>	Not known

上記のように、細胞膜上のタンパク質は主に Art ファミリータンパク質により識別されるものの、Art ファミリー以外のアダプタータンパク質も細胞内の様々な膜区画に局在する基質タンパク質または細胞質に局在するタンパク質の認識に関与することが報告されている (表 2) (149, 188–192)。これらのタンパク質は、Art ファミリーと同様に PY モチーフを有しており、Rsp5 との相互作用を介して Rsp5 を基質ヘリクルートする。また、Ssh4, Ear1, Sna3, Bsd2, Tre1/2, Rcr1/2 は、膜貫通領域をそれぞれ有しており、エンドソーム膜および液胞膜上で機能する。さらに、Ydj1 は変性した細胞質のタンパク質を認識するために必要な、唯一のアダプタータンパク質である。

表2 Art ファミリー以外のアダプタータンパク質

遺伝子名	基質	細胞内局在
<i>SSH4</i>	Fur4, Gap1, Sit1, Smf1, Ypq1 Mup1, Wsc1, Lyp1	液胞
<i>EAR1</i>	Fur4, Gap1, Sit1, Smf1	エンドソーム
<i>SNA3</i>	Mup1	エンドソーム、液胞
<i>BSD2</i>	Fur4, Itr1, Smf1, Tat2, Cps1	エンドソーム
<i>TRE1</i>	Sit1, Smf1, Cps1	エンドソーム、液胞
<i>TRE2</i>	Sit1, Smf1	エンドソーム、液胞
<i>RCR1</i>	Chs3	細胞膜
<i>RCR2</i>	Not known	液胞
<i>YDJI</i>	Cdc19, Pdc1, Sup45	細胞質

細胞膜タンパク質のユビキチン化

近年、Mup1 および Can1 を用いた解析により、細胞膜ドメインを形成するエイソソームを介したアミノ酸-ポリアミン-オルガノカチオン (APC) トランスポーターの局在制御機構が提唱された (15, 132, 193, 194) (図 11)。このモデルでは、まず炭素源が枯渇した条件下において APC トランスポーターはエイソソームに局在し、不活性化状態となっている。これは細胞内の ATP が減少した結果、プロテインキナーゼの AMPK が活性化され、エイソソーム構造を維持するためだと考えられている。エイソソームに局在する APC トランスポーターは、細胞外の基質と結合が可能な Outward-facing (OF) 構造を形成している。この構造により、アレスチンドメインが相互作用する領域が構造内部に配置し、Art ファミリータンパク質による認識から保護されている。これに加え、エイソソームが形成するドメイン構造により、Art ファミリータンパク質から隔離され、APC トランスポーターが安定して細胞膜上に局在する。一方、環境中に炭素源が存在する場合、Major facilitator superfamily (MSF) に属するグルコーストランスポーターなどにより、細胞内に炭素源が供給され、ATP の合成と並行して細胞膜上に局在する ATP 依存性プロトンポンプ Pma1 がプロトンを細胞外に放出する。また、細胞内 ATP レベルの上昇に伴い AMPK が不活性化し、エイソソーム構造の弛緩が誘導される。これにより、APC トランスポーターがエイソソームから離脱する。さらに、APC トランスポーターの基質アミノ酸が環境中に加わると、プロトンの濃度勾配により、細胞外の基質が APC トランスポーターの構造変化を介して細胞内へと取り込まれる。この構造変化により、APC トランスポーターは OF 状態から Inward-facing (IF) 構造となり、アレスチンドメインに認識される領域が細胞内に露出する。Rsp5 は、Art ファミリータンパク質を介して IF 構造の APC トランスポーターをユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導すると考えられている。

上記のエイソソームおよび膜タンパク質の構造変化を介したエンドサイトーシス機構とは異なり、窒素源の資化し易さがトランスポーターのエンドサイトーシスを誘導することも知られている(127, 195) (図 12)。アミノ酸パーミアーゼ Gap1 は、資化し難い窒素源であるアラントインが単一窒素源の場合は細胞膜上に局在するが、アンモニウムイオンなどの資化し易い窒素源が存在すると、Gap1 のエンドサイトーシスが誘導される。この機構においては、まず資化し易い窒素源あるいはアミノ酸が枯渇した条件下では、キナーゼである Target of rapamycin complex 1 (TORC1) の活性が抑制され、Npr1 による Bul1 と Bul2 のリン酸化が引き起こされる。14-3-3 タンパク質は、Bul1 と Bul2 のリン酸化状態に依存してこれらタンパク質と相互作用するため、上記の Bul1 と Bul2 のリン酸化は 14-3-3 との相互作用を促進し、Rsp5 と Bul1 および Bul2 を乖離させる。一方、環境中にアンモニウムイオンなどの資化し易い窒素源が存在する場合は、アンモニウムパーミアーゼである Mep1/2/3 により細胞外のアンモニウムイオンが細胞内に取り込まれ、TORC1 が活性化する。TORC1 の活性化は、Npr1 のリン酸化による不活性化および脱リン酸化酵素 Sit4 と Tap42 の相互作用を促進し、Bul1 および Bul2 の脱リン酸化を引き起こす。この脱リン酸化により、Bul1 と Bul2 は 14-3-3

と乖離し、Rsp5 と相互作用することが可能になる。この一連の反応により、Rsp5 が Gap1 をユビキチン化し、エンドサイトーシスを介してその活性を抑制する。

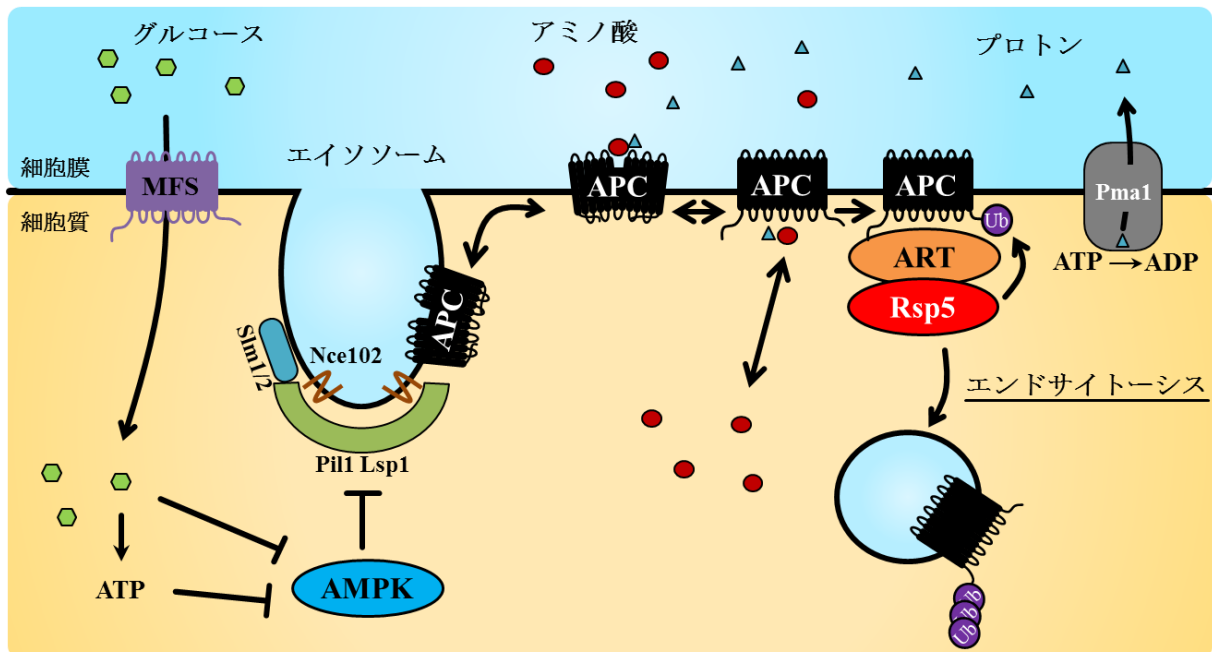
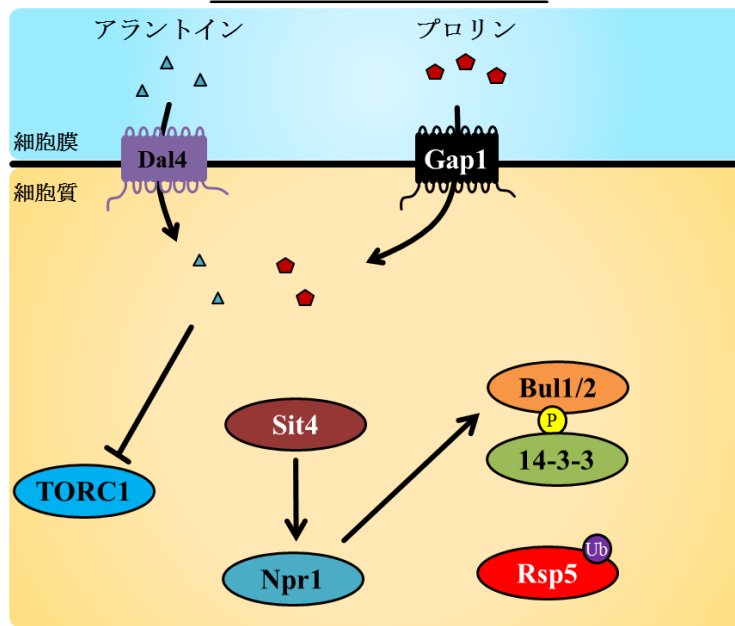


図 11 エイソソームを介した APC トランスポーターの制御機構

グルコース枯渇時は、細胞内 ATP 含量の低下により AMPK が活性化し、エイソソーム構成因子である Pil1, Lsp1, Shm1/2, Nce102 の機能によりエイソソームが維持される。APC トランスポーターは、この細胞膜ドメインに OF 構造で局在する。グルコースが環境中に存在する場合は、MFS トランスポーターにより環境中のグルコースが細胞内に取り込まれ、ATP の合成を進める。これにより AMPK の活性は抑制され、エイソソームの弛緩が生じ、APC トランスポーターがドメイン構造から脱離する。エイソソームの弛緩と並行して、Pma1 により ATP 依存的にプロトンが細胞外へ排出され、プロトンの濃度勾配が形成される。APC トランスポーターは、プロトンの濃度勾配および自身の立体構造の変化により、環境中のアミノ酸を細胞内に取り込み、IF 構造となる。Rsp5 と Art タンパク質の複合体は、IF 構造の APC トランスポーターを認識し、ユビキチン (Ub) を結合することでエンドサイトーシスを効率的に進める。

難資化性の窒素源条件



易資化性の窒素源条件

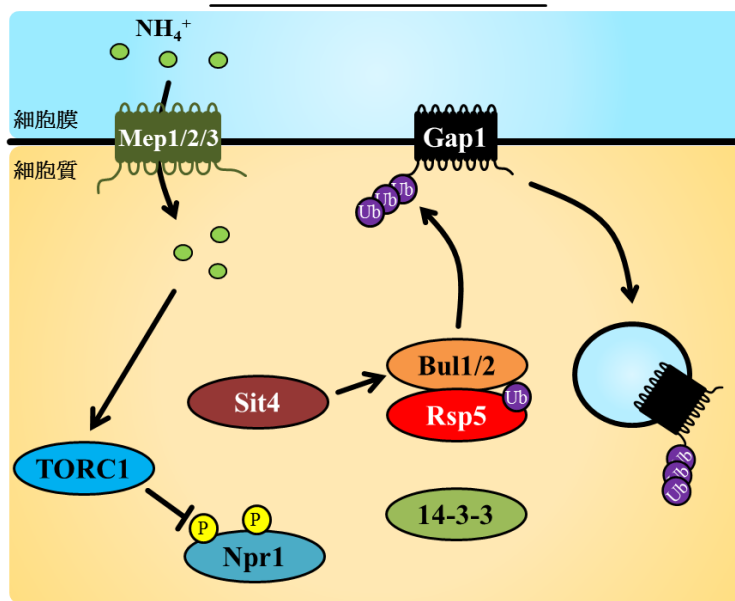


図 12 TORC 経路を介した Gap1 の抑制機構

A) 難資化性窒素源における Gap1 の活性化機構。アラントインやプロリンなどの難資化性の窒素源が単一窒素源の場合、TORC1 の活性が抑制され、Sit4 により Npr1 が脱リン酸化される。これにより活性化した Npr1 は、Bul1/2 をリン酸化する。14-3-3 はリン酸化した Bul1/2 と相互作用することにより、Rsp5 と Bul1/2 との相互作用を阻害する。その結果、Gap1 のエンドサイトーシスが抑制される。B) 易資化性窒素源における Gap1 の抑制機構。アンモニウムイオンなどの資化し易い窒素源が環境中に加わると、TORC1 の活性化を介して Npr1 が抑制される。Sit4 は Bul1/2 を脱リン酸化することで、14-3-3 との相互作用を乖離させる。Rsp5 は脱リン酸化状態の Bul1/2 と相互作用し、Gap1 のユビキチン化を介したエンドサイトーシスを促進する。(Ub; ユビキチン, P; リン酸)。

本研究の目的

上記に示したように、Rsp5 が様々な生命現象に関与することがこれまでの研究で示された。細胞膜上に局在するタンパク質の品質管理は、Rsp5 の主要な役割であり、細胞が環境の変化に応答、あるいは適応するために必須の機構である。しかしながら、細胞膜タンパク質の制御機構については、膜タンパク質の種類が多さから、その全体像は明らかになっていない。また、Rsp5 の各ドメインの機能が、基質タンパク質のエンドサイトーシスを誘導する上で重要であるものの、どのように機能が発揮されるのか、未だ不明な点が多く残されている。さらに、Rsp5 が属する Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼの欠陥による細胞内恒常性維持の破綻が、様々な疾患に関与することからも、Nedd4 ファミリーが関わる生命現象の全容解明が重要な課題となっている。

以上の知見に基づき、第 1 章では、未だ Rsp5 の基質として報告されていない広域アミノ酸パーミアーゼ Agp1 の抑制機構について解析した。また、第 2 章では、Rsp5 の N 末端側に位置する C2 ドメインについて、エンドサイトーシスにおける機能解析を行った。さらに、第 3 章では、Nedd4 ファミリーが関わる疾患の一つである神経変性疾患に着目し、酵母を用いた神経変性疾患モデルの構築と、Rsp5 による細胞の恒常性維持機構の解明を目的として解析を行った。

第1章 Rsp5によるAgp1の基質アミノ酸依存的なエンドサイトーシス機構

1-1. 序論

酵母は、環境中の窒素源を細胞膜上のトランスポーターにより細胞内に取り込み、生育や二次代謝産物の生産に利用する。一方、過剰なアミノ酸の取り込みは細胞内の代謝を変化させ、その生育を阻害する。したがって、アミノ酸トランスポーターの活性は環境の変化に応答して厳密に制御される必要がある。アミノ酸トランスポーターの中でも、Agp1は幅広い種類のアミノ酸を細胞内に取り込むため、その抑制機構は細胞の恒常性を維持するために重要である。アミノ酸トランスポーターのエンドサイトーシスを介した抑制機構については、Mup1やCan1などの高親和性特異的トランスポーターをモデルに研究が進められてきたが(132, 179, 196, 197)、基質に対する親和性および特異性が低いAgp1のエンドサイトーシス機構については、ほとんど明らかになっていない。

近年、アミノ酸などの窒素源が豊富なワイン醸造環境において、AGPI遺伝子の転写が抑制されていることが報告された(12)。AGPIの転写は、アミノ酸センサーのSsy1-Ptr3-Ssy5 (SPSセンサーシステム)を介したGATAファミリー転写因子によって制御されている(198–200)。このSPSセンサーシステムが環境中のアミノ酸を検知すると、AGPIの転写が促進される。そして、新たに合成されたAgp1が細胞膜上に局在し、アスパラギンやグルタミンなどの中性アミノ酸を細胞内に取り込む(201–203)。上記のように、AGPI遺伝子の転写については研究が進められているものの、一度細胞膜に局在したAgp1が抑制されるメカニズムは不明である。以上の知見に基づき、本章では、Agp1のエンドサイトーシス機構を解明することを目的として、研究を行った。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 菌株とプライマー、プラスミド

1-2-1-1. 菌株

Saccharomyces cerevisiae

使用した菌株を表 3 に示す。Yeast Knock Out Strain Collection は Horizon Discovery 社より購入した。

表 3 本研究で使用した菌株のリスト

名称	遺伝子型	由来
BY4741	MATa <i>his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ0 <i>met15</i> Δ0 <i>ura3</i> Δ0	Yeast Knockout Strain Collection
<i>rsp5</i> ^{L733S}	BY4741 <i>rsp5</i> ^{L733S}	Nishimura <i>et al.</i> , 2020
<i>GNP1-GFP</i>	BY4741 <i>GNP1-GFP::hphNT1</i>	本研究
CAY29	MATa <i>ura3-52</i>	Andréasson <i>et al.</i> , 2004
<i>gap1</i> Δ <i>put4</i> Δ <i>gnp1</i> Δ	CAY29 <i>gap1</i> Δ <i>put4</i> Δ <i>gnp1</i> Δ	Andréasson <i>et al.</i> , 2004
<i>gap1</i> Δ <i>put4</i> Δ <i>gnp1</i> Δ <i>agp1</i> Δ	CAY29 <i>gap1</i> Δ <i>put4</i> Δ <i>gnp1</i> Δ <i>agp1</i> Δ	Andréasson <i>et al.</i> , 2004
<i>art1</i> Δ	BY4171 <i>art1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art2</i> Δ	BY4171 <i>art2</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art3</i> Δ	BY4171 <i>art3</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art4</i> Δ	BY4171 <i>art4</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art5</i> Δ	BY4171 <i>art5</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art6</i> Δ	BY4171 <i>art6</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art7</i> Δ	BY4171 <i>art7</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art8</i> Δ	BY4171 <i>art8</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art9</i> Δ	BY4171 <i>art9</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>art10</i> Δ	BY4171 <i>art10</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>bul1</i> Δ	BY4171 <i>bul1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>bul2</i> Δ	BY4171 <i>bul2</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>bul3</i> Δ	BY4171 <i>bul3</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>spo23</i> Δ	BY4171 <i>spo23</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection

Escherichia coli

- DH5α 株：遺伝子のサブクローニング用に使用。

F-Φ80lacZΔM15Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1

- DB3.1 株：*ccdB* を含むプラスミドのサブクローニング用に使用。

F-gyrA462 endA1Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB⁻, mB⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (SmR) xyl-5 λ-leu mtl1

1-2-1-2. プライマー

プラスミド構築のために、表4のプライマーをファスマック社に依頼し、合成した。

表4 本研究で使用したプライマーのリスト

名称	配列
S3-GNP1_Fw	AGAGATTAAGAAACGGACCATACTGGAAAAGAGTTCTTG ATTTCGGTGTCGTACGCTGCAGGTCGAC
S2-GNP1_Rv	ATTGTTTCTTCAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATCGTGATTT CTGCTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
GNP1_Up_-532_Fw	TATGCGACGTGCTTGCGATC
hph_Rv_21	GACAGACGTCGCGGTG

1-2-1-3. プラスミド

・ pRS415, pRS416 (Stratagene 社)

YCp型のプラスミド。酵母での選択マーカーとして、pRS415に*LEU2* 遺伝子、pRS416に*URA3* 遺伝子を含む。セントロメア配列が含まれているため、染色体と同様に複製され低コピー数 (1~2 コピー) で、細胞内において安定に保持される。また、大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含む。

・ pRS415-*cgHIS3-MET15*

研究室保有。pRS415に、*Candida glabrata* 由来 *HIS3* (*cgHIS3*) 遺伝子と *S. cerevisiae* 由来 *MET15* 遺伝子が組み込まれている (114)。

・ pDDOR221 (Invitrogen 社)

Gateway technology (Thermo Fisher Scientific 社) による相同組換えを利用したクローニングに使用するプラスミド。attP1-*ccdB*-Cm^R-attP2 配列を有しており、BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を含む。

・ pDONR221-*BUL1*, pDonr221-*BUL2*

pDONR221 上の attP1-*ccdB*-Cm^R-attP2 配列が attL1-*BUL1*-attL2 あるいは attL1-*BUL2*-attL2 に置換されている (107)。

・ pAG416-*P_{GPD}-ccdB-yEGFP-T_{CYC1}*, pAG416-*P_{GPD}-ccdB-T_{CYC1}*

Gateway technology (Thermo Fisher Scientific 社) を用いたクローニング方法に使用する発現用プラスミド。P_{GPD}-attR1-Cm^R-*ccdB*-attR2-*yEGFP-T_{CYC1}* および P_{GPD}-*HA*-attR1-Cm^R-*ccdB*-attR2-*T_{CYC1}* 配列を有しており、LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また、大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含む。

- pAG416-P_{GPD}-AGPI-yEGFP-T_{CYCI}
- pAG416-P_{GPD}-GAPI-yEGFP-T_{CYCI}
- pAG416-P_{GPD}-PUP4-yEGFP-T_{CYCI}

AGPI-yEGFP および GAPI-yEGFP, PUP4-yEGFP 融合遺伝子の ORF の上流に TDH3 遺伝子のプロモーター、下流に CYCI 遺伝子のターミネーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる (114)。

- pAG416-P_{GPD}-BUL1-T_{CYCI}, pAG416-P_{GPD}-BUL2-T_{CYCI}

本研究において、pDONR221-BUL1, pDONR221-BUL2 と pAG416-P_{GPD}-ccdB-T_{CYCI} の LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応により作製した。BUL1 遺伝子および BUL2 遺伝子の ORF の上流に TDH3 遺伝子のプロモーター、下流に CYCI 遺伝子のターミネーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる。

- pFA6a-GFP-hphNT1 (AddGene)

PCR Toolbox (204) に含まれるプラスミド。S3-GFP-hphNT1-S2 配列を有している。

1-2-2. 培地

- YPD 培地(酵母用完全培地)

酵母エキス 1% (オリエンタル酵母社)

ペプトン 2% (日本ベクトン・ディッキンソン社)

グルコース 2% (ナカライテスク社)

寒天 2% (必要に応じて添加) (三井製糖社)

hygromycin B 200 µg/mL (必要に応じて添加) (富士フィルム和光純薬社)

- SD + Am 培地 (アンモニウムイオンを窒素源とする酵母用最少培地)

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.17% (FORMEDIUM 社)

グルコース 2% (ナカライテスク社)

硫酸アンモニウム 0.5% (ナカライテスク社)

寒天 2% (必要に応じて添加) (三井製糖社)

アスパラギン 5 mM (必要に応じて添加) (ナカライテスク社)

アゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) (必要に応じて添加) (BaChem 社)

1 N NaOH で pH 6.0 ~ 6.5 に調整

- SD - N + Allantoin 培地 (アラントインを窒素源とする酵母用最少培地)

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.17% (FORMEDIUM 社)

グルコース 2% (ナカライテスク社)

アラントイン 0.1% (ナカライテスク社)

1 N NaOH で pH 6.0 ~ 6.5 に調整

・ LB 培地 (大腸菌用完全培地)

酵母エキス 0.5 % (オリエンタル酵母社)

トリプトン 1 % (ナカライテスク社)

NaCl 0.5 % (ナカライテスク社)

寒天 2 % (必要に応じて添加) (三井製糖社)

アンピシリン 100 µg/mL (必要に応じて添加) (ナカライテスク社)

カナマイシン 50 µg/mL (必要に応じて添加) (富士フィルム和光純薬社)

1-2-3. GFP 融合タンパク質の作製

pFA6a-*GFP-hphNT1* を鋳型とし、S3-GNP1-Fw, S2-GNP1-Rv プライマー対と KOD FX Neo (東洋紡社) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を酢酸リチウム法により BY4741 に導入することで *GNP1-GFP* を得た。作製した GFP 導入株は GNP1_Up_-532_Fw, hph_Rv_21 プライマー対と KOD FX Neo (東洋紡社) を用いたコロニーPCRによって確認した。選択培地は YPD+hygromycin B (200 µg/mL) 培地を用いた。

1-2-4. Agp1-EGFP および Gap1-EGFP, Put4-EGFP, Gnp1-GFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察

各株を SD + Am 培地で一晩前培養後、各株を集菌し、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.01 になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。*rsp5^{L733S}* 株においては、さらに 30 °C あるいは 38 °C で 1 時間振盪培養した。硫酸アンモニウムまたは Agp1 の基質 (アスパラギン、グルタミン) をそれぞれ終濃度 50 mM および 10 mM になるように添加し、1 時間振盪培養した後、観察を行った。HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) デジタルカメラが付属した蛍光顕微鏡 Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用いて解析を行った (励起波長; 488 nm, 吸収波長; 509 nm)。

1-2-5. Agp1-EGFP 融合タンパク質の免疫沈降

各株を SD 培地で一晩前培養後、各株を集菌し滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.01 になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。*rsp5^{L733S}* 株においては、さらに 30 °C または 38 °C で 1 時間振盪培養した。アスパラギンを終濃度 10 mM になるように添加し、30 分振盪培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、1 % NP-40、0.1 % deoxycholate acid、0.1 % Sodium dodecyl sulfate [SDS]、protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーMB601U (安井器械社製) で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、15 サイクル)。破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間、4 °C)、上清を回収した後、Bradford 法で総タンパク

質量を定量した。上清 (3.0 mg/mL) に 10 μ L の平衡化した抗 GFP マグネティックビーズ (免疫生物学研究所社, ClonID: RQ2) を加え、ローターを用いて 2 時間、4 $^{\circ}$ C でインキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM sodium chloride, 10 % glycerol, and 0.1 % NP-40) で 3 回洗浄し、沈降物に精製水で 1 \times になるように希釈した 5 \times SDS sample buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10 % SDS, 11.25 % glycerol, 25 % 2-mercaptoethanol, 0.0625 % bromophenol blue [BPB]) を加え、2 分間、95 $^{\circ}$ C で煮沸して可溶化した。一方、タンパク質濃度を調整した後の上清を 40 μ L 分取し、5 \times SDS sample buffer を 10 μ L 加え、2 分間、95 $^{\circ}$ C で煮沸したものを全細胞抽出液とした。

1-2-6. 生育試験

各株を SD - N + Allantoin 培地で一晩前培養後、OD₆₀₀ = 0.01 になるように希釈し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 $^{\circ}$ C で振盪培養した。硫酸アンモニウムを終濃度 50 mM になるように添加し、75 分振盪培養した後、各株を集菌した。培養した培地と同量の滅菌水で洗浄後、OD₆₀₀ = 1.0 になるように滅菌水で懸濁した。得られた懸濁液を 10 倍ずつ 3 段階 (10 ~ 1,000 倍) に希釈したサンプルを調製し、3 μ L ずつ寒天培地上にスポットした。スポット後の寒天培地を 1 ~ 5 日間 30 $^{\circ}$ C で培養し、観察を行った。

1-2-7. ウェスタンブロッティング

各サンプルを、8 %あるいは、10 %の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (200 V、15 mA/枚、60 ~ 90 分) を行った。泳動後のゲルから転写バッファー (0.58 % [w/v] Tris, 0.1 % [w/v] SDS, 2.9 % [w/v] グリシン、20 % メタノール) で満たしたトランスファーユニット (Bio-Rad 社製) を使用して、PVDF メンブレン (Millipore 社) にタンパク質を転写した (115 V、400 mA、120 分)。メンブレンをブロッキングバッファー (1 \times TBS - T, 3 % スキムミルクあるいは 5 % BSA) でブロッキングした (室温、60 分)。1 次抗体として、Can Get Signal Solution 1 (東洋紡社) で 10,000 倍に希釈した抗 GAPDH ウサギ抗体 (ClonID: GA1R)、5,000 倍に希釈した抗ユビキチン (Ub) マウス抗体 (ClonID: 13-1600) および 5,000 倍希釈した GFP マウス抗体 (ClonID: AVU73901) をそれぞれ用いた。2 次抗体には Can Get Signal Solution 2 (東洋紡社) で 2,000 倍に希釈した抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、Easy blot 抗マウス IgG 抗体 (Gene Tex 社) をそれぞれ用いた。検出には ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を用い、ルミノメーター LAS-4000 (Fujifilm 社製) で検出した。各バンドのシグナル強度は、Image J ソフトウェアを用いて測定し、定量化した。

1-2-8. その他

大腸菌からのプラスミド調製は、アルカリ SDS 法をベースにした QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。大腸菌の形質転換は「バイオマニュアルシリーズ①遺伝工学の基礎技術」(羊土社) および「バイオ実験イラストレイテッド」

(秀潤社) に、酵母の取り扱いや遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ⑩酵母による遺伝子実験法」(羊土社) および「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝実験法」(学会出版センター) に準じた。その他、各試薬の調整は「バイオ試薬調整ポケットマニュアル」(羊土社) を参照した。

1-3. 結果

1-3-1. Rsp5 による基質依存的な Agp1 のエンドサイトーシス

アミノ酸パーミアーズのエンドサイトーシスは、易資化性窒素源または過剰な基質アミノ酸の存在によって誘導される。しかし、これまでに Agp1 がどのような条件に反応してエンドサイトーシスされるのか明らかになっていない。そこでまず、アラントインを窒素源とする培地に硫酸アンモニウム、アスパラギン、またはグルタミンを添加した時の Agp1 の細胞内局在を解析した (図 13)。アラントインを単一窒素源する条件において、細胞膜上で GFP の蛍光シグナルを示す細胞が 90 %の割合で観察された。このことから、難資化性の窒素源を用いて酵母を培養した場合は、Agp1 が細胞膜に局在することが明らかになった。一方、Gap1 のエンドサイトーシスを誘導する易資化性窒素源であるアンモニウムイオンを添加しても、細胞膜上で GFP の蛍光シグナルを示す細胞が 84 %の割合で観察された。したがって、アンモニウムイオンを添加しても、Agp1 は細胞膜上に局在することが示された。興味深いことに、Agp1 の基質であるアスパラギンおよびグルタミンを添加した場合は、細胞膜上で蛍光を示す細胞の割合が 10 %および 28 %にそれぞれ減少した。つまり、アスパラギンおよびグルタミンの添加により、Agp1 のエンドサイトーシスが誘導されることが示された。

翻訳後修飾の 1 つであるユビキチン化は、細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスを誘導する引き金となることが知られている。実際、易資化性窒素源に反応した Gap1 のエンドサイトーシスや、基質に反応した Can1 のエンドサイトーシスの場合においても、これらタンパク質のユビキチン化が観察される。そこで、アンモニウムイオンやアスパラギン添加条件における、Agp1 のユビキチン化レベルを検出した (図 14)。アンモニウムイオンを添加した場合、Agp1 のユビキチン化レベルの僅かな増大が検出された (2.2 倍)。一方、Agp1 の基質であるアスパラギンの添加によって、5 倍以上のユビキチン化レベルの増大が検出された。以上の結果から、Agp1 は自身の基質アミノ酸に反応して、ユビキチン化修飾を受けることが判明した。

次に、Agp1 のエンドサイトーシスに Rsp5 が必要かどうか検討した。酵母においては、Rsp5 が多くの細胞膜タンパク質のユビキチン化に関与する (147, 205)。そこで、Rsp5 の温度感受性変異 (*rsp5*^{L733S}) 株を用いて、Rsp5 による Agp1 の細胞内局在制御を解析した (図 15)。*rsp5*^{L733S} 株は、非制限温度下 (30 °C) では正常なユビキチンリガーゼ活性を有するが、制限温度下 (38 °C) においては、ユビキチンリガーゼ活性が劇的に減少する。まず、野生型株について解析を行ったところ、非制限温度 (30 °C) および制限温度 (38 °C) どちらの条件においても、アスパラギンの添加により、細胞膜上で GFP の蛍光を示す細胞の割合が顕著に減少した。このことから、Agp1 のエンドサイトーシスが誘導されていることが明らかになった。また、*rsp5*^{L733S} 株においても、非制限温度下 (30 °C) では、アスパラギンの添加により、細胞膜上で GFP の蛍光を示す細胞の割合が 98 %から 16 %に低下した。一方、制限温度下 (38 °C) においては、アスパラギンを添加しても、97 %の細胞が細胞膜上で蛍光シグナルを示したことから、

Agp1 のエンドサイトーシスは誘導されていないと考えられた。これらの結果から、Agp1 のエンドサイトーシスは、Rsp5 の活性に依存することが明らかになった。

また、*rsp5*^{L733S} 株を用いて、Rsp5 による Agp1 のユビキチン化を調べたところ (図 16)、非制限温度下 (30 °C) では、アスパラギンの添加により、5 倍以上のシグナルの増大が検出された。一方、制限温度下 (38 °C) においては、アスパラギンを添加しても、ユビキチン化レベルの増大は確認されなかった。以上の結果から、Agp1 のユビキチン化は、Rsp5 の活性に依存することが明らかになった。

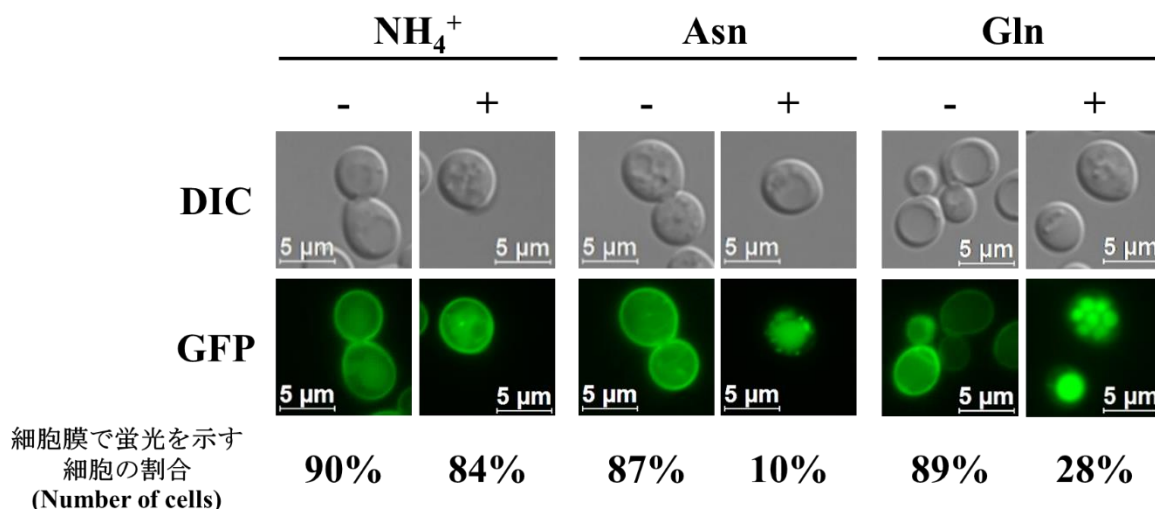


図 13 Agp1 の細胞内局在

BY4741 株 (WT) に Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416-P_{GDP}-AGP1-yEGFP-T_{CYCI}) を導入し、pRS415-CgHIS3-MET15 で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 1 時間の細胞 (+ NH₄⁺) および添加前の細胞 (- NH₄⁺)、または終濃度 10 mM のアスパラギン添加後 1 時間の細胞 (+ Asn) および添加前の細胞 (- Asn)、終濃度 10 mM のグルタミン添加後 1 時間の細胞 (+ Gln) および添加前の細胞 (- Gln) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。それぞれの条件において、Agp1-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし、カウントした細胞の総数を 100 %とした場合に細胞膜上で Agp1-EGFP の蛍光を示す細胞の割合を示した。

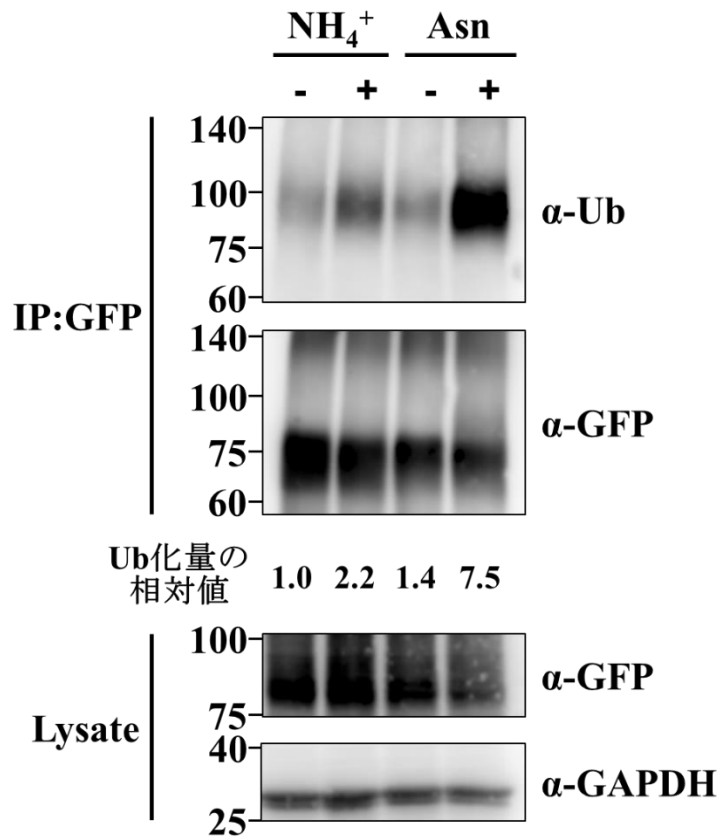


図 14 Agp1 のユビキチン化

BY4741 株に Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416- P_{GDP} -AGP1-yEGFP- T_{CYC1}) を導入し、pRS415-CgHIS3-MET15 で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で $\text{OD}_{600} \approx 1.0$ になるまで培養した。終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムまたは終濃度 10 mM のアスパラギンを添加し、30 分培養後の細胞から全細胞抽出液を調製した後、抗 GFP 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 GFP 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。硫酸アンモニウム添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を示した。

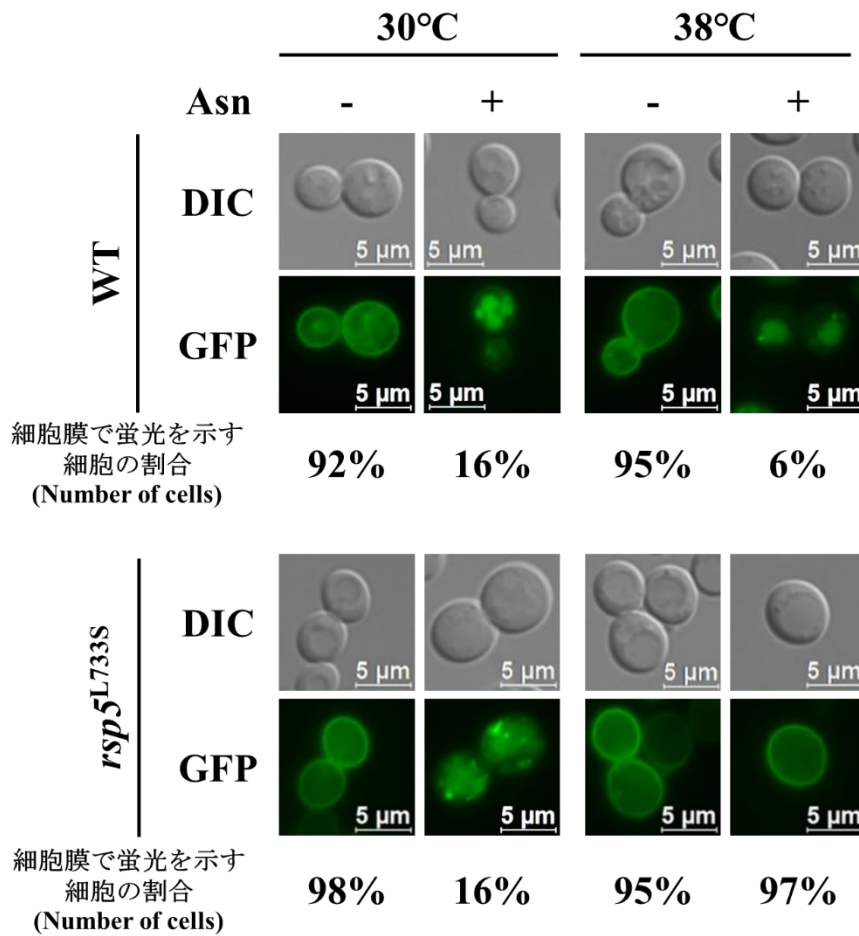


図 15 Rsp5 の活性に依存した Agp1 の細胞内局在

BY4741 株または *rsp5^{L733S}* 株に、Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416- P_{GDP} -AGP1-yEGFP- T_{CYC1}) を導入し、pRS415-CgHIS3-MET15 で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で $OD_{600} \approx 1.0$ になるまで培養し、さらに 30 °C または 38 °C で 1 時間培養した。その後、終濃度 10 mM のアスパラギン添加後 1 時間の細胞 (+ Asn) および添加前の細胞 (- Asn) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。それぞれの条件において、Agp1-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし、カウントした細胞の総数を 100 % とした場合に細胞膜上で Agp1-EGFP の蛍光を示す細胞の割合を示した。

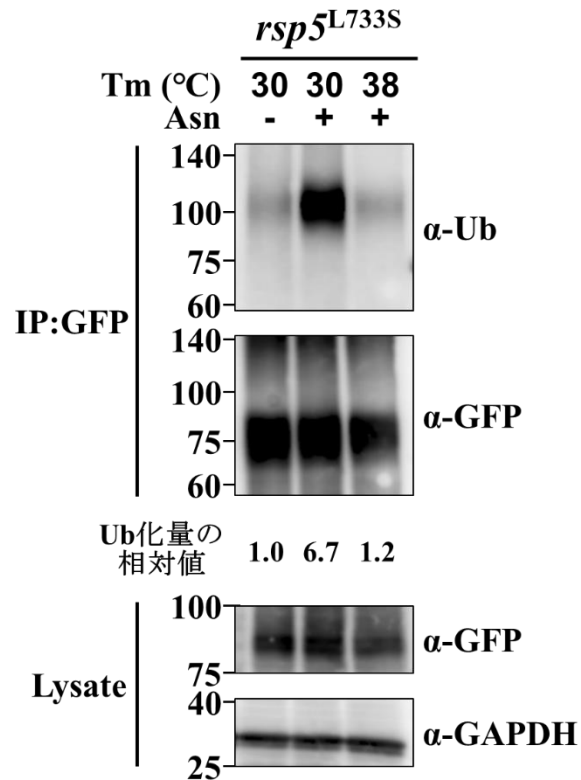


図 16 Rsp5 の活性に依存した Agp1 のユビキチン化

BY4741 株または *rsp5*^{L733S} 株に、Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416-P_{GDP}-AGP1-yEGFP-T_{CYC1}) を導入し、pRS415-CgHIS3-MET15 で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、さらに 30 °C または 38 °C で 1 時間培養した。その後、終濃度 10 mM のアスパラギン添加後 30 分間培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 GFP 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 GFP 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。30 °C で培養した条件でのアスパラギン添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。

1-3-2. AZC を用いたスクリーニング系の構築

Rsp5 は 14 種類の Art ファミリータンパク質をアダプターとして利用することにより、細胞膜上の基質を認識し、ユビキチン化する (129, 179)。しかしながら、Agp1 のユビキチン化に必要なアダプタータンパク質は未だ不明である。Agp1 の認識に必要なアダプタータンパク質を同定するため、まず、プロリンの毒性アナログである AZC を用いた簡便なスクリーニング系の構築を試みた。AZC は Agp1、Gap1、プロリンパーミアーゼ Put4 およびグルタミンパーミアーゼ Gnp1 により細胞内に取り込まれることが報告されている (206)。これら遺伝子の発現、あるいはタンパク質の細胞内局在は環境中の窒素源に依存しており、アラントインを窒素源とした培地で酵母を生育させると、Agp1、Gap1 および Put4 は細胞膜上に局在する。また、アンモニウムイオンの添加により Gap1 と Put4 はエンドサイトーシスにより液胞に移行する (114, 207, 208)。一方、Gnp1 はアラントインおよびアンモニウムイオンを窒素源とした培地条件では、発現が抑制されていることが知られている (209)。まずこれらの知見の再現性を得るため、BY4741 株 (WT) に EGFP を C 末端側に融合した Agp1、あるいは Gap1、Put4 をそれぞれ発現させた。また、Gnp1 の発現レベルを解析するために、C 末端側に GFP を融合したゲノム由来の Gnp1 を発現させる株を作製した。これらの株を用いて、アラントインを窒素源とする培地にアンモニウムイオンを添加した時の Agp1、Gap1、Put4 および Gnp1 の細胞内局在をそれぞれ解析した (図 17)。その結果、Agp1、Gap1 および Put4 はアラントインを窒素源とした場合、細胞膜上に局在した。一方、アンモニウムイオンの添加により、Gap1 および Put4 はエンドサイトーシスによって液胞に輸送された。また、Agp1 は予想通り、アンモニウムイオンの添加後も細胞膜上に残存した。Gnp1 については、アラントインを窒素源とした場合およびアンモニウムイオンを添加した場合でも、GFP のシグナルは観察されなかった。つまり、これらの条件では Gnp1 が発現しないことが示唆された。以上の結果から、アラントインを窒素源とした培地へのアンモニウムイオンの添加により、AZC の取り込みに関わるアミノ酸パーミアーゼの中で Agp1 のみが細胞膜に局在することが判明した。

上記の結果から、細胞膜に局在する Agp1 依存的な AZC の細胞毒性を評価できることが示唆された。そこで次に、Agp1 のエンドサイトーシス誘導物質であるアスパラギンが AZC 耐性に及ぼす影響を検討したところ (図 18)、AZC が存在しない場合、アスパラギンの添加は酵母の生育に影響を与えなかった。興味深いことに、AZC が存在する場合、アスパラギンを添加してない培地では酵母の生育が著しく阻害されたのに対し、アスパラギンの添加培地においては、酵母の生育阻害が部分的に回復した。図 17 の結果と併せて考えると、アスパラギン含有培地では、Agp1 のエンドサイトーシスが誘導され、細胞膜上の AZC 取込みが抑制された結果、AZC の毒性が解除されたと考えられた。

図 18 の結果が細胞膜に局在する Agp1 に依存するかどうか調べるため、Agp1 を除く AZC の取り込みに関わる遺伝子の三重欠損 (*gap1Δ put4Δ gnp1Δ*) および AZC の取り込みに関わる全ての遺伝子の欠損 (*gap1Δ put4Δ gnp1Δ agp1Δ*) が AZC 耐性に及ぼす

影響について解析した (図 19)。その結果、AZC が存在しない場合、それぞれの多重遺伝子欠損は酵母の生育に影響を与えなかった。興味深いことに、AZC が存在する場合、アスパラギンを添加していない培地では *gap1Δ put4Δ gnp1Δ* 株の生育が抑制されたのに対し、*gap1Δ put4Δ gnp1Δ agp1Δ* 株は酵母の生育阻害を部分的に回復した。また、アスパラギンの添加により、AZC が存在しても *gap1Δ put4Δ gnp1Δ* 株は *gap1Δ put4Δ gnp1Δ agp1Δ* 株と同程度の生育を示した。この結果から、アスパラギン非含有培地では細胞膜に局在する Agp1 依存的に AZC が細胞内に取り込まれ、酵母の生育が抑制されることが明らかになった。また、*gap1Δ put4Δ gnp1Δ* 株において、アスパラギン含有培地では Agp1 がアスパラギンに応答してエンドサイトーシスされたため、*gap1Δ put4Δ gnp1Δ agp1Δ* 株と同等の生育を示したことが考えられた。以上の結果から、アラントインを窒素源とした培地にアンモニウムイオンを添加し、AZC を含む培地で酵母の生育を観察することにより、細胞膜上に局在する Agp1 依存的な AZC の細胞毒性を評価できることが示された (図 20)。

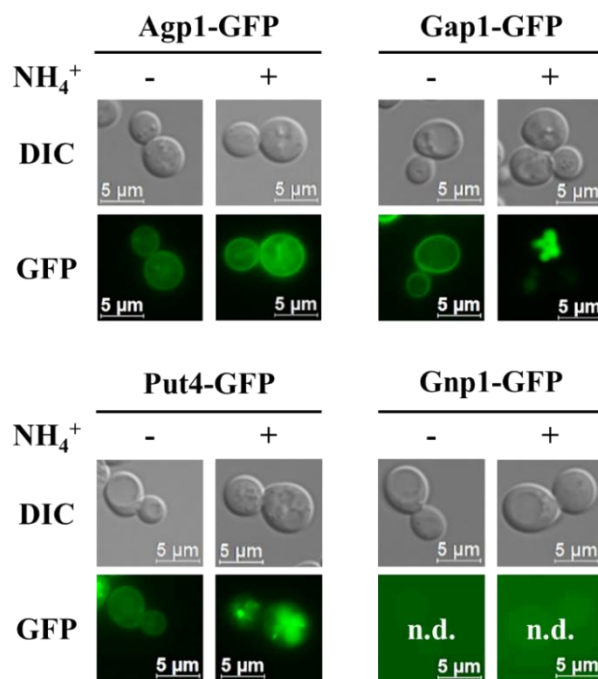


図 17 アンモニウムイオンによる Agp1, Gap1, Put4 および Gnp1 の細胞内局在の変化

Gnp1-GFP 株または BY4741 株に、Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416- P_{GDP} -AGP1-yEGFP-T_{CYC1})、Gap1-EGFP 発現プラスミド (pAG416- P_{GDP} -GAP1-yEGFP-T_{CYC1})、Put4-EGFP 発現プラスミド (pAG416- P_{GDP} -PUT4-yEGFP-T_{CYC1}) をそれぞれ導入し、pRS416 および pRS415-CgHIS3-MET15 で栄養要求性を相補した。SD - N+ Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 75 分後の細胞 (+ NH₄⁺) および添加前の細胞 (- NH₄⁺) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

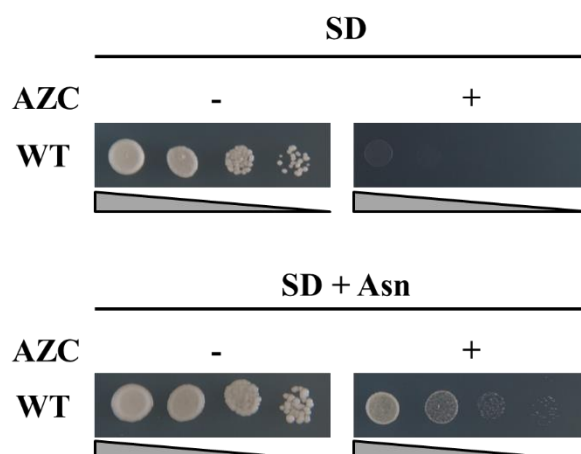


図 18 アスパラギン含有培地を用いた AZC 感受性試験

BY4741 株 (WT) に pRS416 および pRS415-CgHIS3-MET15 を導入し、栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加した。75 分培養した後、各株の OD を 10⁰~10³ 倍まで段階希釈し、SD 寒天培地、SD + Asn 寒天培地、1.0 mM AZC 含有 SD 寒天培地、1.0 mM AZC 含有 SD + Asn 寒天培地にそれぞれスポットした。スポット後の寒天培地を 30 °C で 2 日間培養した。

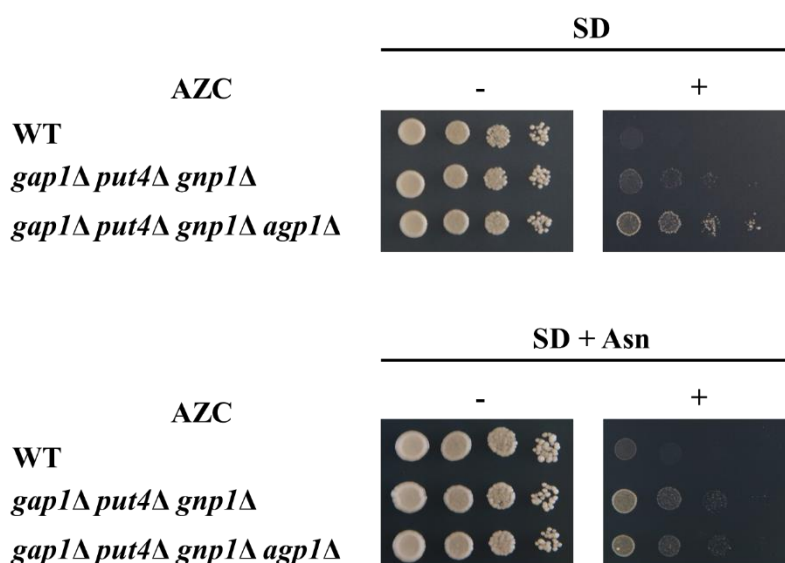


図 19 細胞膜に局在する Agp1 に依存した AZC 感受性試験

CAY29 株 (WT)、および *gap1Δ put4Δ gnp1Δ* 株、*gap1Δ put4Δ gnp1Δ agp1Δ* 株に pRS416 を導入して栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加した。75 分培養した後、各株の OD を 10⁰~10³ 倍まで段階希釈し、SD 寒天培地、SD + Asn 寒天培地、5.0 mM AZC 含有 SD 寒天培地、5.0 mM AZC 含有 SD + Asn 寒天培地にそれぞれスポットした。スポット後の寒天培地を 30 °C で 2 日間培養した。

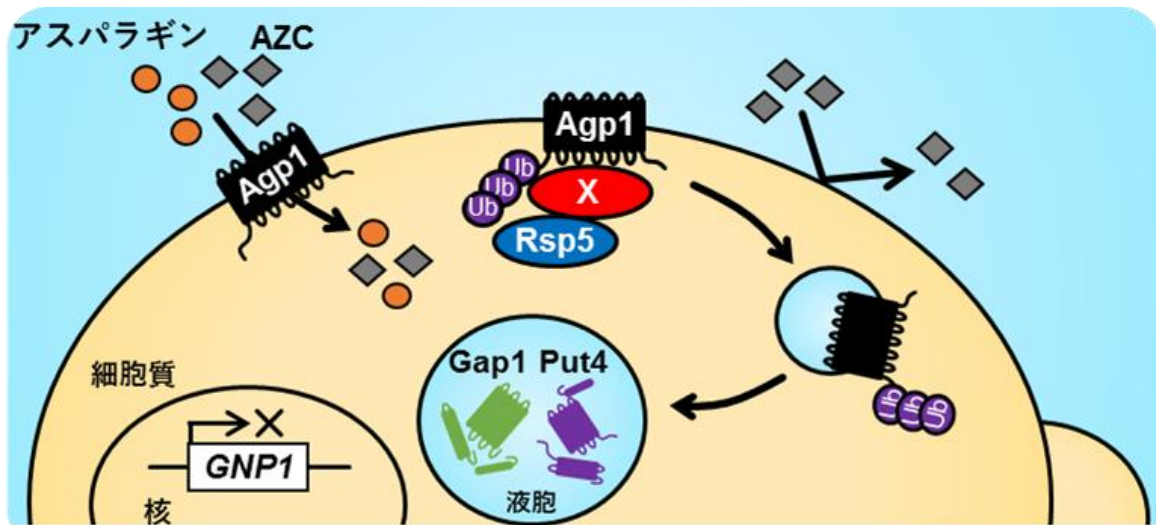


図 20 AZC の取り込みに関わるアミノ酸パーミアーゼの細胞内局在

アラントインを窒素源とした培地で培養した細胞にアンモニウムイオンを添加した細胞では、*GNP1* 遺伝子の発現が抑制され、さらに *Gap1* および *Put4* がエンドサイトーシスを介して液胞に局在する。したがって、AZC の取り込みに関わるアミノ酸パーミアーゼの中で、*Agp1* のみが細胞膜上に局在する。上記の条件を用いて、*Agp1* 依存的な AZC の細胞毒性を評価することが可能である。また、アスパラギンが存在する場合、*Agp1* のエンドサイトーシスが誘導され、AZC の細胞毒性が緩和される。(Ub; ユビキチン)。

1-3-3. Bull 依存的な Agp1 のユビキチン化を介したエンドサイトーシス

1-3-2 に示した結果から、AZC を用いた簡便なスクリーニング系が構築できたと判断した。そこで、Agp1 のエンドサイトーシスに必要な Rsp5 のアダプタータンパク質の候補を得るため、野生型株および各 Art ファミリータンパク質をコードする遺伝子の破壊株を用いて、AZC の有無による生育の違いからアダプタータンパク質の同定を行った。図 21 に示すように、*art5Δ* を除くすべての一遺伝子欠損株は AZC が存在しない場合、ほとんど生育に差はなかった。また、WT, *art1Δ*, *art2Δ*, *art3Δ*, *art4Δ*, *art6Δ*, *art7Δ*, *art8Δ*, *art9Δ*, *art10Δ*, *bul2Δ*, *bul3Δ*, *spo23Δ* 株は、AZC が存在しても、酵母の生育に影響を及ぼさなかった。なお、培養 2 日後の時点では *art5Δ* の生育が著しく遅延したため、培養 5 日後に改めて観察を行ったところ、AZC が存在する場合でも、酵母が生育することを確認した。一方、興味深いことに、*BUL1* 遺伝子の欠損 (*bul1Δ*) により、AZC を含む培地での酵母の生育が顕著に抑制された。この結果から、Bull が Agp1 のエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

次に、Bull がアスパラギンの添加に応答した Agp1 のエンドサイトーシスに必要かどうか調べるため、アスパラギンを添加した時の Agp1 の細胞内局在を解析した (図 22)。野生型株では、アラントインを単一窒素源する条件において、細胞膜上で GFP の蛍光シグナルを示す細胞が 90 % の割合で観察され、アスパラギンの添加によりその割合が 13 % に低下した。この結果は、図 13 の結果と一致しており、Agp1 のエンドサイトーシスが誘導されたことを示した。一方、*BUL1* 遺伝子の欠損 (*bul1Δ*) により、アスパラギンを添加しても 73 % の細胞が細胞膜上で蛍光シグナルを示したことから、Agp1 のエンドサイトーシスが抑制されたことが明らかになった。

図 22 の結果から、Bull が Agp1 のユビキチン化を介したエンドサイトーシスに必要であることが示唆された。そこで、*BUL1* 遺伝子の欠損株 (*bul1Δ*) を用いて、Bull を介した Agp1 のユビキチン化について解析したところ (図 23)、WT では、アスパラギンの添加により、ユビキチンシグナルの増大が検出された (14.9 倍)。一方、アスパラギンを添加しても、*BUL1* 遺伝子の欠損によりユビキチンシグナルの増大が抑制された (3.6 倍)。以上の結果から、Bull は Agp1 のユビキチン化を介したエンドサイトーシスに関与することが明らかになった。

Bull とそのパラログである Bul2 は、膜タンパク質の認識に冗長性があることが知られており、Gap1 のエンドサイトーシスにおいては、どちらかの遺伝子が欠損しても Rsp5 による Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスが誘導される (128, 210)。しかしながら、上記の結果から、Agp1 のユビキチン化を介したエンドサイトーシスには Bull が唯一のアダプタータンパク質であることが強く示唆された。Agp1 のエンドサイトーシスにおける Bul2 の関与を調べるため、*BUL1* 遺伝子の欠損株 (*bul1Δ*) における *BUL2* 遺伝子の過剰発現が AZC 耐性に及ぼす影響について解析した (図 24)。その結果、AZC が存在しない場合は、酵母の生育にほとんど差を示さなかった。また、1 mM AZC を含む培地においては、*BUL1* 遺伝子および *BUL2* 遺伝子の過剰発現は *bul1Δ* 株の生育抑制を回復した。一方、興味深いことに、*bul1Δ* 株における *BUL1* 遺伝

子の過剰発現は 5 mM および 10 mM の AZC を含む培地においても生育が可能であったのに対し、*BUL2* 遺伝子の過剰発現は、*BUL1* 遺伝子の過剰発現に比べて酵母の生育が抑制されることが明らかになった。以上の結果から、Agp1 のエンドサイトーシスに Bul2 は部分的に関与するが、Bul1 が主要な役割を担うことが示された。

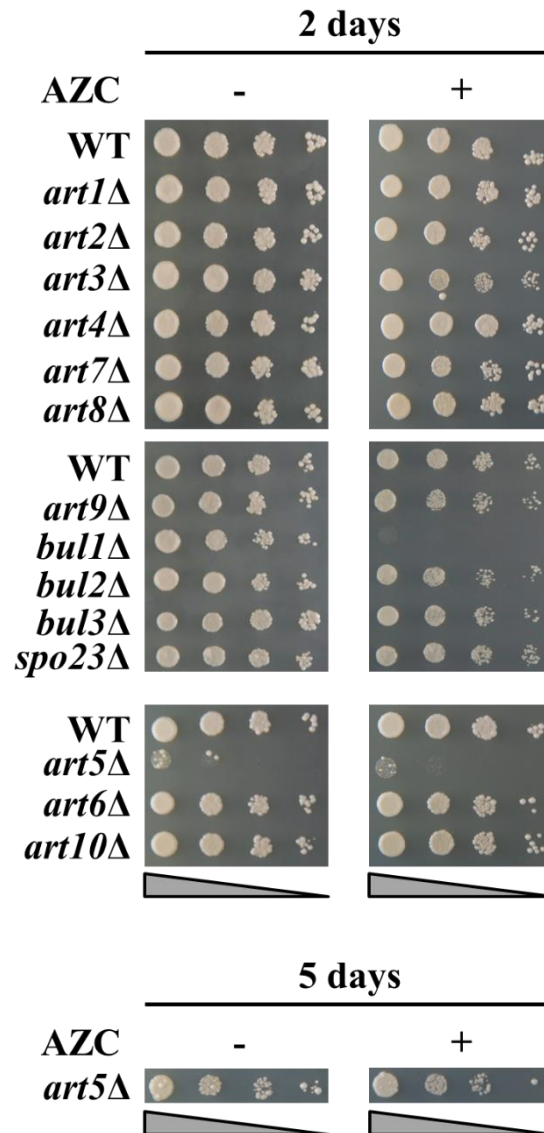


図 21 アダプタータンパク質の一遺伝子欠損株を用いた AZC 感受性試験

BY4741 株 (WT)、*art1*Δ 株、*art2*Δ 株、*art3*Δ 株、*art4*Δ 株、*art5*Δ 株、*art6*Δ 株、*art7*Δ 株、*art8*Δ 株、*art9*Δ 株、*art10*Δ 株、*bul1*Δ 株、*bul2*Δ 株、*bul3*Δ 株、*spo23*Δ 株に、pRS416 および pRS415-CgHIS3-MET15 を導入し、栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加した。75 分培養した後、各株の OD を 10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、SD + Asn 寒天培地および 1 mM AZC 含有 SD + Asn 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 30 °C で 2 日間、あるいは 5 日間培養した。

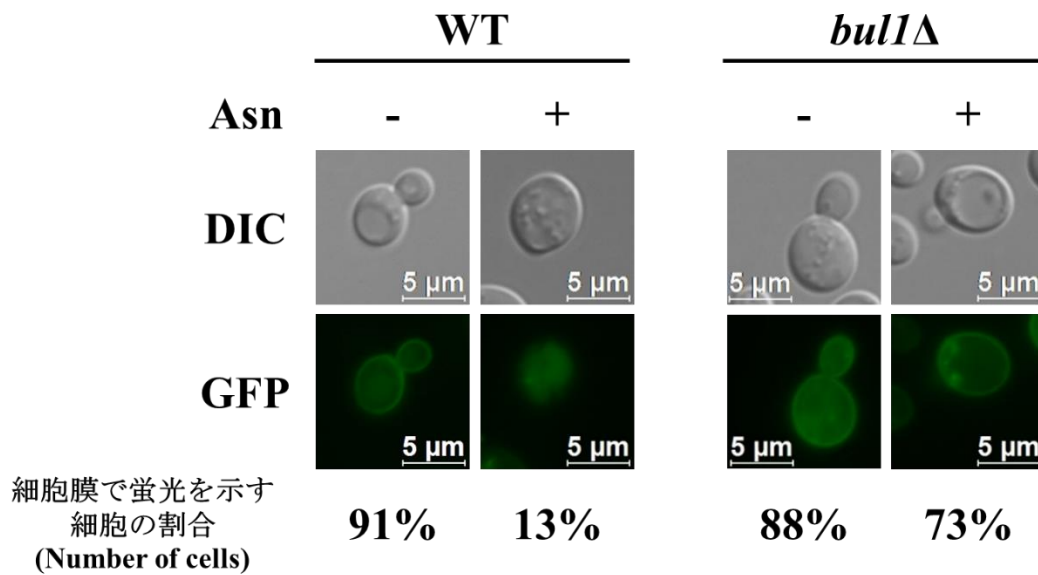


図 22 *Bul1* に依存した *Agp1* の細胞内局在

BY4741 株 (WT) または *bul1Δ* 株に、*Agp1*-EGFP 発現プラスミド (pAG416- P_{GDP} -*AGP1*-yEGFP- T_{CYC1}) を導入し、pRS415-Cg*HIS3-MET15* で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で $OD_{600} \approx 1.0$ になるまで培養し、終濃度 10 mM のアスパラギン添加後 1 時間の細胞 (+ Asn) および添加前の細胞 (- Asn) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。それぞれの条件において、*Agp1*-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし、カウントした細胞の総数を 100% とした場合に細胞膜上で *Agp1*-EGFP の蛍光を示す細胞の割合を示した。

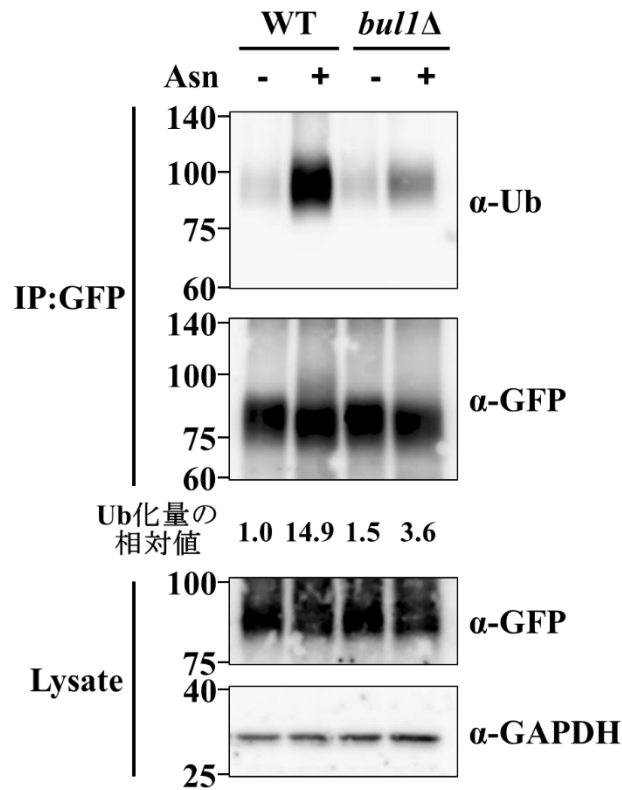


図 23 Bul1 に依存した Agp1 のユビキチン化

BY4741 株 (WT) または *bul1*Δ 株に、Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416-P_{GDP}-AGPI-yEGFP-T_{CYC1}) を導入し、pRS415-CgHIS3-MET15 で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。終濃度 10 mM のアスパラギンを添加し、30 分培養後の細胞から全細胞抽出液を調製した後、抗 GFP 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 GFP 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。WT のアスパラギン添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。

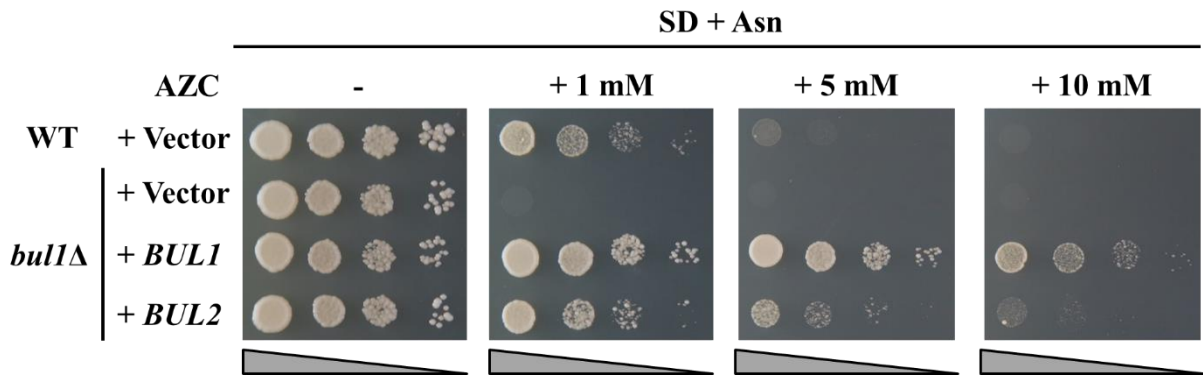


図 24 *BUL1* 遺伝子または *BUL2* 遺伝子の過剰発現株を用いた AZC 感受性試験

BY4741 株 (WT) または *bul1Δ* 株に、空ベクター (pAG416-P_{GDP}-*ccdB*-T_{CYC1})、Bul1 発現プラスミド (pAG416-P_{GDP}-*BUL1*-T_{CYC1})、Bul2 発現プラスミド (pAG416-P_{GDP}-*BUL2*-T_{CYC1}) をそれぞれ導入し、pRS415-Cg*HIS3-MET15* で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加した。75 分培養した後、各株の OD を 10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、SD + Asn 寒天培地および 0.5 mM AZC 含有 SD + Asn 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 30 °C で 2 日間培養した。

1-4. 考察

Rsp5 と Bull1 による基質アミノ酸依存的な Agp1 のエンドサイトーシス

本章では、低親和性広域アミノ酸パーミアーゼ Agp1 のエンドサイトーシスによる抑制機構について解析を行った。その結果、Agp1 の基質アミノ酸が環境中に過剰に存在すると、Rsp5 によるユビキチン化を介したエンドサイトーシスが誘導されることが明らかになった。また、AZC の細胞毒性を指標に、Agp1 のエンドサイトーシスを評価する実験系を構築し、このエンドサイトーシスに必要なアダプタータンパク質として Bull1 を同定した。さらに、Agp1 のエンドサイトーシスにおいて、Rsp5 はパラログである Bul2 ではなく、Bull1 を選択的に用いることが明らかになった。

以上の結果を踏まえると、Rsp5 と Bull1 による Agp1 のエンドサイトーシス誘導モデルが考えられた (図 25)。まず、Agp1 の基質アミノ酸が環境中に存在すると、未知のメカニズムにより、Rsp5 と Bull1 が活性化されると考えられる。活性化した Bull1 は、Rsp5 を Agp1 にリクルートし、Agp1 のユビキチン化を引き起こす。これにより、Agp1 のエンドサイトーシスが促進され、細胞膜上から Agp1 が除去される。上記の機構のように、環境中の基質アミノ酸に応答して Agp1 を細胞膜上から迅速に除去することにより、Agp1 を介した過剰なアミノ酸の取り込みを防いでいることが示唆された。

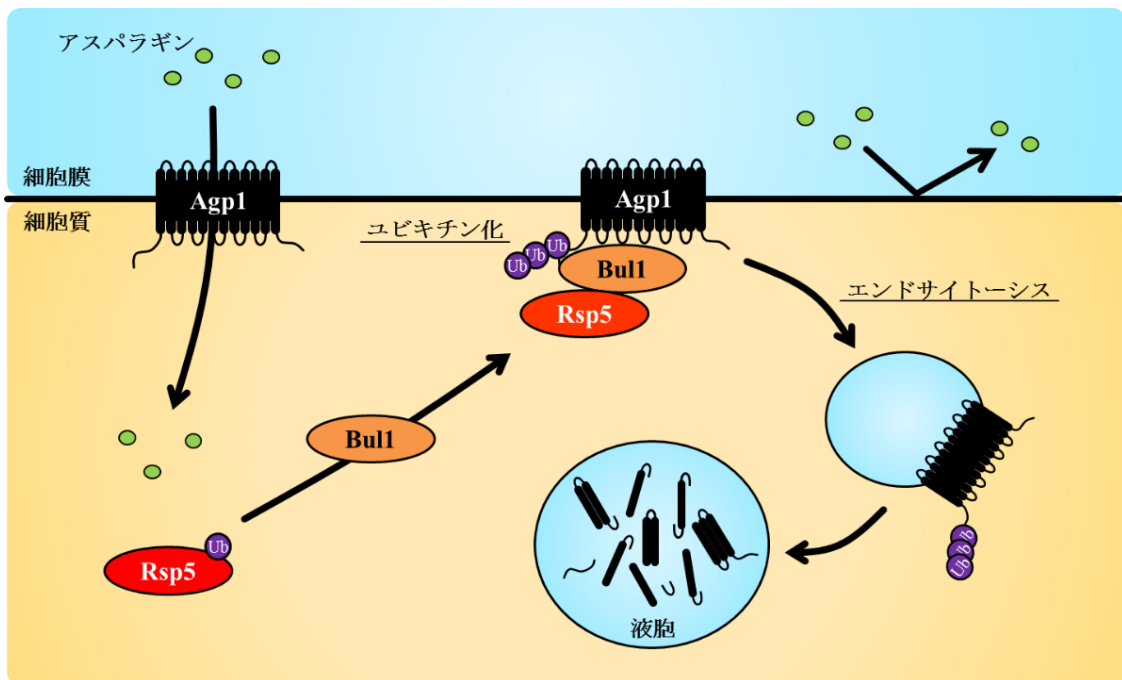


図 25 Rsp5 と Bull1 による Agp1 のエンドサイトーシスモデル

細胞膜上に局在する Agp1 は環境中の基質アミノ酸を細胞内に取り込み、これにより、Rsp5 と Bull1 が活性化される。Rsp5 は、Bull1 との相互作用を介して Agp1 を認識し、ユビキチン化することで Agp1 のエンドサイトーシスを促進させ、Agp1 を細胞膜から迅速に除去する。

基質アミノ酸の取り込みとエンドサイトーシス

広域アミノ酸パーミアーゼのエンドサイトーシス誘導機構については、Gap1 をモデルに解析が進められてきた (126–128)。Gap1 は、アンモニウムイオンのような資化し易い窒素源が環境中に存在すると、エンドサイトーシスによって細胞膜から除去される。Agp1 は、アスパラギンやグルタミンを含む全ての中性アミノ酸を細胞内に取り込むことから、広域アミノ酸パーミアーゼとして定義されている。当初、Gap1 と同様に、窒素源の資化し易さが Agp1 のエンドサイトーシスを誘導する要素であると考えていたが、本研究の結果に基づくと、Agp1 の基質アミノ酸がエンドサイトーシスを引き起こすことが示された。基質アミノ酸に依存したエンドサイトーシスについては、Can1 や Mup1 をモデルに研究が進められている (14, 15, 130–132, 180, 211, 212)。これら基質特異的アミノ酸パーミアーゼは、環境中の基質アミノ酸を細胞内に取り込むことにより、自身の立体構造を Outward-facing (OF) 構造から Inward-facing (IF) 構造に変化することが知られている。Art ファミリータンパク質は、上記の IF 構造への変化によって細胞質に露出した酸性領域を認識し、Rsp5 によるユビキチン化を介したエンドサイトーシスを促進する。Agp1 のエンドサイトーシスが環境中の基質アミノ酸に依存して誘導されたことを踏まえると、おそらく基質の取り込みによって生じた Agp1 の構造変化が自身のエンドサイトーシスを制御する要因になっていると推測される。今後、Agp1 の構造解析や、OF および IF 構造を模した変異体を用いることで、Agp1 によるアミノ酸の取り込みとエンドサイトーシス制御の関係性が明らかになるであろう。

一方、Agp1 とは対照的に、プロリン特異的アミノ酸パーミアーゼ Put4 のエンドサイトーシスは、アンモニウムイオンの添加によって引き起こされる (207)。また、当研究室では近年、Put4 の非基質アミノ酸であるアルギニンによって Put4 のエンドサイトーシスが誘導されることを見出しており (111)、一部の基質特異的アミノ酸パーミアーゼは窒素源の資化し易さによってその局在が制御されている可能性が示された。今後、Agp1 や Put4 を含む様々な種類のアミノ酸パーミアーゼについて、エンドサイトーシスが誘導される条件、およびその分子機構をそれぞれ明らかにすることで、アミノ酸トランスポーター制御機構の全体像が理解できると思われる。

リン酸化修飾による Art ファミリータンパク質の機能制御

Art ファミリータンパク質の Bull と Bul2 には、基質認識に冗長性があることが知られている。したがって、どちらかの遺伝子が欠損しても、Gap1 や Dal5 のエンドサイトーシスは進行する (128, 207, 210)。しかしながら、今回の解析結果は、Bull と Bul2 の役割に違いがあることを示唆している。近年、Art4 と Bull 依存的に、モノカルボキシトランスポーター Jen1 のエンドサイトーシスが引き起こされることが報告された (213, 214)。Jen1 のエンドサイトーシスにおいては、Bull が脱リン酸化されることから、Bull と Bul2 の翻訳後修飾状態の違いがそれぞれの機能を制御することが示唆された。Bull と Bul2 は、TORC1 経路により制御される Npr1 キナーゼおよび Sit4 フ

オスファターゼにより、リン酸化あるいは脱リン酸化される (127)。リン酸化状態の Bul1 と Bul2 は、14-3-3 タンパク質との相互作用を強化する結果、Rsp5 との複合体形成が阻害される。したがって、Agp1 のエンドサイトーシスにおいて、Bul1 は脱リン酸化され、Bul2 はリン酸化を維持している状況が作り出され、Rsp5 による Bul1 と Bul2 の選択性を生み出していることが予想される。また、Art1, Art4, Art8 は Npr1, Snf1, PKA によりそれぞれリン酸化されること、あるいは Art6 は Calcineurin により脱リン酸化されることから (215–217)、それぞれ異なるキナーゼ/フォスファターゼを介して、Rsp5 によるアダプタータンパク質の選択性が調節されていることも考えられる。今後、リン酸化酵素および脱リン酸化酵素をコードする遺伝子の一遺伝子欠損株を用いて、これら変異株における Agp1 の細胞内局在を観察することにより、Agp1 のエンドサイトーシスに関わる因子を同定できると考えられる。また、Phos-tag 試薬を用いたウェスタンブロットなどにより、Bul1 および Bul2 のリン酸化状態の違いについて解析することが必要である。さらに、このリン酸化状態が Rsp5 との相互作用に及ぼす影響を共免疫沈降法などで解析することにより、Rsp5 によるアダプタータンパク質の選択メカニズムが解明できると思われる。

エンドサイトーシスを介して細胞膜タンパク質を制御する意義

本研究では、Rsp5 とアダプタータンパク質による基質アミノ酸依存的な Agp1 のエンドサイトーシス調節機構を明らかにした。今後、本エンドサイトーシスの生理学的意義について調べる必要がある。アミノ酸トランスポーターの多くは、細胞外アミノ酸の取り込みに冗長性があることから、トランスポーターの一遺伝子欠損変異は酵母の生育に大きな影響を及ぼさない。一方、窒素源が豊富な培地における Lyp1 や Can1 などのアミノ酸トランスポーターの過剰発現は、酵母の生育を抑制する (1)。したがって、エンドサイトーシスを介したアミノ酸トランスポーターの抑制機構は、過剰なアミノ酸の細胞内への取り込みを防ぐために必要であると推測される。近年当研究室では、高親和性広域アミノ酸パーミアーゼ Gnp1 のエンドサイトーシスに欠損が生じると、細胞内にアミノ酸が過剰に蓄積し、酵母の生育が抑制されることを見出した (Tira 未発表データ)。また、細胞内アミノ酸含量の増加は、ミトコンドリアの機能阻害、アミノ酸代謝の変化あるいは TORC1 の活性化を引き起こすことも報告されている (218–220)。今後、なぜ細胞内アミノ酸レベルが厳密に制御されなければならないのか、その意義を明らかにする研究が必要である。そして、アミノ酸トランスポーターを制御する生理学的意義の解明と併せて、Rsp5 と Art ファミリータンパク質複合体による基質タンパク質の選択メカニズムについても明らかになると期待される。

第2章 Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構

2-1. 序論

前章で示したように、Rsp5 はエンドサイトーシスの過程において、細胞膜上に局在する基質タンパク質をユビキチン化し、基質を効率良く細胞膜から取り除く。Rsp5 によるユビキチン化を介したエンドサイトーシスについては、Gap1 を細胞膜タンパク質のモデルに用いて盛んに研究が進められてきた (14, 126–128, 221)。易資化性の窒素源に応答して、Rsp5 は細胞膜上の Gap1 をユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導する。Gap1 のユビキチン化において、Rsp5 は WW ドメインを介して Bul1 および Bul2 と相互作用し、Gap1 を認識する。そして、HECT ドメインが有するユビキチンリガーゼ活性により、ユビキチンを Gap1 に転移する。このように、Rsp5 による基質認識、およびユビキチン化に必要な因子とそれらの相互作用のメカニズムは徐々に解明されつつあるが、Rsp5 の N 末端側に位置する C2 ドメインの役割は未だ十分に明らかになっていない。

Rsp5 の C2 ドメインは、ドメイン内に存在する 5 つの Lys 残基 (K44/K45/K75/K77/K78) が生体膜の成分の一つであるリン脂質のフォスファチジルイノシトールと直接相互作用することが知られている (98)。一方で、Nedd4 において、C2 ドメインが HECT ドメインと物理的に相互作用することも報告されており (222)、リン脂質との相互作用だけでなく、より直接的にユビキチンリガーゼ活性の調節に関与する可能性も考えられる。以上の知見に基づき、本章では、Gap1 を細胞膜タンパク質のモデルとして使用し、Rsp5 における C2 ドメインのエンドサイトーシスでの役割を解明することを目的として、研究を行った。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 菌株とプライマー、プラスミド

2-2-1-1. 菌株

Saccharomyces cerevisiae

使用した菌株を表 5 に示す。Yeast Knock Out Strain Collection は Horizon Discovery 社より購入した。

表 5 本研究で使用した菌株のリスト

名称	遺伝子型	由来
BY4741	MATa <i>his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ0 <i>met15</i> Δ0 <i>ura3</i> Δ0	Yeast Knockout Strain Collection
<i>rsp5</i> ^{L733S}	BY4741 <i>rsp5</i> ^{L733S}	Nishimura <i>et al.</i> , 2020
<i>rsp5</i> Δ	BY4741 <i>rsp5</i> Δ:: <i>hphNT1</i>	Sasaki and Takagi, 2013
<i>chc1</i> Δ	BY4171 <i>chc1</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>ent2</i> Δ	BY4171 <i>ent2</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>rvs167</i> Δ	BY4171 <i>rvs167</i> Δ:: <i>kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection

Escherichia coli

第 1 章と同様に、遺伝子のサブクローニングおよび *ccdB* を含むプラスミドのサブクローニングに、DH5α 株および DB3.1 株をそれぞれ使用した。

2-2-1-2. プライマー

プラスミド構築のために、下記表 6 のプライマーをファスマック社に依頼し、合成した。

表 6 本研究で使用したプライマーのリスト

名称	配列
C2 domain K44Q Fw	ACATCCGCAGCGCAGAAAACGTAAAT
C2 domain K44Q Rv	ATTTAACGTTTTCTGCGCTGCGGATGT
C2 domain K45Q Fw	TCCGCAGCGCAGCAAACGTAAAT
C2 domain K45Q Rv	ATTTAACGTTTGCTGCGCTGCGGA
C2 domain K75Q Fw	TTTGATCAAAAGCAATTTAAAAAG
C2 domain K75Q Rv	CTTTTAAATTGCTTTTGATCAAA
C2 domain K77Q Fw	AAGCAATTTAAACAGAAGGATCAAGGG
C2 domain K77Q Rv	CCCTTGATCCTTCTGTTTAAATTGCTT
C2 domain K78Q Fw	CAATTTAAACAGCAGGATCAAGGGTTT
C2 domain K78Q Rv	AAACCCTTGATCCTGCTGTTTAAATTG

2-2-1-3. プラスミド

- pRS313, pRS415, pRS416 (Stratagene 社)

YCp 型のプラスミド。酵母での選択マーカーとして、pRS313 に *HIS3* 遺伝子、pRS415

に *LEU2* 遺伝子、pRS416 に *URA3* 遺伝子を含む。セントロメア配列が含まれているため、染色体と同様に複製され低コピー数 (1~2 コピー) で、細胞内において安定に保持される。また、大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含む。

- pRS313-*MET15*, pRS415-*MET15*, pRS416-*MET15*

pRS313, pRS415, pRS416 それぞれに *MET15* 遺伝子が組み込まれている (114)。

- pRS415-*cgHIS3-MET15*, pRS416-*cgHIS3-MET15*

pRS415 および pRS416 に、*C. glabrata* 由来 *HIS3* (*cgHIS3*) 遺伝子と *MET15* 遺伝子が組み込まれている (114)。

- pRS-*MET15*

pRS416 上の *URA3* 遺伝子を *MET15* 遺伝子に置換している (114)。

- pRS415-*RSP5*, pRS416-*RSP5*

pRS415 あるいは pRS416 のマルチクローニングサイトに *RSP5* 遺伝子の ORF およびその上下流 500bp の配列が組み込まれている (107)。

- pRS416-*RSP5*^{T357A}

pRS416-*RSP5* を鋳型に、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) に記載の方法に準じてアミノ酸置換を導入した。pRS416 のマルチクローニングサイトに *RSP5*^{T357A} 変異遺伝子の ORF およびその上下流 500bp の配列が組み込まれている (107)。

- pRS415-*RSP5*, pRS416-*rsp5*^{C2Δ}

pRS415 あるいは pRS416-*RSP5* を鋳型に、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) に記載の方法を利用した Inverse PCR を行い、C2 ドメインを欠失させた。pRS416 のマルチクローニングサイトに *rsp5*^{C2Δ} 変異遺伝子の ORF およびその上下流 500bp の配列が組み込まれている (107)。

- pRS416-*RSP5*^{C2Δ/T357A}

pRS416-*rsp5*^{C2Δ} を鋳型に、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) に記載の方法に準じてアミノ酸置換を導入した。pRS416 のマルチクローニングサイトに *RSP5*^{C2Δ/T357A} 変異遺伝子の ORF、およびその上下流 500bp の配列が組み込まれている (107)。

- pRS415-*rsp5*^{K44Q}

- pRS415-*rsp5*^{K44/45Q}
- pRS415-*rsp5*^{K75Q}
- pRS415-*rsp5*^{K75/77/78Q}
- pRS415-*rsp5*^{K44/45/75/77/78Q}

本研究において、pRS415-*RSP5* を鋳型に、QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) に記載の方法に準じてアミノ酸置換を導入し作製した。pRS415 のマルチクローニングサイトに *rsp5*^{K44Q}, *rsp5*^{K44/45Q}, *rsp5*^{K75Q}, *rsp5*^{K75/77/78Q}, *rsp5*^{K5KQ} 変異遺伝子の ORF、およびその上下流 500bp の配列が組み込まれている。

- BG1805 (Horizon Discovery)

Yeast ORF library に含まれるプラスミドの親プラスミド。attB1-*ORF*-attB2 配列を有しており、Gateway technology (Thermo Fisher Scientific 社) による相同組換えを利用したクローニングにて、BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また、大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含む。

- BG1805-*RVS167*

Yeast ORF library に含まれるプラスミド。attB1-*RVS167*-attB2 の配列を有している。また、C 末端にタグを融合するため、遺伝子の終止コドンは除去されている。

- pDONR221 (Invitrogen)

Gateway technology (Thermo Fisher Scientific 社) による相同組換えを利用したクローニングに使用するプラスミド。attP1-*ccdB*-Cm^R-attP2 配列を有しており、BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を含む。

- pDONR221-*RVS167*

本研究において、BG1805-*RVS167* と pDONR221 の BP 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応により作製した。pDONR221 上の attP1-*ccdB*-Cm^R-attP2 配列が attL1-*RVS167*-attL2 に置換されている。また、C 末端にタグを融合するため、各遺伝子の終止コドンは除去されている。

- pAG413-P_{GPD}-*ccdB*-yEGFP-T_{CYC1}
- pAG415-P_{GPD}-*HA*-*ccdB*-T_{CYC1}
- pAG416-P_{GPD}-*ccdB*-yEGFP-T_{CYC1}

Gateway technology (Thermo Fisher Scientific 社) を用いたクローニング方法に使用する発現用プラスミド。P_{GPD}-attR1-Cm^R-*ccdB*-attR2-yEGFP-T_{CYC1} および P_{GPD}-*HA*-attR1-Cm^R-*ccdB*-attR2-T_{CYC1} 配列を有しており、LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また、大腸菌の複製起点および選択マーカーとしてア

ンピシリン耐性遺伝子を含む。

- pAG413-P_{GPD}-GAPI-yEGFP-T_{CYCI}
- pAG416-P_{GPD}-AGPI-yEGFP-T_{CYCI}
- pAG416-P_{GPD}-GAPI-yEGFP-T_{CYCI}
- pAG416-P_{GPD}-PUP4-yEGFP-T_{CYCI}

GAPI-yEGFP、および AGPI-yEGFP, PUP4-yEGFP 融合遺伝子の ORF の上流に TDH3 遺伝子のプロモーター、下流に CYCI 遺伝子のターミネーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる (114)。

- pAG415-P_{GPD}-RVS167-HA-T_{CYCI}

本研究において、pDONR221-RVS167 と pAG415-P_{GPD}-ccdB-HA-T_{CYCI} の LR 酵素を用いた *in vitro* 組換え反応により作製した。RVS167-HA 融合遺伝子の ORF の上流に TDH3 遺伝子のプロモーター、下流に CYCI 遺伝子のターミネーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる。

2-2-2. 培地

YPD 培地、SD + Am 培地、SD - N + Allantoin 培地および LB 培地については、第 1 章と同様にして調製した。

- SC 培地

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.17 % (FORMEDIUM 社)

グルコース 2 % (ナカライテスク社)

硫酸アンモニウム 0.5 % (ナカライテスク社)

Drop out mix (各種アミノ酸) 0.2 %

寒天 2 % (必要に応じて添加) (三井製糖社)

1 N NaOH で pH 6.0 ~ 6.5 に調整

2-2-3. 部位特異変異によるアミノ酸置換の導入

pRS415-RSP5 を鋳型として、C2 domain K44Q, C2 domain K45Q, C2 domain K75Q, C2 domain K77Q, C2 domain K78Q プライマー対 (Fw/Rv) を用いて、QuikChange によって Rsp5 に各々のアミノ酸置換を導入した。ポリメラーゼは KOD Plus Neo (東洋紡社) を用いた。PCR 増幅産物を *DpnI* (NEB 社) により 37 °C で 1 時間処理した後、DH5 α に導入しサブクローニングを行った。

2-2-4. Gap1-EGFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察

各株を SD + Am 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.1 になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振

盪培養した。硫酸アンモニウムを終濃度 50 mM になるように添加し、30 分振盪培養した後、観察を行った。HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) デジタルカメラが付属した蛍光顕微鏡 Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用いて、GFP のシグナルを検出した (励起波長; 488 nm, 吸収波長; 509 nm)。

2-2-5. Gap1-EGFP および Rvs167-HA 融合タンパク質の免疫沈降

各株を SD 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.2 になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。*rsp5*^{L733S} 株においては、さらに 30 °C あるいは 38 °C で 1 時間振盪培養した。硫酸アンモニウムを終濃度 50 mM になるように添加し、30 分振盪培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、1 % NP-40、0.1 % deoxycholate acid、0.1 % Sodium dodecyl sulfate [SDS]、protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカー MB601U (安井器械社製) で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、15 サイクル)。破碎後、破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間、4 °C)、ガラスビーズを取り除いた。上清を回収した後、Bradford 法で総タンパク質量を定量した。上清 (3.0 mg/mL) に 10 μL の平衡化した抗 GFP マグネティックビーズ (免疫生物学研究所社, ClonID: RQ2) あるいは、抗 HA マグネティックビーズ (免疫生物学研究所社, ClonID: 5D8) を加え、ローターを用いて 2 時間、4 °C でインキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、10 % glycerol、and 0.1 % NP-40) で 3 回洗浄し、沈降物に精製水で 1× になるように希釈した 5×SDS sample buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8]、10 % SDS、11.25 % glycerol、25 % 2-mercaptoethanol、0.0625 % bromophenol blue [BPB]) を加え、2 分間、95 °C で煮沸して可溶化した。一方、タンパク質濃度を調整した後の上清を 40 μL 分取し、5×SDS sample buffer を 10 μL 加え、2 分間、95 °C で煮沸したものを全細胞抽出液とした。

2-2-6. 生育試験

各株を SD - N + Allantoin 培地で一晩前培養後、OD₆₀₀ = 0.1 ~ 0.2 になるように希釈し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。培養した各株を集菌し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄後、OD₆₀₀ = 1.0 になるように滅菌水で懸濁した。得られた懸濁液を 10 倍ずつ 3 段階 (10 ~ 1,000 倍) に希釈したサンプルを調製し、3 μL ずつ寒天培地上にスポットした。スポット後の寒天培地を 1 ~ 5 日間 30 °C で培養し、観察を行った。

2-2-7. Rvs167-HA 融合タンパク質と Rsp5 の共免疫沈降

各株を SD 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.2 になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。硫酸アンモニウムを終濃度 50 mM になるように添加し、30 分振盪培養し

た後、細胞を回収した。回収した細胞を Lysis buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4]、150 mM sodium chloride、10 % glycerol、1.0 % NP-40、protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーMB601U で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、15 サイクル)。破碎後、破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間、4 °C)、ガラスビーズを取り除いた。上清を回収した後、Bradford 法で総タンパク質量を定量した。上清 (3.0 mg/mL) に 10 μ L の平衡化した抗 HA マグネティックビーズ (免疫生物学研究所社) を加え、ローターを用いて 2 時間、4 °C でインキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、10 % glycerol、and 0.1 % NP-40) で 3 回洗浄し、沈降物に精製水で 1 \times になるように希釈した 5 \times SDS sample buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8]、10 % SDS、11.25 % glycerol、25 % 2-mercaptoethanol、0.0625 % BPB) を加え、2 分間、95 °C で煮沸して可溶化した。一方、タンパク質濃度を調整した後の上清を 40 μ L 分取し、5 \times SDS sample buffer を 10 μ L 加え、2 分間、95 °C で煮沸したものを全細胞抽出液とした。

2-2-8. シクロヘキシミドを用いた Rvs167-HA 融合タンパク質量の経時的な解析

各株を SD 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.1 になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 0.4 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。タンパク質の翻訳合成を停止するため、シクロヘキシミドを終濃度 200 μ g/mL になるように添加し、30 分振盪培養した。硫酸アンモニウムを終濃度 50 mM になるように添加し、30 分振盪培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を 10 % (v/w) トリクロロ酢酸溶液に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーMB601U で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、9 サイクル)。破碎後、破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間)、ガラスチューブを取り除いた。沈殿物に SDS sample buffer (0.5 M Tris-HCl [pH 8.0]、2 % SDS、2.25 % glycerol、5 % 2-mercaptoethanol、0.0125 % BPB) を加え、2 分間、95 °C で煮沸して可溶化した。

2-2-9. ウェスタンブロッティング

各サンプルを、6 %あるいは、8 %、10 %の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (200 V、15 mA/枚、60 ~ 90 分) を行った。泳動後のゲルから転写バッファー (0.58 % [w/v] Tris、0.1 % [w/v] SDS、2.9 % [w/v] グリシン、20 % メタノール) で満たしたトランスファーユニット (Bio-Rad 社製) を使用して、PVDF メンブレン (Millipore 社) にタンパク質を転写した (115 V、400 mA、120 分)。メンブレンを ブロッキングバッファー (1 \times TBS - T、3 % スキムミルクあるいは 5 % BSA) でブロッキングした (室温、60 分)。1 次抗体として、Can Get Signal Solution 1 (東洋紡社) で 2,000 倍に希釈した抗 Rsp5 ウサギ抗体 (Jon M. Huibregtse 博士 [University of Texas at Austin, U. S. A.] より分譲、10,000 倍に希釈した抗 GAPDH ウサギ抗体 (ClonID: GA1R)、5,000 倍に希釈した抗ユビキチン (Ub) マウス抗体 (ClonID: 13-1600)、および 5,000 倍希釈した GFP マウス抗体 (ClonID: AVU73901) をそれぞれ用いた。2 次抗体には Can Get Signal Solution 2

(東洋紡社) で 2,000 倍に希釈した抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、Easy blot 抗マウス IgG 抗体 (Gene Tex 社) および抗ウサギ IgG 抗体 (Promega 社) をそれぞれ用いた。検出には ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を用い、ルミノメーターLAS-4000 (Fujifilm 社製) で検出した。各バンドのシグナル強度は、Image J ソフトウェアを用いて測定し、定量化した。

2-2-10. Lucifer Yellow 染色細胞の蛍光顕微鏡観察

各株を YPD 培地で一晩前培養後、 $OD_{600} = 0.05$ になるように YPD 培地に懸濁し、 $OD_{600} = 0.1 \sim 0.2$ になるまで振盪培養した。各株を集菌し、上清を捨てた後、YPD 培地 90 μ L と Lucifer Yellow 溶液 (40 mg/mL) 10 μ L を加え懸濁し、30 $^{\circ}$ C で 25 分間静置培養した。50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.5 (50 mM リン酸二水素ナトリウム、50 mM リン酸水素ナトリウム、10 mM NaN_3 、10 mM NaF) 1 mL を加え反応を停止させ、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.5 で洗浄後、観察を行った。HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) デジタルカメラが付属した蛍光顕微鏡 Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用いて解析を行った (励起波長; 488 nm, 吸収波長; 509 nm)。

2-2-11. Rvs167-HA 融合タンパク質の免疫沈降と LC-MS/MS によるユビキチン化部位の同定

Rvs167-HA 発現株を SD 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、滅菌水で洗浄した。 $OD_{600} = 0.2$ になるように SD - N + Allantoin 培地に懸濁し、 $OD_{600} = 1.0$ 付近になるまで 30 $^{\circ}$ C で振盪培養した。硫酸アンモニウムを終濃度 50 mM になるように添加し、30 分振盪培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、1 % NP-40、0.1 % deoxycholate acid、0.1 % Sodium dodecyl sulfate [SDS]、protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーMB601U (安井器械社製) で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、15 サイクル)。破碎後、破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間、4 $^{\circ}$ C)、ガラスビーズを取り除いた。上清を回収した後、上清に 10 μ L の平衡化した抗 HA マグネティックビーズ (免疫生物学研究所社, ClonID: 5D8) を加え、ローターを用いて 2 時間、4 $^{\circ}$ C でインキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、10 % glycerol、and 0.1 % NP-40) で 3 回洗浄した後、純水でさらに 3 回洗浄した。洗浄したビーズを 200 mM グリシン (pH 2.0) に懸濁した後、上清を回収し、200 mM Tris-HCl (pH 8.5) を加えて上清を中和した。中和した上清にトリプシン (Sigma-Aldrich 社)、およびリシルエンドペプチダーゼ (富士フィルム和光純薬社) をそれぞれ終濃度 4 ng/ μ L、および 40 ng/ μ L になるように添加し、一晩、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。酵素反応液にギ酸 (富士フィルム和光純薬社) を終濃度 1 % (v/v) になるように加え、溶液の pH を 4.0 以下にすることにより酵素反応を停止した後、酸性溶液を遠心分離し (15,000 rpm、15 分間、4 $^{\circ}$ C)、消化酵素を取り除いた。生成したペ

ペプチド断片の濃縮・脱塩は、Solid Phase Extraction (SPE) C-TIP (AMR 社) を用いて実施した。脱塩処理したペプチド溶液を遠心濃縮機 (Eppendorf 社製) にて乾固させた後、0.1 % ギ酸含有 5 % アセトニトリル溶液を加え可溶化した。

ペプチド断片は、移動相に 0.1 % ギ酸含有アセトニトリル/水溶媒を使用した 80 分間の liner gradient (54 分間の 5–35 % アセトニトリル/水溶媒、8 分の 35–65 % アセトニトリル/水溶媒、1 分の 65–95 % アセトニトリル/水溶媒) の条件で、L-Column ODS, (0.075x150 mm) (CERI 社製) カラムを装着した Advance UHPLC (Michrom BioResources 社製) により分離した。ペプチドの分離後、LTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて、分離したペプチドを 2.0 kV でイオン化し、450 から 1,500 m/z 領域の MS スペクトルを検出した。スペクトル強度が上位 3 番目までのプリカーサイオンをそれぞれ MS/MS 解析に使用した。得られたデータは、Mascot ソフトウェア (Matrix Science 社製) を使用し、帰属したペプチドに由来するタンパク質の同定は、NCBIprot 20190324 を用い行った。

2-2-12. その他

大腸菌からのプラスミド調製、大腸菌の形質転換、酵母の取り扱いや遺伝子操作および各試薬の調製については、第 1 章と同様にして実施した。

2-3. 結果

2-3-1. Rsp5 の C2 ドメインに依存したエンドサイトーシス

現在までに、Rsp5 遺伝子の変異によって細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼである Gap1 のエンドサイトーシスが影響を受けると、プロリンの毒性アナログである AZC の含有培地における生育が変化することが見出されている (107, 114, 223)。そこでまず、C2 ドメインを欠損した Rsp5 変異体 (*rsp5*^{C2Δ}) を *rsp5*Δ 株にて発現する株を構築し、AZC 耐性に及ぼす影響を解析した (図 26)。その結果、*rsp5*^{C2Δ} 発現株は、AZC が存在しない場合には野生型 RSP5 発現株と比較して生育の差を示さなかったのに対し、興味深いことに、AZC が存在する場合、*rsp5*^{C2Δ} 発現株の生育は著しく阻害された。この結果から、C2 ドメインの欠損により Gap1 のエンドサイトーシスが抑制されたため、AZC が細胞内により多く流入し、増殖が阻害されたことが考えられた。

図 26 の結果から、C2 ドメインの欠損が Gap1 のエンドサイトーシスを抑制する可能性が示された。そこで、アラントインを単一窒素源とする培地に硫酸アンモニウムを添加した時の Gap1 の細胞内局在を解析した (図 27, 28)。まず野生型株においては、難資化性のアラントインを単一窒素源とする場合に Gap1 が主に細胞膜上に局在し、易資化性のアンモニウムイオンを添加することでエンドサイトーシスが誘導され、Gap1 が液胞に移行した。一方、*rsp5*^{C2Δ} 発現株では、アンモニウムイオンの添加に関わらず、Gap1 の多くはエンドサイトーシスを受けずに細胞膜上に局在した。これらの結果は、AZC 含有培地での生育評価と一致しており、Rsp5 は C2 ドメインを介して、Gap1 のエンドサイトーシスを誘導することが示された。

次に、C2 ドメインは Gap1 に対して特異的に機能するのか、あるいは幅広い膜タンパク質に対しても必要なのか検討した。Gap1 以外の膜タンパク質に対するエンドサイトーシスへの影響を調べるため、アラントインを単一窒素源とする培地にアンモニウムイオンまたはアスパラギンを添加した時のプロリンパーミアーゼ Put4 および広域アミノ酸パーミアーゼ Agp1 の細胞内局在をそれぞれ解析した (図 29)。その結果、野生型株ではアラントインを単一窒素源とする条件において、Put4 および Agp1 は主に細胞膜上に局在するのに対し、アンモニウムイオンあるいはアスパラギンを添加することでエンドサイトーシスが誘導され、Put4 および Agp1 がそれぞれ液胞に局在移行した。一方、*rsp5*^{C2Δ} 発現株では、エンドサイトーシスを誘導する窒素源の添加にも関わらず、Put4 および Agp1 の多くはエンドサイトーシスを受けずに細胞膜上に局在した。よって Rsp5 は C2 ドメインを介して、Gap1 を含む幅広い細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスに関与することが示された。

Rsp5 による Gap1 のユビキチン化は、エンドサイトーシス誘導の引き金となることが知られている。そこで、Rsp5 の温度感受性変異 (*rsp5*^{L733S}) 株および *rsp5*^{C2Δ} 発現株を用いて、Gap1 のユビキチン化レベルを検出した。まず *rsp5*^{L733S} 株について解析を行ったところ (図 20)、非制限温度条件下 (30 °C) では、アンモニウムイオンの添加により、ユビキチンシグナルの増大が検出された。一方、制限温度条件下 (38 °C) に

においては、アンモニウムイオンの添加によるユビキチン化レベルの増大が抑制された。この結果から、アンモニウムイオンの添加により生じる Gap1 のユビキチン化は、Rsp5 の活性に依存していることが確認された。興味深いことに、今回の解析対象である C2 ドメイン欠損株においては (図 31)、アンモニウムイオンの添加により、野生型 *RSP5* 発現株と同程度のユビキチンシグナルの増大が検出された。以上の結果から、C2 ドメインは Gap1 のユビキチン化とは異なるメカニズムでエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

これまでに、Rsp5 の C2 ドメインを欠損することで細胞膜を透過しない蛍光試薬である Lucifer Yellow の細胞内への取込みが減少することが報告されている (125)。培地中に含まれる Lucifer Yellow の細胞内への取り込みは、液相エンドサイトーシスにより行われるため、C2 ドメインの欠損が液相エンドサイトーシスを抑制すると考えられている。そこで、本研究においても C2 ドメインの欠損が Lucifer Yellow の細胞内への取り込みに及ぼす影響を解析したところ (図 32, 33)、野生型 *RSP5* 発現株では、液相で蛍光シグナルを示す細胞の割合が 95 % と高い割合を示した。一方、*rsp5*^{C2Δ} 発現株ではその割合が 65 % 程度であり、野生型 *RSP5* 発現株と比較して Lucifer Yellow の細胞内への取り込みが部分的に減少した。このことから、Rsp5 は、C2 ドメインを介して液相エンドサイトーシスの調節に関与することが示唆された。

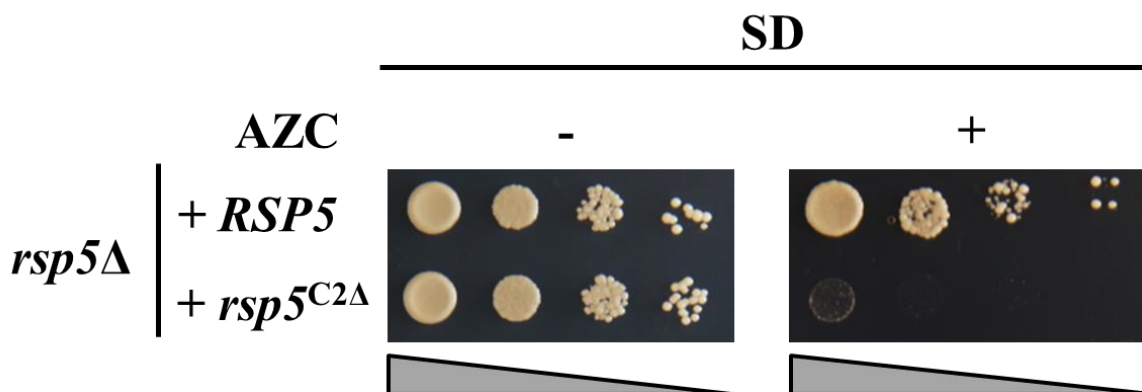


図 26 C2 ドメイン欠損株を用いた AZC 感受性試験

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5^{C2Δ}* 変異 (pRS416-*rsp5^{C2Δ}*) 発現プラスミドを導入し、pRS415-*CgHIS3-MET15* で栄養要求性を相補した各株を OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで SD - N + Allantoin 培地において 30 °C で培養した。各株の OD を 10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、SD 寒天培地および 0.5 mM AZC 含有 SD 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 25 °C で 72 時間培養した。

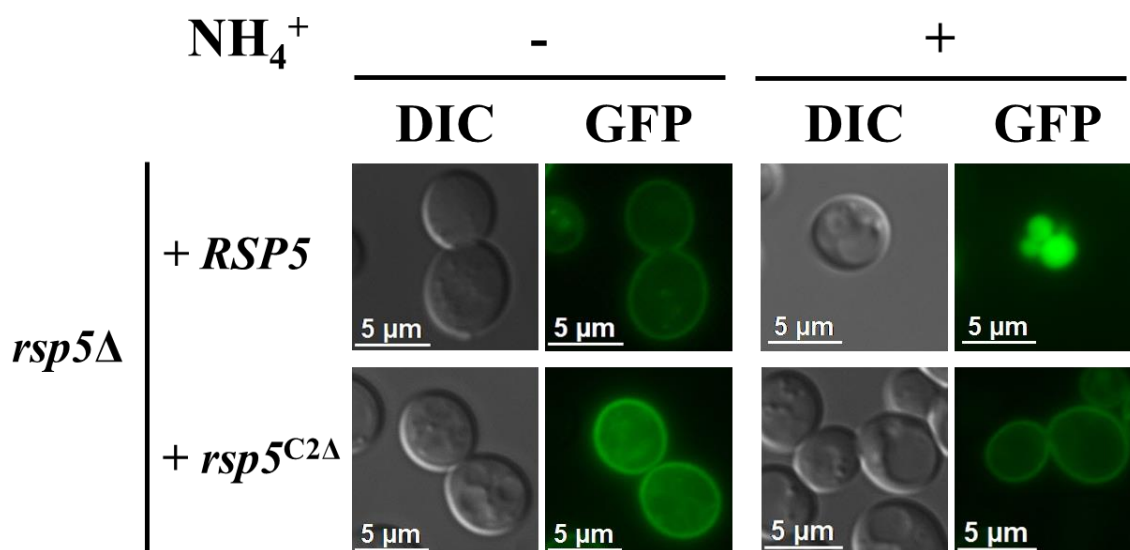


図 27 C2 ドメイン欠損株における Gap1 の細胞内局在

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5^{C2Δ}* 変異 (pRS416-*rsp5^{C2Δ}*) 発現プラスミドを導入した株に、Gap1-EGFP 発現プラスミド (pAG413-*P_{GDP}-GAP1-yEGFP-T_{CYC1}*) を導入し、pRS313-*MET15* で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 1 時間の細胞 (+ NH₄⁺) および添加前の細胞 (- NH₄⁺) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

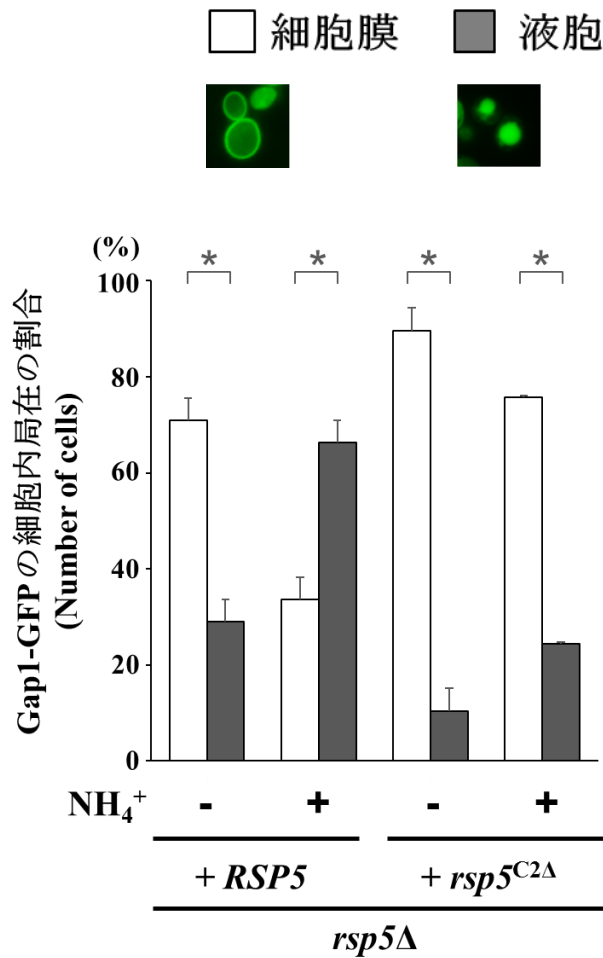


図 28 C2 ドメイン欠損株における Gap1 の細胞内局在に関する定量的解析

野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5^{C2Δ}* 変異 (pRS416-*rsp5^{C2Δ}*) 発現株のそれぞれについて、Gap1-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし、細胞内局在を細胞膜、液胞に分類した。各株とも独立に 3 クローンを用いて同様の実験を行い、カウントした細胞の総数を 100 %とした場合に Gap1 の各局在パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 3 回の標準誤差を用いた。* $p < 0.05$ versus + WT (two-way ANOVA with Turkey's test)。

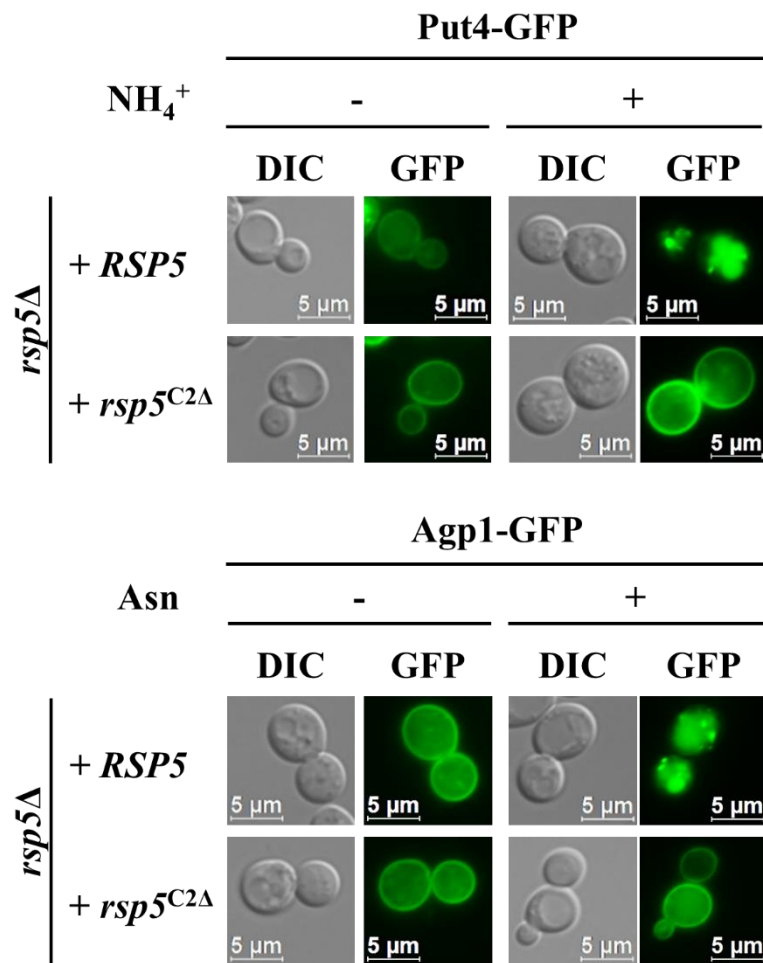


図 29 C2 ドメイン欠損株における Put4 および Agp1 の細胞内局在

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS415-*RSP5*) および *rsp5C2Δ* 変異 (pRS415-*rsp5C2Δ*) 発現プラスミドを導入した株に、空ベクター (pAG416-*P_{GDP}-ccdB-yEGFP-T_{CYC1}*)、Put4-EGFP 発現プラスミド (pAG416-*P_{GDP}-PUT4-yEGFP-T_{CYC1}*)、Agp1-EGFP 発現プラスミド (pAG416-*P_{GDP}-AGP1-yEGFP-T_{CYC1}*) をそれぞれ導入し、pRS313-*MET15* で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 1 時間の細胞 (+ NH₄⁺) および添加前の細胞 (- NH₄⁺)、または終濃度 10 mM のアスパラギン添加後 1 時間の細胞 (+ Asn) および添加前の細胞 (- Asn) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

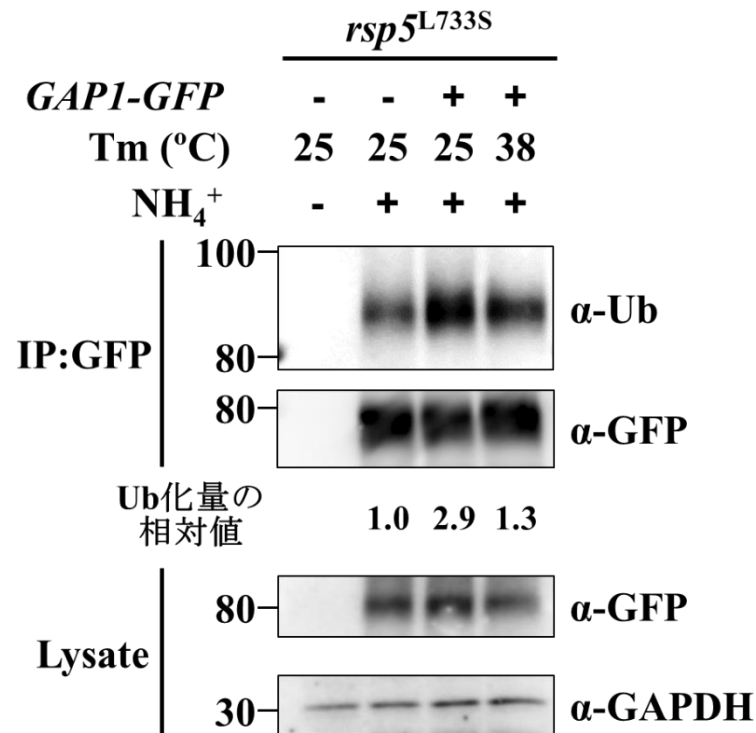


図 30 Rsp5 の活性に依存した Gap1 のユビキチン化

rsp5^{L733S} 株に Gap1-GFP 発現プラスミド (pAG413-P_{GDP}-GAP1-yEGFP-T_{CYC1}) を導入し、pRS313-MET15 で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。さらに 30 °C または 38 °C で 1 時間培養した後、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加後 30 分間培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 GFP 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 GFP 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。30 °C で培養した条件での硫酸アンモニウム添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。

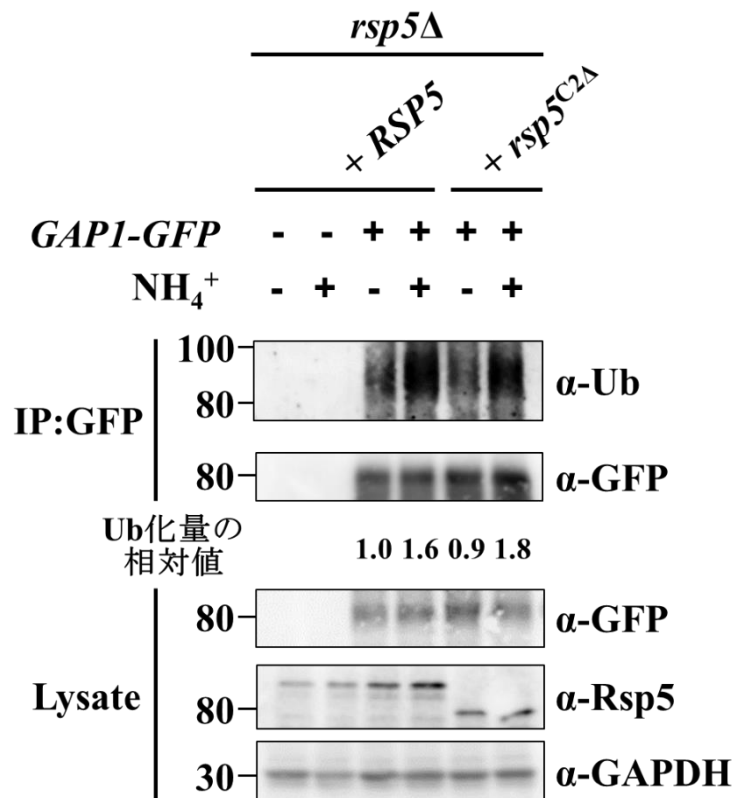


図 31 C2 ドメイン欠損株における Gap1 のユビキチン化

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5^{C2Δ}* 変異 (pRS416-*rsp5^{C2Δ}*) 発現プラスミドを導入した株に、空ベクター (pAG413-*P_{GDP}-ccdB-yEGFP-T_{CYC1}*) または *Gap1-GFP* 発現プラスミド (pAG413-*P_{GDP}-GAP1-yEGFP-T_{CYC1}*) を導入し、pRS313-*MET15* で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で $\text{OD}_{600} \approx 1.0$ になるまで培養した。終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加後 30 分間培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 GFP 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 GFP 抗体、抗 *Rsp5* 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。野生型 *RSP5* 発現株の硫酸アンモニウム添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。

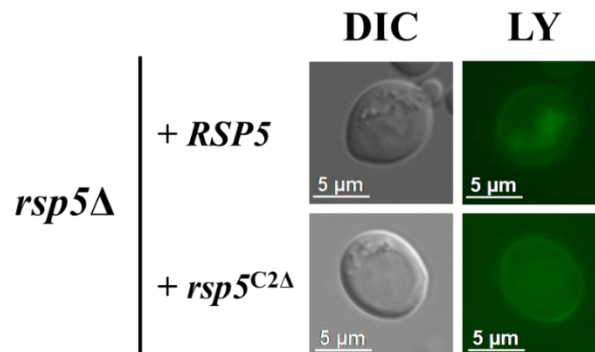


図 32 C2 ドメイン欠損株における液相エンドサイトーシス

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5ΔC2* 変異 (pRS416-*rsp5C2Δ*) 発現プラスミドを導入した株を YPD 培地で $OD_{600} \approx 0.1 \sim 0.2$ になるまで培養し、終濃度 4 mg/mL の Lucifer Yellow を添加し、25 分後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した (LY)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

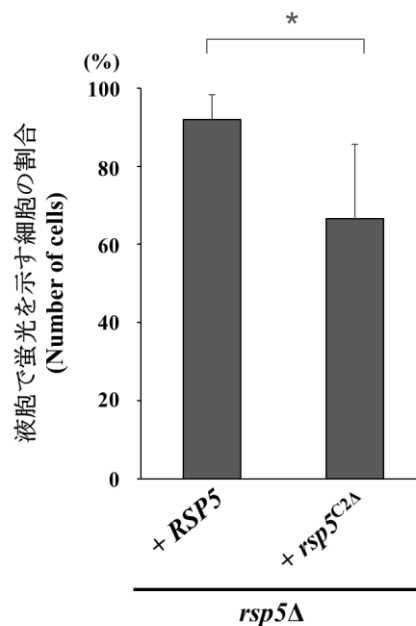


図 33 C2 ドメイン欠損株における液相エンドサイトーシスに関する定量的解析

野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5C2Δ* 変異 (pRS416-*rsp5C2Δ*) 発現株のそれぞれにおいて、Lucifer Yellow で染色した約 200 細胞の中で蛍光シグナルを液胞で示す細胞をカウントした。カウントした細胞の総数を 100% とした場合に Lucifer Yellow の各蛍光パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 30 回の標準誤差を用いた。* $p < 0.05$ versus + WT (two-way ANOVA with Turkey's test)。

2-3-2. Rsp5 の C2 ドメインにおけるフォスファチジルイノシトール結合能を介したエンドサイトーシス

現在までに、Rsp5 の C2 ドメインが生体膜の成分の一つであるリン脂質と相互作用すること、およびタンパク質と相互作用することが報告されている (98)。Gap1 のエンドサイトーシスにおける C2 ドメインの役割を明らかにするため、C2 ドメイン内に存在する 5 つの Lys 残基 (K44/K45/K75/K77/K78) を Gln に置換することで、C2 ドメインによるフォスファチジルイノシトール結合能を欠損させた変異型 RSP5 ($rsp5^{K44/45/75/77/78Q}$) を $rsp5\Delta$ 株において発現する株を作製した。また、5 つの Lys 残基の内いくつかを Gln に置換した株も併せて作製し ($rsp5^{K44/45Q}$, $rsp5^{K75/77/78Q}$)、これらの変異が AZC 耐性に及ぼす影響について解析した (図 34)。これらの変異型 RSP5 発現株は、AZC が存在しない場合ではほとんど生育の差を示さなかった。一方、0.5 mM AZC が含まれる条件においては、 $rsp5^{K44/45Q}$ 発現株は野生型 RSP5 発現株とほぼ同程度あるいは部分的な生育阻害を示したが、 $rsp5^{K75/77/78Q}$ および $rsp5^{K44/45/75/77/78Q}$ 発現株の生育は著しく阻害され、 $rsp5^{C2\Delta}$ 発現株と同様の表現型を示した。より低濃度の AZC が存在する培地においては、 $rsp5^{K75/77/78Q}$ 発現株は $rsp5^{C2\Delta}$ 発現株よりも良好な生育を示したが、野生型 RSP5 発現株や、その他の変異株と比べて顕著な生育遅延を示した。以上の結果から、C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能を失うと、Gap1 のエンドサイトーシスが抑制されたため、AZC が細胞内により多く流入し、増殖が阻害されたのではないかと考えられた。また、フォスファチジルイノシトール結合能に必要であることが報告されていた 5 つの Lys 残基の内、3 つの Lys 残基 (K75, K77, K78) が重要な役割を果たすことが明らかになった。

図 34 の結果から、Rsp5 の C2 ドメインによるフォスファチジルイノシトール結合能が、Gap1 のエンドサイトーシスに必要であることが示唆された。そこで、アラントインを単一窒素源とする培地に硫酸アンモニウムを添加した条件における、Gap1 の細胞内局在を解析した (図 35, 36)。その結果、 $rsp5^{K44/45Q}$ 発現株ではアンモニウムイオンの添加後に Gap1 が液胞に局在しており、その程度も野生型 RSP5 発現株とほぼ同等であったことから、これらの変異は、Gap1 のエンドサイトーシスに影響しないことが示された。一方、 $rsp5^{K75/77/78Q}$ および $rsp5^{K44/45/75/77/78Q}$ 発現株においてはアンモニウムイオンの添加後でさえも Gap1 は細胞膜上に局在しており、 $rsp5^{C2\Delta}$ 発現株の表現型と酷似していたことから、Gap1 のエンドサイトーシスに欠損が生じたことが明らかになった。この結果は、AZC 含有培地での生育評価と一致しており、Rsp5 は C2 ドメインによるフォスファチジルイノシトールとの結合を介して、Gap1 のエンドサイトーシスを制御していることが示された。

次に、C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能の欠損が、Lucifer Yellow の細胞内への取り込みに及ぼす影響について解析した (図 37, 38)。その結果、 $rsp5^{K44/45Q}$ 発現株では液胞で蛍光シグナルを示す細胞の割合が約 90 %程度であり、野生型 RSP5 発現株と同程度の割合を示した。一方、 $rsp5^{K75/77/78Q}$ および $rsp5^{K44/45/75/77/78Q}$ 発現株においては、その割合がそれぞれ約 75 %あるいは約 60 %であり、野生型 RSP5

発現株と比較して Lucifer Yellow の細胞内への取り込みが部分的に減少した。この傾向は、*rsp5*^{C2Δ} 発現株とほぼ同程度であったことから、Rsp5 は C2 ドメインによるフォスファチジルイノシトールとの結合を介して液相エンドサイトーシスの調節に関与することが示唆された。

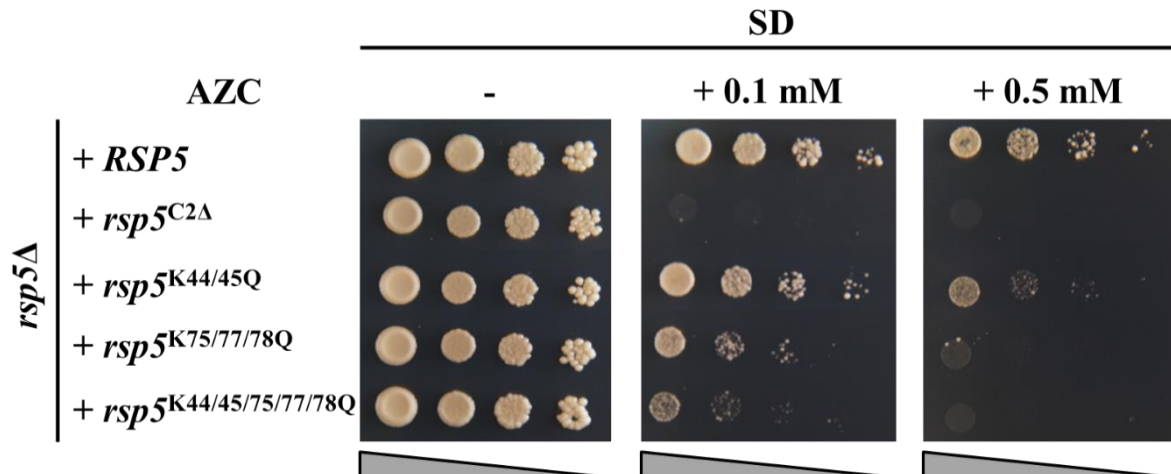


図 34 C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能欠損株を用いた AZC 感受性試験
rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*)、*rsp5*^{C2Δ} 変異 (pRS416-*rsp5*^{C2Δ})、*rsp5*^{K44Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K44Q})、*rsp5*^{K44/45Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K44/45Q})、*rsp5*^{K75Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K75Q})、*rsp5*^{K75/77/78Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K75/77/78Q})、*rsp5*^{K44/45/75/77/78Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K44/45/75/77/78Q}) 発現プラスミドをそれぞれ導入し、pRS415-*CgHIS3-MET15* または pRS416-*CgHIS3-MET15* で栄養要求性を相補した各株を OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで SD - N + Allantoin 培地において 30 °C で培養した。各株の OD を 10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、SD 寒天培地および 0.5 mM AZC 含有 SD 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 25 °C で 72 時間培養した。

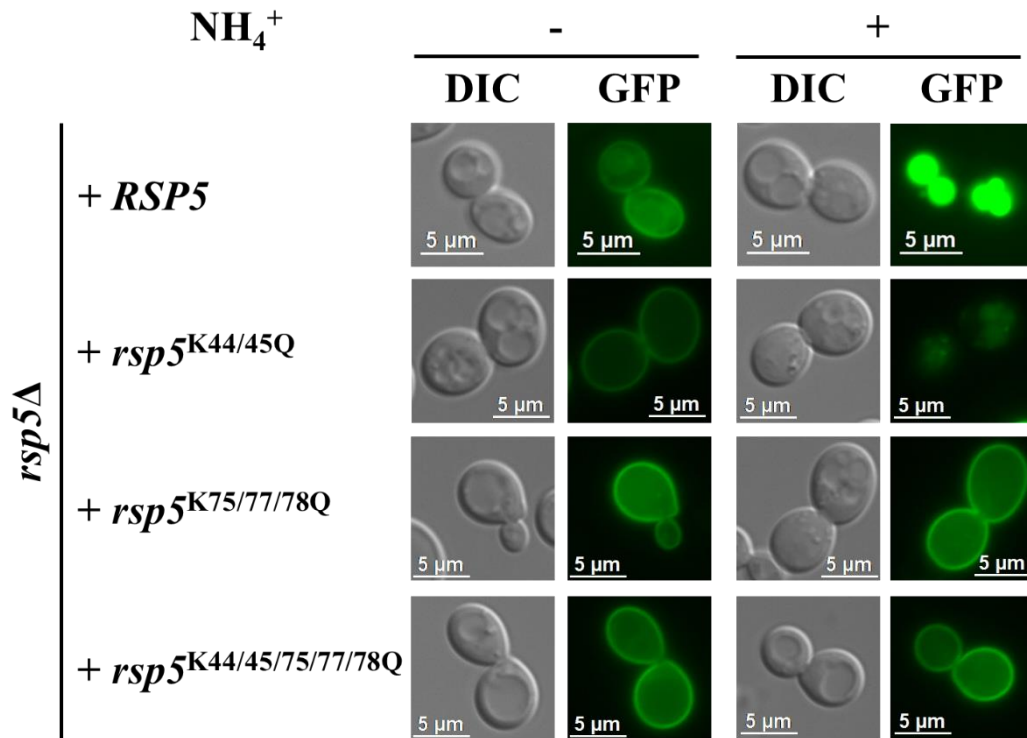


図 35 *C2* ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能欠損株における
Gap1 の細胞内局在

rsp5 Δ 株に *rsp5*^{K44Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K44Q})、*rsp5*^{K44/45Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K44/45Q})、*rsp5*^{K75Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K75Q})、*rsp5*^{K75/77/78Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K75/77/78Q})、*rsp5*^{K44/45/75/77/78Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K44/45/75/77/78Q}) 発現プラスミドをそれぞれ導入した株に、Gap1-EGFP 発現プラスミド (pAG413-P_{GDP}-GAP1-yEGFP-T_{Cyc1}) を導入し、pRS416-MET15 で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ \approx 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 1 時間の細胞 (+ NH_4^+) および添加前の細胞 (- NH_4^+) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

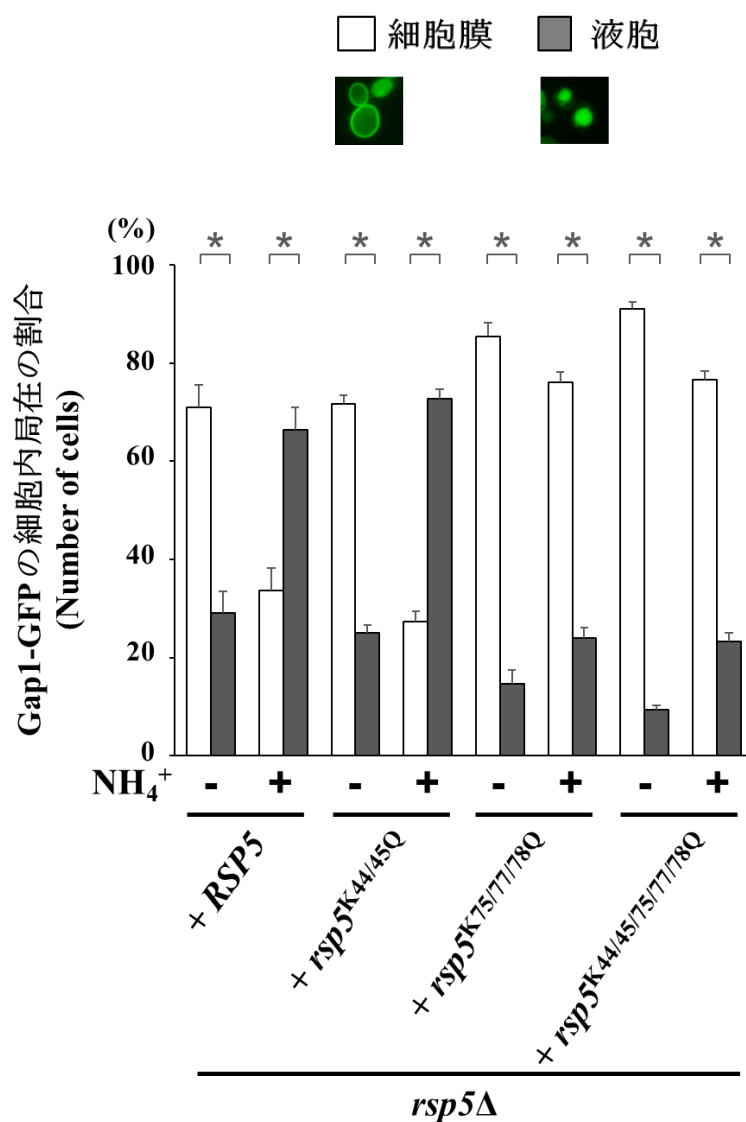


図 36 C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能欠損株における Gap1 の細胞内局在に関する定量的解析

各変異型 *RSP5* 発現株について、Gap1-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし細胞内局在を細胞膜、液胞に分類した。各株とも独立に 3 クローンを用いて同様の実験を行い、カウントした細胞の総数を 100 %とした場合に Gap1 の各局在パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 3 回の標準誤差を用いた。* $p < 0.05$ (Student's *t*-test)。

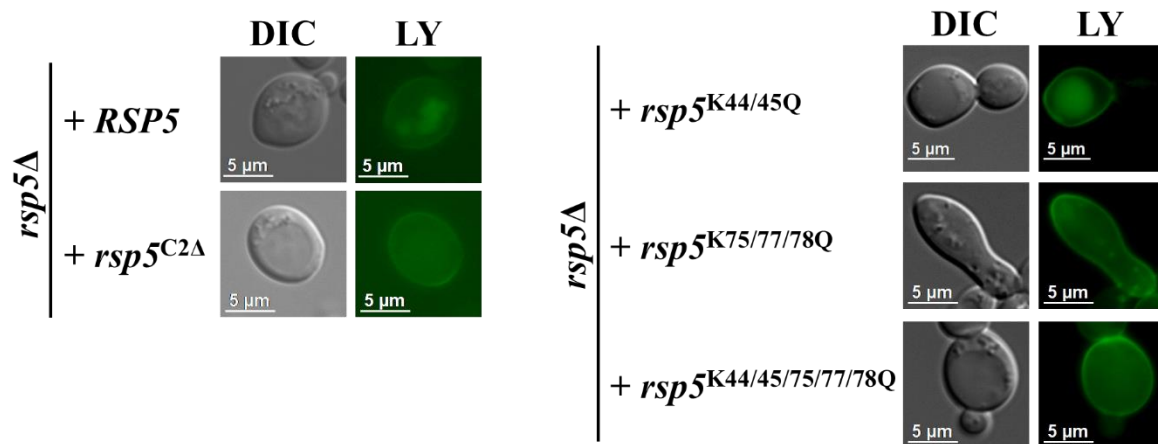


図 37 C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能欠損株における
液相エンドサイトーシス

rsp5Δ 株に *rsp5^{K44Q}* 変異 (pRS415-*rsp5^{K44Q}*)、*rsp5^{K44/45Q}* 変異 (pRS415-*rsp5^{K44/45Q}*)、*rsp5^{K75Q}* 変異 (pRS415-*rsp5^{K75Q}*)、*rsp5^{K75/77/78Q}* 変異 (pRS415-*rsp5^{K75/77/78Q}*)、*rsp5^{K44/45/75/77/78Q}* 変異 (pRS415-*rsp5^{K44/45/75/77/78Q}*) 発現プラスミドをそれぞれ導入した株を YPD 培地で $OD_{600} \approx 0.1 \sim 0.2$ になるまで培養し、終濃度 4 mg/mL の Lucifer Yellow を添加し、25 分後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した (LY)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

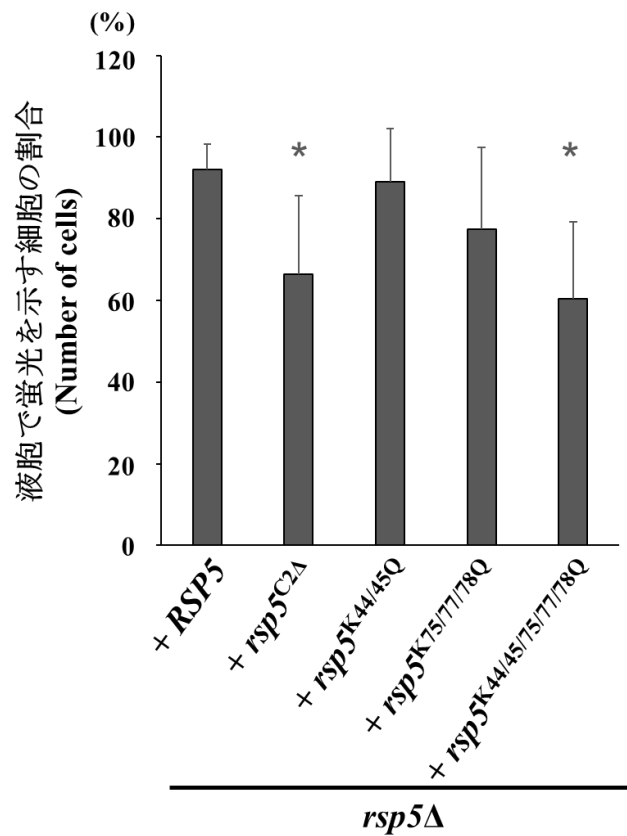


図 38 C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能欠損株における液相エンドサイトーシスに関する定量的解析

各変異型 *RSP5* 発現株について、Lucifer Yellow で染色した約 200 細胞の中で蛍光シグナルを液胞で示す細胞をカウントした。カウントした細胞の総数を 100%とした場合に Lucifer Yellow の各蛍光パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 30 回の標準誤差を用いた。 $*p < 0.05$ versus + WT (two-way ANOVA with Turkey's test)。

2-3-3. アダプタータンパク質と独立した C2 ドメインを介したエンドサイトーシス

先行研究において、*RSP5*^{T357A} 変異により、アダプタータンパク質の Bul2 との相互作用が強化され、Gap1 が恒常的に液胞へ輸送される結果、AZC に対する耐性が上昇することが報告されている (107, 114)。もし、C2 ドメインがアダプタータンパク質との相互作用を介した Gap1 の認識に関与しないのであれば、C2 ドメインを欠損しても *RSP5*^{T357A} 変異による恒常的な液胞輸送も阻害されないことが推測された。そこで、*RSP5*^{T357A} の C2 ドメインを欠損した変異型 *RSP5* (*rsp5*^{C2Δ/T357A}) を *rsp5*Δ 株において発現する株を構築し、AZC 耐性に及ぼす影響について解析した。先行研究で報告されたように、*RSP5*^{T357A} 発現株では、AZC が存在する場合でも良好な生育を示した (図 39)。興味深いことに、*rsp5*^{C2Δ} 発現株は AZC 含有培地で顕著な生育阻害を示したのに対し、*RSP5*^{T357A} 発現株における C2 ドメインの欠損は生育にほとんど影響を及ぼさなかった。この結果から、C2 ドメインの欠損は *RSP5*^{T357A} 発現株における Gap1 の恒常的な液胞輸送には影響を及ぼさない可能性が考えられた。

そこで次に、アラントインを単一窒素源とする培地に硫酸アンモニウムを添加した条件における Gap1 の細胞内局在を解析した。先行研究により、*RSP5*^{T357A} 株では、アラントインを窒素源とする培地においても、Gap1 が恒常的に液胞に局在することが報告されている (107, 114)。本研究においても、*RSP5*^{T357A} 発現株ではアラントインを単一窒素源とする場合において、Gap1 が液胞に局在していた。*RSP5*^{C2Δ/T357A} 発現株も同様に、アラントインを含む条件にて Gap1 の液胞輸送が誘導されており、*RSP5*^{T357A} 発現株と同様に Gap1 が液胞に局在した (図 40, 41)。したがって、AZC 含有培地での生育評価と一致して、*RSP5*^{T357A} 発現株の C2 ドメインを欠損しても、Gap1 の恒常的な液胞輸送には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

次に、C2 ドメインの欠損が *RSP5*^{T357A} 発現株における液相エンドサイトーシスに及ぼす影響を解析した (図 42, 43)。その結果、*RSP5*^{T357A} 発現株では液胞で蛍光シグナルを示す細胞の割合が約 85 % であり、野生型 *RSP5* 発現株とその割合がほとんど同じであったことから、*RSP5*^{T357A} 変異は液相エンドサイトーシス全体に対しては明確な効果を及ぼさないことが明らかになった。興味深いことに、野生型 *RSP5* 発現株および *RSP5*^{T357A} 発現株のいずれにおいても C2 ドメインの欠損により、液胞での蛍光シグナルを示す細胞の割合が約 65 % となり、部分的な減少を示した。以上の結果から、*RSP5*^{T357A} 発現株における C2 ドメインの欠損により、Gap1 の液胞輸送は影響を受けないにも関わらず、液相エンドサイトーシスが部分的に抑制されることが明らかになった。このことから、C2 ドメインは、Gap1 の認識とは異なる何らかのエンドサイトーシスの過程で働く可能性が強く示された。



図 39 *RSP5^{C2Δ/357A}* 株を用いた AZC 感受性試験

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*)、*rsp5^{C2Δ}* 変異 (pRS416-*rsp5^{C2Δ}*)、*RSP5^{T357A}* 変異 (pRS416-*RSP5^{T357A}*)、*RSP5^{C2Δ/T357A}* 変異 (pRS416-*RSP5^{C2Δ/T357A}*) 発現プラスミドをそれぞれ導入し、pRS415-*CgHIS3-MET15* で栄養要求性を相補した各株を OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで SD - N + Allantoin 培地において 30 °C で培養した。各株の OD を 10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、SD 寒天培地および 0.5 mM AZC 含有 SD 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 25 °C で 72 時間培養した。

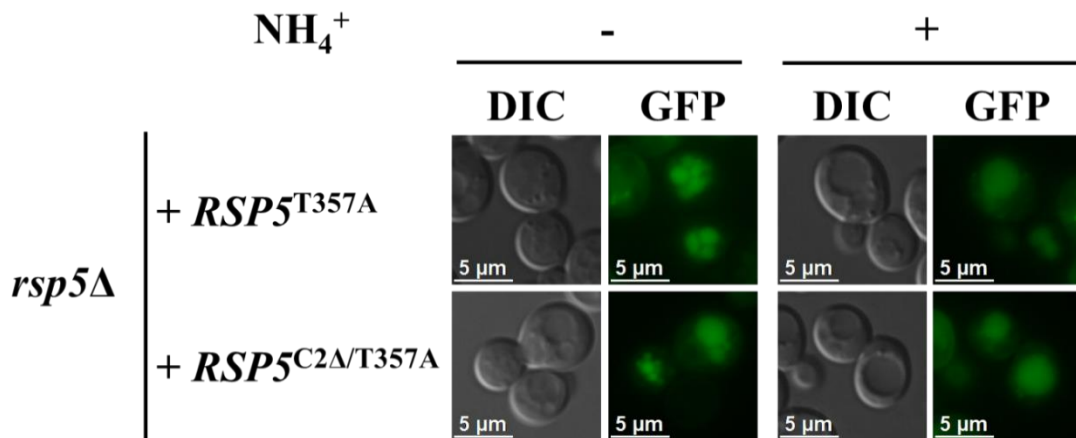


図 40 *RSP5^{C2Δ/357A}* 株における Gap1 の細胞内局在

Δrsp5 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*)、*rsp5^{C2Δ}* 変異 (pRS416-*rsp5^{C2Δ}*)、*RSP5^{T357A}* 変異 (pRS416-*RSP5^{T357A}*)、*RSP5^{C2Δ/T357A}* 変異 (pRS416-*RSP5^{C2Δ/T357A}*) 発現プラスミドをそれぞれ導入した株に、Gap1-EGFP 発現プラスミド (pAG413-P_{GD}-*GAP1-yEGFP-T_{CYC1}*) を導入し、pRS313-*MET15* で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 1 時間の細胞 (+ NH₄⁺) および添加前の細胞 (- NH₄⁺) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

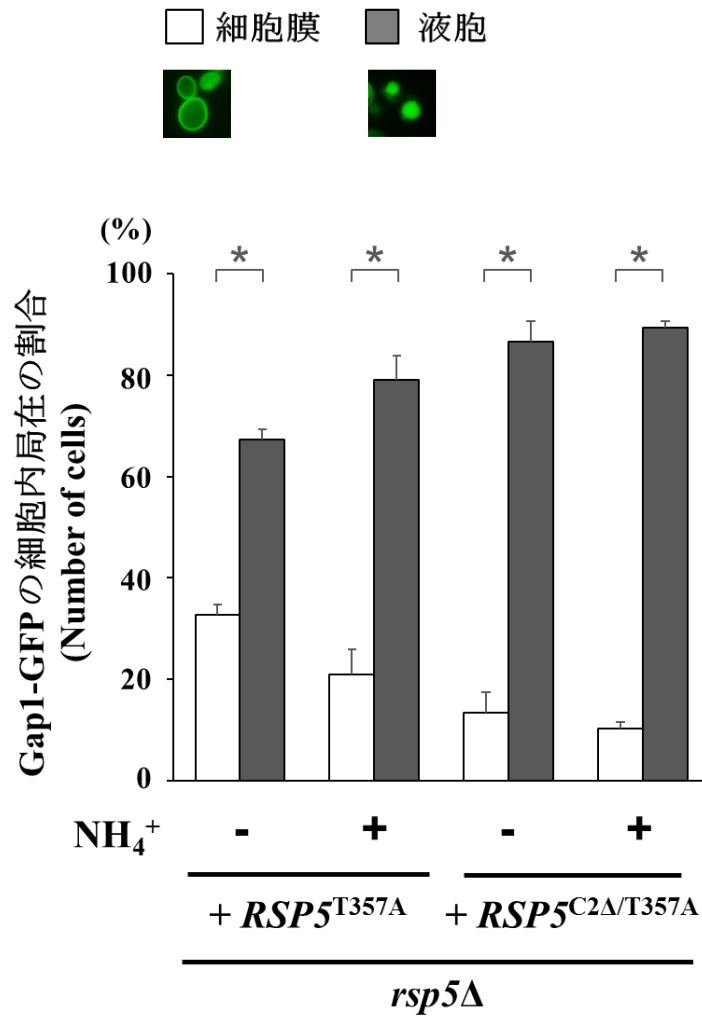


図 41 *RSP5*^{C2Δ/357A} 株における Gap1 の細胞内局在に関する定量的解析

RSP5^{T357A} 変異 (pRS416-*RSP5*^{T357A}) および *RSP5*^{C2Δ/T357A} 変異 (pRS416-*RSP5*^{C2Δ/T357A}) 発現株について、Gap1-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし、細胞内局在を細胞膜、液胞に分類した。各株とも独立に 3 クローンを用いて同様の実験を行い、カウントした細胞の総数を 100 %とした場合に Gap1 の各局在パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 3 回の標準誤差を用いた。**p* < 0.05 (Student's *t*-test)。

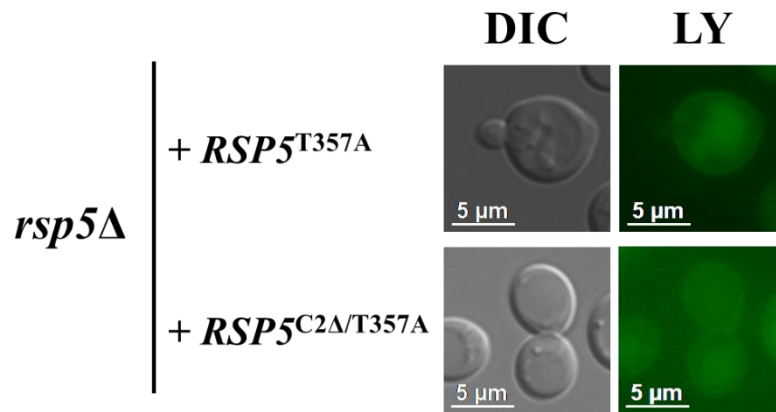


図 42 $RSP5^{C2\Delta/357A}$ 株における液相エンドサイトーシス

$rsp5\Delta$ 株に野生型 $RSP5$ (pRS416- $RSP5$)、 $rsp5^{C2\Delta}$ 変異 (pRS416- $rsp5^{C2\Delta}$)、 $RSP5^{T357A}$ 変異 (pRS416- $RSP5^{T357A}$)、 $RSP5^{C2\Delta/T357A}$ 変異 (pRS416- $RSP5^{C2\Delta/T357A}$) 発現プラスミドをそれぞれ導入した株を YPD 培地で $OD_{600} \approx 0.1 \sim 0.2$ になるまで培養し、終濃度 4 mg/ml の Lucifer Yellow を添加し、25 分後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した (LY)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

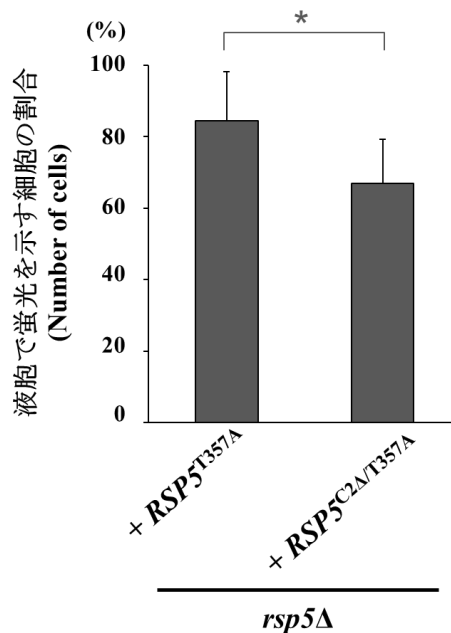


図 43 $RSP5^{C2\Delta/357A}$ 株における液相エンドサイトーシスに関する定量的解析

$RSP5^{T357A}$ 変異 (pRS416- $RSP5^{T357A}$) および $RSP5^{C2\Delta/T357A}$ 変異 (pRS416- $RSP5^{C2\Delta/T357A}$) 発現株において、Lucifer Yellow で染色した約 200 細胞の中で蛍光シグナルを液胞で示す細胞をカウントした。カウントした細胞の総数を 100% とした場合に Lucifer Yellow の各蛍光パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 20 回の標準誤差を用いた。* $p < 0.05$ versus + $RSP5^{T357A}$ (two-way ANOVA with Turkey's test)。

2-3-4. エンドサイトーシス関連タンパク質の Rvs167 を介した Gap1 および液相エンドサイトーシス

上記 2-3-3 の結果から、C2 ドメインは、Gap1 の認識とは異なる何らかのエンドサイトーシスの過程で働く可能性が示された。先行研究において、Rsp5 がエンドサイトーシス関連タンパク質である Chc1, Ent2 および Rvs167 と相互作用することが報告されている (115, 141, 142)。C2 ドメインが Gap1 の基質認識に関わらないのであれば、これらのタンパク質を介してエンドサイトーシスの調節に関与することが推測された。そこで、*CHC1*, *ENT2* および *RVS167* 遺伝子の各単独破壊株を用いて、AZC 含有培地における生育への影響、Gap1-EGFP の細胞内局在への影響、液相エンドサイトーシスへの影響をそれぞれ解析し、Rsp5 が C2 ドメイン依存的に調節するエンドサイトーシス関連タンパク質の候補遺伝子の取得を試みた。まず、AZC 含有培地における生育を評価したところ (図 44)、これらの一遺伝子欠損株は AZC が存在しない場合ではほとんど生育の差を示さなかった。また、AZC を含む条件においては、*CHC1* 遺伝子および *ENT2* 遺伝子の単独破壊株 (*chc1Δ*, *ent2Δ*) は野生型 *RSP5* 発現株に比べてわずかに生育が阻害された。一方、*RVS167* 遺伝子の単独破壊株 (*rvs167Δ*) は、野生型 *RSP5* 発現株に比べて生育が著しく阻害され、*rsp5^{C2Δ}* 発現株と同様の表現型を示した。この結果から、*RVS167* 遺伝子の欠損により Gap1 のエンドサイトーシスが抑制されたため、AZC が細胞内により多く流入し、増殖が阻害されたのではないかと考えられた。

図 44 の結果から、*RVS167* 遺伝子の欠損が Gap1 のエンドサイトーシスに必要であることが示唆された。そこで、アラントインを単一窒素源とする培地に硫酸アンモニウムを添加した時の Gap1 の細胞内局在を解析したところ (図 45, 46)、*chc1Δ* 株および *ent2Δ* 株ではアンモニウムイオン添加後に Gap1 が液胞に局在しており、その程度は野生型 *RSP5* 発現株とほぼ同等であった。この結果から、これらの変異株においては、アンモニウムイオンの添加により Gap1 のエンドサイトーシスが誘導されることが示された。一方、*rvs167Δ* 株ではアンモニウムイオン添加後でさえも Gap1 は細胞膜上に局在しており、*rsp5^{C2Δ}* 発現株の表現型と酷似していたことから、Gap1 のエンドサイトーシスが抑制されたことが明らかになった。したがって、AZC 含有培地での生育評価と一致して、Rvs167 は Gap1 のエンドサイトーシスを調節することが示された。

次に、各遺伝子の単独破壊株における Luciffer Yellow の細胞内への取込みを解析したところ (図 47, 48)、*ent2Δ* 株では液胞で蛍光シグナルを示す細胞の割合が約 90 % であり、野生型 *RSP5* 発現株と比較してその割合が同程度であった。この結果から、Ent2 は液相エンドサイトーシス全体に対しては明確な効果を及ぼさないことが明らかになった。一方、*CHC1* 遺伝子の単独破壊 (*chc1Δ*) により、液胞での蛍光シグナルを示す細胞の割合は約 65 % となり、部分的な減少を示した。さらに、*rvs167Δ* 株ではその割合は約 15 % となり、液相エンドサイトーシスが顕著に阻害された。以上の結果から、*RVS167* 遺伝子の一遺伝子欠損により、C2 ドメインの欠損変異と同様に、Gap1 のエンドサイトーシスおよび液相エンドサイトーシスの両方に欠損が生じることが明らかになった。このことから、Rvs167 は C2 ドメインと同様のエンドサイトーシス

の過程で働く可能性が示された。

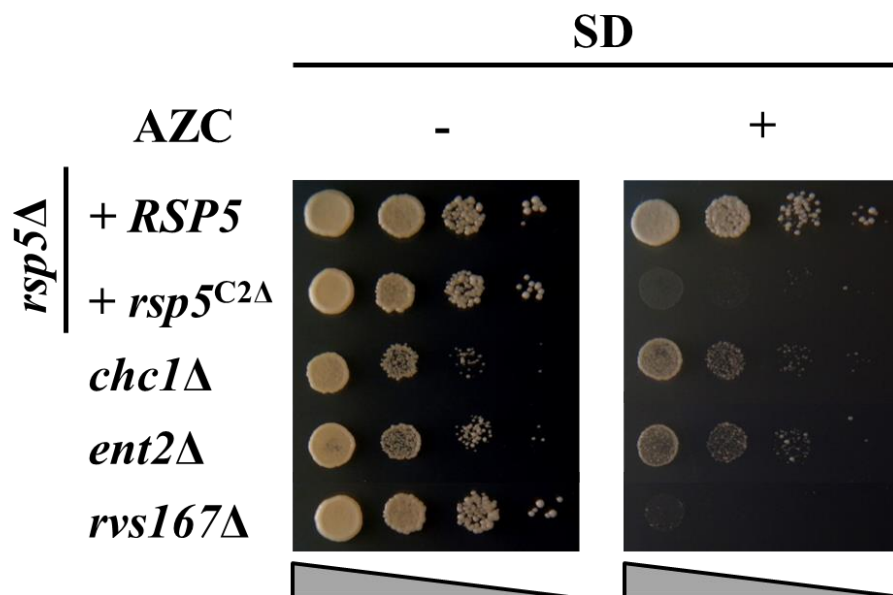


図 44 *CHC1*、*ENT2*、*RVS167* 遺伝子の各単独欠損株を用いた AZC 感受性試験
*rsp5*Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5*^{C2Δ} 変異 (pRS416-*rsp5*^{C2Δ}) 発現プラスミドを導入し、pRS415-*CgHIS3-MET15* で栄養要求性を相補した各株、*chc1*Δ 株、*ent2*Δ 株、*rvs167*Δ 株の栄養要求性を pRS416, pRS415-*CgHIS3-MET15* で相補した各株を OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで SD - N + Allantoin 培地において 30 °C で培養した。各株の OD を 10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、SD 寒天培地および 0.5 mM AZC 含有 SD 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 25 °C で 72 時間培養した。

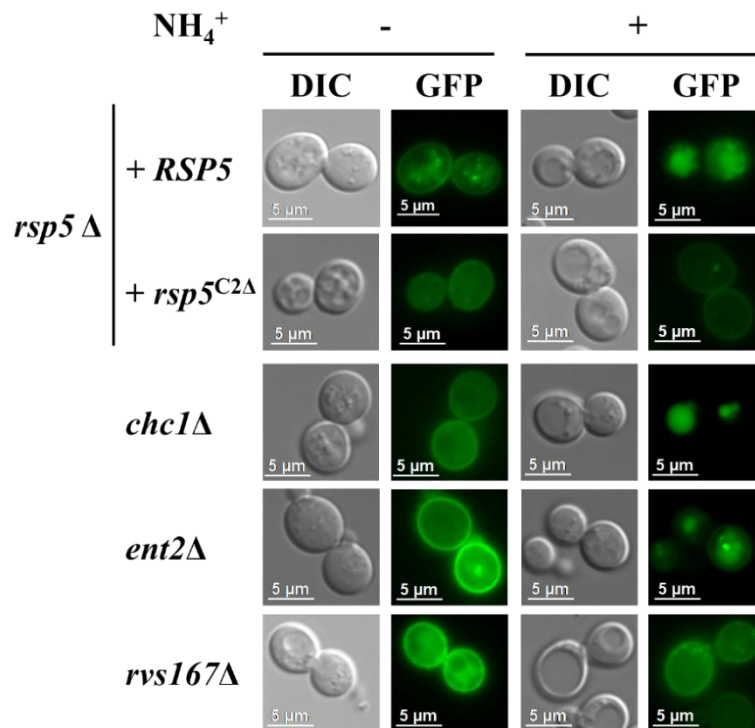


図 45 *CHC1*、*ENT2*、*RVS167* 遺伝子の各単独欠損株における Gap1 の細胞内局在
rsp5 Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) 発現プラスミドを導入した株、*chc1* Δ 、*ent2* Δ 、*rvs167* Δ に pRS416 をそれぞれ導入した各株に、Gap1-EGFP 発現プラスミド (pAG413-*P_{GDP}-GAP1-yEGFP-T_{CYC1}*) を導入し、pRS313-*MET15* で栄養要求性を相補した。SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ \approx 1.0 になるまで培養し、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウム添加後 1 時間の細胞 (+ NH_4^+) および添加前の細胞 (- NH_4^+) をそれぞれ蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

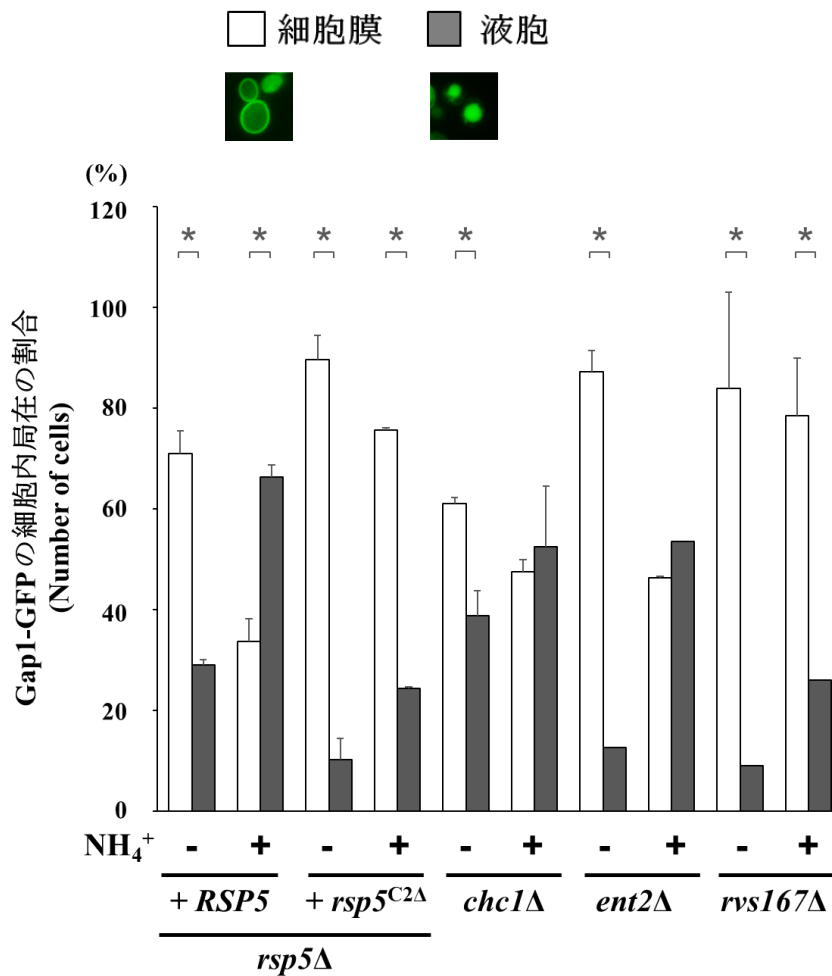


図 46 *CHC1*、*ENT2*、*RVS167* 遺伝子の各単独欠損株における Gap1 の細胞内局在に関する定量的解析

野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) 発現株、*chc1Δ* 株、*ent2Δ* 株、*rvs167Δ* 株のそれぞれについて、Gap1-EGFP を発現する 100 個の細胞をカウントし、細胞内局在を細胞膜、液胞に分類した。各株とも独立に 3 クローンを用いて同様の実験を行い、カウントした細胞の総数を 100%とした場合に Gap1 の各局在パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 3 回の標準誤差を用いた。 $*p < 0.05$ (Student's *t*-test)。

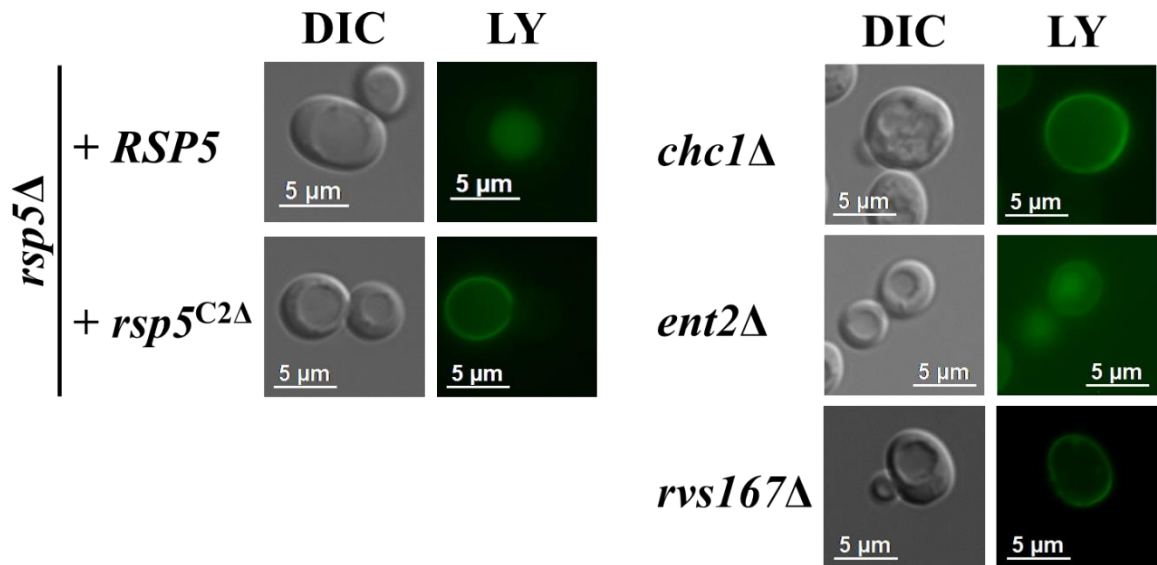


図 47 *CHC1*、*ENT2*、および *RVS167* 遺伝子の単独欠損株における液相エンドサイトーシス
rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) 発現プラスミドを導入した株、および *chc1Δ*、*ent2Δ*、*rvs167Δ*
 各株を YPD 培地で $OD_{600} \approx 0.1 \sim 0.2$ になるまで培養し、終濃度 4 mg/ml の Lucifer Yellow を添加し、
 25 分後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した (LY)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

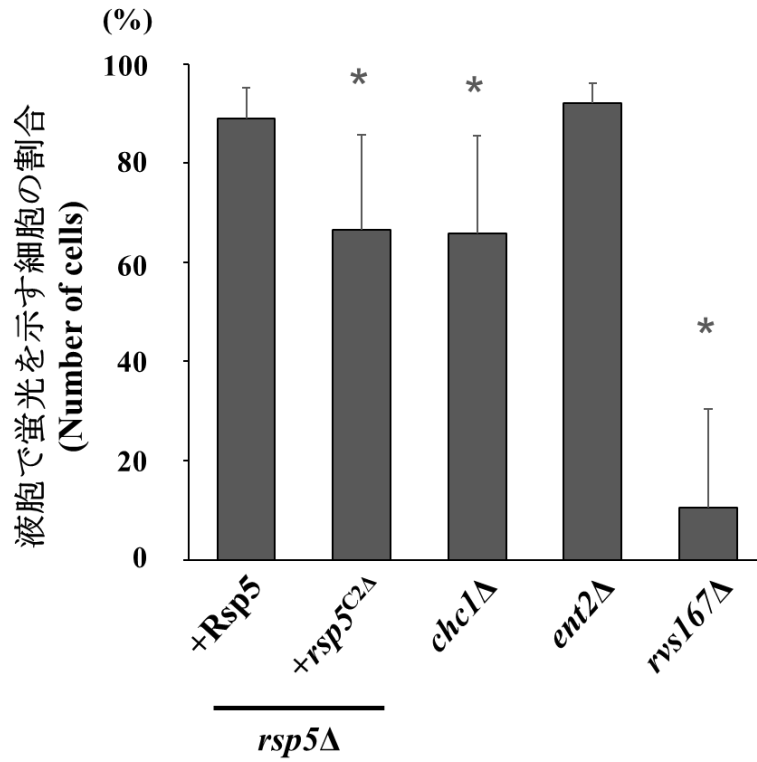


図 48 *CHC1*、*ENT2*、*RVS167* 遺伝子の各単独欠損株における液相エンドサイトーシスに関する定量的解析

野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) 発現株、*chc1Δ*、*ent2Δ*、*rvs167Δ* 各株それぞれにおいて、Lucifer Yellow で染色した約 200 細胞の中で蛍光シグナルを液胞で示す細胞をカウントした。カウントした細胞の総数を 100%とした場合に Lucifer Yellow の各蛍光パターンを示す細胞が占める割合の平均値を示した。エラーバーとして 25 回の標準誤差を用いた。* $p < 0.05$ versus + WT (two-way ANOVA with Turkey's test)。

2-3-5. Rsp5 における C2 ドメインの機能を介した Rvs167 のユビキチン化

上記 2-3-4 の結果から、Rvs167 は Rsp5 の C2 ドメインと同様のエンドサイトーシスの過程で働く可能性が示された。もし、Rsp5 が C2 ドメインを介して Rvs167 を制御することにより、エンドサイトーシスを調節するのであれば、C2 ドメインの欠損により Rvs167 との相互作用が抑制されることが推測された。そこで、Rsp5 における C2 ドメインの欠損が Rvs167 との相互作用に及ぼす影響を解析したところ (図 49)、野生型 *RSP5* 発現株ではアンモニウムイオンの添加に関わらず Rsp5 が検出された。この結果から、窒素源の変化に関わらず、Rsp5 は Rv167 と相互作用することが示された。一方、興味深いことに、*rsp5*^{C2Δ} 発現株では Rsp5 が検出されなかったことから、Rsp5 における C2 ドメインは Rvs167 との相互作用に必要であることが明らかになった。

これまでに、*in vitro* 条件で Rsp5 が Rvs167 をユビキチン化することが報告されている (115)。まず、Rvs167 のユビキチン化が *in vivo* 条件においても生じるのか調べるため、温度感受性変異 (*rsp5*^{L773S}) 株を用いて、Rvs167 のユビキチン化レベルを検出した (図 50)。その結果、非制限温度条件下 (30 °C) では、アンモニウムイオンの添加により Rvs167 におけるユビキチンシグナルの増大が検出された。一方、制限温度条件下 (38 °C) においては、アンモニウムイオンを添加しても、そのユビキチンシグナルの増大は検出されなかった。この結果から、アンモニウムイオンの添加により生じる Rvs167 のユビキチン化は、Rsp5 の活性に依存していることが確認できた。

図 50 の結果から、アンモニウムイオンに応答して、Rsp5 が Rvs167 をユビキチン化することが明らかになった。次に、C2 ドメインの欠損および C2 ドメインにおけるフォスファチジルイノシトール結合能の欠損が、Rvs167 のユビキチン化に及ぼす影響について解析した (図 51)。その結果、野生型 *RSP5* 発現株においては、アンモニウムイオンの添加により Rvs167 のユビキチンシグナルの増大が検出された。一方、*rsp5*^{C2Δ} 発現株および *rsp5*^{K44/45/75/77/78Q} 発現株では、アンモニウムイオンが添加されたのにも関わらず、Rvs167 のユビキチン化の増大は検出されなかった。これらの結果から、アンモニウムイオンの添加に応答した Rvs167 のユビキチン化に、Rsp5 の C2 ドメインによるフォスファチジルイノシトール結合能が必要であることが明らかになった。

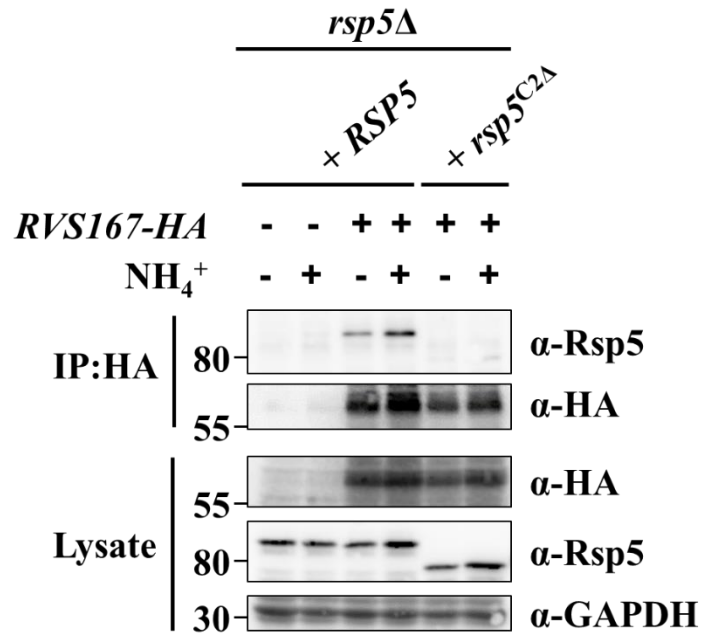


図 49 C2 ドメイン欠損体と Rvs167 との相互作用

*rsp5*Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) および *rsp5*^{C2Δ} 変異 (pRS416-*rsp5*^{C2Δ}) 発現プラスミドを導入した株に、空ベクター (pAG413-P_{GDP}-*ccdB-HA-T_{CYC1}*) または *Rvs167-HA* 発現プラスミド (pAG413-P_{GDP}-*RVS167-HA-T_{CYC1}*) を導入し、pRS415-*MET15* で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加後 30 分間培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体を用いた沈降物中の *Rsp5* を検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗 *Rsp5* 抗体、抗 HA 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

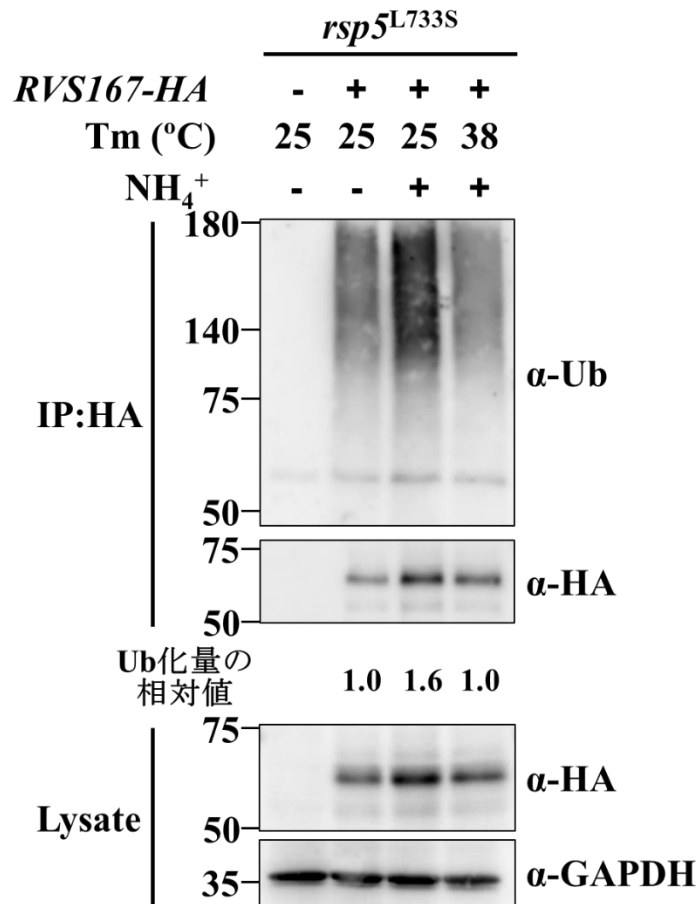


図 50 Rsp5 の活性に依存した Rvs167 のユビキチン化

rsp5^{L733S} 株に空ベクター (pAG413-P_{GDP}-*ccdB-HA-T_{CYC1}*) または Rvs167-HA 発現プラスミド (pAG413-P_{GDP}-*RVS167-HA-T_{CYC1}*) を導入し、pRS416 および pRS415-*MET15* で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。さらに 30 °C または 38 °C で 1 時間培養した後、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加後 30 分培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 HA 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。30 °C で培養した条件での硫酸アンモニウム添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。

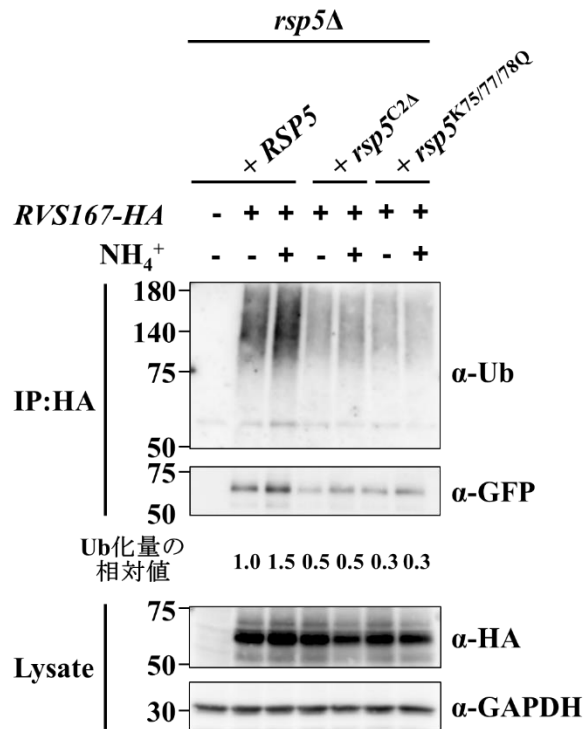


図 51 *C2* ドメイン欠損およびフォスファチジルイノシトール結合能欠損株における Rvs167 のユビキチン化

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*)、*rsp5*^{C2Δ} 変異 (pRS416-*rsp5*^{C2Δ})、*rsp5*^{K75/77/78Q} 変異 (pRS415-*rsp5*^{K75/77/78Q}) 発現プラスミドをそれぞれ導入した株に、空ベクター (pAG413-*P_{GDP}-ccdB-HA-T_{CYC1}*) または Rvs167-HA 発現プラスミド (pAG413-*P_{GDP}-RVS167-HA-T_{CYC1}*) を導入し、pRS415-*MET15* または pRS416-*MET15* で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加後 30 分培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体を用いた沈降物中のユビキチンを検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗ユビキチン抗体 (Ub)、抗 HA 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られたユビキチンのシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。野生型 *RSP5* 発現株の硫酸アンモニウム添加前における IP 後のユビキチンシグナルを 1.0 とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。

2-3-6. ユビキチン化修飾による Rvs167 の安定化

図 50, 51 の結果から、アンモニウムイオンの添加に応答して Rvs167 はユビキチン化されることが示された。タンパク質のユビキチン化の多くは、基質の分解シグナルとしての役割を有している。しかしながら、図 45, 46 の結果が示すように、*RVS167* 遺伝子の欠損は Gap1 のエンドサイトーシスを顕著に抑制するため、Rvs167 のユビキチン化は分解のシグナルではない可能性が考えられる。そこで、タンパク質の翻訳合成を停止するシクロヘキシミドを用いて、Rvs167 のタンパク質レベルについて経時的に解析した (図 52, 53)。その結果、アンモニウムイオンを添加しない条件では、Rvs167 のタンパク質量が 1 時間後に約 50 %にまで低下した。一方、このタンパク質量の減少は、アンモニウムイオンの添加により抑制された。この結果から、Rvs167 のユビキチン化は、タンパク質の安定性に寄与することが明らかになった。

図 52, 53 の結果から、Rvs167 のユビキチン化がエンドサイトーシスに重要であることが示されたものの、Rvs167 分子内のユビキチン化修飾部位は不明である。そこで、LC-MS/MS を用いて、トリプシン消化により得られた Rvs167 のペプチド断片からユビキチン化部修飾位の同定を試みた。まず、LC-MS/MS 解析の結果、Rvs167 由来のペプチドがいくつか検出された (Protein sequence coverage : 38 %)。ユビキチン化修飾されたアミノ酸残基はユビキチン由来の di-Gly を有することが知られており、本研究においても di-Gly を含むペプチドが検出された (図 54)。また、これらの di-Gly は Rvs167 の Lys118/K242/K259/K260 にそれぞれ結合していることが明らかになった。Rvs167 は、細胞膜との相互作用に必要な Bin-Amphiphysin-Rvs161/167 (BAR) ドメインおよびタンパク質との相互作用に関わる Src-homology 3 (SH3) ドメインを有している。ユビキチン化された Lys 残基は、BAR ドメイン内および BAR ドメインと SH3 ドメインの中間領域にそれぞれ位置することが判明した。この結果から、アンモニウムイオンに応答して、Rvs167 に内のこれら Lys 残基がユビキチン化修飾されることが示された。

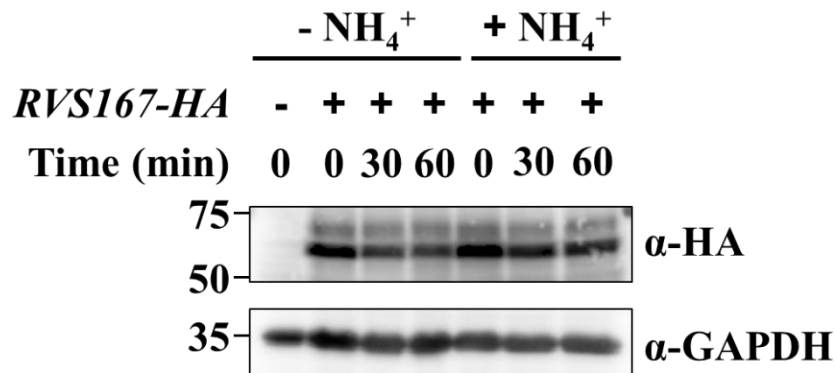


図 52 Rvs167 のユビキチン化によるタンパク質の安定性試験

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) 発現プラスミドを導入した株に、空ベクター (pAG413-P_{GDP}-*ccdB-HA-T_{CYC1}*) または Rvs167-HA 発現プラスミド (pAG413-P_{GDP}-*RVS167-HA-T_{CYC1}*) を導入し、pRS415-*MET15* で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。終濃度 200 μg/mL のシクロヘキシミドを添加し、さらに 30 分培養後、終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加した。硫酸アンモニウム添加直後 (0 min)、30 min、60 min 後の細胞からそれぞれ全細胞抽出液を調製した。全細胞抽出液を用いて、抗 HA 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

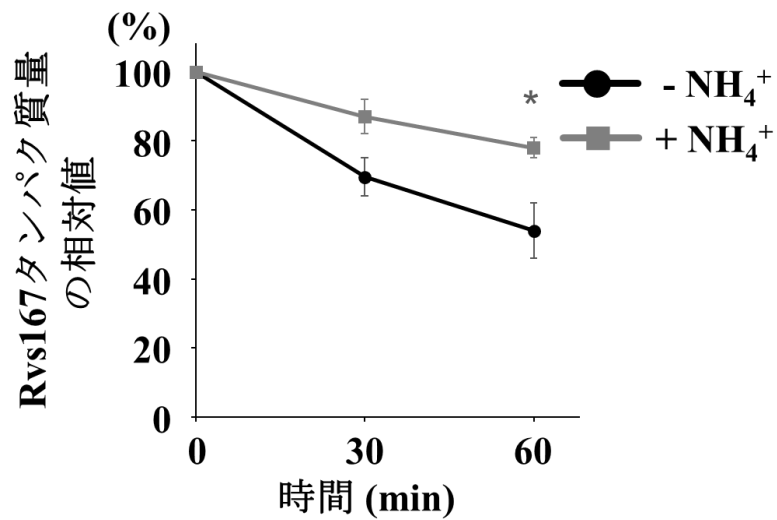
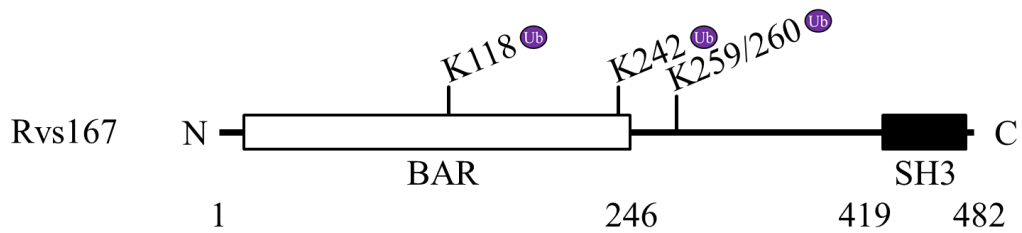


図 53 Rvs167 のユビキチン化によるタンパク質の安定性試験

ウェスタンブロットにより得られた Rvs167-HA および GAPDH のシグナル強度を、それぞれの存在量からイメージ解析ソフト (Image J) により算出し、Rvs167-HA のシグナル強度を GAPDH のシグナル強度により補正した。各株において、硫酸アンモニウム添加 0 時間後の Rvs167-HA のシグナル強度を 100 %とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。各株とも独立に 3 クローンを用いて同様の実験を行い、それぞれの平均値を示した。エラーバーとして 3 回の標準誤差を用いた。

* $p < 0.05$ versus + Am (two-way ANOVA with Turkey's test)。



ユビキチン修飾部位	ペプチド配列
K118	AIVAELQETIKPDLALVEEK
K242	LQDMKIPYFDLNSDIVESYIAK
K259/260	IPYFDLNSDIVESYIAKK

図 54 Rvs167 のユビキチン化修飾部位の検出

rsp5Δ 株に野生型 *RSP5* (pRS416-*RSP5*) 発現プラスミドを導入した株に、空ベクター (pAG413-*P_{GDP}-ccdB-HA-T_{CYC1}*) または Rvs167-HA 発現プラスミド (pAG413-*P_{GDP}-RVS167-HA-T_{CYC1}*) を導入し、pRS415-*MET15* で栄養要求性を相補した各株を SD - N + Allantoin 培地で OD₆₀₀ ≒ 1.0 になるまで培養した。終濃度 50 mM の硫酸アンモニウムを添加後 30 分間培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体を用いた沈降物中のユビキチン化ペプチドを検出した。上の図は、Rvs167 のモデル図を示した。Bin-Amphiphysin-Rvs161/167 (BAR) ドメイン、Src-homology 3 (SH3) ドメイン。下の図は、帰属されたペプチド配列を示した。各ペプチドにおけるユビキチン化修飾 (Ub) を受けた Lys を赤字で示す。

2-4. 考察

Rsp5 の C2 ドメインを介した Gap1 のエンドサイトーシス調節機構

本章では、Gap1 を細胞膜タンパク質のモデルに用いて、Rsp5 における C2 ドメインの機能について解析を行った。その結果、C2 ドメインはフォスファチジルイノシトール結合能を介して、エンドサイトーシスに関与することが示された。また、C2 ドメインはアダプタータンパク質との相互作用を介した Gap1 のユビキチン化に関与しないことが明らかになった。一方で、C2 ドメインの機能がエンドサイトーシスの進行に必須な Rvs167 のユビキチン化に必要であることを見出した。そして、窒素源の変化に応答し、Rsp5 が Rvs167 の Lys118/242/259/260 をそれぞれユビキチン化すること、さらにこのユビキチン化が Rvs167 の安定性に寄与することが明らかになった。

以上の結果を踏まえると、Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節モデルが考えられた (図 55)。当モデルでは、まず、窒素源が枯渇した条件および資化し難い窒素源が単一窒素源の場合、Rsp5 は細胞質あるいは C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能を介して細胞膜にそれぞれ局在する。細胞膜に局在する Rsp5 は、Rvs167 と相互作用するものの、Rsp5 の活性が部分的に抑制されているため、Rvs167 のユビキチン化は強く誘導されないことが考えられる。上記の条件にアンモニウムイオンなどの資化し易い窒素源が加わると、アンモニウムトランスポーターの Mep1/2/3 により、環境中のアンモニウムイオンが細胞内に取り込まれ、Rsp5 および Bul1/2 の活性化を介した Gap1 のユビキチン化を引き起こす。この Gap1 のユビキチン化と並行して、C2 ドメイン依存的に細胞膜に局在する Rsp5 は Rvs167 をユビキチン化する。Rvs167 がエンドサイトーシスに必要であることや、Rvs167 のユビキチン化がタンパク質の安定性を向上させる結果を踏まえると、このユビキチン化はエンドサイトーシスの進行を調節する役割を持つことが考えられる。上記の機構のように、Rsp5 が細胞膜タンパク質およびエンドサイトーシス装置タンパク質をそれぞれユビキチン化することで、エンドサイトーシスを効率的に進めていることが示唆される。

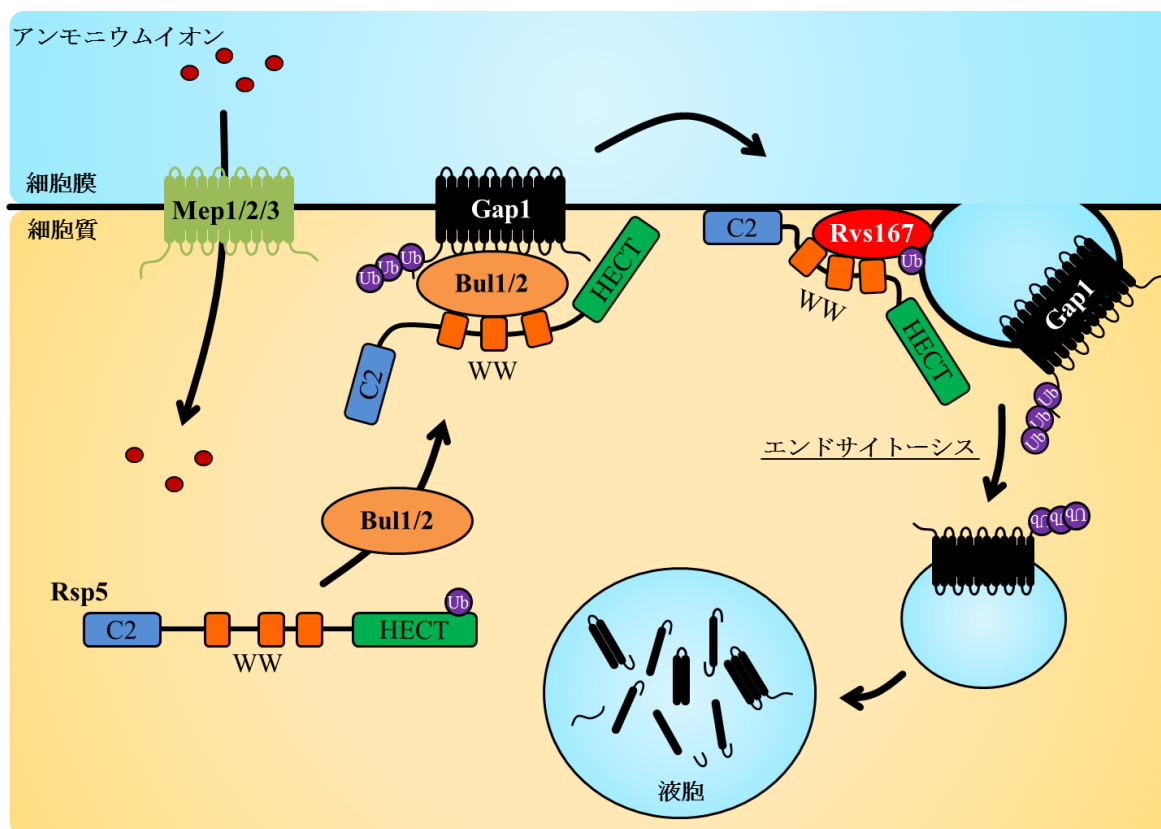


図 55 Rsp5 における C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構モデル

Mep1/2/3 により細胞内に取り込まれたアンモニウムイオンに反応して、Rsp5 が活性化する。一部の Rsp5 は、Bul1/2 との相互作用を介して Gap1 の認識とユビキチン化を行う。Gap1 のユビキチン化と並行して、C2 ドメイン依存的に細胞膜に局在する Rsp5 は Rvs167 をユビキチン化する。このユビキチン化により Gap1 のエンドサイトーシスが効率良く進められ、Gap1 が液胞へと輸送される。

C2 ドメインおよびアダプタータンパク質に依存した Rsp5 の細胞内局在

上記のモデルを踏まえると、Rsp5 の生体膜区画への局在移行は、C2 ドメインによるフォスファチジルイノシトール結合能およびアダプタータンパク質による基質認識を介したリクルートの 2 つのメカニズムによって制御されていると推測される。これまでに、C2 ドメインの欠損によって、Rsp5 の細胞内局在が細胞膜や小胞などの膜区画から細胞質に移行することが報告されている (142, 224)。また、C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能が Gap1 のエンドサイトーシスに必要であったことから (図 35, 36)、C2 ドメインは細胞膜との相互作用に関与することが考えられる。一方、アダプタータンパク質による細胞内局在移行に関しては、C2 ドメイン欠損株において、エンドソーム膜上に局在する Ear1 を過剰発現すると、Rsp5 の局在がエンドソームに移行することが報告されている (189)。また、Bul2 との相互作用が強

化される *RSP5*^{T357A} 変異体の C2 ドメインを欠損しても、Gap1 の恒常的な液胞輸送に影響を及ぼさなかったことから (図 40, 41)、アダプタータンパク質と C2 ドメインはそれぞれ独立したメカニズムで、Rsp5 の細胞内局在に関与すると考えられる。これら Rsp5 の細胞内局在の意義として、まず、これまでの研究により、アダプタータンパク質による Rsp5 の膜区画への局在移行は、生体膜上に局在する基質タンパク質のユビキチン化に関わることが示されている。そして、本研究により、C2 ドメインを介した Rsp5 の細胞内局在制御は、Rvs167 のユビキチン化に必要であることが見出され、Rsp5 によるエンドサイトーシス調節機構の一端が明らかになった。

近年、*in vitro* 条件において、Rsp5 の C2 ドメインを欠損しても Rvs167 をユビキチン化することが報告された (115)。Rvs167 は Rsp5 により認識される PY モチーフを有しているため、Rsp5 が Rvs167 と直接的に相互作用し、ユビキチン化を引き起こすことが考えられる。しかしながら、図 51 の結果が示すように、*in vivo* 条件においては、Rsp5 の C2 ドメインを欠損すると Rvs167 のユビキチン化は抑制された。したがって、Rsp5 は WW ドメインを介して Rvs167 と相互作用するものの、C2 ドメインによる細胞膜への局在移行が Rvs167 との相互作用に必要であることが予想される。

Rsp5 の活性制御

今回の解析により、資化し難い窒素源が単一窒素源の場合においても、Rsp5 は Rvs167 と相互作用するものの、そのユビキチン化能は抑制されていることが示された (図 50, 51)。Rsp5 の活性制御に関しては、このタンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を担う。まず、Rsp5 における Thr761 のリン酸化は、tRNA のプロセシングの抑制、あるいは Sna3 におけるユビキチン化レベルの低下など、Rsp5 が関わる様々な生命現象を抑制することが報告されている (113)。また、Thr357 のリン酸化には、Bul2 との相互作用を阻害するため、基質タンパク質に対するユビキチン化を抑制する働きがある (107)。さらに、Rsp5 における Lys432 がユビキチン化されることも報告されており、この翻訳後修飾が Rsp5 のホモ多量体化を誘導し、Rsp5 を不活性化する (115)。Rvs167 のユビキチン化においても、これら翻訳後修飾による Rsp5 の活性制御が関与することが予想される。今後、難資化性窒素源および易資化性窒素源それぞれの条件における Rsp5 のリン酸化やユビキチン化修飾状態について解析する必要がある。また、翻訳後修飾を受けるアミノ酸残基の置換が、Rvs167 のユビキチン化に及ぼす影響を調べることにより、これらのアミノ酸残基の意義が明らかになるであろう。

Rvs167 をユビキチン化修飾する意義

本研究により、易資化性窒素源の添加に応答して Rvs167 のユビキチン化レベルが増大し、タンパク質が安定化することが示された (図 52, 53)。しかしながら、このユビキチン化がどのように Rvs167 の安定性に寄与するのかについては、未だに不明である。一つの可能性として、このユビキチン化がタンパク質間の相互作用を促進することが考えられる。エンドサイトーシスに関与するタンパク質の多くは、ユビキチン

結合ドメイン (UBD) を有しており、タンパク質に付加されたユビキチン鎖を認識することでタンパク質のネットワークを構築する (141, 225, 226)。また、脱ユビキチン化酵素である Ubp2 および Ubp7 の欠損により、初期コートタンパク質の Edel1 がエンドサイトーシス完了後でさえも、エンドソーム膜上に局在することが報告されている (30)。この結果から、エンドサイトーシス関連タンパク質のユビキチン化は、そのタンパク質の局在や機能に影響を及ぼすことが推測される。また、ヒトの免疫応答時に、RING 型ユビキチンリガーゼの LUBAC により形成されるポリユビキチン鎖は、UBD を持つタンパク質の足場として機能することで、タンパク質複合体の形成を促進し、NF κ B シグナルを効率良くその下流に伝達する (77-79)。したがって、Rvs167 のユビキチン化も、タンパク質間相互作用の強化を介してエンドサイトーシスを促進する役割を担うと考えられる。今後、新たに同定した Rvs167 分子内の 4 つの Lys 残基 (K118/K242/K259/K260) を Arg に置換したユビキチン化修飾部位欠損変異体を作製し、Gap1 のエンドサイトーシスや液相エンドサイトーシスへの影響を解析することで、Rvs167 のユビキチン化修飾の意義を解明できることが期待される。

第3章 Rsp5による神経変性疾患の発症に関わる凝集タンパク質の分解機構

3-1. 序論

第1章および第2章を通じて、Rsp5がエンドサイトーシスを介して細胞膜の恒常性維持に関与することが示された。一方で、Rsp5は細胞内で凝集するタンパク質の分解にも寄与している(105, 227, 228)。細胞内でのタンパク質の凝集は、ヒトの神経変性疾患の病理学的特徴であることから、凝集体を形成することが知られているヒト α -シヌクレインや、ポリグルタミン(PolyQ)を付加したヒトHttなどの神経変性疾患の発症に関わる基質タンパク質を用いて、現在までに様々な酵母のモデル実験系が構築されてきた。しかしながら、これまでのモデル実験系の多くは、*GALI*プロモーターを用いた過剰発現システムを利用しており、炭素源をグルコースからガラクトースに置換するため、細胞内の代謝を大きく変え、対象となるタンパク質の細胞毒性に影響を及ぼすことが懸念されている。近年、エストラジオール誘導型の遺伝子発現システムを用いて、凝集タンパク質の毒性緩和機構について解析が行われた(229)。この例のように、今後の神経変性疾患モデル実験系では、酵母の代謝に影響を及ぼさない遺伝子発現システムを用いた実験系の構築が求められている。

これまでに構築されたモデル実験系により、Rsp5が α -シヌクレインの毒性緩和に関与することが報告された。Rsp5は基質のC末端側に位置するProが富んだ配列を認識し、 α -シヌクレインをK63ポリユビキチン化する(105)。また、*N*-アシルベンゾイミダゾールの添加により、Rsp5を介したエンドサイトーシス経路が活性化され、 α -シヌクレインの細胞毒性が緩和される(227)。 α -シヌクレインに加え、PolyQが付加したHttの凝集に起因する細胞毒性の緩和に対しても、Rsp5が関与している(228)。上記の条件において、Rsp5はPolyQが付加したHttをユビキチン化し、Atg8のアダプタータンパク質であるCue5を介したオートファジー経路により分解する。したがって、Rsp5/Nedd4の役割が凝集タンパク質の毒性緩和に重要であると考えられるが、筋委縮性側索硬化症(ALS)の発症に関わるヒトTDP-43などの他の様々なタンパク質に対しても幅広く関与するのかが不明である。さらに、当研究室ではRsp5におけるWWドメイン上の一アミノ酸置換が、 α -シヌクレインとの相互作用に影響を及ぼすことも見出しており(109)、Rsp5による基質認識機構が凝集タンパク質の分解に何らかの役割を担うことが推測されている。しかしながら、Rsp5がどのように凝集タンパク質の分解に寄与するのか、その詳細なメカニズムは不明である。以上の知見に基づき、本章では、TDP-43を新たなモデル基質として使用し、Rsp5による凝集タンパク質に共通した分解機構の解明を目的として、研究を行った。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 菌株とプライマー、プラスミド

3-2-1-1. 菌株

Saccharomyces cerevisiae

使用した菌株を表 7 に示す。Yeast Knock Out Strain Collection は Horizon Discovery 社より購入した。

表 7 本研究で使用した菌株のリスト

名称	遺伝子型	由来
BY4741	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>rsp5</i> ^{A401E}	BY4741 <i>rsp5</i> ^{A401E}	Sasaki and Takagi, 2013
<i>RSP5</i> ^{P343S}	BY4741 <i>RSP5</i> ^{P343S}	Sasaki and Takagi, 2013
<i>rpn4 Δ</i>	BY4171 <i>rpn4 Δ::kanMX4</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 2018
<i>end3 Δ</i>	BY4171 <i>end3 Δ::natNT2</i>	Sasaki and Takagi, 2013
<i>atg7 Δ</i>	BY4171 <i>atg7 Δ::kanMX4</i>	Tatehashi <i>et al.</i> , 2016
<i>vam3 Δ</i>	BY4741 <i>vam3 Δ::kanMX4</i>	Yeast Knockout Strain Collection
<i>vps1 Δ</i>	BY4171 <i>vps1 Δ::kanMX4</i>	Sasaki and Takagi, 2013
<i>pep4 Δ</i>	BY4171 <i>pep4 Δ::hphNT1</i>	Sasaki and Takagi, 2013
<i>RSP5</i> ^{P343S} <i>end3 Δ</i>	BY4741 <i>RSP5</i> ^{P343S} <i>end3 Δ::natNT2</i>	本研究

Escherichia coli

第 1 章と同様に、遺伝子のサブクローニングおよび *ccdB* を含むプラスミドのサブクローニングに、DH5α 株および DB3.1 株をそれぞれ使用した。

3-2-1-2. プライマー

プラスミド構築のために、下記表 8 のプライマーをファスマック社に依頼し、合成した。

表 8 本研究で使用したプライマーのリスト

名称	配列
END3_S1_+50_Fw	AGTTAGTGGGTATTGGAAAGGCCGGTAAAGATAACAGGG ATCTCTGAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
END3_S2_-50_Rv	AACAAACAGTAAATATTACACATTCATGTACATAAAAATTA ATTATCGGTGTCAATCGATGAATTCGAGCTCG
END3_check_+575_Fw	TCATTTCCCTTGAGCGGATGGT
clonNAT_R	CGATGTCCTCGACGGTCAG

3-2-1-3. プラスミド

- pCM190

Ralf J. Braun 博士 (Danube Private University, Austria) より分譲。YE_p 型のプラスミドで 2μ DNA の複製起点と、酵母での選択マーカーとして *URA3* 遺伝子、大腸菌の複製

起点と選択マーカーのアンピシリン耐性遺伝子を含む。マルチクロニングサイトの
上流には *ADHI* 遺伝子のターミネーターおよび 7 回反復 *tetO* 遺伝子のオペレーター、
下流には *CYCI* 遺伝子のターミネーターが存在する。また、ヒトサイトメガロウィル
ス (CMV) 遺伝子のプロモーターを上流に持つテトラサイクリン制御性トランス活
性化因子 (tTA) をコードする遺伝子も含まれている。恒常的に発現する tTA はドキシ
サイクリン非存在下において、*tetO* 遺伝子のオペレーターに結合し、マルチクロニ
ングサイトに組み込まれた目的遺伝子の転写を活性化する。一方、ドキシサイクリン
が存在する場合は、ドキシサイクリンが tTA と結合し、tTA と *tetO* 遺伝子のオペレー
ターとの結合を介した目的遺伝子の転写を抑制する (230)。

- pCM190-*TDP-43*

Ralf J. Braun 博士 (Danube Private University, Austria) より分譲。pCM190 のマルチク
ローニングサイトにヒト由来 *TDP-43* 遺伝子の ORF が組み込まれている。

- pAG426-*P_{GALI}-ccdB-yEGFP-T_{TEFI}*

Gateway technology (Thermo Fisher Scientific 社) を用いたクローニング方法に使用す
る発現用プラスミド。P_{GALI}-attR1-Cm^R-ccdB-attR2-yEGFP-T_{TEFI} 配列を有しており、LR
酵素を用いた *in vitro* 組換え反応に用いることができる。また、大腸菌の複製起点お
よび選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含む。

- pAG426-*P_{GALI}-TDP-43-yEGFP-T_{TEFI}*

Ralf J. Braun 博士 (Danube Private University, Austria) より分譲。*TDP-43-yEGFP* 融合
遺伝子の ORF の上流に *GALI* 遺伝子のプロモーター、下流に *TEFI* 遺伝子のターミネ
ーターが存在しており、恒常的に高発現を行うことができる。

- pFA6a-*natNT2*

PCR Toolbox (204) に含まれるプラスミド。Nourseothricin 耐性遺伝子 *natNT2* 配列を
持ち、遺伝子破壊の際の鋳型として用いた。

3-2-2. 培地

YPD 培地および LB 培地については、第 1 章と同様にして調製した。

- SC 培地

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.17 % (FORMEDIUM 社)

グルコース 2 % (ナカライテスク社)

硫酸アンモニウム 0.5 % (ナカライテスク社)

Drop out mix (各種アミノ酸) 0.2 %

寒天 2 % (必要に応じて添加) (三井製糖社)

1 N NaOH で pH 6.0 ~ 6.5 に調整

ドキシサイクリン 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ あるいは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (必要に応じて添加) (ナカライテスク社)

・ SG 培地

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 0.17 % (FORMEDIUM 社)

ガラクトース 2 % (富士フィルム和光純薬社)

硫酸アンモニウム 0.5 % (ナカライテスク社)

Drop out mix (各種アミノ酸) 0.2 %

寒天 2 % (必要に応じて添加) (三井製糖社)

1 N NaOH で pH 6.0 ~ 6.5 に調整

3-2-3. 遺伝子破壊株の作製

pFA6a-*natNT2* を鋳型とし、END3_S1_+50_Fw, END3_S2_-50_Rv プライマー対と KOD FX Neo (東洋紡社) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を酢酸リチウム法により *RSP5*^{P343S} に導入することで *RSP5*^{P343S}*end3* Δ を得た。作製した遺伝子破壊株は END3_check_+575_Fw, clonNAT_R プライマー対と KOD FX Neo (東洋紡社) を用いたコロニーPCR によって確認した。選択培地は YPD+hygromycin B (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培地を用いた。

3-2-4. 生育試験

各株を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地で一晩前培養後、各株を集菌し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄後、OD₆₀₀ = 0.2 になるように滅菌水で懸濁した。得られた懸濁液を 10 倍ずつ 3 段階 (10 ~ 1,000 倍) に希釈したサンプルを調製し、3 μL ずつ寒天培地上にスポットした。スポット後の寒天培地を 1 ~ 5 日間 30 °C で培養し、観察を行った。

3-2-5. TDP-43-EGFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察

各株を 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.2 になるように SC - Uracil 培地に再懸濁し、OD₆₀₀ = 1.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。細胞を回収し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄後、OD₆₀₀ = 1.0 になるように SG - Uracil 培地に懸濁した。30 °C で振盪培養を行い、培養開始 6 時間後、12 時間後および 24 時間後の細胞について観察を行った。HBO 100 Microscope Illuminating System (Carl Zeiss 社製) デジタルカメラが付属した蛍光顕微鏡 Axiovert 200M (Carl Zeiss 社製) を用いて解析を行った (励起波長; 488 nm, 吸収波長; 509 nm)。

3-2-6. 凝集タンパク質画分の調製

各株を 2 µg/mL ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.01 になるように SC - Uracil 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 2.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、5 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]、1 % TritonX-100、protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーMB601U (安井器械社製) で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、15 サイクル)。破碎後、破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間、4 °C)、ガラスビーズを取り除いた。上清を回収した後、Bradford 法で総タンパク質量を定量した。上清 (3.0 mg/mL) を遠心分離し (10,000 rpm、15 分間、4 °C)、上清画分と沈殿画分に分画した。沈殿画分を Lysis buffer で 3 回洗浄し、Lysis buffer と等量の 2×Treatment buffer (200 mM Tris-HCl [pH 6.8]、500 mM dithiothreitol [DTT]、2 % glycerol、0.4 % SDS、0.02 % BPB) を加え、2 分間、95 °C で煮沸して可溶化した。一方、タンパク質濃度を調整した後の上清、および遠心後の上清画分を 30 µL ずつ分取し、2×Treatment buffer を 30 µL 加え、2 分間、95 °C で煮沸したものをそれぞれ全細胞抽出液、および上清画分とした。

3-2-7. TDP-43 の経時的分解評価

各株を 2 µg/mL ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.01 になるように SC - Uracil 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 2.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。ドキシサイクリンを終濃度 10 µg/mL になるように添加し、振盪培養開始前 (0 時間)、1 時間後、3 時間後および 6 時間後の細胞を回収した。回収した細胞を精製水に懸濁し、精製水と等量の 200 mM NaOH を加え、10 分間、室温でインキュベートした後、細胞を再度回収した。回収した細胞に、1×SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8]、2 % SDS、2.25 % glycerol、5 % 2-mercaptoethanol、0.0105 % BPB) を加え、2 分間、95 °C で煮沸して可溶化した。

3-2-8. TDP-43 と Rsp5 の共免疫沈降

各株を 2 µg/mL ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地で一晩前培養後、細胞を回収し、培養した培地と同量の滅菌水で洗浄した。OD₆₀₀ = 0.01 になるように SC - Uracil 培地に懸濁し、OD₆₀₀ = 2.0 付近になるまで 30 °C で振盪培養した。ドキシサイクリンを終濃度 10 µg/mL になるように添加し、振盪培養開始 3 時間後の細胞を回収した。回収した細胞を Lysis buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、10 % glycerol、1.0 % NP-40、protease inhibitors) に懸濁し、ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーMB601U で破碎した (2,500 rpm、30 秒間 ON、40 秒間 OFF、15 サイクル)。破碎後、破碎液を遠心分離し (3,000 rpm、2 分間、4 °C)、ガラスビーズを取り除いた。上清を回収した後、Bradford 法で総タンパク質量を定量した。上清 (3.0 mg/mL) に 10

μL の平衡化したマグネティックビーズ (Bio-Rad Laboratories) と 5μL の抗 Rsp5 ウサギ抗体 (Jon M. Huibregtse 博士 [University of Texas at Austin, U. S. A.] より分譲) を加え、ローターを用いて 2 時間、4 °C でインキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM sodium chloride、10 % glycerol、0.1 % NP-40) で 3 回洗浄し、沈降物に精製水で 1× になるように希釈した 5×SDS sample buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8]、10 % SDS、11.25 % glycerol、25 % 2-mercaptoethanol、0.0625 % BPB) を加え、2 分間、95 °C で煮沸して可溶化した。一方、タンパク質濃度を調整した後の上清を 40 μL 分取し、5×SDS sample buffer を 10 μL 加え、2 分間、95 °C で煮沸したものを全細胞抽出液とした。

3-2-9. ウェスタンブロッティング

各サンプルを、10 % の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (200 V、15 mA/枚、60 ~ 90 分) を行った。泳動後のゲルから転写バッファー (0.58 % [w/v] Tris、0.1 % [w/v] SDS、2.9 % [w/v] グリシン、20 % メタノール) で満たしたトランスファーユニット (Bio-Rad 社製) を使用して、PVDF メンブレン (Millipore 社) にタンパク質を転写した (115 V、400 mA、120 分)。メンブレンを ブロッキングバッファー (1×TBS - T、5 % BSA) でブロッキングした (室温、60 分)。1 次抗体として、Can Get Signal Solution 1 (東洋紡社) で 2,000 倍に希釈した抗 Rsp5 ウサギ抗体、2,000 倍に希釈した抗 GAPDH ウサギ抗体 (ClonID: GA1R)、および 5,000 倍に希釈した抗 TDP-43 ウサギ抗体 (Abcam 社, ClonID: ab104223) をそれぞれ用いた。2 次抗体には Can Get Signal Solution 2 (東洋紡社) で 2,000 倍に希釈した抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、Easy blot 抗ウサギ IgG 抗体 (Gene Tex 社) および抗ウサギ IgG 抗体 (Promega 社) をそれぞれ用いた。検出には ECL plus Western blotting Detection System (GE Healthcare 社) を用い、ルミノメーター LAS-4000 (Fujifilm 社製) で検出した。各バンドのシグナル強度は、Image J ソフトウェアを用いて測定し、定量化した。

3-2-10. その他

大腸菌からのプラスミド調製、大腸菌の形質転換、酵母の取り扱いや遺伝子操作、各試薬の調製については、第 1 章と同様にして実施した。

3-3. 結果

3-3-1. ヒト TDP-43 を用いた酵母の ALS モデル実験系の構築

まず、ヒト TDP-43 を用いた酵母の ALS モデル実験系の構築を試みた。*GAL1* プロモーターを用いた過剰発現システムは、酵母の代謝を大きく変えてしまうことが問題であることから、本研究ではドキシサイクリンの存在によって TDP-43 の発現が抑制される Tet-off システムを使用し、TDP-43 の細胞毒性を評価した。図 56 に示すように、ドキシサイクリンが存在する場合は、TDP-43 発現株と非発現株の生育に差が見られなかったのに対し、TDP-43 の発現誘導により酵母の生育が顕著に阻害された。この結果から、TDP-43 の過剰発現により細胞毒性が生じることが示された。

TDP-43 の凝集・蓄積が ALS の病理学的特徴であることから、図 56 で示した細胞毒性は TDP-43 の凝集に起因することが示唆された。そこで、EGFP を融合した TDP-43 の細胞内動態について解析した (図 57)。その結果、EGFP 発現株では、発現誘導 24 時間後でさえも GFP が細胞質中に拡散した。一方、TDP-43-EGFP 発現株においては、発現誘導 3 時間後または 6 時間後に小さなドット状の凝集体が観察された。さらに、発現誘導 12 時間後および 24 時間後に凝集体の大きさが肥大化し、強い蛍光シグナルを示した。したがって、TDP-43 過剰発現条件での生育と一致して、TDP-43 が酵母細胞内で凝集し、酵母に毒性を示すことが明らかになった。

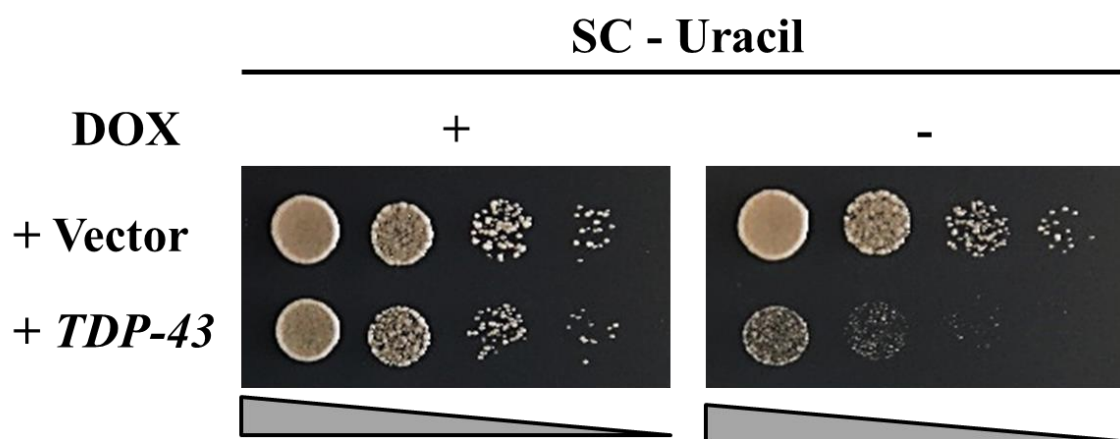


図 56 TDP-43 の毒性試験

BY4741 株に空ベクター (pCM190) または TDP-43 発現プラスミド (pCM190-TDP-43) を導入し、一晚、2 $\mu\text{g/ml}$ ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地において 30 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。各株を $\text{OD}_{600} \approx 0.2$ に調整した後、 $10^0 \sim 10^3$ 倍まで段階希釈し、10 $\mu\text{g/mL}$ ドキシサイクリン (DOX) 含有 SC - Uracil 寒天培地および SC - Uracil 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 30 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間培養した。

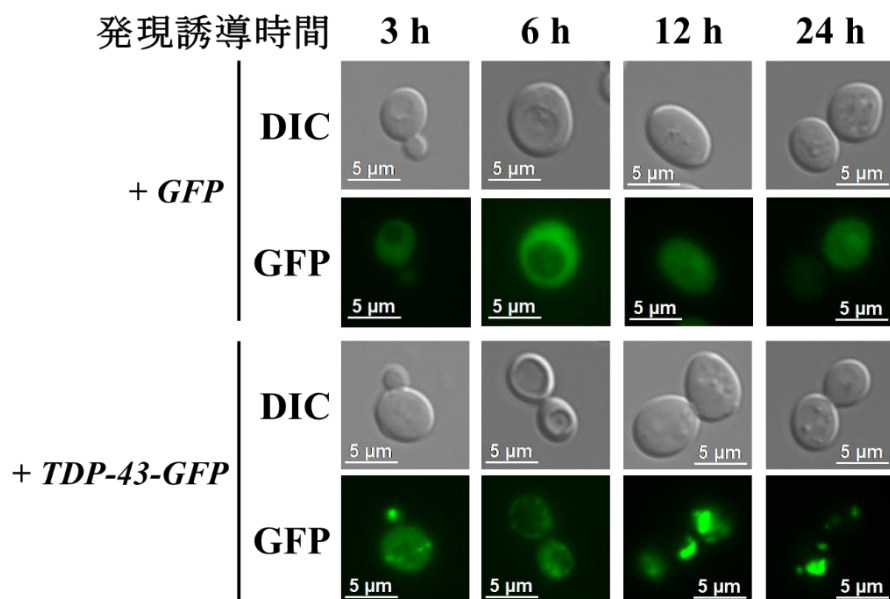


図 57 TDP-43 の細胞内動態

BY4741 株に空ベクター (pAG426-*P_{GALI}-ccdB-yEGFP-T_{TEF1}*) または TDP-43-EGFP 発現プラスミド (pAG426-*P_{GALI}-TDP-43-yEGFP-T_{TEF1}*) を導入し、SG - Uracil 培地で TDP-43-EGFP の発現を誘導した。TDP-43-EGFP 発現誘導後 3 時間、6 時間、12 時間および 24 時間の細胞を蛍光顕微鏡で観察した (GFP)。細胞形態は微分干渉観察によるものを示す (DIC)。

3-3-2. Rsp5 を介した TDP-43 の分解誘導

上記 3-3-1 の結果から、過剰発現した TDP-43 が酵母細胞内で凝集し、細胞毒性を示すモデル実験系が構築できた。本研究の解析対象である Rsp5 が TDP-43 の毒性緩和に関与するのか検討するため、Rsp5 の機能欠損変異 (*rsp5^{A401E}*) 株および機能獲得変異 (*RSP5^{P343S}*) 株において TDP-43 を発現させ、過剰発現条件における酵母の生育を評価した。これまでに当研究室では、*rsp5^{A401E}* 株は α -シヌクレインの過剰発現により生育が抑制されること、一方 *RSP5^{P343S}* 株はその生育抑制を緩和することを報告している (109)。興味深いことに、TDP-43 を過剰発現させた場合においても、*rsp5^{A401E}* 変異により酵母の生育が抑制され、*RSP5^{P343S}* 変異によりその生育が回復することが明らかになった (図 58)。この結果から、Rsp5 が TDP-43 の細胞毒性の緩和に関与することが示された。

一般的に、凝集したタンパク質は、遠心分離を用いた分画法により Pellet 画分に含まれる。そこで、各株における TDP-43 の凝集について解析したところ (図 59)、Pellet 画分において、*rsp5^{A401E}* 変異により TDP-43 のタンパク質量が野生型株よりも増加し、*RSP5^{P343S}* 変異によりその量が減少した。この結果から、Rsp5 が TDP-43 の凝集に関与することが示唆された。これまでに、Rsp5 内のアミノ酸置換が α -シヌクレインの分解に影響を及ぼすことが報告されている (105, 109, 227)。また、図 58, 59 の結果から、これら Rsp5 の変異は TDP-43 の分解にも影響することが推測された。そこで、TDP-43 の発現停止後のタンパク質レベルを経時的に解析した (図 60, 61)。その結果、野生型株においては、発現停止 6 時間後までに TDP-43 のタンパク質量が 45 %程度まで減少した。一方、*rsp5^{A401E}* 株においては、発現停止 6 時間後でさえもそのタンパク質量は 70 %程度までしか減少しておらず、分解が抑制された。興味深いことに、*RSP5^{P343S}* 株においては、発現停止 3 時間後の時点で TDP-43 のタンパク質量が 40 %程度まで減少しており、分解が促進したことが示された。この結果から、Rsp5 が TDP-43 の分解に関与することが明らかになった。

rsp5^{A401E} 変異および *RSP5^{P343S}* 変異は、基質との相互作用に必要な WW ドメイン上のアミノ酸置換であることから、これらの変異が TDP-43 との相互作用に及ぼす影響について解析した。図 62 に示すように、野生型株では抗 Rsp5 抗体による共沈物中から TDP-43 が検出された。一方、*rsp5^{A401E}* 株においては、TDP-43 のシグナルが減弱し、反対に、*RSP5^{P343S}* 株ではそのシグナルが増大した。この結果から、Rsp5 による WW ドメインを介した基質認識が、TDP-43 との相互作用に重要であることが明らかになった。

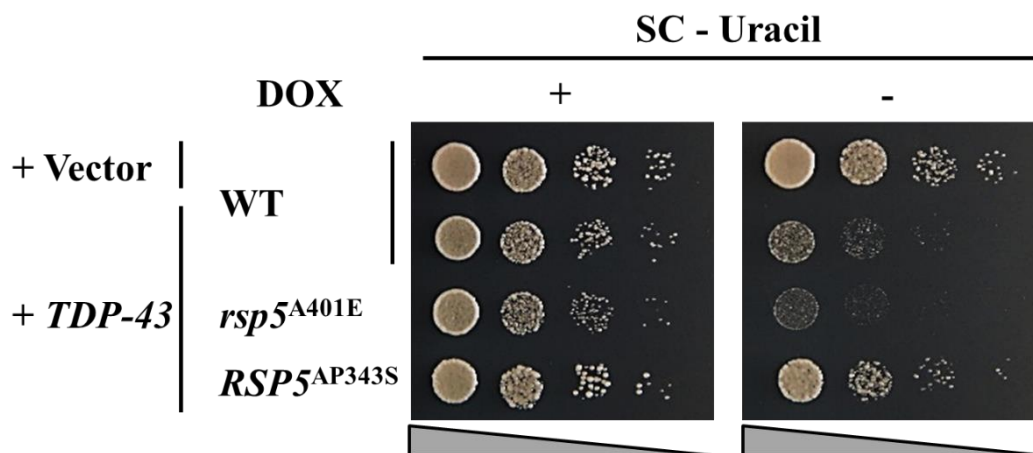


図 58 Rsp5 変異株を用いた TDP-43 の毒性試験

BY4741 株 (WT)、*rsp5^{A401E}* 株および *RSP5^{P343S}* 株に空ベクター (pCM190) または TDP-43 発現プラスミド (pCM190-*TDP-43*) を導入し、一晚、2 μg/mL ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地において 30 °C で培養した。各株を OD₆₀₀ ≒ 0.2 に調整した後、10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、10 μg/mL ドキシサイクリン (DOX) 含有 SC - Uracil 寒天培地および SC - Uracil 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 30 °C で 72 時間培養した。

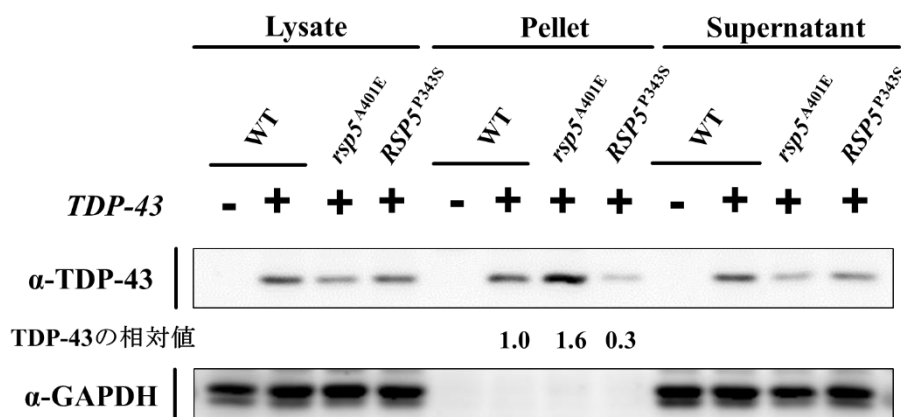


図 59 Rsp5 変異株における TDP-43 の凝集

BY4741 株 (WT)、*rsp5^{A401E}* 株および *RSP5^{P343S}* 株に、空ベクター (pCM190) または TDP-43 発現プラスミド (pCM190-*TDP-43*) を導入した各株を OD₆₀₀ ≒ 2.0 になるまで SC - Uracil 培地において 30 °C で培養した。培養後の細胞から全細胞抽出液を調製し、遠心分離を用いた沈殿画分中の TDP-43 を検出した。全細胞抽出液 (Total)、沈殿画分 (Pellet)、上清画分 (Supernatant) それぞれのサンプルを用いて、抗 TDP-43 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られた TDP-43 のシグナル強度をイメージ解析ソフト (Image J) により算出した。WT の Pellet 画分における TDP-43 シグナルを 1.0 とした場合に、それぞれの Pellet 画分における TDP-43 のシグナル強度について相対値を算出した。

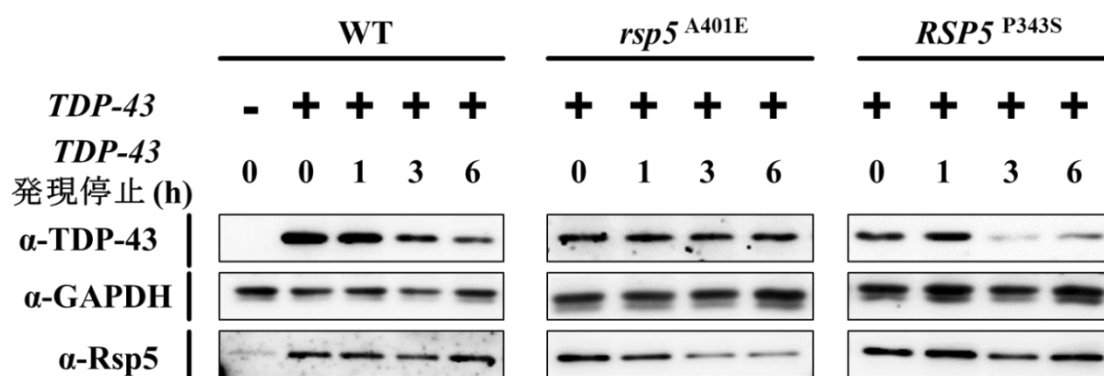


図 60 *Rsp5* 変異株における *TDP-43* の分解

BY4741 (WT) 株、*rsp5*^{A401E} 株および *RSP5*^{P343S} 株に、空ベクター (pCM190) または *TDP-43* 発現プラスミド (pCM190-*TDP-43*) を導入した各株を OD₆₀₀ ≒ 2.0 になるまで SC - Uracil 培地において 30 °C で培養した。終濃度 10 μg/mL のドキシサイクリンを添加して添加直後 (0 時間)、1 時間後、3 時間後および 6 時間後の細胞から全細胞抽出液をアルカリ抽出により調製した。これらのサンプルを用いて抗 *TDP-43* 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

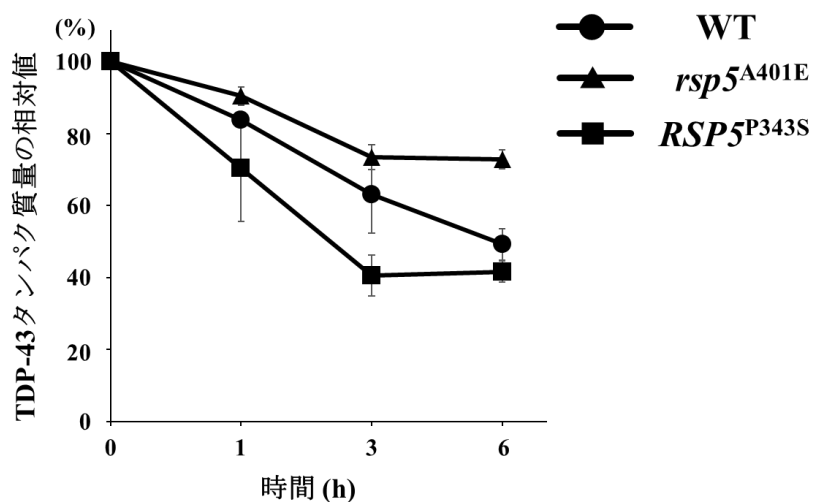


図 61 *Rsp5* 変異株における *TDP-43* の分解に関する定量的解析

BY4741 (WT) 株、*rsp5*^{A401E} 株、*RSP5*^{P343S} 株それぞれについて、ウェスタンブロットにより得られた *TDP-43* および GAPDH のシグナル強度をそれぞれの存在量からイメージ解析ソフト (Image J) により算出し、*TDP-43* のシグナル強度を GAPDH のシグナル強度により補正した。各株において、*TDP-43* 発現停止 0 時間後の *TDP-43* のシグナル強度を 100 % とした場合に、それぞれのシグナル強度について相対値を算出した。各株とも独立に 3 クローンを用いて同様の実験を行い、それぞれの平均値を示した。エラーバーとして 3 回の標準誤差を用いた。

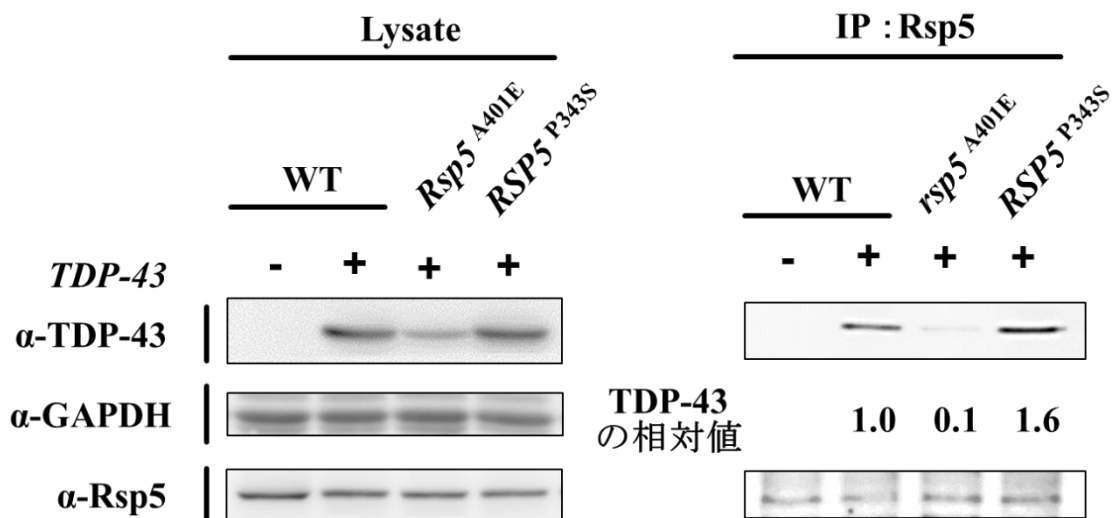


図 62 Rsp5 変異体における TDP-43 との相互作用

BY4741 (WT) 株、*rsp5*^{A401E} 株および *RSP5*^{P343S} 株に、空ベクター (pCM190) または TDP-43 発現プラスミド (pCM190-*TDP-43*) を導入した各株を OD₆₀₀ ≒ 2.0 になるまで SC - Uracil 培地において 30 °C で培養した。終濃度 10 μg/mL のドキシサイクリンを添加して 3 時間後の細胞から全細胞抽出液を調製し、抗 Rsp5 抗体を用いた共沈物中の TDP-43 を検出した。全細胞抽出液 (Lysate) と免疫沈降後 (IP) のサンプルを用いて、抗 Rsp5 抗体、抗 TDP-43 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。ウェスタンブロットにより得られた TDP-43 のシグナル強度を、イメージ解析ソフト (Image J) により算出した。WT の IP 後における TDP-43 シグナルを 1.0 とした場合に、それぞれの TDP-43 のシグナル強度について相対値を算出した。

3-3-3. エンドサイトーシスを介した TDP-43 の毒性緩和

細胞は、プロテアソームによるタンパク質分解経路およびエンドサイトーシスやオートファジーを介した液胞/リソソームでのタンパク質分解経路を有している。どのタンパク質分解経路が TDP-43 の毒性緩和に関与するかを調べるため、プロテアソーム分解に関わる Rpn4、エンドサイトーシスに関与する End3、オートファジーに関連する Atg7、液胞プロテアーゼの Pep4、細胞内の小胞輸送を行う Vam3, Vps1 に着目し (231–236)、各遺伝子の欠損が TDP-43 の細胞毒性に及ぼす影響について解析した (図 63)。その結果、ドキシサイクリンが存在する場合、*RPN4*, *VAM3*, *VPS1* 遺伝子の各単独破壊株 (*rpn4Δ*, *vam3Δ*, *vps1Δ*) は野生型株と比較して生育に差はなかった。また、*END3*, *ATG7*, *PEP4* 遺伝子の各単独破壊株 (*end3Δ*, *atg7Δ*, *pep4Δ*) については、酵母の生育にわずかな遅延が生じたものの、野生型株と比較して大きな生育阻害は観察されなかった。一方、TDP-43 の過剰発現条件においては、*rpn4Δ*, *vam3Δ*, *vps1Δ*, *atg7Δ* 株は野生型株と同程度の生育を示したが、*END3* 遺伝子および *PEP4* 遺伝子の欠損により生育が顕著に抑制された。この結果から、エンドサイトーシスを介した液胞でのタンパク質分解経路が TDP-43 の毒性緩和に関与することが示唆された。

Rsp5 は細胞膜上のタンパク質をユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導することにより細胞膜の恒常性維持に関与する。もし、Rsp5 がエンドサイトーシス経路を介して TDP-43 の毒性緩和に関与するのであれば、TDP-43 の分解を促進する *RSP5*^{P343S} 株において、*END3* 遺伝子の欠損を組み合わせると、*RSP5*^{P343S} 変異による TDP-43 の毒性緩和が抑制されることが推測された。そこで、*RSP5*^{P343S} 株の *END3* 遺伝子を破壊した株 (*RSP5*^{P343S}*end3Δ*) を用いて、TDP-43 の細胞毒性について解析した (図 64)。その結果、TDP-43 の発現が誘導された条件では、図 58 の結果と一致して *RSP5*^{P343S} 株は良好な生育を示し、反対に *END3* 遺伝子の欠損株 (*end3Δ*) は生育が抑制された。興味深いことに、今回の解析対象である *RSP5*^{P343S}*end3Δ* 株はドキシサイクリンが含まれる場合でさえも部分的に生育が抑制され、TDP-43 の発現誘導によりその生育が顕著に阻害された。この結果から、Rsp5 がエンドサイトーシスを介して TDP-43 の毒性を緩和することが示唆された。

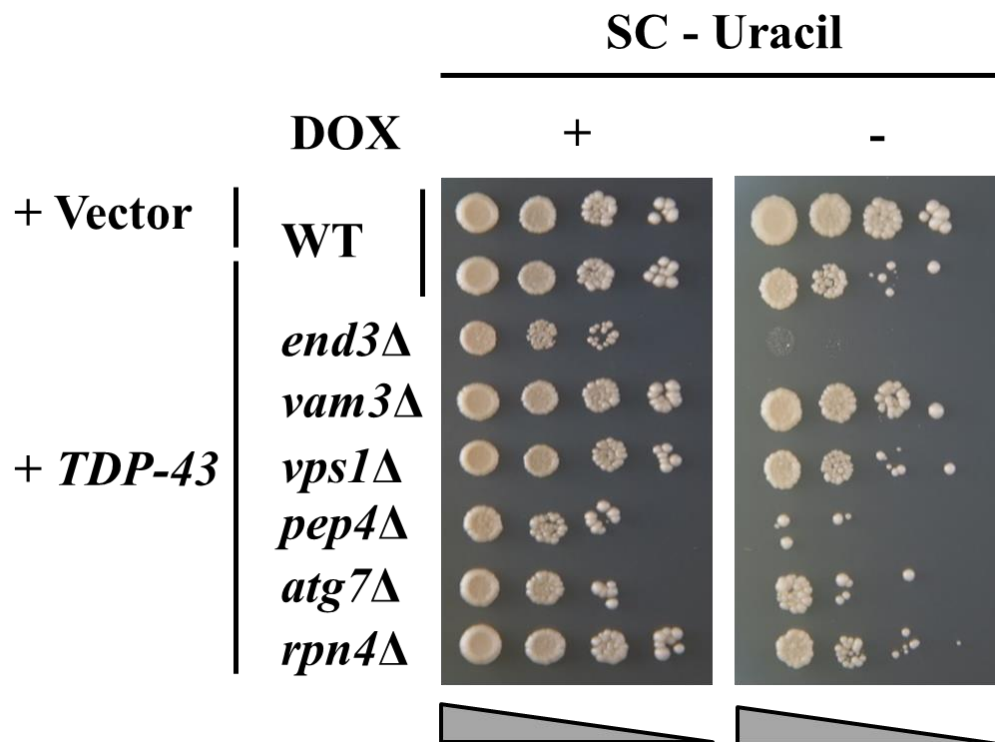


図 63 タンパク質分解に関わる遺伝子の欠損株を用いた TDP-43 の毒性試験

BY4741 (WT) 株、*rpn4Δ* 株、*atg7Δ* 株、*end3Δ* 株、*vam3Δ* 株、*vps1Δ* 株および *pep4Δ* 株に、空ベクター (pCM190) または TDP-43 発現プラスミド (pCM190-*TDP-43*) を導入し、一晩、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地において 30 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。各株を $\text{OD}_{600} \approx 0.2$ に調整した後、 $10^0 \sim 10^3$ 倍まで段階希釈し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ドキシサイクリン (DOX) 含有 SC - Uracil 寒天培地及び、SC - Uracil 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 30 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間培養した。

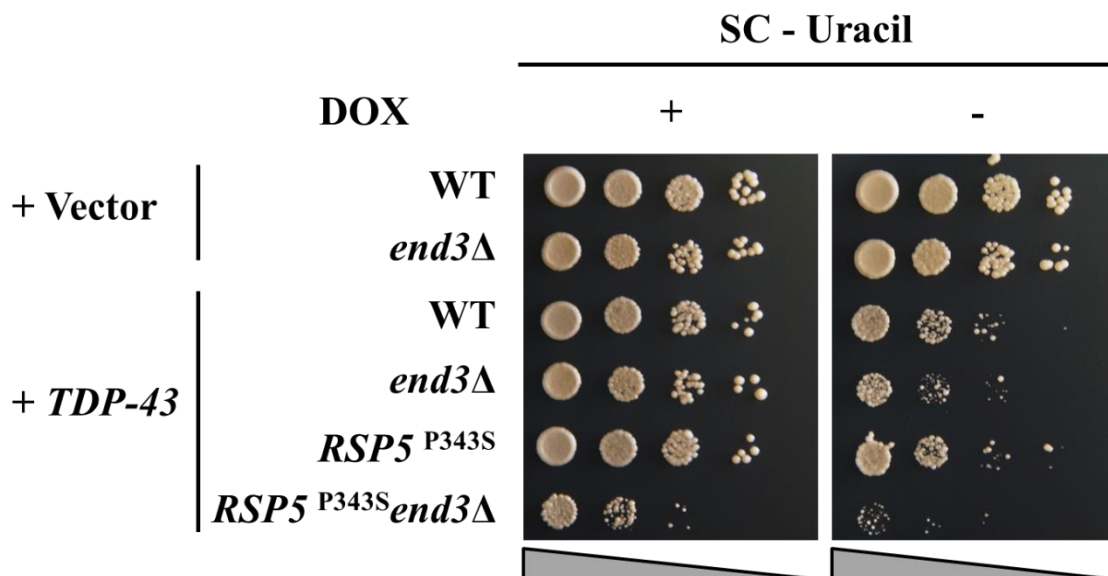


図 64 *RSP5*^{P343S}*end3Δ* 株を用いた TDP-43 の毒性試験

BY4741 (WT) 株、*end3Δ* 株、*RSP5*^{P343S} 株および *RSP5*^{P343S}*end3Δ* 株に、空ベクター (pCM190) または TDP-43 発現プラスミド (pCM190-*TDP-43*) を導入し、一晩、2 μg/mL ドキシサイクリン含有 SC - Uracil 培地において 30 °C で培養した。各株を OD₆₀₀ ≒ 0.2 に調整した後、10⁰ ~ 10³ 倍まで段階希釈し、10 μg/mL ドキシサイクリン (DOX) 含有 SC - Uracil 寒天培地及び、SC - Uracil 寒天培地にスポットした。スポット後の寒天培地を 30 °C で 72 時間培養した。

3-4. 考察

Rsp5によるエンドサイトーシスを介した TDP-43の毒性緩和機構

本章では、ALSの発症に関わるヒト TDP-43を用いた酵母のモデル実験系の構築および真核生物に広く保存された Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼ Rsp5による TDP-43の分解機構に関する解析を行った。まず、TDP-43が酵母細胞内で凝集し、細胞毒性を示すことが明らかになった。また、Rsp5における WW ドメインの基質認識が TDP-43の分解を介した細胞毒性の緩和に重要であることを見出した。さらに、Rsp5を介したエンドサイトーシス経路が、TDP-43の分解に関与する可能性が示された。

以上の結果を踏まえると、図 65に示すような Rsp5によるエンドサイトーシスを介した TDP-43の分解機構が考えられた。まず、TDP-43は酵母細胞内において、可溶性のタンパク質として細胞質に局在する。しがしながら、TDP-43のタンパク質レベルが増加すると、徐々に不溶性の凝集体が形成される。TDP-43が不溶性画分に移行する機構は不明であるが、エンドサイトーシスが TDP-43の毒性緩和に関与する結果を踏まえると、可溶性あるいは凝集体の TDP-43が細胞膜またはエンドソーム画分に局在することが考えられる。Rsp5はこれらの TDP-43を認識し、ユビキチン化を介したエンドサイトーシスにより、分解することが推測される。これまでに、PolyQを付加した Htt および Tau などの様々な凝集タンパク質が、エンドサイトーシスを阻害することが報告されている (237-239)。また、TDP-43がエンドソーム膜上に局在する GTPase の Rab5 と共局在することも示されており (240)、凝集タンパク質とエンドサイトーシス経路が未知のメカニズムにより相互作用すると考えられている。したがって、Rsp5は上記のようなメカニズムで様々なタンパク質を分解し、凝集に起因した細胞毒性を緩和することが予想される。

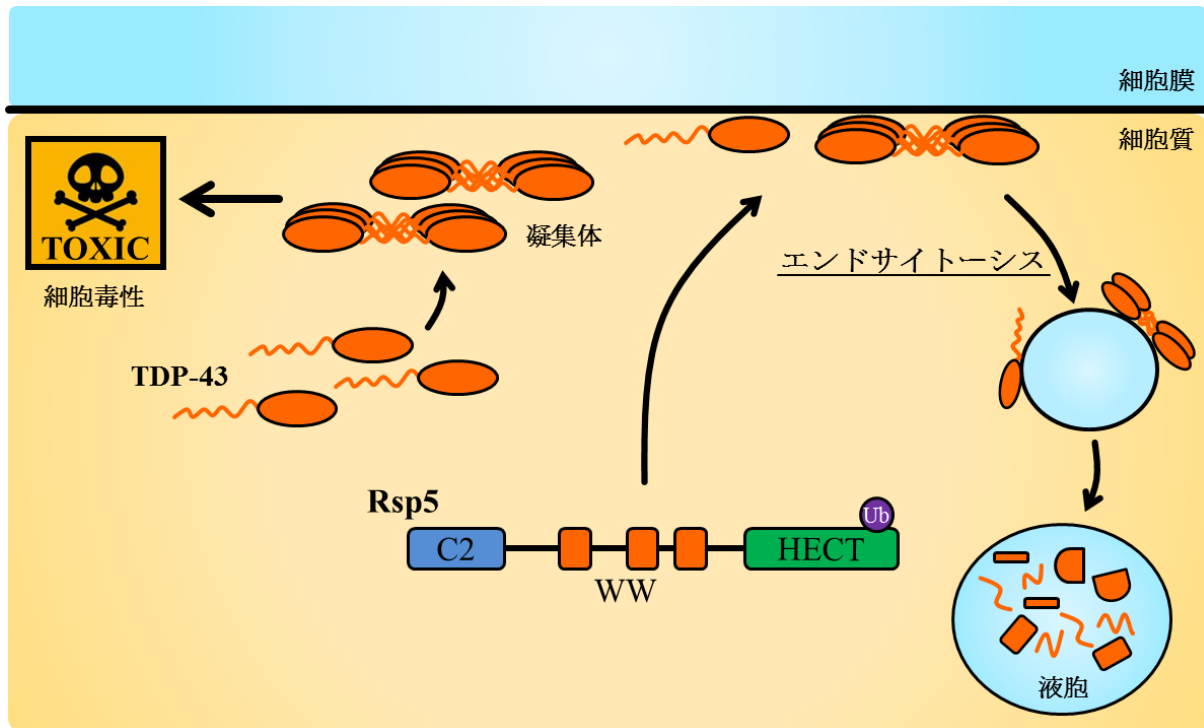


図 65 Rsp5 によるエンドサイトーシスを介した TDP-43 の分解機構モデル

細胞内に局在する TDP-43 は、そのタンパク質レベルが増加すると凝集体を形成する。何らかのメカニズムにより生体膜区画へ移行した可溶性の TDP-43 またはその凝集体は、Rsp5 により認識され、エンドサイトーシスを介して液胞にて分解される。

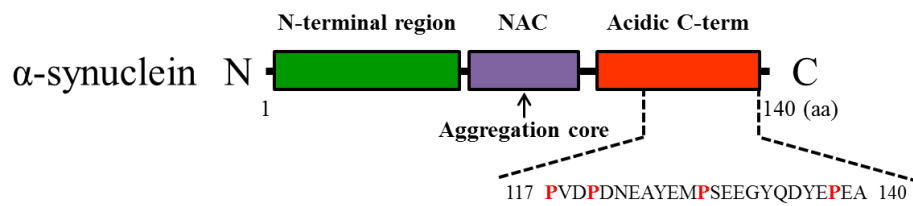
Rsp5 の WW ドメインによる基質認識機構

Rsp5 は基質タンパク質の PY モチーフを介して基質と相互作用することが広く知られているが、TDP-43 は PY モチーフを有しておらず、Rsp5 がどのように TDP-43 を認識するのかは不明である。α-シヌクレインを認識する場合、C 末端に位置する比較的 Pro に富んだ PVDPD NEAYE MPSEE GYQDY EPEA 配列を認識することが示されている (105)。図 66 に示すように、類似配列として、TDP-43 は N 末端側に PIEIP SEDDG TVLLS TVTAQ FPGAC GLRYR NPVS を有しており、Rsp5 がこの配列を認識すると予想される。したがって、Rsp5 は TDP-43 における上記の配列を認識し、可溶性の過剰な TDP-43 を分解へと誘導するものの、Rsp5 に機能欠損変異が生じると、タンパク質分解が抑制され、凝集体の形成が促進することが考えられる。一方、WW ドメインは疎水性の基質認識ポケットを形成することから、立体構造が変化したタンパク質の疎水性領域と相互作用する可能性も考えられる。これまでに、TDP-43、Tau、α-シヌクレインなどの様々な凝集タンパク質に共通して関与するタンパク質として唯一、脱凝集化酵素の Hsp104 が報告されている (241)。Hsp104 は、変性あるいは凝集したタン

パク質の疎水性領域を認識すると考えられることから (242–244)、基質の疎水性領域を介した相互作用は、幅広いタンパク質を共通して認識するメカニズムの一つだと推測される。したがって、Rsp5 が WW ドメインを介して、変性あるいは凝集したタンパク質の疎水性領域を認識する可能性は十分に考えられる。

先行研究の結果と併せて考えると、RSP5^{P343S} 変異は α -シヌクレインおよび TDP-43 との相互作用を強化することから、上記の基質認識メカニズムを解明する足掛かりになると予想される。興味深いことに、SWISS-MODEL ソフトウェアを用いて作製した Rsp5 における WW2 ドメインの立体構造モデルでは、Pro343 はループ構造の折り返し部位に位置しており、逆並行 β -シートによる基質認識と直接的に関与しない可能性が示された (図 67)。したがって、Pro343 の Ser への置換が WW ドメインの立体構造に及ぼす影響を解析することにより、変性あるいは凝集タンパク質に共通する認識機構の解明が期待される。また、図 68 に示すように、この Pro 残基は Rsp5 のヒトオルソログである Nedd4 において、WW3 ドメイン上の 852 番目に保存されていることから、Pro852 の置換が α -シヌクレインや TDP-43 などの凝集タンパク質に対する特異性を Nedd4 においても高める可能性が考えられる。今後、*in vivo/vitro* の条件にて、Rsp5/Nedd4 と TDP-43 との相互作用およびユビキチン化修飾について解析する必要があり、RSP5^{P343S} 変異体または Nedd4^{P852S} 変異体を用いることにより、Nedd4 ファミリーに保存された基質認識メカニズムの解明に繋がることが期待される。一方、Rsp5 のアダプタータンパク質である Ydj1 は、Rsp5 を変性したタンパク質にリクルートすることから (153)、Ydj1 のようなアダプタータンパク質が関与する可能性も考えられる。したがって、免疫沈降法と質量分析計を用いて、Rsp5 と相互作用するタンパク質を網羅的に解析しても興味深い知見が得られることが予想される。上記の解析により得られる結果を踏まえて、WW ドメインと基質タンパク質との相互作用について構造解析することにより、Nedd4 ファミリーに保存された WW ドメインによる基質認識の分子機構を解明できることが期待される。

A



B

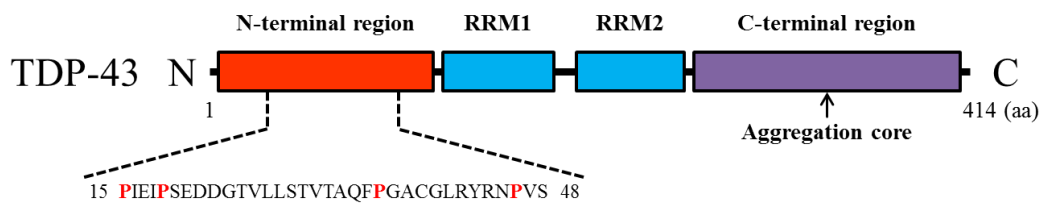


図 66 α-シヌクレインおよび TDP-43 のドメイン構造

A) α-シヌクレインのドメイン構造。α-シヌクレインは、脂質相互作用モチーフを含む N-terminal region、凝集体形成の核となる non-Aβ component (NAC)、Pro 残基に富む Acidic C-term を有している。B) TDP-43 のドメイン構造。TDP-43 は、Pro 残基に富む N-terminal region、RNA recognition motif (RRM) 1/2、凝集体形成の核となる C-terminal region を有している。

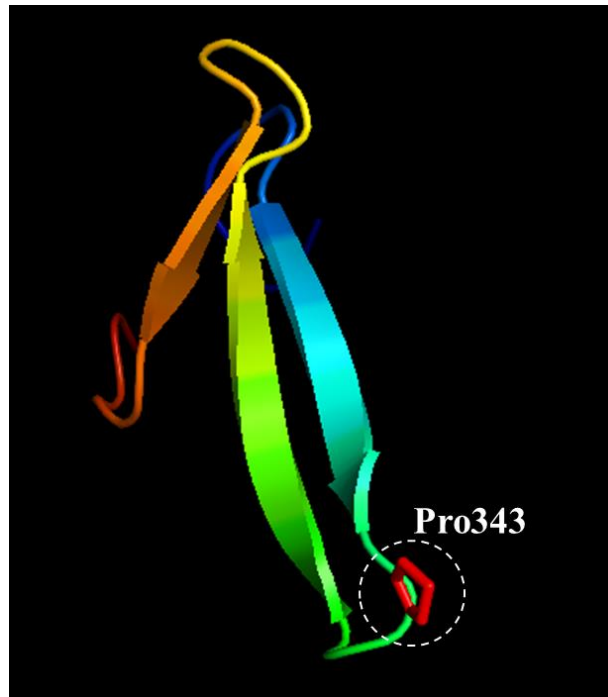


図 67 Rsp5 における WW2 ドメインの立体構造

WW2 ドメインの立体構造。Rsp5 における WW2 ドメインのアミノ酸配列 (331-364 a.a.) と Nedd4 における WW3 ドメインの構造 (Protein Data Bank no. 1I5H) をもとに SWISS-MODEL ソフトウェアを用いてモデルを作製した。作製したモデル構造は、PyMOL ソフトウェアを用いて表示した。343 番目に相当する Pro 残基を赤色で示した。

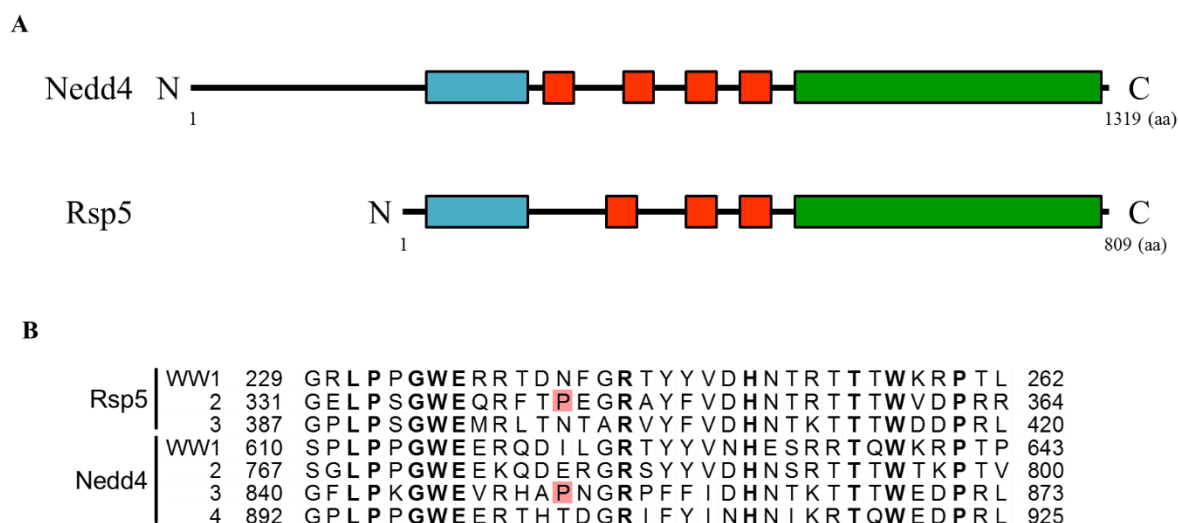


図 68 Rsp5 および Nedd4 のドメイン構造と一次配列の比較

A) Nedd4 と Rsp5 のドメイン構造。N 末端から順に C2 ドメイン(■)、WW ドメイン (■)、HECT ドメイン (■) が並ぶ。B) Rsp5 および Nedd4 における WW ドメインのアライメント。Rsp5 における Pro343 および Nedd4 における Pro852 を赤色で示す。

エンドサイトーシスによる凝集タンパク質の分解機構

これまでに、可溶性の TDP-43 はプロテアソームにより分解されること、および凝集した TDP-43 はオートファジーを介して分解されることが報告されている (245–248)。また、ヒトの培養細胞においては、RING 型ユビキチンリガーゼの Parkin が TDP-43 を K48 または K63 ポリユビキチン化する知見も得られており、TDP-43 の分解に関わるユビキチンリガーゼとその経路が明らかになりつつある (249, 250)s。一方、興味深いことに、酵母およびショウジョウバエのモデル実験系を用いた解析により、オートファジーが欠損した場合は、凝集体または可溶性の TDP-43 がエンドソーム-リソソーム経路を介して分解されることが示されている (240, 251)。また、ヒトの培養細胞においても本機構が保存されている。細胞質に局在する TDP-43 が、どのようにエンドソーム小胞内に取り込まれ、液胞/リソソームにより分解されるのかは不明であるものの、可能性の一つとして、多胞体小胞を形成する際に、細胞質中の TDP-43 が小胞内腔に取り込まれるメカニズムが考えられている (図 69)。これまでに、ESCRT-III 複合体を構成する *VPS24* 遺伝子の欠損により、TDP-43 の細胞毒性が増加することが報告されており (251)、ESCRT 複合体による多胞体小胞の形成が、TDP-43 の分解に重要な役割を担うことが推測される。さらに近年、Cdc48^{Ubx3} セグレターゼ複合体がエンドサイトーシスを介して、TDP-43 や FUS タンパク質の分解に関与することが報告された (252)。当複合体はエンドソーム膜に局在することから、生体膜上に

における Cdc48^{Ubx3} セグレターゼ複合体が細胞質タンパク質の分解に重要な役割を担うことが予想される。また、Rsp5 と Cdc48 に関する過去の知見を踏まえると、Rsp5 によってユビキチン化された凝集タンパク質を Cdc48 がエンドサイトーシスを介して分解する機構が存在する可能性もある。

TDP-43 と同様に、細胞質に局在する変性または凝集したタンパク質の多くは、プロテアソームやオートファジーを介して分解される。酵母においては、熱ショックストレスによって変性した Cdc19 や Pdc1 を Rsp5 がユビキチン化し、E3 ユビキチンリガーゼの Ubr1 が変性タンパク質を K48 ポリユビキチン化することで、プロテアソームを介して分解する (153)。一方、本研究で示したように、細胞質に局在するタンパク質がプロテアソームやオートファジー以外のタンパク質分解経路で除去される機構も見つかっている。リボソーム関連タンパク質の Lsg1 および Tma19 は、42 °C の熱ショックストレスにより凝集体を形成する。これらの凝集タンパク質はミトコンドリアに輸送され、ミトコンドリア局在型プロテアソームにより分解される (253)。また、凝集タンパク質がエンドサイトーシスを抑制することや、Hsp104 による液胞の恒常性維持が凝集タンパク質の細胞毒性を弱めることから (254, 255)、細胞質中のタンパク質がエンドサイトーシス経路を介して液胞で分解される可能性は十分に考えられる。これらの可能性を検討するため、生理学的な条件において、RSP5^{P343S} 変異が細胞機能に及ぼす影響を解析する必要がある。また、Lsg1 や Tma19 など凝集することが知られているタンパク質をモデル基質に用いて、RSP5^{P343S} 変異がこれらタンパク質の分解に及ぼす影響を解析することも必要である。これらの解析を通じて、Rsp5 による細胞質局在タンパク質のエンドサイトーシスを介した分解機構の一端が解明できると期待される。

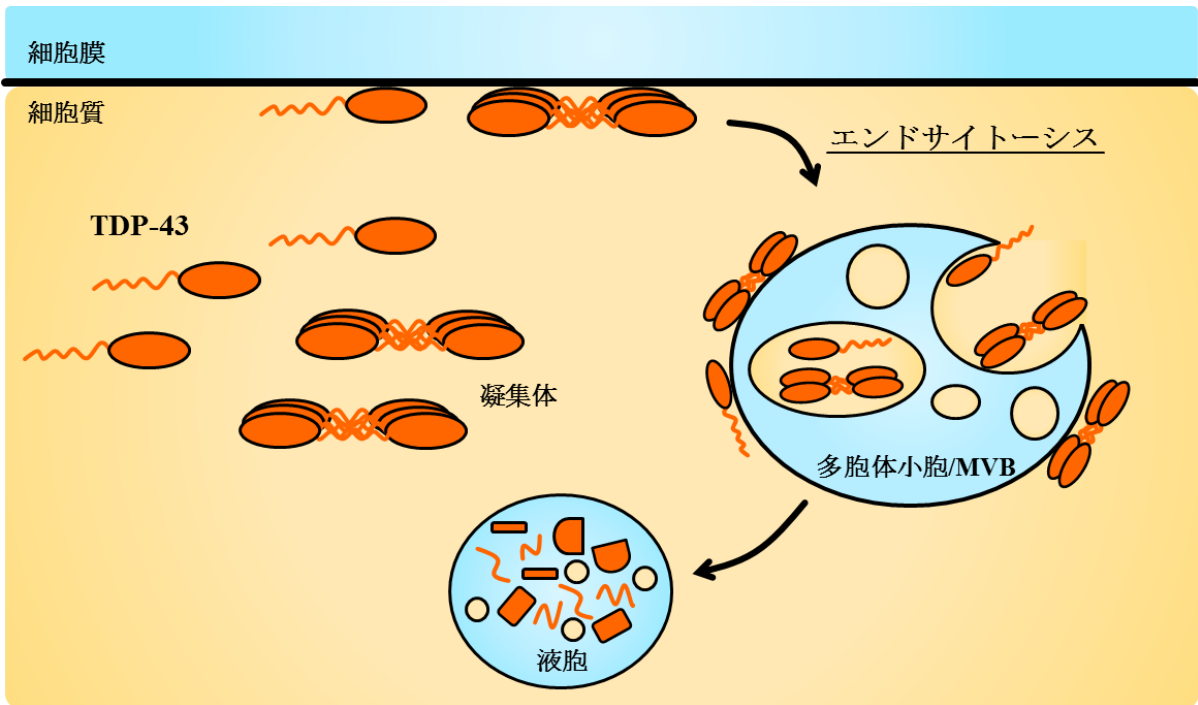


図 69 エンドサイトーシス経路を介した TDP-43 の分解機構モデル

可溶性および凝集した TDP-43 は、細胞膜あるいはエンドソーム膜と未知のメカニズムにより相互作用する。エンドソームが多胞体小胞を形成する際に、細胞質中の TDP-43 は小胞内腔に取り込まれ、液胞へ輸送された後、分解される。

総括

本研究の第一章では、広域アミノ酸パーミアーゼ **Agp1** のエンドサイトーシス機構について解析を行った。その結果、**Agp1** が自身の基質アミノ酸によって、**Rsp5** のユビキチン化活性依存的にエンドサイトーシスされることを明らかにした。また、**AZC** の細胞毒性を指標に **Agp1** のエンドサイトーシスを評価する実験系を構築し、**Rsp5** のアダプタータンパク質として **Bul1** を同定した。さらに、**Agp1** のエンドサイトーシスにおいて、**Rsp5** は基質認識に冗長性のある **Bul2** ではなく、**Bul1** を選択的に用いることを見出した。以上の結果から、基質認識に冗長性のある **Art** ファミリータンパク質にそれぞれ特異性があり、アダプタータンパク質が基質に応じて使い分けられる可能性を示すことができた。

第二章では、**Rsp5** における **C2** ドメインの機能について解析した。その結果、**C2** ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能を介して、総アミノ酸パーミアーゼ **Gap1** のユビキチン化ではなく、エンドサイトーシスを進行する装置タンパク質の制御に関与することを明らかにした。そして、**C2** ドメインの機能がエンドサイトーシスに必須な **Rvs167** との相互作用、およびそのユビキチン化に必要であることを見出した。さらに、窒素源の変化に応答して、**Rvs167** 内の **Lys118/242/259/260** がユビキチン化され、タンパク質の安定性が向上することを明らかにした。以上の結果から、**Rsp5** が非分解性のユビキチンシグナルを用いてエンドサイトーシスの進行を調節する可能性を見出した。

第三章では、ヒトの神経変性疾患の発症に関わるヒト **TDP-43** を凝集タンパク質のモデル基質に用いて、**Rsp5** による凝集タンパク質分解機構の解明を試みた。その結果、本研究で構築した酵母のモデル実験系において、**TDP-43** が細胞内で凝集し、酵母の生育を阻害することを明らかにした。また、**Rsp5** が基質認識に必須な **WW** ドメインを介して **TDP-43** と物理的に相互作用し、**TDP-43** の分解・除去に関わることを示した。さらに、**Rsp5** を介したエンドサイトーシス経路が、**TDP-43** の毒性から細胞を保護していることを明らかにした。これらの結果をもとに、**Rsp5** が細胞質で凝集するタンパク質を、エンドサイトーシスを介して分解する機構を見出した。

まとめ

真核生物は、環境の変化やストレスによって生じる不要または異常なタンパク質について、ユビキチン化を介して選択的に分解・除去する巧妙な機構を備えている。ユビキチン化されたタンパク質の多くは、プロテアソームやエンドサイトーシス経路を経て分解・除去される。酵母 *S. cerevisiae* においては、Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼ Rsp5 が細胞膜上のタンパク質や細胞内の凝集タンパク質をユビキチン化することで、細胞の恒常性維持に関与していることが知られている。本研究では、Rsp5 が WW ドメインを介して不要または異常なタンパク質を認識すること、また C2 ドメインの機能によってエンドサイトーシスのイベントを調節することを明らかにした。

それでは、Rsp5 が自身のドメインを協調的に用いることにより、分解する基質を選択し、さらにエンドサイトーシスの進行を調節する意義とは何であろうか？その回答の一つとして、ユビキチンという翻訳後修飾因子をタンパク質分解における一連の過程で用いることにより、不要または異常なタンパク質を効率良く除去しているのではないかと考えられる。ユビキチン化修飾の役割は、ユビキチンで標識されたタンパク質を分解するための目印であるが、これに加え、約 60 種ものタンパク質が相互作用する複雑なエンドサイトーシスを秩序立てる役割を担うことが予想される。酵母において全タンパク質の約 11%が PY モチーフを有していることを踏まえると、幅広い基質を認識できる WW ドメインおよび膜結合ドメインを有する Rsp5 が上記の目的を満たすために採用されたのだろう。また、PY モチーフが存在する 14 種類の Art ファミリータンパク質を組み合わせることで、200 種類以上の細胞膜タンパク質の中から、除去すべきタンパク質を正確に選択していると考えられる。そして、タンパク質の合成および分解のバランスが崩れた場合には、膜タンパク質の分解促進という本来の役割に加え、プロテアソームやオートファジーによるタンパク質分解経路を手助けするために、エンドサイトーシス経路を活性化することが予想される。このように、Rsp5 がエンドサイトーシスを介して細胞内の恒常性を維持することにより、環境の変化やストレスに対して迅速に適応できる考えられる。上記のモデルを立証するためには、Rsp5 が Art ファミリータンパク質を選択するメカニズムや、ユビキチン化修飾による Rvs167 の機能制御、さらには、細胞質に局在するタンパク質がエンドサイトーシスを介して分解される分子機構を解析する必要がある。

本研究により、Rsp5 によるエンドサイトーシス調節機構の全体像を解明するとともに、エンドサイトーシスを介した新たなタンパク質分解機構の可能性を示すことができた。将来的には、Rsp5 に関する解析が、真核生物において Nedd4 ファミリーユビキチンリガーゼにより制御される多様な生命現象の解明のみならず、酵母による発酵化学産業への貢献および創薬開発技術の進展に繋がることを期待する。

謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製において直接ご指導下さいました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室 高木 博史 教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究の全般にわたり実験のご指導、ご助言を下さいました同研究室の西村 明 助教、渡辺 大輔 助教（現・京都大学大学院 農学研究科 准教授）に心よりお礼申し上げます。

LC-MS/MS 解析を用いてユビキチン化部位の同定を遂行するにあたり、解析のご指導、ご助言を下さいました本学技術職員の倉田 理恵 女史に深くお礼申し上げます。また、TDP-43 発現プラスミドの分譲、および実験のご助言をして頂きました Ralf J. Braun 博士 (Danube Private University, Austria) に感謝申し上げます。

さらに、日頃より様々なご助言を下さいました同研究室の那須野 亮 助教、Tira Siti Nur Afiah、松下 智紀 氏をはじめ、共に研究生活を過ごした同研究室の皆様、先行研究において多くの財産を残して下さいました先輩方に厚くお礼を申し上げます。

参考文献

1. Ruiz, S. J., van't Klooster, J. S., Bianchi, F., and Poolman, B. (2020) Growth inhibition by amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*. **9**, 7
2. Rowley, D. (1953) Inhibition of *E. coli* strains by amino-acids. *Nature*. **171**, 80–81
3. Jensen, R. A., Stenmark-Cox, S., and Ingram, L. O. (1974) Mis-regulation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase does not account for growth inhibition by phenylalanine in *Agmenellum quadruplicatum*. *J. Bacteriol.* **120**, 1124–1132
4. Englesberg, E., Bass, R., and Heiser, W. (1976) Inhibition of the growth of mammalian cells in culture by amino acids and the isolation and characterization of L-phenylalanine-resistant mutants modifying L-phenylalanine transport. *Somatic Cell Genet.* **2**, 411–428
5. Sumrada, R., and Cooper, T. (1976) Basic amino acid inhibition of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 598–602
6. Miles, D. O., Dyer, J. K., and Wong, J. C. (1976) Influence of amino acids on the growth of *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* **127**, 899–903
7. Kaur, J., and Bachhawat, A. K. (2007) Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **176**, 877–890
8. Watanabe, D., Kikushima, R., Aitoku, M., Nishimura, A., Ohtsu, I., Nasuno, R., and Takagi, H. (2014) Exogenous addition of histidine reduces copper availability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell.* **1**, 241–246
9. Blau, N., Van Spronsen, F. J., and Levy, H. L. (2010) Phenylketonuria. *The Lancet*. **376**, 1417–1427
10. Hughes, A. L., and Gottschling, D. E. (2012) An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature*. **492**, 261–265
11. Hofman-Bang, J. (1999) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.* **12**, 35–71
12. Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M. C., Carrau, F., Beltran, G., and Mas, A. (2019) Analysis of the NCR mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Front. Genet.* **9**, 747
13. Poole, K., E. Walker, M., Warren, T., Gardner, J., McBryde, C., de Barros Lopes, M., and Jiranek, V. (2009) Proline transport and stress tolerance of ammonia-insensitive mutants of the *PUT4*-encoded proline-specific permease in yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**, 427–439
14. Ghaddar, K., Merhi, A., Saliba, E., Krammer, E.-M., Prevost, M., and Andre, B. (2014) Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 4447–4463

15. Gournas, C., Gkionis, S., Carquin, M., Twyffels, L., Tyteca, D., and André, B. (2018) Conformation-dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E3145–E3154
16. Morimoto, R. I. (2011) The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 91–99
17. Valastyan, J. S., and Lindquist, S. (2014) Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *DMM Dis. Model. Mech.* **7**, 9–14
18. Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., and Frydman, J. (2011) Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–14
19. Comyn, S. A., Chan, G. T., and Mayor, T. (2014) False start: Cotranslational protein ubiquitination and cytosolic protein quality control. *J. Proteomics.* **100**, 92–101
20. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Ulrich Hartl, F. (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 323–355
21. Powers, E. T., and Balch, W. E. (2013) Diversity in the origins of proteostasis networks—a driver for protein function in evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 237–248
22. Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2010) Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a004390
23. Ciechanover, A., and Kwon, Y. T. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* **47**, e147
24. Ruetenik, A. L., Ocampo, A., Ruan, K., Zhu, Y., Li, C., Grace Zhai, R., and Barrientos, A. (2016) Attenuation of polyglutamine-induced toxicity by enhancement of mitochondrial OXPHOS in yeast and fly models of aging. *Microb. Cell.* **3**, 338–351
25. Ju, S., Tardiff, D. F., Han, H., Divya, K., Zhong, Q., Maquat, L. E., Bosco, D. A., Hayward, L. J., Brown, R. H., Lindquist, S., Ringe, D., and Petsko, G. A. (2011) A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity. *PLoS Biol.* **9**, e1001052
26. Petroi, D., Popova, B., Taheri-Talesh, N., Irniger, S., Shahpasandzadeh, H., Zweckstetter, M., Outeiro, T. F., and Braus, G. H. (2012) Aggregate clearance of α -synuclein in *Saccharomyces cerevisiae* depends more on autophagosome and vacuole function than on the proteasome. *J. Biol. Chem.* **287**, 27567–27579
27. Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J., and Macreadie, I. (2007) Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1230–1236
28. Micsenyi, M. C., Sikora, J., Stephney, G., Dobrenis, K., and Walkley, S. U. (2013) Lysosomal membrane permeability stimulates protein aggregate formation in neurons

- of a lysosomal disease. *J. Neurosci.* **33**, 10815–10827
29. Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **30**, 12535–12544
 30. Weinberg, J. S., and Drubin, D. G. (2014) Regulation of clathrin-mediated endocytosis by dynamic ubiquitination and deubiquitination. *Curr. Biol.* **24**, 951–959
 31. Weinberg, J., and Drubin, D. G. (2012) Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol.* **22**, 1–13
 32. Sen, A., Acosta-Sampson, L., Alvaro, C. G., Ahn, J. S., Cate, J. H. D., and Thorner, J. (2016) Internalization of heterologous sugar transporters by endogenous α -arrestins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 7074–7085
 33. Lu, R., Drubin, D. G., and Sun, Y. (2016) Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 1531–1536
 34. Tang, H. Y., Munn, A., and Cai, M. (1997) EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4294–4304
 35. Wendland, B., and Emr, S. D. (1998) Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J. Cell Biol.* **141**, 71–84
 36. Duncan, M. C., Jamie, M., Cope, T. V., Goode, B. L., Wendland, B., and Drubin, D. G. (2001) Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 687–90
 37. Toshima, J., Toshima, J. Y., Duncan, M. C., Cope, M. J. T. V., Sun, Y., Martin, A. C., Anderson, S., Yates, J. R., Mizuno, K., and Drubin, D. G. (2007) Negative regulation of yeast Eps15-like Arp2/3 complex activator, Pan1p, by the Hip1R-related protein, Sla2p, during endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 658–668
 38. Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Li, R., and Winsor, B. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7889–7906
 39. Rodal, A. A., Manning, A. L., Goode, B. L., and Drubin, D. G. (2003) Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins. *Curr. Biol.* **13**, 1000–1008
 40. Boettner, D. R., D'Agostino, J. L., Torres, O. T., Daugherty-Clarke, K., Uygur, A., Reider, A., Wendland, B., Lemmon, S. K., and Goode, B. L. (2009) The F-BAR protein Syp1 negatively regulates WASp-Arp2/3 complex activity during endocytic patch formation. *Curr. Biol.* **19**, 1979–1987

41. Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*. **123**, 305–320
42. Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M., and Briggs, J. A. G. (2012) Plasma membrane reshaping during endocytosis is revealed by time-resolved electron tomography. *Cell*. **150**, 508–520
43. Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A., and Stevens, T. H. (1992) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: Evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol. Biol. Cell*. **3**, 1389–1402
44. Darsow, T., Katzmann, D. J., Cowles, C. R., and Emr, S. D. (2001) Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. *Mol. Biol. Cell*. **12**, 37–51
45. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., and Emr, S. D. (2011) The ESCRT Pathway. *Dev. Cell*. **21**, 77–91
46. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev. Biochem.* **61**, 761–807
47. Komander, D., and Rape, M. (2012) The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229
48. Husnjak, K., and Dikic, I. Ubiquitin-binding proteins: Decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 291–322
49. Yau, R., and Rape, M. (2016) The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat. Cell Biol.* **18**, 579–86
50. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. **419**, 135–141
51. Freudenthal, B. D., Gakhar, L., Ramaswamy, S., and Washington, M. T. (2010) Structure of monoubiquitinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 479–484
52. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 461–466
53. Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*. **243**, 1576–1583
54. Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. **315**, 201–205
55. Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., and Hicke, L. (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell*. **1**, 193–202
56. Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of

- ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. **458**, 445–452
57. Ren, X., and Hurley, J. H. (2010) VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J.* **29**, 1045–1054
 58. Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. I., and Chen, Z. J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. **412**, 346–351
 59. Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. **103**, 351–361
 60. Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., and Lukas, C. (2009) RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*. **136**, 435–446
 61. Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., Oldreive, C., Wildenhain, J., Tagliaferro, A., Pelletier, L., Taubenheim, N., Durandy, A., Byrd, P. J., Stankovic, T., Taylor, A. M. R., and Durocher, D. (2009) The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*. **136**, 420–434
 62. Elia, A. E. H., Boardman, A. P., Wang, D. C., Huttlin, E. L., Everley, R. A., Dephoure, N., Zhou, C., Koren, I., Gygi, S. P., and Elledge, S. J. (2015) Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response. *Mol. Cell*. **59**, 867–881
 63. Ordureau, A., Sarraf, S. A., Duda, D. M., Heo, J. M., Jedrychowski, M. P., Sviderskiy, V. O., Olszewski, J. L., Koerber, J. T., Xie, T., Beausoleil, S. A., Wells, J. A., Gygi, S. P., Schulman, B. A., and Harper, J. W. (2014) Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol. Cell*. **56**, 360–375
 64. Durcan, T. M., Tang, M. Y., Pérusse, J. R., Dashti, E. A., Aguilera, M. A., McLelland, G., Gros, P., Shaler, T. A., Faubert, D., Coulombe, B., and Fon, E. A. (2014) USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin. *EMBO J.* **33**, 2473–2491
 65. Cunningham, C. N., Baughman, J. M., Phu, L., Tea, J. S., Yu, C., Coons, M., Kirkpatrick, D. S., Bingol, B., and Corn, J. E. (2015) USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **17**, 160–169
 66. Hospenthal, M. K., Freund, S. M. V., and Komander, D. (2013) Assembly, analysis and architecture of atypical ubiquitin chains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 555–565
 67. Lin, D. Y. W., Diao, J., Zhou, D., and Chen, J. (2011) Biochemical and structural

- studies of a HECT-like ubiquitin ligase from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **286**, 441–449
68. Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008) Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell.* **133**, 653–665
 69. Matsumoto, M. L., Wickliffe, K. E., Dong, K. C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D. S., Hymowitz, S. G., Rape, M., Kelley, R. F., and Dixit, V. M. (2010) K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol. Cell.* **39**, 477–484
 70. Jin, S. M., and Youle, R. J. (2012) PINK1-and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 795–799
 71. Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M. G., Aebersold, R., and Penengo, L. (2015) RNF168 promotes noncanonical K27ubiquitination to signal DNA damage. *Cell Rep.* **10**, 226–238
 72. Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., Xu, X., Wang, H., Yang, M., Liu, X., Fan, L., Chen, S., Zhou, J., Sun, Y., Ruan, K., Cheng, S., Komatsu, M., White, E., Li, L., Ji, H., Finley, D., and Hu, R. (2014) Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell.* **26**, 106–120
 73. Johnson, E. S., Ma, P. C. M., Ota, I. M., and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* **270**, 17442–17456
 74. Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* **96**, 635–644
 75. Michel, M. A., Elliott, P. R., Swatek, K. N., Simicek, M., Pruneda, J. N., Wagstaff, J. L., Freund, S. M. V., and Komander, D. (2015) Assembly and specific recognition of K29- and K33-linked polyubiquitin. *Mol. Cell.* **58**, 95–109
 76. Kristariyanto, Y. A., Choi, S. Y., Rehman, S. A. A., Ritorto, M. S., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Toth, R., and Kulathu, Y. (2015) Assembly and structure of Lys33-linked polyubiquitin reveals distinct conformations. *Biochem. J.* **467**, 345–352
 77. Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., and Dikic, I. (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- κ B activation. *Cell.* **136**, 1098–1109
 78. Tokunaga, F., Sakata, S. I., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., and Iwai, K. (2009) Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B

- activation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 123–132
79. Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. (2006) A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.* **25**, 4877–4887
 80. Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J. D. F., Odenwaelder, P., Wilkinson, K. D., and Barford, D. (2009) Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep.* **10**, 466–473
 81. Wertz, I. E., Newton, K., Seshasayee, D., Kusam, S., Lam, C., Zhang, J., Popovych, N., Helgason, E., Schoeffler, A., Jeet, S., Ramamoorthi, N., Kategaya, L., Newman, R. J., Horikawa, K., Dugger, D., Sandoval, W., Mukund, S., Zindal, A., Martin, F., Quan, C., Tom, J., Fairbrother, W. J., Townsend, M., Warming, S., Devoss, J., Liu, J., Dueber, E., Caplazi, P., Lee, W. P., Goodnow, C. C., Balazs, M., Yu, K., Kolumam, G., and Dixit, V. M. (2015) Phosphorylation and linear ubiquitin direct A20 inhibition of inflammation. *Nature.* **528**, 370–375
 82. You, J., and Pickart, C. M. (2001) A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* **276**, 19871–19878
 83. Jin, J., Xie, X., Xiao, Y., Hu, H., Zou, Q., Cheng, X., and Sun, S. C. (2016) Epigenetic regulation of the expression of I112 and I123 and autoimmune inflammation by the deubiquitinase Trubid. *Nat. Immunol.* **17**, 259–268
 84. Grice, G. L., Lobb, I. T., Weekes, M. P., Gygi, S. P., Antrobus, R., and Nathan, J. A. (2015) The proteasome distinguishes between heterotypic and homotypic lysine-11-Linked polyubiquitin chains. *Cell Rep.* **12**, 545–553
 85. Meyer, H. J., and Rape, M. (2014) Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell.* **157**, 910–921
 86. Min, M., Mevissen, T. E. T., De Luca, M., Komander, D., and Lindon, C. (2015) Efficient APC/C substrate degradation in cells undergoing mitotic exit depends on K11 ubiquitin linkages. *Mol. Biol. Cell.* **26**, 4325–4332
 87. Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K. J. (2009) Ubiquitin-binding domains from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 659–671
 88. Bienko, M., Green, C. M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A. R., Hofmann, K., and Dikic, I. (2005) Biochemistry: ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science.* **310**, 1821–1824
 89. Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A. G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P. P., Polo, S., and Schneider, T. R. (2006) Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell.* **124**, 1183–1195
 90. Sloper-Mould, K. E., Jemc, J. C., Pickart, C. M., and Hicke, L. (2001) Distinct

- functional surface regions on ubiquitin. *J. Biol. Chem.* **276**, 30483–30489
91. Swatek, K. N., and Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399–422
 92. Ohtake, F., and Tsuchiya, H. (2017) The emerging complexity of ubiquitin architecture. *J. Biochem.* **161**, 125–133
 93. Herhaus, L., and Dikic, I. (2015) Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO Rep.* **16**, 1071–1083
 94. Ordureau, A., Münch, C., and Harper, J. W. (2015) Quantifying ubiquitin signaling. *Mol. Cell.* **58**, 660–676
 95. Ohtake, F., Saeki, Y., Sakamoto, K., Ohtake, K., Nishikawa, H., Tsuchiya, H., Ohta, T., Tanaka, K., and Kanno, J. (2015) Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *EMBO Rep.* **16**, 192–201
 96. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2563–2567
 97. Medkova, M., and Cho, W. (1998) Mutagenesis of the C2 domain of protein kinase C- α . Differential roles of Ca²⁺ ligands and membrane binding residues. *J. Biol. Chem.* **273**, 17544–17552
 98. Dunn, R., Klos, D. A., Adler, A. S., and Hicke, L. (2004) The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J. Cell Biol.* **165**, 135–144
 99. Wang, J., Peng, Q., Lin, Q., Childress, C., Carey, D., and Yang, W. (2010) Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J. Biol. Chem.* **285**, 12279–12288
 100. Klos Dehring, D. A., Adler, A. S., Hosseini, A., and Hicke, L. (2008) A C-terminal sequence in the guanine nucleotide exchange factor Sec7 mediates Golgi association and interaction with the Rsp5 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **283**, 34188–96
 101. Sudol, M. (1996) Structure and function of the WW domain. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **65**, 113–132
 102. Macias, M. J., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., and Oschkinat, H. (1996) Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature.* **382**, 646–649
 103. Bedford, M. T., Sarbassova, D., Xu, J., Leder, P., and Yaffe, M. B. (2000) A novel Pro-Arg motif recognized by WW domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 10359–10369
 104. Lu, P.-J., Zhen Zhou, X., Shen, M., and Ping Lu, K. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science.* **283**, 1325–8
 105. Tofaris, G. K., Kim, H. T., Hourez, R., Jung, J. W., Kim, K. P., and Goldberg, A. L. (2011) Ubiquitin ligase Nedd4 promotes α -synuclein degradation by the

- endosomal-lysosomal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17004–17009
106. Morales, B., Ramirez-Espain, X., Shaw, A. Z., Martin-Malpartida, P., Yraola, F., Sánchez-Tilló, E., Farrera, C., Celada, A., Royo, M., and Macias, M. J. (2007) NMR structural studies of the ItchWW3 domain reveal that phosphorylation at T30 inhibits the interaction with PPxY-containing ligands. *Structure*. **15**, 473–483
 107. Watanabe, D., Murai, H., Tanahashi, R., Nakamura, K., Sasaki, T., and Takagi, H. (2015) Cooperative and selective roles of the WW domains of the yeast Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5 in the recognition of the arrestin-like adaptors Bull1 and Bul2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 76–81
 108. Watcharawipas, A., Watanabe, D., and Takagi, H. (2017) Enhanced sodium acetate tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by the Thr255Ala mutation of the ubiquitin ligase Rsp5. *FEMS Yeast Res.* **17**, 83
 109. Wijayanti, I., Watanabe, D., Oshiro, S., and Takagi, H. (2015) Isolation and functional analysis of yeast ubiquitin ligase Rsp5 variants that alleviate the toxicity of human α -synuclein. *J. Biochem.* **157**, 251–260
 110. Wang, G., Yang, J., and Huibregtse, J. M. (1999) Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 342–352
 111. Nishimura, A., Tanahashi, R., and Takagi, H. (2020) The yeast α -arrestin Art3 is a key regulator for arginine-induced endocytosis of the high-affinity proline transporter Put4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **531**, 416–421
 112. Fang, N. N., Chan, G. T., Zhu, M., Comyn, S. A., Persaud, A., Deshaies, R. J., Rotin, D., Gsponer, J., and Mayor, T. (2014) Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heat stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1227–1237
 113. Jastrzebska, Z., Kaminska, J., Chelstowska, A., Domanska, A., Rzepnikowska, W., Sitkiewicz, E., Cholbinski, P., Gourlay, C., Plochocka, D., and Zoladek, T. (2015) Mimicking the phosphorylation of Rsp5 in PKA site T761 affects its function and cellular localization. *Eur. J. Cell Biol.* **94**, 576–588
 114. Sasaki, T., and Takagi, H. (2013) Phosphorylation of a conserved Thr357 in yeast Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5 is involved in down-regulation of the general amino acid permease Gap1. *Genes to Cells*. **18**, 459–475
 115. Attali, I., Tobelaim, W. S., Persaud, A., Motamedchaboki, K., Simpson-Lavy, K. J., Mashahreh, B., Levin-Kravets, O., Keren-Kaplan, T., Pilzer, I., Kupiec, M., Wiener, R., Wolf, D. A., Rotin, D., and Prag, G. (2017) Ubiquitylation-dependent oligomerization regulates activity of Nedd4 ligases. *EMBO J.* **36**, 425–440
 116. Kee, Y., Lyon, N., and Huibregtse, J. M. (2005) The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J.* **24**, 2414–2424
 117. Lam, M. H. Y., and Emili, A. (2013) Ubp2 Regulates Rsp5 Ubiquitination Activity In

Vivo and In Vitro. *PLoS One*. **8**, e75372

118. Ho, H. C., MacGurn, J. A., and Emr, S. D. (2017) Deubiquitinating enzymes Ubp2 and Ubp15 regulate endocytosis by limiting ubiquitination and degradation of ARTs. *Mol. Biol. Cell*. **28**, 1271–1283
119. MacDonald, C., Shields, S. B., Williams, C. A., Winistorfer, S., and Piper, R. C. (2020) A cycle of ubiquitination regulates adaptor function of the Nedd4-family ubiquitin ligase Rsp5. *Curr. Biol*. **30**, 465-479.e5
120. Fang, N. N., Zhu, M., Rose, A., Wu, K. P., and Mayor, T. (2016) Deubiquitinase activity is required for the proteasomal degradation of misfolded cytosolic proteins upon heat-stress. *Nat. Commun*. **7**, 1–16
121. Shcherbik, N., Zoladek, T., Nickels, J. T., and Haines, D. S. (2003) Rsp5p is required for ER bound Mga2p120 polyubiquitination and release of the processed/tethered transactivator Mga2p90. *Curr. Biol*. **13**, 1227–1233
122. Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2001) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Chemtracts*. **14**, 148–151
123. Shcherbik, N., and Haines, D. S. (2007) Cdc48p (Npl4p/Ufd1p) binds and segregates membrane-anchored/tethered complexes via a polyubiquitin signal present on the anchors. *Mol. Cell*. **25**, 385–397
124. Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., and Jentsch, S. (2001) Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48 (UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell*. **107**, 667–677
125. Dunn, R., and Hicke, L. (2001) Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell*. **12**, 421–35
126. Lauwers, E., Grossmann, G., and André, B. (2007) Evidence for coupled biogenesis of yeast Gap1 permease and sphingolipids: essential role in transport activity and normal control by ubiquitination. *Mol. Biol. Cell*. **18**, 3068–3080
127. Merhi, A., and André, B. (2012) Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors. *Mol. Biol. Cell*. **32**, 4510–22
128. Shiga, T., Yoshida, N., Shimizu, Y., Suzuki, E., Sasaki, T., Watanabe, D., and Takagi, H. (2014) Quality control of plasma membrane proteins by *Saccharomyces cerevisiae* Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5p under environmental stress conditions. *Eukaryot. Cell*. **13**, 1191–1199
129. Lin, C. H., MacGurn, J. A., Chu, T., Stefan, C. J., and Emr, S. D. (2008) Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*. **135**, 714–725
130. Nikko, E., and Pelham, H. R. B. (2009) Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma

- membrane transporters. *Traffic*. **10**, 1856–1867
131. Guiney, E. L., Klecker, T., and Emr, S. D. (2016) Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex. *Mol. Biol. Cell*. **27**, 4043–4054
 132. Busto, J. V., Elting, A., Haase, D., Spira, F., Kuhlman, J., Schäfer-Herte, M., and Wedlich-Söldner, R. (2018) Lateral plasma membrane compartmentalization links protein function and turnover. *EMBO J*. **37**, e99473
 133. Hovsepian, J., Defenouillère, Q., Albanèse, V., Váchová, L., Garcia, C., Palková, Z., and Léon, S. (2017) Multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls hexose transporter endocytosis. *J. Cell Biol*. **216**, 1811–1831
 134. O'donnell, A. F., and Schmidt, M. C. (2019) AMPK-mediated regulation of alpha-arrestins and protein trafficking. *Int. J. Mol. Sci*. **20**, 515
 135. Jochem, M., Ende, L., Isasa, M., Ang, J., Schnell, H., Guerra-Moreno, A., Micoogullari, Y., Bhanu, M., Gygi, S. P., and Hanna, J. (2019) Targeted degradation of glucose transporters protects against arsenic toxicity. *Mol. Cell. Biol*. **39**, e00559–18
 136. Erpapazoglou, Z., Dhaoui, M., Pantazopoulou, M., Giordano, F., Mari, M., Léon, S., Raposo, G., Reggiori, F., and Haguenaer-Tsapis, R. (2012) A dual role for K63-linked ubiquitin chains in multivesicular body biogenesis and cargo sorting. *Mol. Biol. Cell*. **23**, 2170–2183
 137. Kim, H. C., and Huibregtse, J. M. (2009) Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol. Cell. Biol*. **29**, 3307–3318
 138. Stawiecka-Mirota, M., Pokrzywa, W., Morvan, J., Zoladek, T., Haguenaer-Tsapis, R., Urban-Grimal, D., and Morsomme, P. (2007) Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation. *Traffic*. **8**, 1280–1296
 139. Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N. J., Parkinson, J., and Rotin, D. (2007) Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol. Syst. Biol*. **3**, 116
 140. Lu, J. Y., Lin, Y. Y., Qian, J., Tao, S. C., Zhu, J., Pickart, C., and Zhu, H. (2008) Functional dissection of a HECT ubiquitin E3 ligase. *Mol. Cell. Proteomics*. **7**, 35–45
 141. Dores, M. R., Schnell, J. D., Maldonado-Baez, L., Wendland, B., and Hicke, L. (2010) The function of yeast Epsin and Ede1 ubiquitin-binding domains during receptor internalization. *Traffic*. **11**, 151–160
 142. Stamenova, S. D., Dunn, R., Adler, A. S., and Hicke, L. (2004) The Rsp5 ubiquitin ligase binds to and ubiquitinates members of the yeast CIN85-endophilin complex, Sla1-Rvs167. *J. Biol. Chem*. **279**, 16017–25
 143. Ossareh-Nazari, B., Cohen, M., and Dargemont, C. (2010) The Rsp5 ubiquitin ligase and the AAA-ATPase Cdc48 control the ubiquitin-mediated degradation of the COPII

- component Sec23. *Exp. Cell Res.* **316**, 3351–3357
144. Jarmoszewicz, K., Łukasiak, K., Riezman, H., and Kaminska, J. (2012) Rsp5 ubiquitin ligase is required for protein trafficking in *Saccharomyces cerevisiae* COPI mutants. *PLoS One.* **7**, e39582
 145. Morvan, J., Froissard, M., Haguenaer-Tsapis, R., and Le Urban-Grimal, D. (2004) The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies. *Traffic.* **5**, 383–92
 146. Macgurn, J. A., Hsu, P. C., and Emr, S. D. (2012) Ubiquitin and membrane protein turnover: From cradle to grave. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 231–59
 147. Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (2010) The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* **20**, 196–204
 148. MacDonald, C., Stringer, D. K., and Piper, R. C. (2012) Sna3 is an Rsp5 adaptor protein that relies on ubiquitination for its MVB sorting. *Traffic.* **13**, 586–598
 149. Hettema, E. H., Valdez-Taubas, J., and Pelham, H. R. B. (2004) Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J.* **23**, 1279–1288
 150. Wang, S., Thibault, G., and Ng, D. T. W. (2011) Routing misfolded proteins through the multivesicular body (MVB) pathway protects against proteotoxicity. *J. Biol. Chem.* **286**, 29376–29387
 151. Li, M., Rong, Y., Chuang, Y. S., Peng, D., and Emr, S. D. (2015) Ubiquitin-dependent lysosomal membrane protein sorting and degradation. *Mol. Cell.* **57**, 467–478
 152. Sardana, R., Zhu, L., and Emr, S. D. (2019) Rsp5 ubiquitin ligase-mediated quality control system clears membrane proteins mistargeted to the vacuole membrane. *J. Cell Biol.* **218**, 234–250
 153. Fang, N. N., Chan, G. T., Zhu, M., Comyn, S. A., Persaud, A., Deshaies, R. J., Rotin, D., Gsponer, J., and Mayor, T. (2014) Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heat stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1227–37
 154. Ali, M., Chernova, T. A., Newnam, G. P., Yin, L., Shanks, J., Karpova, T. S., Lee, A., Laur, O., Subramanian, S., Kim, D., McNally, J. G., Seyfried, N. T., Chernoff, Y. O., and Wilkinson, K. D. (2014) Stress-dependent proteolytic processing of the actin assembly protein LSB1 modulates a yeast prion. *J. Biol. Chem.* **289**, 27625–27639
 155. Shcherbik, N., and Pestov, D. G. (2011) The ubiquitin ligase Rsp5 is required for ribosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* **17**, 1422–1428
 156. Kraft, C., and Peter, M. (2008) Is the Rsp5 ubiquitin ligase involved in the regulation of ribophagy? *Autophagy.* **4**, 838–840
 157. Kowalski, L., Bragoszewski, P., Khmelinskii, A., Glow, E., Knop, M., and Chacinska, A. (2018) Determinants of the cytosolic turnover of mitochondrial intermembrane space proteins. *BMC Biol.* **16**, 1–22

158. Cholbinski, P., Jastrzebska, Z., Wysocka-Kapcinska, M., Plochocka, D., Gornicka, A., Hopper, A. K., and Zoladek, T. (2011) Yeast ubiquitin ligase Rsp5 contains nuclear localization and export signals. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 834–843
159. Huibregtse, J. M., Yang, J. C., and Beaudenon, S. L. (1997) The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3656–3661
160. Beaudenon, S. L., Huacani, M. R., Wang, G., McDonnell, D. P., and Huibregtse, J. M. (1999) Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6972–6979
161. Chang, A., Cheang, S., Espanel, X., and Sudol, M. (2000) Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **275**, 20562–20571
162. Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S. E., Banks, C. A. S., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Svejstrup, J. Q. (2009) Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20705–20710
163. Verma, R., Oania, R., Fang, R., Smith, G. T., and Deshaies, R. J. (2011) Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol. Cell.* **41**, 82–92
164. Neumann, S., Petfalski, E., Brügger, B., Grosshans, H., Wieland, F., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003) Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p. *EMBO Rep.* **4**, 1156–1162
165. Rodriguez, M. S., Gwizdek, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Dargemont, C. (2003) The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic.* **4**, 566–575
166. Haitani, Y., and Takagi, H. (2008) Rsp5 is required for the nuclear export of mRNA of HSF1 and MSN2/4 under stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells.* **13**, 105–116
167. Eyboulet, F., Jeronimo, C., Côté, J., and Robert, F. (2020) The deubiquitylase Ubp15 couples transcription to mRNA export. *Elife.* **9**, e61264
168. Turowski, T. W., and Tollervey, D. (2015) Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **6**, 129–139
169. Althelm, B. A., and Schultz, M. C. (1999) Histone modification governs the cell cycle regulation of a replication-independent chromatin assembly pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1345–1350
170. Arnason, T. G., Pisclevich, M. G., Dash, M. D., Davies, G. F., and Harkness, T. A. A. (2005) Novel interaction between Apc5p and Rsp5p in an intracellular signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* **4**, 134–146

171. Harkness, T. A. A., Davies, G. F., Ramaswamy, V., and Arnason, T. G. (2002) The ubiquitin-dependent targeting pathway in *Saccharomyces cerevisiae* plays a critical role in multiple chromatin assembly regulatory steps. *162*, 615–32
172. Frattini, C., Villa-Hernández, S., Pellicanò, G., Jossen, R., Katou, Y., Shirahige, K., and Bermejo, R. (2017) Cohesin ubiquitylation and mobilization facilitate stalled replication fork dynamics. *Mol. Cell.* **68**, 758–772.e4
173. Fisk, H. A., and Yaffe, M. P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **145**, 1199–1208
174. Żołądek, T., Tobiasz, A., Vaduva, G., Boguta, M., Martin, N. C., and Hopper, A. K. (1997) MDP1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial/cytoplasmic protein distribution, is identical to the ubiquitin-protein ligase gene *RSP5*. *Genetics.* **145**, 595–603
175. Belgareh-Touzé, N., Cavellini, L., and Cohen, M. M. (2017) Ubiquitination of ERMES components by the E3 ligase Rsp5 is involved in mitophagy. *Autophagy.* **13**, 114–132
176. Cavellini, L., Meurisse, J., Findinier, J., Erpapazoglou, Z., Belgareh-Touzé, N., Weissman, A. M., and Cohen, M. M. (2017) An ubiquitin-dependent balance between mitofusin turnover and fatty acids desaturation regulates mitochondrial fusion. *Nat. Commun.* **8**, 1–15
177. Goodrum, J. M., Lever, A. R., Coody, T. K., Gottschling, D. E., and Hughes, A. L. (2019) Rsp5 and Mdm30 reshape the mitochondrial network in response to age-induced vacuole stress. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 2141–2154
178. Wu, X., Li, L., and Jiang, H. (2016) Doa1 targets ubiquitinated substrates for mitochondria-associated degradation. *J. Cell Biol.* **213**, 49–63
179. Nikko, E., and Pelham, H. R. B. (2009) Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic.* **10**, 1856–1867
180. Baile, M. G., Guiney, E. L., Sanford, E. J., MacGurn, J. A., Smolka, M. B., and Emra, S. D. (2019) Activity of a ubiquitin ligase adaptor is regulated by disordered insertions in its arrestin domain. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 3057–3072
181. Becuwe, M., and Léon, S. (2014) Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *Elife.* **3**, e03307
182. MacDonald, C., Shields, S. B., Williams, C. A., Winistorfer, S., and Piper, R. C. (2020) A cycle of ubiquitination regulates adaptor function of the Nedd4-family ubiquitin ligase Rsp5. *Curr. Biol.* **30**, 465–479. e5.
183. Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenaer-Tsapis, R., and Belgareh-Touz, N. (2008) Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic.* **9**, 1372–1391
184. Nikko, E., Sullivan, J. A., and Pelham, H. R. B. (2008) Arrestin-like proteins mediate

- ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* **9**, 1216–1221
185. Savocco, J., Nootens, S., Afokpa, W., Bausart, M., Chen, X., Villers, J., Renard, H. F., Prévost, M., Wattiez, R., and Morsomme, P. (2019) Yeast α -arrestin Art2 is the key regulator of ubiquitylation-dependent endocytosis of plasma membrane vitamin B1 transporters. *PLoS Biol.* **17**, e3000512
186. Velivela, S. D., and Kane, P. M. (2018) Compensatory internalization of pma1 in V-ATPase mutants in *Saccharomyces cerevisiae* requires calcium- and glucose-sensitive phosphatases. *Genetics.* **208**, 655–672
187. Alvaro, C. G., O'Donnell, A. F., Prosser, D. C., Augustine, A. A., Goldman, A., Brodsky, J. L., Cyert, M. S., Wendland, B., and Thorner, J. (2014) Specific-arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2660–2681
188. Zhu, L., Sardana, R., Jin, D. K., and Emr, S. D. (2020) Calcineurin-dependent regulation of endocytosis by a plasma membrane ubiquitin ligase adaptor, Rcr1. *J. Cell Biol.* **219**, e201909158
189. Léon, S., Erpapazoglou, Z., and Haguenuer-Tsapis, R. (2008) Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 2379–2388
190. Sullivan, J. A., Lewis, M. J., Nikko, E., and Pelham, H. R. B. (2007) Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Rsp5 to membrane proteins *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 2429–2440
191. Stimpson, H. E. M., Lewis, M. J., and Pelham, H. R. B. (2006) Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *EMBO J.* **25**, 662–672
192. Sardana, R., and Emr, S. D. (2021) Membrane protein quality control mechanisms in the endo-lysosome system. *Trends Cell Biol.* S0962–8924 (20) 30246–4
193. Babst, M. (2020) Regulation of nutrient transporters by metabolic and environmental stresses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **65**, 35–41
194. Léon, S., and Teis, D. (2018) Functional patchworking at the plasma membrane. *EMBO J.* **37**, e100144
195. O'Donnell, A. F. (2012) The running of the Bulls: Control of permease trafficking by α -arrestins Bul1 and Bul2. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4506–4509
196. Lai, K., Bolognese, C. P., Swift, S., and McGraw, P. (1995) Regulation of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* involves inositol-induced changes in permease stability and endocytic degradation in the vacuole. *J. Biol. Chem.* **270**, 2525–2534
197. Hatakeyama, R., Kamiya, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2010) Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent

- recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5598–5607
198. Abdel-Sater, F., Iraqui, I., Urrestarazu, A., and André, B. (2004) The external amino acid signaling pathway promotes activation of Stp1 and Uga35/Dal81 transcription factors for induction of the *AGPI* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **166**, 1727–1739
 199. Eckert-Boulet, N., Larsson, K., Wu, B., Poulsen, P., Regenberg, B., Nielsen, J., and Kielland-Brandt, M. C. (2006) Deletion of *RTS1*, encoding a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, results in constitutive amino acid signaling via increased Stp1p processing. *Eukaryot. Cell.* **5**, 174–179
 200. Palavecino, M. D., Correa-García, S. R., and Bermúdez-Moretti, M. (2015) Genes of different catabolic pathways are coordinately regulated by Dal81 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Amino Acids*. **2015**, 1–8
 201. Schreve, J. L., Sin, J. K., and Garrett, J. M. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *YCC5* (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. *J. Bacteriol.* **180**, 2556–2559
 202. Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., de Craene, J. O., Boles, E., Urrestarazu, A., and André, B. (1999) Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGPI* Gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 989–1001
 203. Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C., and Holmberg, S. (1999) Substrate specificity and gene expression of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **36**, 317–328
 204. Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. **21**, 947–962
 205. Horák, J. (2003) The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: Insights from yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1614**, 139–155
 206. Andréasson, C., Neve, E. P. A., and Ljungdahl, P. O. (2004) Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast. *Yeast*. **21**, 193–199
 207. Villers, J., Savocco, J., Szopinska, A., Degand, H., Nootens, S., and Morsomme, P. (2017) Study of the plasma membrane proteome dynamics reveals novel targets of the nitrogen regulation in yeast. *Mol. Cell. Proteomics*. **16**, 1652–1668
 208. Springael, J.-Y., André, B., and Fink, G. R. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of

- the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **9**, 1253–1263
209. Zhu, X., Garrett, J., Schreve, J., and Michaeli, T. (1996) *GNPI*, the high affinity glutamine permease of *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* **30**, 107–114
210. Soetens, O., De Craene, J. O., and André, B. (2001) Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.* **276**, 43949–43957
211. Epp, E., Nazarova, E., Regan, H., Douglas, L. M., Konopka, J. B., Vogel, J., and Whiteway, M. (2013) Clathrin- and arp2/3-independent endocytosis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *MBio.* **4**, e00476–13
212. Gournas, C., Saliba, E., Krammer, E. M., Barthelemy, C., Prévost, M., and André, B. (2017) Transition of yeast Can1 transporter to the inward-facing state unveils an α -arrestin target sequence promoting its ubiquitylation and endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* **28**, 2819–2832
213. Talaia, G., Gournas, C., Saliba, E., Barata-Antunes, C., Casal, M., André, B., Diallinas, G., and Paiva, S. (2017) The α -arrestin Bull1p mediates lactate transporter endocytosis in response to alkalinization and distinct physiological signals. *J. Mol. Biol.* **429**, 3678–3695
214. Hovsepian, J., Albanèse, V., Becuwe, M., Ivashov, V., Teis, D., and León, S. (2018) The yeast arrestin-related protein Bull1 is a novel actor of glucose-induced endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* **29**, 1012–1020
215. MacGurn, J. A., Hsu, P. C., Smolka, M. B., and Emr, S. D. (2011) TORC1 regulates endocytosis via npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell.* **147**, 1104–1117
216. Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., and León, S. (2012) A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J. Cell Biol.* **196**, 247–259
217. O'Donnell, A. F., Huang, L., Thorner, J., and Cyert, M. S. (2013) A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6. *J. Biol. Chem.* **288**, 24063–24080
218. Cormerais, Y., Giuliano, S., LeFloch, R., Front, B., Durivault, J., Tambutté, E., Massard, P. A., De La Ballina, L. R., Endou, H., Wempe, M. F., Palacin, M., Parks, S. K., and Pouyssegur, J. (2016) Genetic disruption of the multifunctional CD98/LAT1 complex demonstrates the key role of essential amino acid transport in the control of mTORC1 and tumor growth. *Cancer Res.* **76**, 4481–4492
219. Park, Y. Y., Sohn, B. H., Johnson, R. L., Kang, M. H., Kim, S. B., Shim, J. J., Mangala, L. S., Kim, J. H., Yoo, J. E., Rodriguez-Aguayo, C., Pradeep, S., Hwang, J. E., Jang, H. J., Lee, H. S., Rupaimoole, R., Lopez-Berestein, G., Jeong, W., Park, I. S., Park, Y. N.,

- Sood, A. K., Mills, G. B., and Lee, J. S. (2016) Yes-associated protein 1 and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif activate the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway by regulating amino acid transporters in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **63**, 159–172
220. Krall, A. S., Xu, S., Graeber, T. G., Braas, D., and Christofk, H. R. (2016) Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. *Nat. Commun.* **7**, 1–13
221. Crapeau, M., Merhi, A., and André, B. (2014) Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like bul and aly proteins. *J. Biol. Chem.* **289**, 22103–22116
222. Mari, S., Ruetalo, N., Maspero, E., Stoffregen, M. C., Pasqualato, S., Polo, S., and Wiesner, S. (2014) Structural and functional framework for the autoinhibition of nedd4-family ubiquitin ligases. *Structure*. **22**, 1639–1649
223. Haitani, Y., Nakata, M., Sasaki, T., Uchida, A., and Takagi, H. (2009) Engineering of the yeast ubiquitin ligase Rsp5: Isolation of a new variant that induces constitutive inactivation of the general amino acid permease Gap1. *FEMS Yeast Res.* **9**, 73–86
224. Wang, G., McCaffery, J. M., Wendland, B., Dupré, S., Haguenaer-Tsapis, R., and Huibregtse, J. M. (2001) Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3564–3575
225. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P. P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*. **416**, 451–455
226. Claudio Aguilar, R., Watson, H. A., and Wendland, B. (2003) The yeast epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions. *J. Biol. Chem.* **278**, 10737–10743
227. Tardiff, D. F., Jui, N. T., Khurana, V., Tambe, M. A., Thompson, M. L., Yeun Chung, C., Kamadurai, H. B., Tae Kim, H., Lancaster, A. K., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Rochet, J.-C., Buchwald, S. L., and Lindquist, S. (2013) Yeast reveal a “druggable” Rsp5/Nedd4 Network that Ameliorates α -Synuclein Toxicity in Neurons, *Science*. **342**, 979-83
228. Lu, K., Psakhye, I., and Jentsch, S. (2014) Autophagic clearance of PolyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell*. **158**, 549–563
229. Kayatekin, C., Amasino, A., Gaglia, G., Flannick, J., Bonner, J. M., Fanning, S., Narayan, P., Barrasa, M. I., Pincus, D., Landgraf, D., Nelson, J., Hesse, W. R., Costanzo, M., Myers, C. L., Boone, C., Florez, J. C., and Lindquist, S. (2018) Translocon declogger Ste24 protects against IAPP oligomer-induced proteotoxicity. *Cell*. **173**, 62-73.e9

230. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**, 837–848
231. Owsianik, G., Balzi, L., and Ghislain, M. (2002) Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1295–1308
232. Bénédetti, H., Raths, S., Crausaz, F., and Riezman, H. (1994) The *END3* gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 1023–1037
233. Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999) Agp7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 1367–1379
234. Woolford, C. A., Daniels, L. B., Park, F. J., Jones, E. W., Van Arsdell, J. N., and Innis, M. A. (1986) The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2500–2510
235. Ungermann, C., and Wickner, W. (1998) Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion. *EMBO J.* **17**, 3269–3276
236. Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M., and Emr, S. D. (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4936–4948
237. Meriin, A. B., Zhang, X., Miliaras, N. B., Kazantsev, A., Chernoff, Y. O., McCaffery, J. M., Wendland, B., and Sherman, M. Y. (2003) Aggregation of expanded polyglutamine domain in yeast leads to defects in endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7554–7565
238. Rajakumar, T., Munkacsy, A. B., and Sturley, S. L. (2017) Exacerbating and reversing lysosomal storage diseases: From yeast to humans. *Microb. Cell.* **4**, 278–293
239. Yu, A., Fox, S. G., Cavallini, A., Kerridge, C., O’Neill, M. J., Wolak, J., Bose, S., and Morimoto, R. I. (2019) Tau protein aggregates inhibit the protein-folding and vesicular trafficking arms of the cellular proteostasis network. *J. Biol. Chem.* **294**, 7917–7930
240. Liu, G., Coyne, A. N., Pei, F., Vaughan, S., Chaung, M., Zarnescu, D. C., and Buchan, J. R. (2017) Endocytosis regulates TDP-43 toxicity and turnover. *Nat. Commun.* **8**, 2092
241. Tariq, A., Lin, J. B., Jackrel, M. E., Hesketh, C. D., Carman, P. J., Mack, K. L., Weitzman, R., Gambogi, C., Hernandez Murillo, O. A., Sweeny, E. A., Gurpinar, E., Yokom, A. L., Gates, S. N., Yee, K., Sudesh, S., Stillman, J., Rizo, A. N., Southworth, D. R., and Shorter, J. (2019) Mining disaggregase sequence space to safely counter

- TDP-43, FUS, and α -synuclein proteotoxicity. *Cell Rep.* **28**, 2080-2095.e6
242. Tkach, J. M., and Glover, J. R. (2004) Amino acid substitutions in the C-terminal AAA+ module of Hsp104 prevent substrate recognition by disrupting oligomerization and cause high temperature inactivation. *J. Biol. Chem.* **279**, 35692–35701
243. Duran, E. C., Weaver, C. L., and Lucius, A. L. (2017) Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: Common threads and disparate functions. *Front. Mol. Biosci.* **4**, 54
244. March, Z. M., Mack, K. L., and Shorter, J. (2019) AAA+ protein-based technologies to counter neurodegenerative disease. *Biophys. J.* **116**, 1380–1385
245. Cascella, R., Fani, G., Capitini, C., Rusmini, P., Poletti, A., Cecchi, C., and Chiti, F. (2017) Quantitative assessment of the degradation of aggregated TDP-43 mediated by the ubiquitin proteasome system and macroautophagy. *FASEB J.* **31**, 5609–5624
246. Wang, X., Fan, H., Ying, Z., Li, B., Wang, H., and Wang, G. (2010) Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci. Lett.* **469**, 112–116
247. Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., Tanaka, K., Yamazaki, M., Abe, M., Misawa, H., Sakimura, K., Ito, H., and Takahashia, R. (2012) Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 42984–42994
248. Scotter, E. L., Vance, C., Nishimura, A. L., Lee, Y. B., Chen, H. J., Urwin, H., Sardone, V., Mitchell, J. C., Rogelj, B., Rubinsztein, D. C., and Shaw, C. E. (2014) Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J. Cell Sci.* **127**, 1263–1278
249. Seyfried, N. T., Gozal, Y. M., Dammer, E. B., Xia, Q., Duong, D. M., Cheng, D., Lah, J. J., Levey, A. I., and Peng, J. (2010) Multiplex SILAC analysis of a cellular TDP-43 proteinopathy model reveals protein inclusions associated with SUMOylation and diverse polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Proteomics.* **9**, 705–718
250. Hebron, M. L., Lonskaya, I., Sharpe, K., Weerasinghe, P. P. K., Algarzae, N. K., Shekoyan, A. R., and Moussa, C. E. H. (2013) Parkin ubiquitinates tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6). *J. Biol. Chem.* **288**, 4103–4115
251. Leibiger, C., Deisel, J., Aufschnaiter, A., Ambros, S., Tereshchenko, M., Verheijen, B. M., Büttner, S., and Braun, R. J. (2018) TDP-43 controls lysosomal pathways thereby determining its own clearance and cytotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 1593–1607
252. Liu, G., Byrd, A., Warner, A. N., Pei, F., Basha, E., Buchanan, A., and Buchan, J. R. (2020) Cdc48/VCP and endocytosis regulate TDP-43 and FUS toxicity and turnover. *Mol. Cell. Biol.* **40**, e00256-19
253. Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., Florens, L., and Li, R.

- (2017) Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature*. **543**, 443–446
254. Hill, S. M., Hao, X., Grönvall, J., Spikings-Nordby, S., Widlund, P. O., Amen, T., Jörhov, A., Josefson, R., Kaganovich, D., Liu, B., and Nyström, T. (2016) Asymmetric inheritance of aggregated proteins and age reset in yeast are regulated by Vac17-dependent vacuolar functions. *Cell Rep.* **16**, 826–838
255. Samant, R. S., Livingston, C. M., Sontag, E. M., and Frydman, J. (2018) Distinct proteostasis circuits cooperate in nuclear and cytoplasmic protein quality control. *Nature*. **563**, 407–411