

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 による異常タンパク質分解機構の解析とその応用

高木 博史

(福井県立大学生物資源学部 生物資源学科)

研究の目的

酵母は、発酵生産環境において低温、凍結、乾燥、酸化、高浸透圧、高アルコール濃度、偏栄養など様々なストレスを受けるため、細胞内タンパク質中の非共有結合が切断され、表面に疎水性アミノ酸が露出して正常な構造や機能を失った異常タンパク質が生成し、有用機能の発現が著しく制限される。我々は、酵母を材料にストレスによって生じる細胞内の異常タンパク質の検知処理および生成回避の分子機構を解析している¹⁾⁻⁹⁾。これまでにタンパク質合成の際にプロリンと競合して取り込まれ、異常タンパク質を生成させるアゼチジン-2-カルボン酸に対して超感受性を示す変異株を分離した。この株では、酵母のHECT型ユビキチンリガーゼRsp5のWW3ドメイン内に変異(Ala401Glu)があり、細胞内タンパク質のミスフォールディングを誘導し、異常タンパク質を生成するストレス(完全培地での高温培養、熱ショック処理、過酸化水素・エタノール・塩化リチウム・アミノ酸アナログなどの添加培地での培養)に対しても感受性を示した。

ユビキチンリガーゼRsp5は、ユビキチンシステムにおいて標的タンパク質にユビキチンを結合する重要な酵素である。これらの結果から、我々はRsp5の新しい機能として、ストレスで細胞内に生じる異常タンパク質の選択的分解への関与を提唱している⁵⁾。

そこで本研究では、ストレスで生じる異常タンパク質の1)分解機構、および2)修復機構に着目し、両機構におけるRsp5の機能を解析した。

方法

1) 分解機構

Rsp5は様々なストレス条件下でユビキチンリガーゼとして機能すると考えられるが、その標的異常タンパク質基質は不明である。そこで、ストレス条件下でRsp5によってユビキチン化される異常タンパク質基質を同定するために、野生株とRsp5変異株のプロテオーム解析を行った。また、その解析結果から得られた候補タンパク質基質とRsp5の相互作用を酵母ツ-ハイブリッドアッセイにより確認した。

2) 修復機構

Rsp5がheat shock proteinなどストレスタンパク質の誘導に及ぼす影響について解析した。ストレスタンパク質の遺伝子として、転写調節因子Hsf1が結合するHSEを有するHSP42、Msn2/4が結合するSTREを有するDDR2、HSEとSTREを有するHSP12を用いた。各遺伝子上流約500bpを-ガラクトシダーゼ遺伝子に連結したプラスミドを構築後、野生株とRsp5変異株に導入した。各形質転換体を完全培地で培養後、エタノール(終濃度9%)を添加し、レポーターアッセイやノーザン解析、さらにマイクロアレイ解析によ

って各遺伝子の転写量を比較した。

結果

1) 分解機構

プロテオーム解析の結果、完全培地での高温（37℃）培養、エタノール含有培地での培養などのストレス条件下において Rsp5 変異株には、野生株と比較してストレスタンパク質（Hsp12, Sug2, Sod1 など）が蓄積していた。一方、ツーハイブリッドアッセイでは、今回得られたほとんどのストレスタンパク質基質は野生型および変異型 Rsp5 と相互作用していた。

これらの結果から、ストレスタンパク質がストレスによって誘導されるだけでなく、その一部はストレスによって異常タンパク質となって細胞内に蓄積するものと考えられた。また、これら異常タンパク質は Rsp5 の WW3 以外のドメインと相互作用し、ユビキチン化された後、プロテアソームまたは液胞で選択的に分解されることが示唆された。

2) 修復機構

レポーターアッセイの結果、エタノールストレス条件下において Rsp5 変異株では野生株に比べて各遺伝子の転写量が低く、Rsp5 がストレスタンパク質の転写に関与することが示された。また、完全培地での高温培養、1M ソルビトールによる浸透圧ストレスにおいても同様の結果が得られた。さらに、これらのストレスタンパク質を Rsp5 変異株で過剰に発現させると、様々なストレス感受性を相補した。

これらの結果から、ストレスによって生成、蓄積すると考えられる異常タンパク質の処理には、Rsp5 による分解系とストレスタンパク質による修復系が相乗的に作用していると考えられた。また、Rsp5 の新しい機能として、転写調節因子のユビキチン化を介してストレスタンパク質遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。現在、Rsp5 が Hsf1 や Msn2/4 に及ぼす影響（ユビキチン化など）を調べている。

結論

以上の結果から、各ストレスによって細胞内に生成、蓄積すると考えられる異常タンパク質の処理には、Rsp5 による分解機構とストレスタンパク質による修復機構が相乗的に作用すると考えられた。また、ストレスにおける Rsp5 の新しい機能として、転写調節因子（Hsf1, Msn2/4）のユビキチン化を介してストレスタンパク質遺伝子の発現を調節している可能性が示された。

文献

- 1) H. Takagi, K. Sakai, K. Morida and S. Nakamori: Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103-108 (2000).
- 2) M. Shichiri, C. Hoshikawa, S. Nakamori and H. Takagi: A novel acetyltransferase found in *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b that detoxifies a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid.

- J. Biol. Chem.*, **276**, 41998-42002 (2001).
- 3) Y. Morita, S. Nakamori and H. Takagi: Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 390-394 (2002).
 - 4) Y. Morita, S. Nakamori and H. Takagi: L-Proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding γ -glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212-219 (2003).
 - 5) C. Hoshikawa, M. Shichiri, S. Nakamori and H. Takagi: A non-conserved Ala401 in the yeast Rsp5 ubiquitin ligase is involved in degradation of Gap1 permease and stress-induced abnormal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 11505-11510 (2003).
 - 6) Y. Terao, S. Nakamori and H. Takagi: Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6527-6532 (2003).
 - 7) M. Nomura and H. Takagi: Role of the yeast novel acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 12616-12621 (2004).
 - 8) X. Du and H. Takagi: N-Acetyltransferase Mpr1 conferred freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *J. Biochem.*, in press.
 - 9) K. Matsuura and H. Takagi: Vacuolar functions are involved in stress-protective effect of intracellular proline on *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, in press.