

2015 年度

博士学位申請論文

(要約)

出芽酵母アミノ酸輸送体の
細胞内品質管理機構に関する研究

Studies on intracellular quality control of amino acid
permeases in *Saccharomyces cerevisiae*

指導教員 阿部文快 教授

青山学院大学大学院

理工学研究科

理工学専攻生命科学コース

望月 貴博

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は醸造やパン作りに欠かせない有用微生物だが、生命現象の基本的な分子機構がヒトとの間で保存されていることから、真核生物のモデルとして広く研究に利用されている。アミノ酸輸送体によるアミノ酸の取り込みも酵母とヒトが共通して持つ仕組みであり、全ての従属栄養生物において必須な機能である。酵母にはアミノ酸輸送体がホモログとあわせて 24 種類存在し、ほとんどが 12 回膜貫通型と予測されている。小胞体で合成されたアミノ酸輸送体はゴルジ体を経て細胞膜へと運ばれる。しかし、新生タンパク質はしばしば折りたたみに失敗し、異常タンパク質となって小胞体に蓄積することがある。その際には、小胞体関連分解 (Endoplasmic reticulum associated degradation; ERAD) や小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response; UPR) というシステムが働き、蓄積した異常タンパク質の除去やストレス応答遺伝子の発現を誘起する。また、タンパク質が正常に折りたたまれてもストレスによって構造が異常となり、ユビキチンシステムによって分解される場合もある。

異常タンパク質の除去にはこうした機構が重要な役割を果たしているが、細胞がどのようにしてそれらを認識しているのかは不明である。そこで本研究では、酵母の高親和性トリプトファン輸送体 Tat2 と低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 という 2 種類のアミノ酸輸送体に着目し、ERAD と UPR およびユビキチンシステムによる細胞内の品質管理機構の解明を目指して研究を行った。

第 1 章 Tat2-Gap1 キメラタンパク質は小胞体ストレス応答を引き起こす

酵母を用いた ERAD 研究は、小胞体蓄積した異常タンパク質としてごく少数のモデル基質を用いた解析にとどまっている。明確な構造的特徴を持たない様々な異常タンパク質を、ERAD システムがどのようにして見分けているのか明らかにするには、多様な ERAD 基質を用いることが重要である。第 1 章では、Tat2 のトリプトファン認識に不可欠な膜貫通領域 (Transmembrane domain; TMD) を同定する過程で、Tat2 の TMD を総アミノ酸輸送体 Gap1 の TMD とシャッフリングしキメラ輸送体を作製した。このとき、TMD10 あるいは TMD11 を入れ換えた Tat2-Gap1 キメラタンパク質が巨大なクラスターを形成し、小胞体中に蓄積することを見いだした。そこで、小胞体蓄積したこれらのキメラタンパク質が ERAD の基質になり得るのか、また UPR を誘起するかどうかについて検討した。

Tat2 と Gap1 の TMD は膜貫通領域の予測プログラム HMMTOP (Prediction of transmembrane helices and topology of proteins Version. 2.0; <http://www.enzim.hu/hmmtop/>) を用いて予測し、PCR によるシャッフリングでキメラ輸送体プラスミドを作製した。tat2 破壊株は低トリプトファン培地で増殖できないため、これを相補するかどうかでキメラ輸送体の活性を評価した。まず TMD を大きく 3 つに分け、Tat2 の TMD1~4、5~8 および 9~12 番目をそれぞれ Gap1 の TMD と入

れ換えた。その結果、全てのキメラ体でトリプトファンの取り込み能が消失、または低下していた。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを投与後、ウェスタンブロッティングを行ったところ、TMD9-12 置換体において特に顕著な蓄積と分解遅延が認められた。そこで次に、9~12 番目の TMD を一つずつ入れ換えたキメラ体 Tat2^{TMD9G}、Tat2^{TMD10G}、Tat2^{TMD11G} および Tat2^{TMD12G} の機能と発現レベルを調べた。その結果、やはりいずれの発現株も低トリプトファン培地では増殖しなかった。しかし多コピーベクターを用いたところ、Tat2^{TMD9G} と Tat2^{TMD12G} 発現株では増殖が確認された。従って、これらは少なくとも一部は細胞膜に輸送され活性を有するものと考えられた。また、これらは野生型 Tat2 と同程度の速度で分解され、さらに液胞内プロテアーゼ Pep4 の欠損株では分解されなかったことから、野生型 Tat2 と同様に液胞分解されるものと考えられた。ところが Tat2^{TMD10G} と Tat2^{TMD11G} では、それらの高発現株も低トリプトファン培地では増殖せず、取り込み活性が完全に消失していた。Tat2^{TMD10G} と Tat2^{TMD11G} は細胞内に多量に蓄積し、シクロヘキシミド投与後わずかに分解された。それらの分解は Pep4 の欠損株でも認められたが、ERAD 経路のユビキチン結合酵素 Ubc6 と Ubc7 の二重欠損株では抑制されていた。以上の結果は、Tat2^{TMD10G} と Tat2^{TMD11G} が液胞ではなく ERAD 経路で分解される可能性を示唆している。すなわち TMD10 あるいは TMD11 の入れ換えが Tat2 のフォールディング異常を引き起こし、小胞体蓄積を誘起したものと考えられる。実際、蛍光顕微鏡下で観察したところ、野生型 Tat2-GFP、Tat2^{TMD9G}-GFP および Tat2^{TMD12G}-GFP は細胞膜に局在し、Tat2^{TMD10G}-GFP と Tat2^{TMD11G}-GFP は小胞体に蓄積していることが確認された。

小胞体に蓄積した Tat2-Gap1 キメラタンパク質が凝集体を形成するかどうか調べるため、膜面分を界面活性剤のジギトニンで処理し Blue-Native PAGE を行った。その結果、野生型 Tat2 と Tat2^{TMD9G}、Tat2^{TMD12G} はモノマーあるいはダイマーで存在していることがわかった。一方、小胞体局在を示した Tat2^{TMD10G} と Tat2^{TMD11G} は 270-800 kDa の巨大なクラスターを形成していた。この結果は、Tat2^{TMD10G} と Tat2^{TMD11G} が小胞体中でタンパク質凝集体を形成することを示唆している。次に野生型 Tat2 であっても小胞体に蓄積すれば凝集体を形成するのかどうか調べた。Sec12 は小胞体からの輸送小胞形成に必須な膜タンパク質であり、その温度感受性変異株 *sec12-4* では 37°C で輸送小胞の形成不全を示す。37°C で酵母を培養すると Tat2-GFP は確かに小胞体に蓄積した。そこで Blue-Native PAGE を行ったところ、25°C における培養時と同様、37°C でも Tat2 は単一のバンドとして観察された。この結果は、野生型 Tat2 が小胞体に蓄積しても多量体を形成しないこと、すなわち、凝集体形成は前述のキメラ輸送体に固有の現象であることが示された。

次に、Tat2-Gap1 キメラタンパク質の凝集体が細胞増殖に与える影響について検討した。野生株に各 Tat2-Gap1 キメラタンパク質を高発現させたところ、わずかではあるが Tat2^{TMD10G} 発現株の増殖が抑制された。よって Tat2^{TMD10G} が小胞体に蓄積するこ

とが細胞にとってストレスとなる可能性が考えられた。そこで、Tat2-Gap1 キメラタンパク質の蓄積に伴い、UPR が活性化するかどうかを UPRE レポーターアッセイによって調べた。タンパク質の N 型糖鎖付加を阻害する薬剤ツニカマイシンを投与したところ、25°C で約 2 倍のレポーター遺伝子の発現が見られ、確かに UPR が誘導されていた。しかし、いずれの Tat2-Gap1 キメラタンパク質も 25°C では UPR を誘導しなかった。そこで細胞を 37°C で 1 時間培養したところ、野生型 Tat2 の発現で UPR は誘導されなかったが、Tat2^{TMD10G} の発現で 2.3 倍の UPR が誘導された。この結果は、Tat2^{TMD10G} の異常タンパク質の形成が、高温でより顕著になり UPR を引き起こした可能性を示唆している。

大腸菌のアルギニン/アグマチン対向輸送体 AdiC を鋳型とした Tat2 の構造モデルより、TMD10 と TMD11 は平行に位置することが予測された。これら 2 つの TMD の膜内相互作用が Tat2 のフォールディングに重要である可能性が高い。通常、Tat2 や Gap1 などのアミノ酸輸送体は、小胞体から COPII 小胞によってゴルジ体へ輸送されるが、TMD10G と TMD11G のキメラ体は多量体を形成するため COPII 小胞に積み込まれないものと考えられる。そして ERAD に認識され Ubc6/Ubc7 依存的に分解される。このように小胞体に蓄積したキメラ体は ERAD の基質になり、膜貫通型の異常タンパク質がどのようにして UPR を活性化しているのか、その機構を調べる有効なモデルとなるであろう。そこで今後は、Tat2^{TMD10G} と Tat2^{TMD11G} の凝集体がどのユビキチンリガーゼ依存的に分解されるのか、および小胞体ストレスセンサーの Ire1 がどのように凝集体を認識して UPR を活性化しているのかを明らかにしていく予定である。

第 2 章 高水圧によるトリプトファン輸送体 Tat1 のユビキチン依存性分解の促進

第 2 章では非致死的な高水圧（以下、単に高圧とする）が細胞に及ぼす影響を明らかにするため、出芽酵母の低親和性トリプトファン輸送体 Tat1 の制御に着目した解析を行った。Tat1 は非常に安定なタンパク質で半減期が約 6 時間である。ところが細胞を 25 MPa（約 250 気圧、水深 2500 m 相当の圧力）で培養すると、3 時間以内に速やかに分解される。このとき生存率が著しく低下することはない。そこで、酵母を高圧条件にさらしたときの Tat1 の分解機構について、ユビキチン化というタンパク質の品質管理機構の観点から調べた。

一般に酵母の細胞膜タンパク質はエンドサイトーシスにより内在化し、液胞に運ばれ分解される。そこで、高圧による Tat1 の分解がエンドサイトーシス依存的かどうか調べた。エンドサイトーシス能を欠く *end3Δ* 株を 25 MPa の圧力条件にさらしたところ、Tat1 は分解されずに細胞膜に残存したことから、圧力依存的にエンドサイトーシスされることがわかった。細胞膜タンパク質はエンドサイトーシスに先だってユビキチン化される必要がある。Tat1 もやはりユビキチン化されるはずだが、どのリジン残基 (K) がユビキチン化されるのかが明らかでなかった。そこで、ターゲットとなるリジン残基

の同定を試みた。Tat1 の細胞質側 N 末端ドメインには 11 個のリジン残基が存在する。それらを様々な組み合わせでアルギニン (R) に置換し、変異型 Tat1 の発現をウエスタンブロッティングで調べた。野生型 Tat1 ではメインバンドの上に 2 本の高分子量バンドが確認された。一方、29 番目と 31 番目のリジンを同時にアルギニンに置換 (K29R-K31R) したものと 11 個のリジンを全てアルギニンに置換したもの (11K>R) では 2 本の高分子量バンドが消失した。このことは、Tat1 のユビキチン化が 29 と 31 番目のリジンに起こることを示唆している。次に、高圧依存的な Tat1 の分解に K29 と K31 がどのように関わっているのかを検討した。細胞を 25 MPa に 3 時間さらしたところ、野生型 Tat1、Tat1^{K29R}、Tat1^{K31R} は速やかに分解された。ところが、Tat1^{K29R-K31R} と Tat1^{11K>R} は高圧下でも分解されず安定に維持されていた。従って、K29 と K31 のどちらか一方がユビキチン化されれば、Tat1 は高圧下で分解されることが明らかとなった。

次に Tat1 のユビキチン化とユビキチンリガーゼ Rsp5、および Rsp5 に結合するアダプタータンパク質との関連性について調べた。アダプタータンパク質は、Rsp5 と標的となる基質タンパク質を介在する役割を果たすと考えられている。Rsp5 の触媒部位である HECT ドメインの変異株 HPG1-1 (Rsp5^{P514T} 変異株) では、高圧依存的な Tat1 の分解が起こらなかった。しかし、Rsp5 に結合する 2 つタンパク質 Bul1 と Bul2 を同時に欠損しても Tat1 は野生株と同様に分解された。よって、高圧による Tat1 の分解は Rsp5 依存のだが、Bul1 と Bul2 以外のアダプタータンパク質が関与するものと考えられた。アダプタータンパク質は Pro-Pro-x-Tyr (PPxY) 配列を持ち、Rsp5 の WW ドメインと相互作用するものと考えられる。まず Rsp5 の WW ドメインの役割を調べるため、その変異株 *rsp5-ww1* (W257G)、*rsp5-ww2* (W359G) および *rsp5-ww3* (W451G) を用いて解析を行った。その結果、Tat1 は *rsp5-ww1* と *rsp5-ww2* 変異株では野生株と同様に分解されたが、*rsp5-ww3* 変異株では分解が遅延した。この結果から、Rsp5 の WW3 と何らかのアダプタータンパク質が PPxY 配列を介し相互作用することで、高圧依存的な Tat1 のユビキチン化が起こると考えられた。次に Bul1 と Bul2 以外のアダプタータンパク質の関与について検討した。酵母のゲノムには PPxY 配列をもつアレスチン様タンパク質 (Arrestin-related trafficking adaptors; ARTs) が Bul1 と Bul2 を含め少なくとも 11 個コードされている。ARTs の各単独欠損株 (*art1Δ*~*art8Δ*) を 25 MPa で 3 時間培養したところ、Tat1 は野生株と同様に分解されたため、ARTs は重複して Tat1 の分解に関与することが考えられた。ART1~ART8 と ART10 (9-arrestin) の多重欠損株では Tat1 の分解はわずかに遅延し、さらに全ての ARTs を欠損する 9-arrestin *bul1Δbul2Δ* 株では Tat1 の分解遅延がより顕著になった。以上の結果は、機能的に重複した 11 種類のアレスチン様タンパク質が Tat1 と Rsp5 を介在するアダプターとして働き、高圧依存的な Tat1 のユビキチン化を担っている可能性を示唆する。

細胞を高圧にさらしたときに、Tat1 の分解がなぜ促進するのだろうか。可能性として、加圧による細胞膜の構造変化との関連について考えた。脂質二重層の構造は温度や圧力の影響を大きく受け、高圧はアシル鎖のパッキングを高め回転ブラウン運動を束縛する。Tat1 はその構造の大部分が細胞膜に埋め込まれているため、膜にこのような摂動が加わった結果、構造変化あるいは変性する可能性が考えられる。その結果、Rsp5 の標的としてユビキチン化され分解されるのではなかろうか。しかし Pma1 は Tat1 同様、細胞膜貫通型タンパク質だが、25 MPa で分解されることはない。よって、全ての膜タンパク質が一様に圧力により変性して分解される訳ではない。おそらく細胞膜内での安定性が個々に異なり、Tat1 では高圧感受性が高く特に変性しやすいと考えられる。

本研究は、出芽酵母のアミノ酸輸送体の細胞内品質管理機構を解明するための新たな指標となり得るだろう。例えば、小胞体ストレス応答で機能する Ire1 は酵母からヒトまで保存されている重要な機構であり、正常に働かないとヒトではコンフォメーション病などを引き起こすことがわかっている。その理解のため、小胞体内腔に蓄積した構造異常タンパク質を Ire1 がどのように認識して活性化しているのかが研究されている。しかし、アミノ酸輸送体など膜貫通型の構造異常タンパク質がどのように Ire1 に認識されているかはあまり研究されていなかった。第 1 章で見いだした膜貫通型の構造異常タンパク質が、どのように Ire1 に認識されているかを理解することで、小胞体ストレス応答が正常に機能するために重要な分子機構が解明されると期待される。また、酵母では様々なストレスにさらされることで構造異常タンパク質が生成し、これを除去しきれないと著しく生存率が低下する。第 2 章では摂動因子として高水圧依存的な Tat1 の分解について調べたが、熱や化学物質など他の摂動因子によっても Tat1 は分解される可能性も考えられる。そこで、こうした外的要因による Tat1 の分解機構を調べ高水圧と比較していくことで、Tat1 の分解機構が他のアミノ酸輸送体の細胞内品質管理機構のモデルになると考えている。このように本研究の第 1 章と第 2 章は、アミノ酸輸送体が小胞体内およびそこから搬出された後、異なる機構で品質管理される一連の仕組みを報告したものである。