

酵母における γ -グルタミルキナーゼの機能解析

立橋 祐樹

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)

提出日 平成 28 年 3 月 15 日

目 次

1. 序論	3
2. PUA ドメインを含む C 末端領域が GK 活性に与える影響	14
2-1 緒言	14
2-2 材料と方法	15
2-3 結果	21
2-4 考察	34
3. GK の新規生理機能に関する解析	38
3-1 緒言	38
3-2 材料と方法	50
3-3 結果	55
3-4 考察	68
4. 総括	76
5. 謝辞	78
6. 引用文献	79

1. 序論

はじめに

生体機能に異常をもたらす環境の変化はストレスと呼ばれる。生物はストレスに対する防御機構を備えているが、何らかの原因で防御機能が破綻すると疾病や死滅の原因となる。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は真核生物のモデル生物として盛んに研究されており、1996 年に実験室酵母である S288C 株の全ゲノムが、真核生物では初めて解読され公開されている (Barrell et al., 1996 ; The *Saccharomyces* Genome Database (SGD) : <http://www.yeastgenome.org/>)。酵母とヒトのストレス応答・適応機構には共通のメカニズムも多く、酵母のストレス応答・適応機構の研究が疾病の原因解明や治療に貢献してきた (Morano et al., 2012)。また、酵母はパンや酒類などの発酵食品やバイオエタノールの製造など産業面においても重要な微生物である。酵母は発酵生産過程で、高温や酸化などの様々なストレスを受けることで、著しく生産性が低下し最後には細胞死に至る。そこで、発酵生産力の向上を目指した、ストレスに強い酵母の育種が行われてきた (Alper et al., 2006; Zhao & Bai, 2009; Kitagaki & Takagi, 2014)。このように酵母におけるストレス応答・適応機構の研究は基礎研究のみならず、医学・創薬分野やバイオテクノロジーなどの応用研究においても非常に重要である。

プロリンの物理的、化学的および生理的特徴

プロリンはアミノ酸側鎖のアルキル基がアミノ酸主鎖の窒素原子と共有結合した五員環をもつ化合物で、モル質量 115.13 g/mol である。タンパク質を構成するアミノ酸の一種であるプロリンは、生体内の化合物として必須であるだけでなく、近年では有機合成の分野においても、アルドール反応を触媒する環境負荷の少ない単純な化合物として関心を集めている (List et al., 2001)。また、生体内における遊離型のプロリンには様々な生理機能があることが報告されている。タンパク質を構成するアミノ酸の中で、プロリンは最も溶解度が高く、温度 25℃ 時における溶解度 (水 100 g に溶ける質量) は 163.60 g である

(Jelifiska-Kazimierczuk & Szydlowski, 1996)。植物などは乾燥や高浸透圧時における水ストレス下で、細胞内にプロリンを蓄積することで水分の流出を防ぎ、細胞を保護していると考えられている。また、プロリンは活性酸素種 (ROS) のスカベンジャーとして機能することが明らかになっている (Ben Rejeb et al., 2014; Takagi et al., 2016)。これまで、植物におけるプロリン蓄積は主に高浸透圧などの水ストレス下での影響について調べられてきたが、最近では酸化ストレ

ス下でもプロリンの蓄積が認められ、プロリン代謝と活性酸素種との関係性についても明らかにされつつある (Ben Rejeb et al., 2014; 2015)。さらに、抗酸化酵素であるカタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼなどのタンパク質の活性上昇や安定化などにもプロリンは寄与していることが報告されている (Chen & Dickman, 2005)。また、プロリンはタンパク質の凝集を防ぎ、膜の安定化にも寄与していることが明らかになっている (Rudolph & Crowe, 1985; Ignatova & Gierasch, 2006)。ジチオスレイトール (DTT) やツニカマイシン処理は小胞体 (ER) 内にミスフォールドしたタンパク質を蓄積し、ER ストレスを誘導するが、プロリンはこの ER ストレスを緩和する働きがあることも報告されている (Liang et al., 2014)。このように、細胞内に存在するプロリンには様々な生理的役割があることが示唆されるが、その役割は不明な点が多く、特に分子機構の詳細についてはほとんど理解されていない。

酵母におけるプロリン蓄積とストレス耐性の関係性

植物や微生物の一部は、高浸透圧などのストレスに応答して細胞内にプロリンを蓄積する (Takagi, 2008; Brill et al., 2011; Pérez-Arellano et al., 2010)。一方、酵母 *S. cerevisiae* では、ストレス条件下で細胞内のプロリン含量は増加しないが、当研究室ではプロリンの添加が酵母に冷凍ストレス耐性を付与することを見出している (Takagi et al., 1997)。そこで、突然変異によってプロリンを細胞内に蓄積する変異株が単離された (Iwamoto et al., 1997)。L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC) は細胞毒性を示すプロリンのアナログであり、AZC はプロリンと競合してタンパク質に取り込まれ、異常タンパク質の生成に寄与する。AZC に耐性を示す変異株の中には、細胞内にプロリンを蓄積する株もあり、実際にそれらの株は冷凍ストレスに高い耐性を示すことが明らかになった (Iwamoto et al., 1997)。また、代謝工学的手法を用いてプロリンを細胞内に蓄積する酵母の作製も行われてきた (Morita et al., 2003; Terao et al., 2003; Takagi et al., 2005; Takagi, 2008)。これらの株は冷凍、乾燥、エタノール、酸化などの様々なストレスに対して耐性を示すことから、酵母の細胞内にプロリンを蓄積することでストレス耐性が向上することが明らかとなった。

酵母におけるプロリン代謝

酵母における主なプロリン合成は細胞質で行われ、グルタミン酸から三段階の酵素反応によって合成される (図 1)。まず、 γ -グルタミルキナーゼ (GK) が ATP を用いてグルタミン酸の γ -カルボキシル基をリン酸化することで、 γ -グルタ

ミルリン酸 (GP) が生じる。次に γ -グルタミルリン酸還元酵素 (GPR) が働き、NADPH を用いて GP を還元することでグルタミン酸 γ -セミアルデヒド (GSA) が生産される。GSA は非酵素的に Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) へと変化する。この P5C と NADPH を基質として P5C 還元酵素 (P5CR) の働きによって、プロリンが合成される。GK は最終産物であるプロリンによるフィードバック阻害を受けることで、プロリン合成を調整する重要な酵素である。AZC に耐性を示したプロリン蓄積株では GK をコードする *PRO1* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が導入されており (D154N)、GK 活性がプロリンによるフィードバック阻害非感受性になることでプロリンの過剰合成とストレス耐性に繋がることが明らかとなった (Sekine et al., 2007)。

一方、プロリンの分解はミトコンドリアで行われる。プロリンオキシダーゼ Put1 により、プロリンを P5C へと酸化される。次に P5C は P5C デヒドロゲナーゼ Put2 の働きによってグルタミン酸へと変えられる。

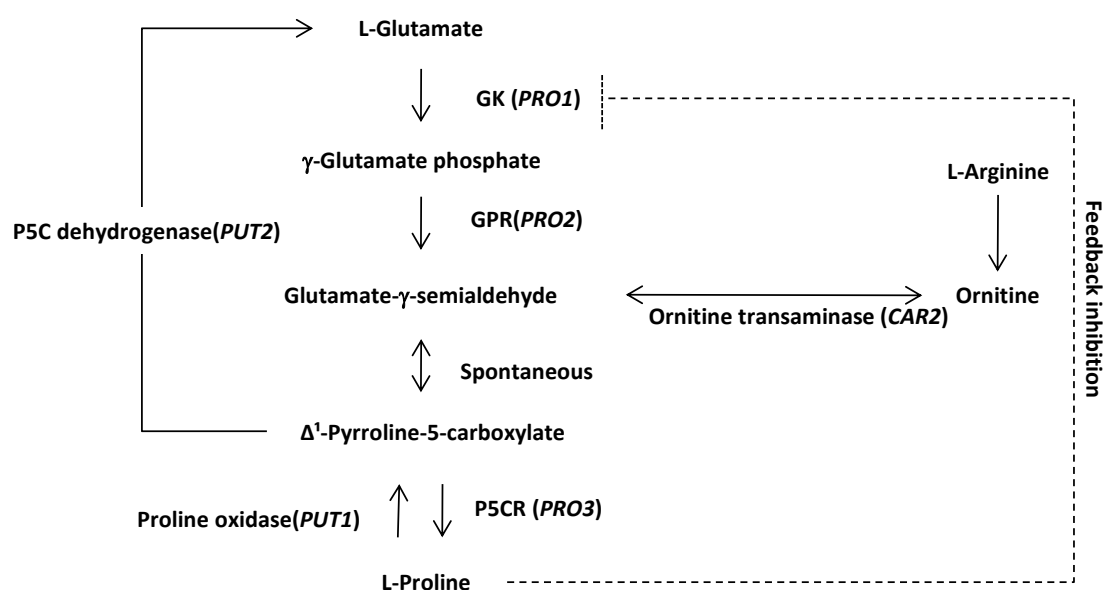


図 1 酵母におけるプロリン代謝 プロリンは主にグルタミン酸から γ -グルタミルキナーゼ (GK)、 γ -グルタミルリン酸還元酵素 (GPR)、P5C 還元酵素 (P5CR) を経る三段階の酵素反応により合成される。また、オルニチンからもオルニチントランスアミナーゼ反応によってプロリン中間体であるグルタミン酸- γ -セミアルデヒドが合成される。プロリンはミトコンドリア内でプロリンオキシダーゼと P5C デヒドロゲナーゼの働きによりグルタミン酸に酸化分解される。括弧内は各酵素をコードする遺伝子名を表す。

微生物および植物におけるプロリン蓄積機構

植物や微生物の一部は高浸透圧などのストレスに応答してプロリンを蓄積する。枯草菌 *Bacillus subtilis* では恒常的に発現している GK として ProB が、高浸透圧に応答して発現される GK として ProJ があることが知られている (Brill et al., 2011)。枯草菌の ProJ と ProB の一次構造は 43% の同一性を示す。ProJ は高浸透圧ストレス時のプロリン蓄積に必須の遺伝子であり、*ΔproJ* 株では高浸透圧ストレス時の生育が阻害される (Brill et al., 2011)。一方、植物の P5CS はプロリンによるフィードバック阻害を受けるが、大腸菌などの微生物 GK よりもプロリンによる感受性が低いことが報告されている (Pérez-Arellano et al., 2010)。様々な GK および P5CS のキナーゼドメインの一次構造を比較したところ、枯草菌 ProB の 142 番目残基は、酸性アミノ酸のグルタミン酸であった。プロリンによって酵素活性が強いフィードバック阻害を受ける酵母や大腸菌などの微生物 GK においても、枯草菌 ProB の 142 番目に相当する残基は酸性残基であったのに対し、フィードバック阻害をほとんど受けない植物の P5CS や枯草菌 ProJ では塩基性残基であった。さらに、大腸菌や酵母 GK のこの酸性残基を塩基性残基に置換した変異型 GK (大腸菌 GK-E143K、酵母 GK-E149K) では、フィードバック阻害が解除されることが報告されている (Sekine et al., 2007; Veeravalli et al., 2011)。これらのことから、高浸透圧に応答して誘導される ProJ はプロリンによるフィードバック阻害を受けないことでプロリン蓄積に繋がるものと考えられている。しかしながら、ProJ の酵素学的な解析が行われていないため、ProJ とプロリンの親和性の程度については不明なままである。

また植物細胞では、高浸透圧などの水ストレス以外にも、重金属、紫外線、病原菌の感染など様々な環境ストレスによってプロリンの蓄積が観察されている (Ben Rejeb et al., 2014)。植物は 2 つの P5CS 遺伝子を持っており、それぞれ局在が違っていることが知られている。植物における P5CS1 はクロロプラストとサイトゾルに局在しており、塩ストレスや乾燥などによって誘導されプロリンの蓄積に繋がる。一方、P5CS2 はサイトゾルに局在しており、高浸透圧などのストレスで誘導は起こらない (Szabados & Savouré, 2010)。興味深いことに、遺伝子破壊の表現型から、二つの P5CS 遺伝子はリダンダントな遺伝子ではないことが報告されている。モデル植物であるシロイヌナズナにおいて、高浸透圧などの水ストレスの刺激を受けると、細胞質内の NADPH オキシダーゼによって ROS の一種であるスーパーオキシドアニオンが生産される。その後、スーパーオキシドジスムターゼの働きによって過酸化水素へと変換されることで、プロリン蓄積のシグナルになっている (Ben Rejeb et al., 2015)。過酸化水素特異的なスカベンジャーや NADPH オキシダーゼ阻害剤の処理では、P5CS の転写レベルおよびタンパク質レベルでの誘導が抑制され、プロリンの蓄積が見られなかった。一方で、過

酸化水素の処理によって、浸透圧に非依存的にプロリンが蓄積されることが分かった (Ben Rejeb et al., 2015)。

酵母におけるプロリンを高蓄積する変異型 GK の獲得とストレス耐性

プロリンの蓄積が酵母のストレス耐性に寄与することから、さらなるプロリン蓄積株の構築を目的に、新しい変異型 GK の取得が行われた。当研究室ではエラープローン PCR 法を用いて、*PRO1* 遺伝子にランダムな変異を導入し、AZC 耐性を指標にして、プロリンによるフィードバック阻害非感受性型の変異体の分離を試みた。その結果、新しく N142D/I166V、E149K、I150T などのアミノ酸置換を伴う GK 変異体が分離され、この他にもほとんどの変異は 150 番目前後のアミノ酸残基に集中していた (Sekine et al., 2007)。これらの新規な変異型 GK は最初に取得された D154N-GK よりも、プロリンによるフィードバック阻害に非感受性であった。大腸菌 GK の構造解析の結果から 150 番目前後のアミノ酸残基の領域は、基質であるグルタミン酸やプロリンの結合領域周辺のものであることが推定され、アロステリック制御に関わる領域の変異であると考えられる。また、新しく得られた変異型 GK を発現させた酵母は、D154N-GK よりも細胞内にプロリンを高蓄積しており、冷凍ストレスに対して耐性を示した (Sekine et al., 2007)。一方で、プロリンを高蓄積させる変異型 GK の発現は、エタノールストレス下で生育の遅延が観察された (Takagi et al., 2007)。プロリンの合成にはグルタミン酸の他に、1 分子の ATP と 2 分子の NADPH が必要であり、多くのエネルギーを必要とする。このため、プロリンの過剰量の蓄積は ATP や NADPH などのエネルギーバランスを崩すことが原因で、ストレス耐性を発揮できなかった可能性が考えられる。また、プロリン蓄積株において液胞の構造や機能を欠損させると、野生型株よりも生育が著しく遅延し、ストレスにも感受性を示した (Matsuura & Takagi, 2005)。これらの結果から、プロリン蓄積によるストレス耐性の付与には、細胞内のプロリン含量と局在性を適切に制御することが重要であると考えられる。

プロリン蓄積によるストレス耐性の応用

プロリンを蓄積した酵母の高いストレス耐性を利用して、産業的に応用する試みが行われている。酵母による醸造や製パンなど発酵生産過程では、様々なストレスにより酵母の発酵生産能が制限される。例えば、高濃度のエタノールを生産する清酒の製造時には最大で 20%を超えるエタノールに酵母細胞は曝される。また、製パン工程などでは冷凍などのストレスに曝される。そこで、こ

これらのストレス下でも高い発酵能を持つ酵母の育種が行われてきた。プロリンの蓄積は、酵母のストレス耐性を向上させたことから、プロリン蓄積株による発酵生産性の向上が試みられた。プロリンを蓄積する変異型 GK を発現する清酒酵母を作製し、醸造への影響が調べられた。その結果、プロリン蓄積株では僅かではあるが有意にエタノール生産量の増加が見られた (Takagi et al., 2007)。また、製パン工程においてもプロリン蓄積の効果が見られた。製パン工程の中で酵母細胞は、冷凍や高濃度ショ糖によるストレスに曝される。変異型 GK の発現によってプロリンを蓄積したパン酵母では、冷凍後の発酵力や高糖生地での発酵力が著しく上昇していた (Kaino et al., 2008; Sasano et al., 2012)。これらの結果から、プロリンの蓄積は実用酵母において、発酵生産の改善に繋がることが明らかとなった。

GK および P5CS の構造的特徴

酵母や大腸菌などのほとんどの微生物 GK は、N 末端側の触媒活性を示すアミノ酸キナーゼドメインと C 末端側の **P**seudo**U**ridine synthase and **A**rchaeosine transglycosylase (PUA) ドメイン、および両ドメインを連結するリンカー領域から構成されている。また、一部の微生物では GK 内に PUA ドメインが存在せず、キナーゼドメインのみで構成されている。一方、ヒトや植物などの高等真核生物では、GK のキナーゼドメインとプロリン合成の 2 番目のステップを触媒する GPR が融合した P5C 合成酵素 (P5CS) として存在しており、GK 内に PUA ドメインを有していない (図 2)。

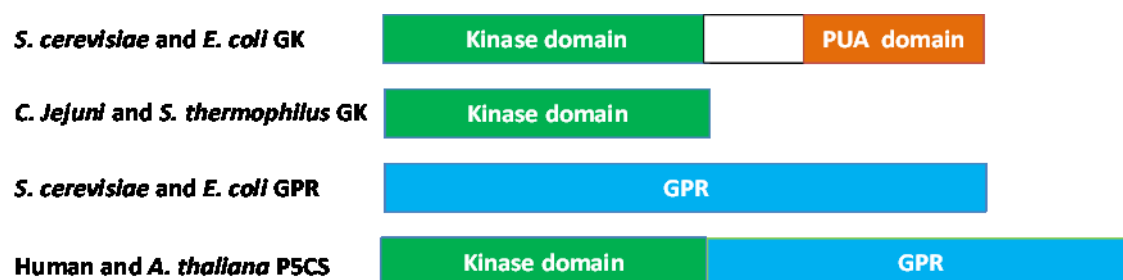


図 2 GK, GPR および P5CS の構造模式図 大腸菌や酵母などのほとんどの微生物 GK の C 末端側には PUA ドメインが存在する。一部の微生物 GK はキナーゼドメインのみで構成される。ヒトや植物などの高等な真核生物では、キナーゼドメインと GPR が融合した P5CS として存在している。

PUA ドメイン

PUA ドメインは RNA 結合ドメインの一つであり、RNA 代謝と関わりのあるタンパク質に多く見出される。微生物由来の GK のように一部の代謝酵素や機能未知タンパク質などにも PUA ドメインが存在しているが、その機能や役割は明らかになっていない (Aravind & Koonin, 1999)。PUA ドメインを持つ代表的なタンパク質としては、シュードウリジン合成酵素である Cbf5 (Li & Ye, 2006; Normand et al., 2006; Ye., 2007)、pre-rRNA processing に必須の酵母 Nip7 (Zanchin et al., 1997; Coltri et al., 2007)、Nip7 と 56.8% のアミノ酸残基が同一であるヒトの機能未知遺伝子 KD93 (Liu et al., 2004)、tRNA のアーケオシン化を触媒する archaeosine tRNA-guanine transglycosylase (ArcTGT) (Ishitani et al., 2003; Sabina & Söll, 2006)、翻訳開始因子の一つであるヒト MCT1 (Reinert et al., 2006; Mazan-Mamczarz et al., 2009) および大腸菌 GK などが知られている (Pérez-Arellano et al., 2005; 2007)。酵母 GK の立体構造は決定されていないため、結晶構造が明らかな大腸菌 GK を用いて構造比較を行なった。表 1 に示すように、大腸菌 GK 以外の PUA ドメインを持つタンパク質は RNA 代謝との関わりが知られている。しかし、各タンパク質の PUA ドメインは全く異なる RNA を認識している。実際に、*Pyrococcus furiosus* Cbf5 (PfCbf5) が認識する RNA と *Pyrococcus horikoshii* ArcTGT (PhArcTGT) が認識する RNA の立体構造は異なることが報告されている (Li & Ye, 2006)。

次に、これまでの文献情報に基づき PUA ドメイン間の構造を解析した。図 4 に示すように、すべての PUA ドメイン間で非常に類似した二次構造を形成しているが、アミノ酸配列の相同性は高くなかった。また、PfCbf5 の PUA ドメインが RNA を認識するアミノ酸残基と PhArcTGT の PUA ドメインが RNA を認識するアミノ酸残基はほとんど一致しなかった。一方、大腸菌 GK の PUA ドメインと PfCbf5 の PUA ドメインの立体構造の重ね合わせた結果、両ドメインの重ね合わせによる平均二乗偏差 (RMSD) は $0.702 \text{ \AA}$ であり、非常に類似性の高い構造であると考えられた (図 3)。また、KD93, ArcTGT, MCT1 の PUA ドメインも大腸菌 GK の PUA ドメインと高い類似性を示した。一方、大腸菌 GK の PUA ドメインには、他の PUA ドメインにはない α -ヘリックスが C 末端付近に付加されていることが確認できた (図 3, 図 4)。

GK の PUA ドメインは他の PUA ドメインと高い類似性を示すが、ターゲットとなる RNA については未だ報告がない。しかし、枯草菌 GK は転写因子 σ^D の制御下にある DegR タンパク質の発現を抑制することが報告されている (Ogura et al., 1994; 1996)。また、DegR のプロモーターである σ^D プロモーターを σ^A 様のプロモーターに変換した時においても DegR の発現が抑制された。このメカニズムは明らかではないが、枯草菌 GK の PUA ドメインが DegR の mRNA に何らか

の機構で影響を及ぼし、発現抑制をしていると考えられている (Pérez-Arellano et al., 2007)。

表1 PUAドメインを持つタンパク質の比較

*KD93 (Nip7) については、PDB IDはKD93を、機能とターゲットRNAはNip7の報告に基づいて作成した。

タンパク質	Cbf5	*KD93 (Nip7)	ArcTGT	MCT-1	GK
生物種	<i>P. furiosus</i>	<i>H. sapiens</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>P. horikoshii</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>
PDB ID	2HVV	1SQW	1J2B	3R90	2J5V
RNAとの共結晶	ACA Box		tRNA		
機能	RNA修飾 (シューードウリジン化)	pre-rRNA processing	RNA修飾 (アーケオシン化)	翻訳開始因子	プロリン合成
ターゲットRNA	H/ACA Box	5' ETS, ITS2, 5.8S rRNA, poly uridine	tRNA	キャップ構造	

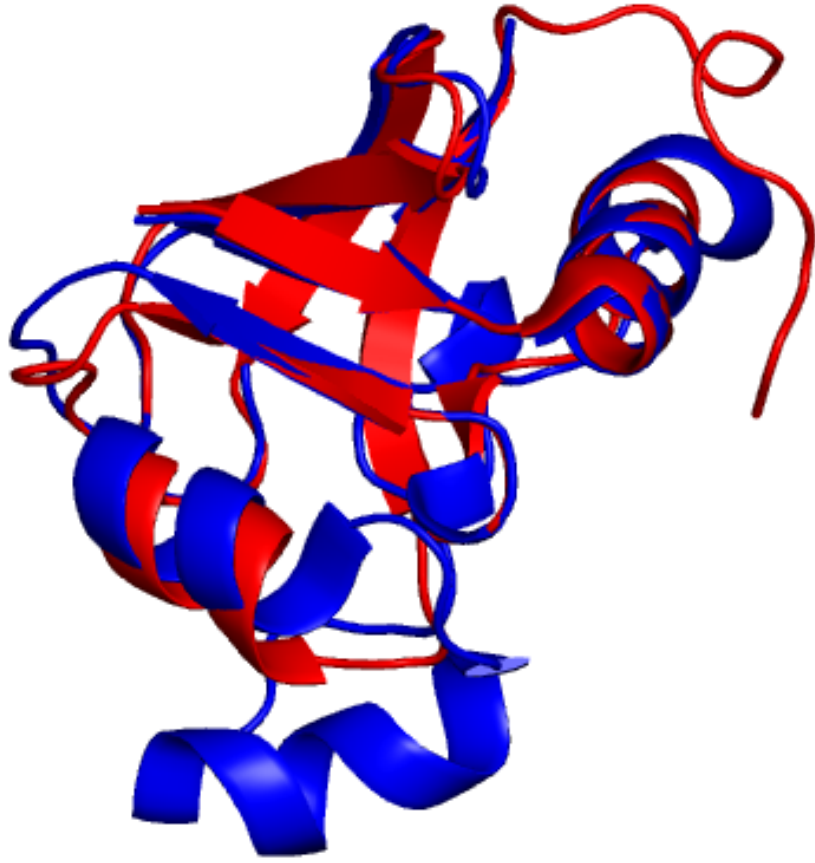


図3 大腸菌 GK と *P. furiosus* Cbf5 の PUA ドメインの重ね合わせ 大腸菌 GK (PDB ID 2J5V) の PUA ドメインと *P. furiosus* Cbf5 (PDB ID 2HVV) の PUA ドメインの重ね合わせを行った。赤色は *P. furiosus* Cbf5 の PUA ドメインを青色は大腸菌 GK の PUA ドメインを示す。2つのドメインの重ね合わせによる RMSD は 0.702 Å であった。

ScGK	322	G	A	V	V	I	D	Q	G	A	Y	A	A	L	T	R	K	N	K	A	G	L	L	P	A	G	V	I	D	V	Q	351
EcGK	276	G	E	I	T	V	D	E	G	A	T	A	A	I	L	E	R	G	S	S	-	L	L	P	K	G	I	K	S	V	T	304
PfCbf5	254	P	K	V	W	I	K	D	S	A	V	A	A	V	T	-	H	G	A	D	-	L	A	V	P	G	I	A	K	L	H	281
PhArcTGT	508	-	M	R	V	V	V	N	K	E	A	E	P	F	A	R	K	G	K	D	-	V	F	A	K	F	V	I	F	A	D	535
HsMCT1	93	P	H	Q	Q	V	D	K	G	A	I	K	F	V	L	-	S	G	A	N	-	I	M	C	P	G	L	T	S	P	G	120
HsKD93	95	Y	K	V	W	I	K	P	G	A	E	Q	S	F	L	-	Y	G	N	H	-	V	L	K	S	G	L	G	R	I	T	122

ScGK	352	G	T	F	H	E	L	E	C	V	D	I	K	V	G	K	K	L	P	D	G	T	L	D	P	D	F	P	L	Q	T	381
EcGK	305	G	N	F	S	R	G	E	V	I	R	I	C	N	-	-	-	-	L	E	G	-	-	-	-	-	-	-	-	R	D	322
PfCbf5	282	A	G	I	K	R	G	D	L	V	A	I	M	T	-	-	-	-	L	K	D	-	-	-	-	-	-	-	-	E	L	299
PhArcTGT	536	P	G	I	R	P	Y	D	E	V	L	V	V	N	-	-	-	-	E	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	E	L	553
HsMCT1	121	A	K	L	Y	P	A	A	V	D	T	I	V	A	I	M	A	E	G	K	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	H	A	142
HsKD93	123	E	N	T	S	Q	Y	Q	G	V	V	V	Y	S	-	-	-	-	M	A	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	P	140

ScGK	382	V	G	K	A	R	C	N	Y	T	-	S	S	E	L	T	K	I	K	G	L	H	S	D	Q	I	E	E	E	L	G	410
EcGK	323	I	A	H	G	V	S	R	Y	N	-	S	D	A	L	R	R	I	A	G	H	H	S	Q	E	I	D	A	I	L	G	351
PfCbf5	300	V	A	L	G	K	A	M	M	T	-	S	Q	E	M	L	E	K	T	K	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	318
PhArcTGT	554	L	A	T	G	Q	A	L	L	S	-	G	R	E	M	I	V	F	Q	Y	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	572
HsMCT1	143	L	C	V	G	V	M	K	M	S	-	A	E	D	I	E	K	V	N	K	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	161
HsKD93	141	L	G	F	G	V	A	A	K	S	-	T	Q	D	C	R	K	V	D	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158

ScGK	411	Y	N	D	S	E	Y	V	A	H	R	E	N	L	A	F	P	P	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	428
EcGK	352	Y	E	Y	G	P	V	A	V	H	R	D	D	M	I	T	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	367
PfCbf5	319	-	-	-	-	-	-	I	A	V	D	V	E	K	V	F	M	P	R	D	W	Y	P	K	L	W	E	-	-	-	-	338
PhArcTGT	573	-	-	-	-	-	-	R	A	V	K	V	R	K	G	V	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	582
HsMCT1	162	-	-	-	-	-	-	I	G	I	E	N	I	H	Y	L	N	D	G	L	W	H	M	K	T	Y	K	-	-	-	-	181
HsKD93	159	-	-	-	-	-	-	M	A	I	V	V	F	H	Q	A	D	I	G	E	Y	V	R	H	E	E	T	L	T	-	-	180

図 4 各種タンパク質の PUA ドメインのアライメント 文字背景が黄色い領域は β -シート、赤い領域は α -ヘリックスまたは 3_{10} ヘリックスをそれぞれ表す。二次構造は ScGK のみ Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) による二次構造予測をもとに、EcGK, PfCbf5, PhArcTGT, HsMCT1, HsKD93 は立体構造に基づいてそれぞれ決定した。緑色、青色および茶色の文字は RNA との相互作用に関わるアミノ酸残基を示す。緑色の残基はアミノ酸側鎖、青色の残基はアミノ酸主鎖、茶色の残基はアミノ酸主鎖および側鎖の両方が、RNA との相互作用に関わる。PUA ドメインのアライメントには、*Saccharomyces cerevisiae* GK (ScGK), *Escherichia coli* GK (EcGK), *Pyrococcus furiosus* Cbf5 (PfCbf5), *Pyrococcus horikoshii* ArcTGT (PhArcTGT), *Homo sapiens* MCT1 (HsMCT1), *Homo sapiens* KD93 (HsKD93) を用いた。

2. PUA ドメインを含む C 末端領域が GK 活性に与える影響

2-1 緒言

プロリントタンパク質合成に必要なアミノ酸であるだけでなく、タンパク質の安定化や活性酸素種の消去など生体内で様々な生理機能を発揮する化合物である。このため、細胞内のプロリン代謝の理解を深めることは、基礎研究のみならず酵母による発酵生産などの応用面においても重要である。しかしながら、細胞内プロリン代謝の仕組みが完全に理解されているわけではない。GK はグルタミン酸からプロリン合成を行う初発の酵素であり、プロリン合成を調整する上で非常に重要な酵素である。また、GK はプロリンによるフィードバック阻害を受けるが、プロリンによる阻害を受けない変異型 GK の発現がプロリン蓄積とストレス耐性に繋がることから、GK の酵素活性を調整する仕組みを理解することは非常に重要であると考えられる。

酵母や大腸菌などの大部分の微生物 GK は、N 末端側の触媒活性を示すキナーゼドメインと C 末端側の PUA ドメインおよび両ドメインを繋ぐリンカー領域から構成されている (Aravind & Koonin, 1999; Marco-Marin et al., 2007)。一方、高等な真核生物であるヒトや植物などはキナーゼドメインとプロリン合成の 2 番目の反応を触媒する GPR が融合した P5CS として存在しており、PUA ドメインは存在しない。PUA ドメインは原核生物から真核生物まで広渡に保存された RNA 結合ドメインの一つであり、RNA 修飾酵素や真核生物の翻訳開始因子などに多く見いだされる (Aravind & Koonin, 1999; Ishitani et al., 2003; Li & Ye, 2006; Reinert et al., 2006; Pérez-Arellano et al., 2007)。一方、プロリン合成系の鍵酵素である GK をはじめとする一部の代謝酵素や機能未知遺伝子にも PUA ドメインが見出されるが、それらの役割や機能についてはほとんど不明である。

そこで、本章では酵母 GK において機能未知ドメインである PUA ドメインを含む C 末端側の領域に着目して、C 末端領域が GK のキナーゼ活性にどのような影響を与えるのか、遺伝学および生化学的に解析した (Kaino et al., 2012; Tatehashi & Takagi, 2013)。

2-2 材料と方法

2-2-1 菌株

本研究で使用した菌株を表 2 に示す。

表 2 使用菌株

菌株	遺伝型
大腸菌	
Rosetta(DE3)	F- <i>ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm</i> λ DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>] pLysSRARE (Cm ^R)
KC1325	Rosetta(DE3) <i>proB1658::Tn 10</i> insertion
酵母	
BY4741	<i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>
$\Delta pro1$	BY4741 <i>pro1::CgHis3</i>
$\Delta pro2$	BY4741 <i>pro2::KanMx4</i>
$\Delta car2$	BY4741 <i>car2::KanMx4</i>
$\Delta pro1 \Delta car2$	BY4741 <i>car2::KanMx4 pro1::CgHis3</i>

2-2-2 培地

培地は以下に示す組成で調製した。

1) YPD培地（酵母用完全培地）

Glucose	2%
Bacto peptone	2%
Bacto yeast extract	1%

必要に応じてG418（100 μ g/ml）またはハイグロマイシン（100 μ g/mg）を加え

た。

2) SD培地 (Ammonium sulfateのみを窒素源とする酵母用最少培地)

Glucose	2%
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and ammonium sulfate	0.17%
Ammonium sulfate	0.5%

3) SC 培地 (SD 培地にアミノ酸等を添加した酵母用完全合成培地)

Glucose	2%
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and ammonium sulfate	0.17%
Ammonium sulfate	0.5%
*Drop-out mixture	0.2%

*Drop-out mixture は、下記の物質から必要に応じて特定の物質を取り除き、残りをよく混合したものを使用した。

Adenine	0.5 g	L-Alanine	2.0 g	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.2 g
L-Arginine	2.0 g	L-Asparagine	2.0 g	Uracil	2.0 g
L-Aspartic acid	2.0 g	L-Cysteine	2.0 g	L-Valine	2.0 g
L-Glutamine	2.0 g	L-Glutamic acid	2.0 g	L-Tyrosine	2.0 g
Glycine	2.0 g	L-Histidine	2.0 g	L-Serine	2.0 g
Inositol	2.0 g	L-Isoleucine	2.0 g	L-Tryptophan	2.0 g
L-Leucine	10.0 g	L-Lysine	2.0 g	L-Threonine	2.0 g
L-Methionine	2.0 g	L-Phenylalanine	2.0 g	L-Proline	2.0 g

4) LB培地 (大腸菌用完全培地)

Bacto tryptone	1%
Bacto yeast extract	1%
NaCl	0.5%

必要に応じてアンピシリン (100 µg/ml)、カナマイシン (20 µg/ml)、クロラムフェニコール (30 µg/ml) を添加した。

5) M9 培地 (大腸菌用最少培地)

Na ₂ HPO ₄	0.6%
KH ₂ PO ₄	0.3%
NaCl	0.05%

NH ₄ Cl	0.1%
MgSO ₄	0.12%
CaCl ₂	0.01%
Glucose	2%

必要に応じてアンピシリン (100 µg/ml) 、カナマイシン (20 µg/ml) 、クロラムフェニコール (30 µg/ml) 、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) (0.1 mM) を添加した。

6) M9CA 培地 (組換えタンパク質発現用培地)

Na ₂ HPO ₄	0.6%
KH ₂ PO ₄	0.3%
NaCl	0.05%
NH ₄ Cl	0.1%
MgSO ₄	0.12%
CaCl ₂	0.01%
Glucose	0.2%
Casamino acids	2%

必要に応じてアンピシリン (100 µg/ml) 、クロラムフェニコール (30 µg/ml) 、IPTG (0.1 mM) を添加した。

2-2-3 プライマー

本研究で使用したプライマーを表 3 に示す。

表 3 使用プライマー

名称	オリゴヌクレオチド配列 (5' → 3')
PRO1-TAGZyme(+)	GGCCGAGCTCAGATGAAGGATGCTAATGAGAG
pQE-2-PRO1-SacIIKpnI-R	CGGGGTACCTCACC GCGGACGAGGTGGGAATGCCAAAT
pQE-2-PRO1dPUA+0-SacIIKpnI-R	CGGGGTACCTCACC GCGGCTCGACAATTCTACCTATATTC
pQE-2-PRO1dPUA+14-SacIIKpnI-R	CGGGGTACCTCACC GCGGTTTAACTTTATTTTCATCGTCA
pQE-2-PRO1dPUA-SacIIKpnI-R	CGGGGTACCTCACC GCGGTTAAGAGCCTTTAATTTCTC
pQE-2-PRO1dPUA+67-SacIIKpnI-R	CGGGGTACCTCACC GCGGCCTTTAGAGACAAGACCGT

kd+PUA-F	GCTGTTGTTATAGACCAAGGTGC
kd+PUA-R	CTCGACAATTCTACCTATATTCGCA
pet53-pro1(attB1)-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAAGGATGCT AATGAGAGTAAATCG
pet53-pro1(attB2)-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACGAGGTGGGAAT GCCAAATTTTC
per53-kd+67(attB2)-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCAGCCTTTAGAGA CAAGACCGT
pAD4-PRO1-SalI-F	AAGGTCGACATGAAGGATGCTAATGAGA
pAD4-PRO1-SacI-R	CCAAGAGCTCTCAACGAGGTGGGAATGCCAA
pAD4-PRO1dPUA(+0)-SacI-R	CCAAGAGCTCTCACTCGACAATTCTACCTAT
pAD4-PRO1dPUA(+14)-SacI-R	CCAAGAGCTCTCATTTAACTTTATTTTCATCGTC
pAD4-PRO1dPUA(+37)-SacI-R	CCAAGAGCTCTCAGTTAAGAGCCTTTAATT
pAD4-PRO1dPUA(+67)-SacI-R	CCAAGAGCTCTCAGCCTTTAGAGACAAGACCGT
pAD4-PRO1dPUA(+110)-SacI-R	CCAAGAGCTCTCAACCAACTTTTATGTCAACAC
kd(+linker0-14)+PUA-R	TTTAACTTTATTTTCATCGTCAAGTTCTAGAGTT
kd(+linker0-36)+PUA-R	GTTAAGAGCCTTTAATTTCTCAAATTCTCTTTTTTGC
kd(+linker37-67)+PUA-R	GTTCCACTACATACGAAGTTCATTGCT
YHR033W(attB1)-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACAAAAGCT TATACTATCGTTATC
YHR033W(attB2)-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAATTGCGGAGGG AAAGCGATG
pro1 up 500 Fw	TTAATCAGTGAAGTGTTCAGGGAC
pro1 dw 500 Rv	GATACAAGGCTTCCAAGGGTAGGA
PRO1-CgHIS3-F	ATTTTATCAGCTACTGTAATATAGTCATAAGAACGCGAAAGTTG TAAAACGACG GCCAGT
PRO1-CgHis3-R	AATATCATTAAGGGAATCCTCTAAACTTTTTAGTTCGTTACAGG AAACAGCTATGACC

2-2-4 プラスミドの構築

大腸菌発現用ベクターへの GK および C 末端欠損型 GK のクローニングは、酵母 BY4741 ゲノムを鋳型として PCR により増幅を行い、増幅された断片を *SacI* および *SacII* により処理し pQE2 へと組み込んだ。また、リンカー領域を削除した kd+PUA-pQE2 を構成するために、PRO1-pQE2 を鋳型に kd+PUA-F と kd+PUA-R を用いてインバース PCR を行い、セルフライゲーションにより環状化させた。

酵母発現用ベクターへの各種 GK のクローニングは、酵母 BY4741 ゲノムを鋳型として PCR により増幅を行い、*SalI* および *SacI* により処理し 3HA-pAD4 へと組み込んだ。また、リンカー領域を削除した kd+PUA-3HA-pAD4、kd+PUA(+14)-3HA-pAD4、kd+PUA(+36)-3HA-pAD4、kd+PUA(37-67)-3HA-pAD4 を作製するために、kd+PUA-F、kd+PUA-R、kd+PUA(+14)-R、kd+PUA(+36)-R、kd+PUA(37-67)-R を用いてインバース PCR を行い、セルフライゲーションにより環状化させた。また、PRO1(*HindIII*)-F と PRO1(*NotI*)-R あるいは kd+67(*NotI*)-R を用いて PCR を行った DNA 断片を *HindIII* と *NotI* により処理し、pAD4-3HA6His に組み込んだ。

大腸菌を用いた組換えタンパク質発現用ベクターおよび酵母発現用ベクターの一部については、Gateway システム (Invitrogen) を用いて構築した。

2-2-5 ウェスタンブロッティング

大腸菌の細胞抽出液は、超音波破碎により調製した。酵母の細胞抽出液は、培養液に終濃度 10% のトリクロロ酢酸を加え、マルチビーズショッカー (安井器械) を用いて破碎することで調製した。各抽出液はポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、その後ニトロセルロース膜へと転写した。タンパク質の検出は、一次抗体として anti-penta-His antibody または anti-HA monoclonal antibody、二次抗体として anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody を用い、ECL Plus Western Blotting Detection System により行った。

2-2-6 組換えタンパク質の精製

His タグ配列を N 末端側に融合した各プラスミド (GK/pQE2 または KD+67/pQE2) を Rosetta (DE3) に導入した。形質転換した Rosetta (DE3) を M9+CA 培地において 37°C で OD₆₀₀ = 0.4-0.8 となるように培養した。IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加えて、18°C に移し一晚培養した。発現誘導した大腸菌を集菌し、溶解バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) に懸濁後、超音波破碎機を用いて菌体を破碎した。高速遠心した上清を Ni-NTA に吸着後、

10 mM イミダゾールを含む同バッファーを用いて洗浄した。タンパク質の溶出は 500 mM イミダゾールを含む同バッファーを用いて行った。

2-2-7 GK 活性測定

GK はグルタミン酸と ATP から γ -グルタミルリン酸と ADP を生産する。GK により生産された γ -グルタミルリン酸は不安定なため分子内反応を起こし、5-オキソプロリンとリン酸に分解される (Seddon et al., 1989)。この性質を利用し、マラカイトグリーンを用いて遊離したリン酸を定量することで GK 活性を測定した (Hoenig et al., 1989; Yim et al., 2003)。反応容積は、100 μ l に調整した。グルタミン酸ナトリウムの濃度を 40-1200 mM で変化させる実験では、酵素 0.02-10 μ g, 20 mM ATP, 20 mM MgCl₂ になるように調製した。ATP の濃度を 5-40 mM で変化させる実験では、酵素 0.02-10 μ g, 400 mM グルタミン酸ナトリウム, 20 mM MgCl₂ になるように調製した。反応は 30°C で 10 分間行った。発色試薬 (発色溶液 A (1 M 塩酸, 0.43% モリブデン酸ナトリウム) と発色溶液 B (0.94% マラカイトグリーン (シュウ酸塩), 0.32% ポリビニルアルコール (重合度約 500)) を使用直前に 100 : 1 で混合した。) を 900 μ l 加えることで反応停止を行った。反応停止の 2 分後に 34% クエン酸三ナトリウムを 70 μ l 加えた。室温で 30 分放置し、620 nm における吸光度を測定した。酵素による遊離リン酸の生成量は、標準試薬 (0-20 nmol KH₂PO₄, 5-40 mM ATP, 100 mM MgCl₂) 中で既知濃度の KH₂PO₄ 溶液を用いて作成した標準曲線と比較することで算出した。得られたプロットについては、GraphPad Prism (GradPad Software, San Diego, California) を用いてカーブフィッティングを行った ($v = V_{\max} \times [S]^H / (K_m^H + [S]^H)$)。v は反応速度、 $V_{\max}$ は最大反応速度、[S] は基質濃度、H はヒル係数、 K_m はミカエリス定数を表す。酵素の比活性は、1 分間あたりに 1 μ mol のリン酸を生成する速度を 1 unit とした。

その他、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ I 遺伝子工学の基礎技術」(羊土社)、及び「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)、「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター)、及び「バイオ実験イラストレイテッド⑦」に準じた。

2-3 結果

2-3-1 大腸菌 GK 遺伝子破壊株 (*ΔproB*) を用いた相補性実験

まず、酵母 GK において PUA ドメインを含む C 末端領域が活性に与える影響を調べるために、図 5 に示すような C 末端欠損型 GK 遺伝子が大腸菌発現用ベクター pQE2 に組み込み、プロリン要求性大腸菌である GK 遺伝子破壊株 KC1325 (Fujita et al., 1998) に導入した。その結果、野生型 GK および KD+67 発現株ではプロリン要求性の回復が見られたのに対し、リンカー領域を一部またはすべてを欠損した KD+0、KD+14、KD+36 および KD+PUA 発現株ではプロリン要求性の回復が見られなかった (図 6A)。この結果から、リンカー領域が欠損した GK は大腸菌細胞内で活性が著しく低下している、または正しくフォールディングされずに不溶性になっている可能性が考えられた。また、KD+67 発現株ではプロリンを含まない最少培地における生育遅延を示したことから、PUA ドメインの欠失も GK 活性の低下またはフォールディング能の低下によりプロリン合成能が低下させる可能性が示唆された。

そこで次に、上記の GK 発現株の粗抽出液を超遠心により分画することで大腸菌内のタンパク質の可溶性画分のみを抽出し、ウエスタンブロットによる検出を行った。その結果、すべてのタンパク質が、予想される分子量の位置に、粗抽出液とほぼ同等に可溶性画分に検出された (図 6B)。しかし、GK の機能を相補しなかった KD+0、KD+14、KD+36 および KD+PUA については、タンパク質の存在量自体が少なく、大腸菌細胞内ではこれらの変異タンパク質の構造が不安定になっていることが示唆された。

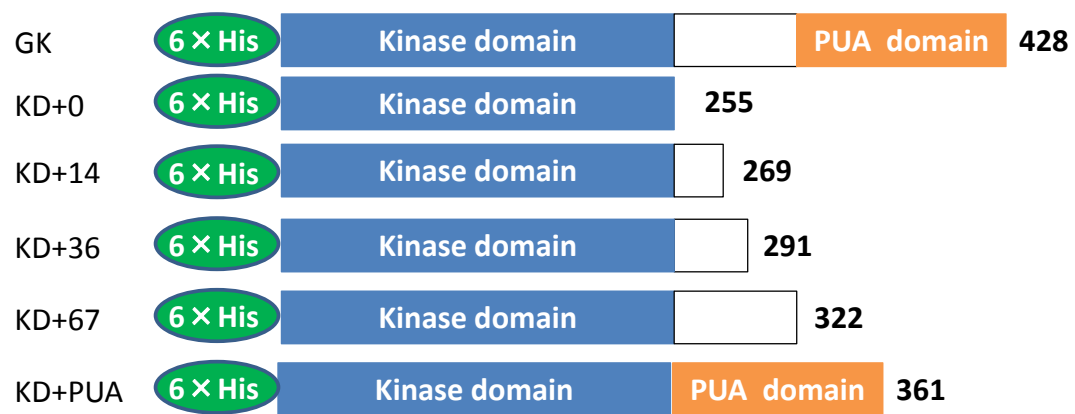


図 5 GK および C 末端欠損型 GK の一次構造模式図 数字はアミノ酸残基数を表す。

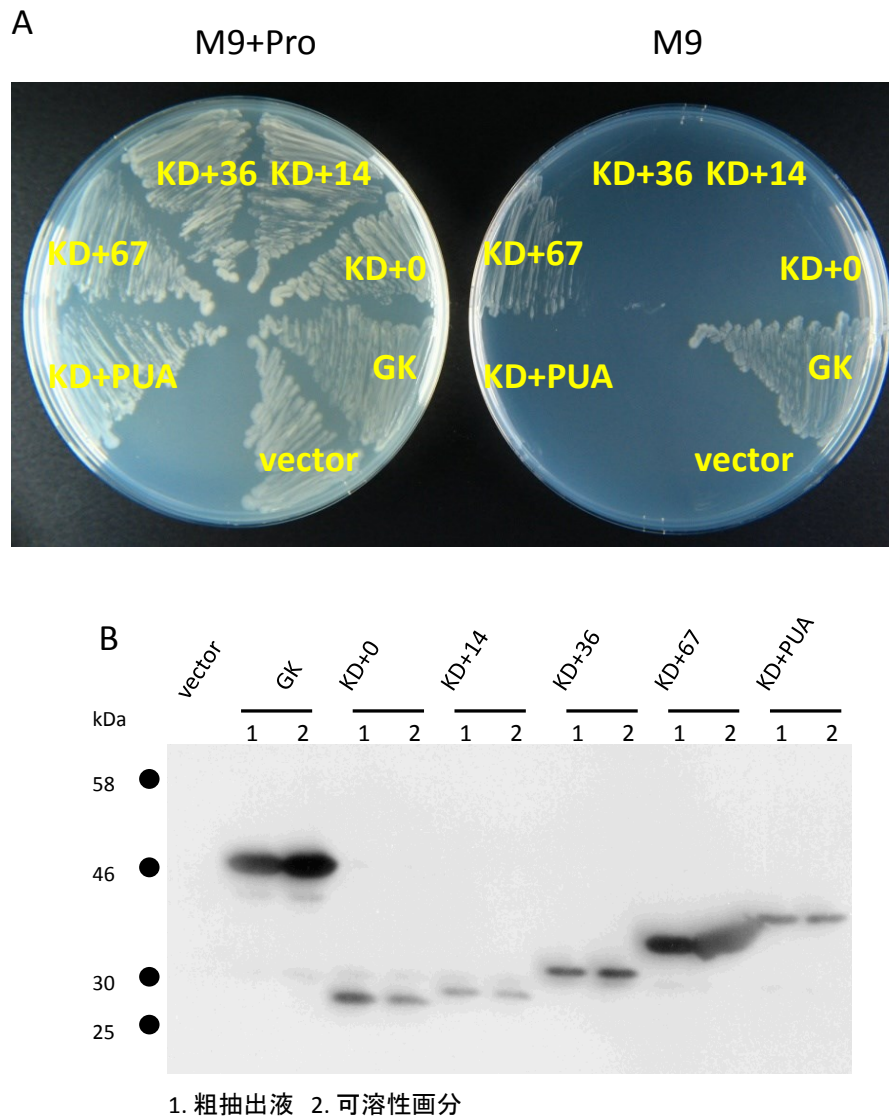


図 6 プロリン要求性大腸菌株を用いた C 末端欠損型 GK による機能相補実験
 (A) プロリン要求性大腸菌 KC1325 を M9 および M9+Pro 培地にストリークし 25℃で 3 日間培養した。(B) ウェスタンブロット解析。1 は粗抽出液、2 は可溶性画分を表す。10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、総タンパク質量 10 μg を泳動した。各タンパク質は anti-penta-His 抗体、anti-mouse IgG 抗体および ECL plus を用いて検出した。

2-3-2 プロリン要求性酵母の作製と表現型の解析

PUA ドメインとリンカー領域が GK 活性に与える影響をより詳細に調べるために、プロリン要求性酵母を宿主として相補性実験を行うことにした。酵母は、グルタミン酸を基質としたプロリン合成経路の他に、オルニチンを基質としてプロリン合成経路を有するため、GK 遺伝子 (*PRO1*) および OAT 遺伝子 (*CAR2*) の単独破壊では、完全なプロリン要求性を示さなかった（ただし、 $\Delta pro1$ 破壊株ではプロリンを含まない培地で増殖の遅延が観察された（図 7）。そこで、 $\Delta car2$ 破壊株を親株として *PRO1* の破壊を行い、二重破壊株を作製した。取得した $\Delta car2 \Delta pro1$ 二重破壊株はプロリンを含まない最少培地では生育できず、完全なプロリン要求性を示した（図 7）。

このプロリン要求性酵母は、YPD 培地や SC 培地などの富栄養培地では生育できず、最少培地にプロリンを添加した場合にのみ生育することができた（図 8）。この理由は明らかではないが、YPD 培地のような富栄養培地では好ましい炭素源および窒素源が存在することで、資化しづらいプロリンの細胞内への取り込みが妨げられるためであると考えられている。あるいは、野生株では起こらない現象であるが、YPD 培地での培養により細胞毒性を示す何らかの化合物が細胞内に蓄積するためであると考えられている。（Brandriss, 1979）。また、酵母において、*PRO1* と *CAR2* の二重破壊は合成致死であると報告されているが（Deutscher et al., 2006）、合成致死になる原因についても、培地が適切でないために取得できなかったのではないかと考えられる。

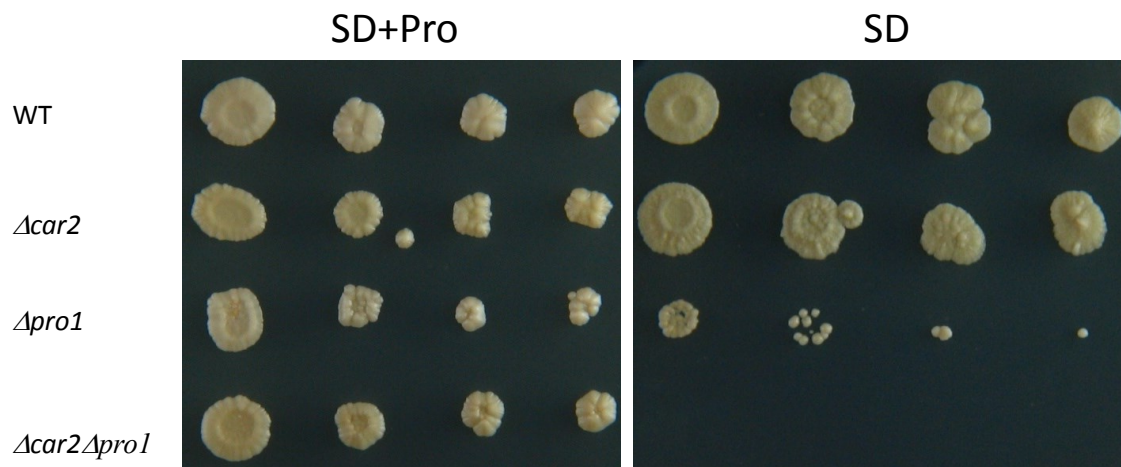


図 7 各破壊株のプロリン要求性 $OD_{600} = 1.0$ の各培養液に関して $1 \sim 10^{-3}$ の段階希釈系列を調製し、SD または SD+10 mM Pro 培地にそれぞれ 3 μ l スポットし、30℃で 4 日間培養した。

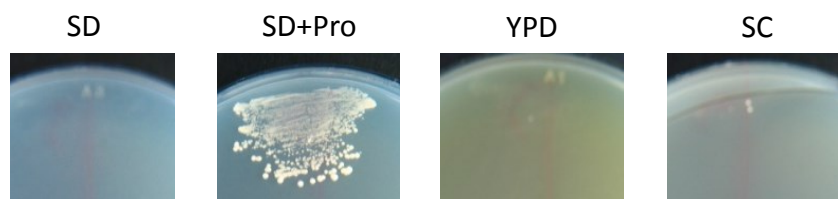


図 8 プロリン要求性酵母の各種培地における生育 プロリン要求性酵母 (BY4741 $\Delta car2 \Delta pro1$) を各培地にストリークし 30℃で 3 日間培養した。

2-3-3 プロリン要求性酵母を用いた相補性実験

作製したプロリン要求性酵母 $\Delta car2 \Delta pro1$ 二重破壊株を用いて、C 末端欠損型 GK の機能相補実験を行った。大腸菌 のプロリン要求性株を用いた相補実験の結果から、リンカー領域が GK 活性に必須であることが示唆された (図 6)。そこで新たに、PUA ドメインを残してリンカー領域の長さが種々異なる、KD+PUA(+14)、KD+PUA(+36)、KD+PUA(37-67)およびリンカー領域の全長と PUA ドメインの半分だけを残した KD+110 を酵母発現用ベクター3HA-pAD4 にクローニングし (図 9)、 $\Delta car2 \Delta pro1$ 二重破壊株に導入して相補実験を行った。その結果、野生型 GK、KD+67 および KD+110 発現株はプロリンを含まない最少培地で生育することができ、プロリン要求性を回復した (図 10A)。ただし、KD+67 および KD+110 発現株は生育遅延を示した。また、PUA ドメイン全体を有していてもリンカー領域が一部でも欠けるとプロリン要求性の回復は見られず、GK の機能を著しく欠損していることが示された (図 10A)。

次にタンパク質の発現を確認するためにウエスタンブロットを行った結果、すべてのタンパク質が、予想される分子量の位置に、酵母細胞内で発現していることが示された。また、大腸菌での結果 (図 6B) とは異なり、機能相補しなかった変異型 GK も、タンパク質量の著しい減少は認められなかった (図 10B)。以上の結果から、変異型 GK 発現株において見られる増殖阻害は GK のタンパク質の不安定性ではなく、主に GK 活性の低下によるものであると結論付けられた。その上で、*in vivo* において GK 活性を発揮するためにはリンカー領域の全長が必須であること、また、PUA ドメインは GK 活性に必須ではないが、高い活性の維持に重要な役割を担っていることが明らかになった (Kaino et al., 2012)。

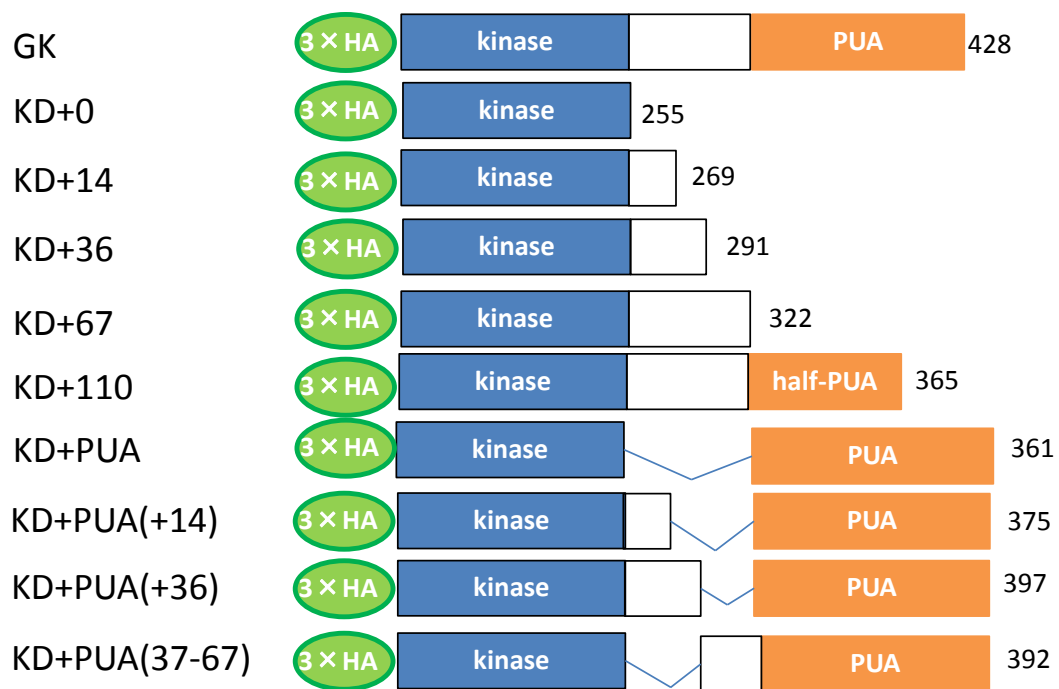


図 9 GK および C 末端欠損型 GK の一次構造模式図 数字はアミノ酸残基数を表す。

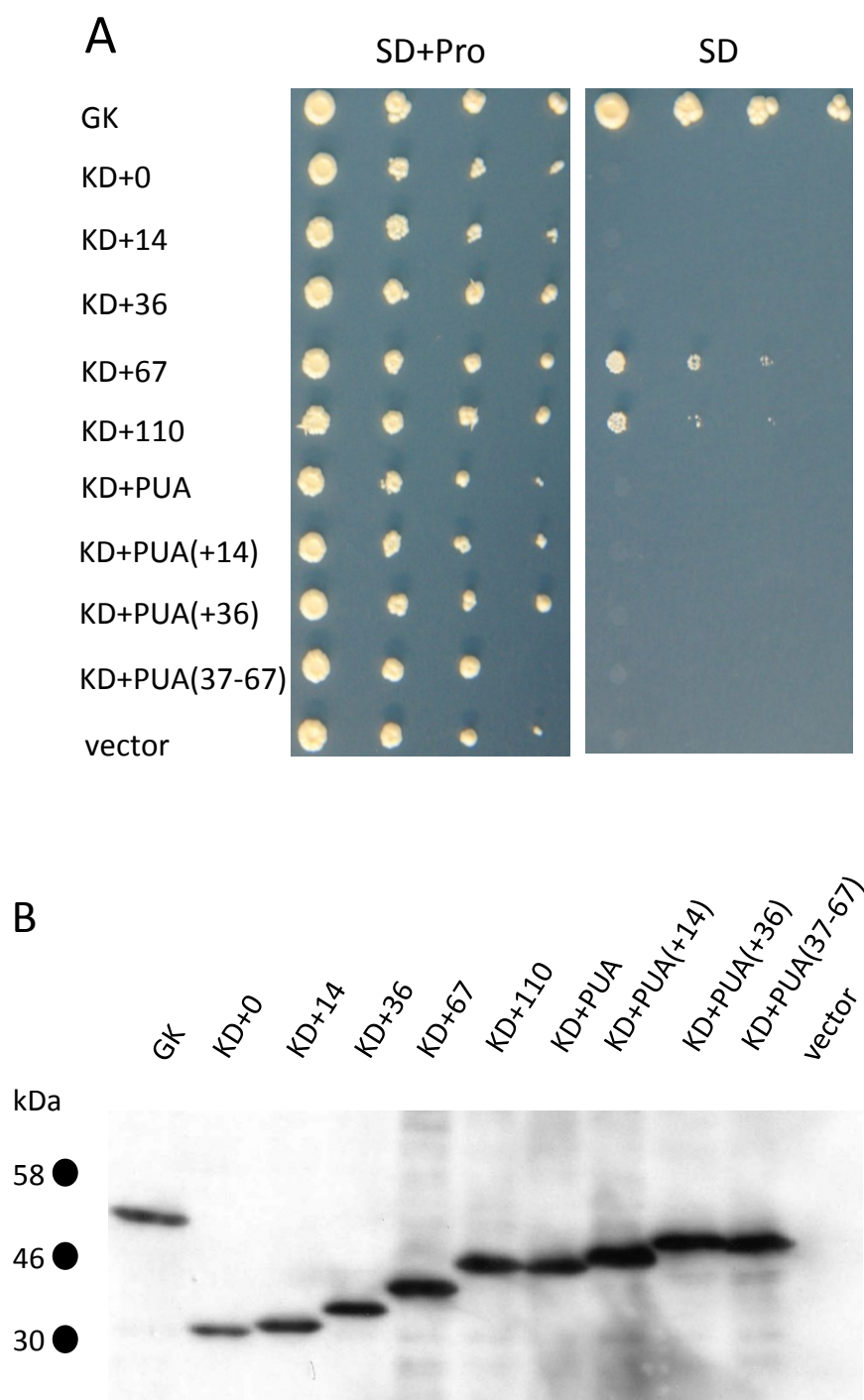


図 10 プロリン要求性酵母株を用いた C 末端欠損型 GK による機能相補実験 (A) OD₆₀₀ = 1.0 の各培養液に関して 1 ~ 10⁻⁴ の段階希釈系列を調製し、SD または SD+10 mM Pro 培地にそれぞれ 3 µl スポットし、30°C で 4 日間培養した。(B) ウェスタンブロット解析。10% ポリアクリルアミドゲルを使用し、総タンパク質量 10 µg を泳動した。各タンパク質は anti-HA 抗体、anti-mouse IgG 抗体および ECL plus を用いて検出した。

2-3-4 野生型 GK および KD+67 の酵素学的解析

PUA ドメインの有無が KG 活性に及ぼす影響を解明するために、大腸菌 Rosetta (DE3) 株を用いて野生型 GK および KD+67 の発現を行い、Ni-NTA で精製し、酵素学的な解析を行った。*In vitro* で酵素活性を測定した結果、図 11 および表 4 に示すように、KD+67 の最大速度定数 $V_{\max}$ 値は、グルタミン酸および ATP の両基質のいずれに対しても野生型の約 1%にまで減少した。一方、KD+67 のグルタミン酸に対するミカエリス定数 K_m 値は、野生型 GK の約 2 倍と大きな差は見られず、ATP に対する K_m 値は、野生型 GK と KD+67 との間に有意な差が見られなかった。さらに、アロステリック性を示す Hill 係数についても、野生型 GK および KD+67 の間にほとんど差は見られなかった。次に、GK 活性のプロリンによるフィードバック阻害についても調べたが、野生型 GK および KD+67 の間に明確な差は確認できなかった (図 12)。

これらの結果から、*in vivo* における相補性実験の結果と矛盾することなく、PUA ドメインが高い GK 活性の維持に重要であることが明らかとなった。また、基質であるグルタミン酸と ATP および阻害剤であるプロリンとの親和性に、PUA ドメインはほとんど影響を与えないことが判明した。また、Hill 係数が野生型 GK と KD+67 で同一であったことから、PUA ドメインは GK のアロステリック制御にも大きく関与していないことが明らかになった (Tatehashi & Takagi, 2013)。

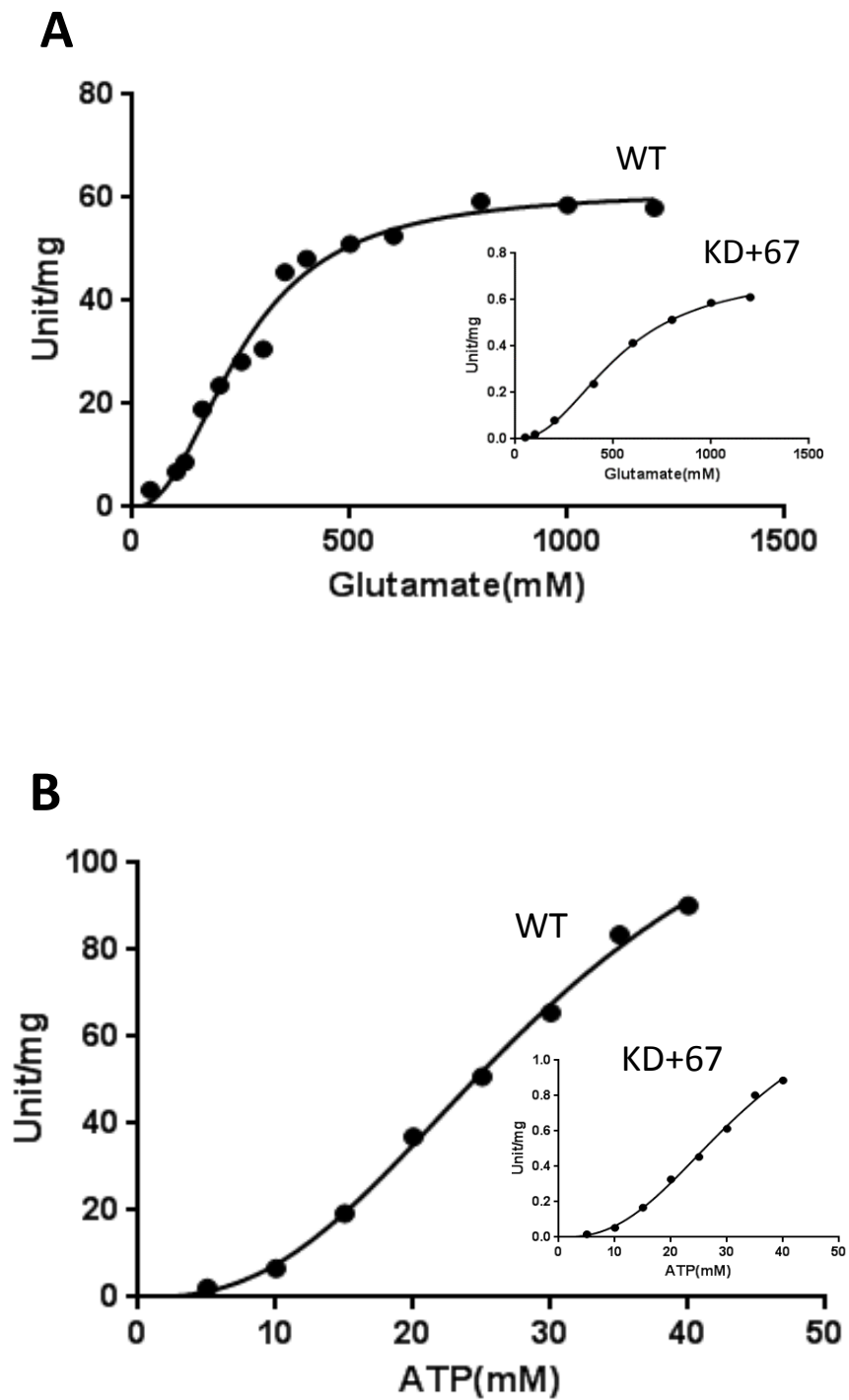


図 11 野生型 GK および KD+67 の酵素学的解析 GK の基質であるグルタミン酸濃度 (A) および ATP 濃度 (B) の違いによる野生型 GK および KD+67 の比活性の変化を観察した。

表 4 野生型 GK および KD+67 のキネティクスパラメータ

Enzyme	Glutamate			ATP		
	$V_{\max}$ (Units/mg)	K_m (mM)	Hill	$V_{\max}$ (Units/mg)	K_m (mM)	Hill
Wild-type	61.4 ± 1.3	251.1 ± 8.0	2.25 ± 0.13	135.4 ± 14.3	30.1 ± 2.7	2.57 ± 0.22
KD+67	0.715 ± 0.017	529.2 ± 14.6	2.26 ± 0.09	1.49 ± 0.23	33.9 ± 4.3	2.55 ± 0.26

独立した 3 回の実験から平均値と標準誤差を測定した。

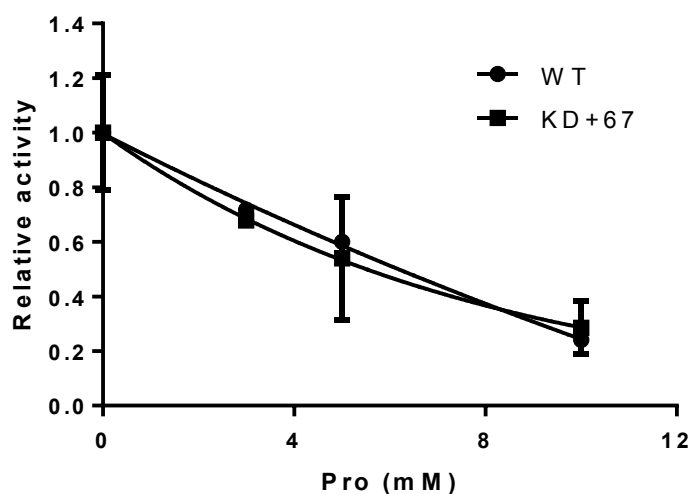


図 12 プロリン濃度による酵素活性の影響 野生型 GK および KD+67 のプロリン濃度による GK 活性の阻害を観察した。3 回の独立した実験から平均値と標準偏差を求めた。

2-3-5 GK と高い相同性を示す機能未知遺伝子 *YHR033W* の解析

酵母には GK と高い相同性を示す機能未知遺伝子 *YHR033W* が存在している。GK と *YHR033W* の推定遺伝子産物のアミノ酸配列の同一性は 67% と非常に高く、キナーゼ活性に必須と推定されている活性中心のアミノ酸残基も保存されている (図 13A)。しかし、*CAR2* と *PRO1* の二重破壊がプロリン要求性を示したことから、*YHR033W* 遺伝子は発現していない可能性が考えられた。そこで、*YHR033W* 遺伝子産物が GK の機能を相補するか否かを確認するため、プロリン要求性酵母 *Δcar2 Δpro1* 二重変異株に、構成的プロモーターである GPD プロモーターの下流に *YHR033W* 遺伝子の ORF を繋げたプラスミドを導入した。しかし、この形質転換体においてプロリン要求性の回復は見られなかった (図 13B)。この結果から、*YHR033W* 遺伝子産物は GK 活性をほとんど有しておらず、当該遺伝子は擬似遺伝子である可能性が考えられる。

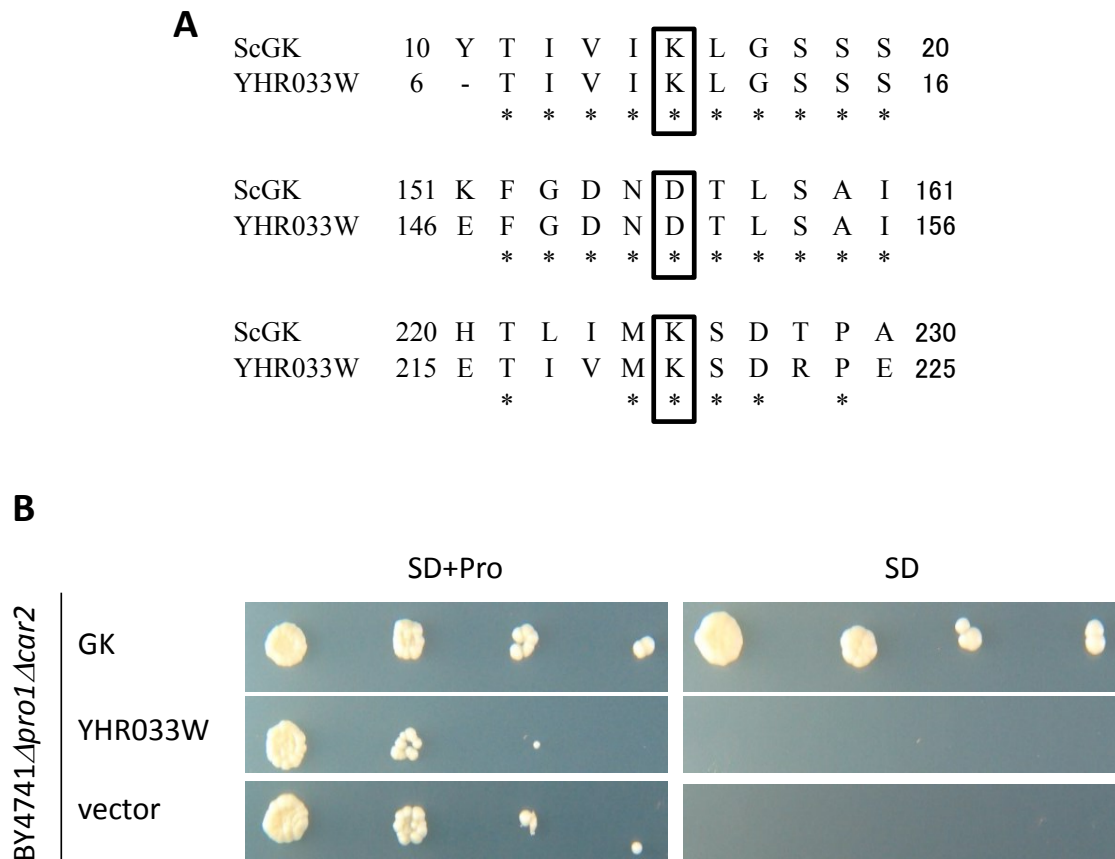


図 13 プロリン要求性酵母株を用いた機能未知遺伝子 *YHR033W* による機能相補実験 (A) GK および YHR033W のアミノ酸配列を表す。活性中心と推定されるアミノ酸残基を黒枠で示す。アスタリスク (*) は同一のアミノ酸残基を表す。(B) プロリン要求性酵母 Δ car2 Δ pro1 に各遺伝子を導入した株の培養液 (OD₆₀₀ = 1.0) に関して 1 ~ 10⁻³ の段階希釈系列を調製し、SD または SD+10 mM Pro 培地にそれぞれ 3 μ l スポットし、30°C で 4 日間培養した。

2-4 考察

プロリン合成を開始する GK には触媒活性を示すキナーゼドメインの他に C 末端側に PUA ドメインが存在している。PUA ドメインは RNA 結合ドメインであり、一般的に RNA 代謝と関わりのあるタンパク質に多く見出せる。しかし、プロリン合成酵素である GK における PUA ドメインの役割は不明な点が多い。そこで、本研究では GK の PUA ドメインを含む C 末端領域に着目し GK の酵素活性に与える影響を解析した。

PUA ドメインの欠損による GK 活性への影響について

遺伝学および酵素学的な解析から PUA ドメインは GK の酵素活性に必須ではないことが明らかになった。まず、プロリン要求性の GK 遺伝子破壊株である KC1325 (*AproB*) 株に種々の C 末端領域を欠失させた GK を発現させたところ、PUA ドメインのみが欠失した KD+67 発現株でプロリン要求性の回復が見られた。しかし、プロリンを含まない培地上での生育の遅延が見られた。また、プロリン要求性酵母である BY4741 Δ *car2Apro1* 株を用いた実験においても、大腸菌と同様に KD+67 を発現させた株ではプロリンを含まない培地で生育の遅延が観察された。一方、大腸菌 KC1325 株および酵母 Δ *car2Apro1* 株での相補実験から、キナーゼドメインと PUA ドメインの両ドメインを繋ぐリンカー領域の一部が欠損すると、プロリン要求性の回復が見られず、GK 活性を示さないことから、酵母 GK 活性の発現にはリンカー領域が必須であることが明らかとなった。また、リンカー領域を欠失した GK (KD+0, KD+14, KD+37) の大腸菌内でのタンパク質は可溶性画分に検出できたが、GK 活性を示した野生型 GK および KD+67 よりも著しく低下していた。この結果は、リンカー領域を欠失した GK (KD+0, KD+14, KD+37) では大腸菌内で安定に存在できないためであると考えられる。リンカー領域には GK のキナーゼドメインが正しいフォールディングを形成するために重要な役割があるのかも知れない。このことを証明するために、リンカー領域が欠損した変異型 GK の円偏光二色性スペクトルを測定し、タンパク質の二次構造を野生型酵素と比較することでリンカー領域が正しいフォールディングの形成に関与するかどうかを考察できると思われる。

また、酵素学的な解析からも KD+67 の $V_{\max}$ 値はグルタミン酸および ATP の両基質において約 1%まで低下していた。これらのことから、遺伝学および酵素学的な解析のどちらの結果からも、GK の PUA ドメインが GK の酵素活性に必須ではないが、高い酵素活性の発現に重要な機能を有していることが明らかとなった。PUA ドメインはキナーゼドメインとは独立した高次構造を形成してい

るが (Marco-Marin et al., 2007)、キナーゼドメインを介した触媒反応の促進に何らかの影響を与えていると思われる。一般的に化学反応は基質が活性化された遷移状態を経由して生産物を生成する。触媒 (酵素) はこの遷移状態に至るまでのエネルギー障壁を低く抑えることで反応速度を上げている。これを酵素による触媒反応に当てはめると、まず、酵素基質複合体が形成される。次に基質が活性化状態へと遷移する。遷移状態にある基質は生産物へと変化し、最後に生産物が酵素から解離する。酵素は遷移状態に至るまでの障壁を低く抑えることにより反応速度を増大させているのは、酵素が遷移状態にある不安定な活性錯体を安定化させるためである。一方、酵素における反応において誘導適合と呼ばれる考え方がある。誘導適合は、酵素と基質が複合体を形成後、基質が遷移状態になる時に、酵素の僅かなコンフォメーション変化が起き、その僅かな変化が遷移状態にある活性錯体を安定化させるというものである。KD+67 の基質との親和性については野生型 GK と差がなかったことから、遷移状態に移る際の活性錯体の安定化に PUA ドメインが寄与しているものと考えられる。これらの事実を踏まえると、PUA ドメインは触媒部位であるキナーゼドメインに影響を与え、遷移状態にある活性錯体を安定化させるための僅かなコンフォメーション変化を引き起こすために重要な働きをしているのではないかと考えられる (図 14)。

一方、野生型 GK と KD+67 の Hill 係数にはほとんど変化が見られなかった。さらに、GK 活性のプロリンによるフィードバック阻害についても野生型と KD+67 の間で有意な差は見られなかった。この結果は、PUA ドメインは基質および阻害剤であるプロリンとの親和性に影響を与えないことを示している。また、Hill 係数に変化が見られなかったことから PUA ドメインがアロステリック制御に関わっていないことも明らかとなった。

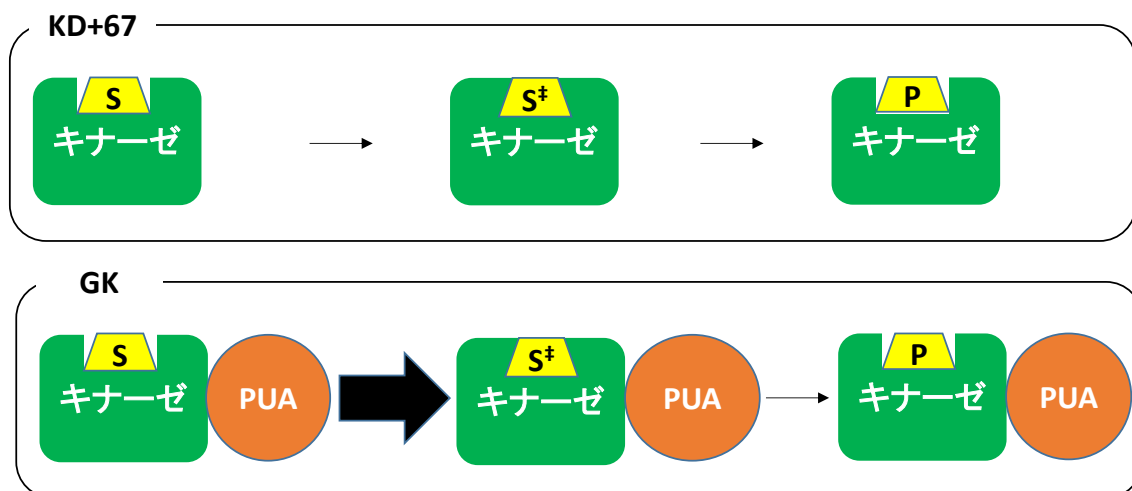


図 14 KD+67 と GK の違いによる反応速度の違いを表すモデル図 GK は活性化錯体を安定化させるためのコンフォメーション変化を起こしやすいため、高い触媒効率を発揮する。一方、PUA ドメインが欠損した KD+67 では、活性化錯体を安定化させるためのコンフォメーション変化が起き難いために反応速度が低下する。S は基質、 $S^\ddagger$ は活性化錯体、P は生産物をそれぞれ表す。

GK と高い相同性を持つ *YHR033W* について

Apro1 はプロリン要求性を示さなかったが、プロリンを含まない培地での生育が遅延していた。しかし、培地中へのプロリンの添加によって、野生株と同程度の生育速度を示した。この結果から、*Apro1* 株の細胞内ではプロリンが十分量合成されないことが、生育の遅延を起こしていたものと考えられる。また、オルニチンからのプロリン合成はほとんど行われておらず、プロリン合成の主要経路はグルタミン酸から GK によって行われていると考えられる。

PRO1 のパラログ遺伝子である *YHR033W* の推定一次構造は GK と高い相同性を示すが、相補実験の結果から同遺伝子産物に GK 活性は確認できなかった。植物や一部の微生物には、プロリン合成の鍵酵素である P5CS あるいは GK が 2 つ存在している。一つは恒常的に発現しているが、もう一方は高浸透圧に応答して発現が誘導される。高浸透圧によって誘導される P5CS (あるいは GK) はプロリンによるフィードバック阻害を受けないことで、細胞内にプロリンを蓄積し、高浸透圧に適応している (Brill et al., 2011; Pérez-Arellano et al., 2010)。このように、高浸透圧に応答してプロリンを蓄積することは高浸透圧に曝された生物の有効な生存戦略であると考えられる。一方、酵母 *S. cerevisiae* では、高浸透圧ストレスによりトレハロースやグリセロールの合成が誘導されるが、プロリン含量は増加しない。*YHR033W* は本来、高浸透圧に応答してプロリンによるフィー

ドバック阻害非感受性の GK として発現していたが、アミノ酸置換を伴う変異の導入で機能を消失したのかも知れない。実際、*S. cerevisiae* においてもプロリンの蓄積が高浸透圧ストレスに対して有効であると報告されている (Sekine et al., 2007)。またマイクロアレイによる解析では、NaCl やソルビトールといった高浸透圧ストレスによって *YHR033W* の発現上昇が確認されている (Causton et al., 2001)。

プロリン要求性酵母について

プロリン要求性酵母 *Acar2Apro1* 株は最少培地である SD 培地にプロリンを添加した場合のみ生育が見られ、富栄養培地である YPD 培地や SC 培地では生育することができなかった。この原因は明らかではないが、酵母は富栄養条件下ではプロリンのような難資化性の窒素源を取り込むパーミアーズがカタボライトリプレッションを受けることで、プロリンの取り込みが抑制されているためだと考えられている。あるいは、YPD 培地上では毒性を示す化合物が細胞内に蓄積するためであると考えられている。(Brandriss, 1979)。今後、YPD 培地上でも生育できる復帰変異株を取得し、解析することで、富栄養と最少培地条件下での違いによる代謝の調節や栄養に応答するセンサータンパク質などの解明に役立つかもしれない。

3. GK の新規生理機能に関する解析

3-1 緒言

代謝酵素の中には酵素活性に依存しない生理機能を有しているものがある。例えば、酵母 *S. cerevisiae* のシステイン合成酵素をコードする *CYS4* 遺伝子の欠損は生育遅延を引き起こすが、この表現型に酵素活性は依存していない

(Hoose et al., 2012)。また、枯草菌由来の GK は、プロテアーゼの調節因子である DegR の発現を抑制することが報告されている (Ogura et al., 1996)。これまでに当研究グループらは、*S. cerevisiae* において GK をコードする *PRO1* 遺伝子の破壊が様々なストレスに対して高い感受性を示すことを報告している

(Ando et al., 2007; Kaino & Takagi, 2009)。したがって、*PRO1* 遺伝子産物 (Pro1 タンパク質) は、プロリン合成に関わる酵素 (GK) としての機能以外にも新規な生理機能を有する可能性が示唆される。そこで、本章では酵母の GK がキナーゼとしての酵素活性以外に新規な生理機能を有している可能性の検証を目的に、詳細な解析を行った。

その結果、Pro1 タンパク質によるストレス耐性機構には GK の酵素活性は必要ではなく、C 末端側に存在し、その機能が十分に理解されていない PUA ドメインが重要であることが明らかになった。一方、*PRO1* と遺伝学的に相互作用する因子を探索した結果、リボソームの選択的なオートファジー (リボファジー) の促進に関わる Ubp3-Bre5 複合体との関係性が見出され、リボファジーには Pro1 タンパク質が必須であり、Pro1 の酵素活性が必須であることが示唆された。

本研究は、Pro1 の酵素活性に依存しないストレス耐性機構およびリボファジーの進行に重要であることを明らかにし、酵母 Pro1 によるプロリン合成以外に新たな生理機能を見出した初めての知見である。

そこで、オートファジーとリボファジーに関して、これまでの研究で得られた知見を以下に記述する。

オートファジーについて

オートファジーとは、酵母からヒトまで真核生物中に保存されているタンパク質などの分解経路である。現在、酵母では 40 を超えるオートファジー関連 (ATG) 遺伝子が同定されている。オートファジーは、栄養飢餓やラパマイシン処理などの刺激によって誘導され、まず、前オートファゴソーム構造体

(pre-autophagosomal structure : PAS) と呼ばれる構造体が液胞近傍に形成されることで始まる (Reggiori & Klionsky, 2013)。PAS は、Atg タンパク質が多数集まった構造体であり、ここから隔離膜が形成されオートファゴソームと呼ばれる二重の脂質膜が形成される。オートファゴソームは、細胞質に存在する成分を内部に取り込みながら発達し、ミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官も取り込むことがある。その後、液胞と融合し、オートファゴソーム内の内容物が液胞内に移行する。脂質の単膜で覆われたオートファジックボディは、液胞内に存在する種々の加水分解酵素によって速やかに分解を受け、生じたアミノ酸などは細胞質に戻され再利用され则认为られている (図 15) (田中啓二ら、2006)。酵母のオートファジー欠損株では栄養飢餓時の生存率が著しく低下することから、栄養飢餓に対する適応に、オートファジーに依存した細胞内成分の分解が必須であることが示されている (田中啓二ら、2006)。また、二倍体酵母では飢餓条件下で孢子が形成されるが、オートファジー欠損株では孢子形成を起こさないとから、孢子形成時にオートファジー依存的に不要なタンパク質の分解を行い、生じたアミノ酸を用いて孢子形成に必要なタンパク質合成を行っていると考えられている。

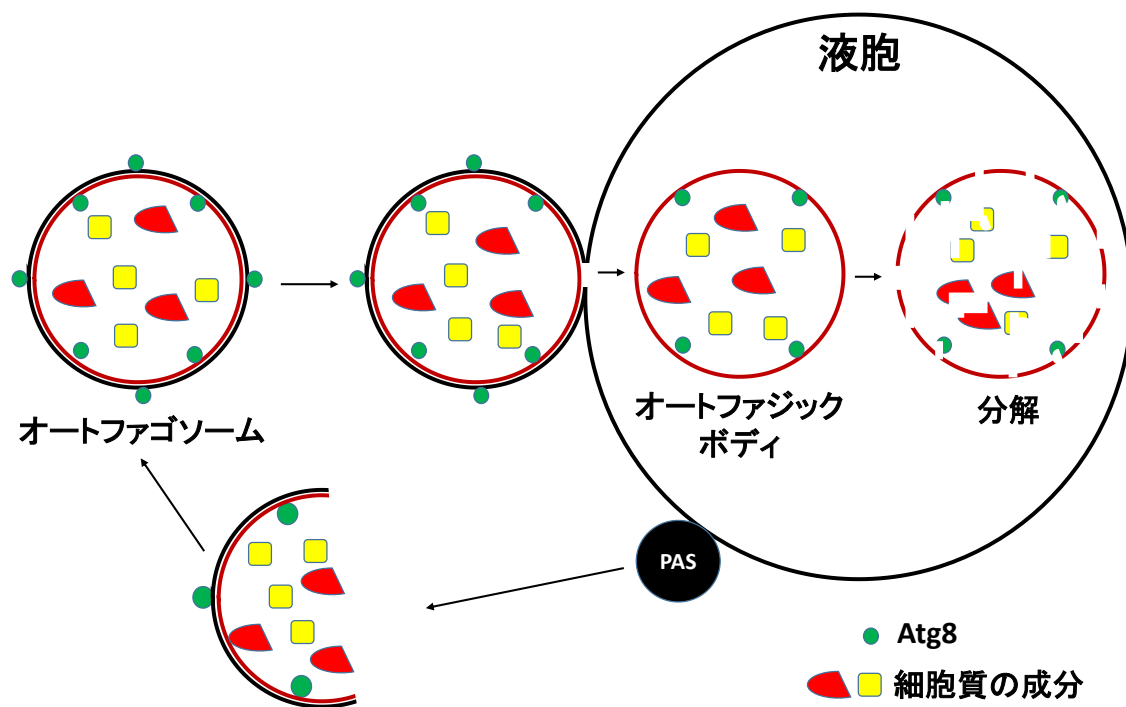


図 15 オートファジーにおける分子機構の概要 オートファジーは PAS と呼ばれる Atg タンパク質が多数集積した構造体が液胞の近傍に形成される。その後、脂質二重膜を伸長しながら内部に細胞質成分を取り込み、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームの外膜上および内膜上には、Atg8 が結合している。オートファゴソームは液胞と融合し、脂質の単膜で覆われたオートファジックボディが液胞内に輸送される。オートファジックボディは液胞内の加水分解酵素によって速やかに分解される。

オートファジーの分子機構

オートファジーにおいて最も重要な機構の1つが、隔離膜であるオートファゴソームの形成である。オートファゴソームの形成に必須の Atg タンパク質として、これまでに 18 種類が同定されている（小原圭介、大隅良典、2008）。オートファゴソームの形成は主に 6 つのグループに分けられ、1) Atg1 複合体、2) Atg9、3) フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 複合体、4) Atg2-Atg18 複合体、5) Atg12 結合系、6) Atg8 結合系、である。

1) Atg1 複合体

PAS は多数の Atg タンパク質で構成されており、Atg1 複合体が PAS 形成の中心的な役割を果たすと考えられている。Atg タンパク質の中で Atg1 は唯一のキナーゼタンパク質である。Atg1 は Atg13 と複合体を形成することで活性化される。富栄養状態では Atg13 は TOR 複合体 1 によってリン酸化されている。リン酸化された Atg13 は Atg1 と弱い相互作用しか示さないが、栄養飢餓やラパマイシン処理によって Atg13 が脱リン酸化状態になることで、Atg1-Atg13 複合体が形成され活性化される（図 16）（Kamada et al., 2000）。この Atg1-Atg13 複合体にさらに、Atg17、Atg29、Atg31 と相互作用し PAS の形成が進行する。Atg1 複合体の変異株では Atg タンパク質が PAS へ局在しないことから（Kawamata et al., 2008）、Atg1 複合体が PAS 形成の始動装置として機能していると考えられる。

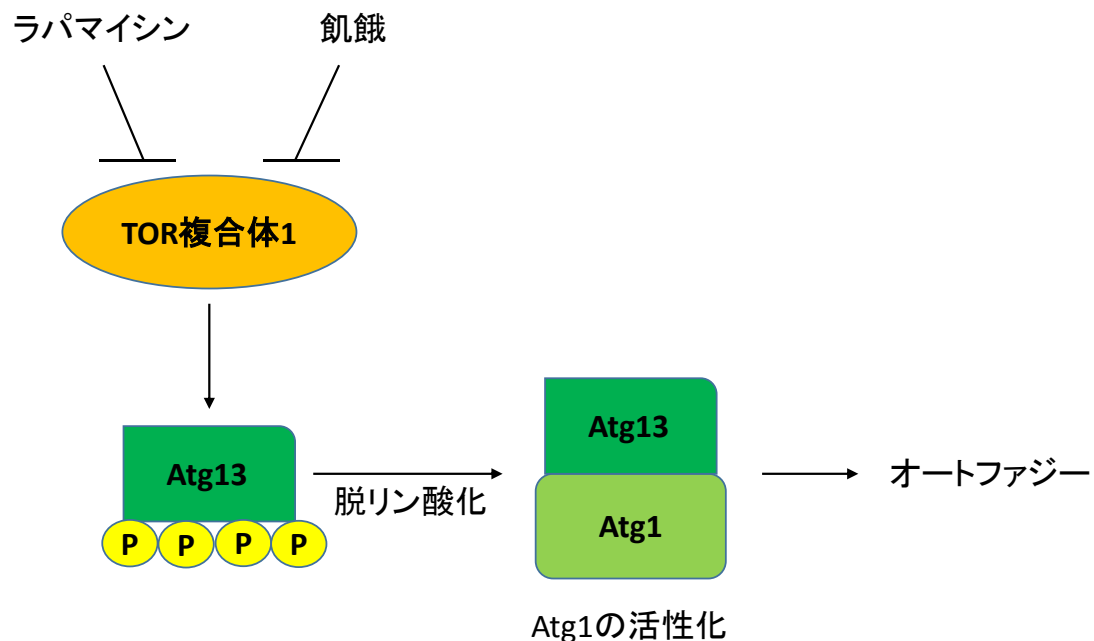


図 16 Atg1 複合体の活性化機構 富栄養下では Atg13 は TOR 複合体 1 によりリン酸化されている。ラパマイシン処理や飢餓によって TOR 複合体 1 の活性が抑制されると Atg13 は脱リン酸化される。脱リン酸化された Atg13 は Atg1 と複合体を形成することで Atg1 が活性化されオートファジーが誘導される。P はリン酸を表す。

2) Atg9

Atg9 は Atg タンパク質の中で唯一の膜貫通タンパク質である。その役割は PAS への脂質の輸送であると考えられており、Atg9 による脂質の供給によってオートファゴソームが形成されると考えられる (Yamamoto et al., 2012)。Atg9 の PAS へのリクルートは Atg1 複合体が担っていると考えられている。

3) PI3K 複合体

Vps30 は液胞酵素の輸送に関わるタンパク質として最初に同定されたが (Robinson et al., 1989)、後にオートファジーに必須の因子である明らかになり Atg6 という別名が与えられた (Tsukada & Ohsumi, 1993)。ATG6 の変異株ではオートファジーと液胞輸送の 2 つに異常が見られた。Atg6 はフォスファチジルイノシトール (PI) をリン酸化してフォスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) を生産するキナーゼ複合体 (PI3K 複合体) のサブユニットである (図 17)。PI のリン酸化を触媒するキナーゼは Vps34 であり、Vps34 は 2 つの複合

体を形成する（複合体 I および複合体 II）（Schu et al., 1993; 荒木保弘、大隅良典、2012）。複合体 I はオートファジーに、複合体 II は液胞輸送に必須であった。複合体 I は Vps34 の他に、Atg6、Atg14、Vps15 からなる。一方、複合体 II は Vps34 の他に Atg6、Vps15、Vps38 から構成される。Atg6 は複合体 I および複合体 II のどちらにも必須の構成因子であったことから、オートファジー欠損と液胞輸送の両方に異常を生じた。一方、複合体 I のみの構成因子である *ATG14* の変異株ではオートファジー欠損しか示さなかった。

4) Atg2-Atg18 複合体

Atg18 は PI3P と Atg2 の二つと相互作用することで、Atg2 を PAS ヘリクルートする働きを持つと考えられている（図 17）（Obara et al., 2008）。しかしながら、*ATG18* 欠損株において Atg2 を人為的に PAS へ局在させてもオートファジーが完全に回復しないことから、Atg18 は PI3P との相互作用に依存しないオートファゴソーム形成の機能があると考えられている（Kobayashi et al., 2012）。Atg2 の PAS への局在はオートファゴソーム形成に必須であるが、既知の機能ドメインが見られずオートファゴソーム形成における役割は謎のままである。

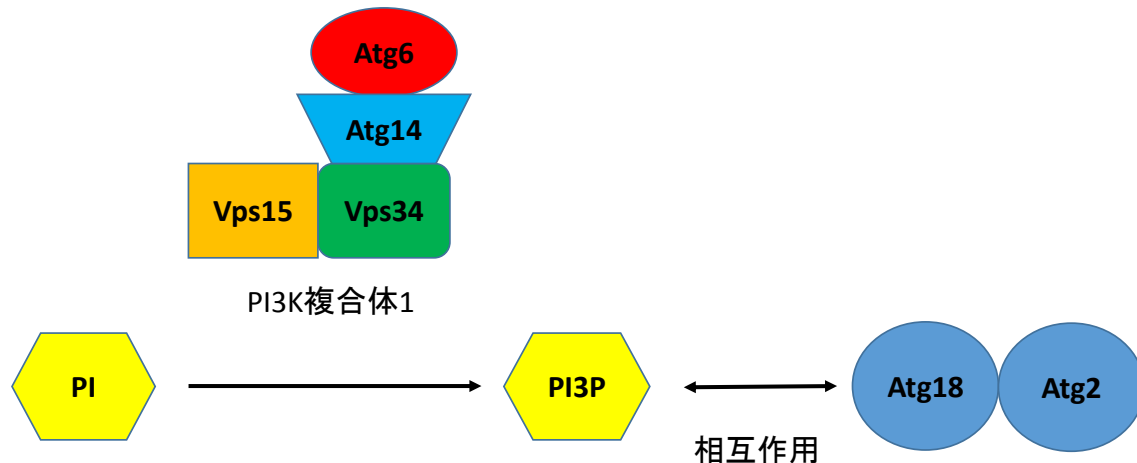


図 17 PI3K 複合体による PI3P の生産と Atg2-Atg18 複合体 Vps34、Vps15、Atg14、Atg6 から構成される PI3K 複合体 I は PI をリン酸化し PI3P を生産する。PI3P は Atg18 と相互作用することで、Atg2-Atg18 複合体を PAS ヘリクルートする働きがあると考えられている。PI はフォスファチジルイノシトール、PI3P はフォスファチジルイノシトール 3-リン酸、PI3K はフォスファチジルイノシトール 3-リン酸キナーゼをそれぞれ表す。

5) Atg12 結合系

Atg12 はユビキチン様タンパク質であり、最終的にユビキチン結合様の反応により Atg5 と共有結合が形成される。ユビキチン化の反応は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン化結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の3つの酵素によって触媒される。E1 は ATP 依存的にアデニル化された中間体を経てユビキチンと共有結合する。ユビキチンは次に E2 酵素へと転移され、最後に、E3 による反応によってターゲットタンパク質がユビキチン化される。Atg12 におけるユビキチン化結合様の反応には、Atg7 と Atg10 によって行われる。まず、E1 に相当する Atg7 が ATP 依存的に Atg12 のグリシン残基と Atg7 のシステイン残基との間に共有結合を形成させる。次に、E2 に相当する Atg10 に Atg12 が転移される。最後に、Atg12 は Atg5 と共有結合が形成される。この Atg12-Atg5 の共有結合を触媒する E3 に相当する酵素は見つかっていないが、*in vitro* の実験において Atg7 と Atg10 のみで Atg12-Atg5 の結合が触媒されたことから、E3 は不要であると考えられている (Yamaguchi et al., 2012)。また、Atg7 は後述する Atg8 結合系においても E1 として機能する。Atg12-Atg5 は Atg16 と相互作用し、Atg8 結合系における E3 として機能している (図 18)。

6) Atg8 結合系

Atg8 はフォスファチジルエタノールアミン (PE) と共有結合を形成することで、オートファゴソームの外膜および内膜上に局在する。PE と Atg8 の共有結合反応は Atg12 結合系と同様にユビキチン化反応と酷似しており、E1 様タンパク質である Atg7、および E2 様タンパク質 Atg3 によって触媒される。まず、Atg8 はプロテアーゼである Atg4 によって C 末端のアルギニン残基が切断され、116 番目のグリシン残基が露出する (Kirisako et al., 2000)。その後、この露出したグリシン残基と Atg7 のシステイン残基がチオエステル結合した中間体を形成し、Atg3 のシステイン残基を経由して PE へと共有結合される。PE へのユビキチンリガーゼ様の反応は Atg12-Atg5/Atg16 複合体が触媒している (図 18) (Handa et al., 2007)。Atg8 の PE 化による膜への共有結合は、リボソームの凝集を起こすことから、オートファゴソームの膜形成に寄与しているものと考えられている (Nakatogawa et al., 2007)。また、オートファゴソームの内膜に共有結合した Atg8 は液胞に運ばれ分解を受けることから、GFP と融合タンパク質として発現させることで、オートファジーをモニターするマーカータンパク質としても活用されている。

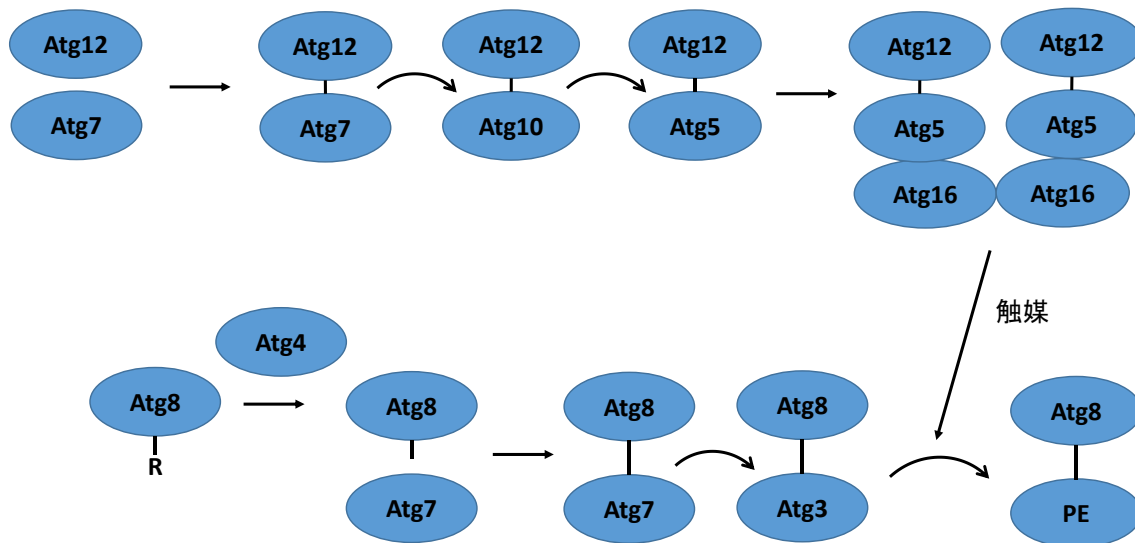


図 18 二つのユビキチン様タンパク質 Atg12 と Atg8 の結合反応 Atg12 は E1 様タンパク質 Atg7 と E2 様タンパク質 Atg10 によって、Atg5 と共有結合が形成される。共有結合した Atg12-Atg5 は Atg16 と相互作用する。Atg8 は Atg4 によって C 末端のアルギニン残基が切断される。その後 Atg8 は、E1 様タンパク質 Atg7 と E2 様タンパク質 Atg3 を経て PE と共有結合が形成される。Atg8 の PE への E3 様の結合反応は、Atg12-Atg5/Atg16 複合体によって触媒される。PE は フォスファチジルエタノールアミンを表す。

オートファジーの生理的意義

酵母細胞では、炭素源、窒素源、硫黄源などの飢餓によってオートファジーが誘導されることが報告されている (Takeshige et al., 1992)。飢餓の中でも特に、窒素飢餓によって強くオートファジーが誘導されたため、オートファジー研究に窒素飢餓条件がよく用いられてきた。ATG 遺伝子を欠損したオートファジー不全株を窒素飢餓培地に移すと野生株よりも早く生存率が低下することが明らかになっている (田中啓二ら、2006)。このことから、オートファジーの機能は窒素飢餓に適応するために必須であることが理解する。オートファジーの分子機構に比べてオートファジーの生理的意義についての理解は遅れているが、近年、飢餓によって誘導されるオートファジーの生理的役割について様々なことが明らかになりつつある。

1) オートファジーによるタンパク質の分解とアミノ酸供給

窒素飢餓条件下でオートファジー依存的に分解されるタンパク質を網羅的に

解析したところ、他のタンパク質よりも迅速に分解されるタンパク質として Ald6 が同定された (Onodere & Ohsumi, 2004)。Ald6 は細胞質に存在する NADP⁺ に依存して、アセトアルデヒドを酸化し酢酸を生産する酵素である。ALD6 遺伝子欠損株や不活性型変異の Ald6 の発現は生存率を向上させるのに対して、Ald6 の過剰発現株では生存率の低下が見られた (Onodere & Ohsumi, 2004)。このことから、Ald6 をオートファジーによって速やかに分解する機構は、細胞が窒素飢餓に適応するために重要であることが示された。この原因は明らかにされていないが、Ald6 の反応は NADPH の供給源になっていることから、窒素飢餓時の NADPH の供給を抑えることが重要なかもしれない (Onodere & Ohsumi, 2004)。また、Ald6 によって生産される酢酸は、アセチル CoA へ代謝される。近年、アセチル CoA の減少がオートファジーを促進させることが明らかとなった (Mariño et al., 2014; Eisenberg et al., 2014)。Ald6 の過剰発現は、窒素飢餓条件下でも細胞内のアセチル CoA 濃度が高く維持されることでオートファジーの抑制に繋がり、生存率の低下を招いているのかもしれない。

一方、窒素飢餓条件下で、著しく発現量が増加するタンパク質として Arg1 や Hsp26 が同定された (Onodera & Ohsumi, 2005)。しかし、オートファジー欠損株では、窒素飢餓時の Arg1 や Hsp26 の mRNA レベルは野生株と同程度であるにもかかわらず、タンパク質レベルでの発現上昇が観察されなかった。このことから、窒素飢餓条件下におけるオートファジー欠損株は、細胞内アミノ酸の枯渇によってタンパク質合成能が低下している可能性が考えられた。そこで、窒素飢餓時のアミノ酸プールの経時的变化が観察された。窒素飢餓によって、野生株およびオートファジー欠損株のどちらも急激なアミノ酸プールの減少が見られた。しかし、野生株では、およそ 3 時間後からアミノ酸プールの一時的な回復が見られ、その後も少なくとも 24 時間後まではある程度のアミノ酸プールを維持していた。対して、オートファジー欠損株ではアミノ酸プールの回復は見られず、24 時間後には、アミノ酸プールは殆ど無い状態まで低下していた。これらの結果から、窒素飢餓条件下でオートファジー依存的に生じるアミノ酸は Arg1 や Hsp26 などの新規タンパク質合成に必須であることが明らかとなった (Onodera & Ohsumi, 2005)。

2) オートファジーによるミトコンドリアの品質管理

ミトコンドリアの選択的オートファジーをマイトファジーと呼び、ミトコンドリアの外膜に存在する Atg32 および Atg33 が、選択的なオートファゴソームへの取り込みに関わるレセプター分子と考えられている (Kanki et al., 2009; Okamoto et al., 2009)。マイトファジーが欠損した ATG32 破壊株を窒素飢餓にさ

らすと、生存率の低下は野生株と差が見られないが、ミトコンドリアの機能が欠損した異常な細胞が多数発生することが報告されている (Kurihara et al., 2012)。窒素飢餓条件下における *ATG32* 破壊株の細胞では、膜電位が低下した異常なミトコンドリアおよび、活性酸素種の蓄積が起こっていた。これらのことから、マイトファジーは異常なミトコンドリアを選択的に分解する品質管理機構であると考えることができる。

3) オートファジーによるゲノムの安定化

オートファジーは窒素飢餓条件下でのゲノム構造の安定化にも寄与している。Ty1 トランスポゾン(トランスポゾン)は酵母における挿入変異を導入するレトロトランスポゾンである。窒素飢餓条件下における Ty1 トランスポゾンの転移率を調べたところ、オートファジー欠損株である *ATG1* 破壊株では野生株よりも高い転移率を示した。Ty1 ウイルス様粒子はオートファジー依存的に分解を受けており、その選択的なオートファジーには *Atg19* が必須であった (Suzuki et al., 2011)。これらのことから、窒素飢餓時において Ty1 ウイルス様粒子をオートファジー依存的に分解することで変異の導入を抑制していることが明らかとなった。

また、ゲノムの異数体化の抑制にもオートファジーは寄与している。*ATG2* の破壊株を窒素飢餓条件下で培養後、富栄養培地に移し培養するとゲノムが異数体化した細胞が野生株より多く生じた (Matsui et al., 2013)。窒素飢餓条件下では核内成分がオートファジー依存的に分解されることが知られており、近年では核の選択的なオートファジーにおけるレセプターとして *Atg39* が同定された (Mochida et al., 2015)。*ATG39* が欠損した株では、窒素飢餓条件下で核の形態に異常を生じ、野生株より顕著に生存率が低下した。オートファジーがゲノムの異数体化を抑制する機構は不明であるが、核の選択的なオートファジーにより異数体化した異常な染色体を特異的に分解しているのかもしれない。

リボファジーについて

オートファジーの中でも特に、リボソームの選択的なオートファジーはリボファジーと呼ばれる (Kraft et al., 2008)。哺乳類細胞ではリソソーム(酵母の液胞に相当する)にリボソームが取り込まれることは古くから知られていたが (Trier, 1963)、その過程は非選択的なマクロオートファジーによるものと考えられていた。しかし、Kraft らは酵母細胞を用いた実験から、窒素飢餓によって誘導されるリボソームの分解が選択的なオートファジーであることを証明した (Kraft et al., 2008)。酵母を窒素飢餓条件下にさらすと、60 S リボソームタンパク質である *Rpl25* や *Rpl5* の分解が観察された。しかし、オートファゴソーム形

成に必須である *ATG7* を破壊した株では分解が観察されなかった。また、*PEP4* 遺伝子の欠損においても分解が観察されなかった (Kraft et al., 2008)。Pep4 は液胞に局在するペプチダーゼであり、Pep4 によるプロセッシングによって液胞内に局在する多くの加水分解酵素が活性化される。このため、*PEP4* 遺伝子の破壊株では多くの加水分解酵素が未成熟のため、液胞内に輸送されたタンパク質などは分解されずに蓄積する (Takeshige et al., 1992)。更に、窒素飢餓条件下でプロテアソーム阻害剤による処理を行った細胞でも、リボソームタンパク質の分解に差が見られなかった (Ossareh-Nazari et al., 2010)。これらの結果から、窒素飢餓時のリボソームの分解はオートファジーによって液胞に運ばれ分解を受けていることが明らかとなった。リボファジーに関わる因子をスクリーニングしたところ、Bre5 および Ubp3 が関与していることが見出された (Kraft et al., 2008)。Ubp3 は脱ユビキチン化酵素であり、コファクターである Bre5 と複合体を形成することで機能する (Cohen et al., 2003)。 Δ ubp3 株や Δ bre5 株あるいは、不活性型 Ubp3 (Ubp3-C469A) の発現株ではリボファジーが抑制されていた。また *UBP3* 破壊株では、窒素飢餓条件下での Rpl25 のユビキチン化レベルが野生株よりも高く維持されていた。 (Kraft et al., 2008)。一方、窒素飢餓条件下ではリボソームタンパク質をユビキチン化するユビキチンリガーゼ Ltn1 のタンパク質レベルが著しく低下していた (Ossareh-Nazari et al., 2014)。これらの結果から、Ltn1 によるリボソームタンパク質のユビキチン化はリボファジーを抑制し、反対に Ubp3-Bre5 複合体によるリボソームタンパク質の脱ユビキチン化はリボファジーを促進させると考えられている (図 19) (Kraft et al., 2008; Ossareh-Nazari et al., 2014)。ただし、Ubp3-Bre5 複合体は、大サブユニットである 60 S リボソームのリボファジーに関わるが、40 S リボソームの分解には影響を与えないことや、*UBP3* 遺伝子の欠損がリボファジーを完全に抑制しないことから、リボファジーの進行に重要な未知因子の存在が示唆される (Kraft et al., 2008; Beau et al., 2008)。一方、リボファジーが抑制される Δ ubp3 株および Δ bre5 株では窒素飢餓時の生存率が低下することが報告されている (Kraft et al., 2008)。リボソームは細胞内の全 RNA の約 80%、また、全タンパク質の 50% を占めると推定されている (Warner, 1999)。また、窒素飢餓条件下では、オートファジーによって生じたアミノ酸が、新生タンパク質の合成に必須であることが知られていることから (Onodera & Ohsumi, 2005)、細胞内の半数のタンパク質を占めるリボソームの分解は、主要なアミノ酸供給源になるのではないかと推定されている。しかしながら、リボソームのユビキチン化がリボファジーの分子機構に与える影響やリボファジーの生理的役割についての詳細は明らかにされていない。

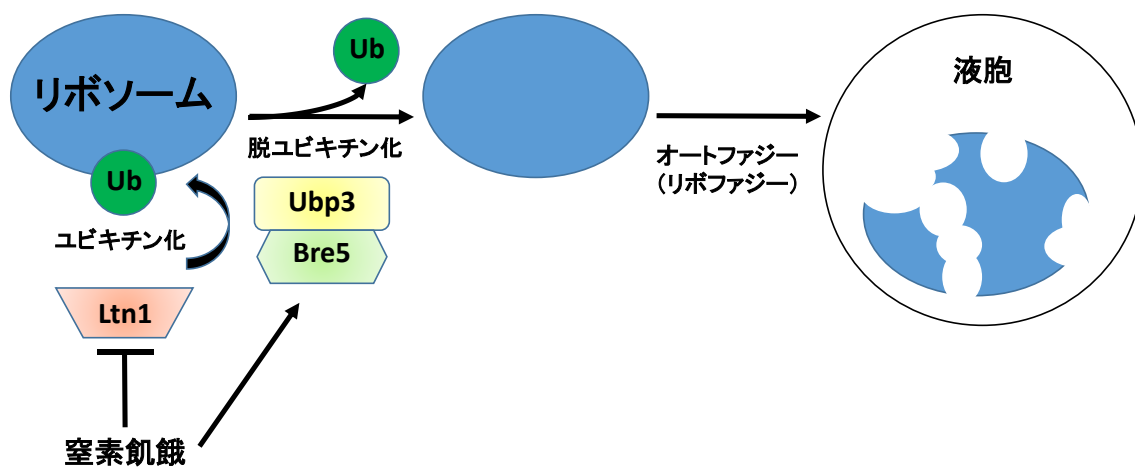


図 19 脱ユビキチン化によるリボファジーの分子機構モデル図 リボソームタンパク質をユビキチン化する Ltn1 は窒素飢餓によって発現レベルが抑制される。一方、窒素飢餓に応答してユビキチン化されたリボソームは Ubp3-Bre5 複合体により脱ユビキチン化される。脱ユビキチン化されたリボソームはオートファジーによって液胞に輸送され分解される。Ub はユビキチンを表す。

3-2 材料と方法

3-2-1 菌株

本研究で使用した菌株を表 5 に示す。

表 5 使用菌株

菌株	遺伝型
酵母	
BY4741	<i>MATa leu2Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>
<i>Δpro1</i>	BY4741 <i>pro1::CgHis3</i>
<i>Δpro2</i>	BY4741 <i>pro2::KanMx4</i>
KD+67	BY4741 <i>pro1::KD+67-3HA6His-KanMx6</i>
<i>Δbre5</i>	BY4741 <i>bre5::KanMx4</i>
<i>Δbre5 Δpro1</i>	BY4741 <i>bre5::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δdbf2</i>	BY4741 <i>dbf2::KanMx4</i>
<i>Δdbf2 Δpro1</i>	BY4741 <i>dbf2::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δgis2</i>	BY4741 <i>gis2::KanMx4</i>
<i>Δgis2 Δpro1</i>	BY4741 <i>gis2::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δhhf1</i>	BY4741 <i>hhf1::KanMx4</i>
<i>Δhhf1 Δpro1</i>	BY4741 <i>hhf1::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δhsp82</i>	BY4741 <i>hsp82::KanMx4</i>
<i>Δhsp82 Δpro1</i>	BY4741 <i>hsp82::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δist1</i>	BY4741 <i>ist1::KanMx4</i>

<i>Δist1 Δpro1</i>	BY4741 <i>ist1::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δrad10</i>	BY4741 <i>rad10::KanMx4</i>
<i>Δrad10 Δpro1</i>	BY4741 <i>rad10::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δssb2</i>	BY4741 <i>ssb2::KanMx4</i>
<i>Δssb2 Δpro1</i>	BY4741 <i>ssb2::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δubi4</i>	BY4741 <i>ubi4::KanMx4</i>
<i>Δubi4 Δpro1</i>	BY4741 <i>ubi4::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δubp3</i>	BY4741 <i>ubp3::KanMx4</i>
<i>Δubp3 Δpro1</i>	BY4741 <i>ubp3::KanMx4 pro1::CgHis3</i>
<i>Δatg7</i>	BY4741 <i>atg7::KanMx4</i>
<i>Δpep4</i>	BY4741 <i>pep4::KanMx4</i>
Rpl25-GFP	BY4741 <i>RPL25::RPL25-GFP-hph</i>
<i>Δubp3</i> Rpl25-GFP	<i>Δubp3 RPL25::RPL25-GFP-hph</i>
<i>Δpro1</i> Rpl25-GFP	<i>Δpro1 RPL25::RPL25-GFP-hph</i>
<i>Δatg7</i> Rpl25-GFP	<i>Δatg7 RPL25::RPL25-GFP-hph</i>
<i>Δpep4</i> Rpl25-GFP	<i>Δpep4 RPL25::RPL25-GFP-hph</i>

3-2-2 培地

1) SD-N

Glucose	2%
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and ammonium sulfate	0.17%

その他の培地は 2-2-2 に記載した培地の組成に準ずる。

3-2-3 プライマー

本研究で使用したプライマーを表 6 に示す。

表 6 使用プライマー

名称	オリゴヌクレオチド配列 (5' → 3')
PRO1-D156A Fw	AGAAATCAAATTTGGTGACAATGCCACTTTATCAGCAATTACTTCTG
PRO1-D156A Rv	CAGAAGTAATTGCTGATAAAGTGGCATTGTCACCAAATTTGATTTCT
PRO1(Hind III)-F	ATTAAGCTTATGAAGGATGCTAATGAGAGTAAATC
kd+67(Not I)-R	ATAGCGGCCGCGGCCTTTAGAGACAAGACCGT
PRO1(Not I)-R	ATAGCGGCCGCGACGAGGTGGGAATGCCAAATTTTC
KanMx6(pro1)-R	AATATCATTAAGGGAATCCTCTATAACTTTTTAGTTCGTTATCGATGA ATTCGAGCTCG
ADH1-R	GTGTGGAAGAACGATTACAACAG
KanMx6(ADH1)-F1	TCCTCAGAGGACAACACCTGTTGTAATCGTTCTTCCACACCGTACGCT GCAGGTCGAC
Bre5-F	TTATTTTCGTTCAAACCTCATTTTC
Bre5-R	CAGAAGAAAGTGCCCATATATCATT
Dbf2-F	TCATGGTTAGGGCTCTTCTACATAC
Dbf2-R	CCCAACATGAATGCTTAAGTTTAGT
Gis2-F	ACTCGATGTTTCATAACTATTCCAGC
Gis2-R	TTCGAAGAGCATTAATTAGCAGAT
Hhf1-F	TAATGGTTAGTGGTAAAAACCGAAG
Hhf1-R	CAGAGTAAATTCCCAAATTATTCCA
Hsp82-F	CTCATACGCTTGTACATATTGTTT
Hsp82-R	GCAAGGTCTTATAGTCACTCGTCTC
Ist1-F	GATTAAGTGAATATGACACCAAGGG
Ist1-R	AGTGTACAACCTACGACAAAGGTTCC
Rad10-F	ATACATTCTGTGAACCTGCCCTTAG
Rad10-R	GGAGGTGAGATACCCATTTTATAGAT
Ssb2-F	TTTATAGATTATGCGGAAATGGTGT
Ssb2-R	ATCAAGAGAAGAACCTTCACAACCTG
Ubi4-F	AATAATCCTGGATAAACCAATTTTCG
Ubi4-R	CTTTTCCCTTTTGGTAGTCACAATA
Ubp3-F	TCAGTCATGCTTTAGGCTTTCTATT
Ubp3-R	TGTTTCATCTCCAAGAAATAATTGGT
Ssb2-Fw	TGTTGGAAGATACCAGATTGTAAGC

Ssb2-Rv	TTTCATACGTGCCACAGCTTTG
Atg7-F	AATGACATTAGAAGATGGAGTCGAG
Atg7-R	ACGCCCCGTATCATACATAATAAAGA
Pep4-F	AGTAAAGAAGTTTGGGTAATTCGCT
Pep4-R	AGTGTTCTATGTTTGCCTTGATTT
Rpl25 (Not I) -F	ATAGCGGCCGCATGGCTCCATCTGGTATGTG
Rpl25 (Hind III) -R	ATAAAGCTTGAAATGTAACCGATTCTGTTAG
S2(Rpl25)-R	AAAAATTTAAAAATAATATTAAATTTATTAATTAAACCAATTAGAATC GATGAATTCGAGCTCG
Rpl25-up-F	CTTGCTGTTTCTCACTGGAC
Rpl25-dw-R	CCTCAATAAAAATCACAGTAC
GFP(Pagt8)-F	GTTGAGAAAATCATAATAAAATAATTACTAGAGACATGGGCTGCAGG AATTCGATATC
GFP(atg8)-R	TCAAATGGATATTCAGACTTAAATGTAGACTTCATCTTGTACAGCTCG TCCATGC
ATG8-F	ATGAAGTCTACATTTAAGTCTGAATATC
Tatg8-Rv	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAGATAAA GGTAAATATAGTCGAGTATT
Patg8-F	ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTATAAATA CGTACAAATTTTCTCTACTC
Patg8-R	GTCTCTAGTAATTATTTTATTATGATTTTC

3-2-4 プラスミドの構築

酵母発現用ベクターへの各種 GK のクローニングは、酵母 BY4741 ゲノムを鋳型として PCR により増幅を行い、PRO1(HindIII)-F と PRO1(NotI)-R あるいは kd+67(NotI)-R を用いて PCR を行った DNA 断片を *HindIII* と *NotI* により処理し、pAD4-3HA6His に組み込んだ。また、D156A-GK のプラスミドは、GK 遺伝子を組込んだ pAD4 あるいは pAD4-3HA6His のベクターを鋳型に PRO1-D156A FwPRO1-D156A Rv のプライマーを用いて QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene 社) のプロトコールに従って作成した。

3-2-5 ウェスタンブロッティング

2-2-5 に記載したウェスタンブロッティングの方法に準ずる。

3-2-6 細胞内プロリン含量の定量

プロリン含量の測定は、ニンヒドリン反応による呈色反応を利用して行った (Troll & Lindsly, 1955; Ringel et al., 2003)。YPD または SD + 5 mM Pro 培地で前培養した菌を $OD_{600} = 0.1$ になるように植菌し、 $OD_{600} = 0.5-1.0$ に達するまで培養した。集菌後、超純水 5 ml で 1 回洗浄した。ペレットを 3% スルホサチリル酸 1 ml に懸濁し、100℃で 10 分間処理することで熱水抽出を行った。15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 400 μ l に氷酢酸 400 μ l と 2.5% ニンヒドリン溶液 400 μ l を混合し、100℃で 1 時間処理した。氷上でサンプルを室温まで戻し、520 nm における吸光度を測定した。プロリン含量は、既知濃度のプロリン溶液を用いて作成した標準曲線と比較することで算出した。

3-2-11 オートファジーまたはリボファジーの観察

オートファジーによって液胞に運ばれたタンパク質は加水分解酵素の働きで速やかに分解されるが、GFP タンパク質は安定性が高いため、液胞内でも比較的長時間分解されずに存在し続ける。この性質を利用してオートファジーによって液胞に運ばれた目的タンパク質の分解を、遊離した GFP をウェスタンブロットにより検出することで測定した。非選択的なオートファジーのマーカータンパク質として Atg8 を用いた。N 末端側に GFP を融合させた Atg8 を指標にして、窒素飢餓におけるオートファジーの解析を行った。リボファジーの観察は、Rpl25 の C 末端側に GFP を融合させ、窒素飢餓条件下において分解による GFP の遊離を観察した。オートファジーおよびリボファジーの誘導は YPD 培地あるいは SC 培地で対数増殖期 ($OD_{600} < 1.0$) まで培養した細胞を集菌し、SD-N 培地で細胞を洗浄後、細胞を SD-N 培地に植菌し 30℃で培養した。

その他、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による切断、連結などの遺伝子操作は「バイオマニュアルシリーズ I 遺伝子工学の基礎技術」(羊土社)、及び「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)、「生物化学実験法 39 酵母分子遺伝子実験法」(学会出版センター)、及び「バイオ実験イラストレイテッド⑦」に準じた。

3-3 結果

3-3-1 GK 遺伝子 (*PRO1*) および GPR 遺伝子 (*PRO2*) の変異株のストレス耐性

当研究グループらは、プロリン合成の最初のステップを触媒する GK をコードする *PRO1* 遺伝子の破壊株が様々なストレスに対して高い感受性を示すことを報告している (Ando et al., 2007; Kaino & Takagi, 2009)。しかしながら、プロリン合成の 2 番目の反応を触媒する GPR をコードする遺伝子 (*PRO2*) については、ストレス下における生育に及ぼす影響を調べた例は報告されていない。そこで、本研究ではまず、各遺伝子破壊株のストレスに対する表現型を比較した。

YPD 培地上で高温ストレスあるいは H_2O_2 ストレスを加えたところ、GK 遺伝子を破壊した *Δpro1* 株は高い感受性を示したのに対して、GPR 遺伝子を破壊した *Δpro2* 株では野生型株との明確な差は確認できなかった (図 20A)。次に、このような表現型の差は細胞内のプロリン含量の違いにより生じるのかどうかを調べた。その結果、*Δpro1* 株および *Δpro2* 株のいずれにおいても細胞内プロリン含量の低下は認められなかった (図 20B)。これは、YPD 培地のような富栄養培地では細胞外からの取り込みだけで十分にプロリンを供給でき、合成酵素の機能欠損による影響はほとんど見られないためであると考えられる。以上の結果から、Pro1 タンパク質はプロリン合成と独立に、細胞のストレス耐性獲得に重要な機能を有している可能性が示された。

次に、Pro1 タンパク質の C 末端側に存在する PUA ドメインを欠失させた KD+67 株を作製し、同様のストレス耐性試験を行った。その結果、KD+67 株も高温および H_2O_2 ストレスに対して高い感受性を示した (図 20A)。また、細胞内のプロリン含量も野生型株と同程度であった (図 20B)。これらの結果から、GK が細胞にストレス耐性を付与する機構には、C 末端側に存在し、機能が十分に理解されていない PUA ドメインが特異的に関与していることが強く示唆された。

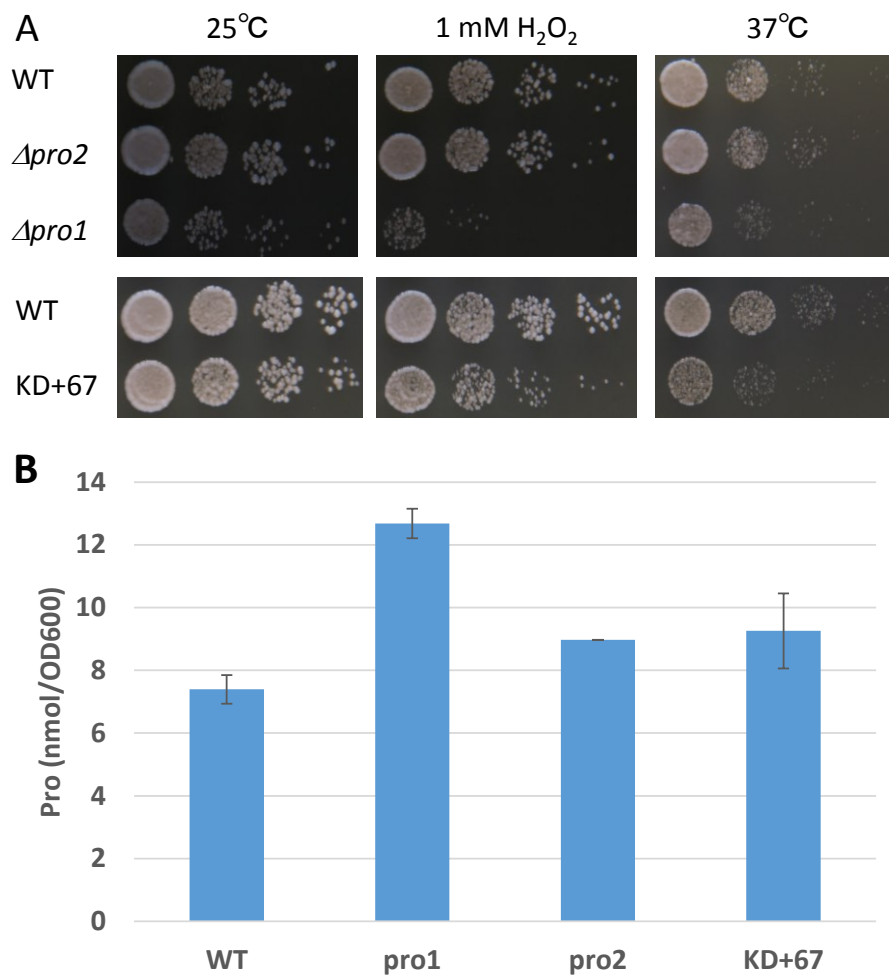


図 20 各変異株のストレス耐性試験 (A) 各株の培養液 ($OD_{600}=0.5$) に関して $1 \sim 10^{-3}$ の段階希釈系列を調製し、各培地にそれぞれ $3 \mu\text{l}$ スポットし、1-3 日間培養した。(B) YPD 培地で $OD_{600}=0.5-1.0$ まで培養した各菌体の 1OD 当たりの Pro 含量を測定した。

3-3-2 GK の酵素活性がストレス耐性に与える影響

次に、*Δpro1* 株で見出された高いストレス感受性が GK の酵素活性欠損に依存するか否かを調べた。まず、GK の活性中心にアミノ酸置換を導入した不活性型の変異型 GK を作製した。大腸菌 GK の立体構造解析や変異型 GK の報告から (Pérez-Arellano et al., 2006; Marco-Marin et al., 2007)、酵母の GK では 156 番目に位置する Asp 残基が重要であると推測された。この Asp156 は、微生物 GK から高等真核生物の P5CS を含むすべての生物種において高度に保存されている (図 21A)。この Asp 残基は、直接基質と相互作用しないが、ATP のリン酸基を認識する 2 つの Lys 残基と相互作用することで触媒反応を促進すること (Pérez-Arellano et al., 2006; Marco-Marin et al., 2007)、また大腸菌 GK の Asp150 (酵母 GK の Asp156 に相当) のアミノ酸置換が GK 活性を低下させることが報告されている (Pérez-Arellano et al., 2006)。そこで、Asp156 を Ala に置換した変異型 D156A-GK を発現するプラスミドを作製後、プロリン要求性酵母 *Δcar2 Δpro1* 株に導入し、プロリン要求性が回復するかどうかを調べた (図 21B)。その結果、D156A-GK 発現株ではプロリン要求性の回復が見られなかったことから、D156A-GK は予想通り酵素活性を消失していることが明らかになった。

さらに、*Δpro1* 株に D156A-GK 発現用プラスミドを導入し、ストレス感受性を調べた。5 mM プロリンを含む SD 培地上で高温および過酸化水素に対するストレス耐性試験を行った。その結果、D156A-GK 発現株は野生型 GK 発現株と同程度のストレス感受性を示した (図 22A)。また、細胞内のプロリン含量を測定したところ、空ベクター導入株と野生型 GK および D156A-GK 発現株の間に大きな差は確認できなかった (図 22B)。以上の結果から、GK による細胞のストレス耐性獲得には GK の酵素活性は必須ではないことが明らかになった。

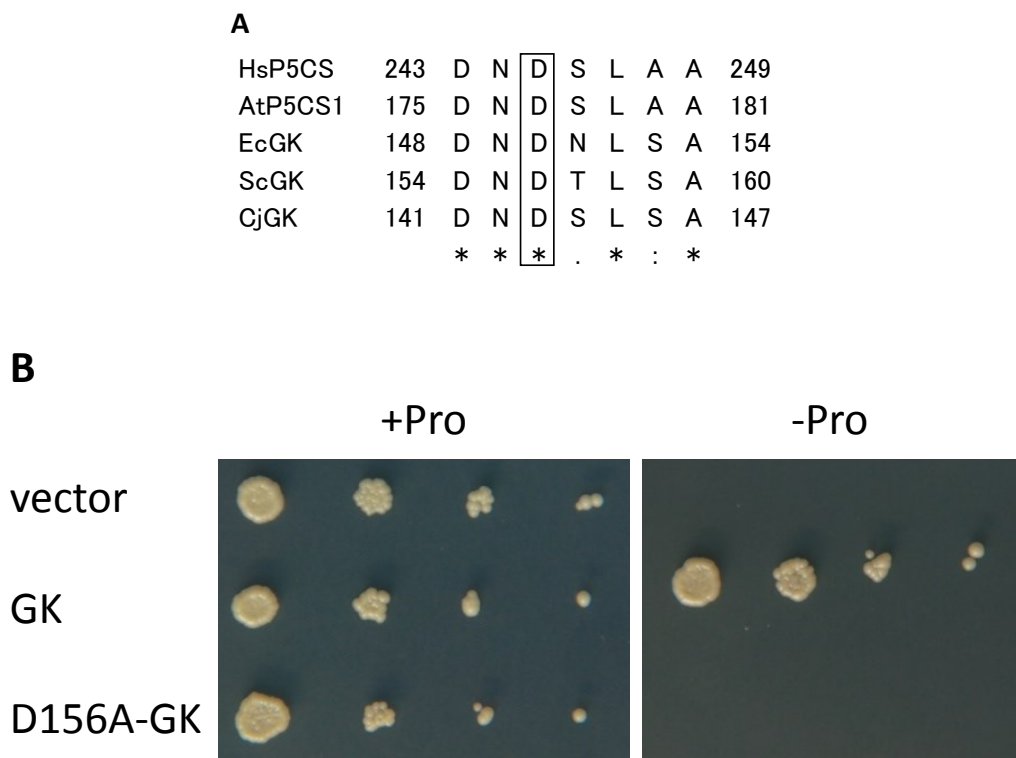


図 21 変異型 D156A-GK の酵素活性への影響 (A) GK および P5CS のキナーゼドメインのアミノ酸配列のアライメントを示す。活性中心である Asp 残基を黒枠で示す。アスタリスク (*) は同一のアミノ酸残基、コロン (:) は高い相同性を持つアミノ酸残基、ピリオド (.) は相同なアミノ酸残基を表す。アライメントには、*Homo sapiens* P5CS (HsP5CS), *Arabidopsis thaliana* P5CS1 (AtP5CS1), *Saccharomyces cerevisiae* GK (ScGK), *Escherichia coli* GK (EcGK), *Campylobacter jejuni* GK (CjGK)を用いた。(B) プロリン要求性酵母 $\Delta car2 \Delta pro1$ 株に各プラスミドを導入した株の培養液 ($OD_{600} = 1.0$) に関して $1 \sim 10^{-3}$ の段階希釈系列を調製し、SD または SD+10 mM Pro 培地にそれぞれ 3 μ l スポットし、30°C で 4 日間培養した。

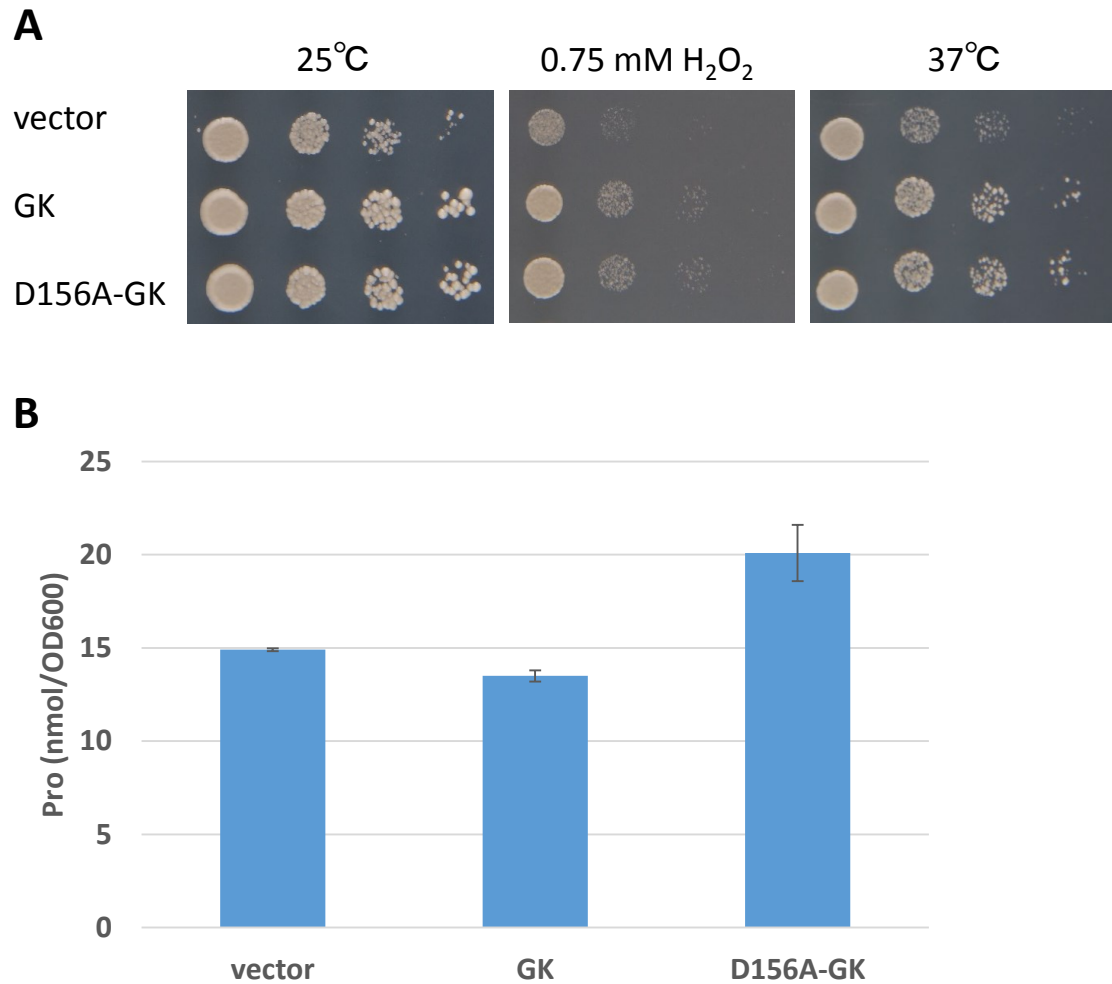


図 22 不活性型 D156A-GK 発現株のストレス耐性への影響 (A) *ΔproI* 株に各遺伝子を発現するベクターを導入した対数増殖期の細胞を培養液 ($OD_{600}=0.5$) に関して $1 \sim 10^{-3}$ の段階希釈系列を調製し、各培地にそれぞれ $5 \mu\text{l}$ スポットし、3-4 日間培養した。(B) SD+5 mM 培地で $OD_{600} = 0.5-1.0$ まで培養した各菌体の 1OD 当たりの Pro 含量を測定した。

3-3-3 Pro1 タンパク質と物理的・遺伝学的に相互作用する因子の探索

次に、Pro1 タンパク質の GK 酵素活性に依存しないストレス耐性機構を解明する目的で、Pro1 と物理的・遺伝学的な相互作用を示す新規因子の探索を試みた。SGD データベース上では (<http://www.yeastgenome.org/>)、Pro1 との物理的相互作用が検出されたタンパク質が（自己相互作用を除き）17 個報告されている（表 7）。

まず、これらのタンパク質をコードする各々の遺伝子の破壊と *Δpro1* との二重破壊株を作製し、その表現型を調べた（図 23）。定常期まで培養した細胞を、YPD 培地あるいは過酸化水素を添加した YPD 培地にスポットし、25℃あるいは 38℃で培養した。その結果、*Δbre5 Δpro1* 株と *Δubp3 Δpro1* 株の 2 つの二重破壊株が、それぞれの単独遺伝子破壊株よりも顕著な生育遅延を示した。さらに、対数増殖期の細胞を用いた実験でも同様の結果が得られ、*Δbre5 Δpro1* 株および *Δubp3 Δpro1* 株の二重破壊株は、それぞれの単独遺伝子破壊株よりも顕著な生育遅延を示した（図 24）。

以上の結果から、Bre5 および Ubp3 が Pro1 と遺伝学的相互作用を示す因子として同定された。一方、38℃の高温ストレスに対しては、*Δbre5*、*Δubp3* および *Δpro1* の単独破壊株と *Δbre5 Δpro1* および *Δubp3 Δpro1* の二重破壊株との間に感受性の違いは見られなかった。

表 7 GK との物理的相互作用が報告されているタンパク質

Protein	Function	Reference
Bre5	Ubiquitin-specific protease, Ubp3, cofactor	Ossareh-Nazari B, et al. (2010)
Dbf2	Ser/Thr kinase	Graumann J, et al. (2004)
Dna2	DNA replication factor	Krogan NJ, et al. (2006)
Gis2	Translational activator	Scherrer T, et al. (2011)
Gle2	RNA export foator; nuclear to cytosol	Gavin AC, et al. (2002)
Hhf1	Histone protein	Gavin AC, et al. (2002)
		Gavin AC, et al. (2006)
Hsp82	Cheaperon protein	Zhao R, et al. (2005)
Ist1	Involved in maltivesicular body sorting pathway	Gavin AC, et al. (2002)
Lte1	Unknown; similar to GDP/GTP exchange factors	Graumann J, et al. (2004)
Mrpl22	Mithocondiral ribosomal protein	Gavin AC, et al. (2006)
Rad10	Single-stranded DNA endonuclease	Ho Y, et al. (2002)
Rpn11	Metalloprotase subunit protein of proteasemoe	Kaake RM, et al. (2010)
Rrp9	Pre-rRNA processing	Ho Y, et al. (2002)
Ssb2	Ribosome-associated chaperone	Willmund F, et al. (2013)
Tfs1	Inhibitor of carboxypeptidase Y	Beaufour M, et al. (2012)
Ubi4	ubiquitin	Peng J, et al. (2003)
		Duttler S, et al. (2013)
		Kolawa NJ, et al. (2013)
Ubp3	Ubiquitin-specific protease	Ossareh-Nazari B, et al. (2010)

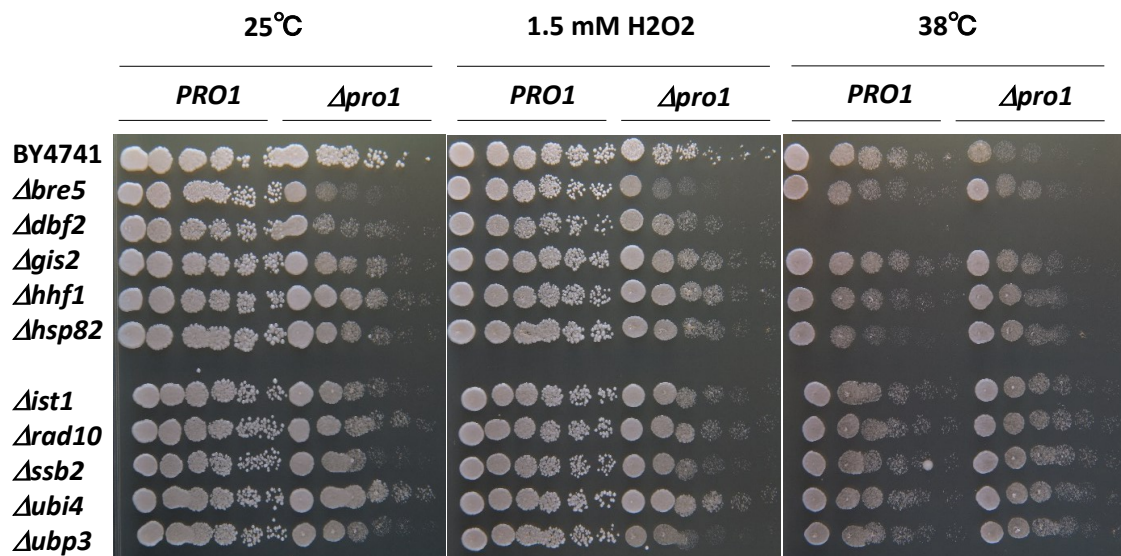


図 23 *PRO1* と遺伝学的相互作用を示す遺伝子の探索 定常期まで培養した各株の培養液 (OD₆₀₀ = 0.5) を用いて 4⁰~4⁻⁶ までの段階希釈系列を調製し、各培地にそれぞれ 3 μl スポット後、2 日間培養した。

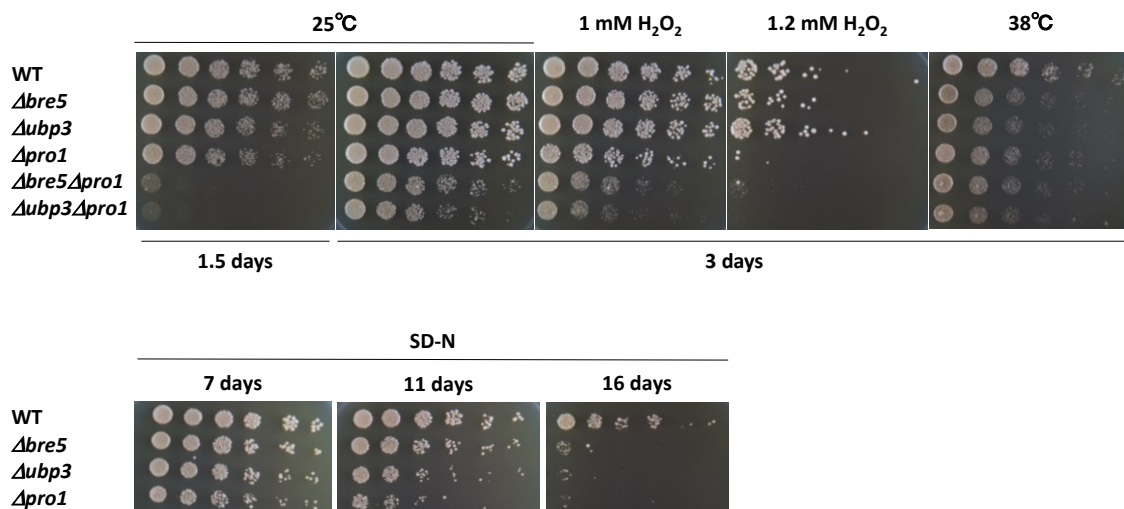


図 24 各変異株を用いたストレス耐性試験 対数増殖期まで培養した各株の培養液 (OD₆₀₀ = 0.5) を用いて 4⁰~4⁻⁶ までの段階希釈系列を調製し、各培地にそれぞれ 3 μl スポット後、1.5-3 日間培養した。あるいは、対数増殖期まで培養した各株を 7-16 日間 SD-N 培地による窒素飢餓条件下に置き、その後、4⁰~4⁻⁶ の段階希釈系列を調製し、YPD 培地にスポットした。

3-3-4 窒素飢餓条件下でのリボファジーの観察

Pro1 との遺伝学的な相互作用が見出された Bre5 と Ubp3 は (図 23、図 24)、複合体を形成することで脱ユビキチン化酵素として機能する。Ubp3-Bre5 複合体による脱ユビキチン化活性は、ユビキチン特異的プロテアーゼである Ubp3 の Cys469 が活性中心であり、UBP3 遺伝子欠損の方が BRE5 遺伝子欠損よりも、明確に脱ユビキチン化活性に影響を与える (Cohen et al., 2003)。また、Ubp3 はリン酸化による活性制御があることも知られている (Solé et al., 2011)。このため、Ubp3-Bre5 による脱ユビキチン化の影響を観察する場合は、BRE5 遺伝子破壊株よりも UBP3 遺伝子破壊株の方がより正確であると考えられる。Ubp3-Bre5 による脱ユビキチン化活性に依存してリボソーム選択的なオートファジーであるリボファジーを促進させることが報告されている (Kraft et al., 2008; Ossareh-Nazari B, et al., 2010)。そこで、Pro1 のリボファジー制御における役割を調べることにした。リボソーム大サブユニットの構成因子の 1 つである Rpl25 の C 末端側に GFP を融合させ、窒素飢餓によるリボファジーの誘導に伴う Rpl25-GFP の分解を観察した (図 25)。

その結果、過去の報告通り $\Delta atg7$ 株および $\Delta pep4$ 株におけるリボソームタンパク質の分解が完全に抑制された (Kraft et al., 2008)。この結果から、窒素飢餓時のリボソームの分解はオートファゴソームの形成が必須であり、液胞で分解を受けていることが確認された。また、 $\Delta ubp3$ 株においてもリボファジーの効率の低下が確認され、過去の報告と一致した (Kraft et al., 2008)。一方、 $\Delta pro1$ 株では、窒素飢餓条件下におけるリボファジーがほとんど認められず、リボファジーが $\Delta ubp3$ 株よりもさらに強く抑制されていた (WT, $\Delta ubp3$, $\Delta pro1$ においては 3 回実験を行い、その中で代表的な結果を載せている)。

次に、GFP-Atg8 を指標にした非選択的なオートファジーを観察した (図 26、図 27)。窒素飢餓によるオートファジーの誘導によって、 $\Delta atg7$ 株および $\Delta pep4$ 株の GFP-Atg8 の分解が観察されず、オートファジーが欠損していることが確認された。一方、野生型株、 $\Delta ubp3$ 株、 $\Delta pro1$ 株は GFP-Atg8 の分解が認められ、さらに、GFP のシグナルは液胞から強く発せられていた (図 26、図 27)。このことから、 $\Delta pro1$ 株においても、非選択的なオートファジーについては明確な欠損を示さないことが明らかになった。これらの結果から、Pro1 は、Ubp3-Bre5 複合体と同様にリボファジーを特異的に促進する新規機能を有していることが判明した。

さらに、Pro1 によるリボファジーの進行が GK の酵素活性に依存するかどうかを調べた (図 28)。 $\Delta pro1$ 株においてプラスミドから野生型 Pro1、不活性型変異である D156A-GK あるいは KD+67 (PUA ドメイン欠失型 GK) を発現させ、窒素飢餓によるリボファジーの誘導を行った。その結果、野生型 Pro1 発現株で

はリボファジーの部分的な回復が見られたが、D156A-GK あるいは KD+67 発現株ではリボファジーが観察されなかった (図 28) (野生型 Pro1 発現株および KD+67 発現株による実験は 2 回行い、代表的な結果を載せている)。不活性型変異である D156A-GK や酵素活性が著しく低下した KD+67 の発現ではリボファジーの回復が見られなかったことから、Pro1 の GK としての活性がリボファジーの進行に関与する可能性が示された。

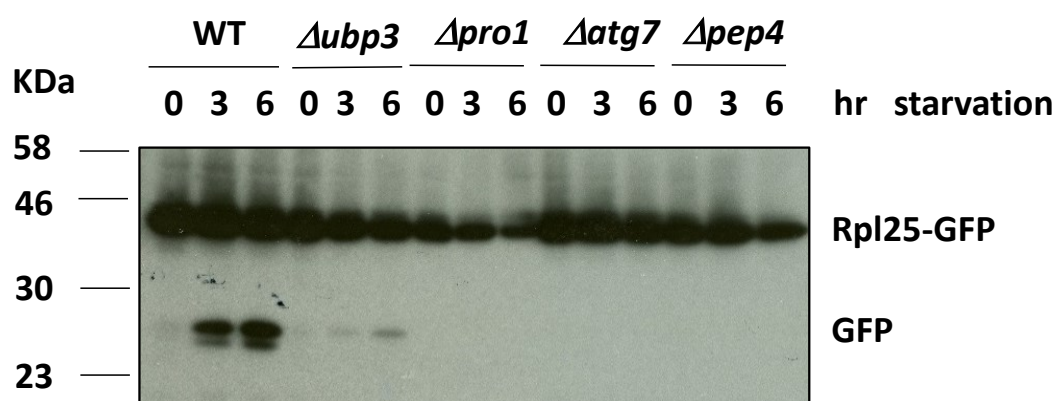


図 25 Rpl25-GFP の分解を指標としたリボファジーの観察 対数増殖期まで培養した酵母を SD-N 培地に植菌後、経時的にサンプルを調製した。その後、ウェスタンブロッティングにより Rpl25-GFP および分解により遊離した GFP の検出を行った。

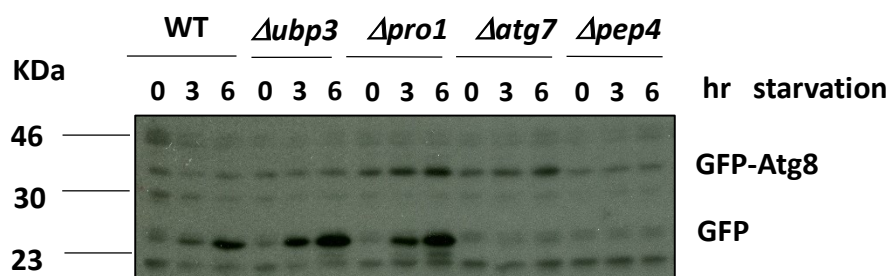


図 26 GFP-Atg8 の分解を指標とした非選択的なオートファジーの観察 対数増殖期まで培養した酵母を SD-N 培地に植菌後、経時的にサンプルを調製した。その後、ウェスタンブロッティングにより GFP-Atg8 および分解により遊離した GFP の検出を行った。

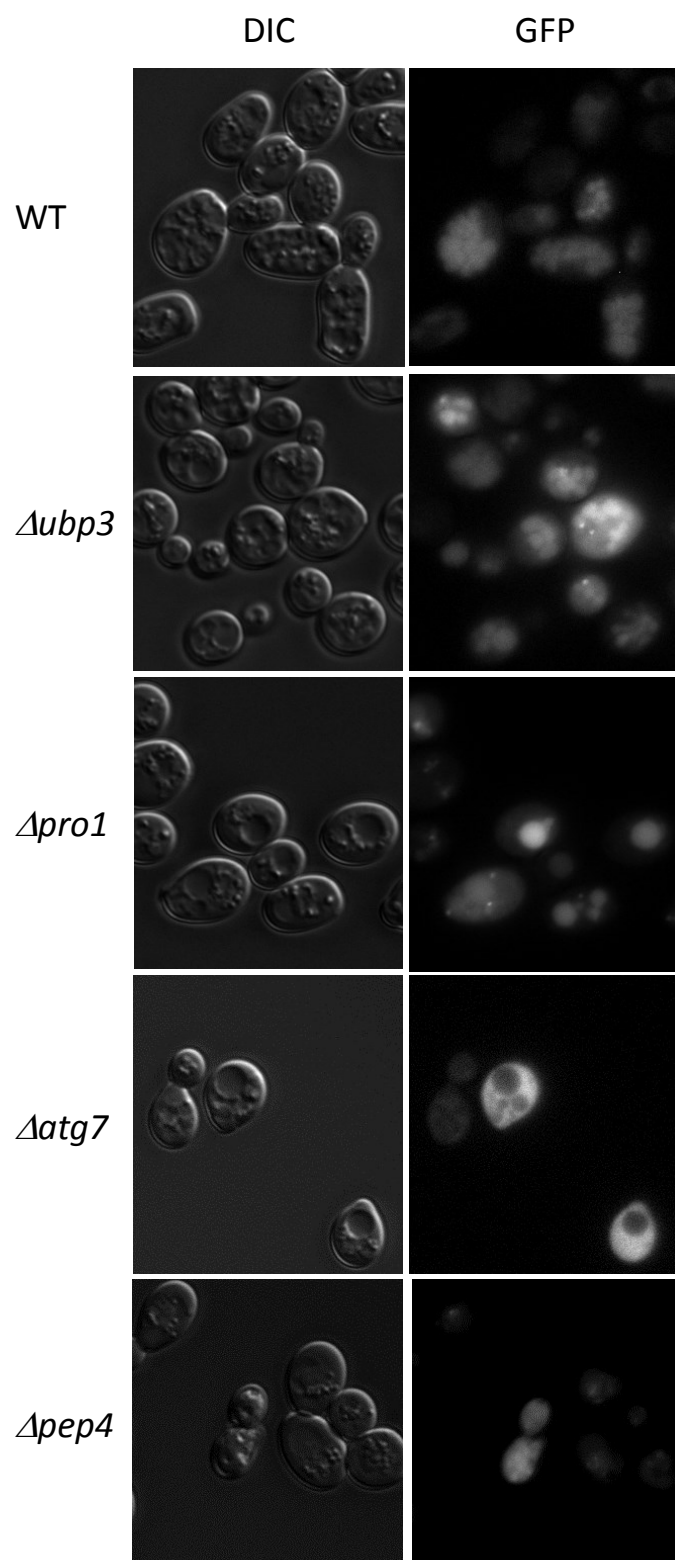


図 27 窒素飢餓条件下での GFP-Atg8 の局在 GFP-Atg8 を発現させた酵母を対数増殖期まで培養後、SD-N 培地へと植菌し、6 時間後の細胞を観察した。

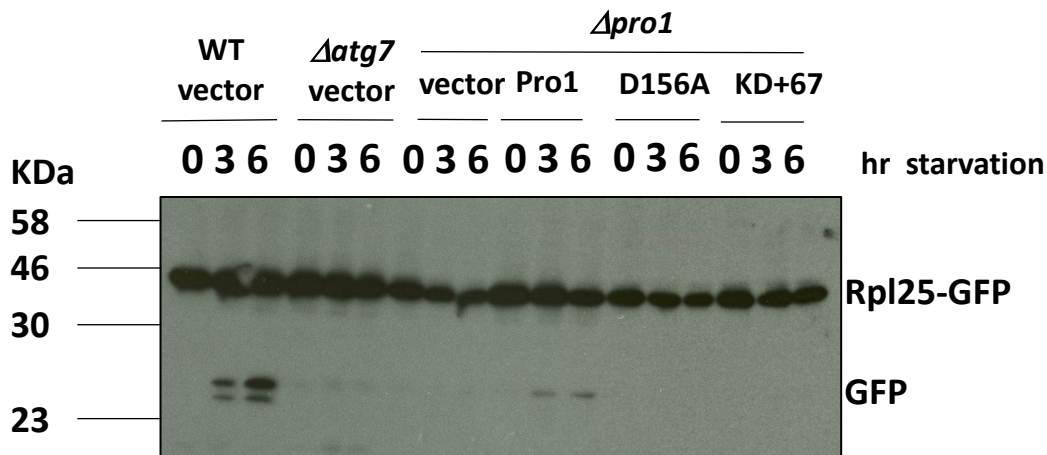


図 28 **Pro1** の酵素活性がリボファジーに及ぼす影響 対数増殖期まで培養した酵母を SD-N 培地に植菌後、経時的にサンプルを調製した。その後、ウェスタンブロッティングにより Rpl25-GFP および分解により遊離した GFP の検出を行った。

3-3-5 リボファジー欠損株の窒素飢餓時の生存の評価

Δ bre5 株および Δ ubp3 株では、窒素飢餓条件における生存率が野生株よりも低下することが報告されている (Kraft et. al., 2008)。このことは、リボファジーによるリボソームの分解が窒素飢餓への適応に必要であるためと考えられる。そこで、 Δ pro1 株の窒素飢餓に対する感受性を調べたところ、 Δ pro1 株は Δ bre5 株や Δ ubp3 株よりも窒素飢餓に対して高い感受性を示した (図 24、SD-N の 11 日目のパネル)。このことは、図 24 で示すように、 Δ pro1 株が Δ ubp3 株よりもリボファジーが強く抑制されていることが原因で、窒素飢餓に適応できなかったためと推測される。

3-3-6 オートファジー欠損によるストレス感受性の影響

対数増殖期にある細胞を用いた実験で、リボファジー欠損株である Δ ubp3 株は Δ pro1 株と同様に高温ストレスに対して高い感受性を示した (図 29)。一方、 Δ ubp3 株は 1.0 mM 過酸化水素ストレス下では、3 日目では野生株と差が見られないが (図 24、図 29)、1.5 日目では野生株よりも生育の遅延が見られた (図 29)。このことから、対数増殖期にある Δ ubp3 株も Δ pro1 株同様に過酸化水素に高い感受

性を示すと思われる。一方、図 23 の定常期まで培養した細胞を用いた実験では、野生型株、*Δubp3* 株の過酸化水素に対する感受性は同程度であった。定常期では対数増殖期の細胞よりも酸化ストレスなどの環境ストレスに対して耐性が高いためことが知られている (Herman et al., 2002)。このため、定常期にある細胞を用いた実験では、野生型株と *UBP3* 遺伝子破壊株との間で、過酸化水素に対する感受性の差が見られなかったのではないかとと思われる。*Δubp3* 株および *Δpro1* 株が示したストレスに対する高い感受性がリボファジーの欠損に依存するのか調べるために、オートファジー欠損株である *Δatg7* 株および *Δpep4* 株におけるストレス感受性の程度を調べた。その結果、*Δatg7* 株と *Δpep4* 株の過酸化水素 (1.0 mM) や高温 (38°C) のストレスに対しては、野生型株と同程度の感受性を示した (図 29)。この結果から、1.0 mM 過酸化水素や 38°C 高温のストレス耐性には、オートファゴソーム形成の欠損や液胞内の加水分解酵素の欠損は影響を与えないことが明らかとなった。このことから、*Δubp3* 株や *Δpro1* 株における高いストレス感受性は、リボファジーとは異なる生理機能に依存していると考えられる。

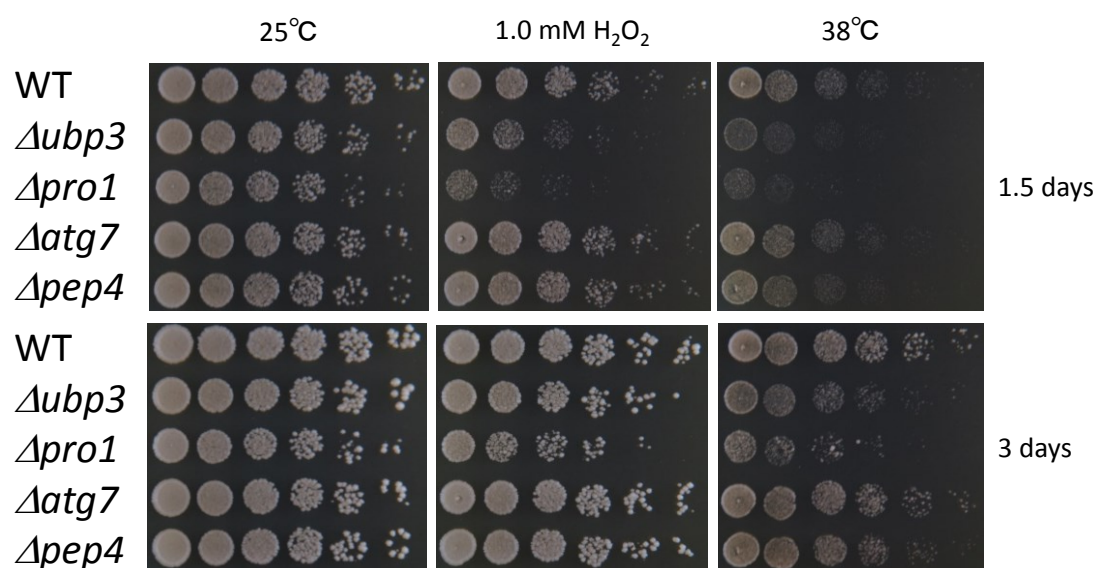


図 29 オートファジーまたはリボファジー欠損株のストレス耐性試験 対数増殖期まで培養した各酵母の培養液 ($OD_{600} = 0.5$) を用いて $4^0 \sim 4^{-6}$ までの段階希釈系列を調製し、各培地にそれぞれ 3 μ l スポット後、1.5-3 日間培養した。

3-4 考察

本研究では、酵母 *S. cerevisiae* においてプロリン合成の初発反応を触媒する GK をコードする *PRO1* 遺伝子の破壊株 ($\Delta pro1$ 株) が特異的に、野生型株よりも過酸化水素や高温に対して高いストレス感受性を示すことを見出した。興味深いことに、細胞内のプロリン含量とストレス感受性の間には関連性がなかった。さらに、Pro1 の C 末端に存在する PUA ドメインの欠損が高いストレス感受性をもたらしたのに対し、GK 活性を欠損させた変異型 GK (D156A-GK) はストレス感受性に影響を及ぼさなかったことから、プロリン合成よりもむしろ、Pro1 タンパク質そのもの、特にこれまで機能がほとんど不明であった PUA ドメインに、酵母のストレス応答に関与する未知の機能があることが示唆された。

次に、Pro1 と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子との遺伝学的相互作用に関する解析から、リボファジの促進に重要な役割を果たす Ubp3-Bre5 複合体と Pro1 とが機能的に関連していることを明らかにした。本研究は、Pro1 タンパク質が単なる GK 活性を有する代謝酵素としてだけでなく、リボファジを介したオルタナティブな機能を有していることが判明した。しかし、リボファジを含む全てのオートファジを欠損する *ATG7* 遺伝子破壊株や液胞の加水分解に関わる *PEP4* 遺伝子の破壊は、ストレス感受性を示さなかったことから、*PRO1* 遺伝子破壊による高いストレス感受性はリボファジとは独立の機能であることが示された。また、Pro1 によるストレス耐性には PUA ドメインが重要であったのに対して、リボファジには Pro1 の酵素活性が関与している可能性が示された。

本研究は、Pro1 の酵素活性に依存しないストレス耐性機構およびリボファジに関与することを明らかにし、Pro1 によるプロリン合成以外に新たな生理機能を見出した初めての報告である。これらの生理機能をまとめたモデルを図 30 に示す。

Pro1 の酵素活性がリボファジに与える影響

PRO1 遺伝子を破壊することでリボファジの欠損が引き起こされることが判明した (図 25)。また、不活性型変異である D156A-GK あるいは著しく酵素活性が低下した KD+67 の発現株はリボファジの欠損を示したことから (図 28)、Pro1 によるリボファジの進行には Pro1 の酵素活性が関与する可能性が示された。しかしながら、Pro1 をプラスミドから発現させた株ではリボファジの部分的な回復しか見られなかった。遺伝子相補に用いたプラスミドは *ADHI* 由来のプロモーターを使用しており、ネイティブなプロモーターとは異なるため、リ

ボファジーが完全に回復しなかったのかもしれない。今後この問題を解決するために、ゲノム上の *PRO1* 遺伝子に点変異を導入し、D156A-GK をゲノム上から発現させる株を作成することで、GK 活性がリボファジーに与える影響について正確に評価していきたい。Pro1 はグルタミン酸の γ -カルボキシル基のリン酸化を触媒し、 γ -グルタミルリン酸を生じる。 γ -グルタミルリン酸は不安定なため、自発的に 5-オキソプロリンとリン酸に分解されることが明らかになっている。酵母の細胞内における 5-オキソプロリンの生理機能については明らかにされていないが、リボファジーの進行に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。あるいは、Pro1 にはグルタミン酸以外にもリン酸化を触媒する基質が存在する可能性があり、このことがリボファジーに必須であるのかも知れない。今後、これらの可能性について慎重に検討していきたいと考えている。また、窒素飢餓時の細胞内プロリン含量についても解析する予定である。

Ubp3-Bre5 複合体によるユビキチン化制御がリボファジーに与える影響

Ubp3-Bre5 複合体は脱ユビキチン化酵素として機能するが、ユビキチン特異的プロテアーゼ Ubp3 をコードする *UBP3* 遺伝子を破壊する方が、Ubp3 のコファクタータンパク質をコードする *BRE5* 遺伝子の破壊よりも明確に脱ユビキチン化活性に影響を与えることが報告されている (Cohen et al., 2003)。また、Ubp3 は Bre5 との相互作用に依存しない活性化制御があることも知られている。Ubp3-Bre5 が窒素飢餓に応答してリボソームタンパク質である Rpl25 を脱ユビキチン化することは報告されているが (Kraft et al., 2008)、窒素飢餓時の Ubp3-Bre5 の活性化機構については明らかになっていない。

一方、高浸透圧ストレスの刺激によって、Ubp3 の 695 番目のセリン残基が Hog1 依存的にリン酸化を受け、浸透圧ストレスに適応するための遺伝子発現を誘導することが知られている (Solé et al., 2011)。しかし、SGD データベース上の情報では、Ubp3 のリン酸化部位は (推定も含めて) 他にも 16 カ所存在している。以上のことから、Ubp3 はストレスの種類に応じてリン酸化される部位に違いが生じることで、脱ユビキチン化のターゲットを変えている可能性がある。Ubp3-Bre5 と遺伝学的大体物理的な相互作用を示した Pro1 が、Ubp3-Bre5 のターゲットタンパク質の認識や活性化にどのように関わるのか、特にリボソームタンパク質のユビキチン化レベルに与える影響については、今後明らかにしていきたいと考えている。

また、窒素飢餓によるリボファジーの誘導では、*UBP3* 遺伝子の欠損により大サブユニットである 60 S リボソームの分解は抑制されるが、小サブユニットである 40 S リボソームの分解には影響を及ぼさなかった (Kraft et al., 2008)。しかしながら、40 S サブユニットもオートファジー依存的に分解されていたことが

ら、40 S サブユニットを選択的に分解するための機構の存在が示唆されているが、40 S サブユニットのリボファジーに関与する因子については同定されていない (Kraft et al., 2008; Beau et al., 2008)。そこで、40 S サブユニットのリボファジーに Pro1 が関わっているのか明らかにしていきたいと考えている。

成熟後のリボソームの品質管理、リボファジーと NRD、について

これまで、リボソームの成熟過程におけるプロセッシングや品質管理には、多数の修飾酵素やシャペロンタンパク質などが関わることが報告されているが (Woolford & Baserga, 2013)、成熟後のリボソームの品質管理機構については僅かしか報告がない。LaRiviere らは、機能を失った rRNA が速やかに分解されることを明らかにし、この rRNA の品質管理機構を nonfunctional rRNA decay (NRD) と名付けた (LaRiviere et al., 2006)。その後、Rtt101-Mms1 に依存したユビキチン化能が NRD に必須であり、プロテアソーム系が関与していることが明らかにされたが (Fujii et al., 2009; 2012)、分子機構の詳細や生理的意義については不明なままである。リボファジーと NRD は、これまでほとんど解析されていなかった成熟後のリボソームの制御を明らかにした希少な報告である。これまでに報告がある NRD とリボファジーの関係については現在のところ明らかではないが、タンパク質のユビキチン化レベルを制御する ATPase の 1 つである Cdc48 が NRD およびリボファジーに関わっていること (Ossareh-Nazari et al., 2010; Fujii et al., 2012)、どちらもリボソームの分解に関与しているという観点から、両者の間に何らかの相互作用があるのではないかと考えている。

ユビキチン化の制御が選択的なオートファジーに与える影響について

Ubp3-Bre5 複合体による脱ユビキチン化の機能は、リボファジー以外のオートファジーにも影響を及ぼすことが報告されている。ミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーは、UBP3 および BRE5 遺伝子の欠損により促進されることが報告されている (Müller et al., 2015)。また最近、窒素飢餓に応じてプロテアソームのオートファジー (プロテオファジー) が起こることが判明した (Waite et al., 2016)。プロテアソームは 20 S のコア粒子と 19 S の制御粒子の二つの粒子から構成されるが、Ubp3 の脱ユビキチン化に依存したプロテオファジーはコア粒子のみで、制御粒子のオートファジーは Ubp3 非依存的であった。これらのオートファジーにおいて、Ubp3 による脱ユビキチン化活性と選択的オートファジーにおける分子機構の関係性は全く明らかにされていない。しかし今後、オートファジーの制御とユビキチン化の制御の関連性を解明することが、選択的なオートファジーの理解に必要なになってくると思われる。

ユビキチン化タンパク質の網羅的解析から、Pro1 タンパク質がユビキチン化されている可能性が考えられる (表 7) (Peng et al., 2003; Duttler et al., 2013; Kolawa et al., 2013)。また、Pro1 と相互作用するタンパク質の候補として Ubp3-Bre5 複合体が示されたことから、Pro1 タンパク質のユビキチン化レベルの制御を Ubp3-Bre5 複合体が担っているのかもしれない。今後、Pro1 のユビキチン化レベルの制御に Ubp3-Bre5 複合体が関与するのかについて、特にリボファジーが促進される窒素飢餓条件下で詳細に解析したいと考えている。

オートファジーと RNA 代謝について

近年、窒素飢餓や炭素飢餓時に起こる RNA の分解がオートファジーに依存していることが明らかとなった (Huang et al., 2015; Xu et al., 2013)。窒素飢餓時にはオートファジーに依存してヌクレオチドやヌクレオベースの増加が見られ、オートファジーに依存した、RNA の分解には関わる液胞 RNase として Rny1 が同定された (Huang et al., 2015)。この RNA の分解に、リボファジーによるリボソームの分解がどの程度影響を及ぼすのかについては解明されていない。オートファジーと核酸代謝に関する解析が進む中で、リボファジーの新しい因子として Pro1 が同定されたことは、今後の研究を進展させる上で重要になってくると思われる。

アミノ酸代謝酵素と選択的なオートファジーについて

ミトコンドリアの選択的なオートファジー (マイトファジー) の特異的なレセプタータンパク質として Atg32 や Atg33 が同定されている。しかし、ゲノムワイドでスクリーニングを行った結果、他にも様々な遺伝子がマイトファジーに関わっていることが報告されている (Kanki et al., 2009)。例えば、芳香族アミノ酸の合成に関わる *ARO2* 遺伝子の欠損は、マクロオートファジーには影響を与えず、マイトファジーの欠損に繋がることが報告されている (Kanki et al., 2009)。アミノ酸代謝がオートファジーに与える影響についてはほとんど解析されていない。しかし、リボファジーと Pro1 やマイトファジーと Aro2 のように特定のオートファジーとアミノ酸代謝酵素についての関連性の解明は、今後の大きな課題になると思われる。

窒素飢餓時におけるリボファジーの役割について

リボファジーの欠損株である $\Delta ubp3$ 株および $\Delta bre5$ 株では窒素飢餓時の生存率が低下することが報告されている (Kraft et al., 2008)。そこで、同じリボファジー欠損株である $\Delta pro1$ 株の窒素飢餓に対する耐性を評価したところ、 $\Delta ubp3$ 株および $\Delta bre5$ 株よりも生存率が低下していた (図 24)。この結果は、 $\Delta pro1$ 株が $\Delta ubp3$

株よりもより顕著にリボファジーが抑制されていたことで、窒素飢餓に対して適応できなかったためであると考えられる。これらのことから、リボファジーは窒素飢餓時の生存に重要である可能性が示された。リボソームは細胞内の全 RNA の約 80%、また、全タンパク質の 50%を占めると推定されている (Warner, 1999)。栄養飢餓時には、リボファジーによって分解されたリボソームがアミノ酸の供給源となることで飢餓に適応しているものと考えられている (Kraft et al., 2008; Beau et al., 2008)。また、飢餓条件下での生存に必要なタンパク質の合成は、オートファジーによって生じるアミノ酸の供給が必須であることが知られており (Onodera & Ohsumi, 2005)、細胞内タンパク質の約半分量を占めるリボソームの分解は主要なアミノ酸供給源になるのではないかと考えられる。今後、窒素飢餓条件下でのリボファジー欠損株のアミノ酸プールを測定することで、リボファジーが細胞内アミノ酸プールに与える影響について解析していきたい。また、飢餓条件下では mRNA からのタンパク質の翻訳が強く抑制されることが知られている (Kraft et al., 2008)。タンパク質の合成は多量のエネルギーやアミノ酸を消費する。このため、窒素飢餓に応答したリボファジーを介したリボソームの分解によって、タンパク質合成が適切に制御されることで、窒素飢餓への適応が可能になるのかも知れない。

Pro1 タンパク質によるストレス耐性機構について

PRO1 遺伝子の破壊株はストレスに高い感受性を示すことが明らかになった (図 20A)。PUA ドメインの欠損が高いストレス感受性を示したのに対して、不活性型変異である D156A-GK の発現株は野生型 *Pro1* 発現株と同程度のストレス感受性であった (図 20A、図 22A)。このことから、*Pro1* によるストレス耐性には GK の触媒活性は必要ではなく、C 末端に存在する PUA ドメインが重要であった。一方で、*Pro1* によるリボファジーの進行には GK 活性が関与する可能性が考えられた。また、リボファジーを含む全てのオートファジーを欠損する *ATG7* 遺伝子破壊株が過酸化水素 (1.0 mM) や高温 (38°C) のストレスに対する感受性が野生型株と同程度であったことから (図 29)、*Pro1* が関与するストレス耐性機構とリボファジーの機構は *Pro1* の異なる分子機能に依存していると考えられる。

PUA ドメインは RNA 結合ドメインとして同定され、その多くが RNA 修飾酵素などの RNA 代謝に関連するタンパク質に見出されている (Aravind & Koonin., 1999)。しかし、一部の代謝酵素や機能未知タンパク質にも PUA ドメインが存在しているが、その生理的役割については不明のままであった。しかし、*Pro1* と RNA 代謝関連タンパク質に見出される PUA ドメイン間で、一次構造上の相同性は高くないものの、二次構造および三次構造は高い一致を示した (図 3、図 4)。

Pro1 については PUA ドメインの標的となる RNA は報告されていないが、Pro1 によるストレス耐性に PUA ドメインが関与していることから、PUA ドメインと RNA との相互作用が Pro1 によるストレス耐性獲得に重要であるのかも知れない。

また、*PRO1* と遺伝学的に相互作用を示した Ubp3 は、オートファジー以外にも様々な生理的役割を担っていることが判明している。*UBP3* 遺伝子の欠損は ER-ゴルジ輸送の抑制に繋がる。これは、Sec23 の脱ユビキチン化を Ubp3-Bre5 によって行われており、Sec23 の脱ユビキチン化が ER-ゴルジ輸送に関わっていることが明らかとなった (Cohen et al., 2003)。さらに最近、Ubp3 による脱ユビキチン化活性が「ストレス顆粒」の形成に必要であることが報告された (Nostramo et al., 2015)。ストレス顆粒とは、サイトゾルに生じる膜に覆われていない凝集体として観察され、主に未翻訳の mRNA と翻訳開始因子が含まれている。酵母におけるストレス顆粒の形成は、ヒートショックやグルコース飢餓などによって誘導されることが知られているが、その分子機構や生理的意義については不明な部分が多い。哺乳類細胞などの高等真核生物では、ストレス顆粒がストレスに適応するための機構であると考えられている (Buchan et al., 2010; Takahashi et al., 2013)。ストレス顆粒は、翻訳されていない mRNA を凝集させ、翻訳効率の低下を引き起こすことで、mRNA をストレスから保護していると考えられている。*UBP3* と遺伝学的な相互作用を示した *PRO1* が、これらの生理機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで今後、これらの生理機能と Pro1 によるストレス耐性機構の関係性を評価することで、*PRO1* 遺伝子破壊による高いストレス感受性について検証していきたい。しかしながら、Pro1 と Ubp3-Bre5 複合体のストレス耐性における両者の関係性は明らかではないため、それぞれ独立したストレス耐性機構である可能性も考慮しながら実験を進めていく必要があると思われる。

発酵産業への応用について

当研究室ではこれまでに、プロリン合成の鍵酵素である GK の活性に着目し、プロリンによるフィードバック阻害を解除するキナーゼドメインの変異体 (D154N, I150T など) を発現させることで、細胞内にプロリンが蓄積し、種々のストレス (冷凍、乾燥、エタノール、酸化、高浸透圧など) に対して高い耐性を示すことを報告している (Takagi, 2008)。今回、新たに PUA ドメインが細胞のストレス耐性に寄与していることが明らかとなった。そこで、PUA ドメインの機能に着目し、プロリン蓄積とは異なる新しい機構によって細胞のストレス耐性を向上させる Pro1 変異体を得ることができないのかと考えている。例えば、PUA ドメインをコードする DNA 領域にのみにランダム変異を導入し

たプラスミドライブラリーを作製し、それらを導入した酵母の形質転換体から、ストレス耐性の向上したクローンをスクリーニングすることで新しい Pro1 変異体を取得できる可能性がある。さらに、PUA ドメイン内の変異とプロリン蓄積を引き起こすキナーゼドメイン内の変異を組み合わせることで、従来よりも高いストレス耐性を細胞に付与する新しい Pro1 変異体を取得できると考えられる。

発酵環境において酵母は様々なストレスに曝されている。発酵時のストレスとオートファジーの関係性についてはほとんど解析が進んでいないが、近年、真菌類のオートファジーが有用物質生産に与える影響が報告されている。日本酒醸造中の酵母では、マイトファジーが起こっていることが明らかとなり、マイトファジーに必要な遺伝子である *ATG32* 破壊株ではエタノールの生産性の増加が見られた (Shiroma et al., 2014)。また、糸状菌 *Aspergillus oryzae* による異種タンパク質発現において、オートファジーの欠損がタンパク質の生産性を向上させた (Yoon et al., 2013)。このことは、ミスフォールドしたタンパク質が、オートファジー依存的に分解されていることを示唆している。発酵生産過程において、リボソームの合成と分解は極めて重要であると思われる。飢餓や栄養源の枯渇は発酵生産時のストレスになるが、その時のリボソームの制御については明らかにされていない。リボファジーが発酵生産時に与える影響についての詳細が把握できれば、物質生産の向上に応用することも期待できる。

また、酵母を用いて旨味成分の一種であるイノシン酸やグアニル酸の核酸発酵が行われている。イノシン酸とグアニル酸の発酵生産量は2010年には、約22,000 トン生産されている (Ledesma-Amaro et al., 2015)。窒素飢餓に曝された酵母では RNA が分解され、細胞内外のヌクレオチドやヌクレオベース濃度が増加することが知られている (Huang et al., 2015; Xu et al., 2013)。リボファジーも含めた RNA 代謝の知見が深まれば、イノシン酸やグアニル酸などの核酸発酵の生産性向上に応用することも可能であると思われる。

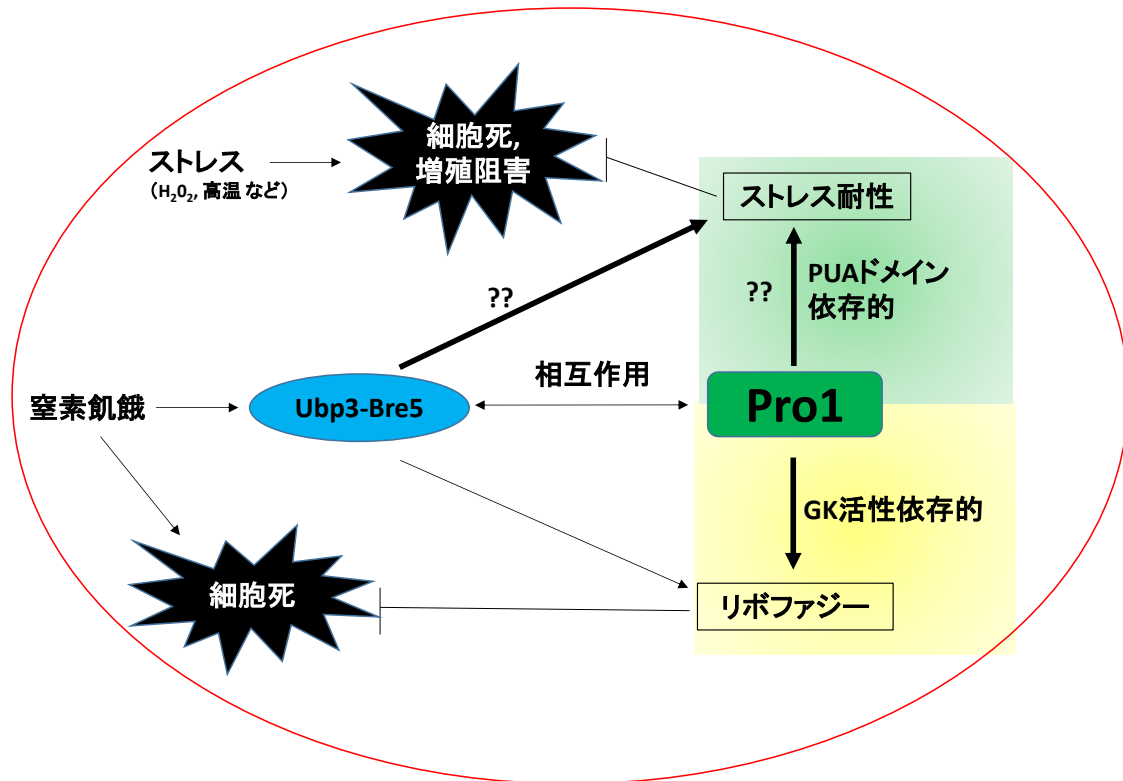


図 30 Pro1 を介した新規な生理機能のモデル図 Pro1 はリボファジーに必須の因子であり、この機構は Pro1 の GK 活性が関与している可能性がある。リボファジーは窒素飢餓による細胞性を抑制する働きがある。また、Pro1 はストレス耐性にも寄与しており、この機構には PUA ドメインが必須であり、GK 活性に非依存的である。

4. 総括

本研究では、酵母におけるプロリン合成系の鍵酵素である γ -グルタミルキナーゼ (GK) の分子機能に着目して、酵素学および分子細胞生物学的な解析を行った。

まず第2章では、GKのC末端側に存在し、機能未知のPUAドメインについて、GKの酵素特性（触媒活性とその制御、安定性など）に与える影響を遺伝学的、生化学的に調べた。その結果、PUAドメインはGKの酵素活性には必ずしも必要ではないことが示された。しかし、*in vivo* および *in vitro* の結果から、PUAドメインはGKの高い酵素活性を維持するために重要な機能を有していることが明らかになった。また、PUAドメインの欠失は基質との親和性やアロステリック制御に影響を及ぼさないことから、PUAドメインは反応速度の制御に重要であることが判明した。

次に第3章では、GKをコードする *PRO1* 遺伝子の破壊がストレスに高い感受性を示すという興味深い表現型を手がかりに、Pro1タンパク質がGK活性以外にストレス耐性に関与する未知の機能を有している可能性について、詳細な解析を行った。その結果、PUAドメインの欠失がストレス感受性を上昇するのに対して、酵素活性の消失はストレス耐性に影響を与えなかった。これらの結果から、Pro1によるストレス耐性にはGK活性は必要ではなく、C末端側に存在するPUAドメインに依存したストレス耐性機構の存在が示された。

更に、Pro1はリボソームの選択的オートファジー（リボファジー）の促進に関わる脱ユビキチン化酵素 Ubp3-Bre5 複合体と遺伝学的な相互作用を見出した。また、Pro1はリボファジーに必須であることに加え、その進行の制御にGKの酵素活性が関わっている可能性が示された。また、リボファジーの欠損株である *UBP3* 遺伝子破壊株や *PRO1* 遺伝子破壊株が窒素飢餓に対して高い感受性を示したことから、リボファジーが窒素飢餓に曝された細胞の生存に重要であることが推量された。

以上の結果をまとめると、酵母のPro1タンパク質は細胞内のプロリン含量を制御している鍵酵素 (GK) としての機能だけでなく、触媒活性に依存しないストレス耐性獲得およびリボファジーへの関与が初めて明らかになった。リボファジーにはGKの触媒活性が関わっている可能性が示された。また、窒素飢餓によって起こる細胞死の抑制に、リボファジーによるリボソームの分解が重要であることが示唆された (図31)。

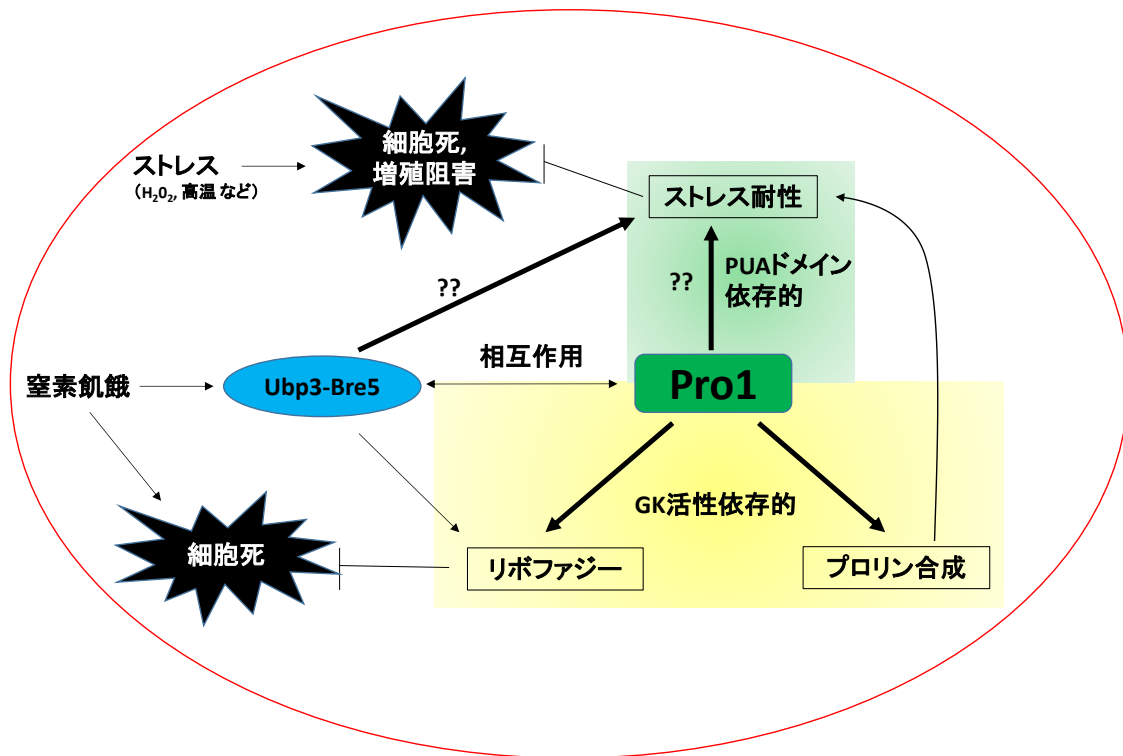


図31 Pro1の生理機能のモデル図 Pro1はGK活性に依存してプロリンの合成を行い、合成されたプロリンはストレス耐性にも寄与している。また、Pro1は、窒素飢餓に応答したリボファジーの進行にも必須であり、この機構にはPro1の酵素活性が関わっている可能性がある。窒素飢餓によって引き起こされる細胞死は、リボファジーによって抑制されていると考えられる。また、Pro1はストレス耐性にも重要な役割を持っており、この機構は酵素活性に非依存的で、C末端に存在するPUAドメインに依存する。

5. 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、終始熱心にご指導いただい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の高木博史教授に厚くお礼申し上げます。

また、日頃から実験の様々なご助言を下さった同研究室の渡辺大輔助教、大津巖生助教、吉田信行助教（現・静岡大学大学院工学研究科准教授）、那須野亮博士、森ヶ崎進博士（現・同大学院大学細胞シグナル研究室 博士研究員）、西田郁久氏に深く感謝いたします。森ヶ崎進博士には実験に使用したプラスミドの一部を供与していただいたことにも御礼申し上げます。また、島根大学生物資源科学部の戒能智宏准教授には共同研究者としてお世話になりました。さらに日々の研究に際し、有益なディスカッションと温かいご支援を頂いた研究室のメンバーにお礼申し上げます。

また、研究を遂行するに当たり貴重なアドバイスを頂いた真木寿治教授と塩崎一裕教授に、この場を借りて心よりお礼申し上げます。

最後に、これまで心身ともに支えてくれた両親に感謝の意を表します。

6. 参考文献

- Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. 2006. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* **314**: 1565-1568.
- Ando A, Nakamura T, Murata Y, Takagi H, Shima J. 2007. Identification and classification of genes required for tolerance to freeze-thaw stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *FEMS Yeast Res* **7**: 244-253.
- Aravind L, Koonin EV. 1999. Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery. *J Mol Evol* **48**: 291-302.
- Beau I, Esclatine A, Codogno P. 2008. Lost to translation: when autophagy targets mature ribosomes. *Trends Cell Biol* **18**: 311-314.
- Beaufour M, Godin F, Vallée B, Cadene M, Bénédicti H. 2012. Interaction proteomics suggests a new role for the Tfs1 protein in yeast. *J Proteome Res* **11**: 3211-3218.
- Ben Rejeb K, Abdelly C, Saviouré A. 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol Biochem* **80**: 278-284.
- Ben Rejeb K, Lefebvre-De Vos D, Le Disquet I, Leprince AS, Bordenave M, Maldiney R, Jdey A, Abdelly C, Saviouré A. 2015. Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **208**: 1138-1148.
- Brandriss MC. 1979. Isolation and preliminary characterization of *Saccharomyces cerevisiae* proline auxotrophs. *J Bacteriol* **138**: 816-822.
- Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, Bremer E. 2011. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J Bacteriol* **193**: 5335-5346.

- Buchan JR, Nissan T, Parker R. 2010. Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **470**: 619-640.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 323-337.
- Chen C, Dickman MB. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3459-3464.
- Cohen M, Stutz F, Belgareh N, Haguenaue-Tsapis R, Dargemont C. 2003. Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* **5**: 661-667.
- Coltri PP, Guimarães BG, Granato DC, Luz JS, Teixeira EC, Oliveira CC, Zanchin NI. 2007. Structural insights into the interaction of the Nip7 PUA domain with polyuridine RNA. *Biochemistry* **46**: 14177-14187.
- Deutscher D, Meilijson I, Kupiec M, Ruppin E. 2006. Multiple knockout analysis of genetic robustness in the yeast metabolic network. *Nat Genet* **38**: 993-998.
- Duttler S, Pechmann S, Frydman J. 2013. Principles of cotranslational ubiquitination and quality control at the ribosome. *Mol Cell* **50**: 379-393.
- Eisenberg T, Schroeder S, Andryushkova A, Pendl T, Küttner V, Bhukel A, Mariño G, Pietrocola F, Harger A, Zimmermann A et al. 2014. Nucleocytosolic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme A stimulates autophagy and prolongs lifespan. *Cell Metab* **19**: 431-444.
- Fujii K, Kitabatake M, Sakata T, Miyata A, Ohno M. 2009. A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev* **23**: 963-974.
- Fujii K, Kitabatake M, Sakata T, Ohno M. 2012. 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO J* **31**: 2579-2589.
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan RA, Csonka LN. 1998. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily

- divergent genes for Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiol* **118**: 661-674.
- Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dimpelfeld B et al. 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**: 631-636.
- Gavin AC, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M et al. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* **282**: 37298-37302.
- Herman PK. 2002. Stationary phase in yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**: 602-607.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K et al. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.
- Hoening M, Lee RJ, Ferguson DC. 1989. A microtiter plate assay for inorganic phosphate. *J Biochem Biophys Methods* **19**: 249-251.
- Hoose SA, Rawlings JA, Kelly MM, Leitch MC, Ababneh QO, Robles JP, Taylor D, Hoover EM, Hailu B, McEnery KA et al. 2012. A systematic analysis of cell cycle regulators in yeast reveals that most factors act independently of cell size to control initiation of division. *PLoS Genet* **8**: e1002590.
- Huang H, Kawamata T, Horie T, Tsugawa H, Nakayama Y, Ohsumi Y, Fukusaki E. 2015. Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *EMBO J* **34**: 154-168.

- Ignatova Z, Gierasch LM. 2006. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13357-13361.
- Ishitani R, Nureki O, Nameki N, Okada N, Nishimura S, Yokoyama S. 2003. Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell* **113**: 383-394.
- Jelifiska-Kazimierczuk M, Szydlowski J. 1996. Isotope effect on the solubility of amino acids in water. *J. Solution Chem* **25**: 1175-1184
- Kaake RM, Milenković T, Przulj N, Kaiser P, Huang L. 2010. Characterization of cell cycle specific protein interaction networks of the yeast 26S proteasome complex by the QTAX strategy. *J Proteome Res* **9**: 2016-2029.
- Kaino T, Takagi H. 2009. Proline as a stress protectant in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: effects of trehalose and *PRO1* gene expression on stress tolerance. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 2131-2135.
- Kaino T, Tasaka Y, Tatehashi Y, Takagi H. 2012. Functional analysis of the C-terminal region of γ -glutamyl kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**: 454-461.
- Kaino T, Tateiwa T, Mizukami-Murata S, Shima J, Takagi H. 2008. Self-cloning baker's yeasts that accumulate proline enhance freeze tolerance in doughs. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5845-5849.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**: 1507-1513.
- Kanki T, Wang K, Baba M, Bartholomew CR, Lynch-Day MA, Du Z, Geng J, Mao K, Yang Z, Yen WL et al. 2009a. A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol Biol Cell* **20**: 4730-4738.
- Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. 2009b. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell* **17**: 98-109.

- Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. 2008. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**: 2039-2050.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**: 263-276.
- Kitagaki H, Takagi H. 2014. Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies. *J Biosci Bioeng* **117**: 383-393.
- Kobayashi T, Suzuki K, Ohsumi Y. 2012. Autophagosome formation can be achieved in the absence of Atg18 by expressing engineered PAS-targeted Atg2. *FEBS Lett* **586**: 2473-2478.
- Kolawa N, Sweredoski MJ, Graham RL, Oania R, Hess S, Deshaies RJ. 2013. Perturbations to the ubiquitin conjugate proteome in yeast δ ubx mutants identify Ubx2 as a regulator of membrane lipid composition. *Mol Cell Proteomics* **12**: 2791-2803.
- Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M. 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* **10**: 602-610.
- Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP et al. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-643.
- Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. 2012. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem* **287**: 3265-3272.
- LaRiviere FJ, Cole SE, Ferullo DJ, Moore MJ. 2006. A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol Cell* **24**: 619-626.

- Ledesma-Amaro R, Buey RM, Revuelta JL. 2015. Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*. *Microb Cell Fact* **14**: 58.
- Li L, Ye K. 2006. Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle. *Nature* **443**: 302-307.
- Liang X, Dickman MB, Becker DF. 2014. Proline biosynthesis is required for endoplasmic reticulum stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **289**: 27794-27806.
- List B, Pojarliev P, Castello C. 2001. Proline-catalyzed asymmetric aldol reactions between ketones and alpha-unsubstituted aldehydes. *Org Lett* **3**: 573-575.
- Liu JF, Wang XQ, Wang ZX, Chen JR, Jiang T, An XM, Chang WR, Liang DC. 2004. Crystal structure of KD93, a novel protein expressed in human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Struct Biol* **148**: 370-374.
- Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Pérez-Arellano I, Cervera J, Fita I, Rubio V. 2007. A novel two-domain architecture within the amino acid kinase enzyme family revealed by the crystal structure of *Escherichia coli* glutamate 5-kinase. *J Mol Biol* **367**: 1431-1446.
- Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, Schroeder S, Pendl T, Harger A, Niso-Santano M et al. 2014. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol Cell* **53**: 710-725.
- Matsui A, Kamada Y, Matsuura A. 2013. The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLoS Genet* **9**: e1003245.
- Matsuura K, Takagi H. 2005. Vacuolar functions are involved in stress-protective effect of intracellular proline in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **100**: 538-544.
- Mazan-Mamczarz K, Hagner P, Dai B, Corl S, Liu Z, Gartenhaus RB. 2009. Targeted suppression of MCT-1 attenuates the malignant phenotype through a translational mechanism. *Leuk Res* **33**: 474-482.

- Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H. 2015. Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**: 359-362.
- Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**: 1157-1195.
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H. 2003. L-proline accumulation and freeze tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding γ -glutamyl kinase. *Appl Environ Microbiol* **69**: 212-219.
- Müller M, Kötter P, Behrendt C, Walter E, Scheckhuber CQ, Entian KD, Reichert AS. 2015. Synthetic quantitative array technology identifies the Ubp3-Bre5 deubiquitinase complex as a negative regulator of mitophagy. *Cell Rep* **10**: 1215-1225.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* **130**: 165-178.
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**: 4347-4368.
- Normand C, Capeyrou R, Quevillon-Cheruel S, Mougin A, Henry Y, Caizergues-Ferrer M. 2006. Analysis of the binding of the N-terminal conserved domain of yeast Cbf5p to a box H/ACA snoRNA. *RNA* **12**: 1868-1882.
- Nostramo R, Varia SN, Zhang B, Emerson MM, Herman PK. 2015. The Catalytic Activity of the Ubp3 Deubiquitinating Protease Is Required for Efficient Stress Granule Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **36**: 173-183.
- Obara K, Sekito T, Niimi K, Ohsumi Y. 2008. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J Biol Chem* **283**: 23972-23980.

- Ogura M, Kawata-Mukai M, Itaya M, Takio K, Tanaka T. 1994. Multiple copies of the *proB* gene enhance degS-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 5673-5680.
- Ogura M, Tanaka T. 1996. Transcription of *Bacillus subtilis* degR is sigma D dependent and suppressed by multicopy *proB* through sigma D. *J Bacteriol* **178**: 216-222.
- Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. 2009. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* **17**: 87-97.
- Onodera J, Ohsumi Y. 2004. Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 16071-16076.
- Onodera J, Ohsumi Y. 2005. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* **280**: 31582-31586.
- Ossareh-Nazari B, Bonizec M, Cohen M, Dokudovskaya S, Delalande F, Schaeffer C, Van Dorsselaer A, Dargemont C. 2010. Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy. *EMBO Rep* **11**: 548-554.
- Ossareh-Nazari B, Niño CA, Bengtson MH, Lee JW, Joazeiro CA, Dargemont C. 2014. Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. *J Cell Biol* **204**: 909-917.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**: 921-926.
- Pérez-Arellano I, Carmona-Alvarez F, Martínez AI, Rodríguez-Díaz J, Cervera J. 2010. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: from osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Sci* **19**: 372-382.
- Pérez-Arellano I, Gallego J, Cervera J. 2007. The PUA domain - a structural and functional overview. *FEBS J* **274**: 4972-4984.

- Pérez-Arellano I, Rubio V, Cervera J. 2005. Dissection of *Escherichia coli* glutamate 5-kinase: functional impact of the deletion of the PUA domain. *FEBS Lett* **579**: 6903-6908.
- Pérez-Arellano I, Rubio V, Cervera J. 2006. Mapping active site residues in glutamate-5-kinase. The substrate glutamate and the feed-back inhibitor proline bind at overlapping sites. *FEBS Lett* **580**: 6247-6253.
- Reggiori F, Klionsky DJ. 2013. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* **194**: 341-361.
- Reinert LS, Shi B, Nandi S, Mazan-Mamczarz K, Vitolo M, Bachman KE, He H, Gartenhaus RB. 2006. MCT-1 protein interacts with the cap complex and modulates messenger RNA translational profiles. *Cancer Res* **66**: 8994-9001.
- Ringel C, Siebert S, Wienhaus O. 2003. Photometric determination of proline in quartz microplates: remarks on specificity. *Anal Biochem* **313**: 167-169.
- Robinson JS, Klionsky DJ, Banta LM, Emr SD. 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.
- Rudolph AS, Crowe JH. 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* **22**: 367-377.
- Sabina J, Söll D. 2006. The RNA-binding PUA domain of archaeal tRNA-guanine transglycosylase is not required for archaeosine formation. *J Biol Chem* **281**: 6993-7001.
- Sasano Y, Haitani Y, Ohtsu I, Shima J, Takagi H. 2012. Proline accumulation in baker's yeast enhances high-sucrose stress tolerance and fermentation ability in sweet dough. *Int J Food Microbiol* **152**: 40-43.
- Scherrer T, Femmer C, Schiess R, Aebersold R, Gerber AP. 2011. Defining potentially conserved RNA regulons of homologous zinc-finger RNA-binding proteins. *Genome Biol* **12**: R3.

- Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast *VPS34* gene essential for protein sorting. *Science* **260**: 88-91.
- Seddon AP, Zhao KY, Meister A. 1989. Activation of glutamate by gamma-glutamate kinase: formation of gamma-cis-cycloglutamyl phosphate, an analog of gamma-glutamyl phosphate. *J Biol Chem* **264**: 11326-11335.
- Sekine T, Kawaguchi A, Hamano Y, Takagi H. 2007. Desensitization of feedback inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -glutamyl kinase enhances proline accumulation and freezing tolerance. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4011-4019.
- Shiroma S, Jayakody LN, Horie K, Okamoto K, Kitagaki H. 2014. Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Appl Environ Microbiol* **80**: 1002-1012.
- Solé C, Nadal-Ribelles M, Kraft C, Peter M, Posas F, de Nadal E. 2011. Control of Ubp3 ubiquitin protease activity by the Hog1 SAPK modulates transcription upon osmostress. *EMBO J* **30**: 3274-3284.
- Suzuki K, Morimoto M, Kondo C, Ohsumi Y. 2011. Selective autophagy regulates insertional mutagenesis by the Ty1 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Cell* **21**: 358-365.
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* **15**: 89-97.
- Takagi H. 2008. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 211-223.
- Takagi H, Iwamoto F, Nakamori S. 1997. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**: 405-411.
- Takagi H, Matsui F, Kawaguchi A, Wu H, Shimoi H, Kubo Y. 2007. Construction and analysis of self-cloning sake yeasts that accumulate proline. *J Biosci Bioeng* **103**: 377-380.

- Takagi H, Taguchi J, Kaino T. 2016. Proline accumulation protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in the stationary phase from ethanol stress by reducing reactive oxygen species levels. *Yeast*.
- Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y. 2005. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8656-8662.
- Takahashi M, Higuchi M, Matsuki H, Yoshita M, Ohsawa T, Oie M, Fujii M. 2013. Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol Cell Biol* **33**: 815-829.
- Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* **119**: 301-311.
- Tatehashi Y, Takagi H. 2013. Characterization of γ -glutamyl kinase mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **116**: 576-579.
- Terao Y, Nakamori S, Takagi H. 2003. Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6527-6532.
- Trier JS. 1963. Studies on small intestinal crypt epithelium. I. The fine structure of the crypt epithelium of the proximal small intestine of fasting humans. *J Cell Biol* **18**: 599-620.
- Troll W, Lindsley J. 1955. A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem* **215**: 655-660.
- Tsukada M, Ohsumi Y. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**: 169-174.
- Waite KA, Mota-Peynado AD, Vontz G, Roelofs J. 2016. Starvation induces proteasome autophagy with different pathways for core and regulatory particles. *J Biol Chem* **291**: 3239-3253.

- Warner JR. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**: 437-440.
- Willmund F, del Alamo M, Pechmann S, Chen T, Albanèse V, Dammer EB, Peng J, Frydman J. 2013. The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis. *Cell* **152**: 196-209.
- Woolford JL, Baserga SJ. 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **195**: 643-681.
- Xu YF, Létisse F, Absalan F, Lu W, Kuznetsova E, Brown G, Caudy AA, Yakunin AF, Broach JR, Rabinowitz JD. 2013. Nucleotide degradation and ribose salvage in yeast. *Mol Syst Biol* **9**: 665.
- Yamaguchi M, Noda NN, Yamamoto H, Shima T, Kumeta H, Kobashigawa Y, Akada R, Ohsumi Y, Inagaki F. 2012. Structural insights into Atg10-mediated formation of the autophagy-essential Atg12-Atg5 conjugate. *Structure* **20**: 1244-1254.
- Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, Ichikawa R, Kinjo M, Ohsumi Y. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol* **198**: 219-233.
- Ye K. 2007. H/ACA guide RNAs, proteins and complexes. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 287-292.
- Yim L, Martínez-Vicente M, Villarroja M, Aguado C, Knecht E, Armengod ME. 2003. The GTPase activity and C-terminal cysteine of the Escherichia coli MnmE protein are essential for its tRNA modifying function. *J Biol Chem* **278**: 28378-28387.
- Yoon J, Kikuma T, Maruyama J, Kitamoto K. 2013. Enhanced production of bovine chymosin by autophagy deficiency in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *PLoS One* **8**: e62512.

- Zanchin NI, Roberts P, DeSilva A, Sherman F, Goldfarb DS. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* **17**: 5001-5015.
- Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J et al. 2005. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* **120**: 715-727.
- Zhao XQ, Bai FW. 2009. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J Biotechnol* **144**: 23-30.
- 小原圭介, 大隅良典. 2008. オートファジーの膜動態を巡る謎. *生化学* **80**: 215-223.
- 荒木保弘, 大隅良典. 2012. オートファジーを長き眠りからめざめさせた酵母. *領域融合レビュー* **5**: 1-10.
- 田中啓二, 大隅良典 (編集) . 2006. ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー. *蛋白質核酸酵素* **51**: 1119-1556.