

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14474

研究課題名(和文) 出芽酵母における短寿命タンパク質の分解を制御するE3リガーゼの網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of budding yeast E3 ubiquitin ligases that regulate the degradation of short life protein

研究代表者

嘉村 巧 (Kamura, Takumi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ユビキチン・プロテアソーム系の多彩な生理機能を明らかにするために、基質側からE3を探索するシステムを構築した。出芽酵母のタンパク質半減期データベースから、機能的に重要な短寿命タンパク質を複数個選択した。そしてE3欠失株あるいは発現抑制株を用いてこれらのタンパク質の分解を制御するE3の同定を行った。その結果、Nup1、Tma17、Hcm1、Cdc1そしてSpo12の分解を制御するE3としてそれぞれ、p70、p75、p75、p65およびp150、そしてp340を見出した。さらにはp340によるSpo12分解の生理的意義を明らかにした。本研究によりユビキチン系の新たな機能が解明された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for E3s which control the stability of the substrates to clarify various phenomenon regulated by the ubiquitin proteasome system. We chose several functionally important short life proteins using a database for protein half-life of the budding yeast. We identified E3s which controlled the degradation of these proteins using E3 deletion strains. As a result, we found p70, p75, p75, p65 and p150 and p340 as E3s which controlled the degradation of Nup1, Tma17, Hcm1, Cdc1 and Spo12. In addition, we clarified the physiological significance of the Spo12 degradation mediated by p340. Our findings shed the light on the new function of ubiquitin proteasome system.

研究分野：生物学

キーワード：タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン・プロテアソーム系において、E3 リガーゼ(ユビキチン転移酵素)は特異的な基質と結合してユビキチンを付加する役割を担っている。出芽酵母には数十種類、哺乳類には数百種類の E3 リガーゼがあるが、多くの E3 リガーゼについては特異的な基質が未同定であるため、生理機能も明らかでない。ユビキチン・プロテアソーム系による生命現象の制御を明らかにするためには、個々の E3 リガーゼの基質を同定して、ユビキチン化の制御機構や分解の生理的意義を調べる必要がある (Deshaies and Joerio, *Annu. Rev. Biochem.* 2009)。

従来の基質探索では、E3 リガーゼと結合するタンパク質を two hybrid 法や質量分析などによって選び出し、膨大なリストの中から偽陽性を排除して、分解基質を絞り込む方法が採られてきた。しかしながら、結合を指標とした E3 リガーゼ側からの基質探索は、必ずしも容易ではないことが明らかになりつつある。たとえば、分解基質の選別は E3 リガーゼと基質の結合の強弱だけでなく、ユビキチン鎖の伸長、脱ユビキチン化、プロテアソームへの標的化ステップなど、多段階で制御されている。すなわち、E3 リガーゼと同程度の強さで結合するタンパク質でも、最終的に分解されるタンパク質と分解されない安定なタンパク質が存在する (Rape et al., *Cell* 2006; Zhang et al., *Cell* 2013)。また、E3 リガーゼと基質の相互作用が微弱で一過的であることも、結合を指標にした分解基質の探索を困難にしている。そこで本研究では、全く逆のアプローチとして、「基質側からの探索システム」を構築する。具体的には、データベースから短寿命タンパク質を選び出し、改変型 SGA (Synthetic Genetic Array) 法を駆使して、その分解を担う E3 リガーゼを網羅的に同定する。最終的には、同定した E3 リガーゼおよび分解基質の生理機能の解明を目指す。

2. 研究の目的

出芽酵母を材料とした研究では、網羅的な遺伝学的・生化学的データもとに、局所的な反応系に関連する因子群を同定して反応機構を解析するトップダウン型のアプローチが大きな成果をあげつつある。これを可能にしているのがリソースとデータベースの充実である。出芽酵母では、全ての非必須遺伝子のノックアウトコレクション、必須遺伝子のノックダウンコレクション (DAmP 株)、染色体上の全遺伝子の下流に各種タグを挿入したタグ付きコレクション (TAP (Tandem Affinity Tag) GFP, GST など) を容易に入手できる。さらに、二重変異株を網羅的に作製して表現型 (遺伝学的相互作用) を定量的に解析する SGA (Synthetic Genetic Array) 法も開発された。その他、共免疫沈降による物理的相互作用、GFP 融合タンパク質の細胞

内局在などの網羅的な解析の結果も、データベースから抽出できる。

本研究は E3 リガーゼの基質探索を目的としている。斬新な点は、出芽酵母の充実したリソースとデータベースを駆使して「機能的に重要で」「プロテアソーム依存的に分解される」「短寿命タンパク質」を最初に選別することにある。また、70 種類の E3 リガーゼの破壊株 (必須遺伝子についてはノックダウン株) において、3xHA タグを付加した分解基質を内在レベルで発現させる。この株を構築する時、SGA 法における株構築のステップを利用して、実験の簡素化と高速化を図ることに新規性がある (改変型 SGA 法)。出芽酵母のユビキチン修飾系酵素は約 70 種類に限られているので、それらを全て解析すれば E3 リガーゼを同定できる可能性が極めて高いと考えられる。さらに、分解基質の細胞内局在、表現型、遺伝学的・物理的相互作用の情報をもとに、候補となる E3 リガーゼを予測することも可能である。

3. 研究の方法

(1) プロテアソーム依存的に分解される基質の検索

ハーバード大学の O'Shea らは、染色体上の ORF 下流に TAP タグ (Tandem Affinity Tag) を挿入した出芽酵母株のコレクションを用いて、内在レベルで発現するタンパク質の半減期を網羅的に測定した (Belle et al., *PNAS* 2006)。我々はこのリストから半減期が 30 分以内で、過去の文献から機能的に重要であると予想され、短寿命の意義が未解明なタンパク質を抽出した。ユビキチン・プロテアソーム系による未知の制御があると期待される 5 つの分野 - 細胞周期、脂質・オルガネラ生合成、リボソーム生合成、転写因子制御、核膜制御 - に関連する短寿命タンパク質を扱う。これら遺伝子の染色体上の ORF 下流に、抗生物質 clonNAT 耐性遺伝子を用いて 3xHA タグを挿入する。発現をウエスタンブロットティングによって確認したのち、プロテアソーム阻害剤 (MG132) を使ったシクロヘキシミドチェイスによって、プロテアソーム依存的に分解される基質を選別する。

(2) 改変型 SGA (Synthetic Genetic Array) 法による E3 リガーゼの同定

SGA 法とは出芽酵母における遺伝学的相互作用を網羅的に解析する方法である (Baryshnikova et al., *Methods in Enzymology* 2010 など)。抗生物質 clonNAT の耐性遺伝子によって遺伝子 A を破壊した株と、全遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子によって破壊したノックアウトコレクション (~ 6500 クローン) を掛け合わせて、2 倍体を作製する。孢子形成の後、段階的なセレクションを経て、clonNAT とカナマイシンの両方に耐性をもつ 1 倍体の二重破壊株を作製する。それら二重破壊株の表現型から、遺伝子 A と他

の遺伝子の遺伝学的相互作用を網羅的に解析するものである。

本研究では、SGA における株構築のステップを利用する(改変型 SGA 法)。ユビキチン修飾系因子を欠損した破壊株をノックアウトコレクションから用意する。ユビキチン修飾系には APC(Anaphase Promoting Complex) や SCF 複合体の一部など、破壊株を作製できない必須遺伝子もある。これらについては、mRNA を不安定化することによって発現をノックダウンした DAmP 株(Breslow et al., Nat. Methods 2008)を用いる。これらの変異株と、3xHA タグを付加した分解基質の発現株を掛け合わせる。セレクションを経て最終的に完成する株は、3xHA タグを付加した分解基質を発現すると同時に、ユビキチン修飾系因子を欠損している。最終的に得られた株について、シクロヘキシミドチェイスと抗 HA 抗体によるウエスタンブロットティングを行い、分解に必要な E3 リガーゼおよびその制御因子を同定する。

(3) 同定した酵素・基質の関係により制御される生命現象の解明

同定した E3 リガーゼと分解基質について、免疫沈降および pull down アッセイによる相互作用の解析、シクロヘキシミドチェイスおよびパルスチェイス法による分解のアッセイ、in vitro ユビキチン化反応などを行う。さらに、分解制御機構(フィードバック・フィードフォワード制御など)、E3 リガーゼおよび分解基質の転写・翻訳レベルの発現調節機構、遺伝学的相互作用などの解析によって、ユビキチン化の制御や分解の生理的意義を調べる。

4. 研究成果

(1) 改変型 SGA(Synthetic Genetic Array) 法による E3 リガーゼの同定

種々の短寿命タンパク質の分解を制御する E3 リガーゼを改変型 SGA 法を用いて同定することを試みた。その結果、核膜孔複合体の構成因子である Nup1 が RING 型 E3 である p70 で分解されることを見出した。またストレス条件下でのプロテアソーム会合促進因子 Tma17 および転写因子 Hcm1 が RING 型 E3 である p75 で分解されることを見出した。そして細胞周期関連因子 Cdc1 が p65 と p150 の 2 つの異なる E3 で分解を制御されていることを発見した。さらには FEAR ネットワークの構成因子である Spo12 が Hect 型 E3 である p340 で分解されることを見出した。

(2) Spo12 の E3 リガーゼ p340 による分解制御機構の解析

Spo12 は p340 および APCCdh1 欠失株で安定化する

Spo12 と p340 の内在性の結合を免疫沈降実験によって調べた。染色体上の p340 遺伝子 ORF の末端に 3xFLAG タグを相同組換えによ

て挿入して、p340-3FLAG タンパク質を発現する株を作製した。細胞をガラスビーズによって破碎した後、抗 FLAG 抗体を用いて p340 を免疫沈降させた。その結果、Spo12 も共沈降されたことから、Spo12 と p340 は生理的な条件下で結合することが明らかになった。

p340 の E2 酵素として、Ubc4 および Ubc5 が報告されている。各欠失株においてシクロヘキシミドチェイスを行った結果、Ubc4 および Ubc5 欠失株において Spo12 の安定性が亢進した。したがって、Spo12 の分解には E2 酵素 Ubc4 および Ubc5 も関与することが明らかになった。

Spo12 は細胞周期関連因子であることから、APC によって分解が制御されている可能性も考えられた。そこで APC の活性化因子である Cdh1 の欠失株で Spo12 の分解を調べた結果、Spo12 が安定化することが明らかになった。さらに、p340 と Cdh1 を同時に欠失させると Spo12 は著明に安定化した。これらの結果から、内在性の Spo12 の分解が p340 と APCCdh1 によって制御されていることが明らかになった。

p340 と APCCdh1 を同時に欠失させると Spo12 がより強く安定化したことから、これら 2 つの E3 リガーゼの遺伝的な相互作用を調べた。Cdh1 欠失株の YPD プレートにおける増殖は 33 でもほぼ野生株と同等であり、p340 欠失株は若干の増殖遅延が見られた。しかし p340 と Cdh1 を同時に欠損した二重変異株では、より顕著な増殖遅延が観察された。

p340 は M 期における Spo12 の分解を制御する

Spo12 は M 期で転写誘導されて、M 期後期で活性化し、Cdc14 のリリースを促進させる。このように細胞周期特異的な機能を持つことから、Spo12 が細胞周期依存的に分解されている可能性が考えられた。そこで細胞をアルファファクター、ヒドロキシル尿素、ノコダゾールでそれぞれ G1、S、G2/M 期に同調させ、シクロヘキシミドチェイス実験を行った。その結果、Spo12 は G1 期で速やかに分解され、G2/M 期でも緩やかに分解されることが分かった。一方、S 期では比較的安定であった。Cdh1 を欠失させると、G1 期において Spo12 が安定化したことから、APCCdh1 は主に G1 期における Spo12 の分解を制御していると考えられた。一方、p340 を欠失させると G2/M 期で Spo12 が安定化したことから、p340 は G2/M 期における Spo12 の分解を制御していることが示唆された。

p340 欠損による増殖遅延は Spo12 欠損によって回復する

Spo12 が M 期で機能することと、p340 が M 期で分解を制御することから、p340 による Spo12 の分解が M 期から G1 期への移行に重要であることが予想された。そこで、p340 による Spo12 の分解制御の生理的意義を調べるた

め、まず野生株、Spo12 欠失株、p340 欠失株、および Spo12 と p340 の二重破壊株の増殖速度を調べた。Spo12 欠失株は野生株と同程度の増殖を示したのに対して、p340 欠失株は明らかな増殖遅延を示した。Spo12 が p340 によって制御される分解基質であるなら、p340 欠失株の増殖が遅くなる理由の少なくとも一部は、Spo12 が蓄積してしまった結果に依るものと考えられた。実際、p340 欠失株でさらに Spo12 を欠失させた二重破壊株では、増殖の部分的な回復が観察された。

p340 による Spo12 の分解は細胞増殖および細胞周期進行に重要である

p340 依存的な Spo12 の分解が細胞周期の進行に及ぼす影響を検討した。細胞をアルファファクターによって G1 期に同調させた後、細胞を洗浄して同調を解除し、細胞周期の進行を FACS で調べた。その結果、野生株は同調を解除してから約 90 分で M 期に入り、105 分で G1 期に戻った。さらに、150 分後には 2 回目の M 期に入り、180 分後には再び G1 期に戻った。Spo12 欠失株では野生株より少し遅れて 90~105 分で M 期に入り、120 分で G1 期に戻った。さらに、150 分後には 2 回目の M 期に入った。P340 欠失株では野生株に比べて G1 期と S 期が長く約 120 分後に M 期に入り、135 分で G1 期に戻ったが、他の株とは異なり、180 分後も 2 回目の M 期に入ることができなかった。しかし、p340 欠失株でさらに Spo12 を欠失させると、Spo12 欠失株と同程度まで細胞周期の進行が回復した。

Spo12 が M 期後期に機能する因子であるため、M 期中期と後期の細胞を観察しカウントした。その際、チューブリンを免疫染色によって可視化し、M 期中期に特徴的な metaphase spindle と M 期後期に特徴的な anaphase spindle をもとに区別した。その結果、野生株は同調を解除してから約 75~90 分で M 期後期の細胞が増え、105 分でなくなる。さらに、150 分後には再び M 期後期の細胞が増える。Spo12 欠失株では野生株より少し遅れて 75~105 分で M 期後期の細胞が増え、120 分でなくなる。さらに、165 分後には再び M 期後期の細胞が増える。P340 欠失株では Spo12 欠失株よりさらに遅れ 90~105 分で M 期後期の細胞が増加し、135 分で完全になくなるが、180 分後も再び M 期後期に入ることはいない。しかし、P340 欠失にさらに Spo12 を欠失させると、Spo12 欠失株と同程度まで回復した。Spo12 が Cdc14 のリリースを促進させることから、p340 による Spo12 の分解が Cdc14 のリリースに及ぼす影響を検証した。Cdc14 の挙動は内在性の Cdc14 に HA タグを付加して、免疫染色によって観察した。Cdc14 のリリースは核までリリースされる partial release と細胞質までリリースされる full release の 2 段階に区別することができるため、それぞれの段階にいる細胞の割合もグラフに示した。野生株では同調を解除してから

約 75~

90 分で Cdc14 のリリースが多く見られ、105 分で完全になくなる。さらに、150 分後には再び Cdc14 のリリースが見られた。Spo12 欠失株では野生株より少し遅れて 75~105 分で Cdc14 のリリースが見られ、120 分でもどる。さらに、165 分後には再び Cdc14 のリリースが見られた。P340 欠失株では Spo12 欠失株よりさらに遅れ 105 分前後で Cdc14 のリリースが見られ、135 分で完全になくなるが、180 分後も再び Cdc14 のリリースが見られることはなかった。しかし、p340 欠失にさらに Spo12 を欠失させると、Spo12 欠失株と同程度まで回復した。

また、同調解除後、p340 欠失株における Spo12 のタンパク量は野生株と比べて比較的安定化することが予測された。そこで、野生株および P340 欠失株における同調解除後の Spo12 のタンパク量を調べた。結果、P340 欠失株は確かに、野生株と比べて安定化したが、135 分後には一度減少している。これは G1 期に入ることによって Spo12 の発現量自体が減ったこと、APCCdh1 によって分解された影響であると考えられる。

細胞周期進行の遅延、M 期後期への移行および脱出、Cdc14 のリリースおよび回帰、いずれにおいても p340 欠失株において遅延が見られたが、さらに Spo12 を欠失させることで回復した。さらに、p340 欠失株における M 期後期前後での Spo12 の安定化も確認できた。これらの結果は、細胞増殖の結果と一致したことから、Spo12 が p340 によって制御される分解基質であることを強く示唆した。p340 欠失株において細胞周期の進行や Cdc14 のリリースおよび核小体への回帰が遅くなった原因の少なくとも 1 つは Spo12 が分解されず蓄積したことだと考えられた。以上の結果から p340 による Spo12 の分解が細胞増殖および細胞周期進行の制御に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Uematsu, K., Okumura, F., Tonogai, S., Okumura, A.J., Alemayehu, D.H., Nishikimi, A., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., and Kamura, T. ASB7 regulates spindle dynamics and genome integrity by targeting DDA3 for proteasomal degradation. *J Cell Biol* 215(1):95-106. DOI: 10.1083/jcb.201603062. (2016) 査読有
2. Okumura, F., Uematsu, K., Byrne, S.D., Hirano, M., Joo-Okumura, A., Nishikimi, A., Shuin, T., Fukui, Y., Nakatsukasa, K., Kamura, T. Parallel regulation of VHL disease by

- pVHL-mediated degradation of B-Myb and HIF- α . *Mol. Cell. Biol.*, 36(12):1803-17. doi: 10.1128/MCB.00067-16. (2016) 査読有
- Okumura, F., Okumura, A.J., Nakatsukasa, K., Kamura, T. The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases. *Cell Division*. 11:1 DOI 10.1186/s13008-016-0016-3. (2016) 査読有
 - Nakatsukasa, K., Kamura, T. Subcellular Fractionation Analysis of the Extraction of Ubiquitinated Polytropic Membrane Substrate during ER-Associated Degradation. *PLoS One*. Feb 5;11(2):e0148327. doi: 10.1371/journal.pone.0148327. (2016) 査読有
 - Nakatsukasa, K., Nishimura, T., Byrne, D., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Okumura, F., Kamura, T. The ubiquitin ligase SCFUcc1 acts as a metabolic switch for the glyoxylate cycle. *Molecular Cell*. 59:22-34 doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.013. (2015) 査読有
 - Nakatsukasa, K., Okumura, F., Kamura, T. Proteolytic regulation of metabolic enzymes by E3 ubiquitin ligase complexes: lessons from yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 50(6):489-502. doi: 10.3109/10409238.2015.1081869. (2015) 査読有
〔学会発表〕(計9件)
 - Alemayehu Dawit Hailu, 中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧：出芽酵母 E3 リガーゼ SCFDia2 の新奇基質 Pr11 の同定 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜) (Poster 発表)
 - 奥村 文彦、植松 桂司、外海 駿輔、奥村(城尾) 晶子、Alemayehu Dawit Hailu、錦見 昭彦、福井 宣規、中務 邦雄、嘉村 巧：ユビキチンリガーゼ ASB7 による DDA3 の発現制御は適切な紡錘体形成と染色体分配に必要である 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜) (Poster 発表)
 - 山口竜、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧：出芽酵母 E3 リガーゼ複合体 SCFMet30 による Ary34 の分解制御 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜) (Poster 発表)
 - 大谷悠貴、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧：出芽酵母タンパク質 BDF2 の機能解析 第 39

回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜) (Poster 発表)

5. 鈴木優太、栗田英奈、中務邦雄、奥村文彦、嘉村巧：リボソーム生合成を負に調節する転写制御因子 Dot6 および Tod6 は窒素源飢餓条件下でプロテアソーム依存的に分解される 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜) (Poster 発表)

6. 中務 邦雄、嘉村 巧：The Ubiquitin Ligase SCFUcc1 Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle ICY14 (The 14th International Congress on Yeasts) 2016 年 9 月 11 日～9 月 15 日 淡路夢舞台国際会議場(淡路島) (口頭発表 ポスター発表)

7. 中務 邦雄、嘉村 巧：F ボックスタンパク質 Ucc1 による代謝制御機構の解析 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートアイランド(神戸) (ワークショップ)

8. 植松 桂司、奥村 文彦、中務 邦雄、嘉村 巧：染色体安定性の維持における CRL5ASB7 ユビキチンリガーゼの機能 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートアイランド(神戸) (Poster 発表)

9. 富澤 優貴、中務 邦雄、奥村 文彦、嘉村 巧：ユビキチンリガーゼ SCFMet30 の新規基質 p17 の同定と機能解析 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートアイランド(神戸) (Poster 発表)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~2kamura/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嘉村 巧 (Takumi Kamura)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40333455

(2) 研究分担者

中務 邦雄 (Kunio Nakatsukasa)

名古屋大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：90547522