

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450084

研究課題名(和文) 酵母膜輸送体のグルコース不活性化の分子機構とその生物学的意義

研究課題名(英文) Mechanism and biological significance of glucose inactivation of transporters in yeast

研究代表者

新谷 尚弘 (Shintani, Takahiro)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70374973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：酵母はパンの製造やアルコール発酵に用いられる微生物である。酵母は環境中にグルコースが存在すると、乳酸やピルビン酸の取込みを制限する。その機構の一つにモノカルボン酸輸送体Jen1のグルコース誘導性のエンドサイトーシスを介した分解(グルコース不活性化という)が挙げられる。Jen1のグルコース不活性化はRsp5-Rod1ユビキチンリガーゼ複合体によるユビキチン化が引き金となり起こる。私たちは、Jen1のC末端の20アミノ酸の領域がRsp5-Rod1複合体によって認識され、膜輸送体のグルコース不活性化を引き起こすのに十分であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Yeast is a microbe that contributes to bread making and alcohol fermentation. Incorporation of lactic acid and pyruvate by yeast is inhibited in a medium containing glucose. This phenomenon is partly due to glucose-induced endocytic degradation, so-called as glucose inactivation, of Jen1. It is known that glucose inactivation of Jen1 is triggered by its ubiquitination by Rsp5-Rod1 ubiquitin ligase complex. We discovered that the C-terminal 20-amino-acid region of Jen1 recognized by Rsp5-Rod1 complex and sufficient to induce glucose inactivation of transmembrane transporter.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 モノカルボン酸輸送体 グルコース不活性化 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上にはアミノ酸や核酸、糖類などの多様な栄養源に対する輸送体が存在しており、刻々と変化する栄養条件に応答して、そのラインナップを最適化している。不要な輸送体はユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化をシグナルとしてエンドサイトーシスされ、液胞に輸送され分解されるが、どの輸送体が除去されるべきかという選択性に関わるメカニズムは長年不明であった。しかし、近年、酵母に 14 種類あるアレスチン様タンパク質がアダプターとして機能し、分解ターゲットとなる輸送体の Rsp5 によるユビキチン化を促していることが明らかとなりつつあった(1,2)。

グルコースは多くの微生物にとって最も利用しやすい炭素源であり、ほかの炭素源が存在していても優先的に取込まれる。パン酵母では、グルコースが涸渇するとモノカルボン酸輸送体 Jen1 を始めとする他の炭素源の輸送体が発現し、グルコースが再添加されると速やかに分解される。この現象は、グルコース不活性化と呼ばれ、近年 Jen1 のグルコース不活性化には、Rod1/Art4 (以下、Rod1 と表記) と呼ばれる -アレスチンが Rsp5 アダプターとして機能することが示されていた(3)。しかし、これら輸送体の不活性化機構の全容や生物学的重要性は明らかでなかった。

2. 研究の目的

グルコースの存在によって分解が促進される Jen1 をモデルとし、その分解機構を明らかにすることを目的とした。細胞膜上にある Jen1 の分解は、Rsp5-Rod1 ユビキチンリガーゼ複合体による Jen1 のユビキチン化が引き金となって起こることが分かっていた。そこで、Rsp5-Rod1 による Jen1 の認識機構を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

ほぼ全ての実験で、Jen1 の C 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した Jen1-GFP を *JEN1* プロモーター制御下で出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において発現させた。乳酸を単一炭素源とする培地で酵母株を生育させることで Jen1-GFP の発現を誘導した後、グルコース (終濃度 2%) を培地に添加して *JEN1-GFP* 遺伝子の転写を停止させるとともに、Jen1-GFP の分解を開始させた。Jen1-GFP の分解速度の解析には、抗 GFP 抗体 (mFX75、和光純薬工業株式会社) を用いたウェスタンブロット法と蛍光顕微鏡による局在解析法を用いた。Jen1 と Rod1 の *in vivo* 相互作用解析には、二分子蛍光相補 (Bimolecular fluorescence complementation; BiFC) 法を用いた。Jen1-GFP のユビキチン化の確認は、抗 GFP 抗体 (ロッシュ) を用いて免疫沈降した後、抗ユビキチン抗体 (P4D1、サンタクルーズ・バイオテクノロジー

社) を用いたウェスタンブロット解析法で行った。

4. 研究成果

Jen1 のグルコース不活性化には Rod1 が必要であることが知られている(3)。しかし、私たちは *rod1* 破壊株でも Jen1 の分解は完全には阻害されないことを明らかにした。そこで、Rod1 の他に Jen1 の分解に関与する Rsp5 アダプターがないか調べた結果、互いに機能が重複する Bul1 と Bul2 が追加的に必要であることが分かった。即ち、*rod1Δbul1Δbul2Δ* 三重破壊株で著しく Jen1-GFP の分解が阻害された。そこで、次にこれらのアダプタータンパク質が Jen1 のどの領域の認識に関与するか解析した。

Transmembrane hidden Markov model 解析により、Jen1 は 12 回膜貫通型膜タンパク質であり、その N 末端、C 末端が細胞質側に面していることが推測された。そこで、Jen1 の N 末端領域、C 末端領域を欠失した変異体を作製した。C 末端領域を欠失した Jen1ΔC (C 末端の 43 アミノ酸を欠失) は輸送活性を保持していたが、グルコースに応答した分解とユビキチン化が著しく損なわれていた。この変異体を *rod1Δ* 破壊株で発現させても、分解速度はあまり変化しなかったことから、C 末端領域が、Rod1 依存的な分解に関与していることが示唆された。一方、N 末端の欠失した Jen1ΔN (2-94 番目アミノ酸を欠失) も弱いながら分解が抑制された。しかし、この欠失によるユビキチン化レベルの低下は顕著ではなかった。従って、C 末端領域が Jen1 のグルコース不活性化に重要な役割を果していることが言える。Jen1ΔC-GFP が *bul1Δbul2Δ* 二重破壊株で著しく安定化すること、Jen1ΔN-GFP の分解速度が *bul1Δbul2Δ* 株と野生株で変わらないことから、Bul1 と Bul2 は主に Jen1 の N 末端の認識に関与していることが示唆された。

Rod1 による C 末端領域の認識機構を明らかにするため、欠失領域を狭めた変異体を発現させた。その結果、C 末端の 13 アミノ酸を欠失した変異体もグルコース不活性化に対して耐性であった。この 13 アミノ酸領域に対してアミノ酸置換変異を導入した結果、C 末端近傍の His-612、Ile-613、Glu-614 を Ala に置換した変異体 (3A) のユビキチン化は顕著に阻害され、そのグルコース誘導性の分解も回避された。GFP タグを N 末端に付加した GFP-Jen1 を用いて同様の実験を行っても、分解特性に変化はなかった。この結果は、GFP タグの付加は、Rod1 による Jen1 の認識に影響を与えず、Rod1 による認識部位が必ずしも末端にある必要はないことを示している。

次に、Jen1 の C 末端領域と Rod1 の相互作用について解析した。まず、*in vitro* 結合実験を行った。即ち、Jen1 の C 末端領域 (556-616 番目アミノ酸) を日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum* 由来グルタチオン-S-トランスフ

ェラーゼ (GST) に融合した GST-Jen1C を大腸菌で発現させ、グルタチオン・セファローズビーズに固定した。この固定化ビーズとグルコースで処理した酵母から調製した細胞抽出液を混和した後、ビーズと結合したタンパク質を解析した。しかしながら、結合タンパク質として Rod1 を検出することはできなかった。そこで、BiFC 法による *in vivo* の相互作用の検出を試みた。BiFC は二つに分断された蛍光タンパク質が会合した時のみ蛍光を発することを利用したタンパク質-タンパク質間相互作用を検出する方法である。Jen1 に黄色蛍光タンパク質 Venus の N 末端側領域 VN を、Rod1 に Venus の C 末端側領域 VC を融合したタンパク質を発現させた。乳酸培地で Jen1-VN の発現を誘導した後、グルコースを添加すると、原形質膜上に BiFC のシグナルが得られた。一方、3A 変異体と Rod1 の相互作用から得られる BiFC シグナルは著しく低下した。この結果から、Jen1 の His₆₁₂-Ile-Glu は Rod1 との相互作用に重要であることが明らかとなった。

次に、Jen1 の C 末端領域が Rod1 を介した分解の誘発に十分であるか解析した。即ち、グルコース不活性化を受けない膜輸送体 Mup1 に Jen1 の C 末端領域 (Jen1C; 20 アミノ酸からなる) を融合し、その分解様式を解析した。Mup1 は高親和性メチオニン輸送体であり、細胞外の高濃度のメチオニンを感知して、-アレスチン Art1 依存的に分解を受けることが知られている (1)。Jen1C を付加した Mup1-Jen1C-GFP は Mup1-GFP と同様に培地へのメチオニン添加で速やかに分解されたが、グルコース添加に対しては Mup1-Jen1C-GFP のみが分解された。このグルコース不活性化は、Rod1 依存的かつ付加した Jen1C 中の His₆₁₂-Ile-Glu 配列依存的であった。これらの結果より、Jen1C 領域はグルコースに応答して膜タンパク質を分解に導くのに十分であることが示された。

次に、Mup1-Jen1C-GFP のエンドサイトーシスに必要なユビキチン化部位の解析を行った。Mup1 のメチオニン誘導性の分解には、その Lys-27 残基と Lys-28 残基のユビキチン化が必要であることが示されている (4)。報告通り、Mup1-GFP と Mup1-Jen1C-GFP のメチオニン誘導性の分解とユビキチン化は Lys-27 と Lys-28 のアルギニンへの置換で阻害されたが、Mup1-Jen1C-GFP のグルコース誘導性分解とユビキチン化は阻害されなかった。このことは、Mup1 の分解には Lys-27 と Lys-28 のユビキチン化が必ずしも必要ではないことを意味している。付加した Jen1C 領域中に含まれている Lys-599 残基と Lys-607 残基をアルギニンに置換したところ、Mup1-Jen1C-GFP および Jen1-GFP のグルコース不活性化は阻害された。これらの結果より、Rsp5-Rod1 複合体は Jen1C に含まれる His₆₁₂-Ile-Glu を認識し、その近傍の Lys 残基をユビキチン化することが示唆された。

培地中のグルコースが枯渇している時、Rod1 は Snf1 キナーゼによってリン酸化されており、グルコースの再添加で Glc7-Reg1 ホスファターゼにより脱リン酸化される (3)。このことから、脱リン酸化された Rod1 が Jen1 と相互作用することが考えられた。Mup1 やウラシル輸送体 Fur4 を始めとする多くの栄養源輸送体は、自らの輸送基質が培地中に過剰に存在すると、エンドサイトーシスを介した分解を受ける。基質の通過に伴う輸送体のコンフォーメーション変化が -アレスチンとの結合を介したユビキチン化を引き起こすというモデルが考えられている (4,5)。即ち、基質と結合していない輸送体は自らの N 末端領域が輸送体本体と分子内相互作用しており、基質との結合によりこの相互作用が解除され、-アレスチンとの結合部位が露出するというものである。これに対して、Jen1 は自らの輸送基質が存在していなくても、グルコースシグナルに応答して分解を受ける。C 末端領域に存在する Rod1 結合部位は常に露出しており、Rod1 のリン酸化状態で Jen1 のユビキチン化が制御されていると考えられた。

引用文献

1. Lin, C. H. et al. (2008) *Cell*, **135**, 714-725
2. Nikko, E., and Pelham, H. R. (2009) *Traffic*, **10**, 1856-1867
3. Becuwe, M. et al. (2012) *Journal of Cell Biology*, **196**, 247-259
4. Guiney, E. L. et al. (2016) *Molecular Biology of the Cell* **27**, 4043-4054
5. Keener, J. M., and Babst, M. (2013) *Traffic* **14**, 412-427

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1件)

Shoki Fujita, Daichi Sato, Hirokazu Kasai, Masataka Ohashi, Shintaro Tsukue, Yutaro Takekoshi, Katsuya Gomi, and Takahiro Shintani, The C-terminal region of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 acts as a glucose signal-responding degron recognized by the -arrestin Rod1, (2018) *Journal of Biological Chemistry*, in press (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.RA117.001062

[学会発表](計12件)

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース不活性化における -アレスチン Rod1 による認識とユビキチン化制御機構の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、Rsp5 アダプタータンパク質 Art4 によるモノカルボン酸輸送体 Jen1 C-tail 認識と標的ユビキチン化制御機構の解析、酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会、2017 年

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、膜輸送体 Jen1 の分解に関する Rsp5 アダプターの Jen1 認識領域の探索、酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会、2016 年

Shoki Fujita, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani, Identification of regions of plasma membrane transporter Jen1 recognized by Rsp5 adaptor proteins in its vacuolar trafficking pathways, 14th International Congress on Yeast, 2016 年

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、グルコースにより不活性化される酵母膜輸送体 Jen1 のアレスチン様タンパク質 Art4 による認識領域の解析、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

竹越 祐太郎、五味 勝也、新谷 尚弘、グルコースグルコース抑制における 3' UTR が担う役割の解析、酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会、2015 年

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、Rsp5 アダプタータンパク質 Art4 のモノカルボン酸輸送体 Jen1 認識ドメインの探索、酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会、2015 年

Takahiro Shintani, Shoki Fujita, Katsuya Gomi, Identification of regions in monocarboxylic acid transporter Jen1 requisite for its glucose-induced degradation and recognition by Rsp5 adaptor Rod1, 27th International conference on yeast genetics and molecular biology, 2015 年

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、出芽酵母モノカルボン酸輸送体 Jen1 のグルコース不活性化に必要なアレスチン様タンパク質 Art4 による Jen1 認識領域の探索、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年

竹越 祐太郎、松本 耕助、五味 勝也、新谷 尚弘、転写産物の安定化によるモノカルボン酸輸送体遺伝子 JEN1 のグルコース抑制の遅延、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年

竹越 祐太郎、五味 勝也、新谷 尚弘、グルコースに応答したモノカルボン酸輸送体 Jen1 の減少における Ccr4-Not 複合体の役割、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告

会、2014 年

藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘、モノカルボン酸輸送体 Jen1 のエンドサイトーシスにおける Rsp5 アダプタータンパク質 Art4 による Jen1 認識機構の解析、酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会、2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 尚弘 (SHINTANI, Takahiro)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70374973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

五味 勝也 (GOMI, Katsuya)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：60302197

(4) 研究協力者

藤田 翔貴 (FUJITA, Shoki)
竹越 祐太郎 (TAKEKOSHI, Yutaro)