



ユビキチン-プロテアソーム系に関するuts2+遺伝子の単離と機能解析

加茂, 統良

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2597

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002597>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



ユビキチン-プロテアソーム系に関与する

uts2⁺ 遺伝子の単離と機能解析

加 茂 統 良

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
皮膚科学分野

(指導：市橋 正光教授)

連絡先：加茂 統良

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
皮膚科学分野

〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1

電話：078(382)6134

(平成14年2月14日受付)

要 約

紫外線照射により、細胞ではDNAの損傷とその修復、細胞周期の変化、アポトーシスなど多様な現象が引き起こされるが、紫外線に対する細胞応答の機構には未だ不明な点が多い。我々は、分裂酵母をモデル系として研究を行い、短波長紫外線に対して超感受性を示すと共に温度感受性も示す変異株 (*uts2-1*) を得た。*uts2-1*は紫外線、温度以外にも、methylmethanesulfonate、カルシウムイオン、重金属、酸化ストレスなど多様なストレスに対して感受性を示した。*Uts2*のアミノ酸配列を解析した結果、*Uts2*はWD40反復構造を含む新規遺伝子であることが判明した。さらに、*uts2-1*の温度感受性を部分的に相補する遺伝子としてポリユビキチンをコードする *ubi4*⁺ が得られた。また、*uts2* 遺伝子破壊株は野生株に比べて細胞内ユビキチン量が著しく減少していること、および *uts2*⁺ の導入にてプロテアソームの機能に異常をもつ変異株の表現型が相補されることが判明した。これらの結果から、*Uts2* はユビキチン-プロテアソーム系において、ユビキチンの供給、消費に強い影響を与えることが示唆された。

緒 言

細胞周期、シグナル伝達、ストレス応答などに関するさまざまな遺伝子群は分裂酵母からヒトに至るまで

きわめて高度に保存されている。分裂酵母は、ゲノムサイズがヒトの約250分の1で、3本の染色体に約5,000の遺伝子を含む単細胞の真核生物である。哺乳動物細胞では複雑で解析が困難な生体反応であっても、分裂酵母をモデル系として用いることで明快かつ単純化することができる。我々は、紫外線に対するストレス応答機構を解明するため、紫外線に超感受性を示す分裂酵母変異株についてその変異遺伝子及びそれに関連する遺伝子の解析を行ったところ、その欠損、導入によりユビキチン量が著しく変化する遺伝子を発見した。ユビキチンは76個のアミノ酸からなる低分子蛋白で、基質に結合してユビキチン化し、ユビキチン-プロテアソーム系と言われる蛋白質分解経路によって基質を分解する際の主要な蛋白であるが、今回発見した遺伝子はユビキチン量調節を解明する上で極めて重要な役割のあるものと考えられる。

方 法

材料

分裂酵母は HM123 (*h⁺leu1*), *uts2-1* (*h⁺leu1 uts2-1*), $\Delta uts2$ (*h⁺leu1 ura4 uts2::ura4⁺*), 大腸菌は DH5 α [*supE44*, $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *grayA96*, *thi-1*, *relA1*] 株を用いた。培地は、YPD (1% yeast extract, 2% ポリペプトン, 1% dextrose, 0.9% agar), EMM¹⁾, LB (0.5% yeast extract, 1% ポリペプト

キーワード：紫外線、ストレス応答、ユビキチン、蛋白質分解、WD40反復構造

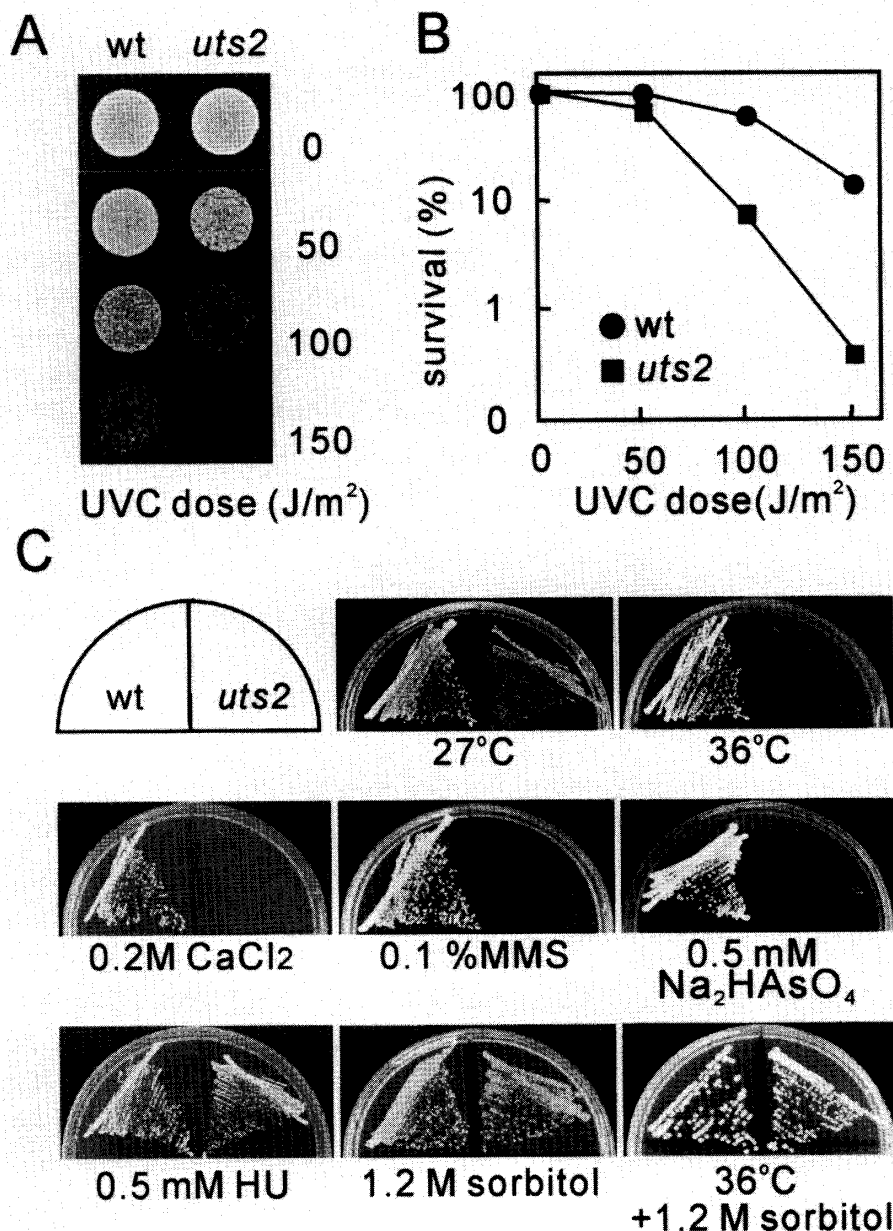


図1 *uts2-1*変異体のストレス感受性。変異体の紫外線感受性（ドロップテスト(A)）とこれを定量的に示したもの（B）。C, *uts2-1*変異体は様々なストレスに対して感受性を示す。

ン, 0.5%NaCl) を用いた。分裂酵母の遺伝学的操作は Moreno らの方法²⁾に従って行った。分子生物学的操作については Sambrook らの方法³⁾に従って行った。

結 果

紫外線超感受性分裂酵母変異株の単離

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces Pombe*) をニトロログアニジンにて処理することで突然変異を誘発, 紫外線 (UVC) および高温に強い感受性を示す株 (*uts2-1*) を得た (図1 A, B)。 *uts2-1* は紫外線, 高温の他に, 0.2M CaCl_2 , 0.1% methyl-methanesulfonate (MMS), 0.5mM 亜砷酸に感受性が強く, 0.5mM Hydroxyurea (HU), 高浸透圧ストレスでは野生株

と同様に増殖した。また, 高浸透圧下においては高温感受性が抑圧された (図1 C)。さらに, 過酸化水素, caffein にも強い感受性を示し, 接合率も低下していた。

uts2⁺ 遺伝子の単離

分裂酵母遺伝子ライブラリーから *uts2-1* の高温感受性を相補するプラスミドを単離し, 遺伝子を同定, 塩基配列を含んだ DNA 断片を得た。 *uts2*⁺ の塩基配列を解析した結果, その N 末端側に WD40 反復配列を含んでいた。

uts2⁺ の遺伝子破壊

uts2⁺ 遺伝子中の制限酵素切断部位に *ura4*⁺ を相同

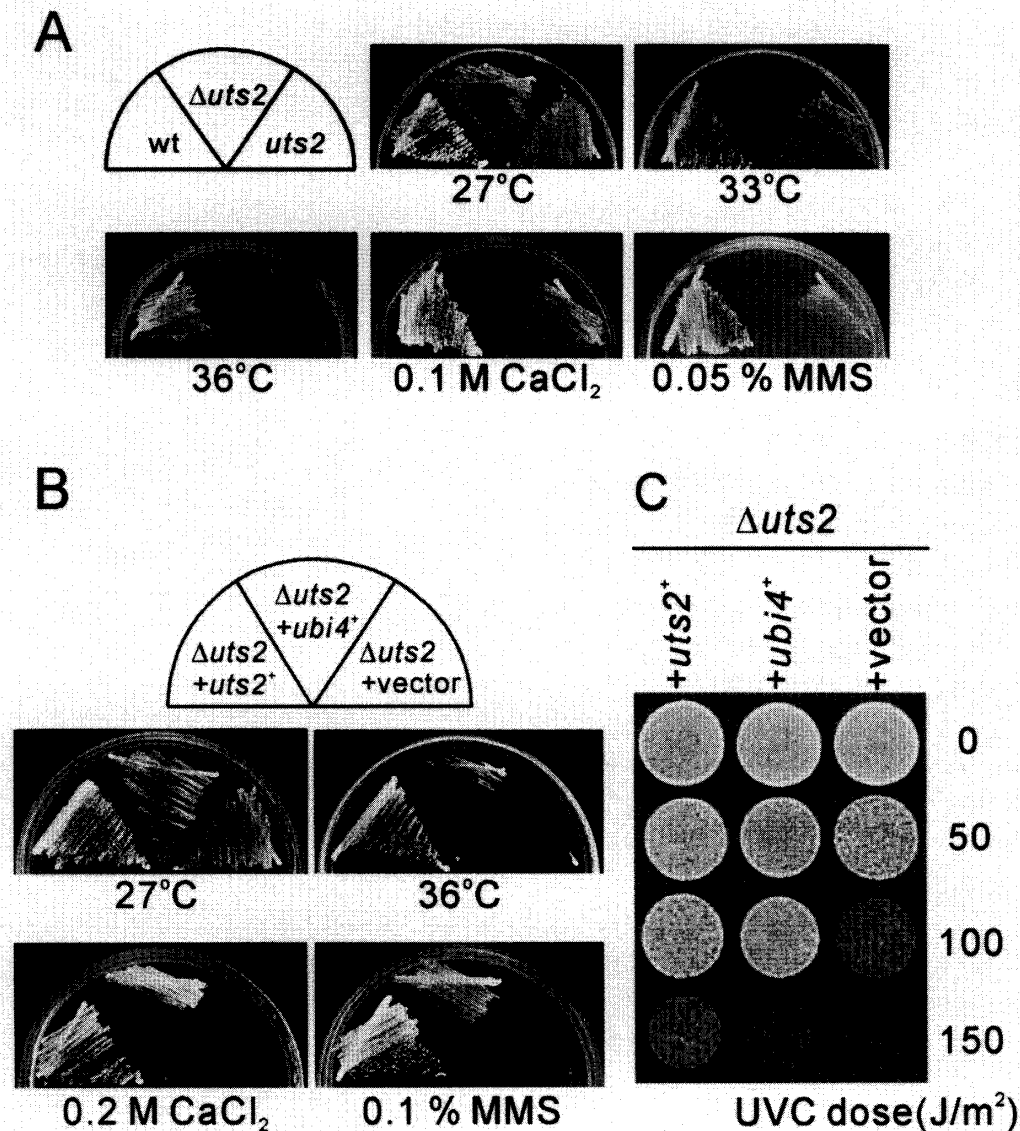


図2 $uts2^+$ 遺伝子破壊。A, $uts2^+$ 遺伝子破壊株 ($\Delta uts2$) のストレス感受性。変異体よりも様々なストレスに対してより強い感受性を示す。B, $\Delta uts2$ のストレス感受性はユビキチン遺伝子の過剰発現によって部分的に相補される。C, $\Delta uts2$ の紫外線感受性はユビキチン遺伝子の過剰発現によって部分的に相補される。

入れ替えにて挿入、破壊し、 $uts2$ 破壊株 ($\Delta uts2$) を得た。 $\Delta uts2$ の表現型を調べたところ、 $uts2-1$ が感受性を示す全てのストレスにおいて $\Delta uts2$ はさらに強い感受性を示し (図2 A), 許容温度内での増殖速度も低下していた。

多コピー抑圧遺伝子の単離、同定

$uts2-1$ の単離と同様、 $\Delta uts2$ に分裂酵母 DNA ゲノムライブラリーを導入し、温度感受性およびカルシウムイオン (0.2M $CaCl_2$) を加えた YPD 培地にて培養したところ、カルシウムイオン感受性を部分的に相補する株が得られ、プラスミドを抽出した。得られたプラスミドを解析したところ、ポリユビキチン遺伝子 $ubi4^+$ であることが判明した。さらに、 $ubi4^+$ を多

コピーで発現した $\Delta uts2$ の各種ストレスに対する感受性を比較するため、0.2M $CaCl_2$ 、0.1% MMS を加えた YPD プレート上 (27 °C), 及び高温下 (36 °C) の YPD プレート上で培養した。 $uts2^+$ を導入したもの及びベクターのみを導入したものと比較して、各種ストレスに対する感受性を部分的に相補していた (図2 B)。 $ubi4^+$ を $\Delta uts2$ に過剰発現することによる表現型の相補は、温度、カルシウムイオン感受性以外に紫外線に対しても同様の結果であった (図2 C)。

Uts2 の細胞内局在

Uts2のN末端に蛍光蛋白 (green fluorescent protein : GFP) を融合させたものを発現し、蛍光顕微鏡にて観察した。核質の蛍光がやや強いが、細胞質全体に

も均一に存在していた (図 3 A)。各種ストレスを与えても、分布に変化は無く、細胞周期の各段階においても変化は認めなかった。

Δ*uts2* の細胞内ユビキチン量の測定

抗ユビキチン抗体を用いた Western blot にて細胞内のユビキチン量を測った (図 3 B)。野生株に比べて Δ*uts2* はユビキチン量が極端に減少していたが、*uts2*⁺ あるいは *ubi4*⁺ の発現によりユビキチン量は増加した。一方、*ubi4*⁺ 破壊株においてはユビキチン量の減少はみられなかった。

Δ*uts2* におけるユビキチンの寿命

ユビキチンの N 末端に Flag タグを融合した Flag-ユビキチンを *nmt1* promotor にて野生株及び Δ*uts2* に過剰発現し、許容温度、富栄養下において培養し、24 時間後 cycloheximide を加えて蛋白合成を阻害、Flag-ユビキチンの産生を停止し、その後抗 Flag 抗体を用いて細胞内の Flag-ユビキチン量の経時変化を調べた (図 3 C)。Δ*uts2* は野生株に比して、Flag-ユビキチン量の減少が poly-ユビキチン、mono-ユビキチンとも極めて速くなっていた。

Δ*uts2* におけるユビキチン転写

Nothern blot にて *ubi4*⁺ の mRNA を測定し、Δ*uts2* 産生の変化を調べた。野生株において、*ubi4*⁺ の転写が窒素飢餓状態で増加するが、同様の条件において Δ*uts2* の *ubi4*⁺ の転写も野生株と同様に増加した (図 3 D)。

uts2⁺ の種々の断片による相補能

uts2⁺ を制限酵素切断部位や PCR 法による断片の増幅により数カ所の断片に分割、それぞれを Δ*uts2* に導入し相補能を調べた。Uts2 の WD40 反復配列を含まない C 末端部分 (Uts2ΔN) を導入することで Δ*uts2* の高温感受性が相補された。しかし、WD40 反復配列部分のみ (Uts2ΔC) では表現型に変化はみられなかった。高温以外のストレス感受性も Uts2ΔN の導入によって同様に相補された。Uts2ΔN と Uts2ΔC の局在を調べるため、Uts2ΔN と Uts2ΔC の N 末端に GFP を融合させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、Uts2 全長の場合と明らかな差は認めず、各種ストレスによる変化もなかった。

Uts2ΔN の過剰発現

Uts2ΔN を *nmt1* promotor にて過剰発現すると、野生株が各種ストレスに対して強い感受性を示すようになった (図 4 A)。Flag-ユビキチンを導入し、Uts2

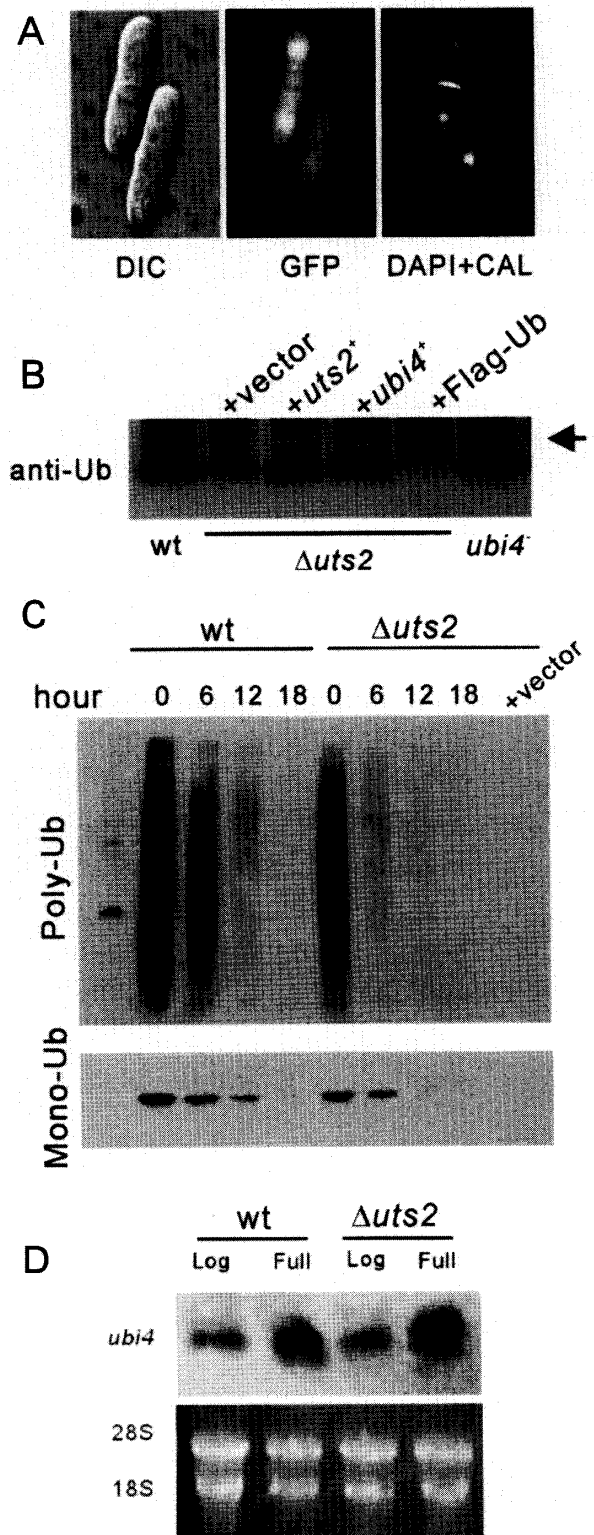


図 3 *uts2*⁺ 遺伝子産物の局在と破壊株におけるユビキチン代謝。A, GFP-Uts2 の細胞内局在。DAPI, CAL はそれぞれ核と中隔を示す。B, Δ*uts2* ではユビキチン量が減少している。矢印は Flag-ユビキチンのバンドを示す。C, Δ*uts2* ではユビキチン寿命が短い。Flag-ユビキチンを過剰発現した細胞で調べた。D, Δ*uts2* ではユビキチンの転写は正常である。*ubi4*⁺ 遺伝子のプロンプを用いた。

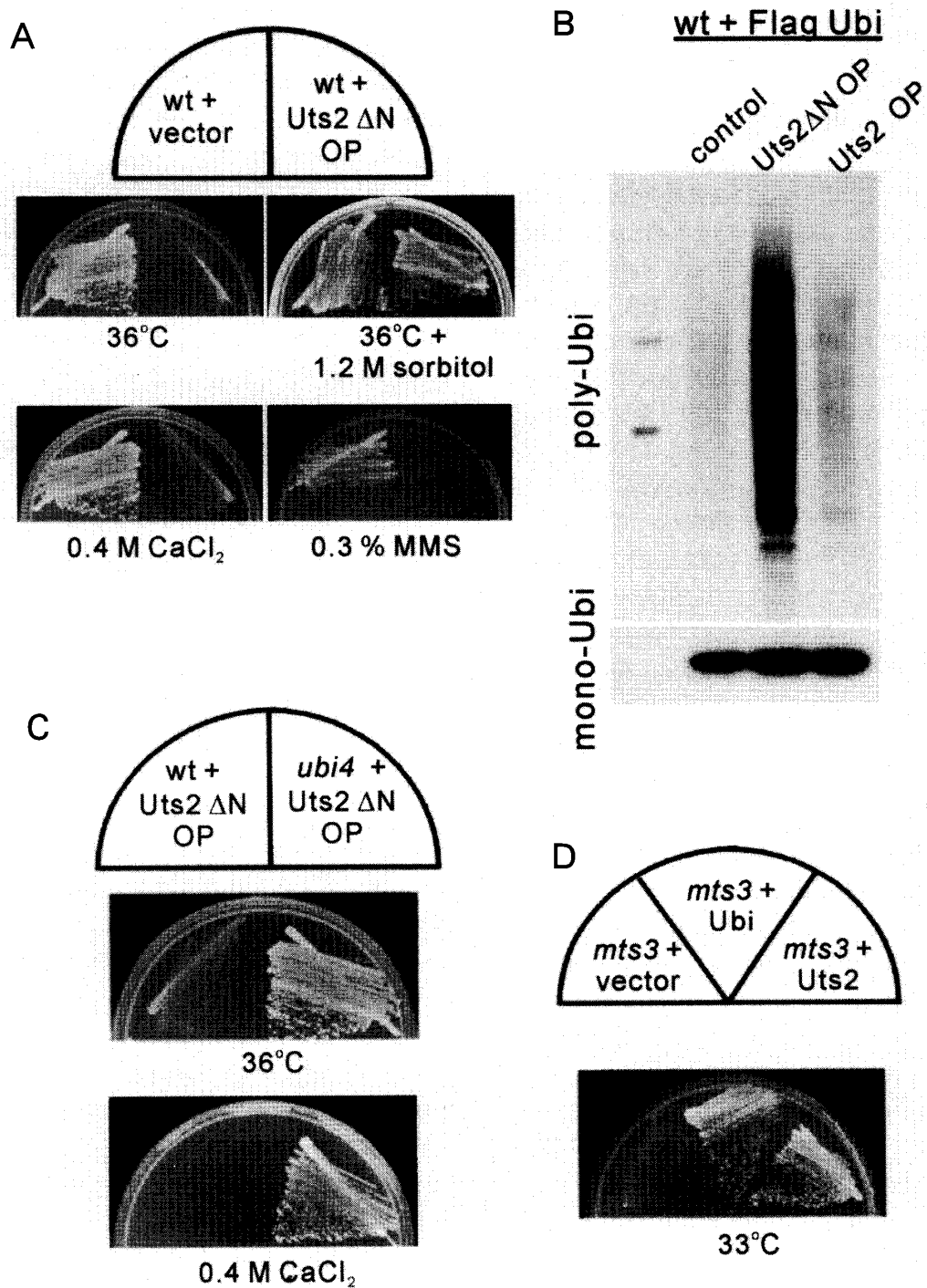


図4 Uts2のWD40反復構造を含まないC末端部分(Uts2 Δ N)の導入効果とプロテアソームとの関係。A, Uts2 Δ Nの過剰発現株はストレス感受性を示す。B, Uts2 Δ Nの過剰発現は細胞内ユビキチンの増加をきたす。C, Uts2 Δ Nの過剰発現による細胞毒性は *ubi4* 変異体において減弱する。D, プロテアソーム遺伝子 *mts3* 変異体の表現型は Uts2 およびユビキチンの過剰発現により抑圧される。

Δ N を過剰発現した野生株において細胞内ユビキチンを測定したところ poly-ユビキチン, mono-ユビキチンとも極端に増加したが, *uts2*⁺ の全長の過剰発現では増加は軽度であった (図4B)。また, Δ *ubi4* に Uts2 Δ N を過剰発現したが, 野生株にみられるよう

な表現型の変化は認めなかった (図4C)。

uts2⁺ の導入により, *mts3* の表現型が相補される。

26S プロテアソームのサブユニットの変異株である, *mts3* に *uts2*⁺ を多コピーで導入したところ温度感受性が相補され, さらにユビキチンのみを *nmt1*

promotor にて導入しても同様に温度感受性が相補された (図 4 D)。

考 察

短波長紫外線 (UVC) および温度感受性によるスクリーニングの結果、単離された変異株 *uts2-1* を解析することで得られた Uts2 (UV and temperature sensitive) は、その N 末端側に WD40 反復構造を含んでいた。WD40 反復構造は、真核細胞における細胞分裂、シグナル伝達、RNA 合成、小胞体輸送などさまざまな場面において存在し、蛋白-蛋白間の相互作用または結合に重要な足場構造と考えられている⁴⁾。出芽酵母のホモログである Doal/Ufd3 蛋白は出芽酵母のユビキチン-プロテアソーム系において CDC48 と複合体を作り、ユビキチンの量を調節していると考えられており、*doal/ufd3* 変異株では細胞内ユビキチン量が減少していることが分かっている⁵⁾。

また、ほ乳類のホモログである phospholipase A2 activating protein (PLAP) の詳細は解明されていないが、好中球の遊走やリソソームからの加水分解酵素、活性酵素などの分泌の促進、また leukotriene D4 の刺激により平滑筋や血管内皮細胞より分泌され、細胞膜のリン脂質の分解から始まるアラキドン酸カスケードの活性化を誘導することが判明している^{6), 7)}。さらに phospholipase A2 はほ乳類における細胞分裂、増殖において mitogen activated protein kinases (MAPK) の下流にあるとされ⁸⁾、PLAP と相同性の高い Uts2 がユビキチン-プロテアソーム系に影響を与えていることより、アラキドン酸カスケードを介した細胞の炎症反応およびストレス感受性における MAPK の働きにユビキチン-プロテアソーム系が関連している可能性も考えられ、同様に $\Delta uts2$ の多様なストレスへの感受性や増殖能の異常も MAPK 系が関与している可能性が考えられる。

$\Delta uts2$ の表現型を相補する遺伝子として *ubi4⁺* が単離され、ユビキチン量の野生株と比較の結果、 $\Delta uts2$ のユビキチン量が著明に減少しており、さらに *ubi4⁺* を導入することで $\Delta uts2$ のストレス感受性が相補されることから、*uts2⁺* はその変異、破壊により細胞内ユビキチン量が減少することが分かった。従って $\Delta uts2$ が示す様々な表現型はユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解がユビキチンの不足により正常に機能しないからではないかと考えられる。

$\Delta uts2$ の細胞内ユビキチン量が減少するメカニズムとして、ユビキチン産生の低下あるいは消費の亢進による場合が考えられるが、まず、 $\Delta uts2$ 、野生株

にユビキチンを *nmt1* promotor を用いて大量に発現させ、蛋白合成を cycloheximide を加えて阻害しユビキチン合成を停止、その後のユビキチン量の変化を調べたところ、野生株と比較して $\Delta uts2$ のユビキチン減少は poly-ユビキチン、mono-ユビキチンとも明らかに速く、ユビキチン消費の亢進が強く疑われた。

つぎに、*ubi4⁺* の転写を調べた。出芽酵母における *ubi4* 変異体は、熱、飢餓、アミノ酸アナログによる異常蛋白質の蓄積によるストレスに感受性を持つこと^{9), 10), 11), 12)}が知られているが、分裂酵母においては窒素飢餓環境下にて転写が亢進することが分かっており¹³⁾、 $\Delta uts2$ 、野生株における *ubi4⁺* の転写の変化を窒素飢餓環境下にて比較したが、ユビキチン産生の低下は認めなかった。

さらに、*uts2⁺* の WD40 反復構造を含まない C 末端部分 (Uts2 Δ N) を導入させることで $\Delta uts2$ のストレス感受性が相補されるが、*nmt1* promotor を用いて Uts2 Δ N を過剰に発現させるとストレスへの強い感受性を生じるという結果が得られ、その場合の細胞内ユビキチンは野生株に比べて極端に増加しており、過剰なユビキチンが細胞に毒性を生じることが疑われた。

そこで、ユビキチンの産生能が低下している $\Delta ubi4$ に Uts2 Δ N を過剰に発現させてみたが、毒性を示さなかった。これは、Uts2 Δ N を発現することで細胞内ユビキチンが増加するが、 $\Delta ubi4$ ではユビキチン産生量が少ないのでユビキチンが過剰な状態に至らず、ユビキチン過剰による表現型が現れなくなったと考えられる。

mts3 は、プロテアソームの α サブユニットを構成する蛋白で、温度感受性を示す変異株であるが¹⁴⁾、*mts3* に *uts2⁺* を多コピーで導入したところ温度感受性が相補され、さらにユビキチンのみを導入しても温度感受性が相補された。これにより *uts2⁺* の導入がユビキチンの増加と同様の効果を示すことが判明し、他の結果と合わせて、ユビキチン量調節において Uts2 が重要な役割をもっている可能性がさらに高くなった。

以上より、通常は一定に保たれている細胞内ユビキチン量を Uts2 の発現量を増減させることで人為的に変えることができ、Uts2 を用いることでユビキチン-プロテアソーム系の解析の進展が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご助言くださいました神戸大学大学院医学系研究科ゲノム科学講座の久野高義教授、およびご協力くださった研究室の皆様に感謝します。

文 献

- 1) Mitchison, J. M.: Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. Meth. Cell Physiol., 4: 131-165, 1970.
- 2) Moreno, S., Klar, A., Nurse. P.: Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol, 194: 795-823, 1991.
- 3) Sambrook, J., fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- 4) Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., Smith. T.F.: The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins, Nature, 371: 297-300, 1994.
- 5) Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F., Varshavsky, A.: Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J, 15: 4884-4899, 1996.
- 6) Clark, M.A., Ozgur, L.E., Conway, T.M., Dispoto, J., Crooke, S.T., Bomalaski, J.S.: Cloning of a phospholipase A2-activating protein, Proc Natl Acad Sci USA, 88: 5418-5422, 1991.
- 7) Ruiz, A., Nadal, M., Puig, S., Estivill, X.: Cloning of the human phospholipase A2 activating protein (hPLAP) gene on the chromosome 9p21 melanoma deleted region, Gene, 239: 155-161, 1999.
- 8) Hirasawa, N., Scharenberg, A., Yamamura, H., Beaven, M.A., Kinet, J.P.: A requirement for Syk in the activation of the microtubule-associated protein kinase/phospholipase A2 pathway by Fc epsilon R1 is not shared by a G protein-coupled receptor, J Biol Chem, 270: 10960-10967, 1995.
- 9) Finley, D., Ozkaynak, E., Varshavsky, A.: The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses, Cell, 48: 1035-1046
- 10) Treger, J.M., Heichman, K.A., McEntee, K.: Expression of the yeast UBI4 gene increases in response to DNA-damaging agents and in meiosis, Mol Cell Biol 8: 1132-1136, 1988.
- 11) Tanaka, K., Matsumoto, K., Toh-e, A.: Dual regulation of the expression of the polyubiquitin gene by cyclic AMP and heat shock in yeast, EMBO J, 7: 495-502, 1988.
- 12) Watt, R., Piper, P.W.: UBI4, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control, Mol Gen Genet 253: 439-447, 1997.
- 13) Okazaki, K., Okayama, H., Niwa, O.: The polyubiquitin gene is essential for meiosis in fission yeast, Exp Cell Res, 254: 143-152, 2000.
- 14) Seeger, M., Gordon, C., Ferrell, K., Dubiel, W.: Characteristics of 26 S proteases from fission yeast mutants, which arrest in mitosis, J Mol Biol 263: 423-431, 1996.

Cloning and identification of *uts2*⁺ gene, involved in ubiquitin-proteasome system in fission yeast

Tsuneyoshi Kamo

Division of Dermatology, Department of Clinical Molecular Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

Ubiquitin-mediated proteolysis controls intracellular levels of various regulatory proteins. However, the underlying regulatory mechanisms controlling ubiquitin level have remained obscure. In an attempt to identify genes involved in the stress response, we screened for fission yeast mutants that showed increased sensitivity to the ultraviolet light and high temperature, and isolated a mutant, *uts2-1*. *uts2*⁺ encodes a highly conserved WD protein. Disruption of *uts2*⁺ gene caused defects, including increased sensitivity to various stresses such as heavy metals, hydrogen peroxide, methyl methanesulfonate, and high temperature, as well as reduced mating frequency. The level of mono- and poly-ubiquitin was very low in the *uts2* mutant or disruptant. Consistently, the polyubiquitin gene *ubi4*⁺ suppressed all defects associated with loss *uts2*⁺ gene. Overexpression of C-terminal half of Uts2 resulted in aberrant elongated cell morphologies, and increased intracellular ubiquitin level. These results suggest that shortage of ubiquitin caused the pleiotropic defects of *uts2* mutant and that Uts2 functions as a key regulator of ubiquitin metabolism.