

## 論文内容の要旨

論文題目 出芽酵母アレクチン様タンパク質 Rod1 の分子生物学的解析

〔Molecular Analysis of Arrestin-like Protein, Rod1 in *Saccharomyces cerevisiae*〕

篠田 淳郎

### 序論

出芽酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼのひとつである Rsp5 はヒトの Nedd4 のホモログであり、細胞内輸送、エンドサイトーシス、ストレス応答など様々な局面において、基質タンパク質をユビキチン化することで中心的な働きをすることが知られている。Rsp5 は単独でユビキチンリガーゼ活性を持つが、いくつかの基質タンパク質のユビキチン化においては、補助タンパク質が必要になる。この補助タンパク質と Rsp5 の関わり合いについては不明な点が多い。私は Rsp5 制御機構についての知見を得る為に、Rsp5 の結合タンパク質であり、Rsp5 と協調的に機能することが示唆され、進化的に保存されたドメインを持つ Rod1 に着目し、その機能解析を行った。

ROD1 は過剰発現をした場合、野生型酵母に対し、グルタチオンにより解毒される薬剤である *o*-dinitrobenzene 耐性を付与する遺伝子のスクリーニングにより単離された。その後の研究により ROD1 遺伝子産物は C 末端側に 2 カ所ある

PYモチーフを通じて Rsp5 の WW ドメインと相互作用すること、さらに PYモチーフに変異を導入すると *o*-dinitrobenzene 耐性を付与しなくなることが明らかにされた。このことから Rod1 は Rsp5 と結合することにより何らかの役割を果たすことが示唆されるが、具体的な機能については全く未知であった。

## 結果

### 1) Rod1 は Snf1 キナーゼ複合体によりリン酸化を受ける

私は Rod1 が Snf1 キナーゼ複合体のγサブユニットである Snf4 と免疫沈降実験において共沈すること、Rod1 が Snf1 キナーゼ活性依存的に翻訳後修飾を受けていることを見いだした。さらに、*snf1* 変異株も *o*-dinitrobenzene 感受性を示した。Snf1 は出芽酵母における AMP 活性型キナーゼであり、酵母細胞がグルコース飢餓状態に陥ると活性化され、転写因子などのリン酸化により、グルコース以外の炭素源を利用する為の遺伝子の転写を促す。

Rod1 の翻訳後修飾がリン酸化であるかを調べる為に CIP アッセイを行った。その結果、ウェスタンブロットティングにおいて Rod1 のエクストラなバンドが消失したことから Rod1 はリン酸化を受けていることが分かった。Rod1 のアミノ酸配列中には、Snf1 のターゲットになりうる配列が4カ所存在したので、それぞれに変異を導入し、ウェスタンブロットティングを行った。その結果、447番目のセリン残基をアラニンに置換した Rod1(S447A)のみ、エクストラバンドが消失した。さらに、これらの変異 Rod1 の *o*-dinitrobenzene 耐性能を比較したところ、Rod1(S447A)のみが野生型の Rod1 よりも強い耐性能を酵母に与えることが分かった。大腸菌で発現させ、アフィニティー精製した Rod1 と、酵母から精製した Snf1 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、Rod1(1-459) は Snf1 によりリン酸化されたが 447番目のセリン残基を含まない Rod1(1-444) は Snf1 によるリン酸化は見られなかった。従って Rod1 の 447番目のセリン残基は *in vivo* においても *in vitro* においても Snf1 キナーゼによりリン酸化を受けることが分かった。

### 2) Rod1 は G タンパク質共役型受容体 Gpr1 の C 末端と相互作用する

Rod1 は N 末側に高等生物のアレスチンと相同な領域 arrestin-N、C domain を持つ。アレスチンは、主に G タンパク質共役型受容体などの7回膜貫通タンパク質受容体がホルモンなどそれぞれに固有のリガンドを受け取ると、その受容

体の細胞質ドメインに結合し、エンドサイトーシスを引き起こすことで脱感作を引き起こす。また、経路によっては下流へシグナルを伝達する役割を果たす場合もある。アレスチンは **visual arrestin**、 $\beta$ -**arrestin1**、**2**、**cone-specific arrestin** といったサブタイプが存在する。また、**arrestin-N domain**、**arrestin-C domain** の両方を持つ機能未知のタンパク質ファミリー **arrestin domain containing (Arrdc)** が1から5まであり、このうち **Arrdc1**、**2**、**3**、**4** はC末端側にPYモチーフを2つ持っている。アレスチンは高等生物において広く保存されており詳細に研究されているが、単細胞生物では最近 *Aspergillus nidulans* においてアレスチン様のタンパク質の報告がなされたのみである。

私は **Rod1** がこのアレスチンと同様の働きをしているのではないかと考え、出芽酵母のGタンパク質共役型受容体である性ホルモン受容体 **Ste2**、グルコースセンサーであり、cAMPやカルシウムイオンの上昇に関与する **Gpr1** の細胞質ドメインと **Rod1** の相互作用を調べた。その結果、**Gpr1** の細胞質ドメインであるテイル部分と **Rod1** が結合することが分かった。また、**Rsp5** も **Rod1** と同様に **Gpr1** のC末端のテイル部分と相互作用した。