

出芽酵母 uS7/Rps5 の Ser223 のリン酸化による  
リボソームの成熟及び翻訳制御機構

富岡 真



## 【目次】

要旨 .....	1
緒論 .....	2
第 1 章 プロテインキナーゼ Ypk1 の新規基質の同定	
要旨 .....	5
序論 .....	5
結果 .....	8
考察 .....	12
第 2 章 uS7 S223 リン酸化を介する増殖・翻訳制御機構	
要旨 .....	15
序論 .....	15
結果 .....	17
考察 .....	24
第 3 章 uS7 S223 リン酸化を介するリボソーム成熟制御機構	
要旨 .....	26
序論 .....	26
結果 .....	27
考察 .....	38
実験材料及び方法 .....	41
結論 .....	50
略語表 .....	51
謝辞 .....	52
引用文献 .....	54



## 【要旨】

細胞は外部の環境に応じて細胞機能を調節することで自らの運命を決定し、至適環境においては増殖を促し、過酷な環境においては自らの生命を保つ事を優先する。このような細胞機能の調節は細胞内外の様々なセンサーによる感知を発端とし、プロテインキナーゼを始めとするシグナル伝達因子を介した細胞内シグナル伝達によって達成される。出芽酵母 Ypk1 は AGC キナーゼファミリーに属するセリン・スレオニンプロテインキナーゼの一種で、アクチン骨格制御やエンドサイトーシスに加えて、タンパク質翻訳と細胞増殖を正に制御している。Ypk1 の発現量は細胞外栄養源の一つである窒素源の量に応じて制御されていることから、Ypk1 は栄養源に応じてタンパク質翻訳を制御しているものと考えられる。しかしながらその制御に関わるリン酸化基質はこれまで明らかにされていない。

申請者は Ypk1 のリン酸化基質の機能解析を行うことにより、Ypk1 によるタンパク質翻訳機構の解明を試みた。第 1 章では共同研究者による Ypk1 の基質スクリーニング結果を元に、申請者はリボソーム 40S サブユニット構成タンパク質 uS7/Rps5 が Ypk1 のリン酸化基質であること、そのリン酸化部位が 223 番目のセリンであることを明らかにした。また uS7 が Ypk1 のみならず Pkc1 によってもリン酸化されることを見出した。次に第 2 章においては uS7 のリン酸化不全変異体発現細胞の表現型解析を行うことにより、至適環境下において変異体発現細胞では総タンパク質翻訳量が減少し、細胞増殖が抑制されていることを明らかにした。その一方で熱ストレス条件下において変異体発現細胞では特定のタンパク質の翻訳量と熱ストレス耐性が上昇していることを明らかにした。最後に第 3 章においては、変異体発現細胞のリボソームに着目することで uS7 のリン酸化によるタンパク質翻訳制御機構の解明を試みた。リボソームの解析を行うことにより uS7 のリン酸化不全変異は uS7 と 40S リボソーム小サブユニットの成熟に関与するタンパク質である Rio2 タンパク質との相互作用を減弱することを明らかにした。そして Rio2 が 40S リボソーム小サブユニットとの適切な結合が阻害されることによって 18S rRNA の成熟を阻害され、その結果として 40S リボソーム小サブユニットの減少を惹起されることを明らかにした。

以上、申請者によって行われた本研究は Ypk1 の新規リン酸化基質として uS7 を同定し、Ypk1 によるリボソーム成熟制御を通じたタンパク質翻訳制御機構を明らかにしたのであり、細胞の外部環境への適応におけるタンパク質のリン酸化修飾の意義に関して重要な知見を与えるものである。

## 【緒論】

細胞は外部の環境に応じて細胞内機能を調節する。外環境に応じ、時には増殖を促し、時には過酷な環境から自らの生命を保たんとする。このような細胞内機能の調節は細胞内外の様々なセンサーによる感知を発端とした細胞内シグナル伝達により行われ、その中でプロテインキナーゼは他の様々なタンパク質のリン酸化を介する調節機構における中心的な役割を果たしている。細胞外の栄養源が豊富にあり、かつ細胞にとって理想的な環境においては、細胞はシグナル伝達経路を介してタンパク質の翻訳を促し、また核酸、脂質などといった細胞の増殖や成長に必要な分子の生合成を行う。一方、栄養源が枯渇していたり、細胞に何らかのストレスがかかっていたりといったような状況では、細胞は細胞増殖等に必要な分子の生合成を中止し、自らの生命を維持する。この生命維持機構において、最もエネルギーを要するタンパク質翻訳を停止させることは非常に重要なプロセスであり、この機構は厳密に調節がなされている(Warner, J. R. 1999)。

栄養源応答性の細胞内シグナル伝達はこれまで Target of Rapamycin(TOR) 、MAPK/Erk、PI3K/Akt といったキナーゼを中心としてその解明が行われてきた。TOR は進化的に保存されたプロテインキナーゼであり、TORC1 と TORC2 の 2 種類の複合体を形成する(Jacinto and Lorberg., 2008; Loewith *et al.*, 2002; Wullschleger *et al.*, 2006)。様々な栄養源からの応答の一部は TORC1 を介して行われており、その標的はリボソーム生合成、タンパク質翻訳、オートファジーと多岐に渡る(Kamada *et al.*, 2000; Noda & Ohsumi, 1998; Rohde *et al.*, 2001)。S6 キナーゼ(S6K)は哺乳動物 TORC1(mTORC1)の基質として初めて同定されたタンパク質である。S6K は AGC(protein kinase A/ protein kinase G/ protein kinase C)キナーゼファミリーに属し、栄養源が豊富な環境下において mTORC1 によってリン酸化されることによりタンパク質の翻訳を促進する(Wang *et al.*, 2001)。こういったシグナル伝達因子は相互に調節しあっている為に未だその全容の解明には程遠い。

出芽酵母は真核生物でありながら単細胞生物であることから細胞間相互作用の影

響を考慮する必要がなく、それ故に細胞外環境への応答に関する解析が厳密に行うことができる為、シグナル伝達研究を行う上で非常に有用なモデル生物である。細胞外環境応答に関わる栄養源シグナル伝達因子は出芽酵母と哺乳動物の間でも概ね共通しており、前述した S6K のオーソログとして Ypk3 が同様に TORC1 によってリン酸化され、タンパク質翻訳や細胞周期の制御における役割を担っていることが明らかにされている(Gonzalez *et al.*, 2015)。

出芽酵母のプロテインキナーゼ Ypk1(Yeast protein kinase)は藤多哲朗京都大学名誉教授らのグループが単離に成功した免疫抑制物質 ISP-1 (immunosuppressant product-1)/myriocin の耐性遺伝子として、当研究室において出芽酵母より単離された遺伝子の一つである(Fujita *et al.*, 1994, Sun *et al.*, 2000)。Ypk1 はセリン/スレオニンプロテインキナーゼであり、AGC キナーゼファミリーに属している(Jacinto and Lorberg, 2008)。Ypk1 はその遺伝子の欠損により細胞増殖の遅延(Chen *et al.*, 1993)を始めとし、エンドサイトーシスの不全(deHart *et al.*, 2002)、アクチン細胞骨格の形成不全 (Schmelzle *et al.*, 2002)といった様々な細胞機能の低下を促すことが明らかにされている。Ypk1 はその遺伝子の欠損によりタンパク質翻訳の開始に異常がみられることから、細胞増殖を制御するシグナル伝達において TORC1 経路と独立してタンパク質翻訳を制御すると考えられている (Gelperin *et al.*, 2002)。著者の研究室

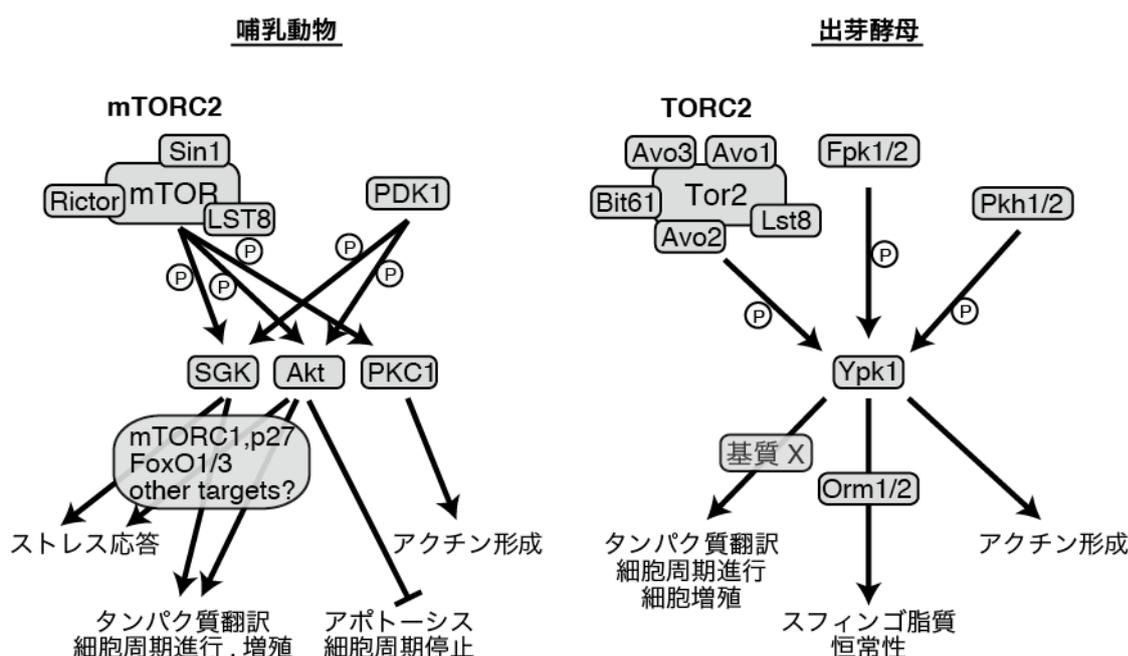


Figure 0 プロテインキナーゼを介する栄養源応答シグナル伝達経路

において下林貢博士らは、細胞増殖を制御する Ypk1 が主要栄養源の一つである窒素源の飢餓時特異的に選択的なオートファジーによって分解される事を明らかにしており、Ypk1 は細胞外栄養源応答に関与していると考えられる(Shimobayashi *et al.*, 2010)。しかしながら Ypk1 の下流のシグナル伝達機構の詳細については未知の点が多く、直接基質として明らかになっているものは Orm1/2 のみである(Roelents *et al.*, 2011)。Orm1/2 はスフィンゴ脂質恒常性を制御しているとされており(Breslow *et al.*, 2010)、Orm1/2 は細胞増殖に影響を与えないことから、Ypk1 の基質は Orm1/2 の他にも存在し、Ypk1 はその未知の基質のリン酸化を介して細胞増殖を制御していることが予想される(**Figure 0**)。

## 第 1 章

### プロテインキナーゼ Ypk1 の新規基質の同定

#### 【要旨】

出芽酵母プロテインキナーゼ Ypk1 は、先行研究によりその機能として細胞増殖やタンパク質翻訳に関わることが知られてきたが、それらの機能を調節する際の直接のリン酸化基質はこれまで明らかではなかった。本章においては平本博士によるプロテアソーム解析の結果を受け、リボソーム構成タンパク質 uS7/Rps5 に着目し、uS7 と Ypk1 が相互作用すること、Ypk1 は uS7 を基質としてリン酸化することを明らかにした。さらにこの uS7 リン酸化に関わるアミノ酸残基とともに、Ypk1 以外の uS7 リン酸化プロテインキナーゼの同定を行った。

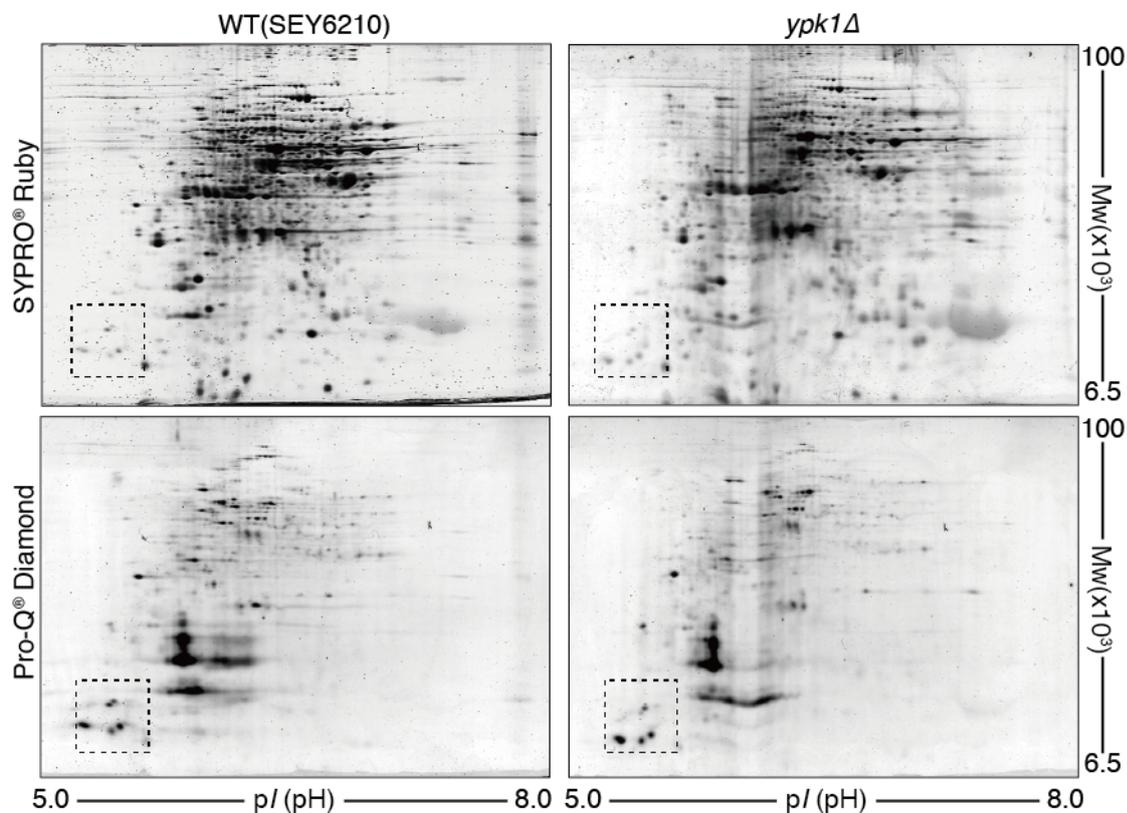
#### 【序論】

Ypk1 の下流シグナルには不明な点が残されているものの、その類似のキナーゼや Ypk1 の上流に関する研究は積極的に進められている。Ypk2 に関しては、Ypk1 と高い相同性を示すことからこれらはパラログであり、*YPK1* 及び *YPK2* 遺伝子の欠損はそれぞれ単独欠損株では生存できるものの、二重欠損株では合成致死となることが明らかにされている。またこれらは血清グルココルチコイド誘導性タンパク質キナーゼファミリーに属する哺乳動物 SGK に関連すると考えられており、哺乳動物における PDK-SGK の関係と同様に Ypk1/2 は Pkh1/2 によりリン酸化を受け Casamayor *et al.*, 1999)、さらにそのキナーゼ活性はスフィンゴ脂質の一種である PHS (phytosphingosine) により上昇することが報告されている (Dickson, R.C. 2008)。Ypk3 は哺乳動物 S6K のオーソログであることが示されており、更に Ypk3 は TORC1 の下流においてリボソーム S6 タンパク質のリン酸化を行っていることが報告されている (Gonzalez *et al.*, 2015, Yerlikaya *et al.*, 2016)。

また Ypk1 は Pkh1/2 のみならず TORC2 (TOR-complex 1) や Fpk1/2 によってもリン酸化修飾を受ける事が知られており、酵母における重要なシグナル伝達分子であ

ることが予想される。別の AGC キナーゼファミリーの一つである Pkc1 も Ypk1 と

A



B

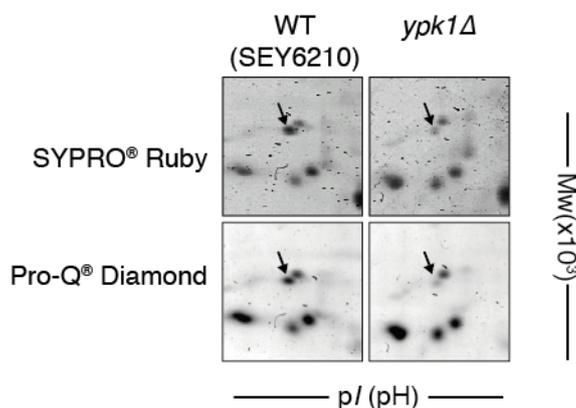


Figure 1-1 *ypk1Δ*株において影響を受けるタンパク質の同定

(A) 野生株 (SEY6210) 及び *ypk1Δ*株の細胞抽出液中タンパク質は2次元電気泳動により展開した。タンパク質は SYPRO Ruby (全タンパク質の染色) 及び Pro-Q Diamond (リン酸化タンパク質の染色) を用いて蛍光染色した。各細胞株について、等電点 (pI) 及び分子量 (Mw) をそれぞれ横軸、縦軸に示した。(B) Figure 1-1A において破線で示す pI=5、Mw=30x10<sup>3</sup> 周辺領域を拡大した。矢印は Table 1-1 における Spot ID 16 を示す。

同様に Pkh1/2 及び TORC2 によってリン酸化されることが明らかにされており、上流のシグナル伝達系は類似していると考えられるものの、Pkc1 は細胞壁の維持において中心的な役割を担うと考えられており、Ypk1 との関連には不明な点が多い。

このような背景のもと、共同研究者の理化学研究所の平本真介博士らは Ypk1 の直接の下流となる基質を新たに発見するためにプロテオーム解析を行い、YPK1 欠損時に影響を受けるタンパク質のスクリーニングを行った。この解析においては野生株 (SEY6210) 及びその YPK1 遺伝子欠損株である *ypk1Δ* 株について、それらの細胞抽出物を 2 次元電気泳動法により分離し、SYPRO Ruby 染色液及び Pro-Q Diamond 染色液によりゲルを染色することで比較が行われた (Figure 1-1A)。次に全タンパク質を染色する SYPRO Ruby 染色においてタンパク質量が増減したスポット及びリン酸化タンパク質を染色する Pro-Q Diamond 染色においてリン酸化レベルが増減したスポット計 13 スポットに着目し、マスマスペクトロメトリー解析が行われた。解析の結果、*ypk1Δ* 株においてタンパク質レベル又はリン酸化レベルに影響を受けるタン

**Table 1-1 *ypk1Δ* 株において影響を受けたスポット**

Spot ID	Standard name	Systematic name	protein abundance	phosphorylation
C	Hxk1	YFR053C	+/-	+
F	Rbi1	YDL135C	+/-	+
2	Adi1	YMR009W	+	+/-
3	Tpi1	YDR050C	-	-
3	Rib3	YDR487C	-	-
7	Tdh2	YJR009C	-	+/-
8	Ald6	YPL061W	-	+/-
8	Mrt4	YKL009W	-	+/-
9	Hyp2	YEL034W	-	+/-
10	Eno1	YGR254W	+	+/-
11	Pdc1	YLR044C	+	+/-
16	uS7/Rps5	YJR23W	-	-
17	Rpp2b	YDR282W	+	+
17	Efb1	YAL003W	+	+
19	Tdh3	YGR192C	+	+/-
28	Pst2	YDR032C	+	+

パク質の候補として 16 種類のタンパク質が同定された(**Table 1-1**)。

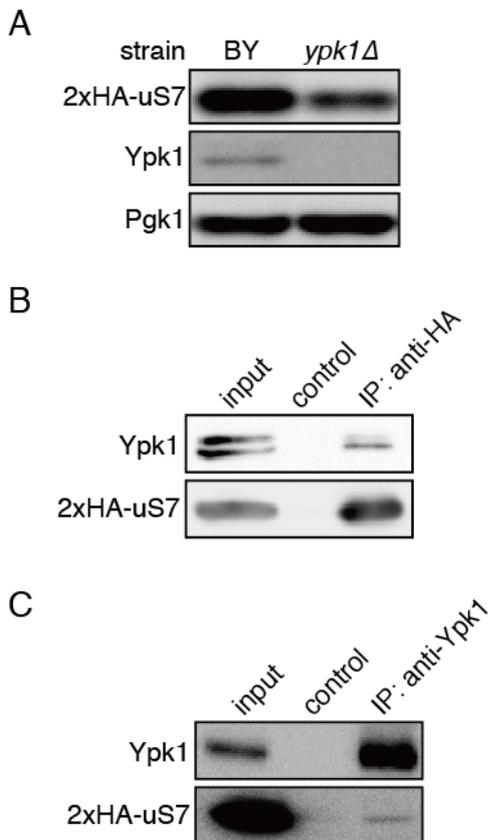
スクリーニングにより得られた候補タンパク質のうち、リン酸化レベルが低下すること、Ypk1 の細胞機能に直接関与している可能性が高く見込まれることから、著者は spot ID 16 に示される uS7/Rps5 に着目した(**Figure 1-1B**)。リボソームタンパク質 uS7 は酵母の生育に必須なリボソーム 40S サブユニット構成タンパク質の一つであり、そのアミノ酸配列は大腸菌からヒトに至るまで高度に保存されている。

本章において著者は、まず uS7 と Ypk1 との相互作用を明らかにした。次に uS7 が Ypk1 によってリン酸化される基質であり、そのリン酸化部位が 223 番目のセリンであることを明らかにした。またそのみならず、uS7 の 223 番目のセリンは Pkc1 によってもリン酸化されるが、Ypk2 によってはリン酸化されないことを見出した。

## 【結果】

### Ypk1 は uS7 と相互作用する

著者は Ypk1 と uS7 の関係を明らかにする為、まず *ypk1Δ* 株における uS7 のタンパク質量の変化について検証を行った。2 反復 HA タグを C 末端側に付加した



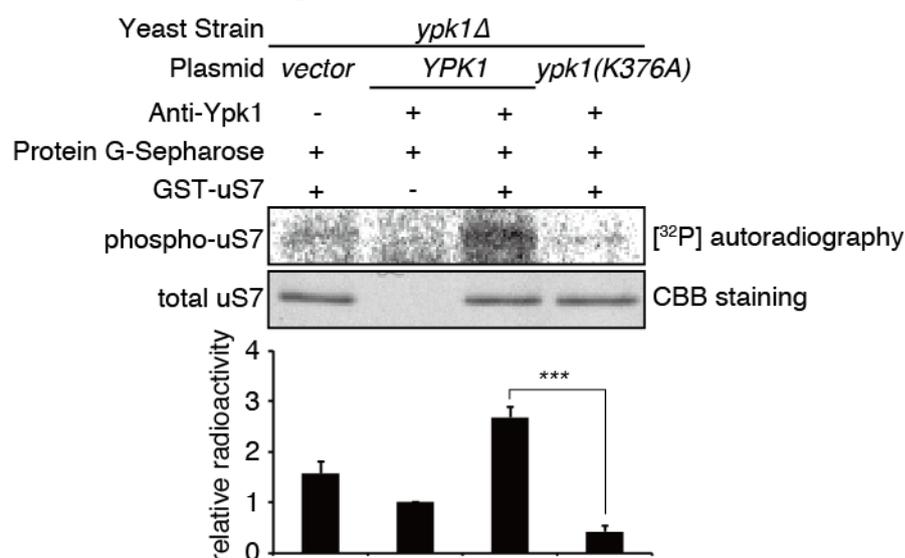
### Figure 1-2 Ypk1 と uS7 の相互作用

(A) *ypk1Δ* 株における uS7 発現量低下を示す。uS7 遺伝子を有するシングルコピープラスミドにより uS7 タンパク質を野生株及び *ypk1Δ* 株に導入し、対数増殖期において細胞を回収し細胞抽出液を得た。細胞抽出液 (5  $\mu$ g/lane) をウエスタンブロット法により解析した。uS7 は抗 HA 抗体を用いて検出した。Ypk1 は抗 Ypk1 抗体を用いて検出した。Pgk1 はローディングコントロールとして用いた。(B, C) Ypk1 と uS7 の物理的相互作用。2xHA-uS7 (B) 又は Ypk1 (C) を protein G Sepharose を用い、それぞれ抗 HA 抗体又は抗 Ypk1 抗体により免疫沈降を行った。共免疫沈降されたタンパク質は抗 HA 抗体及び抗 Ypk1 抗体を用いて検出した。

2xHA-uS7 をプラスミドにより *ypk1Δ*株に発現させたところ、野生株(BY4741)と比較して大きく発現量が低下していた(**Figure 1-2A**)。次に Ypk1 と uS7 の物理的相互作用の有無を明らかにする為、免疫沈降法を用いて検証を行った。まず HA タグを付加した uS7 を野生株に発現させ、その細胞抽出物から抗 HA 抗体を用いて uS7 を免疫沈降したところ、2xHA-uS7 と共に内在性の Ypk1 が共沈降された(**Figure 1-2B**)。また同じ細胞抽出物を用いて、内在性の Ypk1 を抗 Ypk1 抗体により免疫沈降した結果、2xHA-uS7 が微量ながら共沈降された(**Figure 1-2C**)。以上の結果は Ypk1 のごく一部が uS7 と相互作用しており、uS7 が恒常的ではなく一時的に Ypk1 と相互作用している可能性を示唆するものであった。

### Ypk1 により uS7 はリン酸化される

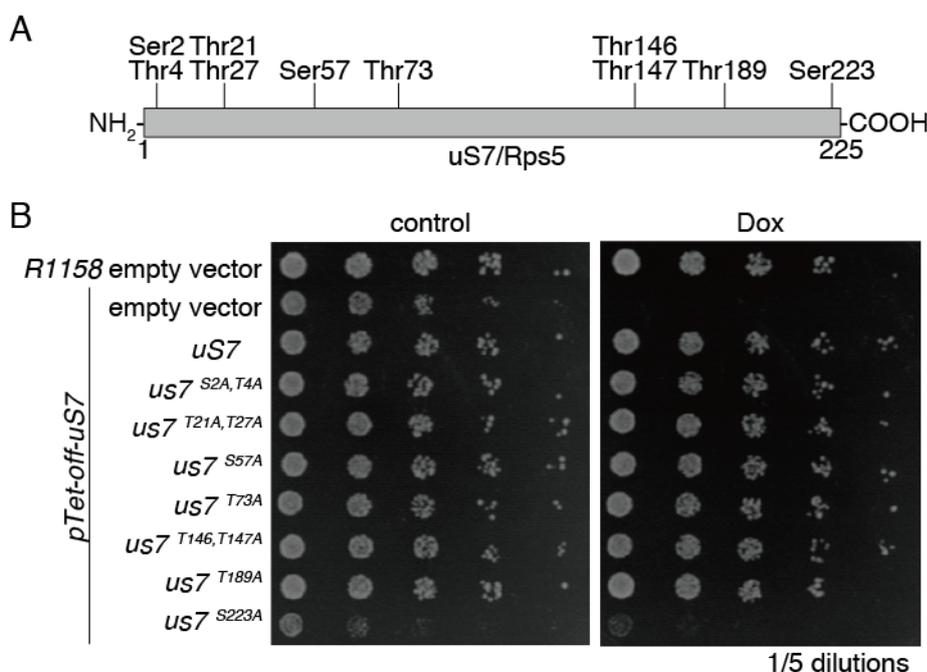
ここでみられた Ypk1 と uS7 の相互作用はプロテインキナーゼと基質の関係であ



**Figure 1-3 Ypk1 による uS7 の *in vitro* リン酸化**

対数増殖期の酵母細胞を回収・破碎し得た細胞抽出液より抗 Ypk1 抗体と protein G Sepharose を用いて Ypk1 を免疫沈降した。GST 融合 uS7 は大腸菌に発現させ、glutathione Sepharose を用いて精製した。Ypk1 を結合させた樹脂を uS7 と [<sup>32</sup>P]ATP と共にインキュベートした後、SDS-PAGE により展開した。展開後のゲルをイメージングプレートに露光させ、BAS-2500 により放射活性を測定した。総 uS7 は CBB 染色により検出した。キナーゼ活性の 3 回試行平均値は uS7 (-) サンプルを基準として SD と共に図示した。統計的有意性は Student の t 検定を用いて評価した。\*\*\*は p 値が 0.001 以下であることを示す。

る可能性が考えられた。そこで Ypk1 による uS7 のリン酸化の有無を明らかにするため、*in vitro* でのキナーゼアッセイを行った。プラスミドにより Ypk1 を *ypk1Δ* 株において発現させ、抗 Ypk1 抗体を用いて抽出した Ypk1 と大腸菌より精製したリコンビナント GST-uS7 を  $^{32}\text{P}$ -ATP を含む反応液中にて反応し、SDS-PAGE により分離、オートラジオグラフィーにより検出した。この結果、野生型 Ypk1 によるシグナルの顕著な増加が観察され、そのシグナルは Ypk1 のキナーゼ活性不活性型変異体である K376A 変異体では有意に抑制された(**Figure 1-3**)。この結果は uS7 が Ypk1 の直接のリン酸化基質である事を示唆する。続いて uS7 のリン酸化部位の解明を試みるにあたり、まずリン酸化部位の候補の選定を行った。Ypk1 の基質特異性については既に報告があり、一般的には RxRxxS/T(R はアルギニン、x は任意のアミノ酸、S/T はセリン又はスレオニンを示す)配列のセリン又はスレオニンをリン酸化するこ



**Figure 1-4 uS7 リン酸化候補部位の探索**

(A) uS7 のリン酸化セリン及びスレオニンの候補部位。uS7 の翻訳領域を長方形に示し、その上部にリン酸化の候補部位を示した。リン酸化候補部位は NetPhosYeast 2.0 ソフトウェアを用いて同定した。(B) uS7 のアラニン変異体発現株解析。Fig. 1-4A に示したリン酸化候補部位に対してアラニン置換変異を導入した。変異型 uS7 は pRS415 発現ベクターにより自己のプロモーターにより発現させ、内在性の uS7 は Tet プロモーターと Doxycycline により発現抑制させた。各細胞は Doxycycline を含まない SD 寒天培地 (control) または 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycycline を含む SD 寒天培地 (Dox) に段階希釈してスポットし 30°C で培養を行った。

とが知られている。しかしながら uS7 のアミノ酸配列中にはこのようなモチーフ配列は存在しないことから、アミノ酸配列によるリン酸化部位予測を NetPhos 2.0 (Technical University of Denmark, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)を用いて行い、リン酸化されている可能性の高い 10 のセリン及びスレオニンに着目した (Figure 1-4A)。これらのセリン及びスレオニンをそれぞれアラニンに置換した変異体を作製した。uS7 は酵母細胞の生存に必須の遺伝子である。そこでここでは作製した変異体が野生型 uS7 の機能を代替可能かどうかを、酵母の寒天培地上における増殖・生存能により評価した。この評価系においては、内在性 uS7 プロモーターをテトラサイクリン依存性プロモーターに置換した *pTet-off-uS7* 株を用いた。この細胞株ではテトラサイクリンアナログである doxycycline(Dox)存在下においてのみ内在性 uS7 の発現を誘導的に抑制することができ、この条件下でプラスミドにより発現

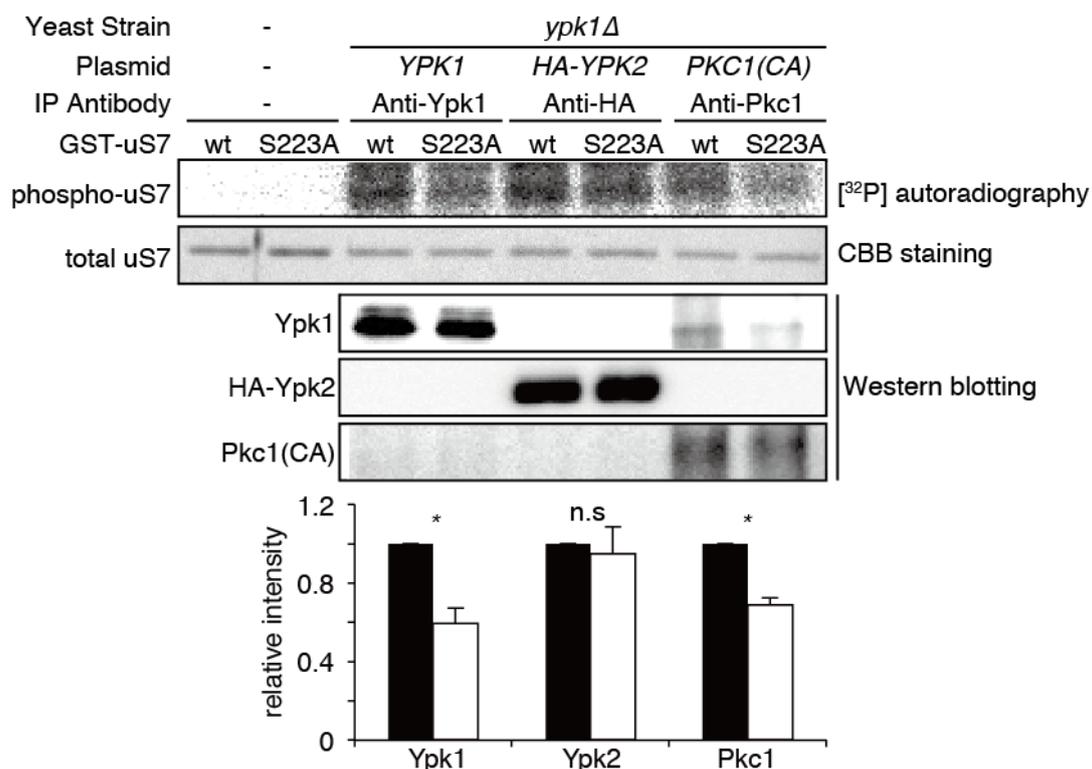


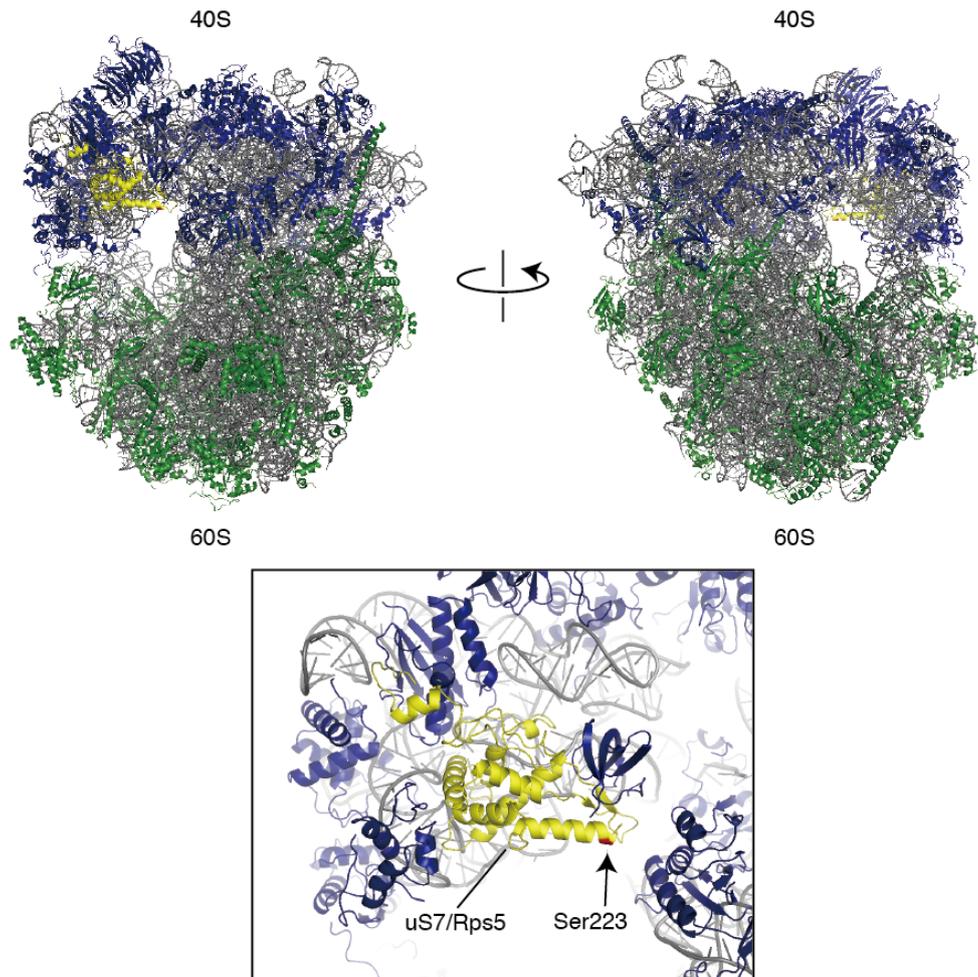
Figure 1-5 Ypk1 及び Pkc1 による uS7 S223 リン酸化

uS7 の 223 番目のセリンの *in vitro* リン酸化を Fig. 1-3 と同様の実験により評価した。Ypk1 に加えて Ypk2 と Pkc1 をキナーゼとして用いた。GST-uS7 (wt) 又は GST-uS7 S223A 変異体 (S223A) を基質として用いた。キナーゼ活性の 3 回試行平均値は野生型を基準として SD と共に図示した。統計的有意性は Student の t 検定を用いて評価した。\*は p 値が 0.05 以下であることを示す。n. s. は統計的有意差がないことを示す。

させたアラニン変異 uS7 の機能を検討できる。Dox 存在下では、ほとんどのアラニン変異型 uS7 発現細胞は野生型 uS7 発現株と同等に増殖していた。223 番目のセリンに変異を導入した us7 S223A 発現細胞のみが顕著に遅い増殖を示した(**Figure 1-4B**)。また Dox 非存在下の細胞増殖においても us7 S223A 発現細胞はドミナントネガティブに影響を与えた。この結果を踏まえ、Ypk1 に加えてそのパラログである Ypk2、NetPhos2.0 によるリン酸化予測において S223 のリン酸化酵素の候補として挙げられた PKC の酵母ホモログ Pkc1 をキナーゼとして用い、野生型及び S223A 変異型 uS7 をリン酸化可能かどうか *in vitro* キナーゼアッセイにより評価した。Ypk1 による us7 S223A のリン酸化は野生型 uS7 のリン酸化シグナルと比較して約 40%程度有意に低下していた(**Figure 1-5**)。この結果は、uS7 が Ypk1 の基質であり、そのリン酸化部位の少なくとも 1 つが 223 番目のセリンである可能性を示唆するものである。Ypk2 についても Ypk1 と同様に野生型 uS7 をリン酸化していたが、そのシグナルに S223A 変異による有意な低下はみられなかった(**Figure 1-5**)。最後に Pkc1 については、これも Ypk1 及び Ypk2 と同様に uS7 をリン酸化しており、Ypk1 と同じく S223A 変異によりそのシグナルが減弱された(**Figure 1-5**)。以上の結果から、uS7 は Ypk1、Ypk2、Pkc1 それぞれによりリン酸化される基質であるが、uS7 の 223 番目のセリンは Ypk1 と Pkc1 によってのみリン酸化されることが示唆された。

### 【考察】

本章における結果はプロテインキナーゼ Ypk1 及び Pkc1 がリボソーム小サブユニット構成タンパク質 uS7 の 223 番目のセリンをリン酸化することで細胞機能の制御を行っている可能性を示すものである。X 線構造解析により、翻訳複合体である 80S リボソームにおいて uS7 は tRNA が翻訳複合体より解離する E 部位に位置し、さらに 223 番目のセリンがリボソームの外表面に位置していることが明らかにされている(**Figure 1-6**)。この知見は、uS7 の 223 番目のセリンが細胞質中に存在している Ypk1 によってリン酸化され得ることを支持する。また、Fig. 1-5 に示す実験において Ypk2 も Ypk1 と同じく uS7 のリン酸化を行っているものの 223 番目のセリンに関してはリン酸化を行っていないことが考えられる。これまで、Ypk1 と Ypk2 はパ



**Figure 1-6 リボソーム複合体の構造**

酵母 80S リボソーム複合体において、uS7 は head 部分に存在する。図は PyMOL ソフトウェアを用い、PDB 4V88 ファイルを元に作図した。40S サブユニット構成タンパク質は青色で示し、60S サブユニット構成タンパク質は緑色で示した。uS7 タンパク質は黄色で示し、uS7 の 223 番目のセリンを赤色で示した。

ラログであると考えられており、このような Ypk1 と Ypk2 の基質特異性の違いはこれまで報告されていないという点でこの知見は重要な知見であるといえる。*YPK1* 遺伝子の欠損が増殖遅延を惹起する一方で *YPK2* 遺伝子の欠損は増殖には影響を与えない。著者が明らかにした Ypk1 のみが uS7 の 223 番目のセリンをリン酸化するという知見は、これら欠損株のフェノタイプの相違を理解する手がかりになると考えられる。また、本章において筆者は Pkc1 によっても uS7 の 223 番目のセリンをリン酸化することを明らかにしている。Ypk1 と Pkc1 はいずれも AGC キナーゼファミリーに属し、Pkh1/2 によってリン酸化されることから、これらは同一の調節機構に

より制御され、相補的に働くキナーゼである可能性が考えられる(Casamayer *et al.*, 1999)。

本章の結果に加え uS7 のリン酸化を細胞内でも検出することが出来れば、本章の結果は強く裏付けられる。しかしながらその検出は非常に困難であった。Fig.1-3 では Ypk1 により有意にオートラジオグラフィのシグナルが増加しているものの、高いバックグラウンドシグナルが検出されている。これは抗 Ypk1 抗体を加えないコントロールにおいてもみられていることから、細胞抽出液中に含まれ、protein G-Sepharose に非特異的に結合したキナーゼによるリン酸化と推測される。本章で紹介しなかった *in vitro* キナーゼアッセイ以外のリン酸化検出法として、uS7 S223 リン酸化特異抗体を用いたウエスタンブロット法や phos-tag アクリルアミドを用いたウエスタンブロット法を考案し、これらの手法を用いて野生株と *ypk1Δ*株中 uS7 のリン酸化レベルの検出を試みた。しかしながら、リン酸化特異抗体に関しては、リン酸化ペプチドの抗原性が低いことが原因と思われるが、使用に耐える抗体は得られなかった。phos-tag アクリルアミドを用いたウエスタンブロット法においても、223 番目のセリン以外のリン酸化部位の存在の為か、明確に 223 番目のセリンのリン酸化を検出する事は出来なかった。だが、本章で明らかにしたように uS7 は Ypk1 のみならず Pkc1 によっても 223 番目のセリンがリン酸化され、Ypk1 は 223 番目のセリン以外にもリン酸化していることが考えられる。これらが原因で *ypk1Δ*株における uS7 のリン酸化が上記の方法によっては明確に検出できなかったものと考えられる。今後、このような複雑系においても uS7 の Ypk1 による特定の部位のリン酸化をモニターする手法が確立され、明確に uS7 を介したシグナル系が解明されることが期待される。

## 第 2 章

### uS7 S223 リン酸化を介する増殖・翻訳制御機構

#### 【要旨】

第 1 章において著者は Ypk1 及び Pkc1 のリン酸化基質として uS7/Rps5 を同定し、そのリン酸化部位が 223 番目のセリンである可能性を示した。本章においては us7 S223A 変異体発現株の表現型解析により、S223A 変異は増殖遅延を惹起する可能性を示唆する知見を得た。先行研究により、Ypk1 に関して YPK1 欠損株は増殖遅延表現型を有することが報告されており、また uS7 欠損株は致死であることが報告されている。本章においては us7 S223A 変異体の表現型解析を通じ、S223 のリン酸化を介する細胞増殖及びタンパク質翻訳の調節機構を明らかにした。

#### 【序論】

前章において Ypk1 のリン酸化基質として同定した uS7 はリボソーム 40S サブユニットを構成するタンパク質である。uS7 はそのアミノ酸配列の N 末端側と C 末端側の両者がある機能に重要であり、N 末端アミノ酸欠失変異はタンパク質翻訳阻害をもたらすことが報告されている (Galkin *et al.*, 2007, Lumsden *et al.*, 2010)。また uS7 の C 末端アミノ酸配列は生物種間でもほぼ同一でありリボソームの機能にとって重要であることが予想され (Figure 2-1)、実際に C 末端 7 アミノ残基の欠損は致死となることが報告されている (Neueder *et al.*, 2010)。更に uS7 の C 末端アミノ酸への点変異導入による実験の成果として、uS7 は eIF2 $\alpha$  と共に開始コドンの認識において役割を担っていることが提唱されている (Visweswaraiah *et al.*, 2015, Visweswaraiah, J & Hinnebusch, A. G. 2017)。また、uS7 は uS7 と同じくリボソーム 40S サブユニット構成タンパク質である eS21/Rps25 と共に内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site : IRES) によって翻訳される cap 構造非依存的な翻訳機構に関与していることが明らかにされている (Muhs *et al.*, 2011; Fukushi *et al.*, 2001)。以上の知見より、uS7 はタンパク質翻訳において何らかの役割を果たしていると考えられる。

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

D.melanogaster   MAEVAENVVETFEPPAAPMEEVAETILETNVVSTTELPEIKLFGRWSCDDVTVNDISLQ 60
H.sapiens        -----MTEWETAAPAVAETPDIKLFGKWSDDVQINDISLQ 36
C.elegans        -----MADNNGSENVVADAAPATEAPEVALFGKWSLQSVNVSDISLV 42
C.reinhardtii    -----MASPDVKLFGKWSFEDIEVTDISLE 25
A.thaliana       -----MATAADVDAEIQQALTNEVKLFNKWTYDDVTVDISLV 38
S.cerevisiae     MSDTEAPVVEVQEDFEVVVEFTPVVLTAPIPEEVOQAQT-EIKLFNKWSFEEVEVKDASLV 59
:: **::** :: ** **

D.melanogaster   DYISVKE-KFARYLPHSAGRYAAKRFRKAQCPIVERLTCSLMMKGRNNGKKLMACRIVKH 119
H.sapiens        DYIAVKE-KYAKYLPHSAGRYAANAFRKAQCPIVERLTNSMMHGRNNGKKLMTVRIVKH 95
C.elegans        DYIPVKE-KSAKYLPHSAGRFQVRRFRKAACPIVERLANSLMMHGRNNGKKLMTVRIVKH 101
C.reinhardtii    DYIAVKT-KYAVYVPHTAGRYOKRRFRKALCPIVERLNCNSLMMHGRNNGKKLMAVRIVKH 84
A.thaliana       DYIGVQAAKHATFVPHTAGRYSVKRFRKAQCPIVERLTNSLMMHGRNNGKKLMAVRIVKH 98
S.cerevisiae     DYVQVRQ----PIFVAHTAGRYANKRFRKAQCPIIERLTNSLMMHGRNNGKKLKAIVRIKH 116
**: *: . :.**:***: . ***** **:*** ** ** *:***:***** : **:**

D.melanogaster   SFEIIHLLTGENPLQILVSAIINSGPREDSTRIGRAGTVRRQAVDVSPLRVNQAIWLLC 179
H.sapiens        AFEIIHLLTGENPLQVLVNAIINSGPREDSTRIGRAGTVRRQAVDVSPLRVNQAIWLLC 155
C.elegans        AFEIIYLLTGENPVQVLVNAVINSGPREDSTRIGRAGTVRRQAVDVAPLRRVNQAIWLLC 161
C.reinhardtii    AFDIIHLLTQDNPQVVDAIINSGPREDSTRIGSAGVVRQAVDISPLRRVNQAIYLLT 144
A.thaliana       AMEIIHLLSDLNPIQVIIDAVINSGPREDSTRIGSAGVVRQAVDISPLRRVNQAIFLIT 158
S.cerevisiae     TLDIINVLTQDNPQVVDAIINTGPREDTTRVGGGAARRQAVDVSPLRVNQAIALLT 176
:.*: *:. **:***::*: *:***:**: *.*.*****:***** *:.

D.melanogaster   TGAREAAFNRNIKTIAECLADELINAAGSSNSYAIKKKDELERVAKS NR 228
H.sapiens        TGAREAAFNRNIKTIAECLADELINAAGSSNSYAIKKKDELERVAKS NR 204
C.elegans        TGAREAAFNRNVTIAECLADELINAAGSSNSYAIKKKDELERVAKS NR 210
C.reinhardtii    TGAREAAFNRNIKTIAECLADELVNAAGSSNSYAIKKKDELERVAKS NR 193
A.thaliana       TGAREAAFNRNIKTIAECLADELINAAGSSNSYAIKKKDELERVAKS NR 207
S.cerevisiae     IGAREAAFNRNIKTIAETLAEELINAAGSSNSYAIKKKDELERVAKS NR 225
*****:***** **:***:*****. *****:*****:**

```



Figure 2-1 進化において保存された uS7C 末端アミノ酸配列

ショウジョウバエ (*D. melanogaster*), ヒト (*H. sapiens*), 線虫 (*C. elegans*), クラムドモナス (*C. reinhardtii*), シロイヌナズナ (*A. thaliana*) そして出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の uS7 配列の比較を CLUSTAL 2.1. を用いて行った。矢印は出芽酵母における 223 番目のセリンの位置を示す。

タンパク質の翻訳は細胞の生育において必須のプロセスであるが、熱ストレス等のストレス環境下において細胞は全体的な翻訳を停止する。この停止の過程では、細胞質中には P-body (processing body) 及びストレス顆粒 (stress granule) と呼ばれる 2 種類の mRNA を含むリボタンパク質集合体がみられるようになる (Anderson and Kedersha, 2008; Buchan and Parker, 2009)。P-body は mRNA を含むものの、それらは翻訳されることなく P-body 内において分解される。一方でストレス顆粒は mRNA の他に翻訳開始複合体及びリボソーム 40S サブユニットを含むことが報告されている (Hoyle *et al.*, 2007; Buchan *et al.*, 2008)。遺伝子特異的な翻訳を制御する例についても報告がある。グルコース飢餓環境下にある酵母細胞において、リボソームが結合している mRNA を網羅的に同定することのできるリボソームプロファイリング解析を行うことで、翻訳停止後に特異的に翻訳された mRNA のうちグルコース

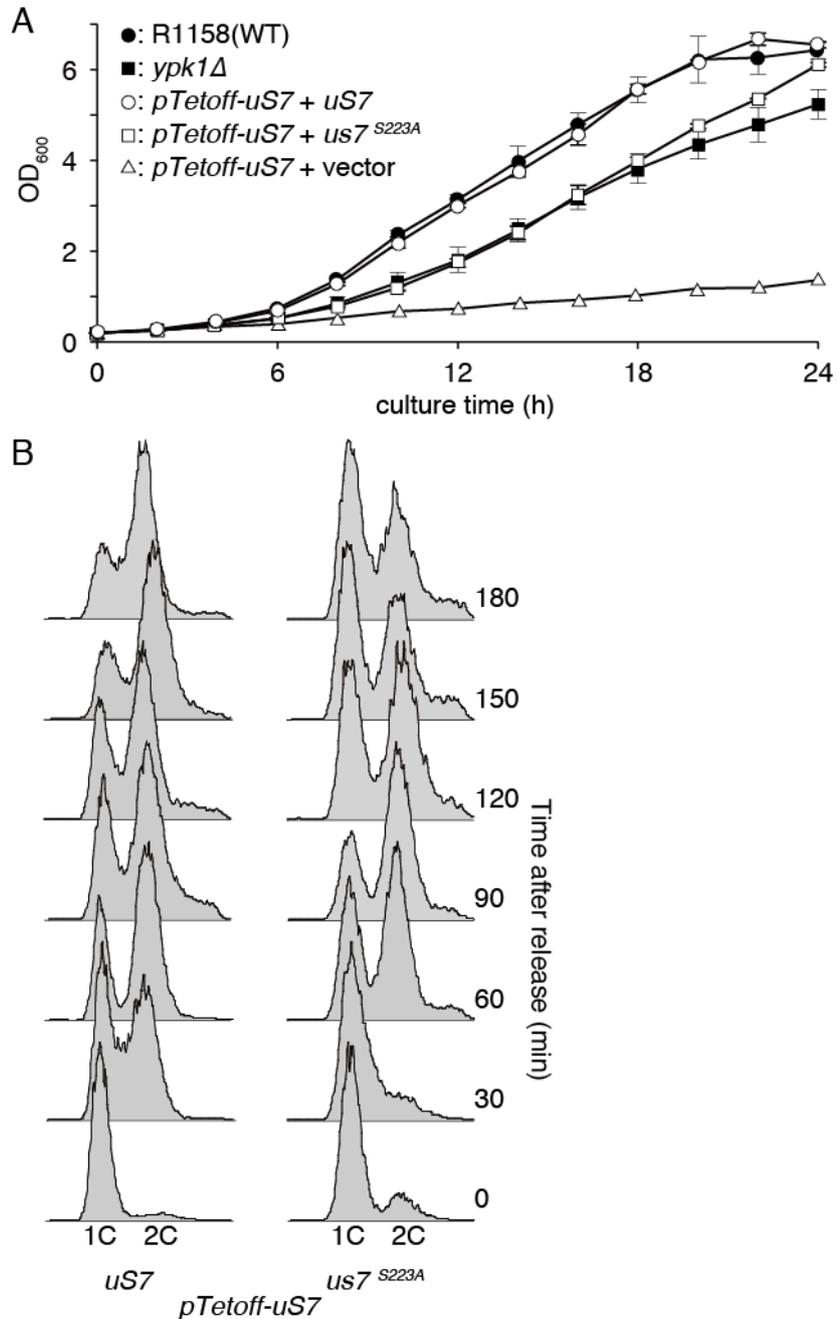
代謝に関与する遺伝子の mRNA はストレス顆粒に取り込まれること、熱ショックタンパク質をコードする遺伝子の mRNA はこれを回避して翻訳が行われることが明らかにされている(Zid *et al.*, 2014)。このように、翻訳が抑制されたストレス環境下において細胞はストレス顆粒を介し、特定のタンパク質の翻訳のみを行っていることが明らかになりつつあるが、これを可能とする分子機構は未だ明らかではない。

本章においては uS7 の非リン酸化模倣変異体である S223A 変異体の解析により、このセリンがタンパク質翻訳及び細胞増殖にとって重要であることを明らかにした。またそのみならず、アラニン変異体発現細胞においては熱ショックタンパク質の翻訳量が増加しており、熱ストレス耐性が亢進していることを明らかにした。

## 【結果】

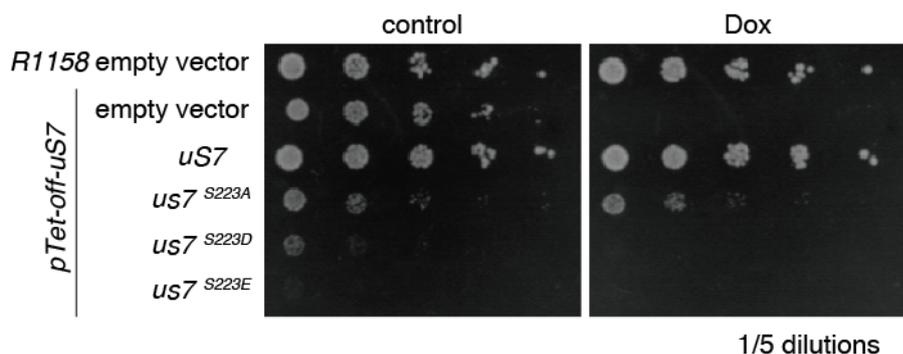
### us7 S223A 変異による細胞増殖遅延

前章 Fig. 1-4B において、us7 S223A 変異体発現株は野生型 uS7 発現株と比較して寒天培地上における細胞増殖は遅延していた。この結果を受け、著者は細胞増殖における us7 S223 のリン酸化の影響について更なる解析を行った。より正確に細胞増殖を検証するため、OD<sub>600</sub> の経時的測定により液体培地中における細胞増殖を評価したところ、寒天培地の結果と同様に us7 S223A 発現株は野生型と比較して増殖が遅延しており、またその増殖速度は *ypk1Δ*株と同程度であった(**Figure 2-2A**)。この増殖曲線において、対数増殖期における増殖速度は野生型と S223A 変異体の間に大きな差は観察されなかったものの、増殖誘導期においては顕著な差がみられた。この結果を受け、次に us7 S223A 発現株の細胞周期解析を行った。細胞周期は酵母の細胞周期を酵母の接合因子である  $\alpha$ -factor mating pheromone により G1 期停止させた後、これを解除することにより解析した。G1 期からの開放 30 分後には野生型 uS7 発現株で S 期へ移行していたが、us7 S223A 変異体発現株では S 期への移行には 60 分を要した(**Figure 2-2B**)。以上の結果より、uS7 S223 のリン酸化は細胞増殖における増殖誘導段階に重要な役割を有していることを明らかにした。更にこの部位のリン酸化の意義を明らかにする為、アミノ酸のリン酸化状態を模倣する手法として 223 番目のセリンをアスパラギン酸(S223D)及びグルタミン酸(S223E)へと置換した変異体を作製し、リン酸化模倣変異体発現による細胞増殖を検証した。これらを酵母に発



**Figure 2-2 us7 S223A 変異による増殖遅延**

(A) *us7 S223A* 変異体の増殖曲線。内在性 *uS7* は *pTet-off-uS7* 株を用い、Doxycycline を培地中に添加することで発現を抑制した。プラスミドベクターにより野生型 *uS7* 及び変異型 *uS7* を発現させた。細胞増殖は OD<sub>600</sub> を経時的に測定することにより図示した。(B) *S223A* 変異体発現細胞の細胞周期。 *pTet-off-uS7* 株を用いることで野生型 *uS7* または *us7 S223A* のみを発現する酵母細胞を alpha factor 存在下で培養することにより G<sub>1</sub> 期で細胞周期を停止させた。細胞を培地で洗浄することにより細胞周期の進行を再開させこれを 0 min とした。細胞中 DNA 量は PI 染色を行い、細胞をフローサイトメトリーにより解析することにより定量した。細胞周期の進行は 2 コピー (2C) のピークの増加により観察される。



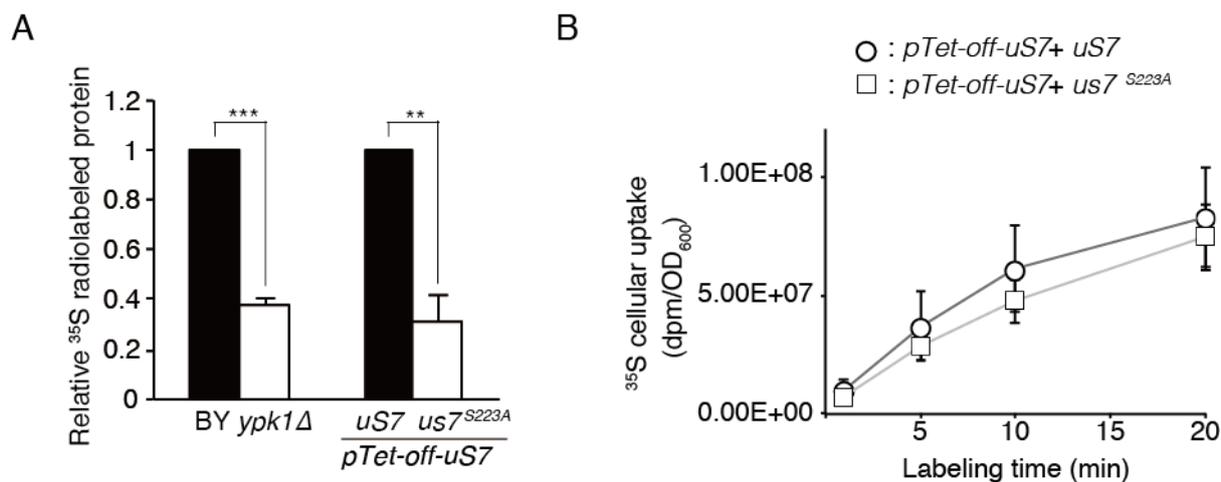
**Figure 2-3 uS7 リン酸化模倣変異体**

uS7 の 223 番目のセリンをアラニン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸に置換した変異体を作製した。各 uS7 変異体は pRS415 プラスミドベクターにより、自己のプロモーターを介して発現させた。内在性の uS7 は *pTet-off-uS7* 株を用い、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxycycline を添加することにより発現を抑制させた。段階希釈を行った酵母細胞は SD 寒天培地上にスポットし、30°C で培養を行った。

現させた結果、us7 S223D 及び us7 S223E 変異体発現細胞は S223A 変異体よりも強く増殖が抑制された(**Figure 2-3**)。この結果は Ser223 が常時リン酸化されていない可能性、そして uS7 は適切にリン酸化されることで状況に応じた働きを行っている可能性を示唆するものである。

### us7 S223A 変異による全タンパク質翻訳抑制

uS7 はリボソーム構成タンパク質であることから、uS7 のリン酸化はリボソームの機能であるタンパク質翻訳の調節に関与している可能性は高い。また Ypk1 はタンパク質翻訳に関与していることが報告されている(Gelperin *et al.*, 2002)。つまり、uS7 の Ser223 がリン酸化部位であるならば、そのリン酸化不全変異はタンパク質翻訳に影響を与えると考えられる。著者はタンパク質翻訳への uS7 リン酸化の影響を明らかにする為、放射性同位体標識したアミノ酸のタンパク質への取り込み量の測定を行った。この結果、*ypk1Δ* 株では野生株と比較して約 60% 取り込み量が減少しており、同様に us7 S223A 発現細胞においても野生型発現細胞と比較して同程度取り込み量の減少が観察された(**Figure 2-4A**)。細胞内への放射性同位体を含むアミノ酸の取り込み量には野生型と変異体の間に差が見られなかったことから(**Figure 2-4B**)、合成されたタンパク質への放射性同位体標識したアミノ酸の取り込み量の減少は翻訳の低下に起因している可能性が示唆された。放射活性の検出は SDS-PAGE



**Figure 2-4 us7 S223A 変異体発現株におけるタンパク質翻訳**

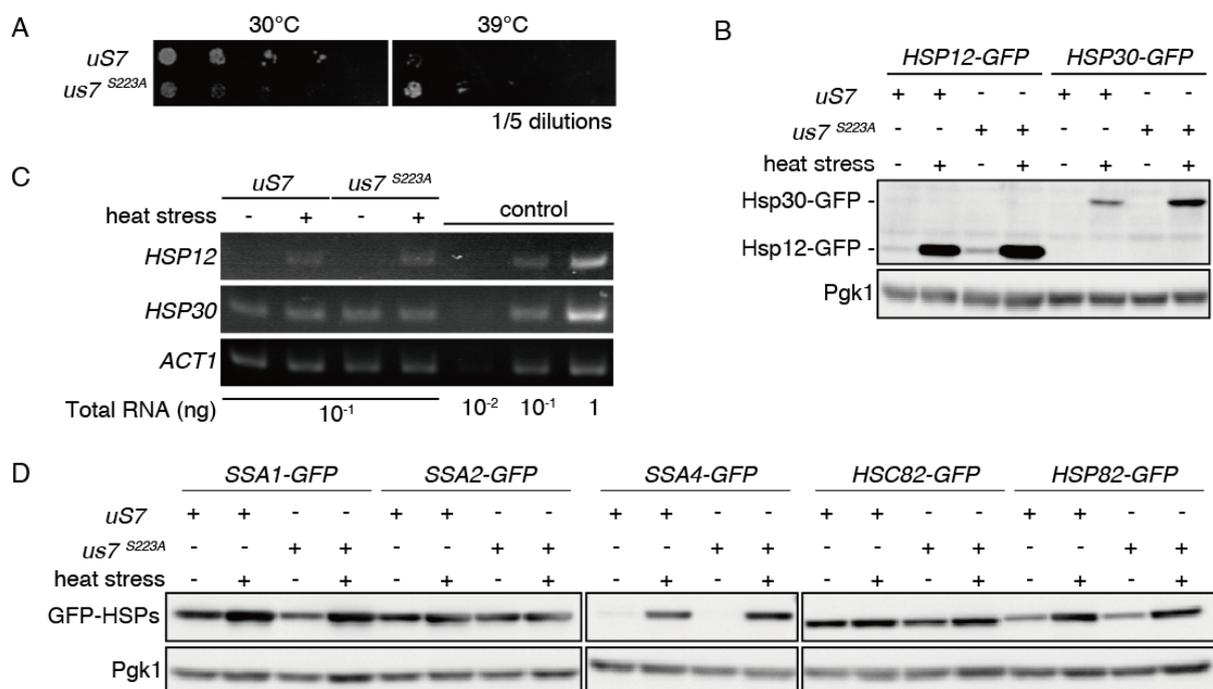
(A) *us7 S223A* 変異体発現株における新規タンパク質翻訳量。各酵母細胞を [<sup>35</sup>S]メチオニン及びシステインを用いて代謝標識し、その細胞内タンパク質を TCA 沈殿により精製した。放射性同位体により標識されたタンパク質は液体シンチレーションカウンター及び Bradford 法を用いて解析した。新規合成タンパク質は総タンパク質中の放射活性を総タンパク質濃度で標準化することにより算出した。相対値の 3 回独立試行平均値は野生型を基準として SD と共に図示した。統計的有意性は Student の t 検定を用いて評価した。\*\*は p 値が 0.005 以下であることを示す。\*\*\*は p 値が 0.001 以下であることを示す。(B) *us7 S223A* 変異体発現株における [<sup>35</sup>S]メチオニン及びシステイン取り込み量。3.0 OD<sub>600</sub> に相当する酵母細胞をメチオニン非存在下で培養した後、100 μCi の [<sup>35</sup>S]メチオニン及びシステインと共に培養した。細胞を回収後洗浄し、液体シンチレーションカウンターにより測定を行うことでアミノ酸の細胞内への取り込み量を測定した。グラフは放射性同位体取り込み量を細胞数で標準化した値 (dpm/OD) により作図した。

によりタンパク質を展開した後のオートラジオグラフィーによっても行ったが、30℃培養条件において特定のタンパク質のバンドとして有意に影響をうけたものを見出すことはできなかった(データ示さず)。

### us7 S223A 発現細胞は熱ストレス応答を促進する

*us7 S223A* 発現細胞はタンパク質翻訳を低下させるものの、完全に機能不全とはなっていないことから、*uS7* 変異体はリボソームに取り込まれ、野生型と異なった働きを行っている可能性が考えられた。著者は *us7 S223A* 変異体が異なる細胞機能を有している可能性について検討する為に酵母の至適培養温度である 30℃での培養と

酵母にとって熱ストレス条件となる 39°Cでの培養を行い、寒天培地上の酵母の増殖・生存を比較した。この結果、39°Cでは *us7 S223A* 変異体が優位に増殖した (**Figure 2-5A**)。この結果を解釈する為に、熱ストレスに応じてその発現が上昇す



**Figure 2-5 S223A 変異体発現株における熱耐性及び熱ショックタンパク質翻訳上昇**

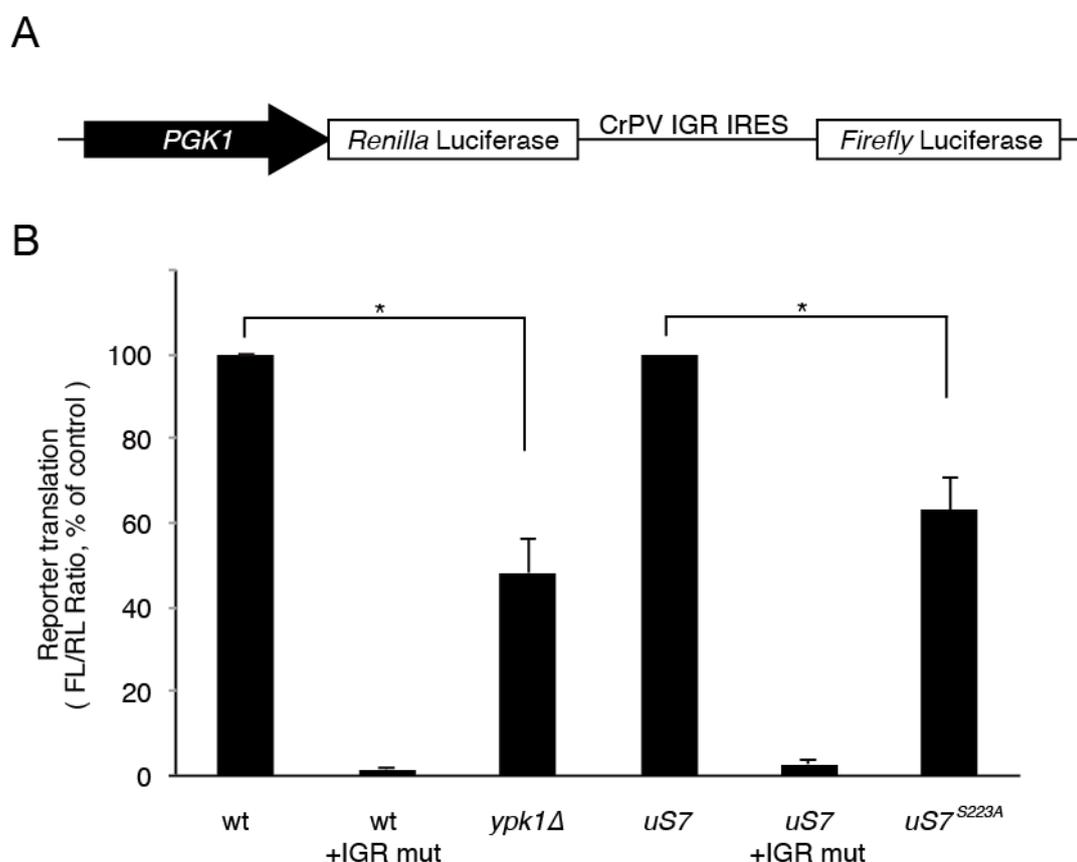
(A) S223A 変異体発現株における熱ストレス耐性。Fig. 2-3 と同様に酵母細胞を Doxycycline を含む SD 寒天培地上にスポットし、異なる温度で培養した。30°Cで培養したプレートはスポット後 2 日経過後に撮影した。39°Cで培養したプレートはスポット後 7 日経過後に撮影した。(B) S223A 変異体発現株における熱ショックタンパク質発現量上昇。GFP 融合熱ショックタンパク質発現株に野生型 *uS7* または変異型 *uS7* を発現させることで熱ショックタンパク質発現量を観察した。熱ストレスは対数増殖期の細胞を 39°Cの水浴中で振盪培養することにより行った。熱ストレス後の細胞を回収し細胞抽出液を得た。細胞抽出液 (5 μg/lane) をウエスタンブロット法により解析した。GFP 融合熱ショックタンパク質は抗 GFP 抗体を用いて検出した。Pgk1 はローディングコントロールとして用いた。(C) 熱ショックタンパク質 mRNA は *uS7* 変異による影響を受けない。熱ストレス後の酵母細胞より RNA を抽出した後、*HSP12* 及び *HSP30* の mRNA 発現量を半定量 RT-PCR 法により解析した。*ACT1* はローディングコントロールとして用いた。(D) *us7 S223A* 変異体発現細胞における特異的な熱ショックタンパク質発現上昇。Fig. 2-5B と同様の実験により別の熱ショックタンパク質の発現量について解析した。

ることが知られている熱ショックタンパク質である Hsp12 及び Hsp30 について、それらの発現量をウエスタンブロット法により解析した。この結果、両タンパク質とも野生型と比較して us7 S223A 変異体発現細胞においてより高い発現量を示した (**Figure 2-5B**)。Hsp12 及び Hsp30 の mRNA 量には明確な差は認められなかったことから (**Figure 2-5C**)、us7 S223A 変異体発現細胞においては転写段階ではなく翻訳段階において Hsp12 及び Hsp30 の発現が亢進していると考えられる。Ssa1、Ssa2、Ssa4、Hsc82、Hsp82 といった別の熱ショックタンパク質についても同様に発現量の解析を行った結果、Ssa4 においてのみ us7 S223A 変異体発現によるタンパク質発現の亢進がみられた (**Figure 2-5D**)。以上の結果は us7 S223A を含むリボソームは全てのタンパク質翻訳プロセスにおいて負の制御を行う訳ではなく、少なくとも Hsp12、Hsp30、Ssa4 といった熱ショックタンパク質の翻訳においてはこれを亢進する可能性を示唆した。

### cap 構造非依存的翻訳における uS7 の影響

富士らの研究により uS7 はウイルス由来 IRES に対してその RNA 配列に直接結合し、IRES を介したタンパク質の翻訳、つまり cap 構造非依存的な翻訳に関与している事が知られていた (Muhs *et al.*, 2011, Fukushi *et al.*, 2001)。実際にどのようにその翻訳に関わっているかは不明であった。著者はデュアルルシフェラーゼアッセイを用いて uS7 と cap 構造非依存的翻訳との関与について明らかにすべく測定を行った。この実験で用いたレポータープラスミドはウミシイタケルシフェラーゼ (RL) 及びホタルルシフェラーゼ (FL) の遺伝子間にコオロギ麻痺ウイルス (cricket paralysis virus : CrPV) 由来の IRES を導入しており、FL の翻訳は CrPV-IRES 依存的に行われる (Landry *et al.*, 2009)。このプラスミドを保有する酵母では cap 構造依存的に RL が翻訳され、cap 構造非依存的に FL が翻訳される。これにより cap 構造依存的な翻訳と非依存的な翻訳を区別して検出することが可能となり、RL を内部コントロールとして用いることで cap 構造非依存的な翻訳を評価できる (**Figure 2-6A**)。この手法により cap 構造依存的な翻訳と cap 構造非依存的な翻訳の割合について野生型 uS7 発現株と us7 S223A 発現株の比較を行った結果、cap 構造非依存的な翻訳は us7 S223A 発現株において低下し、また *ypk1Δ* 株においても低下していた (**Figure 2-6B**)。この結果より、uS7 の Ser223 は cap 構造非依存的な翻訳の調節に関与して

いる可能性が示された。



**Figure 2-6 Cap 非依存的翻訳における *us7* S223A の影響**

(A) 2 シストロン性デュアルルシフェラーゼレポーター概略図を示す。2 シストロンレポーターの転写は *PGK1* プロモーターに依存する。Renilla luciferase (RL) は cap 依存的に行われる一方で、Firefly luciferase (FL) は内部リボソーム結合部位に依存して行われる。FL をコードする領域の開始コドンは欠損していることから、AUG を必要とする cap 依存的翻訳によっては翻訳されない。(B) *ypk1*Δ 株及び *us7* S223A 発現細胞における cap 構造非依存的翻訳を示す。図に示す遺伝型の細胞に 2 シストロンレポーター、又はその IRES 配列に変異を導入することで FL を発現しないコントロールベクター (intergenic region mutation; IGR mut) のどちらかを導入した。内在性 *uS7* は Doxycycline の添加により抑制した。FL の値を内部コントロールである RL の値で標準化した。相対値の 3 回独立試行平均値は野生型を 100% として SD と共に図示した。統計的有意性は Student の t 検定を用いて評価した。\*は p 値が 0.01 以下であることを示す。

## 【考察】

本章において著者は uS7 のリン酸化不全変異を導入することにより至適温度環境下においてはタンパク質翻訳が抑制され、その結果として細胞増殖遅延を引き起こすことを明らかにした。逆に、熱ストレス条件下においては熱ショックタンパク質の翻訳が促進され、その結果として熱ストレス環境における細胞増殖が亢進することを明らかにした。この知見は細胞の外環境の変化への応答の一端を明らかにするものである。

グルコース飢餓環境下における熱ショックタンパク質の翻訳促進機構としては、既存の mRNA が P-body へと取り込まれることで翻訳を阻害される一方で、プロモーター配列中に heat shock element(*HSE*)を有し、それによりストレス環境下における転写が増加する mRNA はストレス顆粒への移行を逃れて翻訳される機構が報告されている(Zid *et al.*, 2014) (Figure 2-7)。つまり、*HSE* は転写時に用いられるのみならず、転写後もその産物の翻訳に寄与する可能性が考えられた。本章においてみられた us7 S223A 変異体発現細胞における熱ストレスに応じた熱ショックタンパク質の発現量の亢進は *HSE* を有する *HSP12*, *HSP30* でみられたことから、us7 S223A 変異体発現細胞は *HSE* を介した翻訳制御機構を増強する可能性が高い。事実、uS7

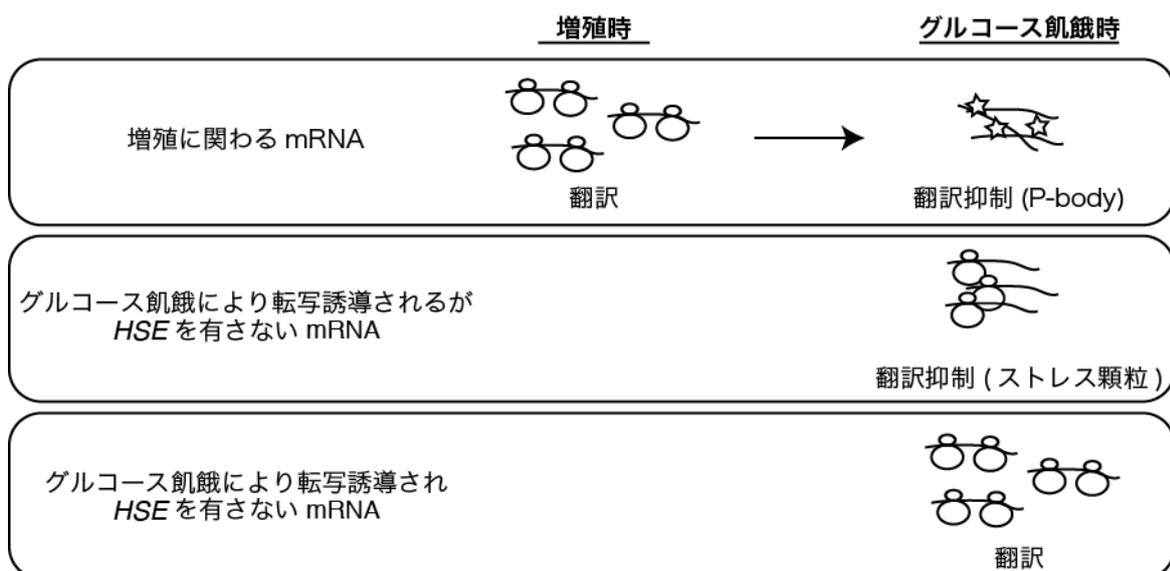


Figure 2-7 グルコース飢餓時における mRNA 特異的翻訳機構

と eIF2 $\alpha$  は mRNA の開始コドンを認識することが報告されており (Visweswaraiah *et al.*, 2017)、S223A 変異体及び非リン酸化 uS7 は HSE によって制御される mRNA を認識することによりその翻訳を促進しているものと予想される。これとは異なる考え方として、増殖速度と熱ストレス耐性には負の相関があり、us7 S223A 発現株は増殖遅延により熱ストレス耐性を獲得している可能性も考えられた。そこでこの仮説を検証するため、細胞増殖を遅延する表現型を示し、酵母ゲノム中にそのパラログを有しているリボソーム小サブユニットタンパク質欠損株を 7 株用いてそれらに熱ストレスを与える実験を行った。結果は示していないが、用いた 7 株のうち 5 株には熱ストレス耐性がみられたものの、残りの 2 株は熱ストレス耐性を有さなかった。この結果から、増殖速度と熱ストレス耐性は単純な逆相関関係にはないことが判明した。以上の知見より細胞は熱ストレスという生命の危機に際し、自らを守るタンパク質の翻訳を uS7 のリン酸化状態の変化を含む様々な調節機構を通じて活性化しているものと考えられる。

本章にて明らかにした uS7 のリン酸化による翻訳調節は mRNA 特異的な翻訳調節の好例となることが期待され、今後熱ストレス環境化における uS7 S223 のリン酸化状態などを明らかにすることで特異的翻訳制御機構に関する研究がより進展することが期待される。

## 第 3 章

### uS7 S223 リン酸化を介するリボソーム成熟制御機構

#### 【要旨】

前章にて著者は us7 S223A 変異体発現細胞は通常培養条件において全体的な翻訳が抑制されることを見出した。しかしながら uS7 のリン酸化がリボソームにおけるタンパク質翻訳に具体的にどのように作用しているかは明らかでない。本章においては、リボソーム RNA 解析及びリボソーム結合タンパク質の解析を行うことにより、uS7 のリン酸化はリボソーム成熟に関与する Rio2 との相互作用を介して適切な rRNA の切断を促し、それによって 40S リボソームサブユニットの成熟を制御することを明らかにした。

#### 【序論】

第 1 章において Ypk1 の基質として同定し、第 2 章においてそのリン酸化部位がタンパク質翻訳に重要であることを明らかにした uS7 は、その哺乳動物ホモログに関する知見として、カゼインキナーゼ II によるマウス uS7 のリン酸化がリボソームの核から細胞質への輸送に重要であることが報告されている(Matragkou *et al.*, 2009)。更に uS7 欠乏時の細胞の解析により、リボソーム生合成の初期段階が破綻し、核から細胞質中への未成熟リボソームの移行が阻害されることが報告されている(Ferreira-Cerca *et al.*, 2005)。uS7 はリボソーム DNA(rDNA)が RNA ポリメラーゼ I により転写された後、切断されて 18S、5.8S、25S rRNA へと成熟するリボソーム生合成において必要であることとされている(Woolford, J. L. Jr & Baserga, S. J., 2013)。40S 小サブユニットの成熟はその未成熟段階にある 43S サブユニットが細胞質中において Rio2 や Nob1 といったタンパク質との相互作用を経て達成される(**Figure 3-1**) (Campbell, M. G. & Karbstein, K. 2011)。リボソーム 40S サブユニット成熟の最終段階である 20S rRNA から 18S rRNA へのプロセッシングは 20S rRNA 上の D 部位と呼ばれる部位で RNA の切断が起こることが知られており、この切断はリボソーム 40S サブユニットが正常な翻訳複合体を形成する上で重要であるとされ

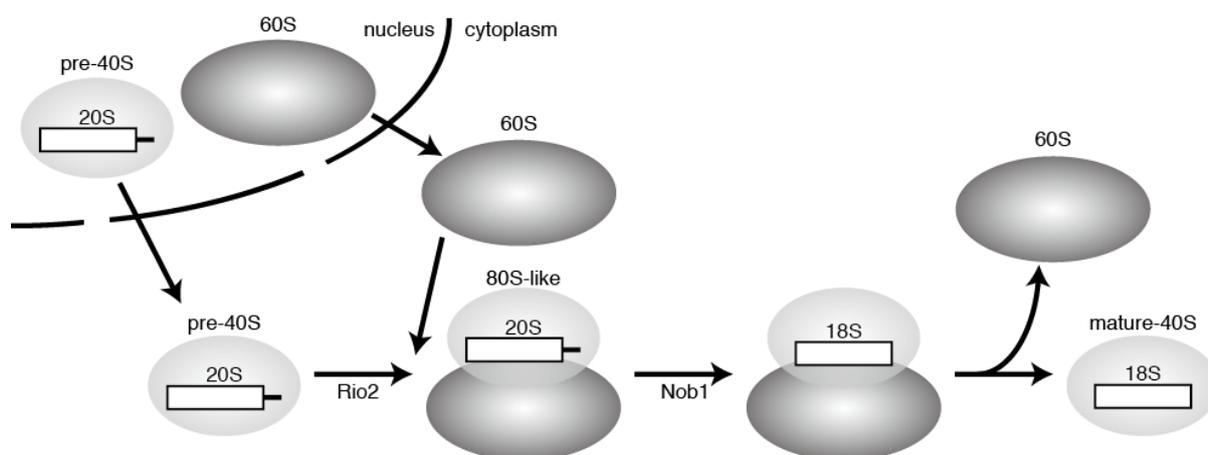


Figure 3-1 リボソームサブユニット成熟過程

ている(Udem S. A. & Warner J. R., 1973; Trapman J. & Planta R. J., 1976)。プロセッシングを受けた 80S リボソーム複合体において、uS7 は D 部位の近傍に位置している。

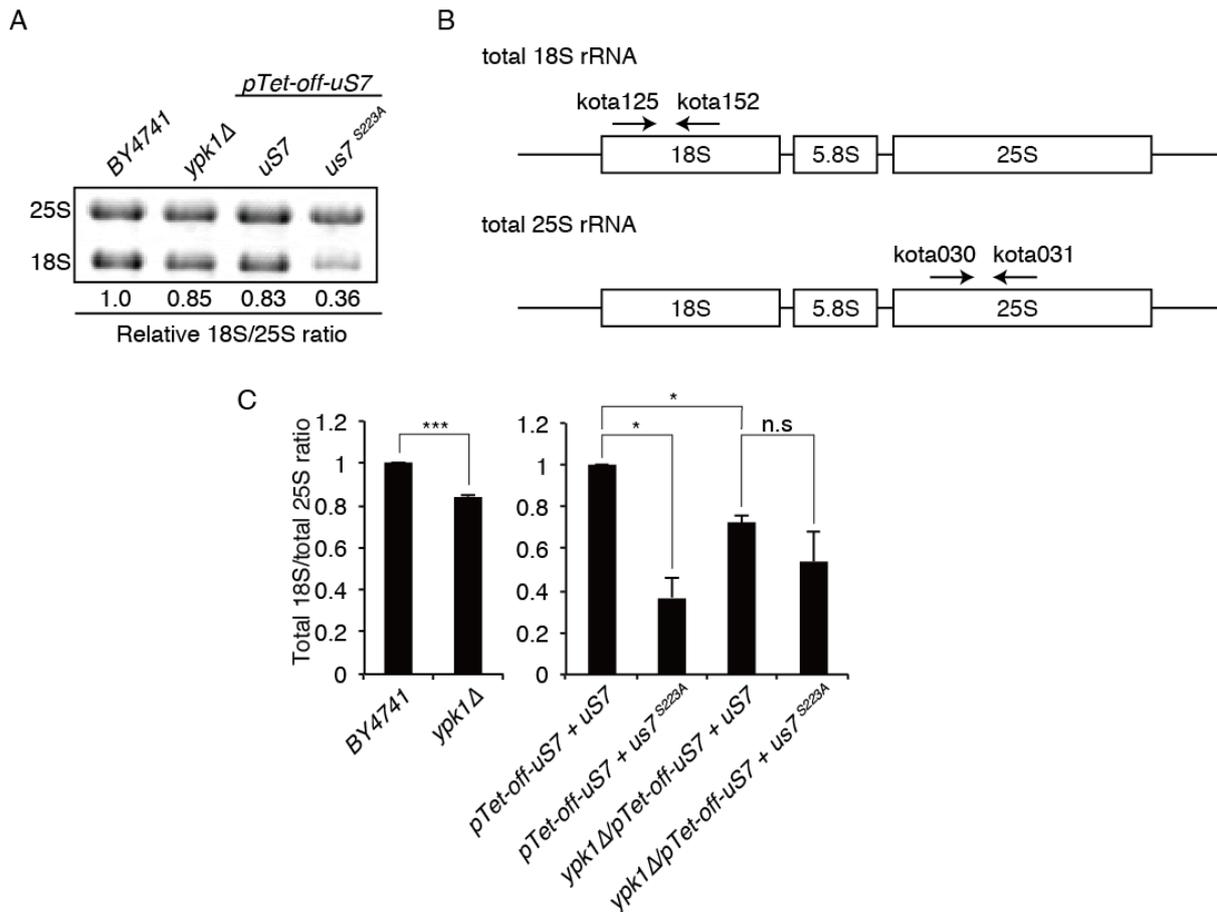
以上のように uS7 はリボソームの成熟の複数の段階において重要な働きをすることが明らかにされているものの、その具体的な役割は未だ未解明である。

第 3 章においては、S223A 変異体発現細胞においては Rio2 との相互作用が減弱され、その結果としてリボソームの成熟に異常をきたしていることを明らかにした。

## 【結果】

### S223A 変異によるリボソームへの影響

*ypk1Δ*株や *us7* S223A 変異体発現細胞における翻訳抑制機構を明らかにする為に、まず著者はリボソームを構成するリボソーム RNA (rRNA) の解析を行った。各細胞より全 RNA を抽出した後、アガロースゲル電気泳動により rRNA を分離した結果、*ypk1Δ*株において 25SrRNA と比較して 18S rRNA の減少が見られ、*us7* S223A 変異体発現細胞においてはより顕著な 18S rRNA の減少がみられた(Figure 3-2A)。同様にリボソーム RNA をリアルタイム PCR 法を用いて解析した結果、アガロースゲル電気泳動法と同じ結果を得る事ができた(Figure 3-2B, C)。どちらの手法で得られた結果においても *ypk1Δ*株における 18S rRNA の減少は 223A 変異による減少



### Figure 3-2 us7 S223A 発現細胞における 18S rRNA 減少

(A) *ypk1Δ*細胞及び *us7 S223A* 発現細胞における 18S/25S rRNA 比の減少。図に示す遺伝型の細胞より全 RNA を抽出後、アガロースゲル電気泳動により展開した。相対的 18S rRNA/25S rRNA 比は蛍光強度より算出した。(B) リアルタイム PCR 法に用いたプライマーセットの概略図。(C) Fig. 3-1A と同様に全 RNA を抽出後、リアルタイム PCR 法により rRNA の定量を行った。18S/25S rRNA 比の 3 回独立試行平均値は野生型を 100% として SD と共に図示した。統計的有意性は Student の t 検定を用いて評価した。\* は p 値が 0.01 以下であることを示す。\*\*\*は p 値が 0.001 以下であることを示す。

と比較して微弱な減少ではあったものの、*ypk1Δ*株においては *us7 S223A* 変異体を発現させることによる 18S rRNA の更なる有意な減少は観察されなかった(**Figure 3-2C**)。この結果は Ypk1 と uS7 の間に遺伝的相互作用がある、つまり Ypk1 と uS7 は同一のシグナル伝達経路で機能するという仮説を支持するものである。

次に uS7 以外のリボソーム構成タンパク質として 60S サブユニット構成タンパク質である uL23/Rpl25 及び 40S サブユニット構成タンパク質として、uS3/Rps3 の発

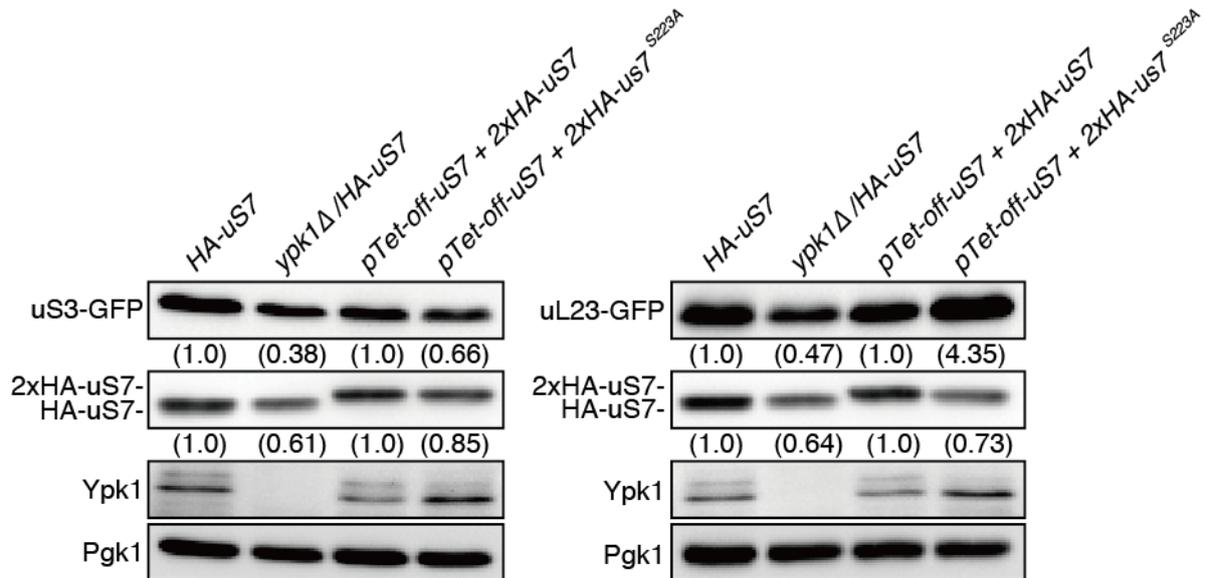


Figure 3-3 40S サブユニット構成タンパク質 us7 S223A 変異体発現株における特異的な減少及び *ypk1Δ*細胞における非特異的な減少

図に示す遺伝型の細胞に uS3-GFP 及び uL23-GFP を発現させることによりリボソーム構成タンパク質の発現量を観察した。対数増殖期の細胞を回収し細胞抽出液を得た。細胞抽出液 (5 μg/lane) をウエスタンブロット法により解析した。GFP 融合タンパク質は抗 GFP 抗体を用いて検出した。uS7 タンパク質は抗 HA 抗体を用いて検出した。Ypk1 は抗 Ypk1 抗体を用いて検出した。Pgk1 はローディングコントロールとして用いた。野生型と比較したリボソーム構成タンパク質の相対的蛍光値を算出し図中に示した。

現量の解析を行った。*ypk1Δ*株においては、Fig. 1-1B の結果と同様に uS7 の発現量は低下し、また uS3 及び uL23 についても発現量の低下が観察された(**Figure 3-3**)。この結果は *ypk1Δ*株においては 40S サブユニットと 60S サブユニットの両者が減少していることを示唆する。*us7 S223A* 変異体発現細胞に関しては 40S サブユニット構成タンパク質 uS3 と uS7 の両者の減少がみられたが、60S サブユニット構成タンパク質 uL25 は対照的に発現量が増加していた(**Figure 3-3**)。この結果は S223A 変異体発現細胞においては uS7 のみが減少しているのではなく、40S サブユニットそのものが減少している可能性を示唆するものである。つまり、等量の RNA を泳動している Fig. 3-2A においてみられる *ypk1Δ*と *us7 223A* 変異の表現型の差は、*ypk1Δ* 株では 18S rRNA と 25S rRNA の両方が減少しており、*us7 223A* 変異体発現細胞で

は 18S rRNA のみが減少することで生まれた差であると考えられる。

### リボソーム成熟における uS7 S223

リボソームの成熟過程において 40S サブユニットは核内にて構築された後に細胞質に放出され、20S rRNA がプロセッシングを受けることでその成熟を完了する。出芽酵母及びマウス細胞を用いた uS7 解析により、uS7 の欠失不全では 40S リボソーム小サブユニットが核から細胞質へと正しく輸送されないことが明らかにされている (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Matragkou *et al.*, 2009)。そこで us7 S223A 変異によるリボソーム成熟への影響を明らかにする為、まず GFP タグ融合 uS7 をプラスミドにより発現させ顕微鏡下での観察を行ったところ、us7 S223A 変異体は野生型と変わらず細胞質中に観察された (Figure 3-4)。この結果は us7 S223A 変異体はリボソームへと正常に組み込まれており、変異が与えるリボソームへの影響は細胞質中へと 40S サブユニットが移行した後の成熟段階にある可能性を示唆する。次に rRNA 成熟への S223A 変異の影響を明らかにする為、ノーザンブロット法による 18S rRNA 及び 25S rRNA の解析を試みた。この解析においては RNA ポリメラーゼ I による rDNA の転写調節による影響を回避する為、ガラクトースで人為的に誘導可能かつ RNA ポリメラーゼ II 依存的な GAL7 プロモーターの下流に rDNA を組み込み、さらに rDNA 中に検出用の RNA タグを 18S rRNA と 25S rRNA それぞれに組み込んだプラスミドを用いた (Figure 3-5A)。このプラスミドを保有する細胞を GAL7 プ

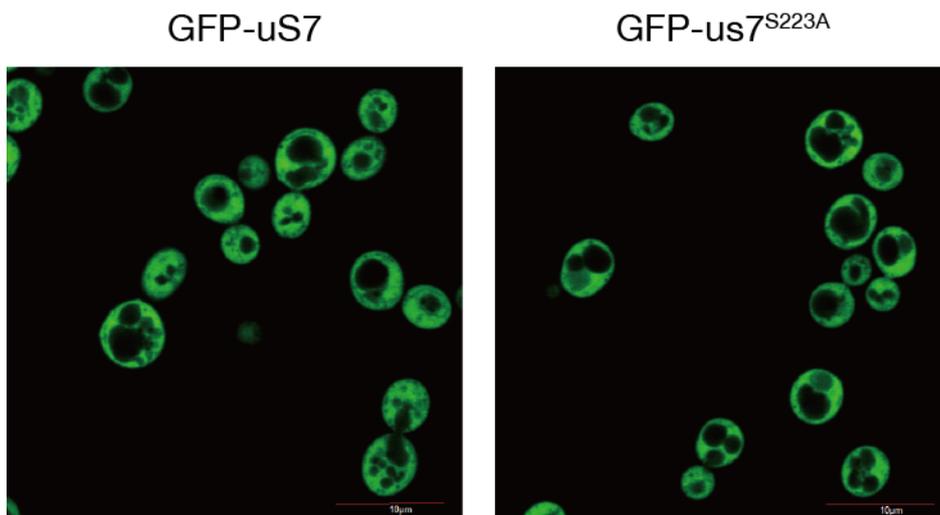
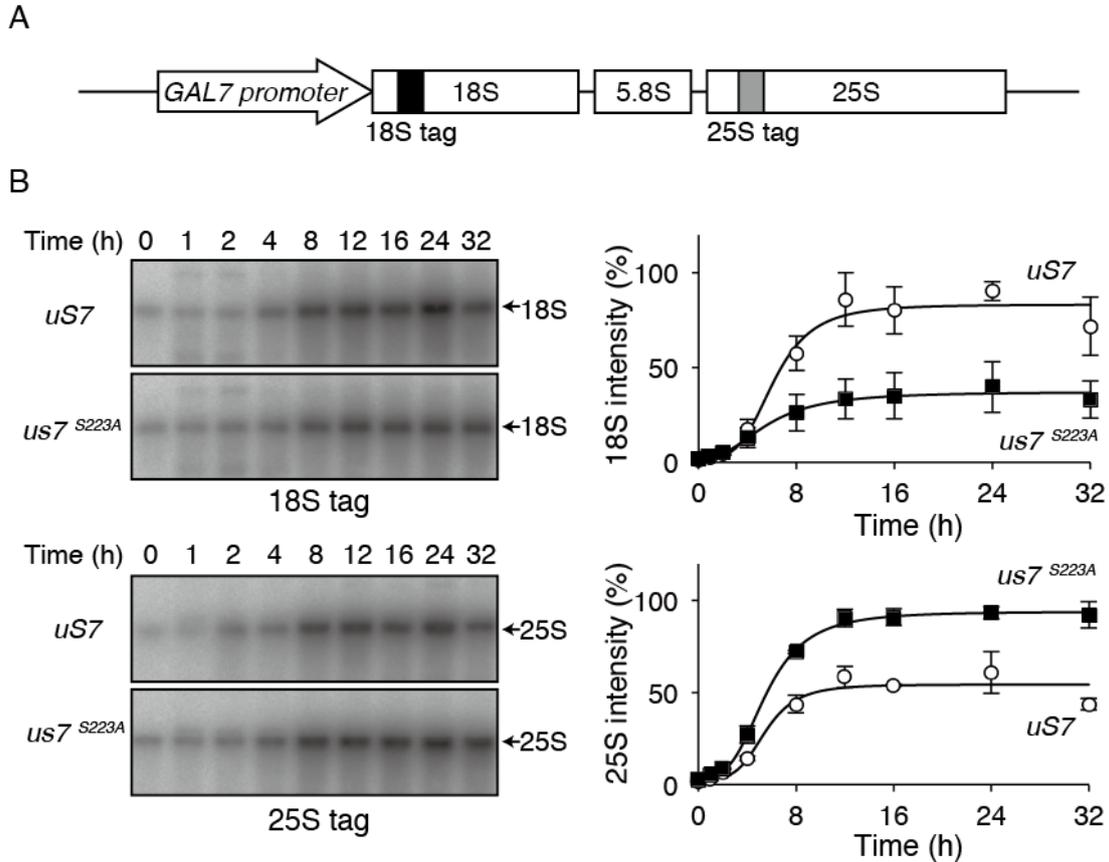


Figure 3-4 uS7 の細胞内局在

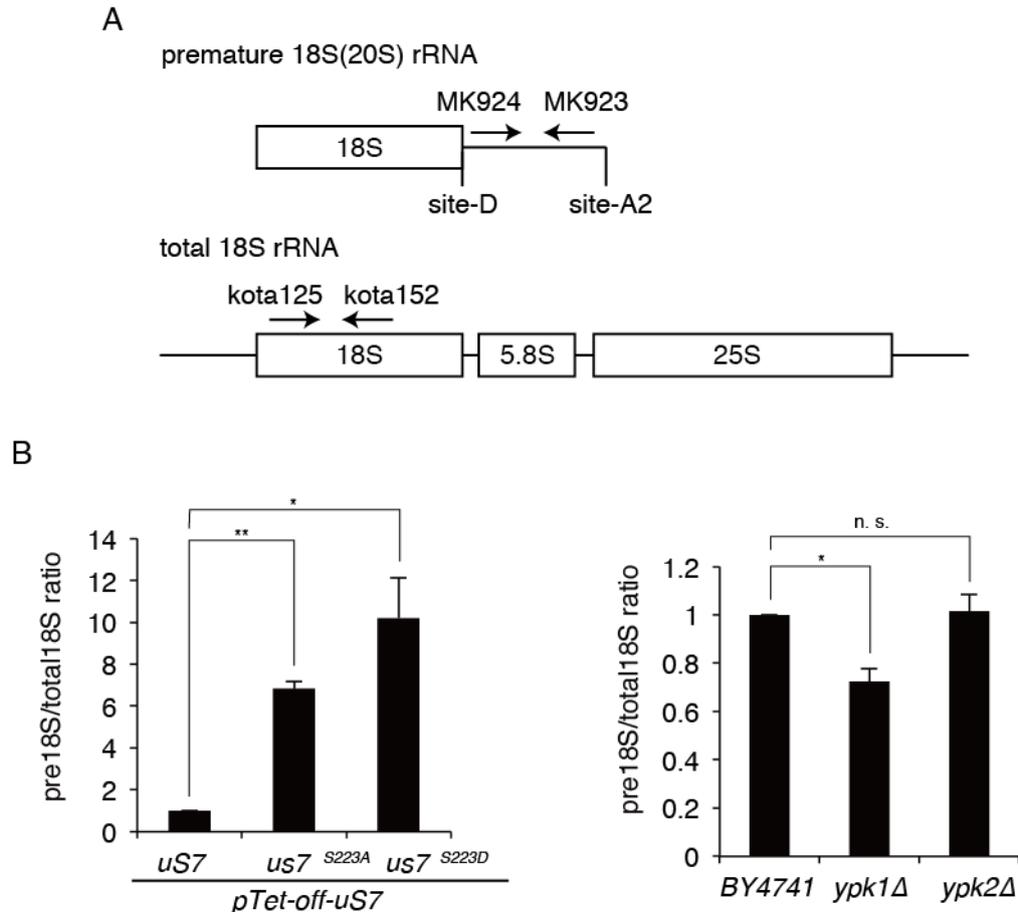
GFP 融合 uS7 及び us7 S223A を *pTet-off-uS7* 株に発現させ、内在性 uS7 の発現を Doxycycline の添加により抑制した。対数増殖期の酵母細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。図中の棒線は 10 μm を示す。



**Figure 3-5 *us7 S223A* 発現細胞における 18S rRNA 発現量減少**

(A) rRNA 発現 minigene 概略図。GAL7 プロモーター下流にリボソーム DNA を配置することで、ガラクトース依存的に rRNA を発現する。18S rRNA 領域及び 25S rRNA 領域中にそれぞれ RNA タグ配列を組み込むことで、内在性 rRNA と区別した検出を可能としている。(B) *us7 S223A* 発現細胞においてプラスミド由来 18S rRNA 発現は低下する。SD-Raf 培地で前培養した酵母細胞を SD-Gal 培地へと置換することにより minigene 由来の rRNA の発現を誘導した。誘導後の細胞を経時的に回収し、RNA 抽出を行った。18S rRNA 及び 25S rRNA はノーザンブロット法により 18S tag 及び 25S tag を用いて検出した。それぞれの相対的バンド強度の 3 回独立試行平均値を図示した。

ロモーターによる転写を誘導しないラフィノース培地中で培養した後にガラクトースを含む培地へと移行させ、タグ配列を検出することによりプラスミド由来の新規合成 rRNA のみを検出することが可能となる。これを用いてガラクトースによる誘導開始後の細胞中 rRNA の解析を行ったところ、*us7 S223A* 発現細胞において 18S rRNA レベルは低下し、25S rRNA レベルは上昇していた(**Figure 3-5B**)。これは泳動に用いた RNA を一定量としたことが原因であると考えられる。Ser223 を含む C 末端 7 アミノ酸残基を欠損した *uS7* 発現する細胞においては、35S 及び 20S rRNA が蓄積されることが報告されているが(Neueder *et al.*, 2010)、S223A 変異によって

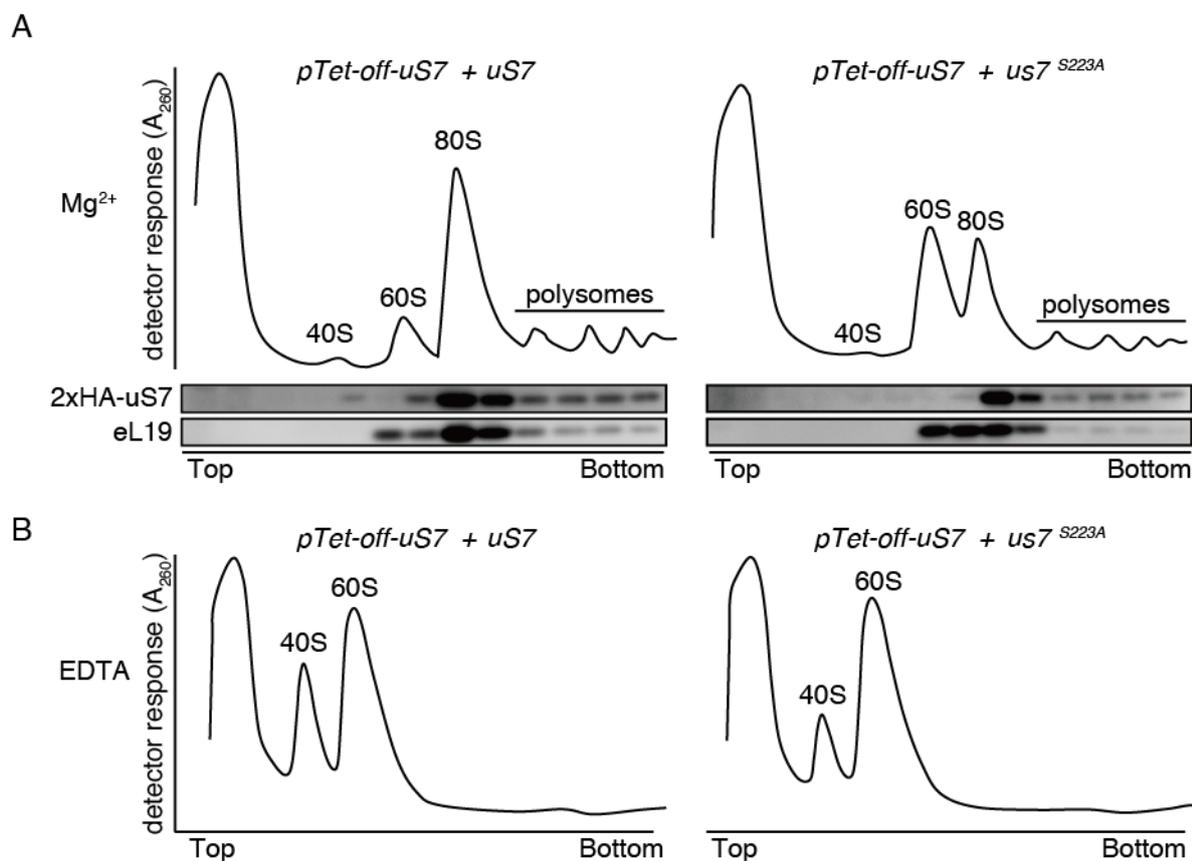


**Figure 3-6 us7 S223A 発現細胞における未成熟 18S rRNA 上昇**

(A)リアルタイムに用いたプライマーセットの概略図。site-D は 18S rRNA 生合成の最終段階における切断部位を、site-A2 は 32S rRNA から 20S rRNA と 27SA2 rRNA に切断される際における切断部位を示す。未成熟 18S(20S) rRNA 及び総 18S rRNA 量を図示するプライマーセットを用いて検出することが可能である。(B)未成熟 18S rRNA 量の変化。野生型 *uS7* 発現細胞、*us7 S223A* 発現細胞、*us7 S223D* 発現細胞、*BY4741* 株、*ypk1Δ*株、*ypk2Δ*株のそれぞれを対数増殖期まで培養後、回収して RNA 抽出を行った。抽出した RNA は Fig. 3-6A に示すプライマーセットを用いたリアルタイム PCR により解析を行った。未成熟 18S/成熟 18S1 比の 3 回独立試行平均値は野生型を基準として SD と共に図示した。統計的有意性は Student の t 検定を用いて評価した。\*は p 値が 0.01 以下であることを示す。\*\*は p 値が 0.005 以下であることを示す。n. s. は統計的有意差がないことを示す。

は同様の rRNA 分子種の蓄積はアガロースゲル電気泳動によっては確認できなかった。そこで pre-18S rRNA 及び全 18S rRNA に対応するプライマーを用いてリアルタイム PCR 法によりそれぞれを検出し存在比を算出した。この結果、S223A 及び S223D 変異体発現株においてどちらもプロセッシングを受ける前の pre-18S の存在比

が増加していることを明らかにした(**Figure 3-6A,B**)。この結果は、変異体発現細胞においては成熟型 40S リボソームサブユニットの比率が減少していることを示唆するものである。また *ypk1Δ*細胞においては、223A 発現細胞とは異なり pre-18S の存在比は約 30%減少していた(**Figure 3-6B**)。このような *us7* S223A 発現細胞と *ypk1Δ*株の表現型の違いの原因は現在のところ明らかでない。

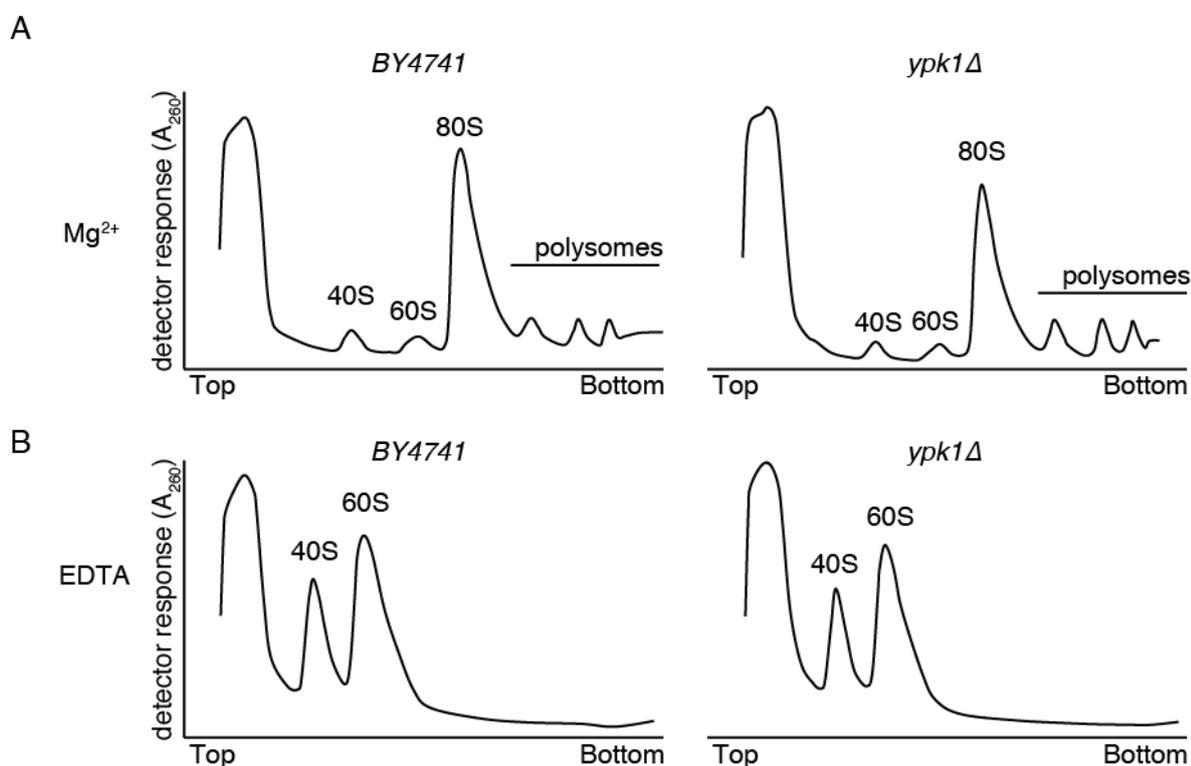


**Figure 3-7 *us7* S223A 変異体発現細胞のポリソーム解析**

対数増殖期の酵母細胞を回収し破碎した後、シヨ糖密度勾配中にて超遠心を行った。遠心後のサンプルは遠心チューブ上部より順に $A_{260}$ を測定し縦軸にとって図示することで、その分子密度に応じたRNA量の変化を可視化した。抗HA抗体及び抗uL19抗体を用いたウエスタンブロット法により、各ピークが40Sリボソーム、60Sリボソーム、80Sリボソーム、ポリソームであることを確認し、図中に示した(A)。40Sリボソームサブユニットと60Sリボソームサブユニット量を解析するため、細胞破碎液をEDTA処理することにより、80Sリボソーム及びポリソームを解離させ同様のポリソーム解析を行った(B)。

## シヨ糖密度勾配遠心法を用いたリボソーム分画による *us7 S223A* 変異体発現細胞解析

これまでの結果により *us7 S223A* 発現細胞においてリボソーム小サブユニットの成熟に異常が起こることが予想された。更に *us7 S223A* 発現細胞におけるリボソームの直接的な解析を進める為にリボソーム分画法によりリボソームレベルでの解析を行った。シヨ糖密度勾配遠心により細胞ライセート中に含まれるリボソームをその密度により分画し  $A_{260}$  を計測すると、野生型発現細胞において低密度側より、free RNA、40S リボソーム、60S リボソーム、80S リボソーム、ポリソームの順にピークが観察された(**Figure 3-7A**)。これら各フラクションについては *uS7* と *uL19/Rpl19a/b* をウエスタンブロット法により解析することで *uS7* が 40S リボソームと 80S リボソーム、ポリソームに、*uL19* が 60S リボソーム、80S リボソーム、ポリソームに正しく分画されていることが確認された(**Figure 3-7A**)。同様の条件で *us7 S223A* 発現細胞を野生型と比較したところ、60S リボソームのピークの上昇と 80S リボソーム及びポリソームのピークの低下が観察された(**Figure 3-7A**)。80S リボソームを維持する為に必要な  $Mg^{2+}$  イオンを EDTA によりキレートすることで



**Figure 3-8 *ypk1Δ*株のポリソーム解析**

(A) Fig. 3-7 と同様に野生株と *ypk1Δ*株のポリソーム解析を行った。(B) 40S リボソームサブユニットと 60S リボソームサブユニット量の解析は Fig. 3-7B と同様に EDTA 処理することにより行った。

会合していたリボソームをサブユニットに解離させリボソーム分画を行った。この結果、野生型と比較して *us7 223A* 発現細胞において 60S サブユニットは不変であり、40S サブユニットのみが減少していることが明らかとなった。(Figure 3-7B)。この結果はこれまでに得られた結果と一致し、*S223A* 変異体発現細胞においては 40S リボソームサブユニットの成熟に異常をきたしていると結論づけられた。また *ypk1Δ* 株においてもリボソーム分画を行い、各リボソームの存在状態を調べた結果、野生株と比較して 80S リボソームの低下と若干のポリソームの上昇がみられたものの、*S223A* 変異体発現時のような大きな違いはみられなかった(Figure 3-8A)。EDTA

処理した場合においても 40S サブユニットと 60S サブユニットの量比に大きな差は見られなかった(Figure 3-8B)。Fig.3-3 においても示すように *ypk1Δ* 株では 40S サブユニットと 60S サブユニットの両方が減少しているようにみられることから、Ypk1 は 40S サブユニットと 60S サブユニット両方の発現量を制御する因子であり、このうち 40S サブユニットの制御において uS7 のリン酸化を介していると考えられる。

### S223A 変異体表現型における Rio2 の関与

Neueder らによる研究により、40S サブユニットの前駆体である 43S サブユニットにおいて uS7 は S223 を含む C 末端 7 アミノ酸を介して Rio2 と直接相互作用している事が明らかとされている(Neueder *et al.* 2010)。また 43S サブユニットと 60S

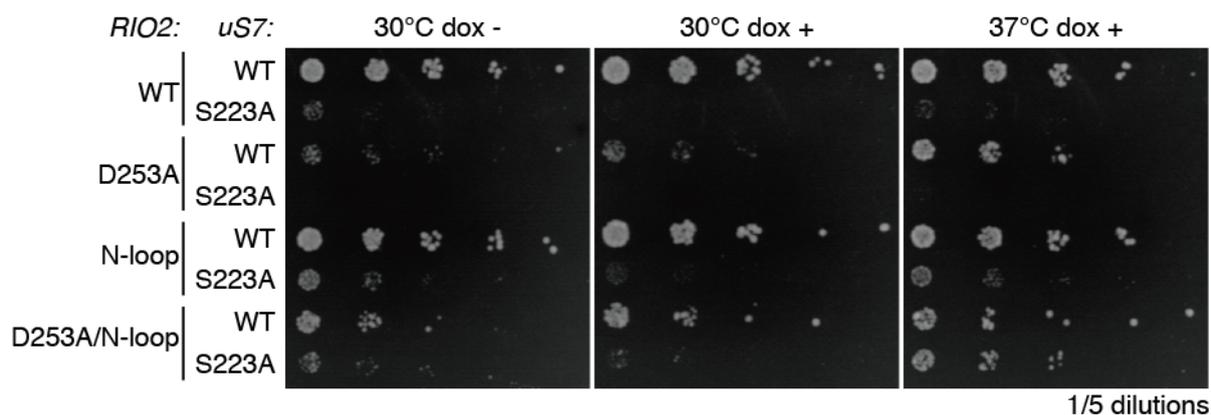


Figure 3-9 *uS7* と *RIO2* の遺伝的相互作用

*uS7* 変異と *RIO2* 変異のそれぞれを有する細胞を用いて増殖速度及び熱ストレス耐性の解析を行った。内在性 *uS7* の発現は Doxycycline (dox) の添加により抑制した。Fig. 1-4 と同様に酵母細胞を段階希釈した後、Doxycycline を含む SD 寒天培地上にスポットし、異なる温度で培養した。

サブユニットが細胞質において結合し pre-80S リボソームを構築することが、43S サブユニット中の 20S rRNA がその配列中の D 部位において切断されて 18S rRNA となることに必要であるとされている(Strunk *et al.*, 2012, Turowski *et al.*, 2014)。この pre-80S リボソームにおいて Nob1 はヌクレアーゼとして作用し(Karpstein, K 2013)、Rio2 はその ATPase 活性により rRNA を切断する為に必須な駆動力を付与すると考えられている(Geerlings *et al.*, 2003)。さらに Rio2 の ATP 結合モチーフと Flexible loop と呼称される領域のそれぞれが 43S サブユニットの 60S サブユニットへの結合と脱離に重要であることが明らかにされている。ATP 結合モチーフへの変異導入(D253A)は通常培養条件において細胞増殖遅延を示す一方で、熱ストレス条件においては野生型と同等の増殖を示すことが明らかにされているものの、その原因は未解明である(Ferreira-Cerca *et al.*, 2012)。既報内容と同様に、rio2 D253A 変異体発現株は 30°Cでの培養において増殖が遅延し、37°Cにおける培養においては野生型と同様の増殖を示した(Figure 3-9)。また Flexible loop 中の荷電アミノ酸にアラニ

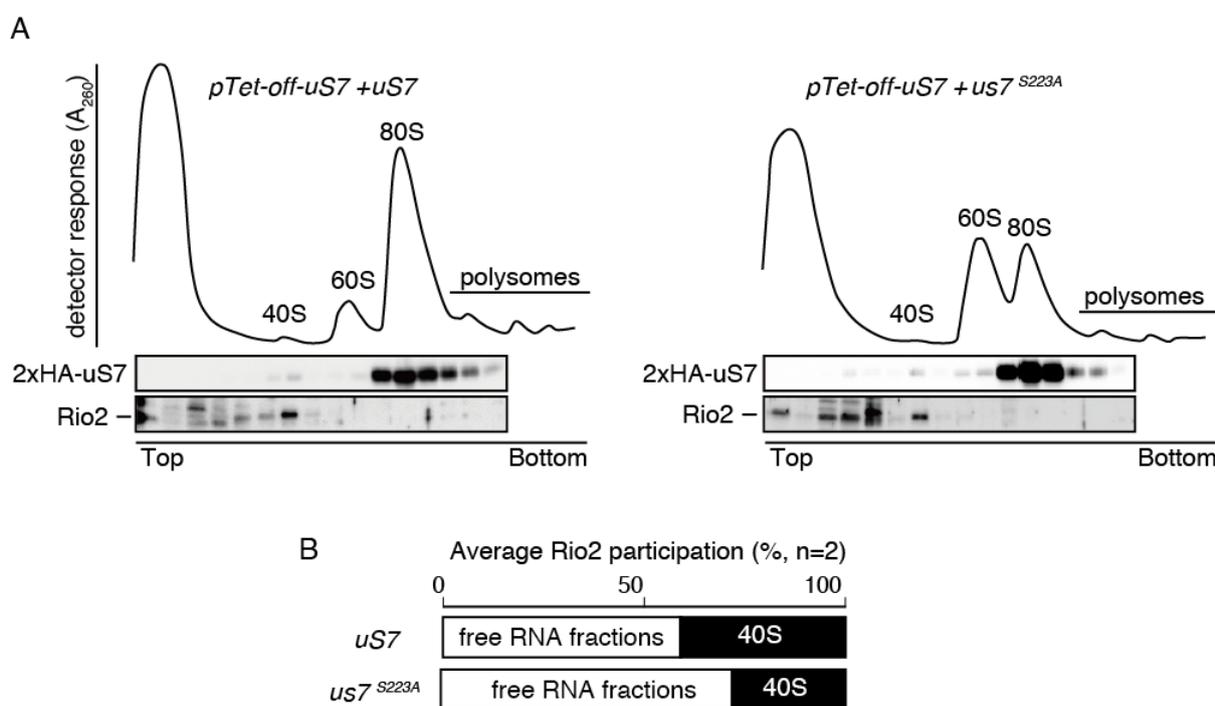
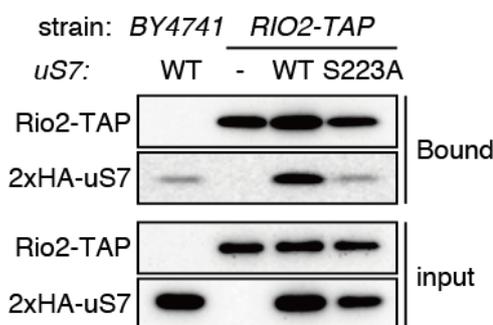


Figure 3-10 *us7 S223A* 変異体発現細胞 40S リボソームサブユニットにおける Rio2 低下

(A) 野生型 *uS7* 発現細胞と *us7 S223A* 発現細胞について、Fig. 3-7A と同様にポリソーム解析を行った。分画したフラクションをウエスタンブロット法により解析した。*uS7* タンパク質は抗 HA 抗体を用いて検出した。Rio2 は抗 Rio2 抗体を用いて検出した。P<sub>gk1</sub> はローディングコントロールとして用いた。(B) 40S リボソームと結合する Rio2 の存在比低下。Fig. 3-10A における Rio2 のウエスタンブロット像において、free RNA 領域にある Rio2 と 40S リボソーム領域にある Rio2 の比を算出して図示した。

ン変異を導入した N-loop(Neutral-loop)変異により 30°Cでの増殖遅延は一部回復した(**Figure 3-9**)。これらの rio2 変異体発現株に us7 S223A 変異体を導入し、その増殖への影響を調べた。この結果、いずれの Rio2 変異体においても us7 S223A 変異によって増殖が遅延していたが、S223A 変異体は N-loop 変異により 37°Cにおける増殖が回復した(**Figure 3-9**)。この結果は S223A 変異が rio2 D253A 変異と類似した表現型であることを示しており、このような遺伝的相互作用から Rio2 と uS7 の相互作用が S223A 変異により損なわれている可能性が示唆された。このような表現型以上の実験結果で見られた us7 S223A 発現細胞における 40S サブユニットの成熟異常が Rio2 と uS7 の相互作用阻害によるものかどうかを検証するため、著者は Rio2 と uS7 の相互作用の解析を行った。ショ糖密度勾配遠心により分画したフラクションをウエスタンブロット法により解析したところ、全 Rio2 のうち 40S リボソームフラクションに占める割合は、野生型の 41%と比較して 28%まで下落した(**Figure 3-10A,B**)。更に直接の uS7 と Rio2 の直接的な相互作用を調べるために、TAP タグと融合した Rio2 を発現する細胞を用いてアフィニティ精製を試みた結果、野生型 uS7 は Rio2 との相互作用がみられ、us7 S223A 変異体では相互作用が顕著に低下した(**Figure 3-11**)。この結果は uS7 の C 末端領域と Nob1 やその他のリボソーム結合タンパク質が相互作用するとする報告と一致する(Neueder *et al.*, 2010)。従って、



**Figure 3-11 us7 S223A 変異による uS7 と Rio2 の物理的相互作用低下**

TAP タグを融合した Rio2 を発現する細胞に 2xHA-uS7 及び 2xHA-us7 S223A を発現させた。対数増殖期の酵母細胞を回収後破碎し、細胞抽出液中に含まれる TAP-Rio2 を IgG-Sepharose に結合させた。TAP-Rio2 と共に共沈降された uS7 をウエスタンブロット法により解析した。uS7 タンパク質は抗 HA 抗体を用いて検出した。Rio2 は TAP タグ中に含まれるカルモジュリン結合ペプチド配列を利用し、抗 CBP 抗体を用いて検出した。

uS7 の C 末端領域に存在する S223 は、リボソームが相互作用するタンパク質との相互作用においてその制御を司る部位であると考えられ、S223A 変異は 40S サブユニットの成熟に必要な Rio2 を 43S リボソームへの導入を阻害することで結果として 40S リボソームの成熟異常を引き起こしているものと考えられる。

## 【考察】

### Ypk1 によるリボソーム成熟制御

本章において著者は uS7 の Ypk1 によるリン酸化部位である S223 のアラニン変異体の発現により、40S リボソームサブユニットが減少すること、*YPK1* 欠損株においては 40S リボソームサブユニットと 60S リボソームサブユニットの両者が減少することを見出した。40S リボソームの成熟は未成熟型リボソームが 60S サブユニットと結合し、80S 様リボソームを形成することを発端とした機構により達成されることが報告されている(Strunk et al., 2012)。本章において uS7 とその Ser223 を介して結合することを明らかにした Rio2 はこの 80S 様リボソームに結合し、その後脱離することが 40S リボソームサブユニットの成熟に重要である。つまり、本章で得られた知見から、Ypk1 は Rio2 と未成熟型 40S リボソームとの結合を制御することによって 40S リボソームの成熟制御を行っているものと予想される。また、Ypk1 のリン酸化モチーフのコンセンサス配列解析から 60S リボソーム構成タンパク質 uL3 もリン酸化される可能性が示唆されている(Muir et al., 2014)。この可能性と著者が明らかにした知見から、Ypk1 は 40S リボソームサブユニットタンパク質と 60S リボソームサブユニットタンパク質のそれぞれをリン酸化し、それによって両者の正常な成熟を促進している可能性が考えられる(Figure 3-12)。

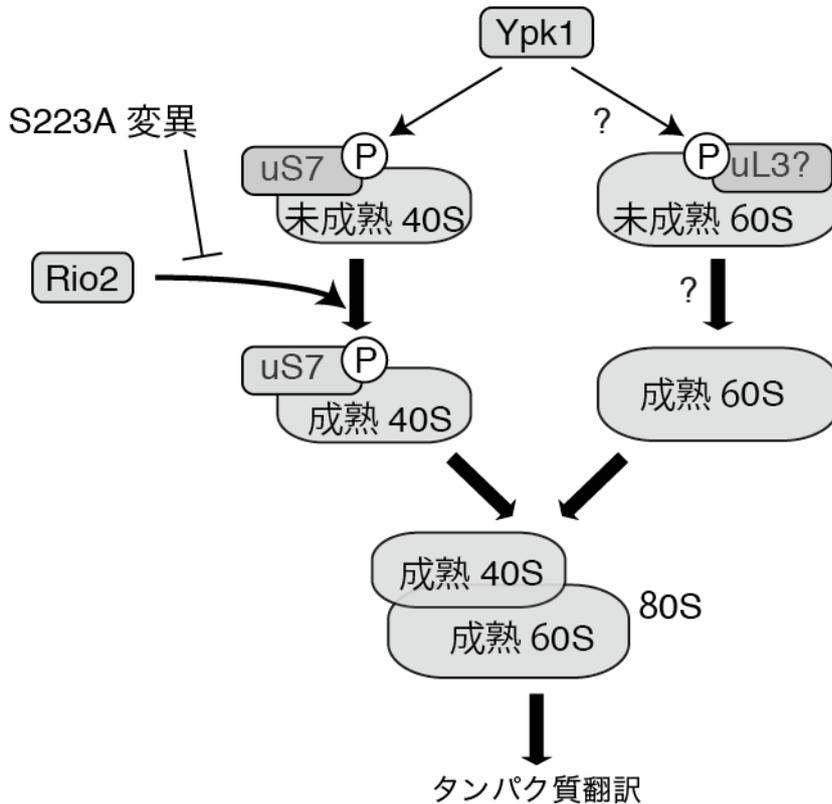


Figure 3-12 Ypk1 をマスター制御因子とするリボソーム成熟機構モデル

### リボソーム品質管理機構

著者は us7 S223A 変異により未成熟 18S rRNA が蓄積することを Fig. 3-5B において見出したが、その結果として 60S リボソームの量は変わらないものの未成熟型である 43S リボソームは蓄積せず、むしろ 40S リボソーム全体としては減少していた。この結果はリボソームの品質管理機構によりもたらされたと考えられる。しかしながら、リボソームの品質管理機構として現在までに報告されているものは翻訳途中で停止した機能不全リボソームに対して行われるものであり、60S リボソームのプロテアソーム系を介する分解である。つまり本論文でみられるような 43S リボソームの特異的な分解ではなく、そのような分解機構は未だ明らかではない。このことから本論文で示した us7 S223A 変異体の表現型は uS7 の機能の解明に繋がるのみならず、機能不十分な 40S リボソームを分解するメカニズムを明らかにするためのモデルとして有用であると考えられる。

上述したように 43S リボソームの分解に関しての報告がないとは言え、43S リボ

ソームサブユニットの成熟不全によって惹起されるその分解は現在報告されているリボソーム品質管理機構と共通項がないとは断定できない。著者はリボソーム品質管理機構において機能不全 60S リボソームに結合することが報告されている Rqc1 及び Rqc2/Tae2 に着目した。Rqc は 60S リボソームに結合して翻訳途中の新規ペプチド鎖と 60S リボソームのプロテアソーム系による分解に寄与することが報告されている (Brandman *et al.*, 2012)。結果は示していないが、著者は us7 S223A 変異体発現細胞において Rqc1 及び Rqc2 の発現量が熱ストレス非依存的に上昇していることを見出している。これらの発現量の上昇が 40S リボソームサブユニットの分解に寄与しているのかは未だ不明ではあるが、この知見が 40S リボソームサブユニット品質管理機構の解明の糸口となることが期待される。また Rqc2 はストレスセンサータンパク質である Hsf1 を活性化することも報告されている (Brandman *et al.*, 2012)。これを裏付けるように、予備的なデータではあるが、*rqc2Δ*株においては us7 S223A 変異体発現による熱ストレス耐性はみられないことを確認している(データ示さず)。以上の知見は第 2 章において得られた us7 S223A 変異体発現細胞における熱ショックタンパク質の発現上昇機構の解明にも繋がると思われる。

## 【実験材料及び方法】

### 酵母と培養条件

本章で用いた出芽酵母は **Table 0-1** に示す通りである。

**Table 0-1** 酵母細胞株

Strain	Genotype	Source / Reference
BY4741	<i>MATa his3-1 leu2-0 met15-0 ura3-0</i>	(Brachman <i>et al.</i> , 1998)
<i>ypk1Δ</i> (BY)	BY4741 <i>ypk1::HISMX6</i>	(Shimobayashi <i>et al.</i> , 2010)
<i>ypk2Δ</i>	BY4741 <i>ypk2::URA3</i>	This study
R1158	BY4741 <i>ura3-0::CMV-tTA</i>	Open biosystems
<i>ypk1Δ</i> (R1158)	R1158 <i>ypk1::HISMX6</i>	This study
<i>pTet-off-uS7</i>	R1158 <i>puS7::KanMX4-TetO7CYCTATApuS7</i>	Open biosystems
<i>HSP12-GFP</i>	BY4741 <i>HSP12::HSP12-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>HSP30-GFP</i>	BY4741 <i>HSP30::HSP30-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>SSA1-GFP</i>	BY4741 <i>SSA1::SSA1-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>SSA2-GFP</i>	BY4741 <i>SSA2::SSA2-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>SSA4-GFP</i>	BY4741 <i>SSA4::SSA4-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>HSC82-GFP</i>	BY4741 <i>HSC82::HSC82-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>HSP82-GFP</i>	BY4741 <i>HSP82::HSP82-GFP-HISMX6</i>	Invitrogen
<i>HA-uS7</i>	BY4741 <i>puS7::KanMX4-puS7-HA</i>	This study
<i>ypk1Δ/HA-uS7</i>	BY4741 <i>ypk1::HISMX6 puS7::KanMX4-puS7-HA</i>	This study
<i>ypk1Δ/pTet-off-uS7</i>	R1158 <i>puS7::KanMX4-TetO7CYCTATApuS7</i> <i>ypk1::HISMX6</i>	This study
<i>RIO2-TAP</i>	BY4741 <i>RIO2::RIO2-TAP-HISMX6</i>	Dharmacon

酵母の欠損変異体は PCR を用いた相同組換え法により作成した(Brachman *et al.*, 1998, Longtine *et al.*, 1998)。酵母の培養は、SD 液体培地 (0.67% Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% Dextrose)、SD Raffinose 液体培地 (0.67% Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% Raffinose)、SD Galactose 液体培地 (0.67% Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% Galactose)、SD 寒天培地 (SD 液体培地 + 2% Bacto-Agar)、YPD 液体培地(1% Bacto yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% Dextrose)、YPD 寒天培地 (YPD 液体培地 + 2% Bacto-Agar)を

用いた。出芽酵母の増殖は 600 nm の吸光度(OD<sub>600</sub>)を Biophotometer Plus (Eppendorf)を用いて測定した。全ての実験において、酵母は 30°C で一晚培養した後に OD<sub>600</sub>=0.2 となるように希釈し、本培養に用いた。熱ストレス実験においては、本培養後にウォーターバスインキュベータ中にて 39°Cで 1 時間振盪培養を行った。SD 寒天培地を用いた酵母の増殖の検討においては希釈後 30°C で 1 時間培養した後に 5 倍ずつ段階希釈を行い、1.5 µL の希釈液を寒天培地上にスポットした。この後、30°C、37°C、39°Cのインキュベータにて培養を行った。Tet-off システムを用いた実験においては、培地中に doxycycline を 10 µg/mL で添加した。カナマイシン耐性株は G418 を 200 µg/mL で添加して培養を行った。

## プラスミド

本章で用いたプラスミドは **Table 0-2** に示す通りである。

**Table 0-2** プラスミド

Plasmid name	Features	Reference
pRS413	<i>CEN; HIS3</i>	NEB
pRS413-uS7	<i>CEN; HIS3; uS7</i> ORF under own promoter	this study
pRS413-us7 S223A	<i>CEN; HIS3; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS413-2xHA-uS7	<i>CEN; HIS3; uS7</i> ORF fused to 2xHA tag	this study
pRS413-2xHA-us7 S223A	<i>CEN; HIS3; uS7</i> mutant ORF fused to 2xHA tag under own promoter	this study
pRS415	<i>CEN; LEU2</i>	NEB
pRS415-uS7	<i>CEN; LEU2; uS7</i> ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 S2A, T4A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 T21A, T27A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 S57A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 T73A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 T146A, T147A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 T189A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 S223A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 S223D	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study
pRS415-us7 S223E	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF under own promoter	this study

pRS415-2xHA-uS7	<i>CEN; LEU2; uS7</i> ORF fused to 2xHA tag under own promoter	this study
pRS415-2xHA-us7 S223A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF fused to 2xHA tag under own promoter	this study
pRS415-GFP-uS7	<i>CEN; LEU2; uS7</i> ORF fused to GFP tag under own promoter	this study
pRS415-GFP-us7 S223A	<i>CEN; LEU2; uS7</i> mutant ORF fused to GFP tag under own promoter	this study
pRS415-uS3-GFP	<i>CEN; LEU2; uS3</i> fused to the <i>GFP</i> under own promoter	this study
pRS415-uL23-GFP	<i>CEN; LEU2; uL23</i> fused to the <i>GFP</i> under own promoter	this study
pRS416	<i>CEN; URA3</i>	NEB
YEp351-YPK1	<i>2μ; LEU2; YPK1</i> ORF under own promoter	(Sun <i>et al.</i> , 2000)
YEp351-YPK1(KD)	<i>2μ; LEU2; ypk1<sup>K376A</sup></i> mutant ORF under own promoter	(Sun <i>et al.</i> , 2000)
YEp351-HA-YPK2	<i>2μ; LEU2; YPK2</i> ORF fused to 1xHA tag under own promoter	this study
YEp351-PKC1(CA)	<i>2μ; LEU2; constitutively-active PKC1</i> ORF under own promoter	(Inagaki <i>et al.</i> , 1999)
YEp351-RIO2-His6	<i>2μ; LEU2; RIO2</i> ORF fused to the His6 tag under <i>ADH1</i> promoter	this study
YEp351-rio2D253A-His6	<i>2μ; LEU2; RIO2</i> mutant ORF fused to the His6 tag under <i>ADH1</i> promoter	this study
YEp351-rio2N-loop-His6	<i>2μ; LEU2; RIO2</i> mutant ORF fused to the His6 tag under <i>ADH1</i> promoter	this study
YEp351-rio2D253A/N-loop-His6	<i>2μ; LEU2; RIO2</i> mutant ORF fused to the His6 tag under <i>ADH1</i> promoter	this study
pSRT209	<i>2μ; LEU2; Renilla</i> luciferase ORF, CrPV IRES and <i>Firefly</i> Luciferase under <i>PGK1</i> promoter	(Landry <i>et al.</i> , 2009)
pSRT210	<i>2μ; LEU2; Renilla</i> luciferase ORF, mutant CrPV IRES and <i>Firefly</i> Luciferase under <i>PGK1</i> promoter	(Landry <i>et al.</i> , 2009)
pWT4-LEU2	<i>2μ; LEU2; rDNA 25S-tag</i> and <i>18S-tag</i> under <i>GAL7</i> promoter	this study
pGEX4T-1-uS7	<i>E. coli</i> expression; Amp; <i>uS7</i> ORF fused to the GST	this study
pGEX4T-1-us7 S223A	<i>E. coli</i> expression; Amp; <i>uS7</i> mutant ORF fused to the GST	this study

pGEX4T-1-uS7 は pGEX4T-1 ベクターに PCR により増幅した酵母 *uS7* の ORF を組み込み作製した。

*uS7* 発現コンストラクトの作成は、酵母 *uS7* 遺伝子のプロモーター部位、翻訳領域、ポリアデニル(PA)付加部位をそれぞれ酵母ゲノム DNA を PCR により増幅して pRS415 ベクターに組み込むことで作製した。HA タグの 2 回縦列反復をもつ *uS7*

発現コンストラクトはオリゴヌクレオチドをアニーリングさせて得た 2xHA 断片を uS7 の翻訳領域の直前に導入して作製した。Ypk2 発現コンストラクトに関しても同様にして YEp351 ベクターに組み込み、直前に HA タグを導入して作製した。全ての変異型 us7 発現プラスミドは Clontech Laboratories 社の site-directed mutagenesis 法により点変異を導入することで作製した。

pWT4-LEU2 プラスミドは pWT4 プラスミドの rDNA 配列を *BamHI* 及び *Sall* により制限酵素消化した後 pYO325 ベクターに組み込む事で作製した(Fujii *et al.*, 2009)。

デュアルルシフェラーゼレポータープラスミドである pSRT209 及び pSRT210 は University of Alabama の Sunnie R. Thompson 助教授より提供していただいた(Landry *et al.*, 2009)。

## 抗体

Pgk1、HA、GFP に対するモノクローナル抗体はそれぞれ Invitrogen、COVANCE、Santa Cruz 社より購入した。HA、Pkc1 に対するポリクローナル抗体は Santa Cruz 社より購入した。Ypk1 に対するポリクローナル抗体は当研究室で作成されたものを用いた(Tanoue *et al.*, 2005)。eL19 に対するポリクローナル抗体は京都大学ウイルス研究所北畠助教よりご提供いただいた。Rio2 に対するポリクローナル抗体は Santa Cruz 社より購入した。CBP に対するポリクローナル抗体は MBL 社より購入した。HRP 標識 mouse IgG 及び HRP 標識 rabbit IgG は Zymed Laboratories 社より購入した。

## ウエスタンブロット法

通常のポリアクリルアミドゲル電気泳動には、回収した酵母を lysis buffer (50 mM Tris-HCl(pH7.6), 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 30 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail for general use (Nacalai Tesque), and 0.5% Triton X-100)に懸濁した。細胞懸濁液は microtube mixer で 10 分間 4°C でガラスビーズと共にボルテックスすることにより破碎し、破碎した細胞の残骸や破碎できなかった細胞を 10 分間の 500 xg での遠心により取り除いた。遠心後の上清は Bradford 法によりタンパク定量を行い、総タンパク質を 5  $\mu$ g

に揃え SDS-PAGE sample buffer 中で煮沸した後 SDS-PAGE により展開した。SDS-PAGE による展開後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗体を用いて検出した。抗体の検出には Chemilumi-One (Nacalai Tesque) 又は West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Pierce) を基質として用い、その発光を LAS-3000/4000 (Fujifilm) で検出した。

共免疫沈降においては、細胞抽出液を Protein G Sepharose 4B と共に 1 時間 4°C でインキュベートすることにより非特異に結合する夾雑物を取り除いた後、anti-Ypk1 又は anti-HA ポリクローナル抗体及び Protein G Sepharose 4B と混合しインキュベートすることにより行った。洗浄後の Beads を SDS-PAGE sample Buffer 中で煮沸し、上記の手法により解析した。

TAP タグを利用した相互作用解析においては、細胞抽出液を Sepharose 4B beads と共に 1 時間 4°C でインキュベートすることで非特異に結合する夾雑物を取り除いた後、IgG Sepharose と共にインキュベートすることで TAP タグ融合タンパク質とそれが結合するタンパク質を精製した。洗浄後の Beads を SDS sample Buffer 中で煮沸し、上記の手法により解析した。

### In vitro キナーゼアッセイ

基質として用いたリコンビナント GST-uS7、GST-us7 S223A は pGEX4T-1-uS7 又は pGEX4T-1-us7 S223A ベクターを保有する soluBL21 大腸菌株に発現させ、その細胞抽出液を glutathione Sepharose 4B を用いて精製した(Tanoue *et al.*, 2005)。Ypk1, Ypk1<sup>K376A</sup>, HA-Ypk2, Pkc1<sup>R398P</sup> はこれらを強制発現させた酵母を回収し、その細胞抽出液を Protein G Sepharose と anti-Ypk1、anti-HA、anti-Pkc1 抗体を用いた免疫沈降により得た。反応は上記キナーゼを kinase buffer (50 mM Tris-HCl(pH7.5), 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 μM ATP) 中にて、基質と [<sup>32</sup>P]-ATP(NEG-002Z, Perkin Elmer) と共に 30 分間 30°C で恒温振盪することで行った後、SDS-PAGE sample buffer の添加により終止させた。これを 5 分間煮沸した後に SDS-PAGE によりタンパク質を展開し、続いて CBB 染色、ゲルドライを行った。リン酸化されたタンパク質は BAS-2500 imaging system (Fujifilm) を用いたオートラジオグラフィにより検出した。

### フローサイトメトリー

細胞周期解析においては、対数増殖期の酵母細胞の培養液中に 10 µg/mL の濃度で alpha-mating factor を添加し、30°C で 3 時間培養することにより細胞周期を G<sub>1</sub> 期で停止させた後、酵母を alpha-mating factor を含まない培地で洗浄後再度培養することで細胞周期を再開させた。再開後の酵母を経時的に回収し、4°C で 70%エタノールで 1 晩処理することにより細胞を固定した。細胞中の RNA は 0.25 mg/mL RNase A により消化した。この後染色体 DNA を 50 µg/mL propidium Iodide で染色し、FACS Calibur(Becton Dickinson)により解析した。

### de novo 翻訳解析

<sup>35</sup>S 代謝標識においては、対数増殖期の酵母細胞(合計 OD<sub>600</sub>=3.0)をメチオニン及びシステインを含まない培地中で洗浄後、<sup>35</sup>S 標識されたメチオニン及びシステインを含む EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S protein labeling mix(Perkin Elmer)を含む SD 培地中で 30°C 振盪培養することにより行った。標識は SD 培地による洗浄を行うことで停止させた。

細胞の翻訳活性は翻訳に用いられた <sup>35</sup>S 量を定量することにより求めた。10 分間標識を行い、標識を停止させた後の細胞を lysis buffer (50mM Tris-HCl(pH7.6), 0.5mM EDTA, 150mM NaCl, 50mM sodium fluoride, 30mM β-glycerophosphate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail for general use (Nacalai Tesque) and 0.5% Triton X-100)に懸濁し、ガラスビーズにより細胞を破碎した。破碎した細胞の残骸や破碎できなかった細胞を 10 分間の 500 xg での遠心により取り除いた後、TCA 沈殿を行った。これを再懸濁したサンプルは Bradford 法によりそのタンパク質濃度を定量すると同時に Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (Perkin Elmer)を用いて <sup>35</sup>S 量を定量した。翻訳活性は単位タンパク量あたり放射活性 (dpm/µg)として表した。独立試行毎の結果を標準化する為、実験結果はコントロールとの比の平均値として表記した。

細胞内への <sup>35</sup>S 取り込み量の測定においては、合計 OD<sub>600</sub> = 0.03 の酵母細胞に直接シンチレーション液を添加し、Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (Perkin Elmer)を用いて定量した。

## 半定量 PCR(sqRT-PCR)

対数増殖期の酵母を回収後 400  $\mu$ L の AE Buffer(50 mM sodium acetate(pH=5.3)、10 mM EDTA)に懸濁後、500  $\mu$ L の AE Buffer 飽和フェノールと 50  $\mu$ L の 10% SDS を添加した。この混合液を 15 秒ごとにボルテックスにより混和を行いつつ 65°C で 5 分間インキュベートした。遠心により混合液を分離した後、水相に等量の PCI(Phenol: chloroform: isoamyl alcohol=25:24:1)を添加した。再度これを分離した後水相に 10 分の 1 量の 3 M sodium acetate と 2.5 倍量の ethanol を添加し、-20°C で 20 分間静置し、遠心することにより RNA 沈殿を得た。沈殿物を 80% ethanol で洗浄後、MilliQ 水を用いて溶解した。RNA 溶液中の DNA は DNase I を添加し 37°C で 30 分間インキュベートすることで消化し、DNase I はフェノール：クロロホルムにより除去した。RNA 濃度を定量後、RNA を Superscript II(M-MLV-RT, Invitrogen)を用いて逆転写することにより cDNA を得た。Table 0-3 に示すプライマーを用いてこれを鋳型として PCR を行うことにより半定量 PCR を行った。半定量 PCR が定量可能域にあることを示す為に総 RNA 量を 10 分の 1、または 10 倍とした PCR の泳動結果を併せて Figure 2-5C に示した。

Table 0-3 半定量 PCR に用いたプライマー

Name	Sequence	Note	Used in
HSP12-Fwd	5'-AAGGATTCGGTGAAAAAGCTTCTGA	<i>HSP12</i> ORF sequence	sqRT-PCR
HSP12-Rev	5'-TGGGTCTTCTTCACCGTGGACACGA	complementary to <i>HSP12</i> ORF	sqRT-PCR
HSP30-Fwd	5'-ATATGCCTTAGCTCCTGCATTTTTG	<i>HSP30</i> ORF sequence	sqRT-PCR
HSP30-Rev	5'-TACCCACGATTTGAATTAACAGCGA	complementary to <i>HSP30</i> ORF	sqRT-PCR
ACT1-Fwd	5'-AGGTTGCTGCTTTGGTTATTGATAA	<i>ACT1</i> ORF sequence	sqRT-PCR
ACT1-Rev	5'-AACAGGGTGTTCTTCTGGGGCAACT	complementary to <i>ACT1</i> ORF	sqRT-PCR

## デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイは Dual Luciferase assay kit

(Promega)を用いて Landry らの手法に基づいて行った(Landry *et al.*, 2009)。測定には回収した酵母を全量で 1 OD<sub>600</sub> とし、これを Dual Luciferase assay kit 添付の 1x Passive Lysis Buffer 中に懸濁、溶菌したものをを用いた。細胞中のルシフェラーゼは pSRT209 又は pSRT210 プラスミドベクターにより発現し、及び Spectramax L (Molecular Devices)を用いて測定した(Landry *et al.*, 2009)。ホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの発光は、同一のサンプルに各々の基質を加えた後にそれぞれ 560 nm、480 nm の波長を測定した。

### rRNA 解析

リアルタイム PCR を用いた rRNA 解析においては、酵母細胞を回収した後 MasterPure Yeast RNA Purification Kit(Epicentre Biotechnologies)を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA は SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit with ROX(Invitrogen)を用いて、**Table 0-4** 及び **Fig. 3-6** に示す oligo DNA を用いて 7500 Real-time PCR system(Applied Biosystems)により Standard curve 法により解析を行った。

ノーザンブロット法を用いた rRNA 解析においては、対数増殖期まで SD-Raffinose 培地で培養した後 SD-Galactose に培地を交換することで *GAL7* プロモーター依存的な 18S タグ及び 25S タグを保有する rRNA の転写を誘導し、経時的に細胞の回収を行った。MasterPure Yeast RNA Purification Kit を用いて RNA 抽出を行った後、400 µg total RNA/lane で MOPS/アガロースゲル電気泳動を行い、Hybond-N+膜に RNA を転写した。紫外光によりクロスリンクを行った後、<sup>32</sup>P 標識した **Table 0-4** に示す oligo DNA を 40°C で 1 晩ハイブリダイズさせた。Hybond-N+膜を Low Stringency Buffer(5x SSC, 0.1% SDS)、High Stringency Buffer(2x SSC, 0.1% SDS)、Ultra High Stringency Buffer(0.1x SSC, 0.1% SDS)の順で洗浄後、BAS-2500(Fujifilm)を用いてオートラジオグラフィにより検出した。シグナル強度は最大のシグナル強度を有するバンドを 100%として、プローブ毎に相対強度を数値化した。

**Table 0-4 rRNA 解析に用いた oligo DNA**

Name	Sequence	Note	Used in
kota125	5'-TACAGTAAACTGCGAATGGC	untagged 18S rRNA sequence	realtimePCR
kota152	5'-ATCTCTTCCAAAGGGTCGAG	complementary to untagged 18S rRNA	realtimePCR
kota030	5'-GAAATCTGGTACCTTCGGTG	untagged 25S rRNA sequence	realtimePCR
kota031	5'-GATTCTCACCTCTATGACG	complementary to untagged 25S rRNA	realtimePCR
MK923	5'-CAGAAATCTCTCACCGTTTGG	complementary to untagged <i>ITS-1</i>	realtimePCR
MK924	5'-GCTTTTACTGGGCAAGAAGAC	untagged <i>ITS-1</i> sequence	realtimePCR
MK253	5'-CACCGAAGGTACACTCGAGA GCTTC	complementary to pWT4 25S rRNA tag	Northen blotting
kota153	5'-CGAGGATTCAGGCTTTGG	complementary to pWT4 18S tag	Northen blotting

#### シヨ糖密度勾配遠心法によるリボソーム分画

対数増殖期の酵母細胞を約  $6 \times 10^9$  細胞回収後、TSM lysis Buffer(10 mM Tris-HCl pH7.4, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% ジエチルピロカルボネート)に懸濁してガラスビーズを用いて破碎した。破碎した細胞の残骸や破碎できなかった細胞を 10 分間の 500g での遠心により取り除いた後、RNA 濃度の定量を行った。総 RNA 量 900 µg の RNA 溶液を 10-40%の連続的シヨ糖密度勾配にアプライ後、SW4.1Ti ローターを用いて 4°Cにて 40,000 rpm の速度で 2 時間遠心した。遠心後のサンプルは Gradient Station Model 153(Biocomp Instrument, Inc.)を用いて A<sub>260</sub> を経時的に測定することで解析した。測定と同時に分画したサンプルは必要に応じウエスタンブロット法による解析を行った。会合したリボソームを各サブユニットに解離させる実験においては、TSM lysis Buffer 及びシヨ糖溶液中に終濃度 10 mM となるよう EDTA を添加して同様の解析を行った。

## 【結論】

本博士論文において著者が明らかにした主要な知見は以下に示す通りである。

1. 細胞増殖及びタンパク質翻訳を制御する出芽酵母プロテインキナーゼ Ypk1 のリン酸化基質の探索により、著者はリボソームタンパク質 uS7 が Ypk1 のリン酸化基質であることを見出した。さらに Ypk1 のみならず Pkc1 も uS7 の 223 番目のセリンを *in vitro* においてリン酸化することを明らかにした。
2. uS7 のリン酸化不全変異体発現細胞は、通常培養条件においてはタンパク質翻訳及び細胞増殖が遅延するが、熱ストレス条件においては熱ショックタンパク質の翻訳及び熱ストレス耐性が亢進する。
3. 著者は、uS7 のリン酸化不全変異はリボソームの成熟過程における鍵因子である Rio2 とリボソームとの相互作用を減弱することにより 18S rRNA の生合成遅延をもたらすことを明らかにした。

## 【略語表】

AGC kinase, protein kinase A/ protein kinase G/ protein kinase C

CrPV, cricket paralysis virus

Dox, Doxycycline

FL, firefly luciferase

HSE, heat shock element

IGR, intergenic region

IRES, internal ribosome entry site

ISP-1, immunosuppressant product-1

OD, optical density

P-body, processing body

PHS, phytosphingosine

RL, renilla luciferase

rDNA, ribosomal DNA

rRNA, Ribosomal ribonucleic acid

S6K, S6 kinase

TOR, target of rapamycin

TORC, TOR-complex

Ypk1, Yeast protein kinase

## 【謝辞】

本研究を進めるにあたり、非常に多くの方々に御世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

研究活動全般に渡り格別なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院医学研究科 竹松弘特任教授、岡昌吾教授、京都大学生命科学研究科 小堤保則名誉教授に甚大なる謝意を表します。先生達が示して下さった研究者の姿は私の今後の人生において目指すべき姿であると確信しています。研究室での経験を糧に、今後も研究者として人の役に立っていく所存です。

研究を進めるにあたって基本的な実験手法を始め、多くのご指導、ご助言を頂きました下林貢博士に心より感謝いたします。下林博士の研究に注ぐ情熱こそが私が博士課程への進学を決めた理由の一つです。

本研究の発端となった Ypk1 の基質スクリーニング解析を行い、データを示して下さった平本真介博士に多大な感謝を申し上げます。

リボソームの解析を行うにあたり快く実験器具を使用させて下さりその利用法をご教授して下さっただけでなく、様々なご助言をして下さった京都大学ウイルス研究所 北畠真助教に心より感謝申し上げます。先生の専門知識により本論文の完成度は飛躍的に上昇しました。本当にありがとうございました。

また、京都大学生命科学研究科の副指導教員制度により貴重なご教示を賜りました京都大学生命科学研究科 西田栄介教授、増田誠司准教授、土方誠准教授に感謝申し上げます。違った視点からの意見は本研究にとっても重要な助言となっただけではなく、先生方が真剣に著者の研究内容に耳を傾け、議論を交わして下さったことこそが研究を進める動機の一つとなりました。誠にありがとうございました。

研究指導委託元として多くの御支援をいただいた京都大学生命科学研究科 根岸学教授、そして秘書の根岸美保子氏に心より感謝いたします。

研究活動を側面から支えて下さった京都大学生命科学研究科システム機能学分野及び京都大学医学研究科人間健康科学専攻基礎検査展開学分野生化学教室の皆様

感謝いたします。気軽に研究についての相談に付き合ってくれた森瀬譲二助教や実験の補助をして下さった糸瀬邦之氏には非常に助けられました。秘書として様々な支援をして下さった有賀友美氏、若木章子氏、垣本温美氏に感謝申し上げます。

放射性同位体を用いた実験を行うにあたりご支援をいただいた京都大学薬学研究科病態機能分析学分野の藤野由佳氏、清水久美子氏、寺井早恵子氏、近藤直哉博士に感謝申し上げます。

研究活動費においては、日本学術振興会科学研究費からの御支援を頂戴しました。大変感謝しております。

最後になりましたが、博士課程に進学する機会を与えて下さり、ありとあらゆる場で私を暖かく見守り励ましてくれた両親、そして学術論文及び博士論文の執筆作業を励まし、日々支えてくれた妻郁子に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Makoto Tomioka, Mitsugu Shimobayashi, Makoto Kitabatake, Mutsuhito Ohno,  
Yasunori Kozutsumi, Shogo Oka & Hiromu Takematsu  
Ribosomal protein uS7/Rps5 serine-223 in protein kinase-mediated  
phosphorylation and ribosomal small subunit maturation  
Scientific Reports volume 8, Article number: 1244 (2018)

## 【引用文献】

Anderson P and Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. Trends Biochem Sci. Mar;33(3):141-50. doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003. (2008)

Brachmann C.B., et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast, 14(2):115-32 doi:14(2):115-32. 10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2 (1998)

Brandman O et al. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. Cell. 21;151(5):1042-54., doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044. (2012)

Breslow D. K. , Collins S. R. , Bodenmiller B., Aebersold R., Simons K., Shevchenko A., Ejsing C. S., Weissman J. S.. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. Nature. Feb 25;463(7284):1048-53. doi: 10.1038/nature08787. (2010)

Buchan J. R., Muhlrud D., Parker R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol. Nov 3;183(3):441-55. doi: 10.1083/jcb.200807043. (2008)

Buchan J. R., Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. Mol Cell. Dec 25;36(6):932-41. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.020. (2009)

Campbell, M. G. & Karbstein, K. Protein-protein interactions within late pre-40S ribosomes. PloS one 6, e16194, doi:10.1371/journal.pone.0016194 (2011)

Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J. & Alessi, D. R. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. Curr Biol 9, 186-197 (1999)

Chen, P., Lee, K. S. & Levin, D. E. A pair of putative protein kinase genes (YPK1 and YPK2) is required for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236, 443-447 (1993)

deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A. & Hicke, L. The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 156, 241-248 (2002)

Dickson R. C. Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J Lipid Res.* May;49(5):909-21. doi: 10.1194/jlr.R800003-JLR200. (2008)

Ferreira-Cerca, S. *et al.* ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit. *Nature structural & molecular biology* 19, 1316-1323, doi:10.1038/nsmb.2403 (2012)

Ferreira-Cerca, S., Poll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H. & Milkereit, P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell* 20, 263-275, doi:10.1016/j.molcel.2005.09.005 (2005)

Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T. & Ohno, M. A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* 15;23(8):963-74. doi: 10.1101/gad.1775609. (2009)

Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo)*. Feb;47(2):208-15 (1994)

Fukushi, S., Okada, M., Stahl, J., Kageyama, T., Hoshino, F. B., & Katayama, K. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* 276(24), 20824-6. (2001)

Galkin, O. et al. Roles of the negatively charged N-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein S5 revealed by characterization of a yeast strain containing human ribosomal protein S5. *Rna* 13, 2116-2128, doi:10.1261/rna.688207 (2007)

Geerlings, T. H., Faber, A. W., Bister, M. D., Vos, J. C. & Raue, H. A. Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 22537-22545, doi:10.1074/jbc.M300759200 (2003)

Gelperin, D., Horton, L., DeChant, A., Hensold, J. & Lemmon, S. K. Loss of *ypk1* function causes rapamycin sensitivity, inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-deficient yeast. *Genetics* 161, 1453-1464 (2002)

Gonzalez, A. et al. TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 10, e0120250, doi:10.1371/journal.pone.0120250 (2015)

Hoyle N. P., Castelli L. M., Campbell S. G., Holmes L. E., Ashe M. P. Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J Cell Biol.* Oct 8;179(1):65-74. (2007)

Inagaki, M. et al. PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 8344-8352 (1999)

Jacinto E., Lorberg A. TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J.* Feb 15;410(1):19-37. doi: 10.1042/BJ20071518. (2008)

Kamada Y., Fujioka Y., Suzuki N. N., Inagaki F., Wullschleger S., Loewith R., Hall M. N., Ohsumi Y.. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol.* Aug;25(16):7239-48. (2005)

Karbstein, K. Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends Cell Biol* 23, 242-250, doi:10.1016/j.tcb.2013.01.004 (2013)

Landry, D. M., Hertz, M. I., & Thompson, S. R. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs. *Genes & Development*, 2753-2764. (2009)

Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M. N. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell. Sep*;10(3):457-68. (2002)

Longtine, M.S., A. McKenzie, 3rd, D.J. Demarini, N.G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J.R. Pringle. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14:953-61. (1998)

Lumsden, T. *et al.* Yeast strains with N-terminally truncated ribosomal protein S5: implications for the evolution, structure and function of the Rps5/Rps7 proteins. *Nucleic Acids Res* 38, 1261-1272, doi:10.1093/nar/gkp1113 (2010).

Matragkou C., Papachristou H., Karetsoy Z., Papadopoulos G., Papamarcaki T., Vizirianakis I. S., Tsiftoglou A. S., Choli-Papadopoulou T. On the intracellular trafficking of mouse S5 ribosomal protein from cytoplasm to nucleoli. *J Mol Biol.* Oct 9;392(5):1192-204. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.049. (2009)

Muhs, M., Yamamoto, H., Ismer, J., Takaku, H., Nashimoto, M., Uchiumi, T., Nakashima, N. Structural basis for the binding of IRES RNAs to the head of the ribosomal 40S subunit. *Nucleic acids res.* 39(12), 5264-75. (2011)

Muir, A., Ramachandran, S., Roelants, F. M., Timmons, G. & Thorner, J. TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids. *eLife* 3, doi:10.7554/eLife.03779 (2014)

Neueder, A. *et al.* A local role for the small ribosomal subunit primary binder rpS5 in final 18S rRNA processing in yeast. *PloS one* 5, e10194, doi:10.1371/journal.pone.0010194 (2010).

Noda T., Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* Feb 13;273(7):3963-6. (1998)

Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S. & Thorner, J. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19222-19227, doi:1116948108 [pii] 10.1073/pnas.1116948108 (2011)

Rohde J., Heitman J., Cardenas M. E. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem.* Mar 30;276(13):9583-6. (2001)

Schmelzle T., Helliwell S. B., Hall M. N. Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol.* Mar;22(5):1329-39. (2002)

Shimobayashi, M., Takematsu, H., Eiho, K., Yamane, Y. & Kozutsumi, Y. Identification of Ypk1 as a novel selective substrate for nitrogen starvation-triggered proteolysis requiring autophagy system and endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery components. *J Biol Chem* 285, 36984-36994 (2010)

Strunk, B. S., Novak, M. N., Young, C. L. & Karbstein, K. A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* 150, 111-121, doi:10.1016/j.cell.2012.04.044 (2012)

Sun, Y. *et al.* Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Mol Cell Biol* 20, 4411-4419 (2000)

Tanoue, D. *et al.* The requirement for the hydrophobic motif phosphorylation of Ypk1 in yeast differs depending on the downstream events, including endocytosis, cell growth, and resistance to a sphingolipid biosynthesis inhibitor, ISP-1. *Arch Biochem Biophys* 437, 29-41 (2005)

Trapman J., Planta R. J. Maturation of ribosomes in yeast. I Kinetic analysis by labelling of high molecular weight rRNA species. *Biochim Biophys Acta* 442: 265–274. 29. (1976)

Turowski, T. W. *et al.* Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res* 42, 12189-12199, doi:10.1093/nar/gku878 (2014)

Udem SA, Warner JR The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J Biol Chem* 248: 1412–1416. (1973)

Visweswaraiah, J. & Hinnebusch, A. G. Interface between 40S exit channel protein uS7/Rps5 and eIF2alpha modulates start codon recognition in vivo. *eLife* 6, doi:10.7554/eLife.22572 (2017)

Visweswaraiah, J., Pittman, Y., Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. The beta-hairpin of 40S exit channel protein Rps5/uS7 promotes efficient and accurate translation initiation in vivo. *eLife* 4, e07939, doi:10.7554/eLife.07939 (2015)

Wang, X. *et al.* Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20, 4370–4379 (2001)

Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440 (1999).

Woolford, J. L., Jr. & Baserga, S. J. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643-681, doi:10.1534/genetics.113.153197 (2013)

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. Feb 10;124(3):471-84. (2006)

Xue, S. & Barna, M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 355-369, doi:10.1038/nrm3359 (2012)

Yerlikaya S., Meusburger M., Kumari R., Huber A., Anrather D., Costanzo M., Boone C., Ammerer G., Baranov P. V., Loewith R. TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. Jan 15;27(2):397-409. doi: 10.1091/mbc.E15-08-0594. (2016)

Zid, B. M. & O'Shea, E. K. Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature* 514, 117-121, doi:10.1038/nature13578 (2014)