

エンドサイトーシスを制御する新規アダプター分子
Aly2 の機能解析

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

平成 20 年度博士課程進学 畠山 理広

指導教官 豊島 近

目次

略語一覧	3
背景・目的	4
材料・方法	11
結果	20
考察	38
図	49
参考文献	94
謝辞	102

略語一覧

GPCR (G protein-coupled receptors)

TORC1 (target of rapamycin complex 1)

ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)

MVB (multivesicular body)

HECT (homologous to E6AP COOH terminus)

ART (arrestin-related trafficking adaptors)

GRK (G protein coupled receptor kinase)

RING (really interesting new gene)

SD (synthetic dextrose)

NS (nutrient supplement)

SC (synthetic complete)

YPD (yeast extract, peptone, dextrose)

PBS (phosphate-buffered saline)

TCA (trichloroacetic acid)

DSP (dithiobis[succinimidyl propionate])

背景・目的

本研究では酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の新規分子 Aly2 の機能解析を通し、エンドサイトーシス制御機構の解明を目指した。本項ではエンドサイトーシス制御について既存の知見をまとめた。

1. 環境応答とエンドサイトーシス

細胞膜は細胞と外界との境界であり、物質や情報のやり取りの場である。細胞が様々な外部環境に適応する上で、それらのやり取りを柔軟かつ厳密に自己制御することは重要である。

細胞膜に局在するタンパク質はトランスポーターやレセプターとして、それぞれ物質および情報のやり取りに主要な役割を果たす。従って細胞は環境に応じて細胞膜タンパク質を入れ替える（再編成する）ことで物質や情報のやり取りを制御する。

タンパク質を速やかに細胞膜から除去する手段として、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込む機構が知られる。例として栄養源のトランスポーターが、輸送基質が過剰に存在する環境では活発にエンドサイトーシスされ液胞で分解される (Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Risinger and Kaiser, 2008)。これは細胞内の栄養源プールの恒常性を保つための機構であると解釈されている。また、酵母においては接合フェロモンをリガンドとする GPCR (G protein-coupled receptors) がリガンド受容に伴ってエンドサイトーシスされ、その後液胞で分解されるかまたは細胞膜へとリサイクルされる (Jenness and Spatrick, 1986、Hicke and Riezman, 1996、Chen and Davis, 2002)。それによって接合フェロモンに対する細胞の応答性が調節される。

2. ストレスによるエンドサイトーシス誘導

細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスは輸送基質やリガンドのように当該トランスポーターやレセプターによって受容される刺激だけでなく、高温ストレス、薬剤ストレス、飢餓ストレスといった細胞にとっての様々なストレスによっても誘導される。これらのストレスによってエンドサイトーシスが誘導される機構は十分には理解されていないが、現時点で判明している事項を酵母の場合について記述する。

高温ストレスは、ウラシルトランスポーター Fur4 のエンドサイトーシスを引き起こす (Chung et al., 2000)。Fur4 のエンドサイトーシス誘導には Slm1 または Slm2 が必要である (Bultynck et al., 2006) が、これらのタンパク質が具体的にどのような機構でエンドサイトーシスに関わるのかは不明である。高温ストレスへの細胞の応答としてはフィトスフィンゴシンの蓄積、およびプロテインホスファターゼであるカルシニューリンの活性化が知られる (Chung et al., 2000、Dickson et al., 1997、Jenkins et al., 1997、Bultynck et

al., 2006)。Slm1/2 はフィトスフィンゴシン依存的にリン酸化される (Bultynck et al., 2006)。また Slm1/2 は *in vivo* および *in vitro* でカルシニューリンの基質である (Bultynck et al., 2006)。従って高温ストレスはフィトスフィンゴシンやカルシニューリンを介して Slm1/2 の機能に影響し、その結果としてエンドサイトーシスが誘導されると推測されている。

また細胞を薬剤シクロヘキシミドで処理すると様々なトランスポーターがエンドサイトーシスされる (Galan and Haguenauer Tsapis, 1997, Lin et al., 2008, Nikko and Pelham, 2009)。シクロヘキシミドは一般に翻訳阻害剤として知られるが、それがどのような機構でエンドサイトーシスを誘導するのかはわかっていない。

また細胞が窒素源飢餓にさらされると、アミノ酸トランスポーターのエンドサイトーシスが広汎に誘導される (Schmidt et al., 1998, Beck et al., 1999)。ただしいくつかのアミノ酸トランスポーター、特に基質特異性の低い汎用アミノ酸トランスポーター Gap1 に関しては逆に細胞膜上の量が増える (Schmidt et al., 1998, Beck et al., 1999)。このことの解釈としては、細胞は通常は基質特異性をもつトランスポーターによってアミノ酸間のバランスをとりながら取り込むが、深刻な飢餓状況下ではバランスを考慮せずに Gap1 で無差別に取り込んで窒素源として利用するということが考えられている。細胞の飢餓応答に中心的な役割を果たすのは TORC1 (target of rapamycin complex 1) 経路である。TORC1 は真核生物に保存されたキナーゼ複合体であり、栄養源、特に窒素源の欠乏によって不活性化される (Crespo and Hall, 2002, Wullschleger et al., 2006, Arsham and Neufeld, 2006)。窒素源が豊富な環境では TORC1 は Tap42-ホスファターゼ複合体と結合してその活性を抑制しているが、飢餓によって TORC1 が不活性化されると Tap42-ホスファターゼ複合体は TORC1 から解離して活性化し (Yan et al., 2006)、それによって下流のキナーゼ Npr1 が脱リン酸化され活性化される (Schmidt et al., 1998)。Npr1 を過剰発現させると TORC1 の活性が高くてもトランスポーターがエンドサイトーシスされることから、窒素源飢餓によるエンドサイトーシス誘導は Npr1 の活性化を介していると考えられている (Schmidt et al., 1998) が、Npr1 が具体的にどのような機構でエンドサイトーシスを誘導するのかは不明である。

3. エンドサイトーシスにおけるユビキチン化の役割

細胞膜タンパク質がエンドサイトーシスされるためには、ユビキチン化修飾を受けることで積み荷として認識される必要がある。従って基質やリガンド、ストレスによってエンドサイトーシスされる細胞膜タンパク質は、それらの刺激に応答して速やかにポリユビキチン化される (Dupre et al., 2004, Paiva et al., 2009, Risinger and Kaiser, 2008)。

ユビキチン化された細胞膜タンパク質は、エプシンなどユビキチン結合ドメインをもつタンパク質によって認識される (Lauwers et al., 2010)。エプシンはエンドソーム被覆タンパク質であるクラスリンやクラスリンアダプター複合体 AP-2 と結合し、それらをリクルートすることで積み荷タンパク質をエンドソームに積載する (Lauwers et al., 2010)。その後液胞へと輸送されるためには ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 複合体に認識されて MVB (multivesicular body) 内部へと取り込まれる必要があり、ここでもユビキチン化修飾が認識される (Katzmann et al., 2002)。

酵母では知られている限り全ての細胞膜タンパク質について、HECT (homologous to E6AP COOH terminus) 型の E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 が細胞膜タンパク質のユビキチン化を触媒する (Hicke and Dunn, 2003)。Rsp5 は PY モチーフ (PxY または PPxY) との結合サイトとして機能する WW ドメインを 3 つ持つ。しかし Rsp5 依存的にエンドサイトーシスされる細胞膜タンパク質の多くには PY モチーフがなく、Rsp5 とは直接結合できない。従って Rsp5 がはたらくためにはアダプタータンパク質の助けが必要である。

4. アレスチン様タンパク質ファミリー

最近になり、アレスチン様タンパク質ファミリーのタンパク質群が Rsp5 アダプターとして機能することが報告された (Lin et al., 2008, Nikko and Pelham, 2009, Nikko et al., 2008)。これらは別名 ART (arrestin-related trafficking adaptors) ファミリーとも呼ばれる。このファミリーは 10 個のタンパク質からなり、そのうち 5 つ (Ldb19/Art1, Ecm21/Art2, Rod1/Art4, Art5, Csr2/Art8) がこれまでに細胞膜局在トランスポーターのエンドサイトーシスに関わることが示されている (Lin et al., 2008, Nikko and Pelham, 2009, Nikko et al., 2008)。図 1A に示すように、これらのタンパク質は C 末端側の PY モチーフを介して Rsp5 と結合するとともに、N 末端側のアレスチンドメインを介して細胞膜タンパク質と結合することでアダプターとしてはたらくと考えられる。

残りの 5 つのうち Rim8/Art9 は細胞のアルカリストレス応答に必要な因子として知られる (Treton et al., 2000)。Rim8 は細胞膜に局在する推定アルカリセンサータンパク質および ESCRT 複合体の両者と結合する (Herrador et al., 2010) ことから、センサーのエンドサイトーシスを通してアルカリストレス応答に関わるという仮説が提唱されている。他の 4 つ (Aly2/Art3, Aly1/Art6, Rog3/Art7, Art10) は機能未知である。

アレスチンドメインは、先行して解析されていた哺乳類アレスチンとの相同性から命名された。哺乳類β-アレスチンは GPCR とリガンド依存的に結合し、E3 ユビキチンリガーゼ Mdm2 やクラスリン、AP-2 をリクルートしてエンドサイトーシスを促進する機能をもつ (図 1B, Lefkowitz et al., 2006)。哺乳類β-アレスチンのアレスチンドメインは結晶構造が決定

されており、図 2 に示すように 2 つの β -シートに富むサンドイッチ構造からなる (Han et al., 2001, Milano et al., 2002)。この 2 つのサンドイッチが GPCR のリン酸化された C 末端細胞内領域を挟み込むようにして結合する (図 2, Moore et al., 2007)。GPCR の C 末端細胞内領域はリガンド受容に伴って GRK (G protein coupled receptor kinase) によってリン酸化され、それによって選択的に β -アレシチンに認識される (図 2, Moore et al., 2007)。

哺乳類 β -アレシチンは PY モチーフを持たない点で酵母アレシチン様タンパク質とは構造的に異なっており、ユビキチンリガーゼとの結合機構も異なると考えられる。また β -アレシチンがリクルートする Mdm2 は Rsp5 の HECT 型とは構造や作用機序が異なる RING (really interesting new gene) 型のユビキチンリガーゼであり、GPCR の種類によってはユビキチン化せず (Shenoy et al., 2008)、むしろ β -アレシチン自身をユビキチン化することが Mdm2 の役割と考えられている (Shenoy et al., 2001)。さらに酵母ではトランスポーターの細胞内領域に PY モチーフを人為的に挿入するとアレシチン様タンパク質がなくてもエンドサイトーシスされる (Lin et al., 2008) ことから、細胞膜タンパク質と Rsp5 との結合を仲介することがエンドサイトーシス過程における酵母アレシチン様タンパク質の唯一の役割であり、哺乳類 β -アレシチンのようにクラスリンや AP-2 をリクルートするはたらかは無いと考えられている。このように酵母アレシチン様タンパク質の構造と機能はいくつかの点で哺乳類 β -アレシチンとは異なっており、 β -アレシチンの純粋なホモログは酵母には存在しない。

一方で哺乳類にもアレシチンドメインと PY モチーフをともに有するタンパク質群があり、 α -アレシチンと呼ばれる。しかしこれまで哺乳類 α -アレシチンとエンドサイトーシスとの関連は指摘されてこなかった。 α -アレシチンは β -アレシチンよりも真核生物間に広く保存されており、分子系統学的解析から α -アレシチンは β -アレシチンの進化的起源にあたりと考えられている (図 3, Alvarez, 2008)。

5. アレシチン様タンパク質と細胞膜タンパク質との結合

哺乳類 GPCR はリン酸化されることで β -アレシチンによって認識されることを上で述べたが、酵母においても細胞膜タンパク質のリン酸化がエンドサイトーシスに必要である例が複数知られている (Hicke et al., 1998, Nikko et al., 2008)。特にマンガントランスポーター Smf1 に関しては、N 末端細胞内領域に集中して存在するセリン・スレオニン残基を全てアラニンに置換するとアレシチン様タンパク質 Ecm21 との結合能が低下し、アスパラギン酸に置換してリン酸化状態を模すると逆に上昇することがわかっている (Nikko et al., 2008)。従って酵母アレシチン様タンパク質も、細胞膜タンパク質のリン酸化された細胞内領域を認識して結合すると考えられる。

アレスチン様タンパク質は共通して **Rsp5** と結合する一方で、細胞膜タンパク質との結合に関しては互いに異なる標的選択性をもち、多対多の対応関係にある (図 4、Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Nikko et al., 2008)。さらに同じ細胞膜タンパク質に関しても、エンドサイトーシスを引き起こす刺激の種類によって異なったアレスチン様タンパク質が機能するケースが知られている (図 4、Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009)。

このような標的選択性がどのように決定されるかは完全には理解されていない。しかしシクロヘキシミドで刺激した際に本来 **Ldb19** の働きでエンドサイトーシスされるアルギニントランスポーター **Can1** と、本来 **Ecm21** の働きでエンドサイトーシスされるリジントランスポーター **Lyp1** の N 末端細胞内領域を人為的に交換したキメラタンパク質を作製すると、働くアレスチン様タンパク質も交換されることがわかっている (Lin et al., 2008)。このことからアレスチン様タンパク質の標的選択性の決定要因の少なくとも一部は、それらが結合する N 末端細胞内領域の構造に内在すると考えられる。

6. 本研究の目的

現時点で判明しているアレスチン様タンパク質と標的細胞膜タンパク質との対応関係は限定的なものであり、標的選択性について包括的に理解するためにはより多くの対応関係を見出す必要がある。特に 10 個のアレスチン様タンパク質のうち 5 個についてはエンドサイトーシスに関与するかどうかさえ不明であり、これらのタンパク質の機能解析は重要であると考えられた。そこで本研究では、未解析のアレスチン様タンパク質のうち **Aly2** に注目して機能解析を行った。

アレスチン様タンパク質の標的選択性の問題に加えて、エンドサイトーシス制御に関しては次の 2 つの根本的問題が残されている。

まず細胞膜タンパク質が適切に再編成されるためには、除去すべきタンパク質は除去し残すべきタンパク質は残す、すなわちエンドサイトーシスの積み荷の選択性が確保される必要がある。そこで選別シグナルとなるのがユビキチン化修飾であるが、ではユビキチン化を受ける細胞膜タンパク質がどのように選択されるのか、その機構についてはわかっていない。

次に、そのユビキチン化が細胞の置かれた様々な状況に応答して制御される機構についても不明である。

筆者はアレスチン様タンパク質の標的選択性がユビキチン化の標的選択性の基盤となっているのではないかと考えた。また状況に応じて細胞膜タンパク質のユビキチン化が制御される際の制御点候補としても、アレスチン様タンパク質は魅力的であった。よって **Aly2** の機能解析を通して上記 2 つの問題に迫れる可能性があると考え、それも本研究の目的と

した。

材料・方法

1. 酵母菌株

使用した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株の一覧を表 1 に示した。TM141 由来株は当研究室のストック株を親株に、BY4741 由来株は酵母ノックアウトライブラリー (Open Biosystems) の株を親株にして作製した。RK835 株以外は Longtine et al. (1998) および Janke et al. (2004) に従って作製した。

RK835 株は以下の手順で作製した。pMK160 (pRS406-*ALY2*^{ΔC-PY}[1101-2835]、神谷昌男、平成 18 年度博士論文) を *SphI* で切断して RK592 株に形質転換し、ゲノムの {*ALY2*} 部分を {*aly2*^{ΔC-PY}[1-2835]-pRS406-*aly2*[1101-3141]} に組み替えた。次にこの株を 5-FOA 含有プレートにストリークすることにより、相同組換えを起こして {*ALY2*[1-3141]} または {*aly2*^{ΔC-PY}[1-3141]} となった株を選択した。それらの株のゲノムDNAからPCRで*ALY2* 部分を増幅し、*PstI* で切断されるもの ({*aly2*^{ΔC-PY}[1-3141]} であることを示す) を選択し、RK835 株とした。

表 1. 使用した株

株名	遺伝子型	入手元
TM141	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	Lab stock
BY4741	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i>	大阪大学 原島俊博士
RK349	TM141 <i>CAN1-EGFP::TRP1</i>	This study
RK356	TM141 <i>aly2::kanMX6 CAN1-EGFP::TRP1</i>	This study
RK724	TM141 <i>dip5::kanMX6 CAN1-EGFP::TRP1</i>	This study
RK807	TM141 <i>gap1::HIS3MX6</i>	This study
RK811	TM141 <i>gap1::HIS3MX6 dip5::kanMX6</i>	This study
RK809	TM141 <i>gap1::HIS3MX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK821	TM141 <i>gap1::HIS3MX6 DIP5-3HA::TRP1</i>	This study
RK592	TM141 <i>DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK599	TM141 <i>aly2::kanMX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK694	TM141 <i>sla1::hphNT1 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK703	TM141 <i>end3::hphNT1 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK637	TM141 <i>DIP5-3HA::TRP1</i>	This study
RK789	TM141 <i>aly2::kanMX6 DIP5-3HA::TRP1</i>	This study

RK899	TM141 <i>kanMX4::PGPD-ALY2-13myc::HIS3MX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK733	TM141 <i>ALY2-13myc::HIS3MX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK913	TM141 <i>aly2::HIS3MX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK598	TM141 <i>aly1::HIS3MX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK601	TM141 <i>aly2::kanMX6 aly1::HIS3MX6 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK842	BY4741 <i>DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK872	BY4741 <i>aly2::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK697	BY4741 <i>sla1::hphNT1 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK706	BY4741 <i>end3::hphNT1 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK762	BY4741 <i>ldb19::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK752	BY4741 <i>ecm21::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK756	BY4741 <i>rod1::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK764	BY4741 <i>art5::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK754	BY4741 <i>csr2::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK760	BY4741 <i>rim8::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK758	BY4741 <i>rog3::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK986	BY4741 <i>art10::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK595	TM141 <i>rsp5-1 DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
RK639	TM141 <i>rsp5-1 DIP5-3HA::TRP1</i>	This study
RK789	TM141 <i>aly2::kanMX6 DIP5-3HA::TRP1</i>	This study
RK835	TM141 <i>aly2^{A-C-PY} DIP5-EGFP::TRP1</i>	This study
MK350	TM141 <i>ALY2-13myc::HIS3MX6</i>	神谷昌男 平成 18 年度博士論文
RK768	TM141 <i>rsp5-1 ALY2-13myc::HIS3 MX6</i>	This study
RK633	TM141 <i>ALY2-13myc::HIS3MX6 DIP5-3HA::TRP1</i>	This study
RK722	TM141 <i>dip5::kanMX6</i>	This study
RK607	BY4741 <i>npr1::kanMX4 DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
RK275	BY4741 <i>npr1::kanMX4</i>	This study
RK878	BY4741 <i>npr1::kanMX4 ALY2-9myc DIP5-EGFP::HIS3MX6</i>	This study
MK191	TM141 <i>aly2::kanMX6</i>	神谷昌男 平成 18 年度博士論文
RK876	TM141 <i>aly2::HIS3MX6 dip5::kanMX6</i>	This study

2. プラスミド

使用したプラスミドの一覧を表 2 に示した。

表 2. 使用したプラスミド

プラスミド名	内容	初出
pRS413	<i>CEN HIS3</i>	Sikorski et al., 1989
pRS415	<i>CEN LEU2</i>	Sikorski et al., 1989
pRS416	<i>CEN URA3</i>	Sikorski et al., 1989
pRK145	<i>CEN URA3 TRP1</i>	This study
pMK131	<i>CEN TRP1 P_{ADH}-GST-ALY2</i>	神谷昌男 平成 18 年度博士論文
pMK139	<i>CEN TRP1 P_{ADH}-GST-ALY2^{ΔC-PY}</i>	神谷昌男 平成 18 年度博士論文
pHY22	<i>2 μm URA3 P_{GPD}-myc-RSP5</i>	Yashiroda et al., 1998
pRK219	<i>CEN URA3 P_{GPD}-DIP5-EGFP</i>	This study
pRK220	<i>CEN URA3 P_{GPD}-DIP5(6S2T-A)-EGFP</i>	This study
pRK221	<i>CEN URA3 P_{GPD}-DIP5(6S2T-D)-EGFP</i>	This study

pRK219~221 の作製手順を以下に示す。プラスミド作製に用いたプライマーの配列一覧を表 3 に示した。

1) pRK219

DIP5-EGFP を gap-repair 法によって pRS416 ベクターにクローニングした後、pRS416GPD ベクター (Mumberg et al., 1995) に組み込むことによって作製した。

まず *DIP5-EGFP* の両端と相同な配列を持つ DNA 断片を得るために、RK592 株のゲノム DNA を鋳型として oRK44 と oRK23, oRK24 と oRK25 のペアをプライマーとして PCR を行い、得られた断片をそれぞれフラグメント A、フラグメント B とした。次に pRS416 から *XbaI* サイトを除去するために *XbaI* と *SacII* で切断し、平滑末端化してセルフライゲーションさせ、pRK161 (pRS416XS) とした。フラグメント A の *ClaI*-*XbaI* 断片、フラグメント B の *EcoRI*-*XbaI* 断片、および pRK161 の *ClaI*-*EcoRI* 断片とで 3 ピースライゲーションを行い、pRK162 (*DIP5-EGFP* gap-repair 用プラスミド) とした。pRK162 を *XbaI* で切断して RK592 株に形質転換した後、プラスミドを回収して pRK169 (pRS416XS-*DIP5-EGFP*) とした。pRK169 の 2.5 kb *ClaI*-*EcoRI* 断片を平滑末端化し、*SmaI* で切断した pRS416GPD とライゲーションして pRK219 とした。

2) pRK220

pRK219 を鋳型とし、overlap-extension 法を利用した 2 段階 PCR によって 6S2T-A 変異

をもつ *DIP5* の N 末端周辺のフラグメントを作製した後、その変異部分周辺を pRK219 と入れ替えることによって作製した。

まず pRK219 を鋳型として oT84 (GPD プロモーター上のプライマー) と oRK61 (6S2T-A 変異を含む *DIP5* N 末端領域のプライマー)、oRK62 (6S2T-A 変異を含む *DIP5* N 末端領域のプライマー) と oRK65 (*DIP5* 内部プライマー) のペアをプライマーとして PCR を行い、得られた断片をそれぞれフラグメント C、フラグメント D とした。次にフラグメント C、フラグメント D を鋳型として oT84、oRK65 をプライマーとして PCR を行い、得られた断片をフラグメント E (6S2T-A 変異をもつ *DIP5* の N 末端周辺のフラグメント) とした。フラグメント E の 0.5 kb *Bam*HI 断片と pRK219 の 8 kb *Bam*HI 断片とをライゲーションして pRK220 とした。

3) pRK221

pRK220 と同様に作製した。ただし oRK61 に替えて oRK63、oRK62 に替えて oRK64 を用いた。

表 3. プラスミド構築に用いたプライマー

プライマー名	配列
oRK44	AATATCGATATGAAGATGCCTCTAAAGAA
oRK23	AATTCTAGATTCTTCCAGGTCAATGTTAT
oRK24	AATTCTAGAGACGGCCCCGTGCTGCTGCC
oRK25	AATGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCA
oT84	TCTTAAATTCTACTTTTATA
oRK61	GGCGGCGGCGTTACGAGGGGCGGCCGCGCAAACATCTTCTTTAGAGGCA
oRK62	GCCCCTCGTAACGCCGCCGCCCTTGACGCCGATCATGACGCTTACTATTC
oRK65	TTGGTTGGGAGGTAAGATGA
oRK63	GTCGTCGTCGTTACGAGGGTCGTCGACGTCAAACATCTTCTTTAGAGGCA
oRK64	GACCCTCGTAACGACGACGACCTTGACGACGATCATGACGCTTACTATTC

3. 培養条件

特に断りがない場合、酵母は液体培地の場合は 30℃で振とう培養、プレート培養の場合は 30℃で静置培養した。以下で「対数増殖期の細胞」とは、一晚液体培地で前培養した後、同じ液体培地で OD₆₀₀=0.2 に希釈し、そこから OD₆₀₀=0.8~1.2 程度まで培養した細胞を指すものとする。

使用した液体培地の組成一覧を表 4 に示した。プレート培地ではさらに 2%の寒天（伊那

食品工業)を加えて固めた。

特に断りがない場合、SD 培地は株の栄養要求性を補うための成分を NS (nutrient supplement、Ausubel et al., 1998, vol. 3) と同じ濃度で添加して使用した。例として *ura3 leu2 his3* の株の場合、表 2 の SD 培地の組成に 20 µg/ml ウラシル、60 µg/ml ロイシンおよび 20 µg/ml ヒスチジン (いずれも終濃度) を添加して使用した。

表 4. 培地組成

培地名	組成
SD	0.17% yeast nitrogen base、0.5% ammonium sulfate、2% glucose
SC	SD に nutrient supplement を加えたもの
アスパラギン酸培地	SD の ammonium sulfate に替えて 50 µg/ml aspartic acid
グルタミン酸培地	SD の ammonium sulfate に替えて 50 µg/ml glutamic acid
尿素培地	SD の ammonium sulfate に替えて 0.2% urea
YPD	1% yeast extract、2% peptone、2% glucose

nutrient supplement の組成 (終濃度): 40 µg/ml adenine、20 µg/ml arginine、100 µg/ml aspartic acid、100 µg/ml glutamic acid、20 µg/ml histidine、60 µg/ml leucine、30 µg/ml lysine、20 µg/ml methionine、50 µg/ml phenylalanine、375 µg/ml serine、200 µg/ml threonine、40 µg/ml tryptophan、30 µg/ml tyrosine、150 µg/ml valine、20 µg/ml uracil

4. 蛍光顕微鏡

EGFP 融合タンパク質の局在観察では、対数増殖期の細胞 (3 ml スケール) に各種刺激を加えた後、100 µl を遠心 (13,000×g、室温、3 分間) して 90 µl の培地を除去することにより濃縮した。細胞を蛍光顕微鏡 BX51 (オリンパス) で観察し、EGFP 蛍光シグナルを U-MNIBA2 フィルター (オリンパス) を用いて検出した。

図 10 の免疫染色法による観察では、対数増殖期の細胞 (4 ml スケール) に各種刺激を加えた後、628 µl のホルムアルデヒドを加え、室温で 30 分間静置することにより細胞を固定した。遠心 (1,600×g、室温、2 分間) で細胞を回収し、500 µl の PBS バッファーで 3 回、500 µl の PS バッファー (1.2 M sorbitol を含む PBS バッファー) で 1 回洗浄した (各回 2,000×g、室温、2 分間の遠心でバッファーを除去)。細胞を 500 µl の PSZM バッファー (100 µg/ml zymolyase 100T と 30 mM β-mercaptoethanol を含む PS バッファー) 中で 37°C で 30 分間静置して細胞壁を溶解させた後、500 µl の PST バッファー (1% TritonX-100 を含む PS バッファー) で 1 回、500 µl の PS バッファーで 3 回洗浄し (各回 300×g、室温、10 分間の遠心でバッファーを除去)、200 µl の PBS バッファーに懸濁した。懸濁液を

PBS バッファーで適宜希釈して 12 μ l をスライドガラス上に滴下し、室温で 5 分間静置して細胞を沈着させた後、バッファーを吸引除去した。細胞を 12 μ l の PBS バッファーで 2 回洗浄し（各回吸引でバッファーを除去）、12 μ l の 1% BSA を用いて室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング液を吸引除去した後、12 μ l の 1/8,000 希釈抗 HA 抗体（12CA5、マウス腹水）を用いて室温 60 分間一次抗体処理を行った。一次抗体液を除去して 12 μ l の PBS バッファーで 3 回洗浄した（各回吸引でバッファーを除去）後、12 μ l の 1/8,000 希釈 Alexa Fluor 488 結合抗マウス IgG（Molecular Probes）を用いて室温 60 分間二次抗体処理を行った。二次抗体液を吸引除去して 12 μ l の PBS バッファーで 3 回洗浄した（各回吸引でバッファーを除去）後、バッファーを吸引除去し、3 μ l の mounting medium（1 mg/ml p-phenylenediamine、90% glycerol、10% PBS）とカバーガラスをのせた。細胞を蛍光顕微鏡 BX51（オリンパス）で観察し、Alexa Fluor 蛍光シグナルを U-MNIBA2 フィルターを用いて検出した。

図 31 の経時観察では、対数増殖期の細胞培養液 500 μ l をポリリジンでコートしたガラスボトムディッシュに滴下し、室温で 5 分間静置して細胞をディッシュに吸着させた。培地を吸引除去した後 500 μ l の同じ培地で洗浄し、再度吸引除去して 2 ml の同じ培地を滴下した。本学農学生命科学研究科応用生命化学専攻・舘川宏之准教授の協力で蛍光顕微鏡 Axiovert S100 (Zeiss) を用いて単一の細胞を経時的に観察し、EGFP 蛍光シグナルを FITC フィルターを用いて検出した。

5. 細胞抽出液の調製

対数増殖期の細胞（3 ml スケール）に各種刺激を加えた後、255 μ l の氷冷した TCA を加えて氷上で 30 分間静置し、遠心（1,600 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分間）で細胞を回収して 1 ml の氷冷 70%エタノールで洗浄した。遠心（13,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、1 分間）で 70%エタノールを除去した後、得られたペレットを 100 μ l の urea バッファー（50 mM Tris-HCl[pH 8.0]、5 mM EDTA、6 M urea、1% SDS、50 mM NaF、10 mM β -glycerophosphate、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride）に懸濁し、等量のガラスビーズを加えて室温で 6 分間ボルテックスすることにより細胞を破碎した。得られた細胞抽出液を遠心（13,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間）して沈殿物を除去した後、DC プロテインアッセイ（Bio-Rad）により総タンパク質濃度を測定し、urea バッファーで適宜希釈してサンプル間で濃度を揃えた。

6. SDS-PAGEとウェスタンブロッティング

細胞抽出液に Laemmli SDS バッファーを加えて 37 $^{\circ}$ C で 30 分加温した後、SDS-PAGE に供した。図 33 のパネル一段目では、Phos-tag AAL-107（NARD institute, ltd.）をマニ

ユアルに従い終濃度 10 μ M でゲルに加えて泳動した。

ウェスタンブロッティングは室温で 30 分間ブロッキング処理（ブロッキング溶液は各一次抗体の希釈溶液と同じ）を行った後、室温で 60 分間または 4℃で一晩一次抗体処理を行い、二次抗体処理は室温で 60 分間行った。用いた抗体と使用条件を表 5 に示した。抗 PGK 抗体はローディングコントロールのために用いた。抗ユビキチン化抗体による検出では Swerdlow et al. (1986)を参考に、ブロッキング前にメンブレンを加熱処理（85℃の湯せん）で 30 分間）した。

シグナルの検出には ECL Plus (GE healthcare) を用いた。

表 5. ウェスタンブロッティングに用いた抗体

一次抗体名	詳細（入手元）	希釈度	希釈溶液
抗 GFP	7.1 and 13.1 (Roche)	1/2000	1% skimmilk/PBST
抗 PGK	22C5 (Molecular Probes)	1/8000	1% skimmilk/PBST
抗 HA	12CA5 腹水（（財）癌研究会癌研究所・星川裕博士）	1/4000	1% skimmilk/PBST
抗ユビキチン	P4D1 (Cell Signaling)	1/1000	5% BSA/PBST
抗 GST	Z-5 (Santa Cruz)	1/4000	1% skimmilk/PBST
抗 myc	9E10 腹水（（財）癌研究会癌研究所・星川裕博士）	1/4000	1% skimmilk/PBST
抗 Clb2	sc-9071 (Santa Cruz)	1/4000	1% skimmilk/PBST
二次抗体名	詳細（入手元）	希釈度	希釈溶液
抗マウス IgG	NA931 (GE healthcare)	1/8000	1% skimmilk/PBST
抗ラビット IgG	NA934 (GE healthcare)	1/8000	1% skimmilk/PBST

7. 免疫沈降

対数増殖期の細胞（10~50 ml スケール、以下 50 ml スケールの場合）から 5.と同様に細胞抽出液を調製した。ただし各処理は適切なスケールで行い、1.5 ml の urea バッファーに溶解させた。細胞抽出液のタンパク質濃度を揃えた後、一部に Laemmli SDS バッファーを加えて 37℃で 30 分加温し、Lysate サンプルとした。免疫沈降サンプルは細胞抽出液 1.2 ml を 10.8 ml の氷冷した免疫沈降用希釈バッファー（50 mM Tris-HCl[pH 8.0]、5 mM EDTA、1% TritonX-100、150 mM NaCl、50 mM NaF、10 mM β -glycerophosphate、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、40 μ g/ml leupeptin、40 μ g/ml aprotinin、20 μ g/ml pepstatin A）で希釈し、40 μ l の抗 myc アガロースビーズ A7470 (Sigma)、または 10 μ l の抗 HA 抗体 Y-11 (Santa Cruz) と 40 μ l の protein A セファロースビーズ (GE healthcare) を加えて 4℃で一晩回転混和させた。1,600 \times g、4℃で 5 分間遠心してビーズを回収し、1 ml

の氷冷した免疫沈降用希釈バッファーで 3 回洗浄した（各回 $13,000\times g$ 、 4°C 、3 秒間遠心でバッファーを除去）後、Laemmli SDS バッファーを加えて 37°C で 30 分加温した。

8. DSP 架橋

図 20 の実験では、対数増殖期の細胞（50 ml スケール）を遠心（ $1,600\times g$ 、室温、3 分間）で回収して 10 ml の PBS バッファーで洗浄し、遠心（ $1,600\times g$ 、室温、3 分間）でバッファーを除去し、5 ml の PBS バッファーに再懸濁した。アスパラギン酸刺激の後、500 μl の 25 mM DSP (dithiobis[succinimidyl propionate]) を加え、室温で 30 分間静置して架橋処理を行った。100 μl の 1 M Tris-HCl(pH 8.0)を加えて室温で 15 分間静置してクエンチングを行った後、5.と同様に細胞抽出液を調製し、7.と同様に免疫沈降を行った。SDS-PAGE に際しては架橋を完全に外すために、まず 2 倍濃度の Laemmli SDS バッファーを加えて 37°C で 30 分加温した後、等量の 100 mM DTT を加えてさらに 37°C で 30 分加温した。

9. *in vitro* ホスファターゼ処理

7.と同様に免疫沈降を行った後、ビーズを免疫沈降用希釈バッファーで 3 回、50 mM HEPES(pH 7.5) で 3 回洗浄した（各回 $13,000\times g$ 、 4°C 、3 秒間遠心でバッファーを除去）。ビーズを 30 μl の λ -ホスファターゼバッファー（New England Biolabs）に懸濁し、0.5 μl （200 U 相当）の λ -ホスファターゼ（New England Biolabs）を加え、 30°C で 30 分間反応させた後、Laemmli SDS バッファーを加えて 37°C で 30 分加温した。

10. 出芽率の計測

対数増殖期の細胞培養液 270 μl に 30 μl のホルムアルデヒドを加えて固定し、顕微鏡下で 100 個以上の細胞のうち出芽しているものの数を計測した。

結果

1. Aly2 の標的の探索

はじめに Aly2 が他のアレスチン様タンパク質と同様に細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスに関与するかどうか、もしそうであればどの細胞膜タンパク質を標的とするかを調べた。

当研究室での先行研究により *aly2Δ* 株はカナバニン耐性を示すことがわかっていた (神谷昌男、平成 18 年度博士論文)。カナバニンはアルギニンのアナログ化合物であり、アルギニントランスポーター Can1 によって細胞内に取り込まれると毒性を示す。よってカナバニン耐性を示す *aly2Δ* 株では Can1 の活性が低い、または細胞膜に局在する Can1 の量が少ない可能性が考えられた。

そこで Can1 の C 末端に EGFP を融合した株を作製し、野生株と *aly2Δ* 株とで Can1 の局在を比較した。その結果、通常の SD 培地では両株間で明確な差は見られなかった (図 5)。しかし様々な条件で観察したところ、細胞を nutrient supplement (以下 NS、SC 培地に添加する核酸およびアミノ酸の混合物) で刺激すると局在に差が出ることがわかった。野生株では NS 刺激によって Can1 の大部分がエンドサイトーシスされ液胞へと運ばれたが、一部は細胞膜に残った (図 5)。それに対して *aly2Δ* 株では Can1 はほぼ完全に液胞へと運ばれ、細胞膜上にはほとんど残らなかった (図 5)。

NS には Can1 の輸送基質であるアルギニンが含まれており、それが Can1 のエンドサイトーシスの原因となっている可能性が考えられた。そこで細胞をアルギニン単独で刺激したところ、わずかに Can1 のエンドサイトーシスが起こったが、野生株と *aly2Δ* 株とで程度に差は見られなかった (図 5)。一方 NS からアルギニンを除いたもの (NS w/o Arg) で刺激したところ、NS 刺激の場合と同様に *aly2Δ* 株でより顕著に Can1 のエンドサイトーシスが観察された (図 5) ことから、NS 刺激による両株間の差異の原因となるのはアルギニン以外の成分であることがわかった。

次に NS w/o Arg の各成分を分離し、それぞれ NS 中の濃度で単独刺激したところ、アスパラギン酸またはグルタミン酸で刺激した場合のみ、両株間で差異が見られた。野生株ではこれらの刺激によって Can1 のエンドサイトーシスはわずかにしか起こらなかったが、*aly2Δ* 株では顕著に起こった (図 6A、グルタミン酸刺激のデータは示していない)。アスパラギン酸やグルタミン酸はトランスポーター Dip5 によって細胞内に取り込まれることが知られている (Regenberg et al., 1998, Regenberg et al., 1999)。そこで *dip5Δ* 株を NS w/o Arg で刺激したところ、Can1 のエンドサイトーシスが野生株ほど顕著には起こらなかった (図 6B)。よって NS w/o Arg 刺激により起こる Can1 エンドサイトーシスの少なくとも一部分は、Dip5 によって取り込まれたアスパラギン酸やグルタミン酸によって間接的に引き起こされたものであり、その過程で野生株と *aly2Δ* 株とに差異が出ることがわかった。

そこで「アスパラギン酸やグルタミン酸刺激に対する Can1 の応答が *aly2Δ*株で野生株よりも顕著に起こるのは、*aly2Δ*株では細胞膜上の Dip5 の量が多く、取り込まれるアスパラギン酸やグルタミン酸の量が多いからである」という仮説をたて、それを検証するために *aly2Δ*株での Dip5 の局在を観察することとした。

2. Dip5 のエンドサイトーシスへの Aly2 の関与

Dip5 についてはアスパラギン酸やグルタミン酸を輸送基質とすることが知られているのみで、これまで局在制御に関する知見はない。そこで Dip5 の C 末端に EGFP を融合した株を新規に作製した。まずこの融合タンパク質が機能的であることを確認する目的で、アスパラギン酸またはグルタミン酸を唯一の窒素源とした培地プレートでの生育を調べた。*dip5Δ*株はこれらの培地では窒素源の欠乏により生育が悪いが、*DIP5-EGFP*株は野生株と同様の良好な生育を示した（図 7、この実験ではアスパラギン酸やグルタミン酸が汎用アミノ酸トランスポーター Gap1 によって Dip5 非依存的に取り込まれるのを防ぐため、*GAP1* 遺伝子を破壊した株を用いた）。よって Dip5-EGFP は正常にアスパラギン酸やグルタミン酸を取り込めることがわかった。

SD 培地で Dip5-EGFP の局在を観察したところ、野生株では細胞膜だけでなく液胞にも蛍光が見られた（図 8、0'）。よって Dip5 はアスパラギン酸やグルタミン酸を含まない通常の培養条件下でも、一部が液胞へと運ばれていることがわかった。次に細胞をアスパラギン酸またはグルタミン酸で刺激したところ、Dip5 はまず細胞内のドット上の構造へと局在を変え（図 8、15'、矢印）、そののちほぼ完全に液胞へと輸送された（図 8、30'）。

トランスポーターが液胞へと輸送される経路としてはゴルジ体から直接輸送されるケースも知られており（Risinger and Kaiser, 2008）、ここで見られた Dip5 の液胞輸送がエンドサイトーシスを介しているとは限らない。そこでそれを確かめるために、既知のエンドサイトーシス欠損株で液胞輸送が見られるかを調べることにした。エンドサイトーシスにはアクチン細胞骨格の関与が必要であり、アクチン細胞骨格とクラスリンとをつなぐアダプターとして機能する Sla1 や End3 の遺伝子破壊株ではエンドサイトーシスが正常に起こらない（Warren et al., 2002、Tang et al., 2000、Tang et al., 1997）。*sla1Δ*株や *end3Δ*株での Dip5 の局在を観察したところ、通常条件下で細胞膜上に顕著に局在し、またアスパラギン酸やグルタミン酸で刺激しても大部分は液胞へ輸送されず、細胞膜上に残っていた（図 8）。このことから通常条件下および刺激後のいずれにおける Dip5 の液胞輸送も細胞膜からのエンドサイトーシスを経たものであると考えられた。また野生株で見られたドット状の局在はエンドソームであると考えられた。

次に *aly2Δ*株での Dip5 の局在を観察したところ、野生株と比べて、通常条件下での細胞

膜局在が顕著であった（図 8、0'）。またアスパラギン酸やグルタミン酸で刺激してから 30 分後でも、大部分が細胞膜に残った（図 8、30'）。これらのことから通常条件下および基質依存的な Dip5 エンドサイトーシスが正常に起こるためには、Aly2 が必要であると考えられた。

ただしこの観察の問題点として、野生株と *aly2Δ* 株とでは通常条件下での Dip5 の局在が大きく異なる（図 8、0'）ため、基質刺激後に誘導されるエンドサイトーシスの程度については、両株間で厳密に比較することが困難であったということが挙げられる。そこで通常条件下での Dip5 のエンドサイトーシスになるべく起こらないよう培地の組成を様々に検討したところ、培地の窒素源をアンモニウムから尿素またはプロリンに置換すると通常条件下でのエンドサイトーシスが比較的抑えられることがわかった（図 9、WT、0'を図 8、WT、0'と比較、プロリンのデータは示していない）。このことの原因として、尿素やプロリンはアンモニウムに比べて窒素源としての質が低いことが考えられる。汎用アミノ酸トランスポーター Gap1 の細胞内輸送は窒素源の質によって制御されることが知られており（Rubio Texeira and Kaiser, 2006、Risinger and Kaiser, 2008）、Dip5 も同様の制御を受けている可能性が示唆された。

この培地条件では野生株と *aly2Δ* 株とで基質刺激前の Dip5 の局在の差が小さい（図 9、0'）ため、基質刺激によって誘導されるエンドサイトーシスの程度を比較しやすいと考えられた。そこでこの培地条件で細胞をアスパラギン酸やグルタミン酸で刺激したところ、やはり野生株では Dip5 はほぼ完全に液胞へと輸送された（図 9、30'）が、*aly2Δ* 株では多くが細胞膜上に残った（図 9、30'）。このことから基質刺激による Dip5 のエンドサイトーシス誘導にも Aly2 が必要であることが確認された。

もう 1 つの問題点として、Dip5 に巨大な EGFP タグを融合することによって局在制御に何らかの影響が出ているおそれがあった。そこで Dip5 の局在を、C 末端側に 3 つの HA タグを融合した株（*DIP5-3HA*）を用いた免疫染色法でも調べた（*Dip5-3HA* も機能的であった、図 7）。その結果、野生株では細胞膜上にシグナルが検出され、*aly2Δ* 株ではそのシグナルが野生株と比べて強かった（図 10、0'）。また細胞をアスパラギン酸で刺激したところ、野生株ではシグナルがエンドソーム様のドットに局在を変えた（図 10、15'）後、30 分後には大部分が消失した（図 10、30'）が、*aly2Δ* 株では 30 分後でも細胞膜に残った（図 10、30'）。従ってこの結果も *Dip5-EGFP* の観察結果と一致し、Aly2 が Dip5 のエンドサイトーシスに必要であることを支持した。ただし *Dip5-EGFP* との相違点として、*Dip5-3HA* では液胞にシグナルが見られなかった。このことは、EGFP が液胞分解に耐性である（Nikko and Pelham, 2009）ことが原因であると推測される。すなわち *Dip5-3HA* は液胞へと輸送された後速やかに分解される一方、*Dip5-EGFP* では Dip5 部分は分解されるが EGFP 部分は分

解されずに残り、それが液胞でのシグナルとして検出されたと考えられる。

これらのことから、エンドサイトーシスされた Dip5 は液胞で分解を受けていると推測された。そこで次に Dip5 の量に着目し、Dip5-EGFP のウエスタン解析を行った（ローディングコントロールとしてホスホグリセリン酸キナーゼ Pgk1 を検出した）。その結果図 11 に示すように、抗 GFP 抗体による検出では 80 kDa 以上と 27 kDa 付近に 2 本のバンドが検出された。これらはその分子量から、それぞれ完全長の Dip5-EGFP と遊離した EGFP 単体であると考えられた。なお完全長 Dip5-EGFP のシグナルと比較して EGFP 単体のシグナルが顕著に強かったが、これは泳動したタンパク質をゲルからメンブレンに転写する過程で分子量が小さいものほど効率よく転写されることが原因であり、必ずしも EGFP 単体の分子数が完全長 Dip5-EGFP に比べて顕著に多いことを示すわけではないと考えられる。実際に他のグループが様々なトランスポーターに EGFP を融合してウエスタン解析を行った際、いずれも EGFP 単体のシグナルは完全長融合タンパク質のシグナルと比べて顕著に強く検出されている (Nikko and Pelham, 2009)。

細胞をアスパラギン酸で刺激したところ、野生株では刺激後 15 分、30 分にかけて、完全長 Dip5-EGFP のシグナルが段階的に弱まるとともに、EGFP 単体のシグナルが段階的に強くなった（図 11、レーン 1 から 3、EGFP 単体は short exposure を参照）。従って上述の通り、Dip5-EGFP の Dip5 部分はアスパラギン酸刺激によって液胞に輸送された後、分解を受けていると考えられた。

一方 *aly2Δ* 株では通常条件下での完全長 Dip5-EGFP のシグナルが野生株よりも顕著に強く、またアスパラギン酸刺激後 15 分、30 分たっても EGFP 単体のシグナルが強くならなかった（図 11、レーン 6 から 8、short exposure）。このことは *aly2Δ* 株では通常条件下および基質刺激後の Dip5 のエンドサイトーシスが抑制されるという局在観察の結果と一致する。しかしアスパラギン酸刺激後 60 分では *aly2Δ* 株でも完全長 Dip5-EGFP シグナルが弱まるとともに EGFP 単体シグナルが強くなっていた（図 11、レーン 9）ことから、この株でも Dip5 のエンドサイトーシスとそれに続く液胞分解は完全に損なわれるわけではなく、野生株と比べて極めて低効率で起こっていると考えられた。

以上から Aly2 は Dip5 の正常なエンドサイトーシスと液胞分解に必要であることがわかった。次に Aly2 がより積極的に Dip5 のエンドサイトーシスに関与するかどうかを調べるため、Aly2 を過剰発現することによって Dip5 がエンドサイトーシスされるかどうかを調べることにした。Aly2 を強力な GPD プロモーター下で過剰発現する株を作製し、Dip5-EGFP の量と局在を調べたところ、Aly2 をオリジナルプロモーター下で発現する株と比べて Dip5-EGFP の量は顕著に減少しており、また細胞膜局在はほぼ完全に失われて顕著に液胞局在を示した（図 12）。よって Aly2 の過剰発現は Dip5 を恒常的にエンドサイトー

ーシスさせるのに十分であることがわかった。

以上全ての結果は Aly2 が Dip5 のエンドサイトーシスに主要な役割を果たすことを示しており、Dip5 が Aly2 の直接の標的である可能性が強く示唆された。

3. Dip5 のエンドサイトーシスへの他のアレスチン様タンパク質の関与

*aly2Δ*株では Dip5 のエンドサイトーシスに顕著に欠損があるものの完全には損なわれず、Aly2 非依存的な Dip5 エンドサイトーシスも低効率ながら観察された (図 8、9、10、11)。他のアレスチン様タンパク質についてのこれまでの研究から、それらは互いに異なった標的選択性を有するものの、標的が重複する場合も多いことがわかっている (図 4, Lin et al., 2008, Nikko and Pelham, 2009, Nikko et al., 2008)。そこで Aly2 以外のアレスチン様タンパク質の中にも、Aly2 と重複して Dip5 のエンドサイトーシスに関与するものがある可能性が考えられた。

他の 9 個のアレスチン様タンパク質のうち、特に Aly2 と配列類似性が高いのが Aly1 である。よって Aly1 も Dip5 を標的とするのではないかと考えた。そこで *aly1Δ*株で Dip5-EGFP の量をウェスタン解析で調べたところ、*aly2Δ*株ほどではないものの野生株よりも多かった (図 13)。また *aly1Δ aly2Δ*二重破壊株では *aly2Δ*株よりもさらに多かった (図 13)。従って Aly1 と Aly2 の標的選択性は少なくとも Dip5 に関しては一部重複しており、互いに独立して機能することがわかった。ただし Dip5 の量に対する寄与の程度は Aly2 のほうが Aly1 よりも大きかった (図 13)。

また Aly2、Aly1 以外の 8 つのアレスチン様タンパク質についても Dip5 のエンドサイトーシスに寄与する可能性が考えられ、それを検証するためにそれぞれの遺伝子を単独破壊した株で Dip5-EGFP の局在を観察した。その結果いずれの株でも細胞膜と液胞の両方に局在が見られ、野生株と明らかな差異が見られなかった (図 14)。よってこれら 8 つのアレスチン様タンパク質は Dip5 のエンドサイトーシスに大きく寄与しないことがわかった。ただし局在観察では *aly1Δ*株でも野生株との差異が明確でなく (データは示していない)、従って顕微鏡観察はウェスタン解析 (図 13) と比べて感度の低い実験であると考えられた。よってこれら 8 つのアレスチン様タンパク質も Aly1 と同程度に Dip5 のエンドサイトーシスに寄与する可能性は否定できない。

以上より Dip5 のエンドサイトーシスに関して少なくとも Aly1 は Aly2 と重複した機能をもつがその程度は Aly2 のほうが顕著に大きいこと、またそれ以外の 8 つのアレスチン様タンパク質は大きく影響しないことがわかった。従って Dip5 のエンドサイトーシスに主に寄与するのは Aly2 であると考えられ、以降も Aly2 を中心に解析した。

4. Dip5 のユビキチン化へのRsp5 とAly2 の関与

次に Aly2 が Dip5 のエンドサイトーシス過程のどの段階ではたらくかを調べた。Aly2 が他のアレクチン様タンパク質と同様に Rsp5 アダプターとして機能するならば、Dip5 のユビキチン化に寄与するはずである。そこで Dip5 のユビキチン化に注目することとした。

まず他のトランスポーターと同様に、Dip5 のエンドサイトーシスがユビキチンリガーゼ Rsp5 によるユビキチン化に依存するかどうかを調べた。RSP5 は遺伝子破壊すると致死であるため、ここでは温度感受性変異株 *rsp5-1* を用いた。*rsp5-1* 株では培養温度の上昇に伴い Rsp5 の活性が低下する (Wang et al., 1999)。この株において Dip5-EGFP の局在を観察したところ、通常条件下で野生株よりも顕著に細胞膜に局在した (図 15、0')。また細胞をアスパラギン酸で刺激した後の局在についても、野生株と比べて顕著に細胞膜に残っていた (図 15、15'、30')。これらの傾向は Rsp5 の活性が比較的高く保たれている 24℃ で培養した場合に比べ、より活性が低下している 30℃ で培養した場合により顕著であった。このことから Dip5 の正常なエンドサイトーシスには Rsp5 の活性が必要であると考えられた。

次に Dip5 がエンドサイトーシスされる際、実際にユビキチン化を受けているかどうかを調べることにした。Dip5-3HA のウェスタン解析を行ったところ、シグナルがアスパラギン酸刺激後速やかに高分子量側にスメア状にシフトするのが観察された (図 16、5'、15')。このことは Dip5 が分解 (図 16、30') に先立ってユビキチン化されていることを反映している可能性が考えられた。なおこのような泳動度の変化は Dip5-EGFP のウェスタン解析では明瞭に観察されなかった (図 11) が、このことの原因としては Dip5-EGFP は分子量が大きいため泳動の分離度が小さいことが考えられる。

次に Dip5 のユビキチン化状態をより直接的に評価するため、抗 HA 抗体で免疫沈降した Dip5-3HA に対して抗ユビキチン抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果、Dip5-3HA のシグナルが検出される分子量帯 (およそ 62 kDa) のやや上方からゲル上端にかけてスメア状のシグナルが観察された (図 16、上パネル、レーン 2)。このシグナルは Dip5 に 3HA タグを付加していない株から調製したサンプルでは検出されなかった (図 16、上パネル、レーン 1) ことから、免疫沈降された Dip5-3HA に由来するシグナルであり、Dip5 のポリユビキチン化を示していると考えられた。この結果は基質刺激を行わない通常の培養条件下でも Dip5 のポリユビキチン化がある程度起こっていることを示しており、Dip5 のエンドサイトーシスがこの条件下でも起こっていることとよく対応する。また細胞をアスパラギン酸で刺激したところ、このシグナルは顕著に強くなった (図 16、上パネル、レーン 3)。このことから、Dip5 のポリユビキチン化は基質に応答して亢進することがわかった。

次にこのポリユビキチン化が Rsp5 の働きによるものかを調べるために、*rsp5-1* 株でも同

様の実験を行った。その結果、*rsp5-1* 株では通常条件下、アスパラギン酸刺激後ともに、Dip5-3HA の総量が野生株と比べて顕著に多い (図 16、下パネル、レーン 4、5) にもかかわらず、ポリユビキチン化シグナルは野生株と同程度かやや弱かった (図 16、上パネル、レーン 4、5)。よって *rsp5-1* 株では Dip5 のユビキチン化効率は野生株と比べて低いと考えられ、Rsp5 が Dip5 のユビキチン化に寄与することがわかった。

また Dip5 のユビキチン化への Aly2 の関与について調べるため、*aly2Δ*株でも同様の実験を行った。その結果、通常条件下、アスパラギン酸刺激後ともに野生株と比べてポリユビキチン化シグナルが顕著に弱かった (図 16、上パネル、レーン 6、7)。従って Aly2 も Dip5 のポリユビキチン化に寄与することがわかり、それを介して Dip5 のエンドサイトーシスに寄与していることが示唆された。

5. Aly2 と Rsp5 の結合

Rsp5 と Aly2 はともに Dip5 のユビキチン化およびエンドサイトーシスに関与することから、両者は協調してはたらく可能性が考えられた。他のアレクチン様タンパク質の解析から Aly2 も Rsp5 アダプターとしてはたらくことが類推され、実際にタンパク質間相互作用についての網羅的解析では Aly2 と Rsp5 の結合が検出されていた (Krogan et al., 2006, Lin et al., 2008)。よって両者の結合を確認するとともに、その結合の Dip5 エンドサイトーシスへの関与を調べることにした。

まず両者の *in vivo* での結合を検討するために共沈降実験を行った。GST-Aly2 と myc-Rsp5 を共発現させて抗 myc 抗体で免疫沈降したところ、GST-Aly2 の共沈降が見られ (図 17B、レーン 2)、両者の結合が確認された。

次に Rsp5 と結合が Aly2 の機能に必要なかどうかを検討するために、Rsp5 と結合できない変異型 Aly2 の取得を試みた。Aly2 は Rsp5 との結合モチーフとして知られる PY モチーフを分子内に 2 つ有している (⁵³⁷PSY および ⁷⁰⁰PPSY、図 17A)。これらのモチーフが実際に Rsp5 との結合に寄与しているならば、そこに変異を入れることで Rsp5 と結合しなくなると期待された。そこでこれらのモチーフをアラニンに置換した変異型 Aly2 を作製し、Rsp5 との結合を検討した。このうち C 末端側の ⁷⁰⁰PPSY を AAAA に置換した変異体 (Aly2^{ΔC-PY}) を共沈降実験に供したところ、期待した通り Rsp5 との結合が見られなかった (図 17、レーン 3)。この結果から ⁷⁰⁰PPSY が結合に寄与していることが示唆された。なお N 末端側の ⁵³⁷PSY を AAA に置換した変異体では発現量が顕著に低下していた (データは示していない) ため、結合への寄与の有無は判断できなかった。

次に Aly2 が Rsp5 と結合できない場合に Dip5 のエンドサイトーシスが正常に起こるかどうかを調べた。ΔC-PY 変異をゲノム上の *ALY2* に導入した株を作製し、Dip5-EGFP の局

在を観察したところ、*aly2Δ*株と同程度に顕著な細胞膜局在を示した（図 18）。よってこの株では Dip5 のエンドサイトーシスが抑制されることがわかり、Rsp5 との結合は Dip5 のエンドサイトーシスにおける Aly2 の機能に必須であることが示唆された。

6. Rsp5 による Aly2 のユビキチン化

共沈降の実験において、myc-Rsp5 を発現させると発現させない場合と比べて GST-Aly2 のシグナルが高分子量側に検出された（図 17、パネル 3 段目、レーン 1 と 2 を比較）。また Rsp5 と結合できないΔC-PY 変異体では低分子量側にシグナルが検出された（図 17、パネル 3 段目、レーン 3）。これらのことから Aly2 は Rsp5 との結合依存的に何らかの修飾を受けている可能性が考えられた。もしそうであれば Aly2 が Rsp5 の働きをアダプターとして補助する一方で、Rsp5 が Aly2 を修飾して制御するという相互依存的な関係が示唆されることとなり、興味深い点であった。そこでこの修飾が何であるか、またそれが Rsp5 の活性に依存するかを調べることにした。

修飾が何であるかについては、Aly2 と Rsp5 が結合することから、Aly2 自体も Rsp5 によってユビキチン化を受けている可能性が考えられた。実際に *in vitro* で Rsp5 のユビキチン化基質を探索した網羅的解析では Aly2 が同定されていた（Gupta et al., 2007）。そこでまず Aly2 が *in vivo* でユビキチン化されているかどうかを調べることにした。Aly2-13myc を抗 myc 抗体で免疫沈降し抗ユビキチン抗体でブロットしたところ、シグナルが検出された（図 19、上パネル、レーン 2、4）。このシグナルは Aly2 に 13myc タグを付加していない株から調製したサンプルでは検出されなかった（図 19、上パネル、レーン 1）ことから、免疫沈降された Aly2-13myc に由来するシグナルであり、Aly2 のユビキチン化を示していると考えられた。

次にこのユビキチン化が Rsp5 の活性に依存するかどうかを *rsp5-1* 株を用いて調べた。*rsp5-1* 株で上記と同様の実験を行ったところ、ユビキチン化のシグナルは 24℃培養の場合でも野生株と比べて弱くなり（図 19、上パネル、レーン 3）、さらに 30℃培養ではほとんど検出されなかった（図 19、上パネル、レーン 5）。また抗 myc 抗体による Aly2-13myc のシグナルに注目すると、特に 30℃において *rsp5-1* 株で野生株よりも低分子量側に検出され（図 19、下パネル）、これも Aly2 のユビキチン化状態に対応していると考えられた。

以上より Aly2 は *in vivo* で Rsp5 によってユビキチン化されていることが示唆された。ただしこの修飾が Aly2 の機能に及ぼす影響は現時点で明らかでなく、さらなる解析が必要である。

7. Aly2 と Dip5 の結合

Aly2 が他のアレスチン様タンパク質と同様に Rsp5 アダプターとしてはたらくならば、Rsp5 だけでなく Dip5 と結合するはずであると考えられた。そこで Aly2 と Dip5 の *in vivo* での結合を検討するために、ゲノム上の *ALY2*、*DIP5* にそれぞれ 13myc、3HA タグを付加して共沈降実験を行った。しかし、抗 HA 抗体を用いて Dip5-3HA を免疫沈降したところ、通常の方法では Aly2-13myc の共沈降は検出されなかった（データは示していない）。

ただし仮に実際には両者が結合しているとしても、その結合がサンプル調製の過程で解離してしまう弱い結合であるか、または一過的な結合であれば、通常の条件では結合は検出されないと考えられる。そのような場合、免疫沈降前にタンパク質間の架橋処理を行って結合を固定する方法が有効である。実際にアレスチン様タンパク質と標的細胞膜タンパク質との結合が共沈降実験によって示されているのは、Ldb19-Mup1 と Ecm21-Smf1 の 2 つのペアであるが、いずれの場合も細胞を架橋剤 DSP (dithiobis[succinimidyl propionate]) で処理した上で免疫沈降が行われている (Lin et al., 2008、Nikko et al., 2008)。そこで Aly2 と Dip5 との共沈降実験においても DSP による架橋を試すこととした。

細胞に DSP 処理を行った上で Dip5-3HA を免疫沈降したところ、Aly2-13myc の共沈降が見られた (図 20、レーン 3)。よって両者は弱くまたは一過的であるものの *in vivo* で結合することがわかった。このことにより Dip5 が Aly2 の直接の標的であることが確かめられ、Rsp5 との共沈降実験の結果 (図 17) と併せて、Aly2 は *in vivo* で Rsp5 と Dip5 とをつなぐアダプターとして機能することが示唆された。またアスパラギン酸やグルタミン酸を含まない通常の培養条件下でも結合が見られたことは、この条件でも Dip5 のエンドサイトーシスが起きていることとよく対応した。

なお図 20 の実験では Aly2-13myc のシグナルは 2 本のバンドとして検出された。これは Aly2 の何らかの修飾状態の違いを表していると考えられる (ただし毎回バンドが 2 本検出されるわけではなく、例えば図 19 の実験では、野生株では Aly2-13myc は 1 本のバンドとして検出された)。この修飾の候補としてはユビキチン化 (図 19) やリン酸化 (図 36) などが考えられるが、2 本のバンドはともに Dip5-3HA を免疫沈降したサンプルからも検出されたことから、この修飾は Dip5 との結合には影響しないと考えられた。

次に輸送基質によって Dip5 のエンドサイトーシスが誘導される機構についても調べることにした。エンドサイトーシスが基質によって誘導される例は Dip5 以外にも多くのトランスポーターについて知られている (Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Risinger and Kaiser, 2008) が、その制御機構は未だ明らかになっていない。しかし同じくアレスチンの働きでエンドサイトーシスされる哺乳類 GPCR の場合には、リガンド依存的に β -アレスチンが GPCR に結合することによってエンドサイトーシスが誘導されることがわかっており (Moore et al., 2007)、それと類似した機構が酵母のアレスチン様タンパク質・トラン

スポーター系にも存在する可能性が考えられた。そこで Aly2 と Dip5 の結合が基質に影響されるかどうかを調べることにした。DSP は細胞膜を透過できるという性質から、生きた細胞に直接処理することで生理的な状態のままタンパク質間の結合を固定できるという利点があり、この場合のように環境に応答した結合変化を調べるのに適していると考えられた。

期待した通り、細胞をアスパラギン酸で刺激した後に DSP 架橋処理を行って Dip5-3HA を免疫沈降したところ、刺激前と比べて多くの Aly2-13myc の共沈降が見られた (図 20、レーン 4)。よって Aly2 と Dip5 との結合はアスパラギン酸処理によって促進されることがわかった。この結果から Dip5 のユビキチン化とそれに続くエンドサイトーシスが基質によって促進されるのは、Aly2 との結合率が増すことでより多くの Rsp5 がリクルートされるためであると考えられ、基質によるトランスポーターのエンドサイトーシス制御機構が初めて明らかになった。

8. Dip5 のエンドサイトーシスにおけるリン酸化の役割

次に Aly2 が Dip5 を認識する機構についてより詳細に調べることにした。アレスチン様タンパク質は哺乳類β-アレスチンと同様に、細胞膜タンパク質のリン酸化された細胞内領域を認識すると考えられている (Nikko et al., 2008)。そこで Dip5 がリン酸化されているか、またそのリン酸化がエンドサイトーシスに影響するかについて調べることにした。

まず Dip5 が *in vivo* でリン酸化されているかを確かめるため、免疫沈降した Dip5-3HA を *in vitro* でホスファターゼ処理することで SDS-PAGE における泳動度が変化するかを調べた。その結果、泳動度が低分子量側に変化した (図 21)。よって Dip5 は通常条件下でリン酸化状態にあることがわかった。

次に Dip5 のリン酸化がエンドサイトーシスに関与するかを調べるため、推定リン酸化部位に変異を導入した Dip5 を作製することとした。Dip5 の N 末端細胞内領域にはセリン・スレオニンに富む領域 (¹⁰TSTSPRNSSSLDS) があり、うち少なくとも 10T と 11S 以外のセリン・スレオニンはリン酸化プロテオーム解析でリン酸化残基として同定されている (図 22A, Bodenmiller et al., 2007)。よってこの領域は高度にリン酸化を受けていると考えられた。そこでこの領域内の 6 つのセリンと 2 つのスレオニンを全てアラニンに置換して脱リン酸化状態を模した 6S2T-A 変異体、および全てアスパラギン酸に置換してリン酸化状態を模した 6S2T-D 変異体を作製し、EGFP 融合タンパク質のウェスタン解析と局在観察を行った。両変異型 Dip5 についてアスパラギン酸刺激後の量の変化を野生型 Dip5 と比較したところ、6S2T-A 変異体は野生型よりも減少がわずかに抑えられており、6S2T-D 型では逆に亢進していた (図 22B 上、15'、30')。局在観察の結果もウェスタン解析と一致し、6S2T-A 変

異体はアスパラギン酸刺激後の液胞輸送が野生型よりもわずかに抑制され、6S2T-D型では逆に亢進していた（図 22B下）。従ってこの領域のリン酸化はDip5 のエンドサイトーシスに正に寄与することが示唆され、Aly2 による認識部位の候補として考えられた。

9. 基質以外の刺激によるDip5 エンドサイトーシスへのAly2 の関与

ここまで Dip5 の基質依存的なエンドサイトーシスを中心に記述した。しかし他のトランスポーターについての研究では基質刺激以外にも高温ストレス、シクロヘキシミド処理、TORC1 阻害といった細胞にとっての様々なストレスでエンドサイトーシスが誘導されることが知られている（Chung et al., 2000、Galan and Haguener Tsapis, 1997、Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Schmidt et al., 1998、Beck et al., 1999）。これらのストレスによるエンドサイトーシス誘導には、基質刺激の場合に見られたアレスチン様タンパク質とトランスポーターとの結合促進（図 20）とは異なる機構が働いている可能性が考えられた。そこでこれらのストレスによるエンドサイトーシスについても Dip5 をモデルに調べることにした。

以下では、まず Dip5 についても高温ストレス、シクロヘキシミド処理、TORC1 阻害の3つのストレスでエンドサイトーシスが誘導されるかを調べた。またトランスポーターによってはエンドサイトーシスの誘導条件によって関与するアレスチン様タンパク質が異なる例がある（Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009）ため、基質以外の刺激による Dip5 のエンドサイトーシスにも Aly2 が関与するかを調べた。

はじめに 30℃で培養した細胞を 37℃に移すことで高温ストレスにさらし、Dip5-EGFP の局在を観察した。その結果、野生株では速やかな液胞輸送が見られた（図 23）。一方 *aly2Δ* 株では局在変化はほとんど起こらなかった（図 23）ことから、高温ストレスによる Dip5 エンドサイトーシスにも Aly2 が関与することがわかった。

次に細胞をシクロヘキシミドで処理して Dip5-EGFP の局在を観察したところ、野生株では Dip5 がほぼ全て液胞に輸送された（図 24）。しかし *aly2Δ* 株では細胞膜上にある程度残った（図 24）ことから、シクロヘキシミドによる Dip5 エンドサイトーシスにも Aly2 が関与することがわかった。

さらに細胞を TORC1 阻害剤であるラパマイシンで処理したところ、野生株では処理後 40 分から 70 分をピークに Dip5-EGFP がエンドソーム様の局在を示し（図 25、矢印）、120 分後には大部分が液胞へと運ばれた（図 25）。しかし *aly2Δ* 株では 120 分後でも大部分が細胞膜上に残った（図 25）。よって TORC1 阻害による Dip5 エンドサイトーシスにも Aly2 が関与することがわかった。

以上より Dip5 のエンドサイトーシスは基質刺激以外にも高温ストレス、シクロヘキシミ

ド処理、TORC1 阻害によって誘導されること、またいずれの誘導も Aly2 を介していることがわかった。

10. TORC1-Npr1 経路によるAly2 の制御

次に Dip5 のエンドサイトーシスを誘導する基質以外の刺激のうち、TORC1 阻害について詳細に制御機構を解析することとした。

まず他のトランスポーターのエンドサイトーシスに関与することが知られている TORC1 下流のキナーゼ Npr1 が、Dip5 のエンドサイトーシス制御にも関与するかどうかを調べた。*npr1Δ*株での Dip5-EGFP の局在を観察したところ、*npr1Δ*株では野生株と比べて Dip5 の量自体が顕著に多く、局在の比較が困難であった (図 26A)。この株間の Dip5 の量の違いは転写量に起因する可能性が考えられ、もしそうであれば Dip5 のプロモーターを置換することで量の違いがなくなり、局在を比較しやすくなると期待された。そこで Dip5-EGFP を GPD プロモーター下で発現させるプラスミドを作製し、野生株と *npr1Δ*株で発現させたところ、量に大きな差は見られなかった (図 26B)。従ってオリジナルプロモーター下で発現した Dip5 の量が *npr1Δ*株で野生株よりも多いのは転写量の違いが原因と考えられた。

GPD プロモーター下で発現させた Dip5 は、*npr1Δ*株では野生株よりも細胞膜にやや多く局在した (図 26B、0')。また細胞をラパマイシンで処理したところ、*npr1Δ*株では野生株と比べて顕著に細胞膜上に残った (図 26B、60')。このことから Npr1 は通常条件下およびラパマイシン処理による Dip5 のエンドサイトーシスに関与することがわかった。

次に TORC1-Npr1 経路が Dip5 のエンドサイトーシスを制御する機構について調べることにした。この経路によってエンドサイトーシスが誘導されるトランスポーターは Dip5 以外にもトリプトファントランスポーター Tat2 など複数知られているが、その一方で Gap1 など誘導されないトランスポーターも知られている (Schmidt et al., 1998、Beck et al., 1999)。すなわちこの経路はトランスポーターのエンドサイトーシスを一括して、しかし選択性をもって制御する。そのような制御は複数のトランスポーターを選択性をもって標的とするアレスチン様タンパク質が制御されることによって実現されるのではないかと考えた。

そこでラパマイシン処理によって Aly2 に起こる変化を探したところ、処理後 30 分から 45 分をピークに Aly2 の量が顕著に増加することがわかった (図 27A)。これは Dip5 が細胞内にエンドソーム様の局在を顕著に示し始めるタイミングと大まかに一致していた (図 25)。またより生理的な TORC1 阻害条件として細胞を窒素源飢餓においた場合にも、60 分後をピークに Aly2 は増加した (図 27B)。Aly2 の過剰発現は Dip5 のエンドサイトーシ

スを引き起こすのに十分である (図 12) ことから、ここで見られた Aly2 量の増加は Dip5 のエンドサイトーシス誘導に寄与していると推測された。

次に Aly2 の増加に Npr1 が関与しているかどうかを調べるため、*npr1Δ*株をラパマイシンで処理したところ、野生株で見られたような Aly2 量の増加は見られなかった (図 28)。従って TORC1 阻害による Aly2 の増加は Npr1 の活性化を介していると考えられた。これまで Npr1 がエンドサイトーシスに関与する具体的な機構は不明であったが、それがアレシチン様タンパク質の量の制御を介して起こることが初めて示唆された。

興味深いことに、ここで見られた Aly2 の量の制御を介した Dip5 エンドサイトーシスの制御は、Aly2 の量自体は変化せずに Dip5 との結合率が制御される輸送基質による制御 (図 20) とは全く異なる機構であった。

11. 通常条件下でのDip5 エンドサイトーシスの細胞周期依存性

ここまで述べてきたように Dip5 のエンドサイトーシスは基質やそれ以外の刺激によって誘導されるが、その一方で培地に基質を含まずかつ何も刺激を与えない通常の培養条件下でもある程度の効率でエンドサイトーシスが起きている (図 8、0')。これについても *aly2Δ*株では抑制される (図8、0') ことから、Aly2 が主要な役割を果たしていると考えられた。そこで以降では、通常条件下における Dip5 エンドサイトーシスについて詳細に調べることとした。

ただし図 8 では栄養要求性をもつ株を使用しており、それを補うために培地中にはウラシル、ロイシン、ヒスチジンが含まれていた。これらの成分は Dip5 の主要な基質ではないものの、なかでもアミノ酸であるロイシンとヒスチジンについては非特異的に低感度で Dip5 に認識されてエンドサイトーシスを誘導する可能性があった。そこで野生株にこれら 3 つの栄養要求性を相補するプラスミドを導入し、いずれも含まない SD 培地中での Dip5-EGFP の局在を観察したところ、やはり液胞局在が見られた (図 29)。よって通常条件下での Dip5 エンドサイトーシスは培地中のウラシル、ロイシン、ヒスチジンが原因ではないことがわかった。

野生株における通常条件下での Dip5-EGFP の局在を詳細に観察したところ、細胞ごとにバラつきがあることがわかった。しかし細胞の形態ごとに明確な傾向が見られ、出芽中の細胞群 (S 期から M 期に相当) では細胞膜と液胞の両方にほぼ同程度に局在が見られた (図 30、白矢印) 一方、出芽していない細胞群 (G1 期に相当) ではほとんどの Dip5 が液胞に局在した (図 30、グレー矢印)。それに対して *aly2Δ*株では細胞ごとのバラつきや形態ごとの明らかな傾向の違いは見られなかった (図 30)。このことから通常条件下での Dip5 のエンドサイトーシスは、G1 期に進入する前のタイミングに集中して、Aly2 依存的に起こって

いる可能性が示唆された。

そこで Dip5 のエンドサイトーシスと細胞周期進行との関係をより直接的に調べるため、単一の野生株の細胞を経時的に観察した。その結果、出芽していない状態では細胞膜に局在が観察されず (図 31、0'から 26')、出芽が始まるのと併せて細胞膜局在が見られ始め (図 31、39'から 90')、芽がある程度まで大きくなるとエンドソーム様のドットへと局在を変え (図 31、103'以降、矢印)、分裂する段階ではほとんど細胞膜上に残っていなかった (図 31、167'以降)。すなわち Dip5 のエンドサイトーシスは芽がある程度大きくなってから分裂するまでの間 (M 期に相当) に集中して起こっていた。

次に M 期の中でもどの段階で Dip5 のエンドサイトーシスが起こるか、具体的には metaphase 以前であるかそれよりも後であるかを調べるために、細胞を微小管重合阻害剤ノコダゾールで処理することによって metaphase で停止させ、Dip5 の局在を観察した。その結果 Dip5 は顕著に液胞局在を示した (図 32) ことから、Dip5 のエンドサイトーシスは M 期のなかでも metaphase 以前に起こっていることが示唆された。

次に Dip5 の量に注目し、同調培養した細胞でウェスタン解析を行った。具体的には細胞を α -ファクター (接合フェロモン) 処理によって G1 期で停止させた後、 α -ファクターを除去して停止を解除することで同調培養を始め、そこから経時的にサンプリングして Dip5-3HA の量を調べた。その結果 Dip5 は α -ファクター処理によって大きく減少し (図 33、パネル 2 段目、0')、そこから 105 分にかけて増加した (図 33、パネル 2 段目) が、120 分後には顕著に減少が見られた (図 33、パネル 2 段目)。同じサンプルを抗 Clb2 抗体 (Clb2 は M 期に発現するサイクリンであり、metaphase 終了とともに分解される) で検出したところ、量の振動が見られたことから細胞はうまく同調されていることが確認され、また 120 分は Clb2 の量が多いタイミング、すなわち M 期の metaphase 以前にあたることがわかった (図 33、パネル 3 段目)。従ってこの結果も Dip5 のエンドサイトーシスとそれに続く分解は M 期、なかでも metaphase 以前に集中的に起こることを支持した。

なお Dip5-EGFP と異なり、Can1-EGFP の局在は細胞周期に拘らず一定であった (図 34)。このことから、細胞周期に沿ったエンドサイトーシスの制御は全てのトランスポーターに共通するものではないと考えられた。

12. Aly2 の量およびリン酸化の細胞周期依存性

次に細胞周期の進行に沿って Dip5 のエンドサイトーシスが制御される機構について調べることとした。細胞周期によるエンドサイトーシス制御も選択性をもっていると考えられ (図 30、図 34)、よってアレスチン様タンパク質の制御を介している可能性が考えられた。

そこで細胞周期に沿って Aly2 に起こる変化を探するため、同調培養したサンプルで

Aly2-13myc を検出した。その結果、細胞周期の進行に沿って Aly2 の量が大きく振動していた (図 33、パネル 1 段目)。Aly2 の増加と減少は Clb2 とほぼ並行していたことから、Aly2 量が多いのは M 期、なかでも metaphase 以前であると考えられた。またこのことを確認するために細胞をノコダゾール処理したところ、やはり Aly2 の量が増加した (図 35)。M期の metaphase 以前は Dip5 のエンドサイトーシスが活発に起こるタイミングと一致しており (図 31、32)、ここで見られた Aly2 量の増加がエンドサイトーシス誘導に寄与していると推測された。

また Aly2 の泳動度はノコダゾール処理によって高分子量側へわずかに変化した (図 35)。このことから Aly2 は M 期の metaphase 以前特異的に何らかの修飾を受けていることが示唆され、量の制御以外の制御機構も存在する可能性が考えられた。そこでこの修飾が何であるかを調べることにした。

興味深いことにサイクリン依存性キナーゼ Cdk1 の基質の網羅的探索で Aly2 が同定されており (図 42B、C、Ubersax et al., 2003、Holt et al., 2009)、よって Aly2 の M 期特異的な修飾はリン酸化である可能性が考えられた。そこで免役沈降した Aly2-13myc を *in vitro* でホスファターゼ処理したところ、泳動度が低分子量側に変化した (図 36)。従って実際に Aly2 はリン酸化状態にあることがわかった。

次に Aly2 のリン酸化が細胞周期に沿って制御されるかどうかを調べた。図 33 のパネル 1 段目では Aly2 のシグナルがリン酸化状態に応じて分離されるよう、Phos-tag (リン酸化されたタンパク質を特異的に捕捉し、泳動度を低下させる試薬) を添加したゲルでサンプルを泳動した。その結果 Aly2-13myc のシグナルは泳動度の異なる 2 本のバンドとして検出され (図 33、パネル 1 段目)、これはリン酸化状態の違いを表していると考えられた。よってこの 2 本のバンドのシグナル強度比は Aly2 のリン酸化の程度の指標になると考えられた。

ノコダゾール処理をした細胞におけるシグナル強度比に注目したところ、何も添加しない細胞と比べて泳動度の小さいシグナルが顕著に強かった (図 33、パネル 1 段目、レーン 1 とレーン 2 を比較)。このことから M 期の metaphase では高度にリン酸化された Aly2 が多いと考えられた。なお α -ファクター処理をした細胞では逆に泳動度の小さいシグナルが検出されなかった (図 33、パネル 1 段目、レーン 3) ことから、比較的リン酸化程度の低い Aly2 が多いと考えられた。この結果から Aly2 は M 期の metaphase 特異的に高度にリン酸化されていることが示唆された。

以上から、Aly2 は M 期 (metaphase 以前) において量が増加するとともに高度にリン酸化されていることがわかった。またそのタイミングは Dip5 のエンドサイトーシスが活発に起こるタイミングと一致していることから、細胞周期に沿った Aly2 の量およびリン酸化の制御が Dip5 のエンドサイトーシス制御に寄与している可能性が示唆された。

13. アスパラギン酸やグルタミン酸が細胞周期進行に与える影響

M 期に Aly2 の制御を介して Dip5 のエンドサイトーシスが誘導されることには何らかの生理的意義があるものと推測される。そこでそのタイミングでの Dip5 のエンドサイトーシスが細胞の生存に関して何らかの有利性をもたらすかどうかを調べることにした。

Dip5 のエンドサイトーシスが正常に起こらない *aly2Δ* 株の SC プレート培地での生育を調べたところ、野生株よりも顕著に悪く、逆に *dip5Δ* 株は野生株よりも良かった (図 37A、左パネル)。ALY2 破壊による生育悪化は DIP5 破壊によって抑圧された (図 37A、左パネル) ことから、Dip5 の制御を介したものであることがわかった。また SC 培地からアスパラギン酸とグルタミン酸を除いた培地 (SC-DE) では野生株と *aly2Δ* 株との生育差は小さかった (図 37A、右パネル、ただしわずかに差は見られた) ことから、この両株の生育差の大部分はアスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みが原因であると考えられた。

次に液体培地での細胞増殖速度を調べたところ、やはり SC 培地では *aly2Δ* 株の増殖が野生株よりも遅く、逆に *dip5Δ* 株および *aly2Δ dip5Δ* 株は野生株よりも速かった (図 37D)。一方 SC-DE 培地ではいずれの株も同様の速度で増殖した (図 37E)。図 37D および E の増殖曲線から細胞の倍加時間を算出したところ、SC では野生株の約 120 分に対して *aly2Δ* 株では約 140 分と長く、*dip5Δ* 株および *aly2Δ dip5Δ* 株では約 100 分と短かった (図 37F)。一方 SC-DE 培地ではいずれの株も約 100 分、すなわち SC 培地での *dip5Δ* 株の倍加時間と同程度であった (図 37F)。以上の結果から、SC 培地の組成では Dip5 によるアスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みは細胞の増殖に悪影響を与えることがわかった。

ただし *aly2Δ* 株は YPD プレート培地では野生株と同程度の生育を示し (図 37B)、また SD プレート培地でもアスパラギン酸やグルタミン酸の有無に拘らず野生株と同程度の生育を示した (図 37C) ことから、アスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みが生育に悪影響するかどうかは培地中の他の栄養源の組成に依存すると考えられた。

なお Dip5 と異なり Can1 は細胞周期を通じて細胞膜に局在する (図 34)。このことからアスパラギン酸やグルタミン酸とは異なり、アルギニンの取り込みは細胞増殖に悪影響を与えないのではないかと推測し、それについても調べた。SC 培地からアルギニンを除いた培地 (SC-R) での野生株の増殖速度を調べたところ、SC 培地と同程度であった (図 37G)。このことから SC 培地中のアルギニンは増殖に悪影響を与えないことがわかった。ただし SC 培地の組成では、アルギニンのモル濃度はアスパラギン酸とグルタミン酸の合計モル濃度の 1/14 倍である。そこでアルギニンが SC 培地でのアスパラギン酸とグルタミン酸の合計モル濃度と同じモル濃度で存在する場合に細胞増殖に影響するかどうかを調べるため、SC 培地からそれら 3 つのアミノ酸を除いた培地 (SC-RDE)、それにアスパラギン酸とグルタ

ミン酸を加えた培地 (SC-R)、およびアルギニンを 14 倍濃度で加えた培地 (SC-RDE+14R) の 3 つの培地で野生株の増殖速度を比較した。その結果、SC-R 培地では SC-RDE 培地よりも増殖が遅くなったが、SC-RDE+14R 培地では SC-RDE 培地と同程度の速度で増殖した (図 37G)。すなわち培地中のモル濃度が同じ場合でも、アスパラギン酸やグルタミン酸は細胞増殖に悪影響を与えるが、アルギニンは与えないことがわかった。

次にアスパラギン酸やグルタミン酸による細胞増殖阻害の直接の原因を調べることにした。その 1 つの可能性として、細胞周期の特定のステップの進行が遅延していることが考えられた。特に Dip5 のエンドサイトーシスは M 期に集中して起こることから、その後の G1 期にアスパラギン酸やグルタミン酸が取り込まれることが細胞周期の進行を阻害する、すなわち G1 期にそれらを取り込むと次の S 期に入りづらくなるのではないかと推測し、それを検証することとした。

具体的には対数増殖期における出芽率 (全ての細胞のうち出芽中の細胞の割合。細胞周期全体に対する、S/M 期の相対的長さの指標) を調べた。その結果、SC 培地では *dip5Δ* 株の出芽率が野生株よりも顕著に高く、*aly2Δ* 株は逆に低かった (図 38A)。それに対して SC-DE 培地では野生株の出芽率が *dip5Δ* 株と同程度に高く、また *aly2Δ* 株の出芽率も SC 培地よりは高かった (図 38A)。これらのことから、SC 培地ではアスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みが出芽率低下の原因になると考えられた。一方 YPD や SD 培地ではアスパラギン酸やグルタミン酸の有無に拘らず、各株の出芽率に顕著な差は見られなかった (図 38A)。

次に SC および SC-DE 培地における出芽率の値 (図 38A) と、図 37F の倍加時間 (細胞周期全体の長さ) から G1 期および S/M 期の長さをそれぞれ算出した。その結果、SC 培地では野生株の G1 期の長さは約 60 分であったのに対し *aly2Δ* 株では約 80 分と顕著に長く、*dip5Δ* 株および *aly2Δ dip5Δ* 株では約 40 分と顕著に短かった (図 38B)。一方 SC-DE 培地ではいずれの株も約 40 分、すなわち SC 培地での *dip5Δ* 株の G1 期の長さと同程度であった (図 38B、ただし *aly2Δ* 株ではわずかに長かった)。よって SC 培地での Dip5 によるアスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みは G1 期を延長させる、すなわち S 期への移行を阻害することがわかった。一方で S/M 期の長さは SC 培地、SC-DE 培地ともに株間の顕著な相違は見られなかった (図 38C)。従って図 37F で見られたアスパラギン酸やグルタミン酸による倍加時間の延長は G1 期の延長が原因であることがわかった。

以上より、アスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みは培地条件によっては G1 期を延長させる、すなわち G1 期から S 期への移行を阻害することが示唆された。従って G1 期に Dip5 の活性が高いことは細胞の生存にとって不利であり、G1 期に入る前の M 期に Dip5 がエンドサイトーシスされることは合目的的であると考えられた。

考察

1. Aly2 と Dip5 の対応関係

これまで機能が不明だった Aly2 であるが、本研究により Dip5 のエンドサイトーシスに寄与することが示された（図 8 から 12）。また同じく機能が不明であった Aly1 も寄与の程度は低いものの Dip5 に関して重複する機能を示した（図 13）。既に他のグループによって解析されていた 5 つ（図 4、Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Nikko et al., 2008）を含めると、これで計 7 つのアレスチン様タンパク質がエンドサイトーシスに寄与することがわかった。

Dip5 のエンドサイトーシスへの Aly2 の寄与は、Aly1 を含めた他 9 つのアレスチン様タンパク質と比べて顕著に大きかった（図 13、14）。すなわち Dip5 は Aly2 に対して特異性をもつ。また Perham らのグループは異なる 4 つの細胞膜タンパク質（Itr1、Hxt6、Fur4、Tat2）について局在に影響するアレスチン様タンパク質を網羅的に探索したが、そこでは Aly2 は同定されなかった（Nikko and Pelham, 2009）ことから、Aly2 も Dip5 に対して特異性をもつ。すなわち Aly2 と Dip5 の対応関係には相互に特異性がある。

ただしアレスチン様タンパク質は複数の標的を有する例が多く（図 4、Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Nikko et al., 2008）、Dip5 以外にも Aly2 の標的となる膜タンパク質が存在する可能性は十分に考えられる。従って Aly2 の機能の全容解明にはさらなる標的の網羅的探索が必要と思われる。

2. Aly2 のエンドサイトーシス促進以外の機能

Aly2 の標的は、*aly2Δ*株がカナバニン耐性を示すことに基づき、Can1-EGFP の局在を指標にして探索した。その結果、アスパラギン酸またはグルタミン酸刺激に応答した Can1 の局在制御が野生株と *aly2Δ*株とで異なること、また Nutrient supplement による Can1 の局在制御が *DIP5* の遺伝子破壊によって抑圧されたこと（図 5、6）から、Aly2 が Dip5 を介して間接的に Can1 の局在制御に関与することがわかった。

しかし *aly2Δ*株のカナバニン耐性は培地にアスパラギン酸やグルタミン酸が含まれていなくても観察された（神谷昌男、平成 18 年度博士論文）ことから、Aly2 の Can1 活性への関与はこのような Dip5 を介した機構が全てではなく、未知の機構も存在すると考えられる。

興味深いことに、筆者らと並行して Aly2 の機能解析を行っている Cyert らのグループは Aly2 が Gap1 の細胞膜局在に対して正にはたらくことを報告している（O'Donnell et al., 2010）。その報告によれば、Aly2 はクラスリンおよびクラスリンアダプター複合体 AP-1 と *in vivo* で結合する。エンドサイトーシス過程で機能する AP-2 とは異なり、AP-1 はエンドソームからゴルジ体への細胞内輸送過程で特異的に機能することから、彼女らは Aly2 がクラスリンのリクルートを介して Gap1 のエンドソームからゴルジ体への輸送に寄与すると

推測している。これはクラスリンのリクルートを介して機能する点で哺乳類 β -アレスチンのエンドサイトーシス制御機序と類似しており、**Rsp5** アダプターとしての機序とは異なる。すなわち **Aly2** は **Gap1** の局在を輸送過程、作用機序ともに **Dip5** の場合とは異なる形で制御していると考えられる。**Can1** も **Gap1** と同様の過程や機序で **Aly2** による制御を受けているのかもしれない。

なおこれまで他の 9 つのアレスチン様タンパク質に関して、エンドサイトーシス以外の輸送過程への関与が示されている例はない。しかし 10 個のアレスチン様タンパク質以外にも、アレスチンドメインと立体的に類似した部分構造をもつタンパク質として **Bul1/2** や **Vps26** があり（ただしこれらの部分構造とアレスチンとの一次配列上の類似性は限定的なものであり、よってこれらがアレスチンドメインであるか否かについてはコンセンサスがとれていない。そこでここでは **Bul1/2**、**Vps26** と 10 個のアレスチン様タンパク質を合わせた計 13 個のタンパク質を「広義のアレスチン様タンパク質」と呼ぶこととする、**Nikko and Pelham, 2009**、**Alvarez, 2008**）、前者はゴルジ体から液胞への輸送およびエンドサイトーシス、後者はエンドソームからゴルジ体への輸送にそれぞれ寄与することが知られている（**Helliwell et al., 2001**、**Risinger and Kaiser, 2008**、**Reddy and Seaman, 2001**）。具体的な機序としては、**Bul1/2** はアレスチン様タンパク質と同様に **Rsp5** アダプターとして働く（**Helliwell et al., 2001**）。一方 **Vps26** については詳細は不明であるが、少なくとも膜タンパク質の認識に関与するとされている（**Reddy and Seaman, 2001**）。このように広義のアレスチン様タンパク質群は、膜タンパク質の認識を介して様々な輸送過程に広汎に関与している可能性がある。

特に **Aly2** は **Dip5** と **Gap1** に対してそれぞれ異なる輸送過程に異なる機序で関与する、すなわち複数の機能を併せ持つことが示されている点で独特である。よって **Aly2** をモデルとして、アレスチン様タンパク質が複数の機能をどう使い分けているか、また関与する輸送過程ごとに標的の選択性がどう異なるかという新たな問題にアプローチすることが出来ると考えられる。

3. **Aly2** の **Rsp5** アダプターとしての機能

本研究では **Aly2** が **Dip5** のエンドサイトーシスに寄与する機序についても具体的に調べた。その結果 **Aly2** は **Dip5** のユビキチン化に寄与すること、また **Rsp5** と **Dip5** の両者と結合することが示された（図 16、17、18、20）。これらのことから、**Dip5** のエンドサイトーシスに際して、**Aly2** は他のアレスチン様タンパク質と同様に **Rsp5** アダプターとして **Dip5** のユビキチン化を仲介すると考えられる。**Rsp5** との結合が PY モチーフを介している（図 17）点も他と共通であった。

また Aly2 自身も Rsp5 依存的にユビキチン化されていることがわかった (図 19)。この修飾の生理的意義は不明だが、*in vitro* での Rsp5 基質の網羅的探索ではアレスチン様タンパク質の多くが同定されており (Gupta et al., 2007)、Rsp5 によるユビキチン化はこのファミリーのタンパク質に共通であるらしい。そのうち Can1 を標的とする Ldb19 に関してはユビキチン化箇所が判明しており、その箇所に変異を導入した株はカナバニン感受性になる (Lin et al., 2008) ことから、Ldb19 が正常に機能するためにはユビキチン化が必要と考えられている。

アレスチン様タンパク質のユビキチン化の役割をより具体的に調べる上で、Aly2 についてもユビキチン化箇所を同定することは重要と考えられる。

4. アレスチン様タンパク質の存在意義

既存のアレスチン様タンパク質の解析はいずれも標的の同定と Rsp5 アダプターとしての作用機序の解析に主眼が置かれており (Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009、Nikko et al., 2008)、環境に応答したエンドサイトーシス制御におけるアレスチン様タンパク質の役割についてはほとんど調べられてこなかった。しかし筆者はそれこそがアレスチン様タンパク質の主要な存在意義であると推測した。細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスを実現するだけであれば Rsp5 が直接それらに結合してユビキチン化することで十分であり、アダプターは必要ないはずである (実際に Can1 に人工的に PY モチーフを挿入するとエンドサイトーシスされる (Lin et al., 2008))。しかし仮にアダプターを介さない場合、Rsp5 は全ての細胞膜タンパク質に対して共通に作用するため、環境に応じて任意の細胞膜タンパク質を選択性をもって制御することが困難であると思われる。この問題を解決するために、明確な標的選択性をもつアレスチン様タンパク質が Rsp5 と細胞膜タンパク質との結合を仲介するのではないかと考えた。

そこで本研究では Aly2 をモデルとして、環境に応答したエンドサイトーシス制御におけるアレスチン様タンパク質の役割についても調べた。

5. 輸送基質濃度によるエンドサイトーシス制御機構

基質刺激による Dip5 のエンドサイトーシス制御機構について調べたところ、Aly2 と Dip5 との結合はアスパラギン酸刺激によって亢進することがわかった (図 20)。このことから Aly2 は Rsp5 を輸送基質依存的に Dip5 へとリクルートしてユビキチン化を促進し、エンドサイトーシスを誘導すると考えられた (図 39)。これによりトランスポーターのユビキチン化とそれに続くエンドサイトーシスが基質濃度によって制御される機構が初めて明らかとなった。アレスチンと細胞膜タンパク質との結合が制御されるのは哺乳類 GPCR の

場合（図 2）と共通であり、この機構はトランスポーターに限定されるものではないと考えられる。

次に問題となるのは Aly2 と Dip5 との結合が制御される機構である。哺乳類 GPCR の場合まずリガンド依存的に細胞内領域が GRK によってリン酸化され、そこを β -アレスチンが認識する（Moore et al., 2007）。これと同様の機構が Dip5 と Aly2 の場合にも存在する可能性が考えられた。

実際に Dip5 はリン酸化されており（図 21）、推定リン酸化部位に変異を導入するとエンドサイトーシス効率への影響が見られた（図 22B）ことから、この部位のリン酸化が Aly2 による認識に関わっている可能性がある。しかしアラニン置換によってエンドサイトーシスが完全に阻害されたわけではなく、またアスパラギン酸置換によって恒常的なエンドサイトーシスは見られず依然として基質によるエンドサイトーシス誘導が見られた（図 22B）ことから、Dip5 のエンドサイトーシス誘導には別の要素も関与するようである。

1 つの可能性としては、Dip5 には他にも重複した役割をもつリン酸化部位が存在することが考えられる。実際に Dip5 の N 末端細胞内領域にはもう 1 つのセリン・スレオニンに富む領域がある（⁵⁴SSRSSTSTSPS、図 22A）。こちらはリン酸化プロテオーム解析ではリン酸化部位として検出されていない（Bodenmiller et al., 2007）ものの、実際にはリン酸化を受けて Aly2 との結合に関わっている可能性が考えられる。よってこちらの部位にも変異を導入し、Dip5 のエンドサイトーシスとの関連を検討する必要がある。

特に重要なことは、Dip5 のリン酸化が基質濃度に応答して制御されることで Aly2 との結合が制御されるのか、それともリン酸化は恒常的に起こっており Aly2 との結合の必要条件に過ぎないのかという問題である。Dip5 は基質のない条件下でもリン酸化されており（図 21）、それが基質刺激によってさらに亢進するか否かは現時点で不明である。これは Dip5 への³²P取り込み実験で調べることが可能と思われる。

またどのキナーゼが Dip5 をリン酸化するのも不明である。酵母にも GRK のはたらきをするキナーゼがあるのか、またあるとすれば GPCR とトランスポーターを共通に基質とするのかは興味深い点である。

6. Dip5 の基質認識から Aly2 との結合に至る過程のモデル

Dip5 が基質を認識してから Aly2 と結合するまでの過程について、想定される 2 通りのモデルを図 40 に示した。

モデル A では Dip5 が基質依存的に構造変化し、それによって何らかのキナーゼに認識されてリン酸化を受け、続いてそこを Aly2 が認識して結合する。哺乳類 GPCR の場合もリガンド依存的な構造変化が GRK による認識およびリン酸化を誘導すると考えられており

(Boguth et al., 2010)、このモデルは哺乳類の GPCR-GRK- β -アレスチン系と相同である。

モデル B では Dip5 は恒常的にリン酸化されているが、基質のない状態では Aly2 と結合できず、基質輸送に伴って構造変化することで結合可能になる。哺乳類の GPCR に関して、リン酸化だけでなくリガンドとの結合も β -アレスチンとの親和性に寄与するという報告がある (Pan et al., 2003)。

2 つのモデルは Dip5 が基質を認識したことをキナーゼと Aly2 のどちらが最初に検知するかという点で異なるが、どちらの場合でも検知されるのは Dip5 の構造変化であると想定している。実際にアミノ酸トランスポーターには基質結合部位が細胞外を向いた構造と細胞内を向いた構造とがあり、基質輸送に伴って外向き構造から内向き構造へと変化することがわかっている (Reyes et al., 2009)。ただし外向き構造と内向き構造とで他のタンパク質との親和性が変化する例はこれまで知られていない。

モデル A の検証のためには、まず Dip5 のリン酸化を担うキナーゼを探索する必要がある。一方モデル B を検証するためには、精製したリン酸化型 Dip5 を人工膜系に再構築し、独立に精製した Aly2 との *in vitro* での結合能が反応系中の基質の有無で変化するかを調べる方法が考えられる。

7. 基質以外の刺激による Dip5 のエンドサイトーシス誘導

本研究では基質刺激以外にも、Dip5 のエンドサイトーシスが誘導される条件として、高温ストレス、シクロヘキシミド処理、TORC1 阻害の 3 つを見出した (図 23 から 25)。他のトランスポーターでは刺激の種類によって担当するアレスチン様タンパク質が異なる例がある (図 4、Lin et al., 2008、Nikko and Pelham, 2009) が、Dip5 エンドサイトーシスの場合はどの刺激による誘導にも Aly2 が寄与していた (図 23 から 25)。しかし寄与の程度は刺激によって差が見られ、特にシクロヘキシミド処理では *aly24* 株でも Dip5 のかなりの部分がエンドサイトーシスされていた (図 24)。この場合では Aly1 をはじめとした他のアレスチン様タンパク質の寄与が大きいのかかもしれない。

これら基質以外の刺激が Dip5 のエンドサイトーシスを誘導する機構は、上で提案した Dip5 の基質輸送に伴う構造変化を起点とする機構 (図 40) とは異なると考えられる。このうち高温ストレスとシクロヘキシミド処理による Dip5 エンドサイトーシス誘導については、制御点が Dip5、Aly2、またはそれ以外のエンドサイトーシス関連因子のいずれであるか現時点で不明であり、今後の課題である。特に高温ストレスに関しては、Slm1/2 がウラシルトランスポーター Fur4 のエンドサイトーシス誘導に関わることが既に知られている (Bultynck et al., 2006)。よって Slm1/2 が Dip5 のエンドサイトーシスにも関わるかどうかを確認し、もし関わるのであればこれらの機能や Aly2 との関係を調べることは重要と考

えられる。

8. TORC1-Npr1 経路によるAly2 の制御

一方 TORC1 阻害に関しては Aly2 量の増加が観察され (図 27)、Aly2 が制御点であることがわかった。これはアレスチン様タンパク質自体が刺激に応答して制御されることが示された初めての例である。興味深いことに TORC1 阻害によるエンドサイトーシス誘導は全てのトランスポーターに共通ではなく、選択性がある (Schmidt et al., 1998、Beck et al., 1999)。このことは制御点がアレスチン様タンパク質であることに起因するかもしれない。すなわち Aly2 のように TORC1 阻害によって量が増えるアレスチン様タンパク質と増えないアレスチン様タンパク質とがあり、Dip5 のように増えるものが標的とするトランスポーターのみが選択的にエンドサイトーシスされるというモデルが考えられる (図 41)。このモデルが正しいならば、アレスチン様タンパク質の標的選択性が TORC1 阻害によるエンドサイトーシスの積み荷選択性の基盤になっていることになる。これを検証するためには、Aly2 以外のアレスチン様タンパク質についても TORC1 阻害で量が増えるか否かを網羅的に調べ、それぞれの標的トランスポーターが TORC1 阻害によってエンドサイトーシスされるかどうかとの対応を見ることが必要と考えられる。

また TORC1 による Aly2 量の制御は下流の Npr1 を介していることがわかった (図 28)。Npr1 は Dip5 のエンドサイトーシスのみならず転写にも関与しており (図 26)、二重に Dip5 を制御している。

なお Cyert らによれば Npr1 は Aly2 を直接のリン酸化基質とする (ただしリン酸化の意義は不明、O'Donnell et al., 2010)。よって Npr1 は Aly2 の機能を量とリン酸化とで二重に制御している可能性がある。または Aly2 のリン酸化が分解抑制を介して量の増加をもたらす可能性も考えられ、量とリン酸化との関連についてはさらなる解析が必要である。

さらに最近、Ldb19 も Npr1 依存的にリン酸化されることが報告された (ただしこちらもリン酸化の意義は不明、Hsu et al., 2010)。従って Npr1 は複数のアレスチン様タンパク質の制御を介して広汎にトランスポーターのエンドサイトーシスを制御していると考えられる。

9. M期特異的なDip5 のエンドサイトーシス

Dip5 のエンドサイトーシスは基質刺激やストレス刺激によって誘導されることに加え、何も刺激を加えない通常の培養条件下でも観察された。興味深いことに、それは細胞周期の M 期、なかでも metaphase 以前に集中して起こっていることがわかった (図 30 から 33)。この M 期特異的なエンドサイトーシスにも Aly2 が寄与する (図 30)。

SC 培地の組成では、培地にアスパラギン酸やグルタミン酸があると細胞の G1 期から S 期への移行が阻害された (図 37、38)。よって Dip5 が M 期のうちにエンドサイトーシスされることは細胞周期の進行、ひいては生育に重要であるようだ。取り込まれるアミノ酸が偏ると細胞の生育が阻害されることが知られており (Risinger et al., 2006)、SC 培地の条件ではアスパラギン酸やグルタミン酸が他のアミノ酸と比べて過剰に取り込まれるのかもしれない。しかしそれらが G1 期から S 期への移行に特に深刻に影響する理由は不明である。

一方で培地中のアルギニンは生育に悪影響を及ぼさなかった (図 37G)。このことは Can1 に関しては細胞周期依存的なエンドサイトーシスが観察されなかった (図 34) こととよく対応する。すなわち G1 期におけるアスパラギン酸やグルタミン酸の取り込みは S 期への移行阻害をもたらすため、細胞は G1 期に進入する前に Dip5 をエンドサイトーシスさせることでそれを回避するが、アルギニンは細胞周期を通じて取り込まれても害が無いため、Can1 は細胞周期を通じて細胞膜上に局在させておくという解釈が可能である。

10. 細胞周期進行による Aly2 の制御

アレクチン様タンパク質の機能と細胞周期との関連はこれまで報告されていなかった。本研究では Aly2 への細胞周期の影響を調べた結果、Aly2 の量が M 期の metaphase 以前をピークに振動することがわかった (図 33、35)。これは Dip5 のエンドサイトーシスのピークと一致することから、M 期特異的な Dip5 エンドサイトーシスも Aly2 が制御点であることが示唆された。マイクロアレイ解析によれば *ALY2* の転写量は細胞周期に沿って振動し、そのピークは M 期にあたる (図 42A、Spellman et al., 1998、Cho et al., 1998、Pramila et al., 2006) ことから、Aly2 量の振動には転写量の振動が寄与していると考えられる。また *DIP5* 自身の転写も周期性を示し、ピークは S 期にあたる (Spellman et al., 1998、Cho et al., 1998、Pramila et al., 2006)。従って Dip5 が S 期に細胞膜上に現れ M 期に分解される (図 31) のは、自身の転写とエンドサイトーシスがそれぞれ S 期、M 期に活発に起こるためと考えられる。

さらに Aly2 のリン酸化も M 期に亢進することが示唆された (図 33、35)。Clb2-Cdc28 (酵母 M 期サイクリン-CDK1 複合体) の *in vitro* および *in vivo* での基質を網羅的に探索した研究ではともに Aly2 が高いスコアで同定されている (図 42B、C、Ubersax et al., 2003、Holt et al., 2009) ことから、Aly2 の M 期特異的なリン酸化を担うのは Clb2-Cdc28 である可能性が高い。このリン酸化の意義は不明だが、転写振動とともに Aly2 の機能の細胞周期依存性に寄与しているかもしれない。少なくとも 2 つのセリン残基 (213S、176S) が Clb2-Cdc28 依存的にリン酸化を受けることがわかっている (図 42C、Holt et al., 2009)

ため、これらに変異を導入して **Dip5** のエンドサイトーシスに影響が出るかを確かめる必要がある。

11. アレスチン様タンパク質と細胞周期

一方で **LDB19** と **CAN1** の転写は細胞周期に沿って振動しない (図 42A, Spellman et al., 1998, Cho et al., 1998, Pramila et al., 2006)。また **Ldb19** は **Clb2-Cdc28** の良い基質ではない (図 42B、C、Ubersax et al., 2003, Holt et al., 2009)。これらのことが **Can1** のエンドサイトーシスが細胞周期依存性を示さない (図 34) 理由である可能性がある。すなわちアレスチン様タンパク質の細胞周期依存性の違いが、それぞれが標的とする細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスの細胞周期依存性の違いを生み、それらの細胞周期進行に沿った再編成を可能にするというモデルが考えられる (図 43)。

なお **Aly2** や **Ldb19** 以外のアレスチン様タンパク質についても、転写の細胞周期依存性と **Clb2-Cdc28** 基質としてのスコアを図 42 にまとめた。ここからアレスチン様タンパク質が細胞周期進行に沿ってそれぞれ異なった制御を受けていることがわかる。10 個のアレスチン様タンパク質のうち、**Aly2** の転写の細胞周期依存性は **Rod1** に次いで 2 番目 (図 42A)、*in vitro* での **Clb2-Cdc28** 基質としてのスコアは **Csr2** に次いで 2 番目 (図 42B)、*in vivo* での **Cdc28** 依存的なリン酸化のスコアは **213S** が 1 番目 (図 42C) と、いずれも上位である。このことから **Aly2** の機能は細胞周期の進行に沿って特に強く制御され、従って **Aly2** の標的細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスは細胞周期依存性を特に顕著に示すと推測される。どのような細胞膜タンパク質群が細胞周期に沿って制御されるのか、またその生理的意義が何であるかは興味深く、その観点からも、**Aly2** の標的を **Dip5** 以外にも網羅的に探索することは有意義であると考えられる。

12. 本研究のまとめ…エンドサイトーシスの個別制御とグループ制御

本研究では **Aly2** の機能解析を通して、エンドサイトーシスの積み荷選択性の分子基盤と環境に応答した制御機構の一端を明らかにすることが出来た。

特に興味深い点として、**Dip5** のエンドサイトーシスを誘導する条件が基質刺激である場合と、**TORC1** 阻害または細胞周期進行である場合とでは、いずれも **Aly2** が寄与するにもかかわらず制御点が変わることがわかった。基質刺激によって制御されるのは **Dip5** と **Aly2** との結合であるのに対して、**TORC1** や細胞周期進行によって制御されるのは **Aly2** 自体の量や修飾であった。

二つの制御点の相違の生理的意義は次のように解釈できる。基質濃度の上昇に際しては対応するトランスポーターのみがエンドサイトーシスされるべきであり、そのためにその

トランスポーター特異的にアレスチン様タンパク質との結合が促進される。これは個別制御と呼ばれるべき機構である。それに対してより広い意味での栄養源飢餓 (TORC1 阻害) や細胞周期の進行に対しては除去すべき細胞膜タンパク質が多くあるため、細胞はアレスチン様タンパク質自体の機能を促進し、それが標的とする細胞膜タンパク質を一括してエンドサイトーシスする。このとき全てのアレスチン様タンパク質の機能が一律に促進されるわけではなく、促進されないアレスチン様タンパク質の標的はエンドサイトーシスされずに細胞膜上に残る。こちらはグループ制御と呼ばれるべき機構である (図 44)。

すなわち細胞がさらされる環境の変化によって、ある特定の膜タンパク質の制御で対応すべき場合と、多くの膜タンパク質を同時にあるルールに従って再編成すべき場合とがあり、細胞は制御点を使い分けることでそれぞれの場合に対応していると考えられる。

13. 本研究の臨床医学的意義と今後の展望

ごく最近になり、哺乳類 β -アレスチンだけでなく哺乳類 α -アレスチンも GPCR のエンドサイトーシスに関わることが報告された (Nabhan et al., 2010)。哺乳類 α -アレスチンは PY モチーフを介して Rsp5 ホモログである HECT 型ユビキチンリガーゼ Nedd4 と結合し、アダプターとして GPCR のユビキチン化を仲介する。すなわち構造、機能ともに酵母アレスチン様タンパク質との間で保存されている。

哺乳類アレスチンが標的とする GPCR は重要な創薬ターゲットである。個々の GPCR を標的とした従来の薬剤に加えて、ある特定のグループの GPCR を一括してかつ選択的に機能調節する薬剤を創出できれば、より効果的に細胞機能を調節できると考えられる。このような薬剤の標的として、細胞膜タンパク質のグループ制御を担うと考えられる (図 44) アレスチンは有望である。

どのアレスチンを機能調節することで任意の GPCR グループを調節することが出来るかをゲノム情報から予測するためには、アレスチンと標的細胞膜タンパク質との間の対応関係の情報を大量に蓄積し、対応関係と両者の一次配列 (およびそこから予測される高次構造や電荷分布) との間に一般則を見出す必要がある。

酵母では図 4 に示した従来の知見に加えて Aly2 と Dip5 との対応が本研究により新たに明らかとなり、2008 年に初めてアレスチン様タンパク質とエンドサイトーシスとの関連が報告され (Lin et al., 2008) てからわずか 2 年で多くの対応関係が見出された。しかし未だ一般則の発見には至っておらず、さらなる情報の蓄積が必要である。

対応関係を網羅的に調べる上では遺伝学的手法が有用であり、実験材料に酵母を用いることに利点がある。図 37A では *ALY2* と *DIP5* との間に遺伝学的相互作用が見られた。酵母では遺伝学的相互作用をゲノム横断的に検出する手法が確立されており (Koh et al.,

2010)、このデータベースから大量の対応関係を抽出できる可能性がある。残念ながら現時点で利用できるデータベースからは明らかな対応関係は抽出されないが、原因としてはそれが完全培地である YPD 培地を利用していることが考えられる。*aly2Δ*株は YPD 培地では野生株と同様に生育し、従って *ALY2* と *DIP5* との間の遺伝学的相互作用は YPD 培地では検出できない (図 37B)。このようにアレスチン様タンパク質と細胞膜タンパク質との遺伝学的相互作用は培養条件に依存すると考えられ、ゲノム横断的な遺伝学的相互作用解析がより多くの培養条件で行われるのが待たれる。

また本研究により、アレスチン様タンパク質の量やリン酸化の制御によって細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスが調節されることが初めて示唆された。今後 *Aly2* をモデルとしてこれらの制御機構を詳細に解明することは、アレスチン機能調節薬の開発に大いに役立つと期待される。



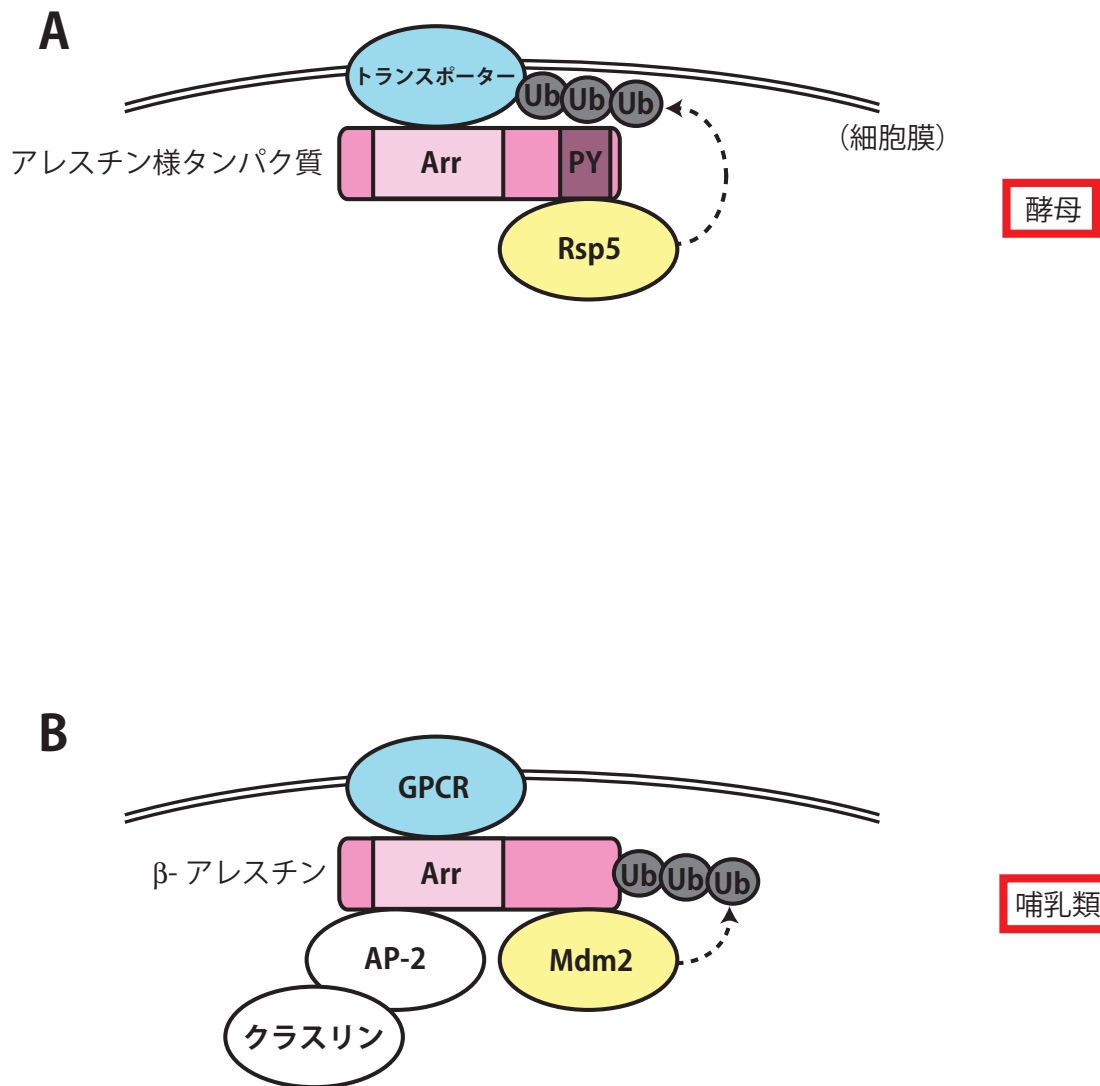
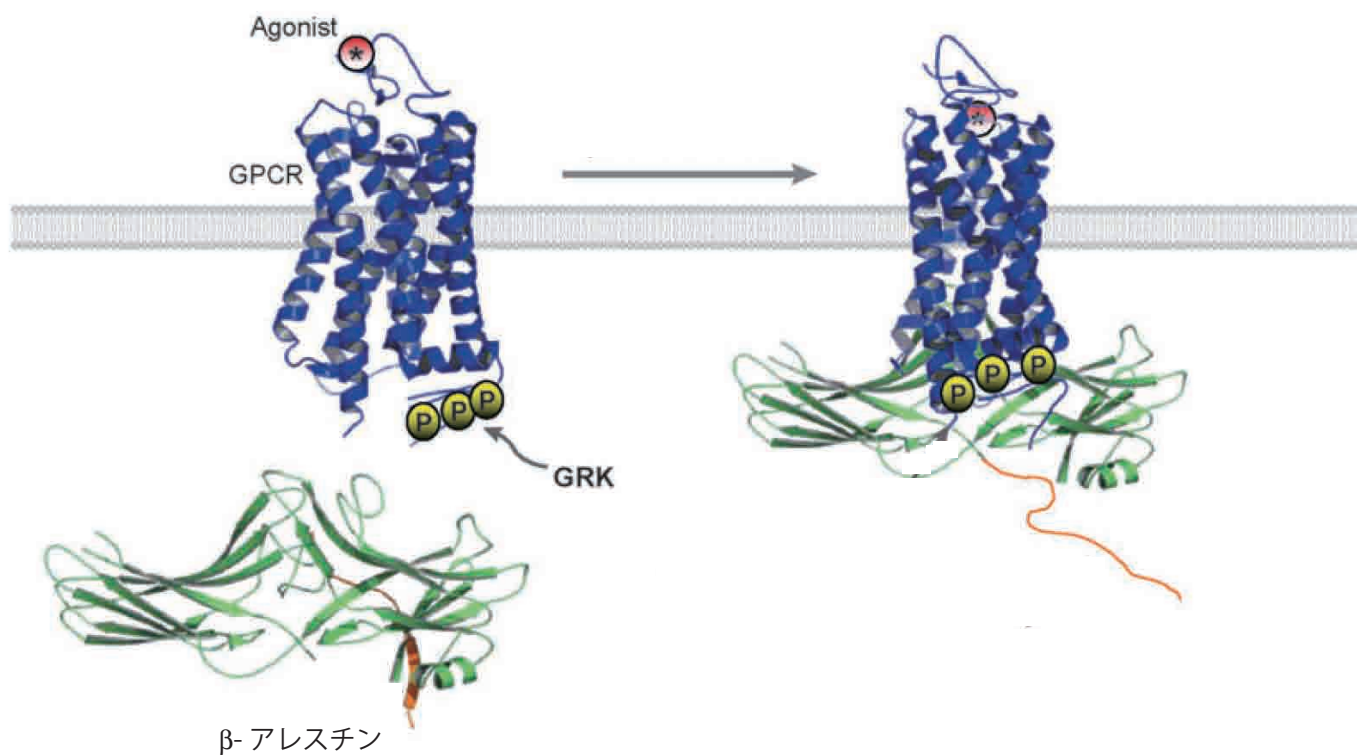


図1 アレスチンの機能

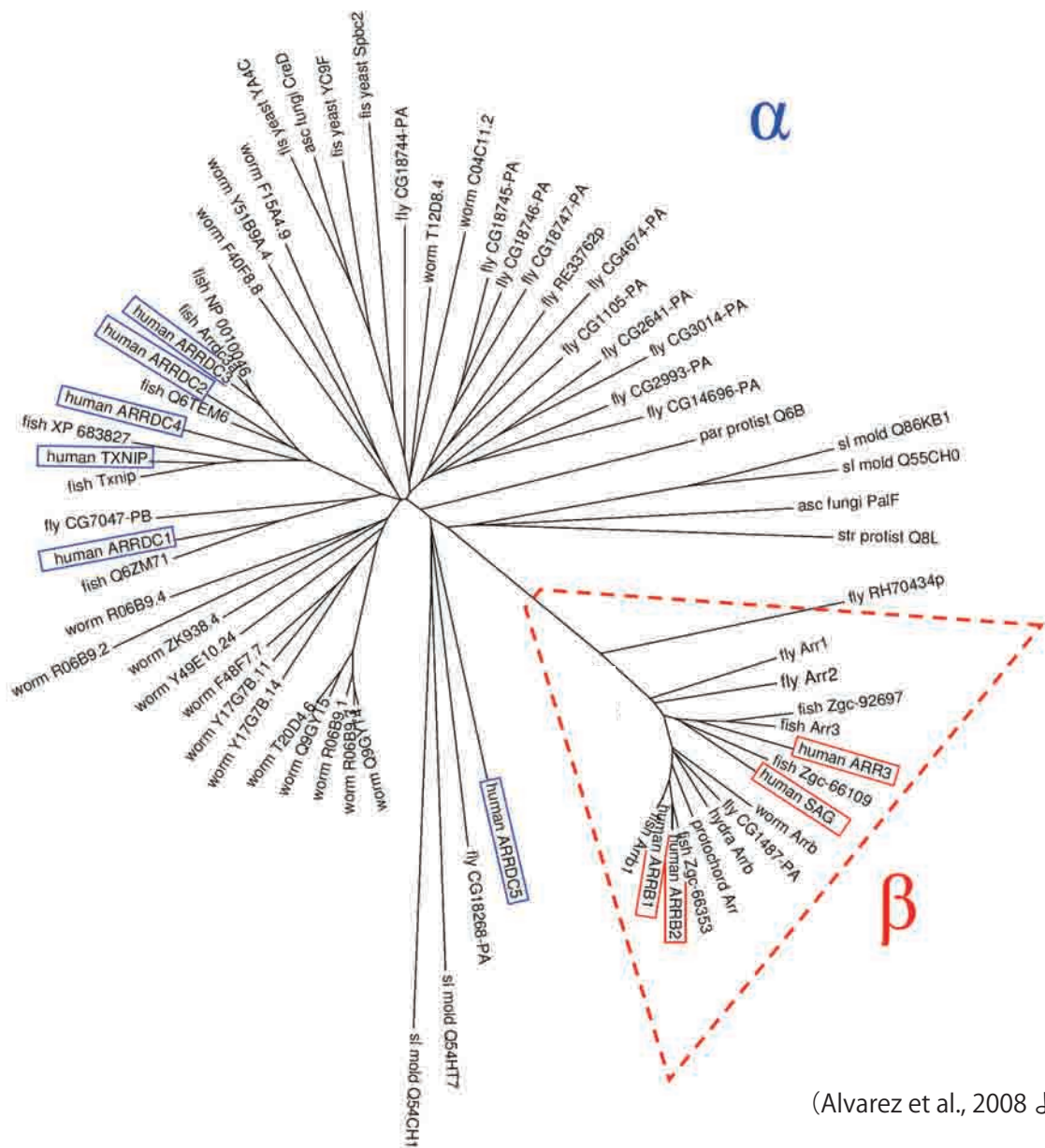
酵母アレスチン様タンパク質 (A) および哺乳類 β -アレスチン (B) の機能を示した。詳細は本文参照のこと。
 Arr: アレスチンドメイン、PY: PY モチーフ、Ub: ユビキチン。



(Moore et al., 2007 より改変)

図2 β- アレスチンと GPCR との結合

β- アレスチンの結晶構造および GPCR との結合様式。詳細は本文参照のこと。β- アレスチンのオレンジ色で示された部分は GPCR との結合により大きく配置が変化する領域であり、クラスリンや AP-2 との結合ドメインを含む。



(Alvarez et al., 2008 より改変)

図3 アレスチンの種間保存

β-アレスチン（赤枠内）およびα-アレスチン（赤枠外）の分子系統樹。ただしこの図には酵母 *S. cerevisiae* のアレスチン様タンパク質は含まれていない。以下、種名略語。

str_protist: stramenopiles 9STRA, ストラメノパイル（原生生物の一種）

par_protist: *Paramecium tetraurelia*, アルベオラータ（原生生物の一種）

sl_mold: *Dictyostelium discoideum*, 粘菌

fis_yeast: *Schizosaccharomyces pombe*, 分裂酵母

asc_fungus: *Emericella nidulans*, 糸状菌

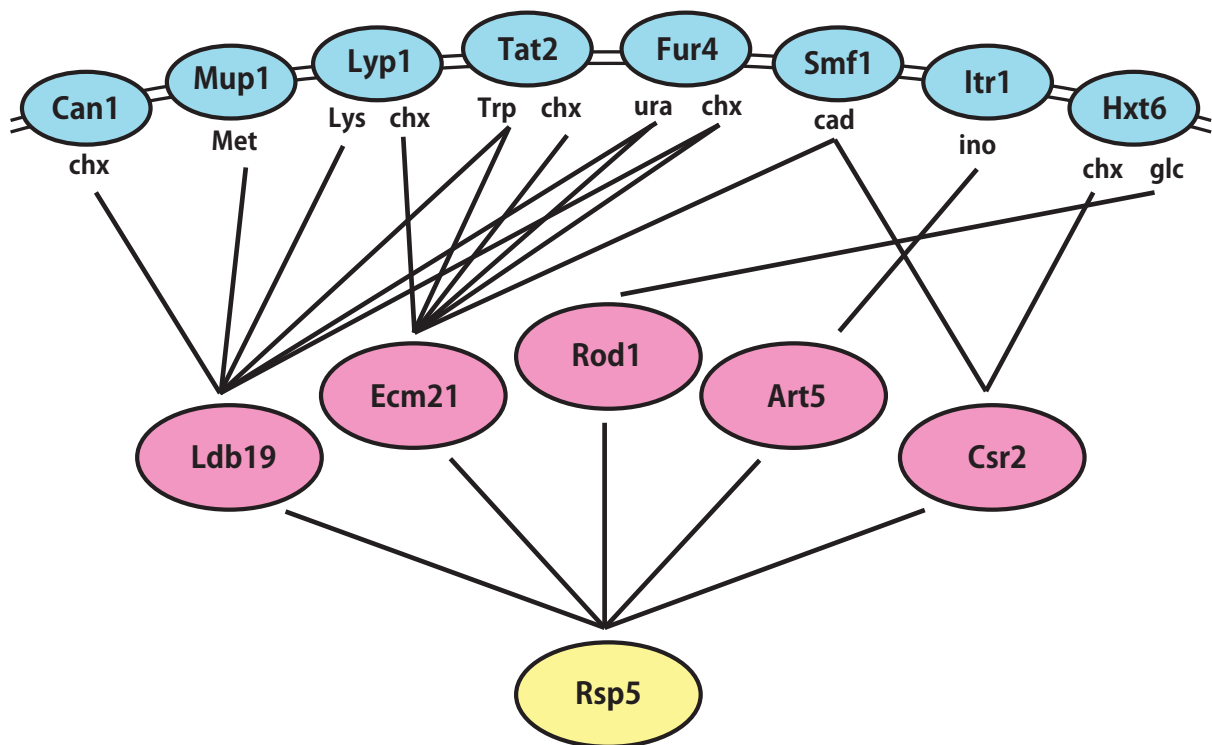
hydra: *Hydra magnipapillata*, ヒドラ（無脊椎動物の一種）

worm: *Caenorhabditis elegans*, 線虫

fly: *Drosophila melanogaster*, ショウジョウバエ

protochord: *Ciona intestinalis*, ホヤ

fish: *Danio rerio*, ゼブラフィッシュ



アルカリ応答

機能未知

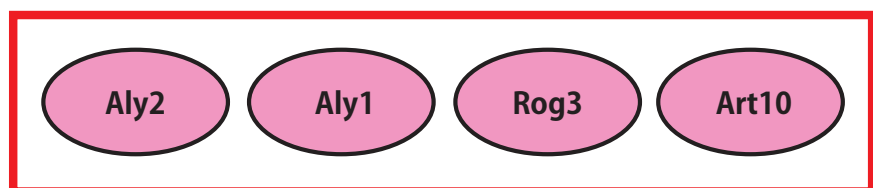
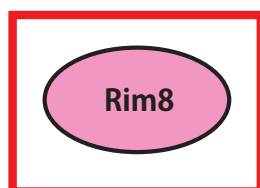


図4 アレスチン様タンパク質と細胞膜タンパク質の対応

それぞれの酵母アレスチン様タンパク質が標的とする細胞膜タンパク質、およびエンドサイトーシスを誘導する刺激を示した。詳細は本文参照のこと。以下、各細胞膜タンパク質の機能。

Can1: アルギニントランスポーター、Mup1: メチオニントランスポーター、Lyp1: リジントランスポーター、Tat2: トリプトファントランスポーター、Fur4: ウラシルトランスポーター、Smf1: マンガントランスポーター、Itr1: イノシトールトランスポーター、Hxt6: グルコーストランスポーター。

以下、刺激略語。chx: シクロヘキシミド、ura: ウラシル、cad: カドミウム、ino: イノシトール、glc: グルコース、それ以外はアミノ酸。

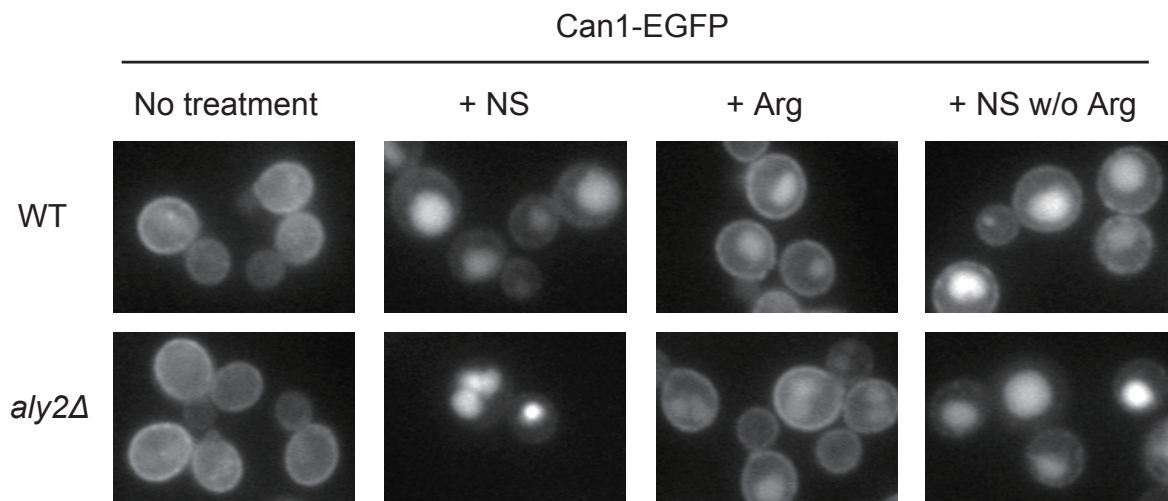


図5 *aly2Δ*株では nutrient supplement に応答した Can1 の局在変化が過剰に起こる

SD 培地で培養した RK349 株 (WT) と RK356 株 (*aly2Δ*) を nutrient supplement (NS)、20 g/ml アルギニン、または NS からアルギニンを除いたもの (NS w/o Arg) で 180 分間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Can1-EGFP の局在を観察した。

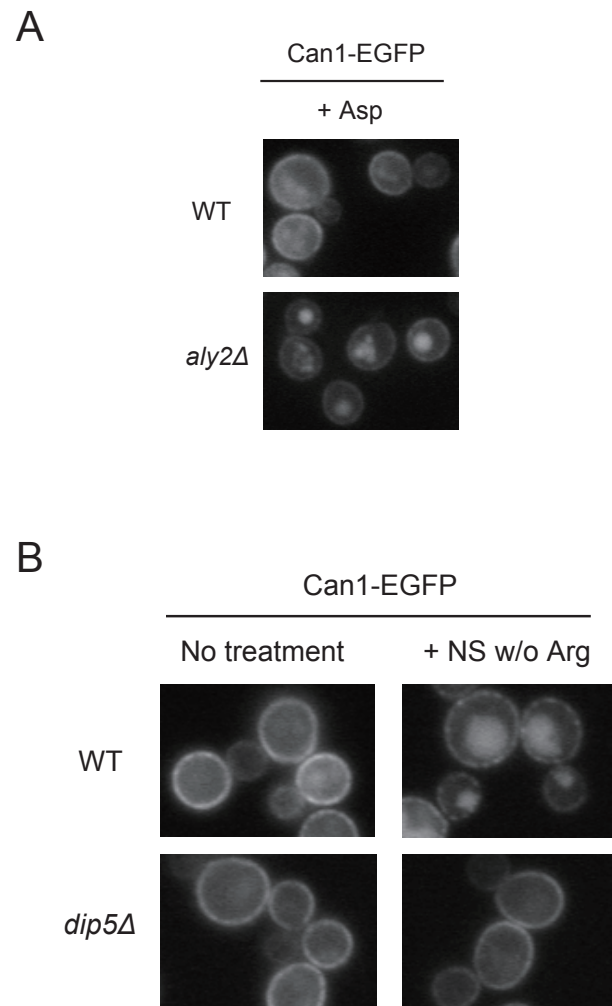


図6 *aly2Δ*株では Dip5 を介したアスパラギン酸への Can1 の応答が過剰に起こる

(A) SD 培地で培養した RK349 株 (WT) と RK356 株 (*aly2Δ*) を 1mg/ml アスパラギン酸で 120 分間処理し、ゲノム由来の Can1-EGFP の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

(B) SD 培地で培養した RK349 株 (WT) と RK724 株 (*dip5Δ*) を NS からアルギニンを除いたもので 180 分間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Can1-EGFP の局在を観察した。

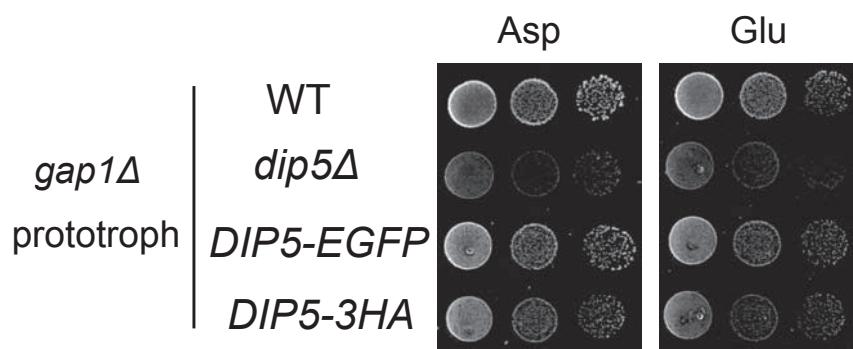


図7 C末端側にEGFPや3HAを融合したDip5は機能的である

RK807株(WT)、RK811株(*dip5Δ*)、RK809株(*DIP5-EGFP*)およびRK821株(*DIP5-3HA*)にそれぞれpRS415とpRK145、pRS415とpRK145、pRS415とpRS416、およびpRS415とpRS416を形質転換して栄養要求性を相補し、アスパラギン酸またはグルタミン酸を唯一の窒素源とするプレート培地で8日間培養した。菌体数は左から30,000、3,000、300。

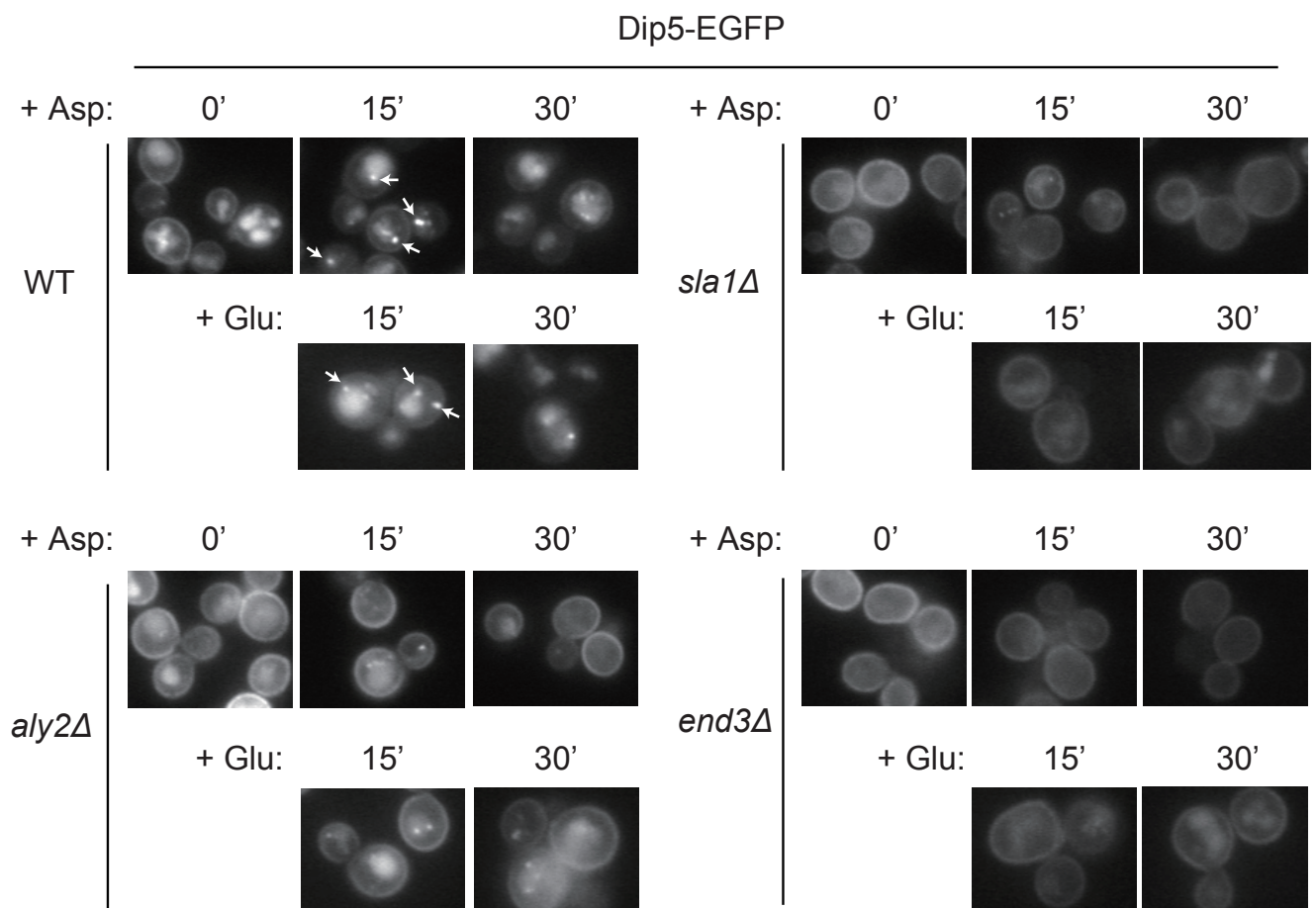


図8 Dip5 の通常条件下および輸送基質に応答した正常なエンドサイトーシスには Aly2 が必要である

SD 培地で培養した RK592 株 (WT)、RK599 株 (*aly2Δ*)、RK694 株 (*sla1Δ*) および RK703 株 (*end3Δ*) を 200 g/ml アスパラギン酸または 200 g/ml グルタミン酸で表記の時間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。WT、15' ではエンドソーム様のドットを矢印で指し示した。

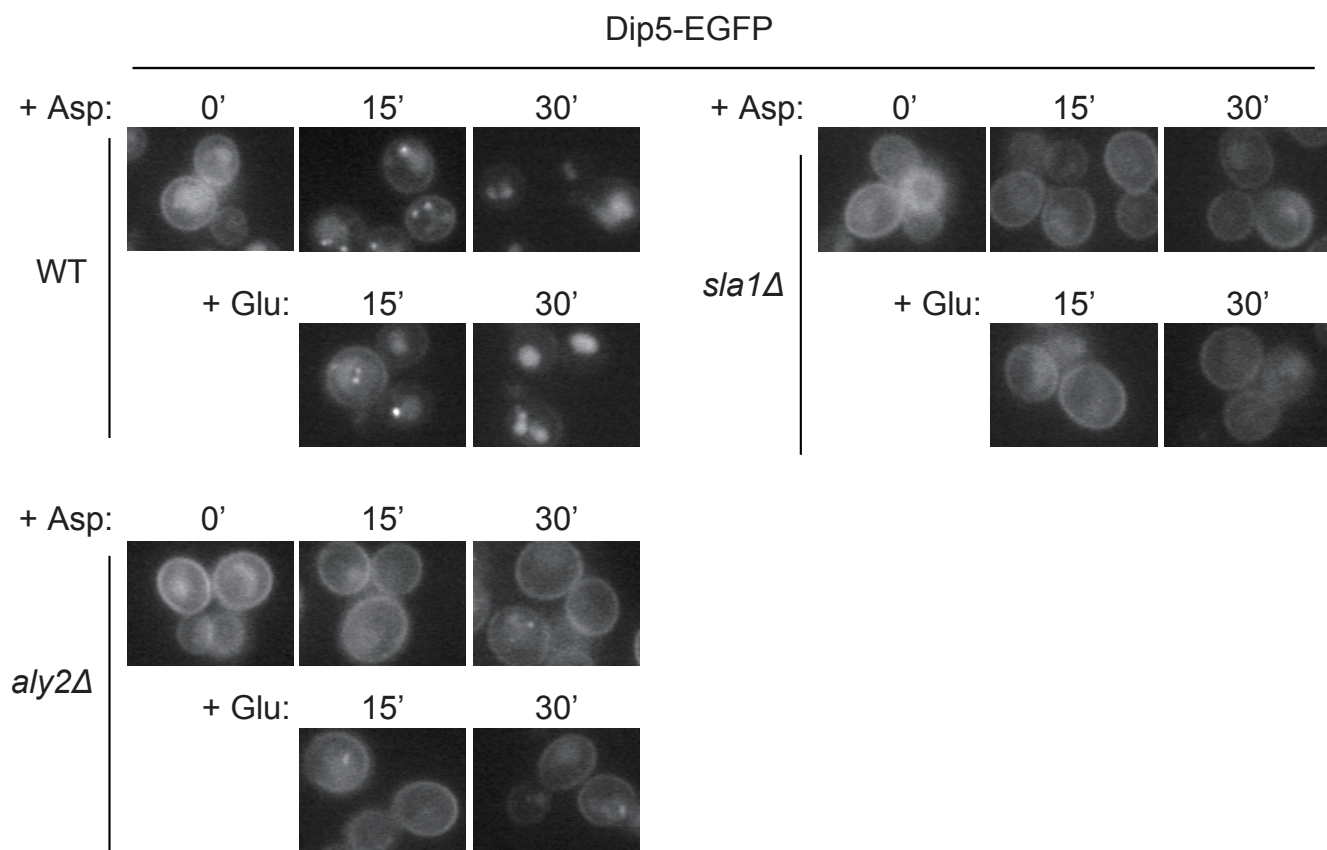


図9 尿素を窒素源とした培地でも基質に応答した正常な Dip5 エンドサイトーシスには Aly2 が必要である

尿素を窒素源とした培地で培養した RK592 株 (WT)、RK599 株 (*aly2Δ*) および RK694 株 (*sla1Δ*) を 200 g/ml アスパラギン酸または 200 g/ml グルタミン酸で表記の時間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

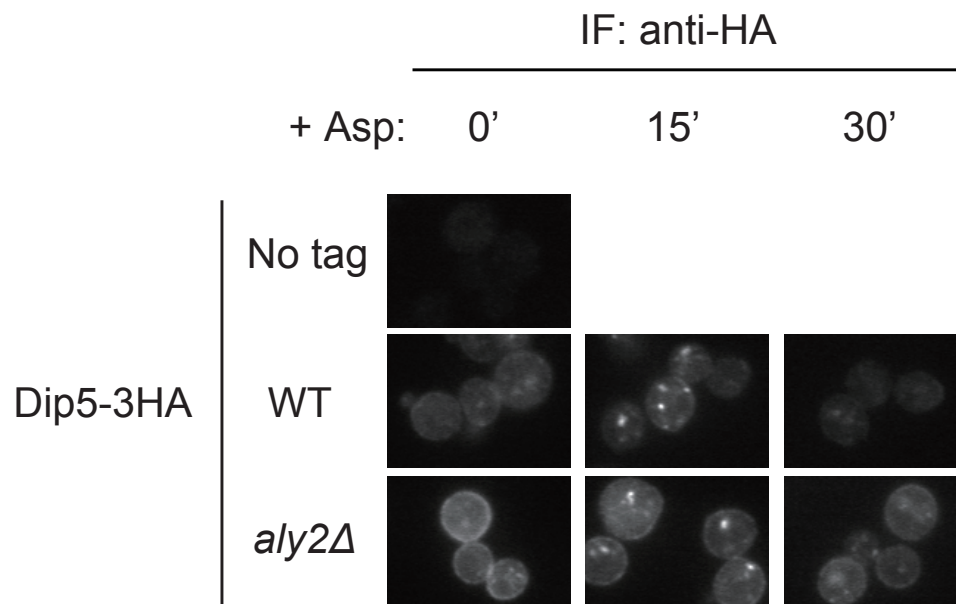


図 10 Dip5 の正常なエンドサイトーシスには Aly2 が必要である（免疫染色法による観察）

SD 培地で培養した TM141 株（No tag）、RK637(WT) および RK789 株（*aly2Δ*）を 200 g/ml アスパラギン酸で表記の時間処理し、抗 HA 抗体を用いた免疫染色法でゲノム由来の Dip5-3HA の局在を観察した。

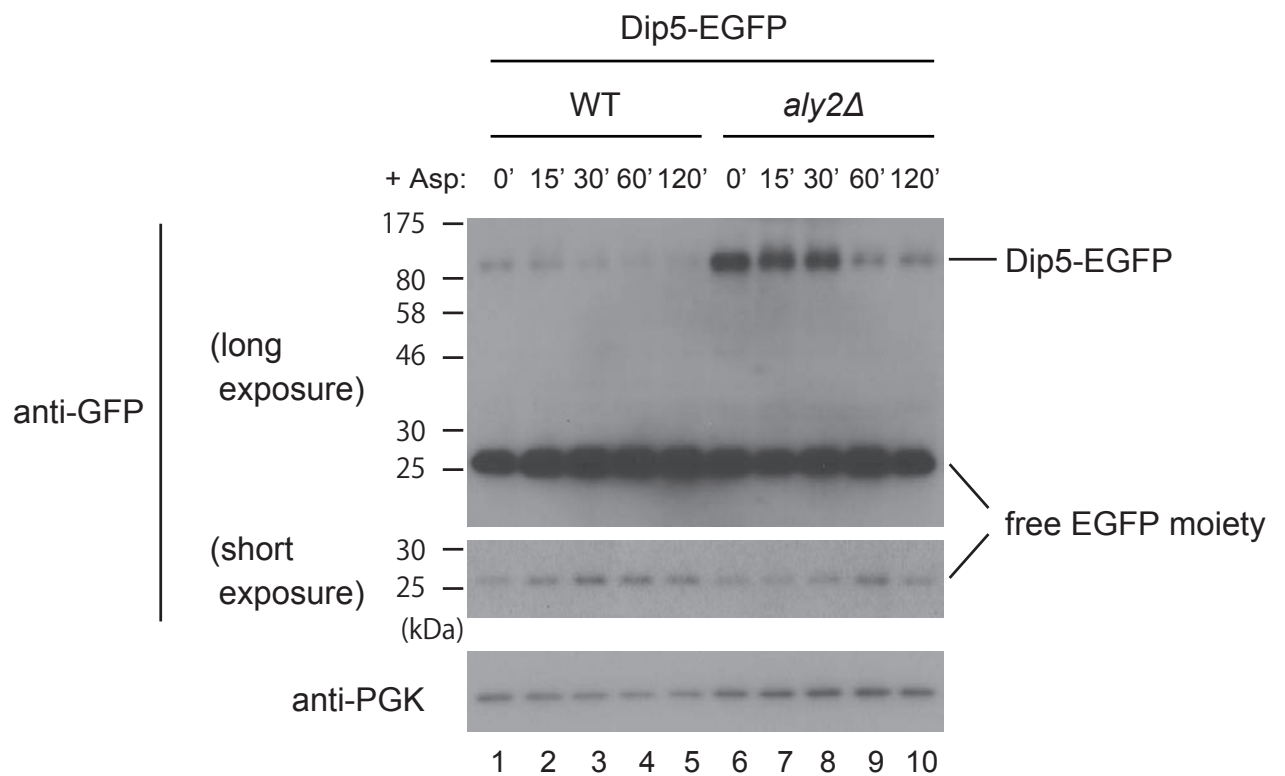


図 11 Dip5 の正常な液胞分解には Aly2 が必要である

SD 培地で培養した RK592 株 (WT) と RK599 株 (*aly2Δ*) を 200 g/ml アスパラギン酸で表記の時間処理した。表記の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Dip5-EGFP、遊離 EGFP および Pgk1 を検出した。

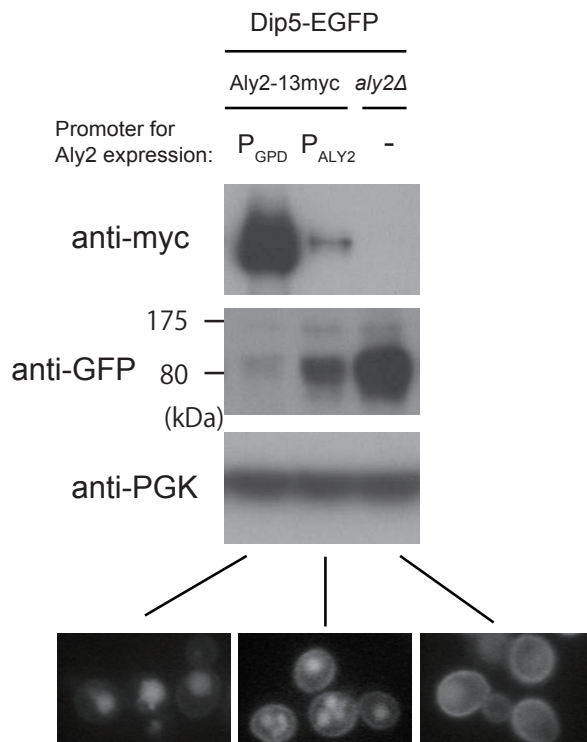


図 12 Aly2 の過剰発現は Dip5 の恒常的なエンドサイトーシスを引き起こす

RK899 株 (P_{GPD})、RK733 株 (P_{ALY2}) および RK913 株 (-) を SD 培地で培養した。表記の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、それぞれのプロモーター下で発現させたゲノム由来の Aly2-13myc、ゲノム由来の Dip5-EGFP および Pgk1 を検出した。Dip5-EGFP は蛍光顕微鏡による局在観察も行った。

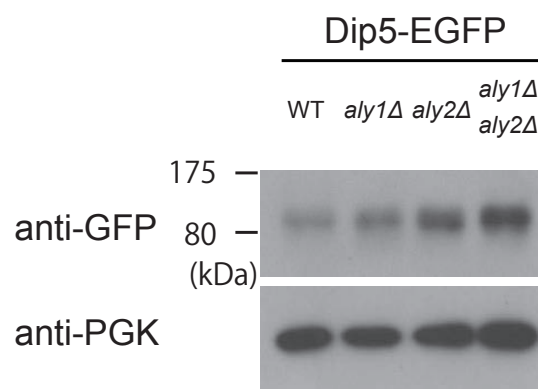


図 13 Aly1 は Aly2 と一部重複した機能をもつ

RK592 株 (WT)、RK598 株 (*aly1Δ*)、RK599 株 (*aly2Δ*) および RK601 株 (*aly1Δ aly2Δ*) を SD 培地で培養した。表記の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Dip5-EGFP と Pgk1 を検出した。

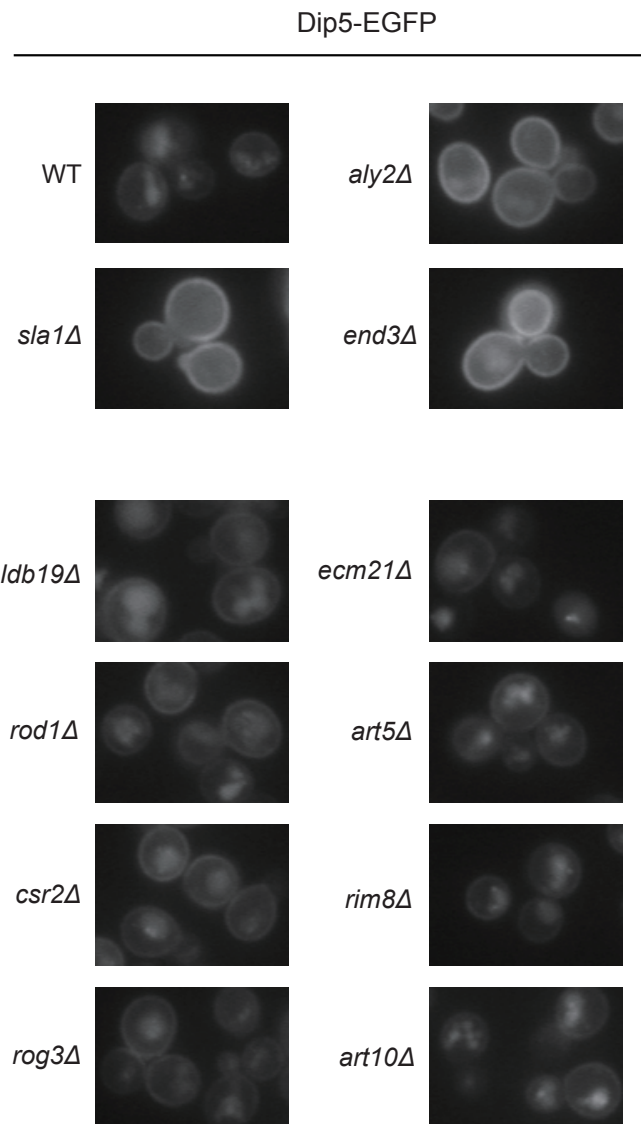


図 14 Aly1/2 以外のアレスチン様タンパク質は Dip5 の局在制御に大きく関与しない

RK842 株 (WT)、RK872 株 (*aly2Δ*)、RK697 株 (*sla1Δ*)、RK706 株 (*end3Δ*)、RK762 株 (*ldb19Δ*)、RK752 株 (*ecm21Δ*)、RK756 株 (*rod1Δ*)、RK764 株 (*art5Δ*)、RK754 株 (*csr2Δ*)、RK760 株 (*rim8Δ*)、RK758 株 (*rog3Δ*) および RK986 株 (*art10Δ*) を SD 培地で培養し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

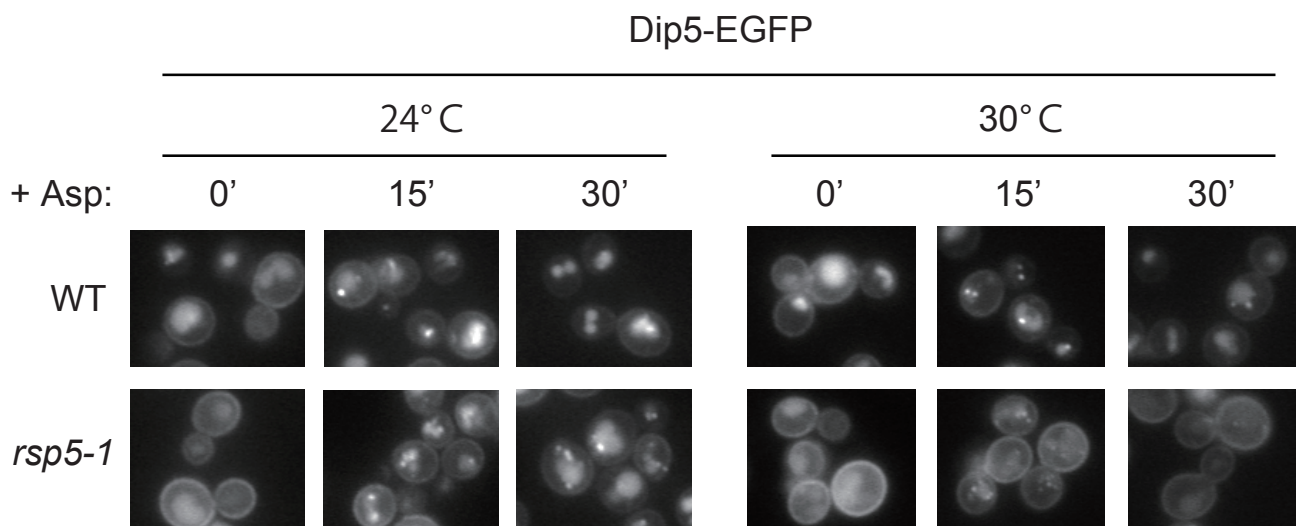


図 15 Dip5 の正常なエンドサイトーシスには Rsp5 の活性が必要である

RK592 株 (WT) と RK595 株 (*rsp5-1*) を 24°C あるいは 30°C で SD 培地で培養した。200 µg/ml アスパラギン酸で表記の時間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

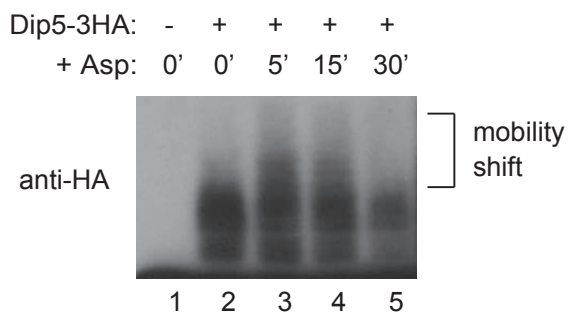
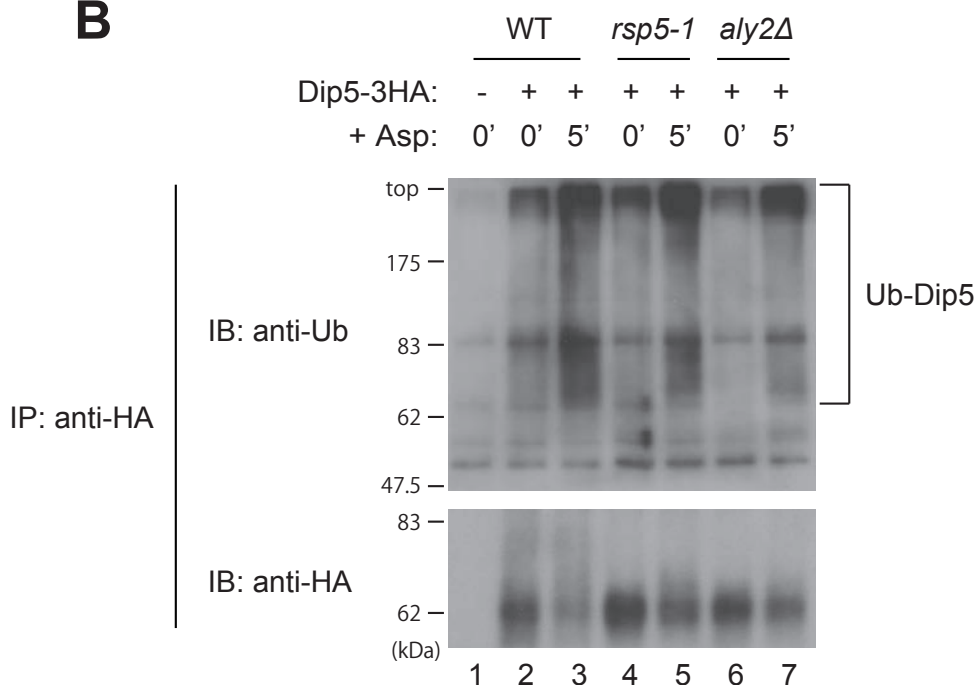
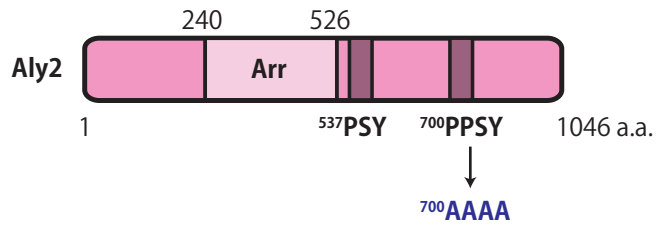
A**B**

図 16 Dip5 の正常なユビキチン化には Rsp5 と Aly2 が必要である

(A) SD 培地で培養した TM141 株 (-) と RK637 株 (+) を 200 μ g/ml アスパラギン酸で表記の時間処理した。抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Dip5-3HA を検出した。

(B) SD 培地で培養した TM141 株 (WT -)、RK637 株 (WT +)、RK639 株 (*rsp5-1*) および RK789 株 (*aly2Δ*) を 200 μ g/ml アスパラギン酸で表記の時間処理した。抗 HA 抗体を用いてゲノム由来の Dip5-3HA を免疫沈降し、表記の抗体を用いたウエスタンブロッティングによってユビキチン化された Dip5-3HA とトータルの Dip5-3HA を検出した。

A



B

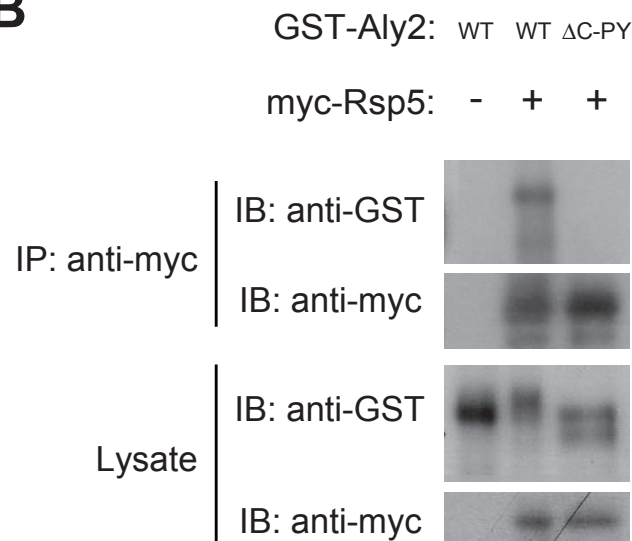


図 17 Aly2 は C 末端側の PY モチーフを介して Rsp5 と結合する

(A) Aly2 のドメイン構造と ΔC-PY 変異体の変異箇所。Arr: アレスチンドメイン。

(B) TM141 株に pMK131 と pRS416 (WT -)、pMK131 と pHY22 (WT +) または pMK139 と pHY22 (ΔC-PY +) をそれぞれ形質転換し、SD 培地で培養した。抗 myc 抗体を用いてプラスミド由来の myc-Rsp5 を免疫沈降し、表記の抗体を用いたウエスタンブロッティングによってプラスミド由来の GST-Aly2 と myc-Rsp5 を検出した。

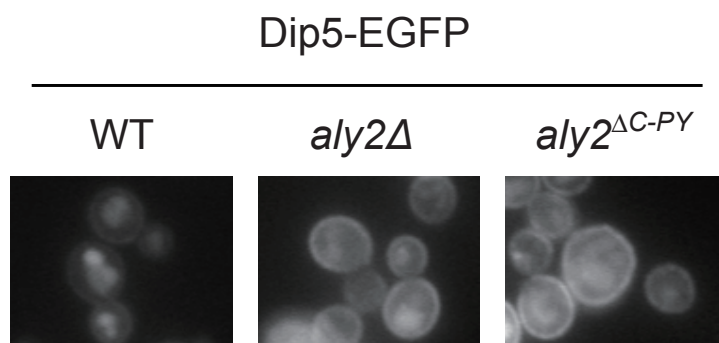


図 18 Aly2 の機能には C 末端側の PY モチーフが必要である

RK592 株 (WT)、RK599 株 (*aly2Δ*)、RK835 株 (*aly2^{ΔC-PY}*) を SD 培地で培養し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

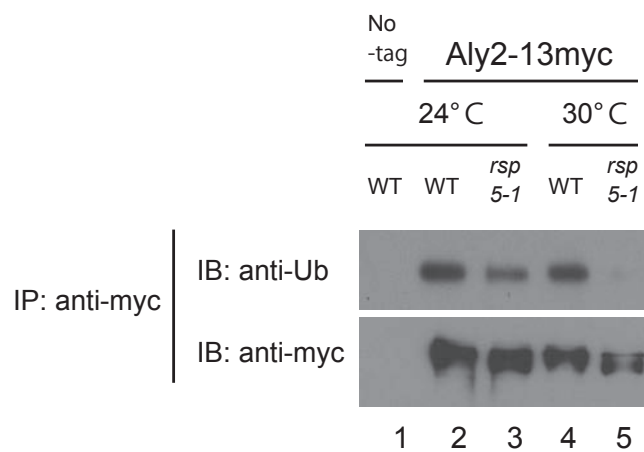


図 19 Aly2 は Rsp5 依存的にユビキチン化される

TM141 株 (No-tag)、MK350 株 (WT) および RK768 株 (*rsp5-1*) を 24°C あるいは 30°C で SD 培地で培養した。抗 myc 抗体を用いてゲノム由来の Aly2-13myc を免疫沈降し、表記の抗体を用いたウエスタンブロッティングによってユビキチン化された Aly2-13myc とトータルの Aly2-13myc を検出した。

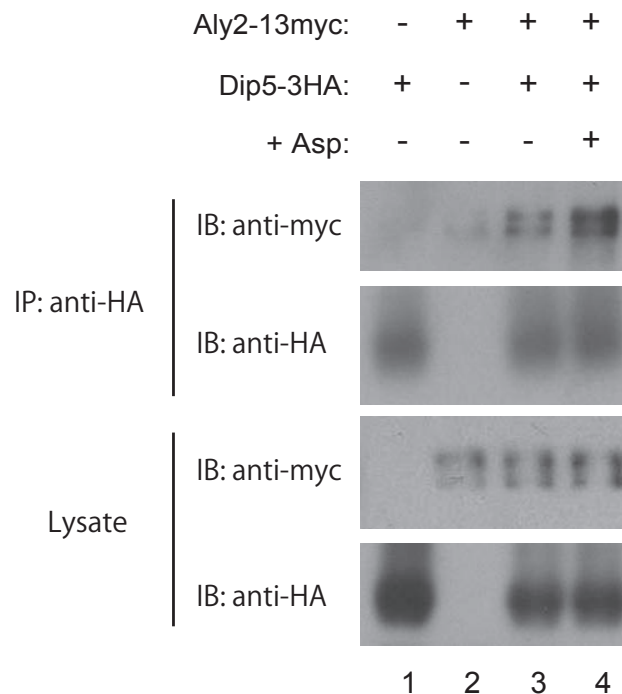


図 20 Aly2 は輸送基質依存的に Dip5 と結合する

RK637 株 (-+)、MK350 株 (+-) および RK633 株 (++) を SD 培地で培養し、レーン 4 では 200 μ g/ml アスパラギン酸で 5 分間処理した。DSP による架橋処理を行い、抗 HA 抗体を用いてゲノム由来の Dip5-3HA を免疫沈降し、表記の抗体を用いたウエスタンブロッティングによってゲノム由来の Aly2-13myc と Dip5-3HA を検出した。

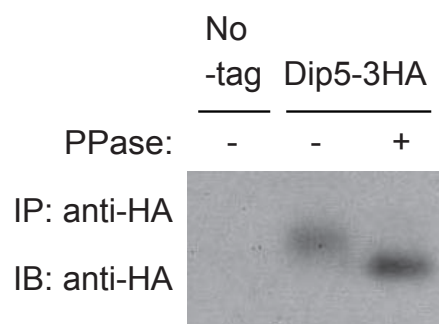
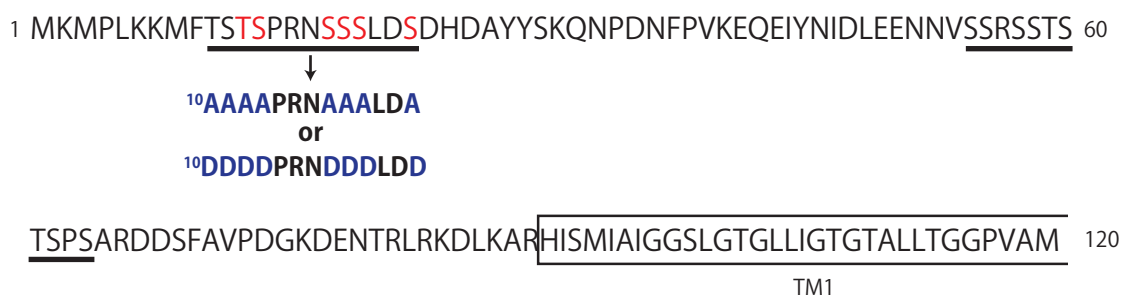


図 21 Dip5 はリン酸化修飾を受けている

TM141 株 (No tag) と RK637 株 (Dip5-3HA) を SD 培地で培養した。抗 HA 抗体を用いてゲノム由来の Dip5-3HA を免疫沈降し、レーン 3 では *in vitro* で λ -ホスファターゼ処理を行った。抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、Dip5-3HA を検出した。

A



B

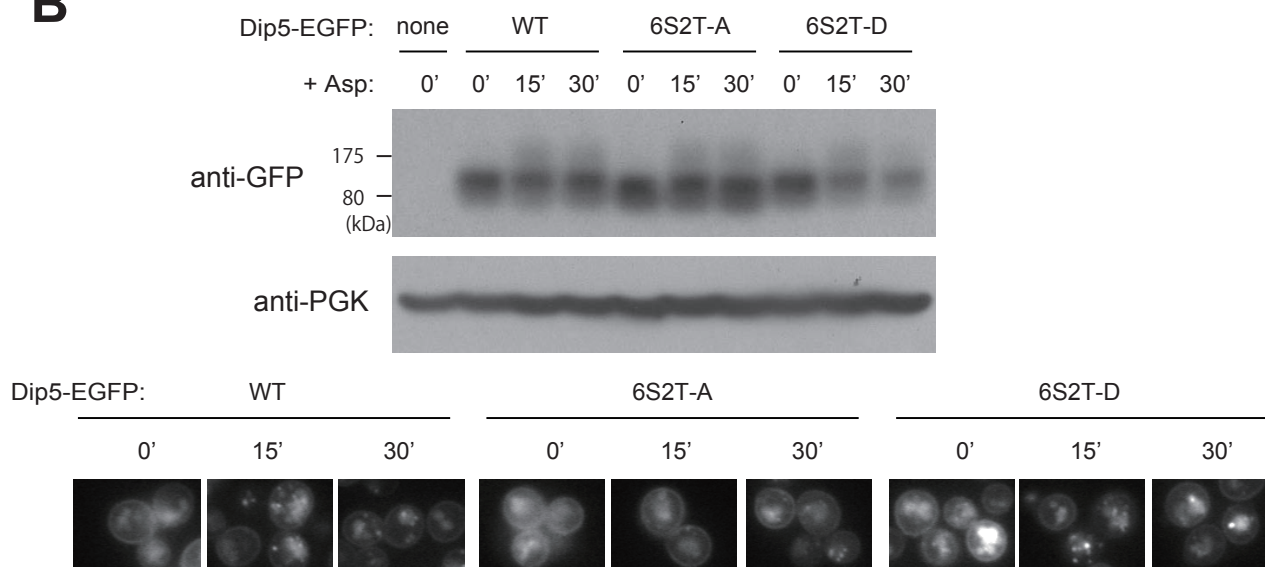


図 22 Dip5 の N 末端細胞内領域のリン酸化はエンドサイトーシスに寄与する

(A) Dip5 の N 末端アミノ酸配列と 6S2T-A、6S2T-D 変異体の変異箇所。下線部はセリン・スレオニンに富む 2 つの領域。赤字はリン酸化プロテオーム解析によりリン酸化サイトとして同定されている 6 つの残基。枠内は 1 つめの膜貫通領域。

(B) RK722 株に pRS416 (none)、pRK219 (WT)、pRK220 (6S2T-A) または pRK221 (6S2T-D) を形質転換して SD 培地で培養し、200 μg/ml アスパラギン酸で示された時間処理した。表記の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、プラスミド由来の Dip5-EGFP およびゲノム由来の Pgk1 を検出した。Dip5-EGFP は蛍光顕微鏡による局在観察も行った。

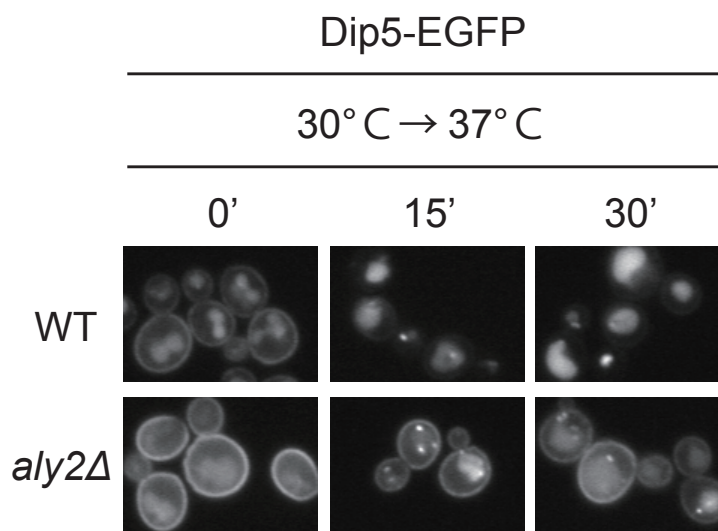


図 23 Aly2 は高温ストレスによる Dip5 のエンドサイトーシス誘導に必要である

RK592 株 (WT) と RK599 株 (*aly2Δ*) を SD 培地で培養した。培養温度を 30°C から 37°C へと変え、表記の時間培養した後に蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

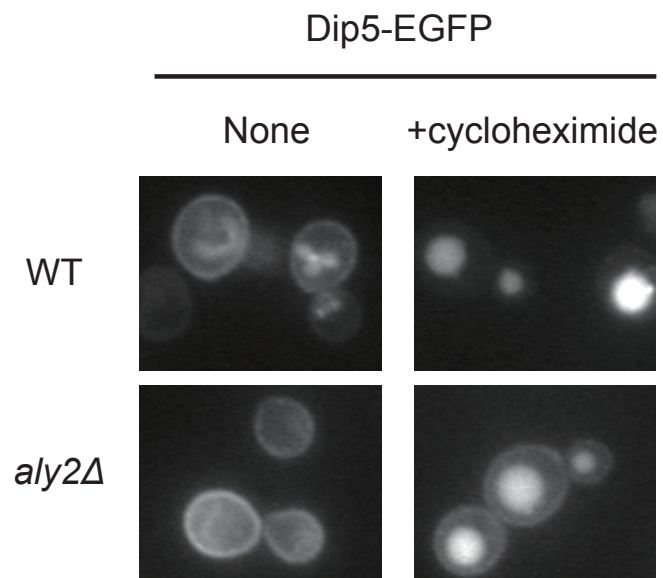


図 24 Aly2 はシクロヘキシミド処理による Dip5 のエンドサイトーシス誘導に必要である

SD 培地で培養した RK842 株 (WT) と RK872 株 (*aly2Δ*) を 50 μ g/ml シクロヘキシミドで 120 分間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

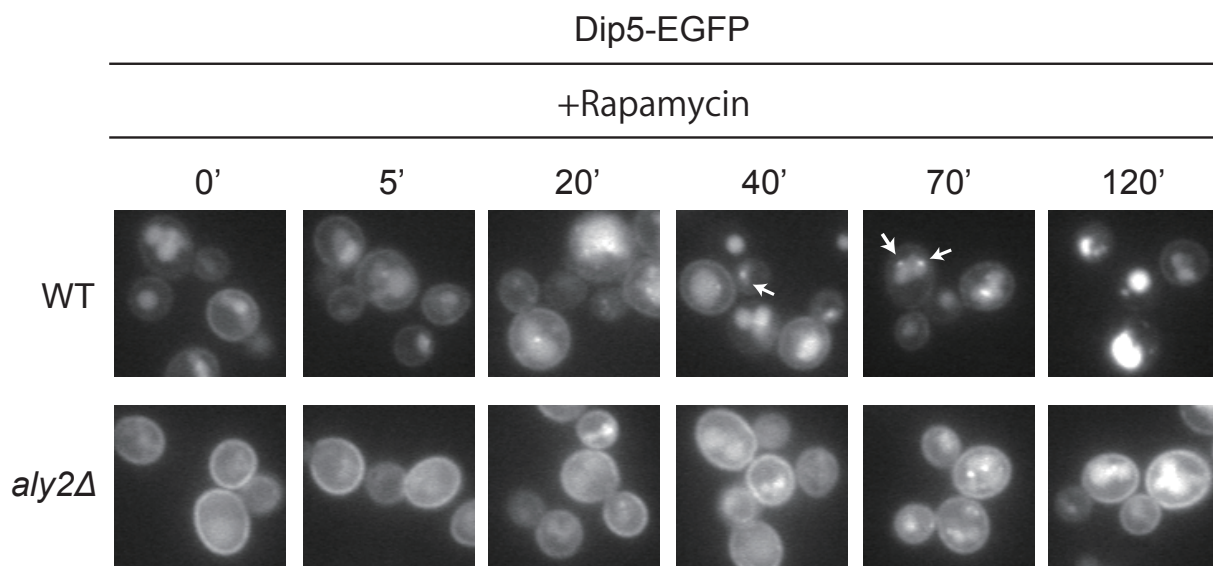


図 25 Aly2 はラパマイシン処理による Dip5 のエンドサイトーシス誘導に必要である

RK592 株 (WT) と RK599 株 (*aly2Δ*) を SD 培地で培養した。100 ng/ml ラパマイシンで表記の時間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。エンドソーム様のドットを矢印で指し示した。

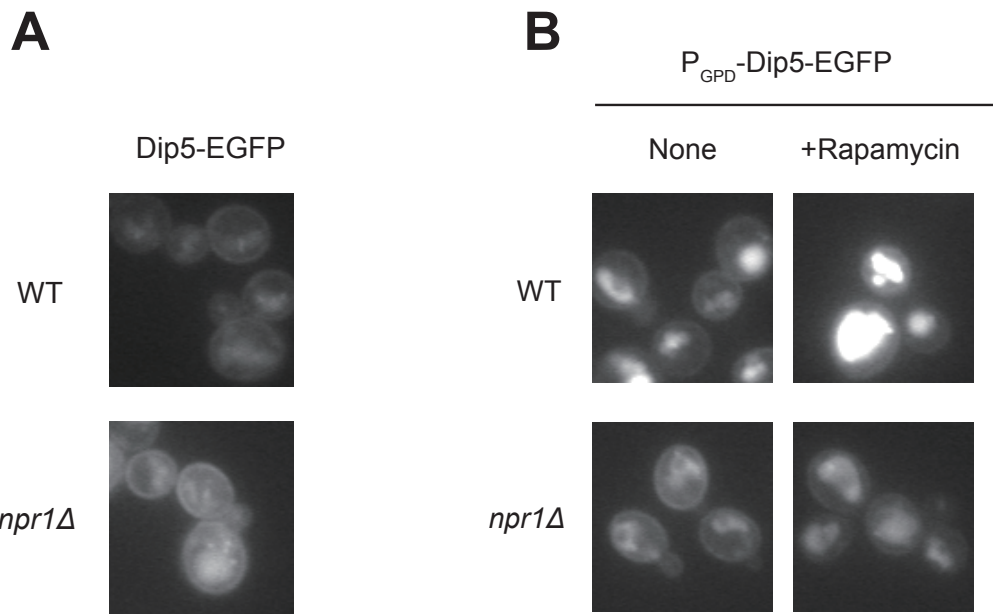


図 26 Npr1 は Dip5 の転写制御とエンドサイトーシス誘導に関与する

(A) RK842 株 (WT) と RK607 株 (*npr1Δ*) を SD 培地で培養し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

(B) BY4741 株 (WT) と RK275 株 (*npr1Δ*) に pRK219 を形質転換し、SD 培地で培養した。100 ng/ml ラパマイシンで 60 分間処理し、蛍光顕微鏡でプラスミド由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

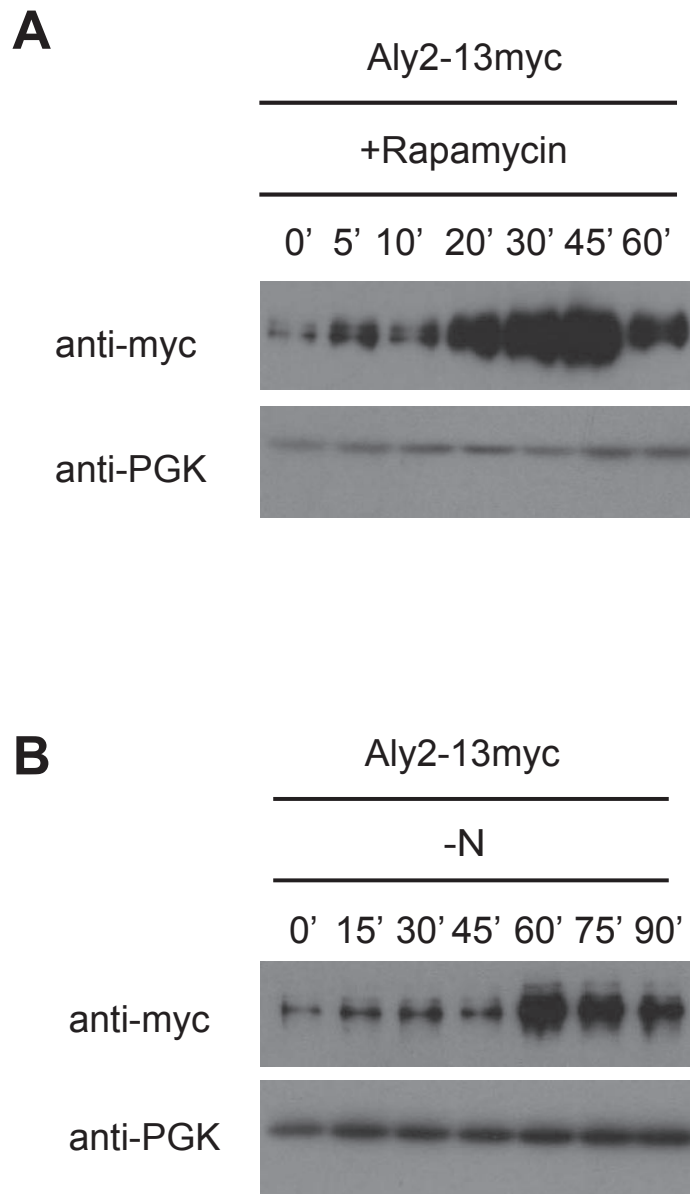


図 27 TORC1 阻害によって Aly2 の量が増える

(A) RK733 株を SD 培地で培養し、100 ng/ml ラパマイシンで表記の時間処理した。表記の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Aly2-13myc と Pgk1 を検出した。

(B) RK733 株を SD 培地で培養し、培地から窒素源を除去して表記の時間培養した。表記の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Aly2-13myc と Pgk1 を検出した。

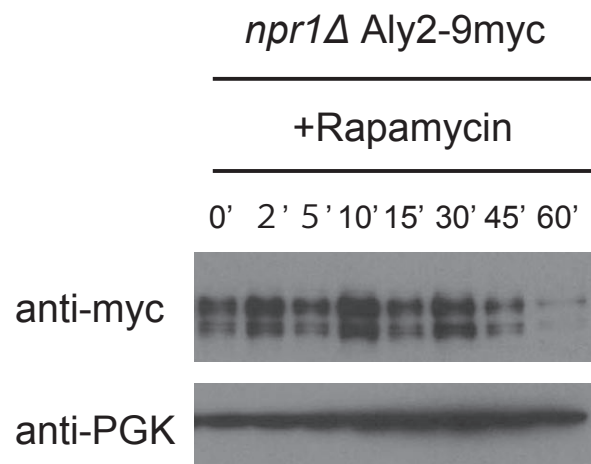


図 28 TORC1 阻害による Aly2 量の増加には Npr1 が必要である

RK878 株を SD 培地で培養し、100 ng/ml ラパマイシンで表記の時間処理した。表記の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Aly2-13myc と Pgk1 を検出した。

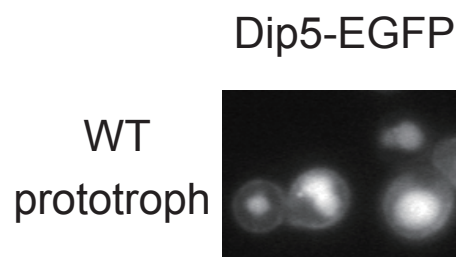


図 29 Dip5 は培地にアミノ酸がなくてもエンドサイトーシスされる

RK592 株に pRS413、pRS415 および pRS416 を形質転換して栄養要求性を相補し、添加物を含まない SD 培地で培養した。蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

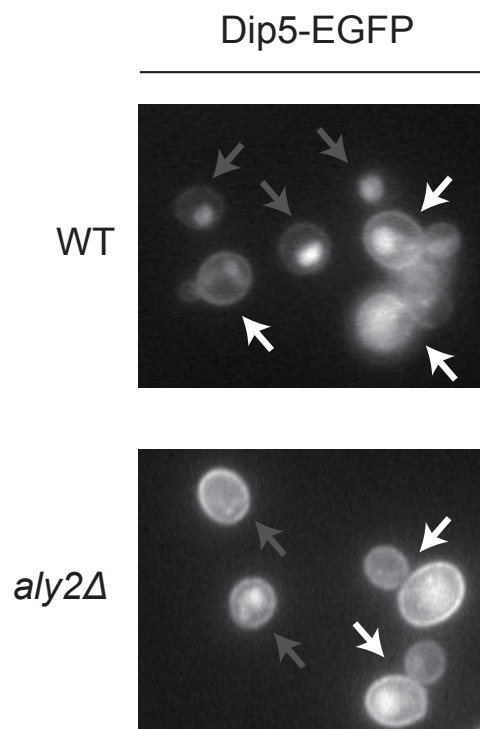


図 30 Dip5 は Aly2 依存的に細胞形態と関連した局在を示す

RK592 株 (WT) と RK599 株 (*aly2Δ*) を SD 培地で培養し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。出芽中の細胞を白矢印、出芽していない細胞をグレー矢印でそれぞれ指し示した。

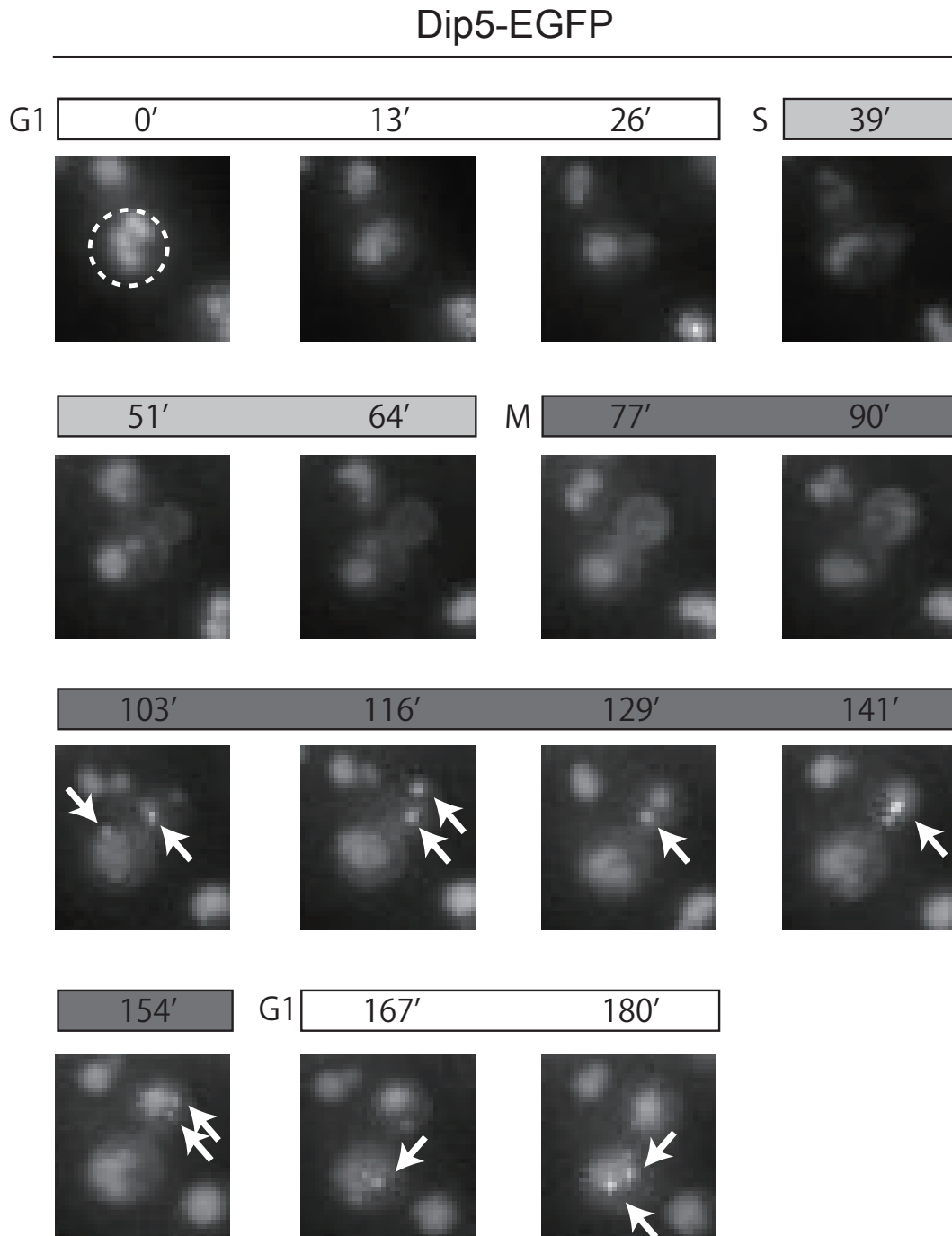


図 31 Dip5 は M 期に集中してエンドサイトーシスされる

RK592 株を SD 培地で培養し、単一の細胞について、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。観察開始を 0' として経時的に観察し、表記の時間での像を示した。0' では細胞の外周を点線で表した。エンドソーム様のドット局在を矢印で指し示した。細胞周期の段階（G1、S、M）は細胞形態から見積もった。

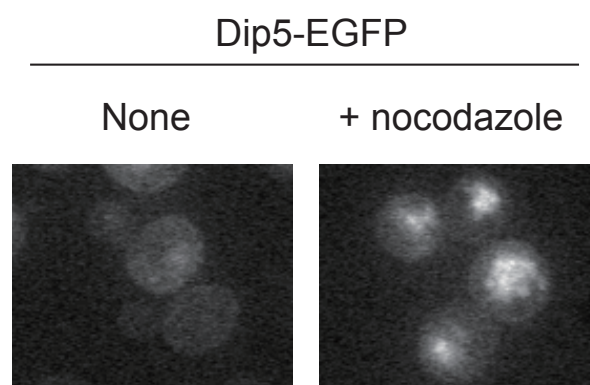


図 32 M 期の metaphase において Dip5 は液胞に局在する

YPD 培地で培養した RK592 株を 15 g/ml ノコダゾールで 120 分間処理し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Dip5-EGFP の局在を観察した。

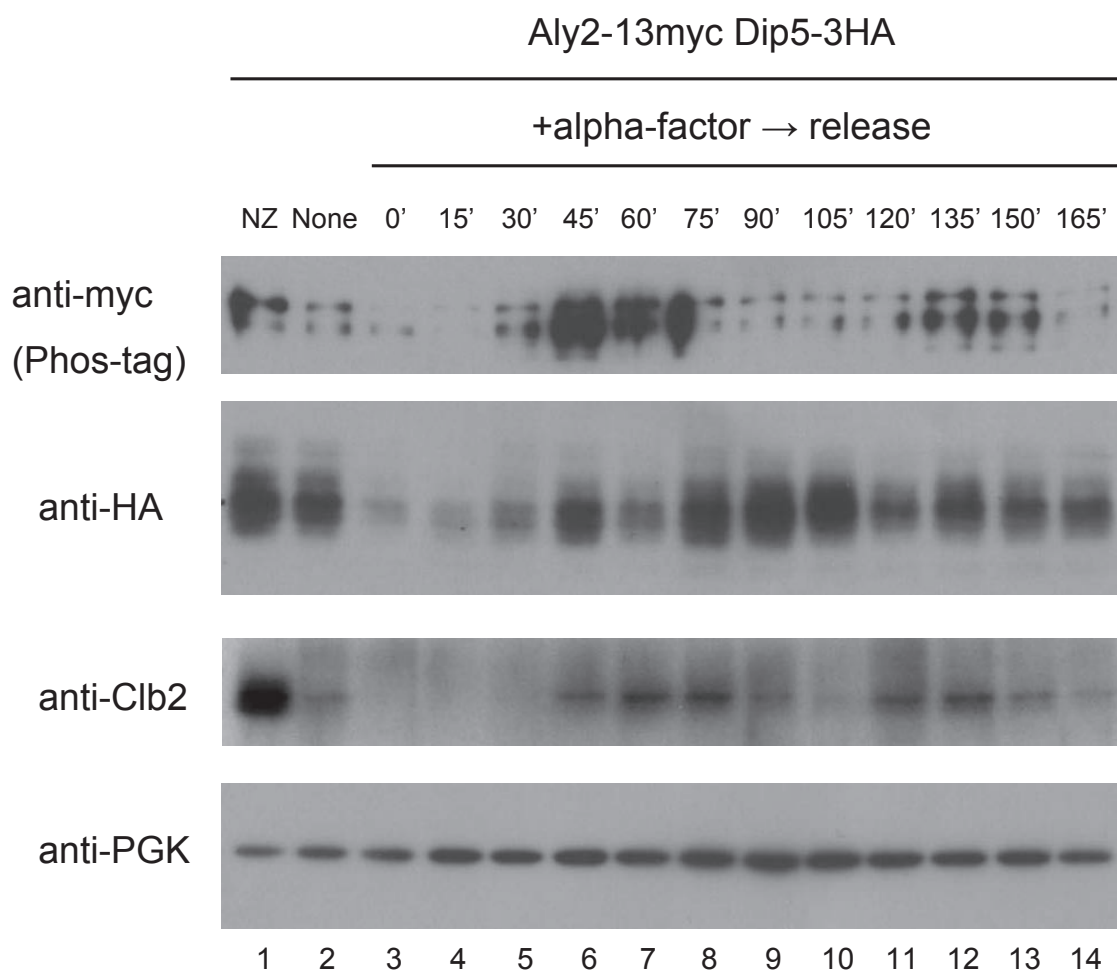


図 33 M 期に Aly2 の増加と Dip5 の減少が起こる

RK633 株を YPD 培地で培養し、15 g/ml ノコダゾールで 120 分間 (NZ) または 2 g/ml α -ファクターで 120 分間 (0') 処理した。 α -ファクター処理後に α -ファクターを洗い流し、再び YPD 培地で表記の時間培養した。表記の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Aly2-13myc、Dip5-3HA、Clb2 および Pgk1 を検出した。パネル 1 段目では 10 M Phos-tag を含むゲルを SDS-PAGE に用いた。

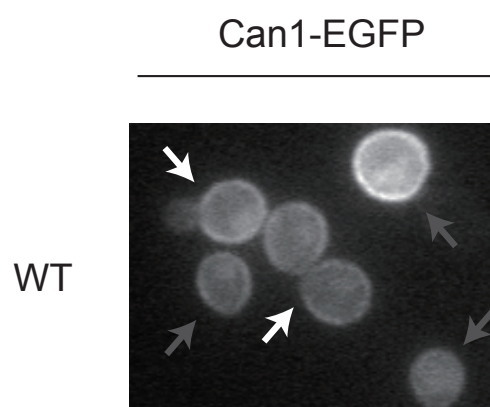


図 34 Can1 の局在は細胞周期の進行に沿って変化しない

RK349 株を SD 培地で培養し、蛍光顕微鏡でゲノム由来の Can1-EGFP の局在を観察した。出芽中の細胞を白矢印、出芽していない細胞をグレー矢印でそれぞれ指し示した。

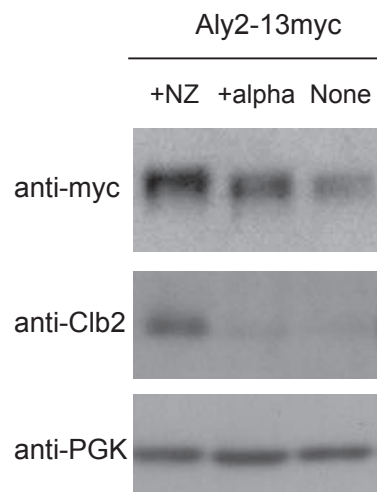


図 35 M 期の metaphase に Aly2 の量の増加と修飾が起こる

RK633 株を YPD 培地で培養し、15 $\mu\text{g/ml}$ ノコダゾールで 120 分間 (NZ) または 2 $\mu\text{g/ml}$ α -ファクターで 120 分間 (alpha) 処理した。表記の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、ゲノム由来の Aly2-13myc、Clb2 および Pgk1 を検出した。

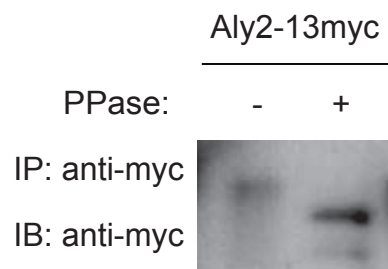


図 36 Aly2 はリン酸化修飾を受けている

MK350 株を SD 培地で培養した。抗 myc 抗体を用いてゲノム由来の Aly2-13myc を免疫沈降し、*in vitro* で λ -ホスファターゼ処理を行った。抗 myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Aly2-13myc を検出した。

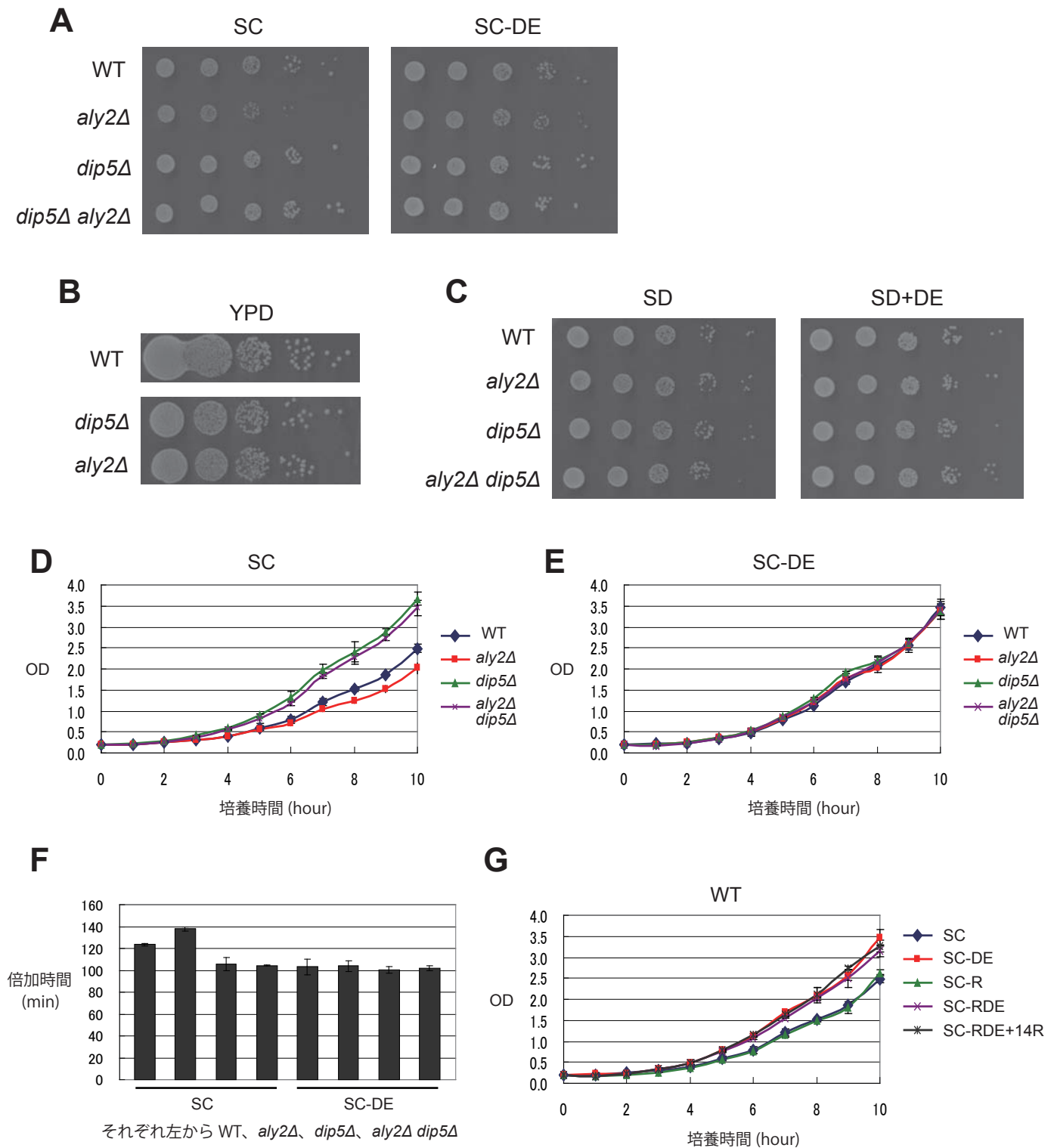


図 37 アスパラギン酸やグルタミン酸を含む SC 培地での正常な生育には Aly2 が必要である

(A)~(C) TM141 株 (WT)、MK191 株 (*aly2Δ*)、RK722 株 (*dip5Δ*) および RK876 株 (*aly2Δ dip5Δ*) を表記のプレート培地で 2 日間培養した。菌体数は左から 15,000、1,500、150、15、1.5。

(D), (E) TM141 株 (WT)、MK191 株 (*aly2Δ*)、RK722 株 (*dip5Δ*) および RK876 株 (*aly2Δ dip5Δ*) を SC 培地 (D) または SC-DE 培地 (E) で $OD_{600}=0.2$ に希釈し、表記の時間培養して 1 時間ごとに OD_{600} を測定した ($n=3$)。エラーバーは標準偏差。

(F) (D) および (E) の 3 時間から 7 時間までの OD_{600} から細胞の倍加時間を算出した。

(G) TM141 株を表記の培地で $OD_{600}=0.2$ に希釈し、表記の時間培養して 1 時間ごとに OD_{600} を測定した ($n=3$)。エラーバーは標準偏差。

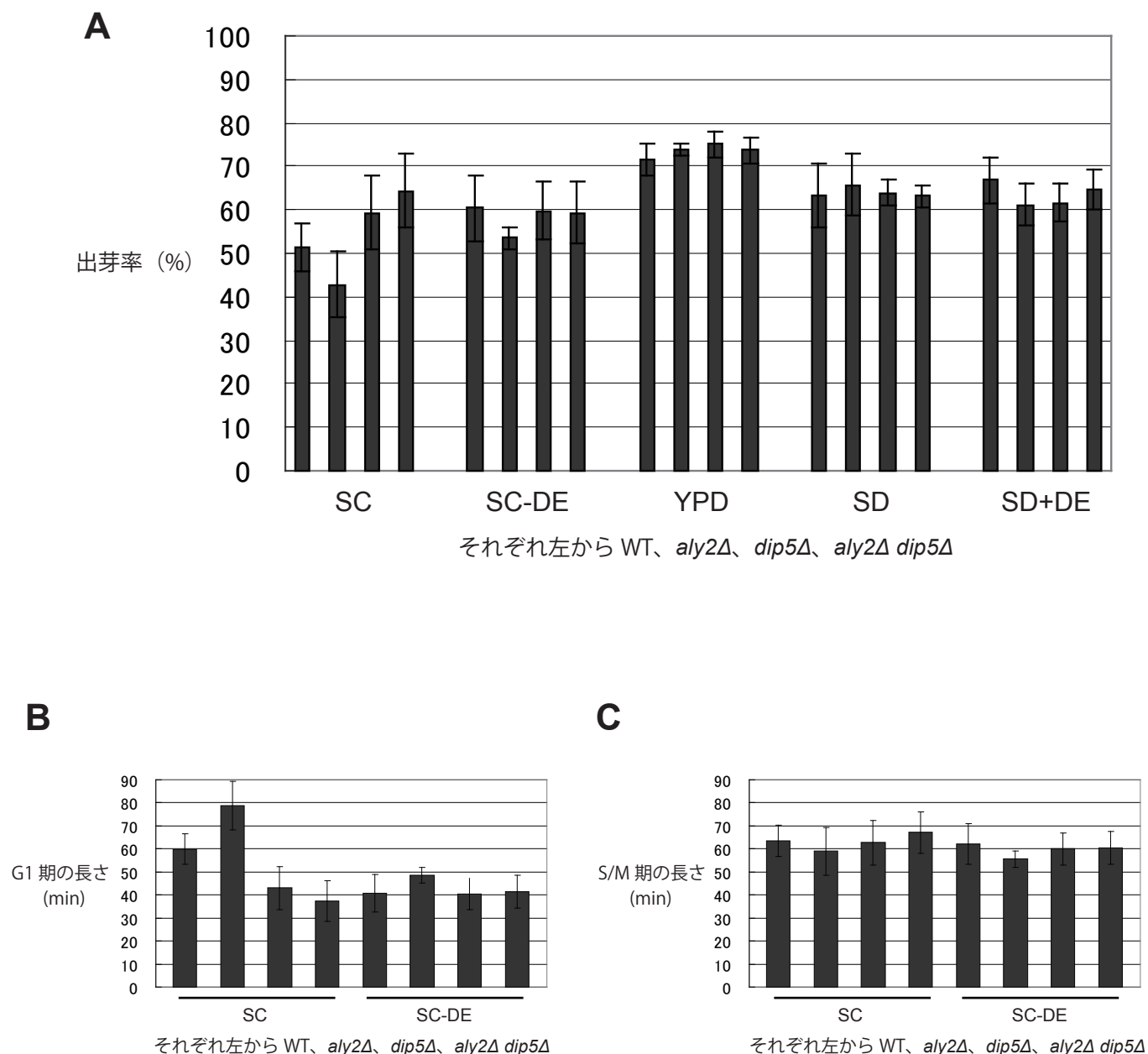


図 38 SC 培地ではアスパラギン酸やグルタミン酸は G1 期から S 期への移行を阻害する

(A) TM141 株 (WT)、MK191 株 (*aly2Δ*)、RK722 株 (*dip5Δ*) および RK876 株 (*aly2Δ dip5Δ*) を表記の培地で培養し、顕微鏡観察によって出芽率を計測した。それぞれ 100 個以上の細胞を計数した (n=3)。エラーバーは標準偏差。

(B), (C) 図 37F の倍加時間と、図 38A の SC および SC-DE 培地での出芽率との乗法によって S/M 期の長さ (C) を算出し、それと倍加時間との差をとることで G1 期の長さ (B) を算出した。

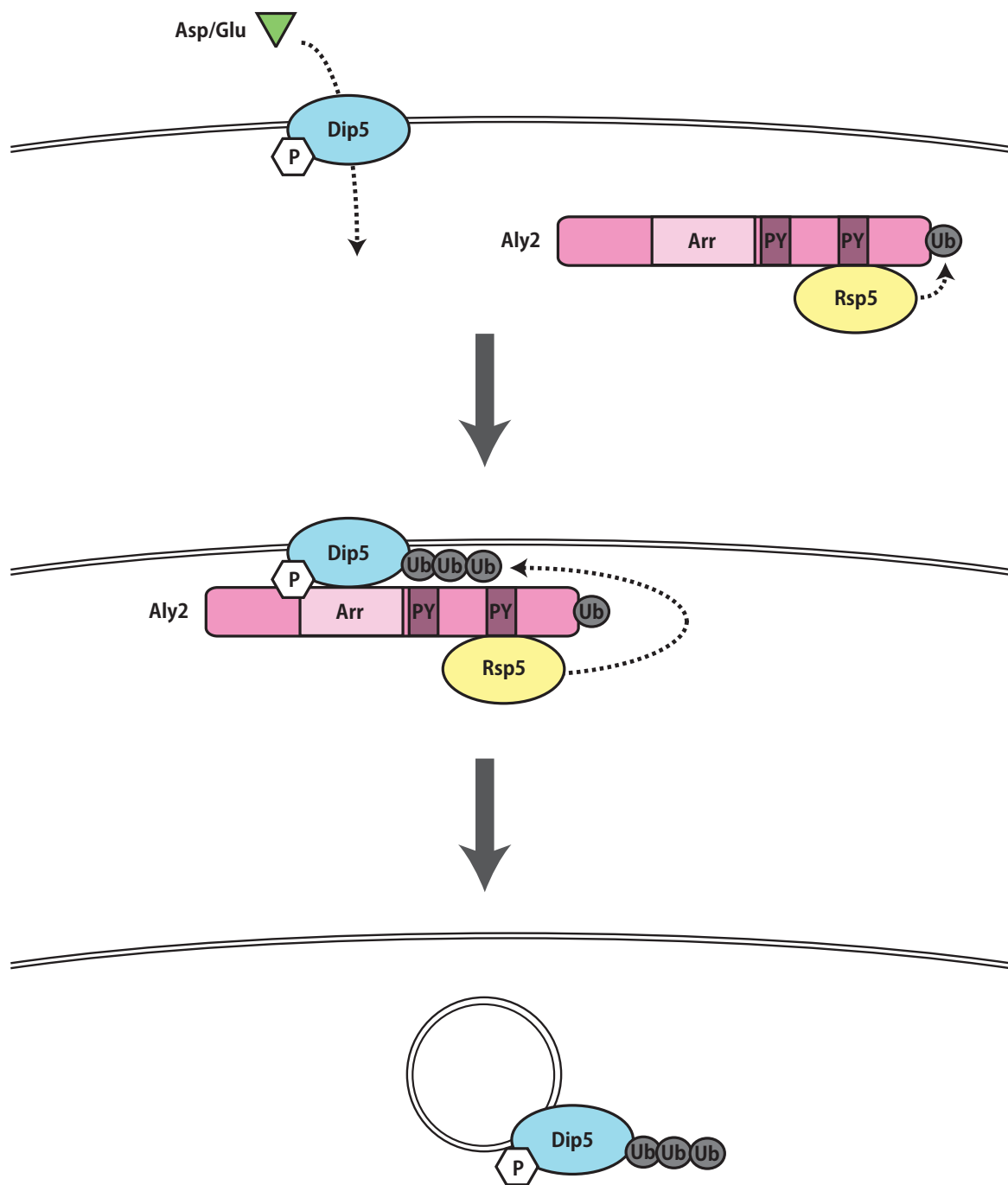


図 39 輸送基質による Dip5 のエンドサイトーシス誘導機構

Dip5 の基質依存的なエンドサイトーシスにおける Aly2 の機能を示した。詳細は本文参照のこと。Arr: アレスチンドメイン、PY: PY モチーフ、Ub: ユビキチン、P: リン酸基。

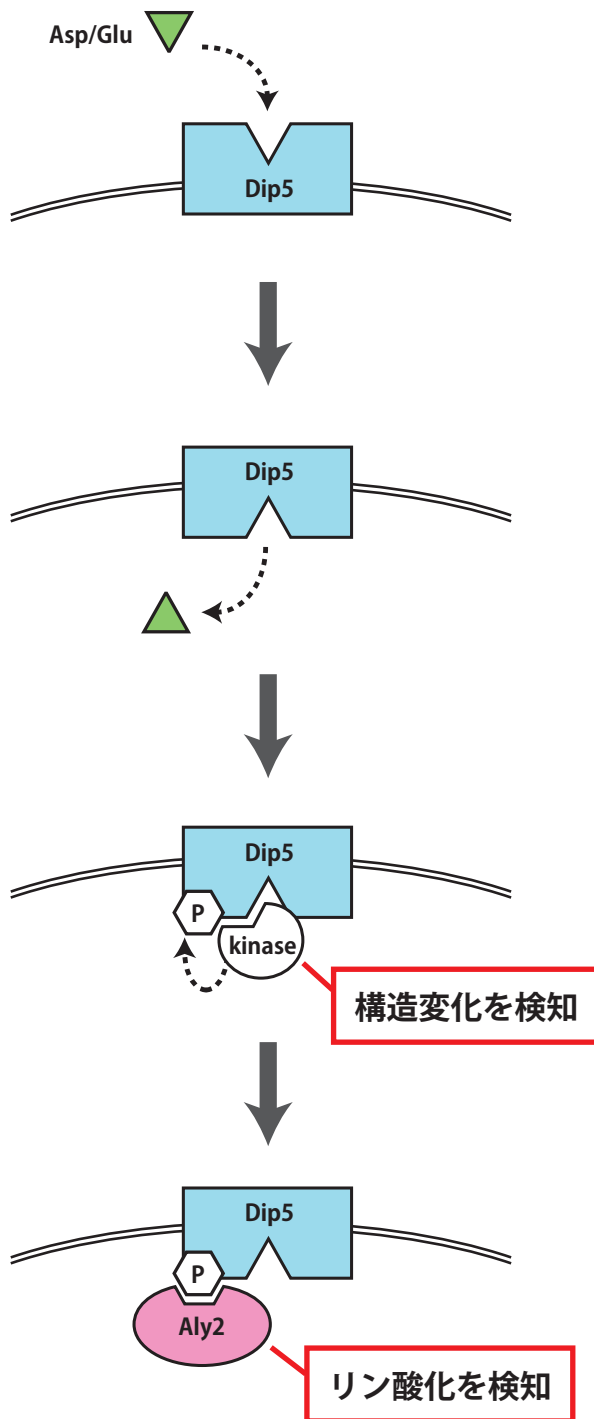
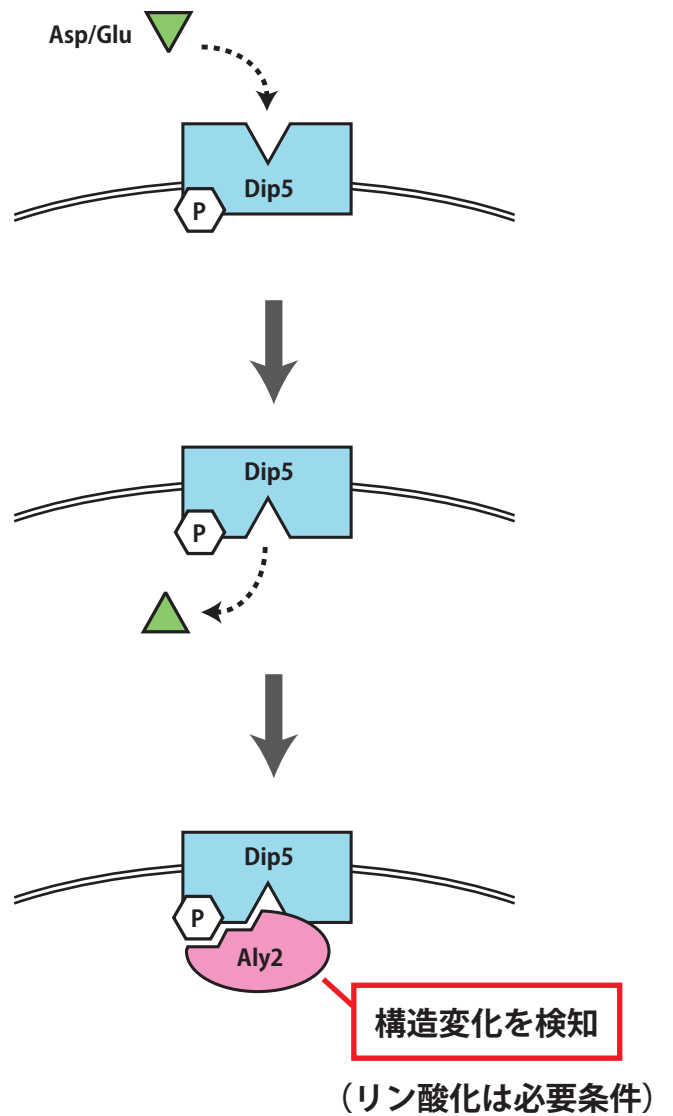
A**B**

図 40 輸送基質による Dip5 と Aly2 の結合制御モデル

Dip5 の基質認識から Aly2 との結合に至る過程について、2 つの可能なモデルを示した。詳細は本文参照のこと。

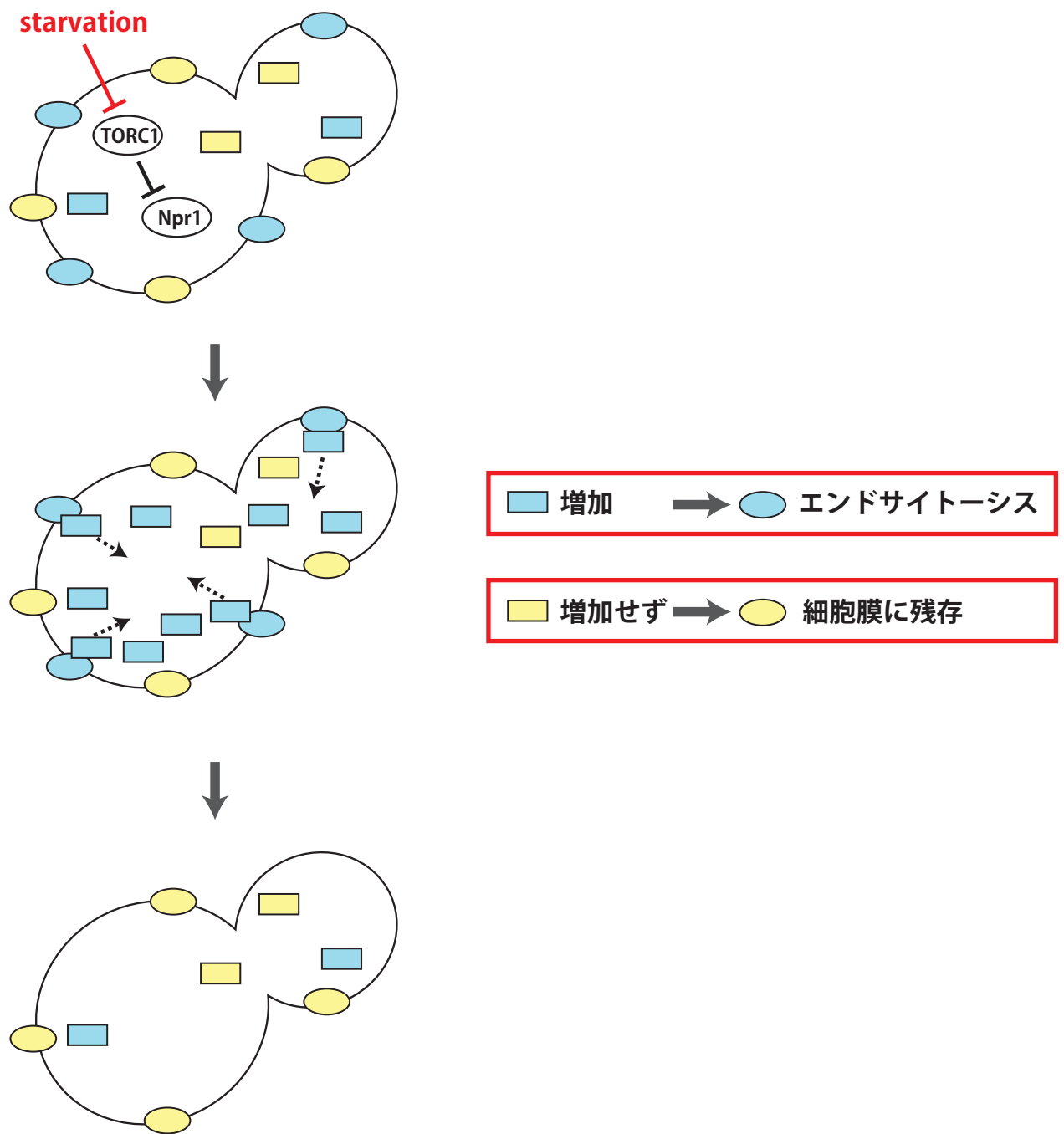
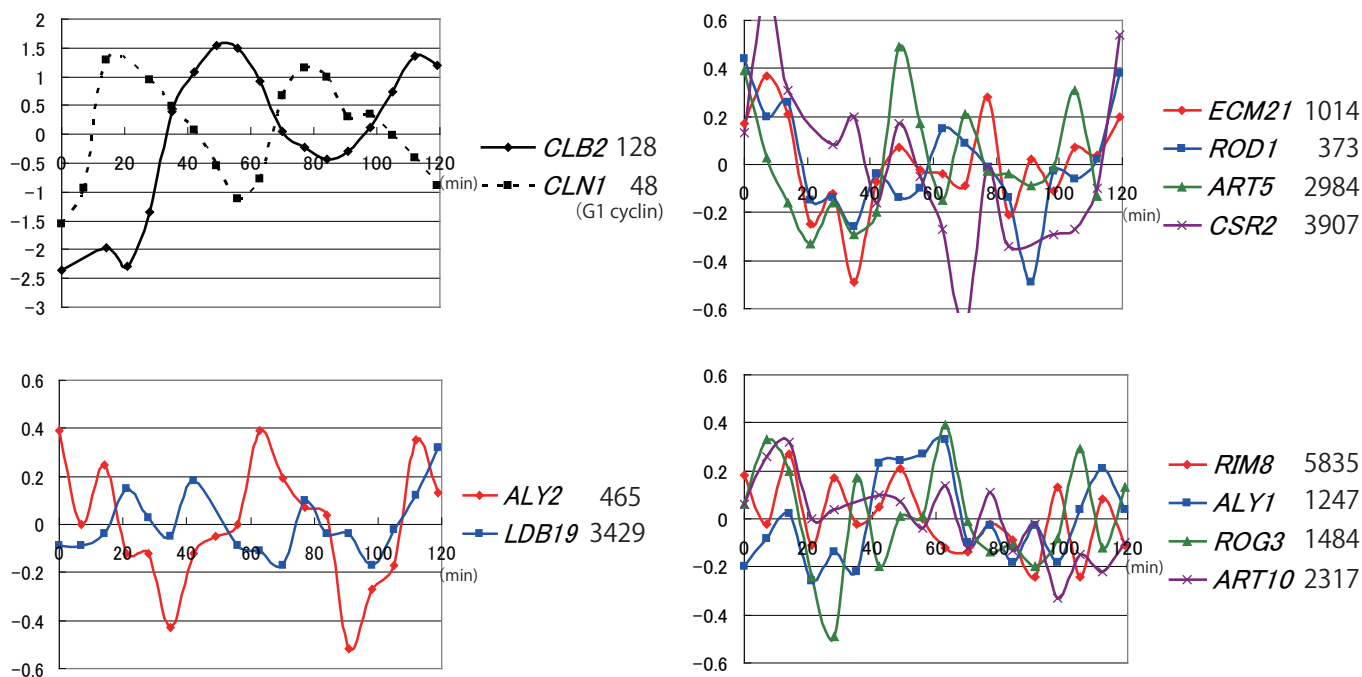


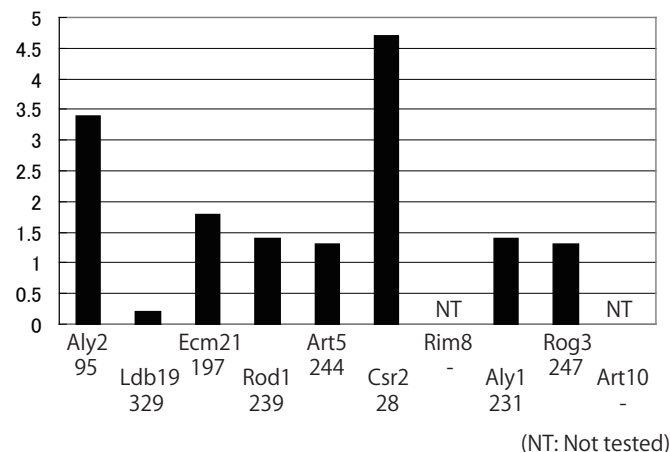
図 41 栄養源飢餓に応答した細胞膜タンパク質の再編成

栄養源飢餓に応答して細胞膜タンパク質が再編成される機構の概念図を示した。詳細は本文参照のこと。水色楕円：栄養源飢餓によってエンドサイトーシスされる細胞膜タンパク質（例：Dip5）、水色長方形：それを標的とするアレスチン様タンパク質（例：Aly2）、黄色楕円：栄養源飢餓によってエンドサイトーシスされない細胞膜タンパク質（例：Gap1）、黄色長方形：それを標的とするアレスチン様タンパク質（Gap1 に関しては未同定）。

A



B



C

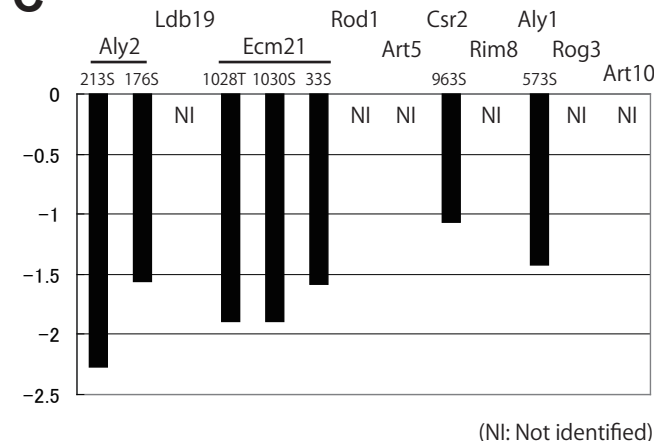


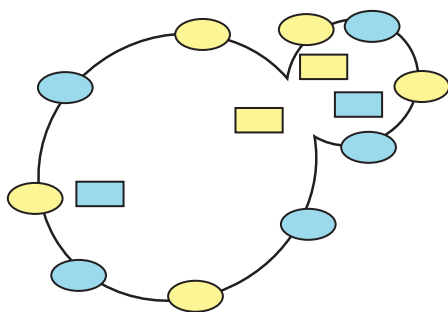
図 42 アレスチン様タンパク質の転写とリン酸化の細胞周期依存性

(A) α -ファクターで同調した細胞の経時的マイクロアレイ解析 (Spellman et al., 1998) よりデータを抽出した。横軸は同調培養の時間、縦軸は相対的な転写強度 (自然対数値)。各遺伝子名の右側の数字は、独立した複数の同調マイクロアレイ解析 (Spellman et al., 1998、Cho et al., 1998、Plamila et al., 2006) を総合して転写の周期性の程度を評価し、6305 個の遺伝子中の順位で示したもの (Plamila et al., <http://labs.fhcrc.org/breeden/cellcycle/index.html> より抽出)。

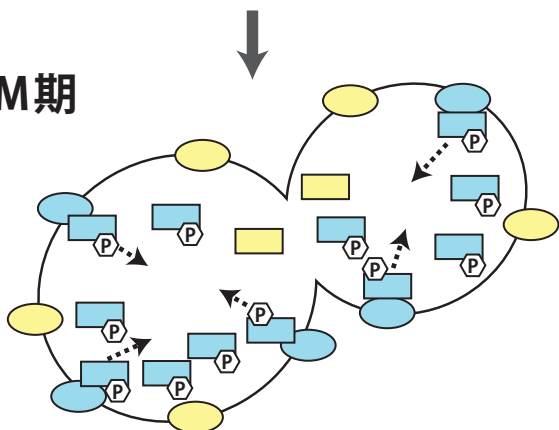
(B) 各タンパク質を精製して Clb2-Cdc28 による *in vitro* キナーゼアッセイを行い、リン酸化を受けた程度を取り込まれた ^{32}P のシグナル強度 (縦軸、底 10 の対数値) を指標に評価した研究 (Ubersax et al., 2003) よりデータを抽出した。実験は複数の Cdc28 コンセンサスサイトを有するもの 385 個、1 つの Cdc28 コンセンサスサイトを有しかつ転写が細胞周期依存性を示すもの 137 個およびランダム抽出されたもの 198 個から重複分を除いた計 695 個のタンパク質について行われ、その中での順位を各タンパク質名の下に示した。

(C) *in vivo* で Cdc28 を特異的に阻害することによりリン酸化の程度が下がる残基を同定したリン酸化プロテオーム解析 (Holt et al., 2009) よりデータを抽出した。縦軸は Cdc28 阻害前に対する阻害後の検出強度 (底 2 の対数値。例えば -2 の場合、Cdc28 阻害後に検出強度が 1/4 になったことを示す)。

S 期



M期



■ 増加、リン酸化 → ● エンドサイトーシス

■ 増加せず → ● 細胞膜に残存

G1 期

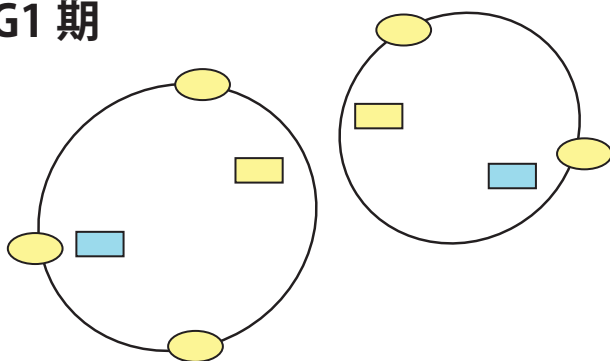


図 43 細胞周期の進行に沿った細胞膜タンパク質の再編成

細胞周期の進行に沿って細胞膜タンパク質が再編成される機構の概念図を示した。詳細は本文参照のこと。
 水色楕円:M 期にエンドサイトーシスされる細胞膜タンパク質 (例:Dip5)、水色長方形:それを標的とするアレ
 スチン様タンパク質 (例:Aly2)、黄色楕円:M 期にエンドサイトーシスされない細胞膜タンパク質 (例:Can1)、
 黄色長方形:それを標的とするアレスチン様タンパク質 (例:Ldb19)。P: リン酸基。

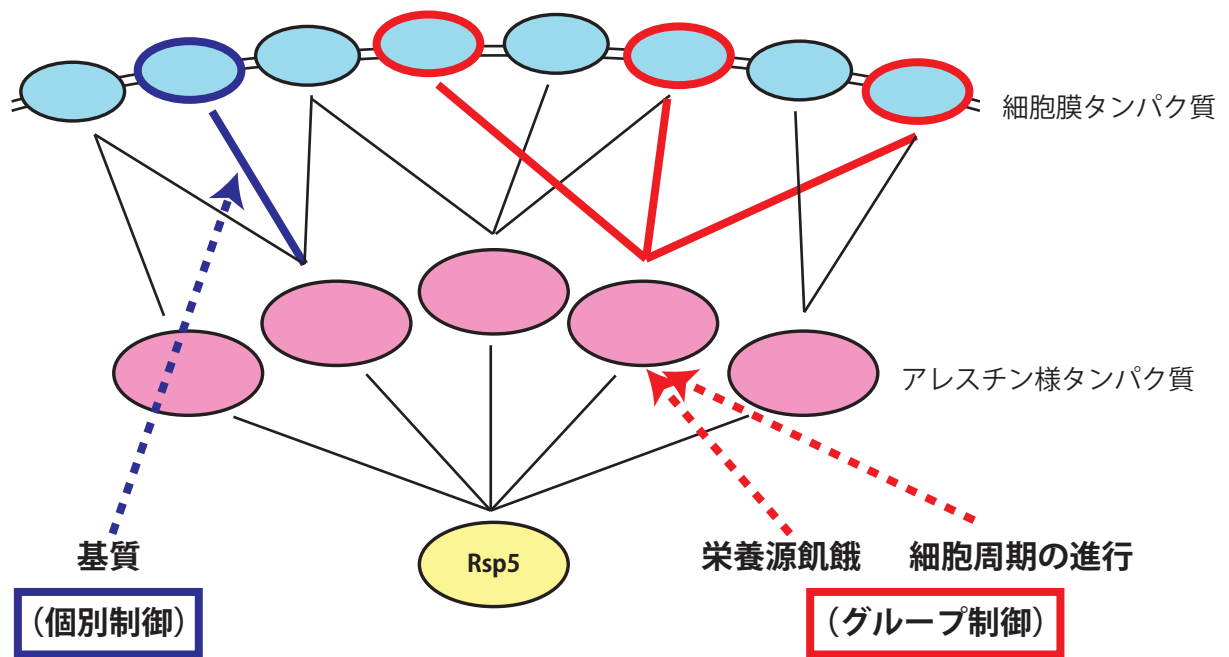


図 44 エンドサイトーシスの個別制御とグループ制御

エンドサイトーシスの個別制御とグループ制御の概念図を示した。詳細は本文参照のこと。それぞれの刺激による制御点を青矢印と赤矢印で指し示し、その結果エンドサイトーシスされる細胞膜タンパク質をそれぞれ青楕円と赤楕円で囲った。

参考文献

- Alvarez, C.E. 2008. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC. Evol. Biol.* 8:222.
- Arsham, A.M., and Neufeld, T.P. 2006. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18:589-597.
- Ausubel et al., *Current protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, NY. 1998
- Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M.N. 1999. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell. Biol.* 146:1227-1238.
- Bodenmiller, B., Malmstrom, J., Gerrits, B., Campbell, D., Lam, H., Schmidt, A., Rinner, O., Mueller, L.N., Shannon, P.T., Pedrioli, P.G., Panse, C., Lee, H.K., Schlapbach, R., and Aebersold, R. 2007. PhosphoPep[™] a phosphoproteome resource for systems biology research in *Drosophila* Kc167 cells. *Mol. Syst. Biol.* 3:139.
- Boguth, C.A., Singh, P., Huang, C.C., and Tesmer, J.J. 2010. Molecular basis for activation of G protein-coupled receptor kinases. *EMBO. J.* 29:3249-3259.
- Bultynck, G., Heath, V.L., Majeed, A.P., Galan, J.M., Haguenaue Tsapis, R., and Cyert, M.S. 2006. Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.* 26:4729-4745.
- Chen, L., and Davis, N.G. 2002. Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic.* 3:110-123.
- Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzeler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., and Davis, R.W. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell.* 2:65-73.
- Chung, N., Jenkins, G., Hannun, Y.A., Heitman, J., and Obeid, L.M. 2000. Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275:17229-17232.
- Crespo, J.L., and Hall, M.N. 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:579-591.

- Dickson, R.C., Nagiec, E.E., Skrzypek, M., Tillman, P., Wells, G.B., and Lester, R.L. 1997. Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* 272:30196-30200.
- Dupre, S., Urban Grimal, D., and Haguenaue Tsapis, R. 2004. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695:89-111.
- Galan, J.M., and Haguenaue Tsapis, R. 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO. J.* 16:5847-5854.
- Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N.J., Parkinson, J., and Rotin, D. 2007. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3:116.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B., and Schubert, C. 2001. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure.* 9:869-880.
- Helliwell, S.B., Losko, S., and Kaiser, C.A. 2001. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell. Biol.* 153:649-662.
- Herrador, A., Herranz, S., Lara, D., and Vincent, O. 2010. Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol. Cell. Biol.* 30:897-907.
- Hicke, L., and Riezman, H. 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell.* 84:277-287.
- Hicke, L., Zanolari, B., and Riezman, H. 1998. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell. Biol.* 141:349-358.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:195-201.

Hicke, L., and Dunn, R. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19:141-172.

Holt, L.J., Tuch, B.B., Villen, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., and Morgan, D.O. 2009. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*. 325:1682-1686.

Hsu et al., Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting July 27-Aug 1, 2010

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 21:947-962.

Jenkins, G.M., Richards, A., Wahl, T., Mao, C., Obeid, L., and Hannun, Y. 1997. Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272:32566-32572.

Jenness, D.D., and Spatrick, P. 1986. Down regulation of the alpha-factor pheromone receptor in *S. cerevisiae*. *Cell*. 46:345-353.

Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:893-905.

Koh, J.L., Ding, H., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Toufighi, K., Bader, G.D., Myers, C.L., Andrews, B.J., and Boone, C. 2010. DRYGIN: a database of quantitative genetic interaction networks in yeast. *Nucleic. Acids. Res.* 38:D502-507.

Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., and Greenblatt, J.F. 2006. Global

landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 440:637-643.

Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaue Tsapis, R., and Andre, B. 2010. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends. Cell. Biol.* 20:196-204.

Lefkowitz, R.J., Rajagopal, K., and Whalen, E.J. 2006. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol. Cell.* 24:643-652.

Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*. 135:714-725.

Longtine, M.S., McKenzie, A. 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14:953-961.

Milano, S.K., Pace, H.C., Kim, Y.M., Brenner, C., and Benovic, J.L. 2002. Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry*. 41:3321-3328.

Moore, C.A., Milano, S.K., and Benovic, J.L. 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69:451-482.

Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*. 156:119-122.

Nabhan, J.F., Pan, H., and Lu, Q. 2010. Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO. Rep.* 11:605-611.

Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R. 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO. Rep.* 9:1216-1221.

Nikko, E., and Pelham, H.R. 2009. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic*. 10:1856-1867.

O'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G., and Cyert, M.S. 2010. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell*. 21:3552-3566.

Paiva, S., Vieira, N., Nondier, I., Haguenauer Tsapis, R., Casal, M., and Urban Grimal, D. 2009. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *J. Biol. Chem*. 284:19228-19236.

Pan, L., Gurevich, E.V., and Gurevich, V.V. 2003. The nature of the arrestin x receptor complex determines the ultimate fate of the internalized receptor. *J. Biol. Chem*. 278:11623-11632.

Plamila et al., <http://labs.fhcrc.org/breeden/cellcycle/index.html>

Pramila, T., Wu, W., Miles, S., Noble, W.S., and Breeden, L.L. 2006. The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes. Dev*. 20:2266-2278.

Reddy, J.V., and Seaman, M.N. 2001. Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Mol. Biol. Cell*. 12:3242-3256.

Regenberg, B., Holmberg, S., Olsen, L.D., and Kielland Brandt, M.C. 1998. Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet*. 33:171-177.

Regenberg, B., During Olsen, L., Kielland Brandt, M.C., and Holmberg, S. 1999. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet*. 36:317-328.

Reyes, N., Ginter, C, and Boudker, O. 2009. Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*. 462:880-885.

Risinger, A.L., Cain, N.E., Chen, E.J., and Kaiser, C.A. 2006. Activity-dependent

reversible inactivation of the general amino acid permease. *Mol. Biol. Cell.* 17:4411-4419.

Risinger, A.L., and Kaiser, C.A. 2008. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 19:2962-2972.

Risinger, A.L., and Kaiser, C.A. 2008. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 19:2962-2972.

Rubio Texeira, M., and Kaiser, C.A. 2006. Amino acids regulate retrieval of the yeast general amino acid permease from the vacuolar targeting pathway. *Mol. Biol. Cell.* 17:3031-3050.

Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J., and Hall, M.N. 1998. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO. J.* 17:6924-6931.

Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 294:1307-1313.

Shenoy, S.K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P.M., Freedman, N.J., and Weissman, A.M. 2008. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 283:22166-22176.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.* 9:3273-3297.

Swerdlow, P.S., Finley, D., and Varshavsky, A. 1986. Enhancement of immunoblot

sensitivity by heating of hydrated filters. *Anal. Biochem.* 156:147-153.

Tang, H.Y., Munn, A., and Cai, M. 1997. EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17:4294-4304.

Tang, H.Y., Xu, J., and Cai, M. 2000. Pan1p, End3p, and Sla1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 20:12-25.

Treton, B., Blanchin Roland, S., Lambert, M., Lepingle, A., and Gaillardin, C. 2000. Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH*. *Mol. Gen. Genet.* 263:505-513.

Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature.* 425:859-864.

Wang, G., Yang, J., and Huibregtse, J.M. 1999. Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* 19:342-352.

Warren, D.T., Andrews, P.D., Gourlay, C.W., and Ayscough, K.R. 2002. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J. Cell. Sci.* 115:1703-1715.

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124:471-484.

Yan, G., Shen, X., and Jiang, Y. 2006. Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO. J.* 25:3546-3555.

Yashiroda, H., Kaida, D., Toh e, A., and Kikuchi, Y. 1998. The PY-motif of Bul1 protein is essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various stress conditions. *Gene.* 225:39-46.

神谷昌男 平成 18 年度博士論文

謝辞

本研究は東京大学分子細胞生物学研究所膜蛋白質解析研究分野・前田研究室にて行われたものです。BY4741 株をご供与くださった原島俊博士、プラスミド pHY22 をご供与くださった安東知子博士、抗 HA 抗体と抗 myc 抗体をご供与くださった星川裕博士、タイムラプス顕微鏡を使わせてくださった舘川宏之博士に感謝いたします。

お世話になった前田研究室の皆様には感謝いたします。皆様のおかげで自分の好きな研究に存分に打ち込むことができ、とても充実した五年間を過ごせました。

前田達哉准教授からは実験結果の解釈から主観を排し、複眼的に思考して懐疑的に判断することが研究を正しい方向へと進めるために必要であることを教わりました。そうすることで誤った仮説を早い段階で棄却できるようになってきたことが、私が前田研で成し得た一番の進歩だと思っています。私は物をハッキリ言い過ぎる面があり扱いやすい学生ではなかったと思いますが、それでも匙を投げることなく最後まできめ細やかにご指導してくださったことに心から感謝しています。高原照直博士には日々大量のディスカッションの相手をしていただき、ありがとうございました。また常に研究室全体のことを考えて行動する態度には感銘を受けました。大根陽一郎博士には研究室に入リたての頃に種々の実験手法を教えていただきました。富岡茂雄助教にはたびたび生化学の相談に乗っていただきました。富田啓子さんには実験のサポートをしていただきました。他の諸先輩方、修士課程時代の同期の宮崎隆幸君、後輩の皆様にも大変お世話になりました。

研究室外からも多くのご支援をいただき、ありがとうございました。

前指導教官の北本勝ひこ教授や有岡学准教授からはたびたび励ましのお言葉をいただき、大変感謝しています。樋口裕次郎博士など北本研の皆様にもお世話になりました。

いつも愚痴の受け皿となってくれた井上和樹君など、分生研の仲間に感謝します。同期が皆ハイレベルで良い刺激を受け続けたことは私にとって幸いでした。

長い学生生活を通じて様々にサポートしてくれた父、母、姉に感謝します。今後少しでも恩返しが出来ればと思います。

最後に、いつも心の支えとなってくれた妻の理江に感謝します。理江と出会ってから急に研究がうまく進みだしたのは決して偶然ではないと思っています。

平成 22 年 12 月 20 日

畠山 理広