【解説】

【2008年 農芸化学研究企画賞】

ストレスにおける酵母のユビキチン リガーゼ Rsp5 の役割とその応用

高木博史

真核生物のタンパク質品質管理に関わるユビキチン (Ub) システムにおいて、Ub リガーゼは標的タンパク質に結合し、Ub を連結する重要な酵素である。発酵食品やバイオ燃料の製造に使用される酵母において、Ub リガーゼの一つ Rsp5 がストレス環境下で細胞内タンパク質の修復・分解に関与する可能性が提唱されている。ここでは、ストレスにおける Ub システムの機能について、特に Rsp5 の役割を中心に概説する。また、Ub システムの機能を強化した酵母を育種する試みも紹介する。

生物の構成単位である細胞にとって最適の生育環境以外はすべてストレス環境であり、温度、水分、浸透圧、pH、栄養飢餓、化学物質など様々な要因がある。細胞は様々なストレスに応答し、ある程度適応する能力を有しているが、ストレスが続くと細胞内のタンパク質は徐々に変性し、正常な構造や機能を失った「異常タンパク質」になる。本来、細胞は異常タンパク質を検知し除去するために、①ストレスタンパク質などの分子シャペロンによる修復、②プロテアソームやリソソーム (液泡)、オートファジーによる分解、などの機構を備えている。しか

し、これらの機構の破綻または過酷なストレス負荷により細胞内に異常タンパク質が蓄積すると、生育が阻害され、やがて致死状況に陥る。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は高等生物のモデルとして、またパン類、酒類、バイオエタノールなどの製造に使用される重要な微生物である。酵母は、種々の発酵生産環境において高温、低温、冷凍、乾燥、高浸透圧、高濃度エタノール、低 pH などのストレスに曝されながら有用機能 (エタノール生産、炭酸ガス発生、味・風味成分の生成など) を発揮している。しかし、長時間に及ぶ複合的なストレスでは、異常タンパク質の蓄積に伴う生育阻害や致死によってこれらの機能が制限されるため、発酵生産力にも限界がある。一方で、発酵生産プロセスの進歩に伴い、効率良く発酵生産を行なうために、酵母には一段と強いストレス耐性が要求されている。したがって、ストレスに対する細胞の応答・適応機構、特に異常タンパク質の除去に関する分子機構への理解を深め、得られた知見を実用酵母の育種に応用することが重要である。ここでは、真核生物における細胞内の主要なタンパク質分解系である「ユビキチン (Ub) システム」に焦点を絞り、特にストレスにおける酵母の Ub リガーゼ Rsp5 の役割を中心に、筆者らの知見を含めて概説する。また、Ub システムの機能を応用する例として、筆者ら

Role of the Yeast Ubiquitin Ligase Rsp5 under Stress Conditions and Its Application
Hiroshi TAKAGI, 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

の新しいアプローチについても紹介する。

Ub システムとは

Ub システムは、Ub 活性化酵素 (E1), Ub 結合酵素 (E2), Ub 連結酵素 (リガーゼ) (E3) からなる酵素系で構成され、Ub の標的タンパク質 (基質) への共有結合を触媒する⁽¹⁾。細胞内で不用になったタンパク質は、Ub システムを介して 76 個のアミノ酸からなる Ub 分子が結合した後、プロテアソームやリソソーム (液胞) で分解される。通常、基質の Lys 側鎖の ϵ -アミノ基に Ub の C 末端 Gly のカルボキシル基がイソペプチド結合することで Ub が付加され (モノ Ub 化)、さらにその Ub の Lys 側鎖に別の Ub が結合する反応を繰り返し、Ub が次々と付加される (ポリ Ub 化)。最近では、ポリ Ub 化を促進する延長化因子 (E4) の存在⁽²⁾に加えて、Ub の N 末端 Met の α -アミノ基と C 末端 Gly のペプチド結合 (直鎖状ポリ Ub 鎖)⁽³⁾ も報告されている。また、Ub を基質から解離させ、細胞内の Ub 量を制御している脱 Ub 化酵素 (プロテアーゼ)⁽⁴⁾ も重要である。Ub システムはタンパク質分解を通して、細胞の増殖制御、DNA の修復、遺伝子の転写・翻訳調節、シグナル伝達など種々の生命現象に深く関わっており、特にモノ Ub 化はエンドサイトーシスや細胞内輸送に、Ub 分子内の Lys48, Lys63 を介したポリ Ub 化はプロテアソームによる分解、DNA 修復やシグナル伝達にそれぞれ関与している⁽⁵⁾。

Ub リガーゼの役割

Ub リガーゼは Ub と基質の両方に結合し、Ub を基質

に受け渡す重要な酵素である。Ub リガーゼには多様性があり、その反応形式から、①Ub 結合酵素から受け取った Ub を基質に渡す HECT 型 (酵母で 5 個、ヒトで 40 個以上)、②Ub が結合した状態の Ub 結合酵素と基質を結合し、Ub の受け渡しを行なうタイプ (RING 型、U-box 型など。酵母で約 40 個、ヒトでおよそ 1,000 個) に区別できる (図 1)⁽⁶⁾。Ub リガーゼの重要な機能である基質の選択的 Ub 化には、基質側の制御として翻訳後修飾 (リン酸化、N 型糖鎖付加、酸化、複合体化など) が知られている (図 2)⁽⁶⁾。また、基質のコンフォメーションを識別しストレスによりミスフォールド化した異常タンパク質だけを認識し Ub 化する機構が考えられているが、詳細は不明である (図 2)⁽⁷⁾。また、小胞体シャペロンと結合する Ub リガーゼは報告されているが⁽⁸⁾、異常タンパク質の分解に関わる Ub リガーゼは同定されていない。

最近、酵母の Ub リガーゼが翻訳に関わる興味深い現象として、①終止コドン非含有 mRNA から翻訳抑制により短鎖型の異常タンパク質が生成し、Not4 依存的にプロテアソームで分解されること⁽⁹⁾、②オートファジーによるリボソームの選択的分解 (リボファジー) に Rsp5 が関わる可能性⁽¹⁰⁾、が報告された。エタノールや高温などのストレスでも同様の現象が起こり、Ub リガーゼが翻訳過程の調節を介し、ストレスで生じる短鎖型異常タンパク質の分解にも関与しているかも知れない。また、異常タンパク質の蓄積が原因と考えられる神経性疾患 (パーキンソン病、アルツハイマー病など) においても、Ub リガーゼが創薬のターゲットとして注目されている。

図 1 ■ Ub リガーゼの分類

Ub リガーゼ (E3) は Ub 結合酵素 (E2) を結合するドメイン (HECT, RING, U-box) と基質を結合するドメインを有しており、E2 結合部位の種類によって 3 つに分類される。HECT 型: E2 から Ub を Cys 残基に転移後、基質に連結する。RING 型: E2 から Ub を直接基質に連結するが、単量体型と複合体型に分かれる。複合体型は RING、足場、アダプター、基質認識に関与するタンパク質から構成される (SCF, APC/C など)。U-box 型: E2 から Ub を分子シャペロンに結合した基質に連結する。カッコ内は左側がヒト、右側が酵母の代表的な Ub リガーゼを示している。

図2 ■ Ub リガーゼによる基質の選択的 Ub 化

これまでにリン酸化、N 型糖鎖付加、酸化、複合体化、補助タンパク質の関与などが知られているが、ストレスでミスフォールディングしたタンパク質だけを認識し Ub 化する機構の存在も考えられている（岩井一宏：“ユビキチンがわかる”，田中啓二 編，羊土社，2004，p. 63 を改変）。

酵母の Ub リガーゼ Rsp5 について

酵母には HECT 型 Ub リガーゼが 5 個存在しているが，Rsp5 (reversion of Spt phenotype) は唯一生育に必須であり，ヒト Nedd4 のホモログである⁽¹¹⁾。N 末端にリン脂質を結合する C2 ドメイン，中央部に基質を結合する WW ドメイン，C 末端に Ub とチオエステル結合する触媒部位と Ub 結合酵素の結合部位を有する HECT ドメインをもつ（図 3）。Rsp5 はトランスポーターやレセプターなど膜タンパク質のエンドサイトーシス⁽¹²⁾，不飽和脂肪酸合成酵素の転写活性化⁽¹³⁾，RNA 分子の核外輸送や成熟化⁽¹⁴⁾，小胞体関連分解 (ERAD)⁽¹⁵⁾，胞子の形成や発芽⁽¹⁶⁾，ミトコンドリアの遺伝⁽¹⁷⁾，など多様な細胞機能に関与するが，ミスフォールド化した異常タンパク質の選択的な認識や除去に関する知見はない。

筆者らは酵母の新しいストレス耐性機構を解析し，得られた知見を実用酵母の育種に応用することを目的に，ストレスのモデルとしてアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を用いた研究を進めている。プロリンの構造類似

体である AZC は，プロリンと競合して新生ポリペプチド鎖に取り込まれて異常タンパク質を生成するため細胞の生育を阻害するが，高温・エタノールストレスと同様の応答機構も誘導する^(18,19)。これまでに，酵母の野生株から AZC に強い感受性を示す変異株を分離し，以下の特性を明らかにした⁽²⁰⁾。

- ① Rsp5 をコードする遺伝子 (*RSP5*) に変異が入っており，Rsp5 の基質認識に関与する WW3 ドメイン内にアミノ酸置換 (Ala401Glu) が生じていた。
- ② Rsp5 の機能低下により，AZC を取込むアミノ酸パーミターゼ Gap1 が Ub 化されず，原形質膜上で安定に活性を維持するために AZC が細胞内に過剰流入し，感受性を示した。
- ③ AZC だけでなく，高温，エタノール，ソルビトール，過酸化水素，塩化リチウムなど細胞内にミスフォールド化した異常タンパク質が生成するストレスに感受性を示した。

以上の結果から，Rsp5 が異常タンパク質の除去に関与する可能性を提唱し⁽²⁰⁾，取得した Rsp5 変異株 (A401E

図3 ■ Rsp5の特徴

上図：Rsp5の構造と機能。Rsp5は809残基から成り、リン脂質を結合するC2ドメイン、基質を結合するWWドメイン(WW1-WW3)、Ubとチオエステル結合する触媒部位とE2の結合部位を有するHECTドメインを含んでいる。下図：WWドメインの一次構造比較。3つのドメインで一致するアミノ酸をコバルト色の枠で囲っている。太字のアミノ酸はRsp5の機能に関わり、高度に保存されている残基を示している。下向きの矢印は変異株(A401E株, T357A株)に見いだしたアミノ酸置換を表わしている。

株)を用いて、修復および分解の分子機構を解析している。

Rsp5による異常タンパク質の除去機構

まず、Rsp5が分子シャペロンとして異常タンパク質修復に関わるストレスタンパク質に及ぼす影響を調べた⁽²¹⁾。A401E株をストレス培地(高温、エタノール、ソルビトール)で培養すると、ストレスタンパク質遺伝子(*HSP12*, *HSP42*, *DDR2*)の転写量が野生株に比べて低下していた。これらをA401E株で強制的に過剰発現させると、ストレス感受性を相補した。次に、これら遺伝子の転写因子(Hsf1, Msn2/4)の発現を解析したところ、野生株とA401E株で転写量に差はなかったが、A401E株ではmRNAやtRNAなどRNA分子のほとんどが核に蓄積しており、Hsf1やMsn2/4の存在量が野生株に比べて著しく減少していた。以上の結果から、Rsp5が転写因子の翻訳制御(RNA分子の核外輸送)を介してストレスタンパク質の発現を調節し、異常タンパク質の修復に関与することが示された(図4)⁽²²⁾。

また、Rsp5による異常タンパク質の分解機構を解析する目的で、野生株とA401E株のプロテオーム解析を行ない、ストレス下でRsp5によりUb化される基質の同定を試みた⁽²³⁾。その結果、高温やエタノールストレス

においてA401E株の細胞内には、新生タンパク質結合複合体αサブユニットEgd2やピルビン酸脱水素酵素αサブユニットPda1などが蓄積していた。野生株ではストレス依存的にポリUb化されたEgd2およびPda1を検出したが、A401E株ではほとんど観察されなかった。また、両タンパク質とも、これまでに報告されたUb化機構と異なり、Rsp5に依存して起こることが判明した。*in vitro*の実験からも、Egd2はストレス下でのみRsp5によりUb化され、分解されることが示された(図4)⁽²³⁾。

筆者らは、エタノールストレス下でGap1がRsp5依存的に原形質膜から消失し、分解経路に輸送されることを見いだしている⁽²⁴⁾。最近、アルギニンパーミアーゼCan1のストレスに伴う液胞への輸送も報告されており⁽²⁵⁾、これらの結果は、原形質膜上の異常タンパク質の品質管理機構が存在する可能性を示すものである。今後、モデル基質などを用いて普遍性を検証し、Ubシステムによる異常タンパク質分解ルールを提唱できれば面白い。

Rsp5の恒常的活性型バリエーション

筆者らは、RSP5にランダム変異を導入し、AZCに強い耐性を付与するバリエーション(Thr357Ala)を取得し

図4 ■ Rsp5による異常タンパク質の除去機構

左図：Rsp5が異常タンパク質修復に関わるモデル。Rsp5は分子シャペロンとして機能するストレスタンパク質（Hsp42, Hsp12, Ddr2 など）の転写因子である Hsf1, Msn2/4 の mRNA の核外輸送に関与している。高温やエタノールなどのストレスにおいて、Rsp5は RNA 分子の核外輸送に関わるタンパク質（？のついた黒丸）を Ub 化し、活性を制御することによって Hsf1 や Msn2/4 の翻訳を制御し、間接的にストレスタンパク質遺伝子の転写を調節していると考えられる^(21, 22)。右図：Rsp5が異常タンパク質分解に関わるモデル。新生タンパク質結合複合体の α -サブユニット Egd2（黒丸）は高温やエタノールなどのストレス下でのみ Rsp5 により Ub 化され、分解される⁽²³⁾。Egd2 が異常タンパク質になっているかどうかは確認できていないが、筆者らは最近、エタノールストレス下でアミノ酸パーミアーゼ Gap1 が Rsp5 依存的に原形質膜から消失し、液胞に輸送されることを見いだしている⁽²⁴⁾。

た⁽²⁶⁾。T357A は基質認識に関わる WW2 ドメイン内のアミノ酸置換であり、AZC 耐性は優性の表現型だった。T357A 発現株では、プロリンや AZC を取り込むパーミアーゼ (Gap1, Put4, Agp1, Gnp1)⁽²⁷⁾ が恒常的に Ub 化され、液胞に輸送されるため AZC 耐性になると考えられる。RSP5 において恒常的に活性を示す優性アレルは報告がなく、その分子機構に興味をもたれる。各パーミアーゼの輸送経路を解析したところ、T357A 株では Gap1 のみがゴルジ体から液胞に直接運ばれていた。また野生株では、Agp1 の液胞への局在変化がグルタミンの添加で誘導されるが、Rsp5 変異株 (A401E 株) ではこの応答が抑制された。以上の結果から、Agp1 が Rsp5 の新規基質であることが示唆された。

Rsp5 の基質認識は、3つの WW ドメインが基質の PPXY モチーフと結合することで起こる⁽²⁸⁾。しかし、同モチーフのない基質も多く、その場合は同モチーフを有するアダプタータンパク質が基質認識を仲介する。これまでに 10 種類以上のアダプターが報告されており⁽²⁵⁾、Gap1 が基質の場合、Bul1/2 がアダプターとして機能するが⁽²⁹⁾、T357A の基質認識も Bul1/2 がアダプターであることが判明した。最近、Nedd4 ファミリーの一つである Itch/AIP4 において、Rsp5 の Thr357 と同じ位置にある Thr 残基がリン酸化されることで立体障害をひき

起こし、基質との結合能を失うことが *in vitro* で証明された⁽³⁰⁾。T357A が恒常的に活性を示す機構についても、Thr357 の Ala への置換により Rsp5 がリン酸化されなくなったために、恒常的に基質との結合能を保持している可能性が考えられる。

バイオエタノール生産酵母の現状と課題

現在のバイオエタノール生産では、トウモロコシやサトウキビの糖質・デンプン原料の加水分解および酵素処理により遊離したグルコースを利用し、酵母がエタノール発酵を行なうプロセスが確立されている。しかし、将来的には食糧と競合しないセルロース主体のソフトバイオマス（トウモロコシの芯、稲わら）、リグニン主体のハードバイオマス（建築廃材、間伐材）などを原料に用いる技術が不可欠であり、そのためには原料の前処理だけでなく酵母機能の改良が重要なブレイクスルーになる。現状の酵母は、①セルロース（リグノセルロース中の主成分）分解能、②キシロース（リグノセルロース中のペントースの主成分）資化能、③エタノール生産能、などの点で機能的に不十分である。これらの解決策として、①強力なセルラーゼの探索と酵母での発現、②キシロース資化に関わる酵素（レダクターゼ、デヒドロゲ

図5 ■新しいバイオエタノール生産酵母の育種

バイオエタノールの生産環境では、酵母にバイオマス由来の高浸透圧、発酵熱に起因する高温、自身が生産する高濃度エタノールなどのストレスが負荷される。したがって、これらのストレスに強い耐性を示す酵母の開発により、エタノール生産能の向上（高濃度エタノールの生産、発酵時間の短縮など）が可能になると考えられる。

図6 ■ Ub システム工学による酵母のストレス耐性の向上

上図：ストレス下で生成する異常タンパク質は、細胞内の Ub システムによってプロテアソームや液胞で分解される。Ub システムの強化により、異常タンパク質が効率良く分解され、酵母はより強いストレス下でも生育可能になると考えられる。下図：ストレス感受性の *Rsp5* 変異株 (A401E 株) を用いた遺伝学的手法によって、高機能型の *Rsp5* やサプレッサーを取得し酵母で発現させることにより、ストレス耐性の向上が期待できる。

ナーゼ、イソメラーゼ)の酵母での発現が考えられ、実用化に向けた研究が国内外で盛んに行なわれている⁽³¹⁾。一方、③については、可能な限り濃厚に仕込んだバイオマスから高濃度のエタノールを生産することが、発酵装置の小型化や発酵後の蒸留コスト低減には有利である。しかし、濃厚な仕込みは酵母に高浸透圧ストレスを負荷し、エタノールも酵母の生育や発酵を阻害する。また、発酵装置の冷却および蒸留段階の加熱に要するコストを考えると高温でのエタノール発酵が望ましいが、高温は酵母の生育や発酵を阻害する。したがって、これらのストレス(高浸透圧、高濃度エタノール、高温)に強い耐性を有する酵母の育種により、エタノール生産能の向上(高濃度エタノール生産、発酵時間の短縮)が実現すると考えられる(図5)。

筆者らは、上記で紹介した Rsp5 の新しい機能や知見(異常タンパク質除去への関与、恒常的活性型バリエーションの取得)に加えて、Ub 結合酵素と Rsp5 の過剰共発現によって野生株のストレス耐性が向上することも報告している⁽³²⁾。このように、Rsp5 を中心とした Ub システムの機能を強化することにより、酵母のストレス耐性を向上させる手法を「Ub システム工学」と名づけ、バイオエタノール生産に適した酵母の育種を試みている(図6)。次に、それらの結果を簡単に紹介する。

変異型 Rsp5 およびサプレッサーの取得と機能解析

RSP5 へのランダム変異導入により取得した T357A は、基質である Gap1 を恒常的に認識して分解経路に輸送する。そこで、T357A はストレスで生じた異常タンパク質も基質として認識して速やかに分解することを期待したが、AZC 以外のストレスに対して T357A 株と野生株とで明瞭な生育の差はなかった。アミノ酸置換の生じた Thr357 は WW2 ドメイン内に存在し、他の WW ドメイン(WW1, 3)の同じ位置にも Thr が保存されている(Thr255, Thr413 など)。したがって、357 番目以外の Thr の Ala への置換や、WW ドメインへのランダム変異導入によって、異常タンパク質に恒常的な活性を示すバリエーションの取得も期待できる。

また、A401E 株に野生型ゲノムライブラリーを導入し、高温・塩化リチウム感受性を相補する多コピーサプレッサーとして *POG1* (G1/S 期移行に関わる転写因子をコード)を単離した⁽³³⁾。興味深いことに、*POG1* を野生株に多コピーで導入すると塩化リチウムや塩化ナトリウムなどイオンストレスに対する耐性が向上した。*POG1* 多コピー導入株ではストレスタンパク質遺伝子(*HSP12*,

HSP42)の転写量が増加しており、Pog1 は A401E 株の修復経路を強化すると考えられた⁽³³⁾。また、塩化リチウムの添加により、*POG1* 多コピー導入株では Ub-プロテアソーム系遺伝子群の転写量が上昇したことから、Pog1 は A401E 株の分解経路も強化すると考えられた⁽³³⁾。このように、Rsp5 と Pog1 はストレス耐性に関与しているが、遺伝学的解析では両者は別々の経路で機能することが示された。Pog1 の機能はほとんど明らかになっておらず、オルソログも他の生物には存在しないため、過剰発現により塩化リチウム耐性が向上する機構は興味深い。これまでに、過剰発現が接合因子存在下における G1 アレストを阻害することが報告されており⁽³⁴⁾、細胞周期制御とイオンストレス応答において共通のメカニズムが存在するのかも知れない。

さらに、A401E 株にもう一度変異処理を施し、種々のストレス(高温、エタノール、塩化リチウム、AZC)に対する感受性を相補するサプレッサー株を取得した(SETA 株)。SETA 株では染色体上の *RSP5* に元の変異が残っているが、多くのアミノ酸パーミアーゼ遺伝子の転写量が親株に比べて低下しており、アミノ酸センサーをコードする *SSY1*⁽³⁵⁾に変異が入っていた(Pro535 Leu)。SETA 株ではアミノ酸パーミアーゼの発現が抑制され、何らかの原因でストレスシグナル伝達系に支障をきたし、ストレス耐性になった可能性が示唆された。

変異型 Rsp5 およびサプレッサー発現株のエタノール発酵試験

T357A 変異型 Rsp5 と Pog1 については、各遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを実験室酵母(BY4741 株)に導入した株を作製した。また、P535L 変異型 *Ssy1* については、同じ変異を実験室酵母(INVSc1 株)の野生型遺伝子に導入した株を作製した。各菌株のエタノール発酵試験を行なったところ、Pog1 過剰発現株では野生株に比べてグルコース消費が速く、エタノール濃度も高かった。また P535L 変異型 *Ssy1* 発現株では、野生株に比べて生育やグルコース消費が速く、エタノール濃度も高かった。一方、T357A 変異型 Rsp5 の過剰発現株は、発酵特性において野生株と有意な差はなかった。

おわりに

Ub システムは、細胞内で役目が終わり不用になったタンパク質、またはストレスで生じる異常タンパク質の処理(品質管理)のみならず、様々な細胞機能の制御に重要である。Ub システムの特徴は基質の選択的 Ub 化

であり、そのコーディネートを Ub リガーゼが行なっている。酵母においては、全タンパク質の 6 分の 1 が Ub 化されるという報告もある⁽³⁶⁾。

Ub リガーゼは通常、自身の活性がリン酸化などによって制御されているため、恒常的には基質を認識していない。ここで取り上げた酵母の Rsp5 では、多くの研究が Rsp5 の機能に着目しており、活性制御についてはモデルさえ提示されていない。今後、恒常活性型バリエーション (T357A) の解析により、Rsp5 では WW ドメインのリン酸化による立体障害が基質認識能を変化させ、活性のオン・オフを行なうという魅力的な仮説を証明したい。また、Rsp5 の活性制御だけでなく、Nedd4 ファミリータンパク質の機能破綻が引き起こすストレス感受性、ガンを含む様々な疾患、生育遅延などの原因解明につながると考えられる。

一方、Ub システムを強化した酵母によるバイオエタノール生産については、実験室酵母株での評価に留まっているが、今後は実用酵母株を用いて糖蜜（第一世代バイオマス）およびモデル糖化液（第二世代バイオマス）での発酵試験を行なう予定である。また、バイオエタノール生産では、遺伝子組換え技術に対する社会の抵抗は比較的少なく、技術的にも現状の実用株に適用できるため、効果が実証された場合、実用化の可能性はきわめて高い。

謝辞：バイオエタノール生産酵母の育種に関する研究は、(社)日本農芸化学会「第 5 回農芸化学企画賞」の助成を受けて行なったものであり、同学会に厚く御礼申し上げます。また、本研究に協力いただいた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の灰谷 豊博士（現 京都大学博士研究員）、佐々木俊弥氏、大城 聡氏、平井 梢さん、浮辺 健博士に心より感謝いたします。さらに、本稿で紹介した研究の一部は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「基礎研究推進事業」および「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の助成を受けて行なったものであり、同事業に深く感謝いたします。

文献

- 1) 田中啓二：“ユビキチンがわかる”，田中啓二 編，羊土社，2004，p. 26.
- 2) M. Koegl, T. Hoppe, T. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer & S. Jentsch : *Cell*, **96**, 635 (1999).
- 3) K. Iwai & F. Tokunaga : *EMBO Rep.*, **10**, 706 (2009).
- 4) S. S. Wing : *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **35**, 590 (2003).
- 5) 佐伯 泰，横沢英良：“ユビキチンがわかる”，田中啓二 編，羊土社，2004，p. 52.
- 6) 岩井一宏：“ユビキチンがわかる”，田中啓二 編，羊土社，2004，p. 58.
- 7) M. H. Glickman & A. Ciechanover : *Physiol. Rev.*, **82**, 373 (2002).
- 8) G. C. Meacham, C. Patterson, W. Zhang, J. M. Younger & D. M. Cyr : *Nature Cell Biol.*, **3**, 100 (2001).
- 9) S. Ito-Harashima, K. Kuroha, T. Tatematsu & T. Inada : *Genes Dev.*, **21**, 519 (2007).
- 10) C. Kraft & M. Peter : *Autophagy*, **4**, 838 (2008).
- 11) J. M. Huibregtse, M. Scheffner, S. Beaudenon & P. M. Howley : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2563 (1995).
- 12) J. Y. Springael & B. André : *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1253 (1998).
- 13) T. Hoppe, K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich & S. Jentsch : *Cell*, **102**, 577 (2000).
- 14) M. S. Rodriguez, C. Gwizdek, R. Haguenaer-Tsapis & C. Dargemont : *Traffic*, **4**, 566 (2003).
- 15) C. M. Haynes, S. Caldwell & A. A. Cooper : *J. Cell Biol.*, **158**, 91 (2002).
- 16) T. Kanda : *Genes Genet. Syst.*, **71**, 75 (1996).
- 17) H. A. Fisk & M. P. Yaffe : *J. Cell Biol.*, **145**, 1199 (1999).
- 18) E. W. Trotter, L. Berenfeld, S. A. Krause, G. A. Petsko & J. V. Gray : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7313 (2001).
- 19) E. W. Trotter, C. M.-F. Kao, L. Berenfeld, D. Botstein, G. A. Petsko & J. V. Gray : *J. Biol. Chem.*, **277**, 44817 (2002).
- 20) C. Hoshikawa, M. Shichiri, S. Nakamori & H. Takagi : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11505 (2003).
- 21) Y. Haitani, H. Shimoi & H. Takagi : *FEBS Lett.*, **580**, 3433 (2006).
- 22) Y. Haitani & H. Takagi : *Genes Cells*, **13**, 105 (2008).
- 23) H. Hiraishi, T. Shimada, I. Ohtsu, T. Sato & H. Takagi : *FEBS J.*, **276**, 5287 (2009).
- 24) H. Hiraishi, M. Okada, I. Ohtsu & H. Takagi : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2268 (2009).
- 25) C. H. Lin, J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan & S. D. Emr : *Cell*, **135**, 714 (2008).
- 26) Y. Haitani, M. Nakata, T. Sasaki, A. Uchida & H. Takagi : *FEMS Yeast Res.*, **9**, 73 (2009).
- 27) C. Andréasson, E. P. A. Neve & P. O. Ljungdahl : *Yeast*, **21**, 193 (2004).
- 28) M. J. Macias, M. Hyvönen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M. Saraste & H. Oschkinat : *Nature*, **382**, 646 (1996).
- 29) S. B. Helliwell, S. Losko & C. A. Kaiser : *J. Cell Biol.*, **153**, 649 (2001).
- 30) B. Morales, X. Ramirez-Espain, A. Z. Shaw, P. Martin-Malpartida, F. Yraola, E. Sánchez-Tilló, C. Farrera, A. Celada, M. Royo & M. J. Macias : *Structure*, **15**, 473 (2007).
- 31) A. J. A. van Maris, D. A. Abbott, E. Bellissimi, J. van den Brink, M. Kuyper, M. A. H. Luttik, H. W. Wisselink, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken & J. T. Pronk : *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, **90**, 391 (2006).
- 32) H. Hiraishi, M. Mochizuki & H. Takagi : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2762 (2006).
- 33) M. Demae, Y. Murata, M. Hisano, Y. Haitani, J. Shima & H. Takagi : *FEMS Microbiol. Lett.*, **277**, 70 (2007).
- 34) M. A. Leza & E. A. Elion : *Genetics*, **151**, 531 (1999).
- 35) H. Forsberg & P. O. Ljungdahl : *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 814 (2001).
- 36) J. Peng, D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley & S. P. Gygi : *Nature Biotechnol.*, **21**, 921 (2003).