

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 21日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770140

研究課題名（和文）浸透圧による膜タンパク質間相互作用を制御する機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of interactions among transmembrane proteins required for activation of the yeast HOG MAPK pathway in response to osmotic stress

研究代表者

山本 勝良（YAMAMOTO KATSUYOSHI）

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：70508366

研究成果の概要（和文）：浸透圧応答を制御する出芽酵母 HOG MAP キナーゼ(MAPK)経路の上流に存在する、浸透圧センサーHkr1 を介した SHO1 支経路の活性化には、4 回膜貫通タンパク質 Sho1 と 1 回膜貫通タンパク質 Opy2 との膜貫通(TM)領域間結合および Hkr1 細胞内領域の機能が必要であることを明らかにした。Opy2 細胞外システイン・リッチ(CR)領域が Hkr1/Msb2 との結合に必要であった。

研究成果の概要（英文）：Transmembrane (TM) interactions between the tetra-spanning membrane protein Sho1 and the single-path membrane protein Opy2, and the cytoplasmic domain of the osmosensor Hkr1, are required for activation of the Hog1 MAPK via the Hkr1 dependent SHO1 branch pathway in response to osmotic stress. The extracellular cysteine-rich (CR) region of Opy2 is required for interaction with Hkr1/Msb2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

浸透圧応答を制御する、出芽酵母 HOG MAP キナーゼ(MAPK)経路活性化メカニズムに関する研究において、近年、当研究室では、HOG 経路の上流に存在する SHO1 支経路が活性化するためには、既知の Msb2 と機能が重複した浸透圧センサーHkr1 と、足場タンパク質 Ste50 と Ste11 MAPKKK との複合体を細胞膜近傍に局在化させる機能を持つ Opy2 という 2 つの膜タンパク質が必要であることを明らかにした(Tatebayashi et al., 2007, EMBO J; Yamamoto et al., 2010, Mol Cell)。現時点において、SHO1 支経路活性化には、浸透圧センサーHkr1 と Msb2, Pbs2 MAPKK に結合する 4 回膜貫通タンパク質 Sho1, そして Ste50-Ste11 複合体に結合する

1 回膜貫通タンパク質 Opy2 の 4 つの膜タンパク質が必要である。しかしながら、細胞外からの高浸透圧ストレス刺激によって、これらの膜タンパク質がどのように相互作用して細胞内にシグナル情報を伝えるのかは不明である。

2. 研究の目的

出芽酵母 HOG MAPK 経路の上流に存在する SHO1 支経路が細胞外からの高浸透圧ストレス刺激に依存して活性化する際に、1 回膜貫通型の浸透圧センサーHkr1 と Msb2, 4 回膜貫通タンパク質 Sho1, そして 1 回膜貫通タンパク質 Opy2 の 4 つの膜タンパク質がどのような相互作用をするのか、Opy2 の

機能解析を通じて、明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 外部から高浸透圧ストレス刺激を与えなくても、上流のキナーゼである Ste20/Cla4 PAKs によるリン酸化の効果を模倣する活性化型 Ste11-Q301P (301 番目のグルタミンがプロリンに置換されたもの) が発現する条件下において、SHO1 支経路の活性化を引き起こす表現型を持つ活性化型 Opy2 変異体の単離を行った。

(2) (1) の変異体スクリーニングによって得られた TM 領域に変異を持つ Opy2 変異体と他の膜タンパク質(Hkr1, Msb2, Sho1) との相互作用について、

①結合レベルを、免疫沈降実験と GST プルダウンアッセイによって調べた。

②Opy2 と Sho1 のそれぞれの TM 領域に系統的に変異を導入した変異体を作成し、Sho1 と Opy2 の相互作用に重要となるアミノ酸の同定を行った。

③②で同定した、Opy2 と Sho1 の相互作用に重要であるアミノ酸に変異を導入した際に SHO 支経路の活性化に及ぼす影響を、Hog1 MAPK の活性化をモニターすることができる *8xCRE-lacZ* レポーター・アッセイによって定量的に測定した。

(3) SHO1 支経路の活性化に関与する Hkr1/Msb2, Sho1, Ste20/Cla4, Ste50, Ste11, Pbs2 それぞれを欠損させた場合、単離した活性化型 Opy2 変異体による Hog1 の活性化が起こるかどうか、*8xCRE-lacZ* レポーター・アッセイによって定量的に調べた。

(4) Opy2 の細胞外領域に、Opy2 ホモログ間において完全に保存された 8 個のシステイン残基を含むシステイン・リッチ(CR)領域が存在する。この CR 領域の欠失や、システイン残基のアラニン残基への置換が、SHO1 支経路の活性化に与える影響を、*8xCRE-lacZ* レポーター・アッセイによって定量的に調べた。

Opy2 CR 領域が浸透圧センサーである Hkr1 や Msb2 との結合に関与しているかどうか、免疫沈降実験によって調べた。

4. 研究成果

(1) 活性化型 Ste11-Q301P を発現させた場合にのみ Hog1 MAPK の活性化を引き起こす表現型を持つ Opy2 変異株を探索した結

果、TM 領域に変異を持つ Opy2-F96I (96 番目のフェニルアラニン残基がイソロイシン残基に置換されたもの) と Opy2-A104V (104 番目のアラニン残基がバリン残基に置換されたもの)、そして細胞内 C 末領域を欠失した Opy2 Δ CD の、3 つの活性化型 Opy2 変異体の単離に成功した。

Opy2 Δ CD 変異体は、Ste11 MAPKKK と構成的に結合する足場タンパク質 Ste50 と強く結合した。Opy2 Δ CD-Ste50 強結合が、Opy2 Δ CD 高発現による Hog1 活性化を起こしているのではないかと考えられる。

(2) ① Opy2-F96I と Opy2-A104V は、共に TM 領域内に変異を持つため、SHO1 支経路の活性化に関与する他の膜タンパク質 (浸透圧センサー Hkr1 と Msb2、4 回膜貫通タンパク質 Sho1) との結合に何らかの変化が見られるのではないかと考えられた。GST プルダウンアッセイの結果、Sho1 は Opy2-WT とは弱くしか結合しないが、Opy2-A104V とは強く結合することがわかった。Sho1 と Opy2 の結合レベルは、使用する界面活性剤によって異なった。TritonX-100 や NP-40 を使用すると、Sho1 と Opy2 の結合がほとんど見られず、Digitonin や Brij を用いると、Sho1-Opy2 結合を検出することができた。これらの結果は、Sho1 と Opy2 とが TM 領域間で結合することを示唆する。Opy2-F96I と Sho1 の結合は通常レベルであった。

(2) ②と③ Opy2-A104V の TM 領域に系統的な変異を導入したところ、Sho1 との結合レベルが低下するものがいくつか見つかかり、そのような Opy2 変異体は Hog1 の活性化を引き起こせなかった。

Opy2 TM 領域への系統的変異導入解析の過程において、2 つの活性化型 Opy2 変異体、Opy2-I93A (93 番目のイソロイシン残基がアラニン残基に置換されたもの) と Opy2-G95L (95 番目のグリシン残基がロイシン残基に置換されたもの)、を新たに単離した。

Sho1 に存在する 4 つの TM 領域(TM1 から TM4)に系統的な変異導入すると、Opy2-A104V との結合レベルが低下するものがいくつか見つかかり、そのような Sho1 変異体は Hog1 の活性化を引き起こせなかった。特に Sho1 TM4 に系統的に変異導入すると、Opy2-A104V との結合が低下するものが多く見られた。Opy2 TM 領域が Sho1 TM4 領域と結合する可能性が考えられる。

Sho1 TM 領域への系統的変異導入解析の過程において、活性化型 Sho1 変異体、Sho1-A123LA124L (TM4 領域に存在する 123 番目と 124 番目のアラニン残基が同時にロイシン残基に置換されたもの)、を新たに単離した。

(3) 活性化型 Opy2 変異体 (Opy2-F96I と Opy2-A104V) の高発現による Hog1 の活性化には、浸透圧センサーである Hkr1 と Msb2 のうち、Hkr1 のみが必要であった。細胞内領域の一部を欠失した Hkr1 変異体を発現させると、活性化型 Opy2 変異体による Hog1 の活性化が起こらなかった。

Ste11 MAPKKK をリン酸化・活性化する PAK キナーゼである Ste20 と Cla4 のうち、Ste20 を欠失させた場合のみ、活性化型 Opy2 変異体による Hog1 活性化が起こらなかった。

Sho1、Ste50、Ste11、Pbs2 それぞれを欠損させた場合、活性化型 Opy2 変異体による Hog1 の活性化が起こらなかった。

(4) Hog1 の活性化状態をモニターする *8xCRE-lacZ* レポーター・アッセイの結果、Opy2 細胞外 CR 領域を欠失した Opy2 Δ CR 変異体や、CR 領域内に存在する最初の4つのシステイン残基をアラニン残基に置換した Opy2-C4A 変異体を発現させると、高浸透圧ストレス刺激による Hog1 の活性化が全く起こらなかった。

免疫沈降実験の結果、浸透圧センサー Hkr1/Msb2 は Opy2-WT と結合したが、Opy2 Δ CR とはほとんど結合しなかった。

以上の結果から、出芽酵母 HOG MAPK 経路の上流に存在する、Hkr1 を介した SHO1 支経路の活性化には、Opy2 と Sho1 の TM 領域間結合および Hkr1 細胞内領域の機能が必要であると考えられる。また、Opy2 と浸透圧センサー Hkr1/Msb2 とが細胞外領域で結合することが明らかになった。

本研究によって得られた、2つの膜タンパク質の TM 領域間結合がシグナル伝達経路の活性化に必要であるという研究成果は、出芽酵母の高浸透圧ストレス応答 HOG MAPK 経路の活性化メカニズム解明を大きく前進させるとともに、あらゆる生物が備えているシグナル情報伝達経路の活性化メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

浸透圧センサー Hkr1/Msb2 と Opy2 との相互作用機構に関する詳細な研究が、細胞外からの高浸透圧ストレス刺激を感知するメカニズム解明に向けての今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

(1) 山本勝良、舘林和夫、奈古屋美穂、斎藤春雄：“高浸透圧ストレス応答 HOG MAP キナーゼ経路活性化における膜蛋白質間相互作用の解析” 第35回日本分子生物学会年会。

(20121212). マリンメッセ福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 勝良 (YAMAMOTO KATSUYOSHI)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：70508366

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし