

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247034

研究課題名(和文) TM領域を介した膜タンパク質相互作用による浸透圧応答シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of osmo-regulatory signal transduction by interactions among membrane proteins through their TM regions

研究代表者

齋藤 春雄 (Saito, Haruo)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60114485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母は高浸透圧ストレスにさらされるとHog1 MAPキナーゼ細胞内情報伝達経路を活性化し、生存に不可欠な様々な浸透圧適応反応を引き起こす。本研究では、浸透圧センサーである4回膜貫通型タンパク質Sho1の多量体構造を部位特異的クロスリンク法で決定し、その浸透圧による多量体内部構造の変化や他のタンパク質との相互作用変化を明らかにした。さらに、共浸透圧センサーMsb2(あるいはHkr1)が膜アンカータンパク質Opy2や細胞質の足場タンパク質と特異的かつ動的に結合することがHog1キナーゼの活性化に必須であった。これらの結果から、高浸透圧がHog1 MAPKを活性化する機構の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：When exposed to hyperosmolarity, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* activates the Hog1 MAP kinase signal pathway, which governs an array of adaptive responses. In this project, we investigated how the activity of the Hog1 MAPK pathway is regulated by the Sho1 osmosensor and the Hkr1/Msb2 co-osmosensors. First, we determined the oligomeric structure of the 4TM osmosensor Sho1 using a site-directed chemical crosslinking strategy. External osmolarity influenced the internal structure of the Sho1 oligomer as well as the interactions between the Sho1 oligomers and cytoplasmic signaling proteins. Second, we found that specific and dynamic bindings of the Hkr1/Msb2 co-osmosensors to the membrane anchorage protein Opy2 and to cytoplasmic scaffold proteins are essential for Hog1 activation. From these results, details of the mechanism of Hog1 activation by external high osmolarity are revealed.

研究分野：Molecular Cell Biology

キーワード：Signal transduction Yeast Osmoregulation Membrane protein MAP kinase

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母は、高浸透圧ストレスにさらされると様々な適応機能を発動する。それを統括的に制御するのが高浸透圧 Hog1 MAPK 経路である。この経路の大半は、機能も含め申請者が明らかにしてきたもので、現在では最も詳細に解明された細胞内情報伝達経路の一つに数えられている。上流部分には SLN1 支経路と SHO1 支経路とがあり、それぞれ独立に Pbs2 MAPKK の活性化を引き起こす。SLN1 支経路については既にその概要を詳らかにした。一方、SHO1 支経路については浸透圧検出機能を持つタンパク質として Sho1、Mbs2、Hkr1 が予想されていたが、それぞれの機能や相互の関係については不明な点が多かった。

SHO1 支経路で中心的機能を持つ Sho1 は 4 回膜貫通型タンパク質 (4TM-P) である。4TM-P は酵母だけでも数十個 (全遺伝子の約 1%) もあり、ほ乳類では CD9、CD63 などを含む tetraspanin ファミリーだけで数十種にもものぼる。タイトジャンクションの Occludin/Tricellulin と Claudin ファミリー、CD20 などの MS4A ファミリー、その他すべて含めると数百種の 4TM-P がある。4TM-P の機能としてはウイルス感染、免疫応答、シグナル伝達、細胞融合、細胞接着、受精などへの関与が知られている。多くの 4TM-P はホモあるいはヘテロの会合で多量体を形成するが、多量体の構造およびその機能は全く不明とよい。

このような背景をふまえ、Sho1 の浸透圧シグナル伝達における機能とその多量体組織化に焦点をあわせた研究を提案した。

2. 研究の目的

SHO1 支経路を主たる研究対象として、浸透圧センサーが細胞内シグナルを生起する機構を解析する。特に、膜タンパク質の膜貫通 (TM) 領域を介しての動的な相互作用に焦点を当てる。また浸透圧センサーが細胞外領域で浸透圧を感知する機構をも解明する。

これらの研究によって、細胞ストレス応答の一般原理を探ると共に、Sho1 の多量体構造を確立し、動植物にも数多くある 4TM 膜タンパク質の多量体構造解明の基盤とする。

3. 研究の方法

細胞が浸透圧に应答する仕組みを解明するために、应答に異常の見られる変異株の分離とその原因遺伝子の同定、さらにその遺伝子産物の機能の細胞生物学的・生化学的解析を組み合わせてもちいた。加えて、細胞の应答を定量的に測定するための遺伝子発現リポ

ーターや、膜タンパク質の多量体構造を解明するための化学クロスリンク法を活用した。

4. 研究成果

(1) Sho1 の多量体構造

酵母の浸透圧センサー Sho1 は 4 個の TM 領域を持ち、膜中で多量体化する。Sho1 の浸透圧センサー機能には多量体構造の浸透圧による変化が密接に関与していると予想して、まず Sho1 多量体の構造を決定した。具体的には、4 個の TM 領域の個々のアミノ酸残基を一個ずつシステインに置換した一連の変異体を作成した。それらを化学試薬によりクロスリンクすると、数多くのシステイン変異体がホモ二量体化することがわかった。すなわち、それらの変異体のシステイン残基は多量体中で比較的近い位置にあった。さらに、2 個のシステイン変異を同時に持つ Sho1 変異体のクロスリンクを用い、Sho1 が TM1/TM4 接合面により二量体化し TM2/TM3 接合面により三量体化すること、それらの接合が繰り返されることによって多量体を構成することなどを明らかにした。(発表論文 1)

(2) Sho1 による浸透圧検出機構

システイン間のジスルフィド結合や長さの異なる一群の化学クロスリンカー (chemical ruler) を利用して、より詳細な Sho1 分子間相互作用マップを作成した。さらに、そのマップを利用し、Sho1 の TM 領域の複数箇所において浸透圧によって大きな構造変化が起こることを明らかにした。浸透圧刺激によって Sho1 分子の構造が変化すると同時に、Sho1 の細胞質領域とアダプタータンパク質 Ste50 との結合が誘起されることも分かった。この結合により、Ste50 に結合している Ste11 と Sho1 に結合している Pbs2 との間でリン酸化反応が起こり、Pbs2 が活性化される。したがって、この反応が Sho1 による浸透圧検出の中心的な機構だと考えられる。

膜の構造とイオン透過性に大きな影響を与える抗真菌剤 Nystatin が、浸透圧そのものにはほとんど影響のない濃度でも Sho1 浸透圧センサーを活性化することがわかった。このことから、Sho1 浸透圧センサーが膜の構造変化、特に膨圧変化に应答するという結論を得た。(発表論文 1)

(3) 共浸透圧センサー Mbs2 の機能

浸透圧ストレスによる SHO1 支経路の活性化には、Hkr1 あるいは Mbs2 が共浸透圧センサーとして Sho1 とともに働く必要がある。Hkr1 と Mbs2 はいずれも高度に糖化修飾されたムチン様膜タンパク質で、いずれか一方があれば SHO1 支経路の活性化に充分であるこ

となどは既に報告した。しかし、それぞれの機能については不明な点が多かった。SH01 支経路活性化に関与する新たな因子の探索を行ったところ、Msb2 によるシグナル伝達には細胞質タンパク質 Bem1 が必須であることが分かった。また、Msb2 を介したシグナルにはアクチン繊維が重要であることも分かった。Bem1 は、Cdc42 や Ste20 と結合することでシグナル伝達の足場として働くと同時にアクチン重合の制御にも関与する。したがって、Msb2 による浸透圧変化の検出機構には細胞骨格の変化が密接に関与していると予想される。(発表論文3)

(4) 共浸透圧センサーHkr1の機能

Msb2 と同様に、Hkr1 を介したシグナルにも足場タンパク質が関与する可能性を検討した。具体的には、Hkr1 に特異的に結合するタンパク質を質量分析法で調べたところ、これまでに機能の知られていない細胞質タンパク質を見出した。現在その機能を解析中である。

(5) 膜アンカータンパク質Opy2の機能

浸透圧による Hog1 活性化には、Msb2 (あるいはHkr1)と膜アンカータンパク質Opy2との結合が必須であり、この結合にはOpy2の細胞外領域Cysteine rich (CR)領域が関与していることがわかった。CR領域は真菌類のOpy2ホモログで高度に保存されているが、その機能はこれまで不明であった。変異体の生化学的解析の結果、CR領域の8個のシステインが4組のジスルフィド結合により規則的な2次構造をとることを示した。また、このCR構造とMsb2のHMHドメインとが特異的に結合することをクロスリンク法で明らかにした。Opy2-Msb2結合が高浸透圧ストレスにより変化をうけることがわかった。

これらの結果を総合して、SH0支経路による浸透圧検出とHog1 MAPKの活性化には、主たる浸透圧センサーSho1のみならず、Opy2とMsb2との複合体が第二の浸透圧センサーとして働くことが必要であると結論付けた。(論文準備中)

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)

[雑誌論文](計 6件)

1. Tatebayashi K, Yamamoto K, Nagoya M, Takayama T, Nishimura A, Sakurai M, Momma T, and Saito H (2015) Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain

osmosensor Sho1. *Nat. Commun.*, **6**: 6975 (doi: 10.1038/ncomms7975).

2. Ichikawa K, Kubota Y, Nakamura T, Weng JS, Tomida T, Saito H, and Takekawa M (2015) MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. *Mol. Cell*, **58**: 35-46.
3. Tanaka K, Tatebayashi K, Nishimura A, Yamamoto K, Yang HY, and Saito H (2014) Yeast osmosensor Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci. Signal.*, **7**: ra21 (doi: 10.1126/scisignal.2004780).
4. Nakamura T, Saito H, and Takekawa M (2013) SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. *Nat. Commun.*, **4**: 1775 (doi: 10.1038/ncomms2752).
5. Tomida T, Oda S, Takekawa M, Iino Y, and Saito H (2012) The temporal pattern of stimulation determines the extent and duration of MAPK activation in a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Sci. Signal.*, **5**: ra76 (doi: 10.1126/scisignal.2002983).
6. Saito H, and Posas F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, **192**: 289-318.

[学会発表](計 2件)

発表者: 齋藤春雄

発表表題: Role of membrane proteins in osmoregulatory signal transduction in yeast

学会等: PRBB 会議

発表年月日: 2012年9月10日

発表場所: Barcelona, Spain

発表者: 齋藤春雄

発表表題: Dynamic regulation of hyperosmotic stress signaling in the budding yeast

学会等: 第22回国際生化学・分子生物学会議

発表年月日: 2012年9月6日

発表場所: Seville, Spain

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 春雄 (SAITO HARUO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60114485