

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370053

研究課題名(和文) 膜蛋白質の多量体形成と動的相互作用を介した高浸透圧感知機構

研究課題名(英文) Osmosensing mechanisms via oligomerization and dynamic interactions of the membrane proteins

研究代表者

館林 和夫 (Tatebayashi, Kazuo)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：50272498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、酵母の高浸透圧応答性HOG経路の上流SHO1支経路で働く高浸透圧センサーとして、4回膜貫通タンパク質のSho1を同定することに成功した。Sho1は高浸透圧に応じた自身の構造変化を通じ、細胞内シグナル因子Ste50と結合し、経路の活性化を促す。また、化学的クロスリンク法を用いた解析から、Sho1は膜貫通領域2、3番(TM2/3面)でホモ3量体、TM1/4面でホモ2量体、全体としてユニークな平面格子状多量体を形成し、他の膜タンパク質Hkr1/Msb2、Opy2と結合することで高浸透圧感知とシグナル伝達のプラットフォームとしても働くことを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I identified the four-transmembrane domain protein Sho1 as an osmosensor in the SHO1 branch of the yeast osmoregulatory HOG pathway. Structural changes are induced in the transmembrane regions of Sho1 by high osmolarity, leading to the increased binding of Sho1 to the cytoplasmic adaptor Ste50, accompanied by Hog1 activation. Chemical cross-linking analyses revealed that Sho1 forms homo oligomer of the dimers-of-trimers architectures by dimerizing at the TM1/4 interface and trimerizing at the TM2/3 interface. In addition, the TM1/4 interface of Sho1 binds to the membrane anchor Opy2, while the TM2/3 interface binds to the osmosensor Hkr1, indicating that Sho1 serves not only as an osmosensor but also as a scaffold.

研究分野：分子生物学

キーワード：高浸透圧 センサー 酵母 HOG経路 膜タンパク質 多量体 結合

1. 研究開始当初の背景

酵母の HOG MAP キナーゼ経路 (HOG 経路) は、細胞の高浸透圧応答に働く細胞内情報伝達経路である。申請者はこれまで HOG 経路において細胞内部のシグナル伝達機構の多くを明らかにしたが、情報伝達の端緒となる細胞が高浸透圧を感知する機構については、感知に関わるセンサーを含めて不明の点が多かった。本研究開始前に申請者は HOG 経路の上流 SH01 支経路における新規高浸透圧センサーとして Hkr1, Msb2 というムチン様膜タンパク質を同定し、これが同じく膜タンパク質の Sho1 と相互作用して高浸透圧感知に関わることを明らかにした。また、予備研究から Sho1 がホモ多量体を形成すること、Opy2 とも相互作用することを示唆する知見を得た。したがって SH01 経路における高浸透圧の感知と経路活性化には Sho1, Hkr1/Msb2, Opy2 といった膜タンパク質間の結合や多量体形成の関与が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では SH01 経路における高浸透圧の感知と経路活性化に重要な役割を果たすことが想定される膜タンパク質 Sho1, Hkr1/Msb2, Opy2 の間での異種タンパク質同士、同一タンパク質同士の相互作用様式を明らかにするとともに、高浸透圧刺激がこの結合様式に与える変化を解析する。これらの解析から膜タンパク質間の多量体形成や動的結合が高浸透圧感知や経路活性化にいかに関与しているのかを明らかにし、膜タンパク質による高浸透圧センシングの動作原理を解明するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

分子生物学、分子遺伝学、生化学的手法を用いての研究を行った。具体例を挙げる。

3-1) 各種遺伝子の変異導入

Sho1 の膜貫通領域内への変異導入など、本研究における各種遺伝子への変異導入はオリゴ DNA を用いた PCR 法により作成した。変異は全てシーケンシングにより確認した。

3-2) HOG 経路活性化の測定

HOG 経路活性化の定量的測定は、HOG 経路の活性化特異的に発現誘導される 8xCRE-lacZ レポーターを使用した。各細胞抽出液による基質の ONPG に対する β -galactosidase 反応を

OD₄₂₀ 値として計測し、細胞量、反応時間で標準化した。

3-3) 化学クロスリンク実験

膜貫通領域間の距離、位置関係を調べるために、膜貫通領域に導入した 2 つの Cys 間でのクロスリンク実験を行った。クロスリンクにはマレイミド基を分子内に 2 つ有する o-PDM、p-PDM、BMH、3 つのマレイミド基を有する TMEA などを用いた。細胞を破碎後、細胞壁を含む細胞破砕片を低速遠心で除去し、13,000g 10 分遠心して得られた沈殿を膜フラクションとして TE バッファーに懸濁した。この膜フラクションに各クロスリンカーを 0.2mM 加え室温でインキュベートしてクロスリンク反応を行い、SDS-PAGE、ウェスタンブロットなどでクロスリンク効率を解析した。in vivo クロスリンクでは培養液中の細胞に直接クロスリンク試薬を添加してクロスリンク反応を行った。

3-4) S-S 結合検出実験

極めて近傍に位置する Cys 同士は酸化されると S-S 結合を形成するため、こうした Cys ペアを探索して近接するアミノ酸を同定した。クロスリンク実験と同様に膜フラクションを回収し、還元剤を含まない条件で SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行い、S-S 結合産物を検出した。

3-5) タンパク質間の結合解析

タンパク質同士の結合解析には、免疫共沈法及びクロスリンク実験を用いた。

4. 研究成果

4-1) Sho1 の多量体構造の解析

Sho1 の多量体形成

4 回膜貫通タンパク質の Sho1 は自身の膜貫通(TM)ドメインを介してホモ多量体を形成することを共沈実験等により明らかにした。

Sho1 の多量体構造

Sho1 の 4 つの膜貫通(TM)領域に網羅的に Cys 置換変異を導入し、クロスリンク距離が異なる 3 種のクロスリンカーを用い、同一残基間でクロスリンク可能な距離の近い Cys 置換部位を同定した。さらに同一分子間でクロスリンク可能な Cys 変異を 1 分子中に 2 種類もつ二重変異を作成し、クロスリンク実験により解析した結果、Sho1 は TM2/3 をインターフェイスとした三量体形成面と、TM1/4 を別のインターフェイスとした二量体形成

面をもつ、極めてユニークな平面格子状の多量体構造をとることが明らかになった。

4-2) Sho1 の高浸透圧センサーとしての機能 高浸透圧依存的 Sho1 の構造変化

Sho1 が高浸透圧センサーである可能性を検討するため、高浸透圧による Sho1 多量体の構造変化の有無を調べた。Sho1 の TM 領域に導入した Cys 間でのクロスリンク効率が高浸透圧刺激により上昇する部位が複数みつかかり、高浸透圧による Sho1 多量体の構造変化の誘導が示された。また、この構造変化は Hkr1, Msb2, Opy2 といった SH01 経路の他の膜タンパク質に依存せずに起こった。

高浸透圧依存的な Sho1 と細胞内シグナル因子 Ste50 との結合誘導

Sho1 の構造変化が SH01 経路の他のシグナル因子との結合性の変化に繋がる可能性を検討した。その結果、アダプタータンパク質の Ste50 との結合性が高浸透圧によって誘導された。SH01 経路の活性化には Ste11 MAPKKK が Pbs2 MAPKK をリン酸化する過程が必須である。Ste11 は Ste50 を介して膜アンカーの Opy2 と間接的に結合し細胞膜に、Pbs2 は Sho1 と結合して細胞膜にリクルートされる。したがって高浸透圧による Ste50 と Sho1 の結合誘導により Ste11 と Pbs2 の相互作用も誘導され、SH01 経路活性化に繋がると考えられた。

Sho1 のセンサー機能

Sho1 の TM 領域の変異スクリーニングにより、高浸透圧刺激を受けても構造変化が起こらない Sho1 変異体を単離した。この変異体では高浸透圧による Sho1 の Ste50 との結合誘導がおこらず、また SH01 経路の活性化も起こらなかった。高浸透圧に依存した Sho1 の構造変化が Ste50 結合性の上昇、SH01 経路活性化を引き起こすことから、Sho1 は高浸透圧を感知して経路を活性化する高浸透圧センサーであることが示された。

4-3) Sho1 多量体と膜タンパク質との結合

Sho1 は以下に示すように、その多量体の 2 つのインターフェイスで Hkr1 や Opy2 と結合し、高浸透圧応答シグナル伝達のプラットフォームとして働くことがわかった。

Sho1 の TM2/3 面での Hkr1 との相互作用とシグナル伝達

Sho1 が Hkr1 と結合することを我々は本研究

前に示したが、本研究で Sho1 の TM2/3 面が Hkr1 との結合面であることを明らかにした。Sho1 の TM2/3 での 3 量体形成を阻害する変異を単離するため、TM2 と TM3 の近接したアミノ酸に様々な変異を導入し目的の変異体を得た。この変異により TM2/3 面での 3 量体形成が阻害されたのに加え、Sho1 と Hkr1 との結合性が低下し、Hkr1 依存的な SH01 経路の活性化も阻害された。

Sho1 の TM1/4 面での Opy2 との相互作用共沈実験により Sho1 と Opy2 が TM 領域を介して結合することがわかった。Sho1 及び Opy2 の TM 領域内にそれぞれ Cys 変異を導入し、クロスリンクを行ったところ、Opy2 は Sho1 の TM1、TM4 と近接していることがわかった。すなわち Sho1 の TM1/4 面は Opy2 と結合するインターフェイスである。

4-4) Hkr1/Msb2 と Opy2 との結合

細胞外領域での Hkr1/Msb2 と Opy2 との結合

Hkr1/Msb2 と Opy2 が結合することを共沈実験により見いだした。欠失変異体を用いた解析等から、両者の結合には Hkr1/Msb2 の細胞外領域に存在する HMH ドメインと、Opy2 の細胞外領域に存在する Cys に富んだドメイン (CR ドメインと名付けた) が必要であった。また両者の結合は SH01 経路の活性化にも必須であった。

Msb2 結合に関わる Opy2 の新規ドメインの構造と機能の解析

Opy2 の Hkr1/Msb2 結合部位 (CR ドメイン) には、他の酵母や菌類の Opy2 オルソログで保存されている 8 つの Cys が存在する。この Cys 残基の Ala 置換変異体の機能解析、クロスリンク実験による構造解析の結果から、CR 領域は分子内で 4 つの S-S 結合を介してドメイン構造を形成していることを導き出した。

高浸透圧に依存した Msb2-Opy2 結合様式の変化

Opy2 の CR ドメインと Msb2 の HMH ドメインに Cys を導入しクロスリンク実験を行ったところ複数の部位でクロスリンクがおこり、両者は直接結合していると考えられた。また高浸透圧刺激により特定の Cys 間におけるクロスリンク効率が低下した。このことは Opy2 と Msb2 の結合部位で高浸透圧依存的な構造変化が起きたことを示しており、Opy2-Msb2 複

合体が高浸透圧を感知するセンサーとして働く可能性が考えられた。

4-5) 機能的に重複した Hkr1 と Msb2 の細胞質領域を介した異なる経路活性化機構

高浸透圧センサーの Hkr1 と Msb2 は SH01 経路活性化と言う意味では重複した機能を有しているが、経路活性化の機構は両者で異なっていることを明らかにした。Msb2 による活性化には Msb2 の細胞質領域と足場タンパク質 Bem1 との結合やアクチン細胞骨格が必要であるが、Hkr1 による活性化はそれらが必要としなかった。

4-6) SH01 経路の新規足場タンパク質 Ahk1 の同定と機能解析

Ahk1 の足場タンパク質としての機能 Hkr1 と Msb2 の SH01 経路活性化機構の違いはその細胞質領域の違いを反映していると考えられる。そこで Hkr1 の細胞質領域との共沈タンパク質をショットガン質量分析することでスクリーニングした。その結果、機能未知の Yd1073w が Hkr1 の細胞質領域と結合することを見だし、Ahk1 (Associated with Hkr1) と名付けた。共沈実験などから、Ahk1 は Hkr1 に加え、SH01 経路で働く Sho1, Ste11, Pbs2 とともに結合する足場タンパク質であることがわかった。

Ahk1 の SH01 経路における機能

AHK1 の欠失変異は、高浸透圧による SH01 経路の活性化を部分的に阻害し、Ste50 や Opy2 の恒常的活性化型変異による SH01 経路活性化をほぼ完全に阻害したことから、Ahk1 が SH01 経路のシグナル伝達に関与することがわかった。

Ahk1 のクロストーク抑制機能

貧栄養環境によって活性化される Kss1 MAPK 経路は Ste11 などの上流因子を SH01 経路と共有している。高浸透圧刺激により Msb2 を介して Kss1 へのクロストークシグナルが伝達されることが知られているが、このクロストークは Hkr1 を介しておこらない。これに対し Ahk1 の破壊株で Hkr1 を介した高浸透圧による Kss1 へのシグナルのクロストークが起きることから、Ahk1 は Hkr1 から Kss1 への誤ったシグナルの流れを防ぐクロストーク抑制機能を有することが示された。

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 4 件)

1. Nishimura A, Yamamoto K, Oyama M, Kozuka-Hata H, *Saito H, and *Tatebayashi K. A scaffold protein Ahk1 that associates with Hkr1, Sho1, Ste11 and Pbs2 inhibits cross-talk signaling from the Hkr1 osmosensor to the Kss1 MAPK. *Mol. Cell Biol.*, **36(7)**:1109-1123 (2016) (* Corresponding authors)

2. Yamamoto K, *Tatebayashi K, and *Saito H. Binding of the extracellular eight-cysteine motif of Opy2 to the putative osmosensor Msb2 is essential for activation of the yeast High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway. *Mol. Cell Biol.*, **36(3)**:475-487.(2016) (* Corresponding authors)

3. #*Tatebayashi K, #Yamamoto K, Nagoya M, Takayama T, Nishimura A, Sakurai M, Momma T, and *Saito H. Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nature Communications*, **6**:6975 (2015) (* Corresponding authors, # Equal contribution)

4. Tanaka K, *Tatebayashi K, Nishimura A, Yamamoto K, Yang HY, and *Saito H. Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Science Signaling* **7**: ra21 (2014) (* Corresponding authors)

[学会発表] (計 9 件)

1. 西村晶子、館林和夫、齋藤春雄 「出芽酵母の高浸透圧応答 HOG 経路に関する新規足場タンパク質の同定と機能解析」 第 38 回 日本分子生物学会年会、第 88 回 日本生化学会大会、合同大会 ; 2015 年 (神戸ポートアイランド)
2. 山本勝良、西村晶子、館林和夫、齋藤春雄 「浸透圧応答を制御する出芽酵母 HOG MAP キナーゼ経路における膜蛋白質 Opy2

- の細胞外 cysteine-rich 領域の役割」第 37 回 日本分子生物学会年会、; 2014 年 (パシフィコ横浜)
3. 西村晶子、舘林和夫、尾山大明、斎藤春雄「出芽酵母の高浸透圧応答 HOG 経路に
関与する新規足場タンパク質の同定と機能解析」第 37 回 日本分子生物学会年会、; 2014 年 (パシフィコ横浜)
 4. 高山知美、舘林和夫、斎藤春雄「出芽酵母 Sho1 浸透圧センサーの作用機構: 浸透圧による Sho1-Ste50 結合誘導の解析」第 37 回 日本分子生物学会年会、; 2014 年 (パシフィコ横浜)
 5. 舘林和夫、山本勝良、奈古屋美穂、西村晶子、斎藤春雄「四回膜貫通型 Sho1 高浸透圧共センサーが形成する二次元六角格子状多量体構造とそのシグナル伝達への関与」第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 (神戸ポートアイランド)
 6. 高山知美、舘林和夫、富田太郎、斎藤春雄「出芽酵母 HOG MAPK 経路の SH01 支経路における Ste11 MAPKKK の活性化機構の解明」第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 (神戸ポートアイランド)
 7. 西村晶子、山本勝良、舘林和夫、斎藤春雄「出芽酵母の高浸透圧センサーHKR1 の機能解析」第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 (神戸ポートアイランド)
 8. 山本勝良、西村晶子、舘林和夫、斎藤春雄「高浸透圧ストレス応答 HOG MAPK 経路活性化に必須な膜蛋白質 Opy2 の細胞外システイン・リッチ領域の解析」第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 (神戸ポートアイランド)
 9. 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 33 回日本分子生物学会年会 (福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)

岡)第 33 回日本分子生物学会年会 (福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘林 和夫 (TATEBAYASHI KAZUO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：50272498