

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04761

研究課題名(和文) 高浸透圧センシングの分子機構解明

研究課題名(英文) Study on the osmo-sensing mechanism in yeast

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が高浸透圧を感知する分子機構を明らかにするため、酵母の高浸透圧応答に働くHog1-MAPキナーゼ(MAPK)経路の高浸透圧センサーの研究を行い、Hog1経路には膜タンパク質型と非膜タンパク質型の高浸透圧センサーの存在することを明らかにした。前者については、高浸透圧感知・応答に必要な複数のセンサー-膜タンパク質の複合体形成について、その相互作用部位を同定することに成功した。後者については、細胞質内のMAPKKによるMAPKリン酸化(活性化)を高浸透圧が増強する作用があることを見出し、細胞が環境ストレスに対して適切に応答する仕組みを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになった膜タンパク質型及び非膜タンパク質型の高浸透圧センサーを介した高浸透圧応答制御機構は、適切な環境ストレス応答を保障する仕組みとしてヒトなどの高等真核生物にも当てはまる可能性が高い。今後の検証を通じて、環境ストレス応答制御の全体像の理解や、環境ストレス耐性の動植物への付与技術の開発などに繋がることを期待される。また本研究で解明されたHog1-MAPKの制御機構に関する知見は、ヒトMAPKの制御破綻が引き起こす癌や自己免疫疾患といった疾患の治療法・治療薬の開発にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The MAP kinase (MAPK) Hog1 is the central regulator of osmoadaptation in yeast. Upon high osmolarity, the Sho1 and Sln1 membrane-associated osmosensors, respectively, activate the Ste11-Pbs2-Hog1 MAPK cascade and the Ssk2/Ssk22-Pbs2-Hog1 MAPK cascade. Sho1 binds to several transmembrane proteins such as Opy2 to form an osmo-sensing protein complex for transduction of an activating signal. In this work, we identified two binding sites between Sho1 and Opy2, and found that the Sho1-Opy2 interaction enhances the signaling efficiency from Ste11 MAPKKK to Pbs2 MAPKK. In addition, we found that the Hog1 MAPK phosphorylation by Pbs2 MAPKK is enhanced by high osmolarity independently of the membrane-associated osmosensors. The lack of the osmotic enhancement of the Pbs2-Hog1 reaction suppresses Hog1 activation by basal MAP3K activities and prevents pheromone-to-Hog1 crosstalk in the absence of osmostress, which enable the yeast cells to respond appropriately to environmental stresses.

研究分野：分子生物学

キーワード：高浸透圧 酵母 MAP kinase経路 センサー シグナル伝達 リン酸化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高浸透圧応答性 Hog1 MAP キナーゼ経路

地球温暖化により乾燥、高温、高浸透圧などの環境ストレスが生物に大きな脅威となっており、苛烈な環境に適応できる動植物の開発、環境ストレスが引き起こす疾患の予防・治療法の開発に向けて、環境ストレス適応メカニズムを細胞レベルで理解することが必要である。真核生物のよいモデル系である酵母では、Hog1 MAP キナーゼ経路が高浸透圧適応に働く情報伝達経路であり、真核生物における環境ストレス適応経路の原型と考えられる。Hog1 経路では、細胞外の高浸透圧を細胞膜上の高浸透圧センサーが感知し、2 つの上流支経路 (SLN1、SHO1 支経路) を通じ、Ssk2/22、Ste11 というそれぞれの MAPKK キナーゼ (MAPKKK)、共通の Pbs2 MAPK キナーゼ (MAPKK)、Hog1 MAP キナーゼにリン酸化の形で活性化シグナルを伝達する。活性化された Hog1 は転写因子をはじめとする様々な基質のリン酸化を介して、酵母の高浸透圧適応に働く。

(2) 高浸透圧センサー

経路活性化の端緒はセンサーを介した高浸透圧を感知するステップであると考えられるが、特に SHO1 支経路における高浸透圧感知については不明の点が多かった。申請者は研究開始直前に、SHO1 支経路において膜タンパク質の Sho1 が高浸透圧センサーとして働くこと、Sho1 は細胞膜上で平面格子状ホモ多量体構造をとり、さらに Opy2 や Hkr1/Msb2 といった膜局在型共センサーとシグナル伝達に必須な複合体を形成していることを明らかにした (文献 1)。この知見は SHO1 支経路の高浸透圧センシング機構の解明のブレイクスルーとなり、本研究における「センサー膜タンパク質間の相互作用に関する研究」を着想するに至った。

一方、酵母の高浸透圧センサーとして上記の複数の膜タンパク質は知られていたが、膜タンパク質以外による高浸透圧センシング機構の存在について本研究以前は不明であった。

2. 研究の目的

(1) 上述のように、高浸透圧感知の分子機構を理解しその作用機作の本質を理解するためには、センサー膜タンパク質複合体 (Sho1-Opy2-Hkr1/Msb2) の各膜タンパク質間の相互作用に関する構造基盤の解明が必須である。そこで本研究では、特に Sho1-Opy2 間の結合に焦点を当てて、その結合様式の詳細な構造情報を取得し、高浸透圧刺激や恒常的活性型変異により結合様式にどのような影響があるかを解析し、Sho1 複合体による高浸透圧感知と経路活性化の動作原理を明らかにすることを目的とする。

(2) 研究開始後、既知のセンサー膜タンパク質の欠失変異体を用いた解析中に、センサー膜タンパク質に依存しない新たな高浸透圧感知機構の存在を見出した。これは「高浸透圧センサーは膜タンパク質である」というこれまでのセンサー概念を覆す画期的な発見であり、上記に加え、この新しい高浸透圧感知機構の解明とその生理的機能の解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

リン酸化検出、結合部位同定などのための生化学的手法や、各種変異体の単離、解析のための分子遺伝学的手法などを融合的に用いて研究を行った。以下、主な方法をあげる。

(1) 各種遺伝子の変異導入：各種遺伝子 (SHO1, OPY2, HOG1 など) への変異導入はオリゴ DNA を用いた PCR 法により作成した。また変異体スクリーニングにおけるランダム変異の導入には Mn⁺⁺ 添加による error prone PCR を用いた。

(2) レポーター遺伝子を用いた Hog1 経路活性化の測定：Hog1 経路活性化の定量的測定は、Hog1 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 beta-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) 化学的クロスリンク実験：Opy2, Sho1 の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 間でクロスリンク実験を行った。マレイミド基を分子内に 2 つ有する BMH をクロスリンカーに使い、クロスリンクの有無は SDS-PAGE による泳動度の変化で判断した。

(4) キナーゼのリン酸化検出：Hog1 MAPK、Pbs2 MAPKK のリン酸化の定量は、リン酸化特異的抗体を使ったウエスタンブロットによる検出法、あるいはリン酸化型、非リン酸化タンパク質の泳動度の違いを利用した Phos-tag PAGE による分離法を用いた。

4. 研究成果

(1) Sho1 と Opy2 の膜貫通領域間相互作用は Hog1 経路のシグナル効率を増強する (文献 2)

(1-1) Opy2 恒常活性型変異は Ste11 MAPKKK による Pbs2 MAPKK 活性化を増強する

申請者は先行研究及び本研究で Opy2 の膜貫通領域内にランダム変異を導入し、高浸透圧刺激なしで Hog1 経路を活性化する恒常活性型変異体を単離した (G95、F96I、A104V など)。遺伝学的解析から、これらは Ste11 MAPKKK による Pbs2 MAPKK のリン酸化・活性化を増強するが、Pbs2 MAPKK による Hog1 MAPK のリン酸化には影響がないことがわかった。

(1-2) Sho1 恒常活性型変異 Sho1-A30D も Ste11 による Pbs2 活性化を増強する

Sho1 についても Opy2 と同様変異体スクリーニングを行ったところ、4 回膜貫通(TM) タンパク質 Sho1 の TM1 細胞質側に変異部位をもつ Sho1-A30D が恒常活性型変異として単離された。この変異は上記の Opy2 変異と同様、Ste11 による Pbs2 のリン酸化を増強することがわかった。

(1-3) Sho1-A30D 変異は Opy2 との結合性を上昇させ、Hog1 経路の活性化を引き起こす

共沈実験から Sho1-A30D 変異体は野生型 Sho1 より Opy2 との結合性が上昇することがわかった。A30D が Sho1 の TM1 の細胞質側に位置することから、結合相手の Opy2 の TM 領域細胞質側のアミノ酸領域(117-121aa)にアラニンを置換した変異体を複数作成したところ、Opy2 の Y119、W120 へのアラニン置換により Sho1-A30D との増強した結合が解消された。さらにこの変異は Sho1 との結合性の低下に加え、Sho1-A30D による Hog1 経路活性化も抑えた。この結果は Sho1 の A30D 変異により、Sho1 TM1 と Opy2 の TM の細胞質側領域の結合性が上昇し、これが Hog1 経路の活性化を引き起こしたことを示す。

(1-4) Sho1 と Opy2 の TM 領域間相互作用部位の同定

先行研究で申請者は Sho1 の TM4 と Opy2 の TM がその細胞外側領域で結合することを示した。上記の知見は新たに Sho1 の TM1 と Opy2 の TM が細胞質側で相互作用することを示唆する。そこで結合性の上昇した Sho1-A30D を使い、Sho1 TM1 と Opy2 TM の両細胞質側領域に系統的に Cys 置換を導入して、BMH を使った化学的クロスリンクを行った。その結果、両 TM 内の Cys 領域が十分近接している場合のみ起こるクロスリンクが Sho1-Y29C と Opy2-R119C の間で検出された。この結果は Opy2 がその TM 領域の細胞質側で Sho1 の TM1 と、細胞外側で Sho1 の TM4 と 2 箇所相互作用することを示す。

(1-5) 考察

Sho1 は先行研究から TM1/TM4 でホモ 2 量体、TM2/TM3 でホモ 3 量体を形成し、全体で平面格子状ホモ多量体構造を取ることが示されている。本研究より Opy2 の 1 分子は TM1/4 で形成された Sho1 の 2 量体とそれぞれ異なる領域で結合することが示唆された。Opy2 はその細胞質領域でリンカータンパク質の Ste50 を介して Ste11 MAPKKK と複合体を形成しており、一方、Sho1 は TM4 から続く細胞質領域で Pbs2 MAPKK と結合している。したがって、Sho1-Opy2 複合体の高浸透圧刺激によるコンフォメーション変化が、細胞質領域で結合する Ste11 と Pbs2 との間のリン酸化反応の増強に働く、という活性化モデルが考えられた。

(2) 高浸透圧はモノリン酸化 Pbs2 による Hog1 リン酸化を増強する(文献 3)

(2-1) 高浸透圧は膜タンパク質型浸透圧センサーなしでも Hog1 MAPK を活性化できる

SHO1 支経路の既知の膜タンパク質型浸透圧センサー(Sho1、Opy2、Hkr1、Msb2)及び SLN1 支経路の MAPKKK を全て欠失した細胞でも、Hog1 経路は高浸透圧によって弱いながら活性化することがわかった。このことは膜タンパク質型浸透圧センサーに依存せずにそれより下流で高浸透圧が Hog1 を活性化する機構が存在することを示す。

(2-2) 非膜タンパク質型センサーは Pbs2 による Hog1 リン酸化ステップで働く

Hog1 経路を構成する因子の各種変異体を用いた分子遺伝学的解析から、膜タンパク質型浸透圧センサー非依存的に高浸透圧が働くのは、Pbs2 による Hog1 のリン酸化反応であることがわかった(高浸透圧依存的なリン酸化増強)。

(2-3) Pbs2 の活性化ループ内リン酸化は MAPKKK の種類によりリン酸化様式が異なる

一般に、MAPKKK は MAPKK の活性化ループ内の 2 箇所の保存された Ser, Thr 残基をリン酸化し、MAPKK を活性化することが知られている。Pbs2 MAPKK では、自身の活性化ループ内のリン酸化部位である Ser514 と Thr518 のうち、Ste11 MAPKKK により Thr518 のみがリン酸化される一方、Ssk2/22 MAPKKK により高浸透圧強度に応じて Pbs2 の Ser514 のみがモノリン酸化される、あるいは Ser514、Thr518 の両残基ともリン酸化されることが明らかになった。

(2-4) 高浸透圧によるリン酸化増強はモノリン酸化 Pbs2 が Hog1 をリン酸化するのに必要である

Hog1 の C 末端の L16 ドメイン欠失変異体は高浸透圧依存的な Pbs2 による Hog1 リン酸化の増強を受けないことが明らかになった。この変異体を用いた解析などから、高浸透圧依存的な Hog1 リン酸化の増強作用は、モノリン酸化型 Pbs2 が Hog1 をリン酸化する反応に必要なことがわかった。

(2-5) 高浸透圧刺激なしでは Hog1 リン酸化増強が起こらないことが、「非刺激時の Hog1 活性化」、「接合経路から Hog1 へのクロスローク」の抑制に働く

変異体スクリーニングによって、高浸透圧なしでもリン酸化増強を受ける Hog1 変異体として Hog1-N149H/D162G を単離した。この変異体を用いた解析を通じて、「高浸透圧刺激下のみモノリン酸化 Pbs2 による Hog1 のリン酸化増強が起きる」という活性制御機構が、非刺激時の Hog1 活性化の抑制、接合経路から Hog1 へのクロスローク抑制に働き、環境ストレス(高浸透圧)に対する細胞の適切な応答を可能にすることを見出した。

<引用文献>

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)

Takayama T, Yamamoto K, Saito H, and Tatebayashi K. Interaction between the transmembrane domains of Sho1 and Opy2 enhances the signaling efficiency of the Hog1 MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*. **14**(1):e0211380 (2019)

Tatebayashi K, Yamamoto K, Tomida T, Nishimura A, Takayama T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Adachi-Akahane S, Tokunaga Y, and *Saito H. Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP2K. *EMBO J*. **39**(5):e103444 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tatebayashi K, Yamamoto K, Tomida T, Nishimura A, Takayama T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Adachi-Akahane S, Tokunaga Y, Saito H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP2K.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103444
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019103444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takayama Tomomi, Yamamoto Katsuyoshi, Saito Haruo, Tatebayashi Kazuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Interaction between the transmembrane domains of Sho1 and Opy2 enhances the signaling efficiency of the Hog1 MAP kinase cascade in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0211380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 館林和夫
2. 発表標題 複数の異なる浸透圧センサーを介した酵母の高浸透圧応答性MAPK経路の制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 シンポジウム「浸透圧ストレスシグナリングの最前線」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館林和夫
2. 発表標題 酵母の高浸透圧センシング機構と環境応答シグナルの制御
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会九州部会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館林和夫、山本勝良、尾山大明、秦裕子、富田太郎、徳永裕二、斎藤春雄
2. 発表標題 高浸透圧がモノリン酸化Pbs2 MAPKキナーゼによるHog1 MAPキナーゼのリン酸化を促進することで、高浸透圧刺激特異的HOG経路活性化が保障される
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Tatebayashi, Katsuyoshi Yamamoto, Taichiro Tomida, Satomi Adachi-Akahane, Akiko Nishimura, Tomomi Takayama, and Haruo Saito
2. 発表標題 Activation of the Hog1 MAP kinase requires a direct osmotic priming of Hog1 itself as well as stimulation of the upstream osmosensors
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saito H, Tatebayashi K, Yamamoto K, Nishimura A, Takayama T.
2. 発表標題 Roles of molecular assemblies in osmoregulatory signal transduction.
3. 学会等名 14th International Congress on Yeasts (Awaji Yumebutai) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tatebayashi K, Yamamoto K, Takayama T, Nishimura A, Saito H.
2. 発表標題 Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane osmosensor Sho1.
3. 学会等名 14th International Congress on Yeasts (Awaji Yumebutai) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

地球温暖化などがもたらす環境ストレス下で細胞が適切に応答する仕組み
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/press/z2021_00105.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----