

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 -2008

課題番号：19570122

研究課題名（和文） 出芽酵母の HOG MAPK 経路における高浸透圧感知の分子機構

研究課題名（英文）Molecular osmo-sensing mechanism in the yeast HOG MAPK pathway

研究代表者

館林 和夫 (Tatebayashi Kazuo)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号；50272498

研究成果の概要：我々は酵母の高浸透圧適応に必須な HOG MAPK 経路の上流支経路である SHO1 経路の高浸透圧センサーとして、ムチン様膜タンパク質の Hkr1 及び Msb2 を同定し、高浸透圧感知に関わる分子機構モデルを提唱した。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000   | 2,210,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：分子生物学

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

真核生物は絶えず変化する生活環境に適応するため、ストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路を備えており、酵母では、高浸透圧環境によって活性化される出芽酵母の HOG 経路が存在する。HOG 経路は 2 つの独立した上流支経路の SHO1 経路、SLN1 経路が高浸透圧刺激を感知し、シグナルを下流の MAPK キナーゼに伝え、さらに共通の Pbs2 MAPK キナーゼ、Hog1 MAP キナーゼが順次リン酸化・活性化される。活性化された Hog1 は様々な基質のリン酸化を通じ、高浸透圧応答遺伝子群の転写誘導、リン酸化修飾による細胞周期や翻訳の制御などに働き、細胞の高浸透圧適応を可能にする。HOG 経路が高浸透

圧を感知したあとの経路活性化と制御のメカニズムについては、その詳細が分子レベルで明らかになりつつあるが、経路活性化の出発点である高浸透圧感知の分子機構に関しては、高浸透圧を感知するセンサーが何かを含めて不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

HOG 経路の上流支経路である SHO1 経路がいかにして細胞外の高浸透圧環境を感知しているのか、特にそれを感知するセンサーは何かはそれまで全く不明であった。我々はすでに予備研究でこの高浸透圧センサーの候補となる膜蛋白質(Hkr1, Msb2)を見いだしており、これらが高浸透圧センサーとして働くこ

とを実証するとともに、高浸透圧感知をいかに細胞内にシグナルとして伝えていくのか、高浸透圧感知の分子機構を解明することを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) HOG 経路の各因子と高浸透圧センサー Hkr1, Msb2 や Sho1 との遺伝学的上位関係の解析には、恒常的活性化変異、欠失変異などの各種変異を組み合わせて、様々な遺伝学的解析を行なった。

(2) Hkr1, Msb2 や Sho1 などの蛋白質の結合性を調べるために、共沈実験をはじめとする様々な生化学的、分子生物学的実験を行なった。

(3) センサー蛋白質の細胞内局在についてはその GFP 融合蛋白質を作製し、蛍光顕微鏡により観察するなど細胞生物学的手法で解析した。

### 4. 研究成果

(1) 我々は SHO1 経路における高浸透圧感知に関わるセンサー因子を探索したところ、二つの膜貫通型ムチン様蛋白質の Hkr1, Msb2 が SHO1 経路における高浸透圧センサー機能を有することを見いだした。Hkr1/Msb2 はセリン・トレオニンに富み高度に糖鎖修飾された細胞外ドメイン(ST-rich 領域)を有しており、この領域を欠失すると恒常的活性化型になり、別の膜蛋白質の Sho1 を介して HOG 経路を活性化する。また、ST-rich 領域の長さを変えると浸透圧に対する細胞の反応性が変わることから、ST-rich 領域は高浸透圧感知に重要である。以上から我々は SHO1 経路における高浸透圧感知の分子機構として、Hkr1/Msb2 内 ST-rich 領域の糖鎖のゲル構造が高浸透圧環境下で変化し、マスクされていた Sho1 との相互作用ドメインが Sho1 と結合して活性化シグナルを細胞内に伝達する、というモデルを提唱した。SHO1 経路においてムチン様膜蛋白質による高浸透圧の感知システムを新たに発見したことは、高浸透圧ストレスが特定の MAPK 経路を特異的に活性化する機構の解明に貢献したばかりでなく、動物細胞など他の高等真核生物における高浸透圧センシング機構の解明の手がかりになると考えられる。

(2) SHO1 経路の高浸透圧センサーとして我々が同定した Msb2 が、O-mannosyl transferase の一つである Pmt4 によって膜外領域に O 型の糖鎖修飾を強くうけ、この修飾が Msb2 の活性制御、環境感知機能に重要であることを明らかにした。また、O 型糖鎖修飾に欠損のある Pmt4 欠失株を tunicamycin 処理し N 型糖鎖修飾に欠損を与えた場合、HOG 経路と多くのシグナル因子を共有するが、高浸透圧ではなく貧栄養環境

によって活性化される擬菌系経路の Kss1 MAPK が Msb2 依存的に活性化するが、Hog1 MAPK は活性化しないことを見いだした。これに対し、擬菌系経路で Kss1 を活性化する Ste7 MAPKK、あるいは Kss1 自身を欠失させて Kss1 の活性化を抑制すると、糖鎖修飾欠損により Hog1 MAPK が活性化された。また Ptp2 protein phosphatase の欠失によっても、糖鎖修飾欠損による Hog1 活性化がおき、一方 Kss1 活性化は Hog1 依存的に抑制された。以上のことから、Msb2 を上流センサーとしてもつ HOG 経路と擬菌系経路において、それぞれの MAPK の間には互いの活性化を制御するフィードバック・ループの存在が明らかになった。

### 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5件;全て査読有)#は同等貢献

1. #Yang HY, #Tatebayashi K, Yamamoto K, & Saito H. Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *EMBO J.* **28**:1380-1391. (2009)
2. #Horie T, #Tatebayashi K, Yamada R, & Saito H. Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 MAP kinase kinase kinase in the yeast HOG osmoregulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 5172-5183 (2008).
3. Murakami Y, Tatebayashi K, & Saito H. Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell Biol.* **28**:2481-2494 (2008)
4. #Tatebayashi K, #Tanaka K, #Yang HY, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, & Saito H. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* **26**:3521-3533. (2007)
5. Oki M, Ma L, Wang Y, Hatanaka A, Miyazato C, Tatebayashi K, Nishitani H, Uchida H, & Nishimoto T. Identification of novel suppressors for Mog1 implies its involvement in RNA metabolism, lipid

metabolism and signal transduction. *Gene*.  
400: 114-121 (2007)

〔学会発表〕(計9件)

1. 舘林、田中、楊、山本、松下、富田、今井、斎藤、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、神戸パシフィコ横浜、(シンポジウム) 2007.12.14
2. 長崎、舘林、山本、植野、斎藤、宮野、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、神戸パシフィコ横浜、(シンポジウム) 2007.12.14
3. 田中、舘林、楊、山本、松下、富田、今井、斎藤、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、神戸パシフィコ横浜、(口頭、ポスター発表) 2007.12.13, 14
4. 楊、舘林、田中、山本、松下、富田、今井、斎藤、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、神戸パシフィコ横浜、(ポスター発表) 2007.12.14
5. 村上、舘林、斎藤、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、神戸パシフィコ横浜、(ポスター発表) 2007.12.14
6. 田中、舘林、斎藤、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、(ポスター発表) 2008.12.10
7. 楊、舘林、山本、斎藤、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、(口頭、ポスター発表) 2008.12.10
8. 山本、舘林、斎藤、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、(ポスター発表) 2008.12.10
9. 堀江、山田、舘林、斎藤、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、(口頭、ポスター発表) 2008.12.10

〔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〕

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・助教

50272498

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし