

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07336

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答におけるSnf1 AMPKによるHog1 MAPKの制御機構

研究課題名(英文)Regulation of Hog1 MAPK by Snf1 AMPK in yeast ER stress response

研究代表者

水野 智亮 (Tomoaki, Mizuno)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80529032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体に不良タンパク質が蓄積すると、小胞体ストレス応答機構が活性化し、不良タンパク質が解消される。出芽酵母小胞体ストレス応答においてはAMPKオルソログSnf1がHog1経路・Ire1経路を負に制御している。今回我々は、Snf1制御サブユニットの発現が小胞体ストレスによって誘導されること、その誘導はIre1経路に依存していることを見出し、Snf1・Hog1経路・Ire1経路が複雑なシグナルネットワークを形成していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス応答は、小胞体に蓄積した不良タンパク質を検知し、解消する細胞恒常性維持機構である。今回我々は、出芽酵母をモデル系として小胞体ストレス応答を制御するシグナル伝達経路を解析し、複数の経路が係わるフィードバックループを見出してきた。小胞体ストレス応答の破綻は、ヒトでは神経変性疾患・糖尿病など様々な病態形成に関与している。したがって、我々の研究成果は、小胞体ストレス応答の分子メカニズムの理解、さらには小胞体ストレス応答の破綻に起因した様々な疾病に対する治療法・予防法の確立に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：The endoplasmic reticulum (ER) stress response pathway is activated by accumulation of the aberrant protein within the ER and functions in the maintenance of cellular homeostasis. The AMPK orthologue Snf1 negatively regulates the Hog1 and Ire1 pathways in the budding yeast endoplasmic reticulum stress response. Here, we found that expression of the Snf1 regulatory subunit is induced by ER stress and that this induction is dependent on the Ire1 pathway. Our results revealed that the Snf1, the Hog1 pathway and the Ire1 pathway form a complex signal network.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス応答 キナーゼ 遺伝子発現制御 フィードバック

1. 研究開始当初の背景

分泌タンパク質や膜タンパク質は生合成の初期段階に小胞体で糖鎖修飾・ホールディングを受ける。小胞体ではタンパク質の品質管理がおこなわれており、正常タンパク質は小胞体から搬出されるが、不良タンパク質は小胞体に留まる。遺伝的要因や環境変化によって不良タンパク質が小胞体内に蓄積すると(この状態を小胞体ストレスという)、小胞体ストレス応答経路が活性化し、不良タンパク質の解消が効率的におこなわれる。小胞体ストレス応答は、本来、小胞体さらには細胞の恒常性維持機構であるが、その過剰応答・持続的応答は、神経変性疾患・糖尿病など様々な病態形成に関与する。したがって、小胞体ストレス応答経路の制御機構を理解することは生物学的・医学的に極めて重要である。

高等真核生物では IRE1、ATF6、PERK という 3 種類の経路が、出芽酵母では Ire1 経路が小胞体ストレス応答において中心的役割を果たしている(Mori, J Biochem. 2009, Walter and Ron. Science. 2011)。一方、出芽酵母非必須遺伝子破壊株の約 3% が小胞体ストレス誘導剤に対して感受性を示すことから(Parsons et al. Nat Biotechnol. 2004)、多数の遺伝子が小胞体ストレス応答に関与していると考えられる。しかしながら、それらのほとんどについて小胞体ストレス応答における作用機序は明らかになっていない。

タンパク質リン酸化は、様々な環境変化に対する細胞応答に関与している。ストレス応答においても多数のキナーゼ・ホスファターゼが機能しており、出芽酵母小胞体ストレス応答では、Hog1 や Mpk1 などの MAP キナーゼ(MAPK)、カルシニューリン(Calcineurin)などが機能している(Bicknell et al. JBC. 2010, Torres-Quiroz et al. JBC. 2010, Babour et al. Cell. 2010)。さらに、我々は、独自の解析から、AMP 活性化キナーゼ(AMPK)の出芽酵母オルソログである Snf1 が、Ire1 経路および Hog1 経路を負に制御することによって、小胞体ストレス応答を負に制御していることを明らかになっている(Mizuno et al., PLoS Genet. 2015)。しかしながら、これら既知の因子でさえ、小胞体ストレス応答における活性制御機構や標的因子が十分に分かっておらず、出芽酵母小胞体ストレス応答におけるキナーゼ・ホスファターゼの制御機構と役割には未解明な部分が多く残されている。

2. 研究の目的

哺乳類 AMPK は触媒サブユニット および制御サブユニット から成る三量体であり、出芽酵母でも同様の構造が保存されている。出芽酵母には、サブユニットとサブユニットはそれぞれひとつずつしかないが(Snf1 と Snf4)、サブユニットは Sip1、Sip2、Gal83 の三種類があり、いずれかが各複合体で用いられている。Sip1、Sip2、Gal83 は重複した機能を有するとともに、いずれが用いられるかによって複合体の基質特異性や細胞内局在が変化することが知られている。そこで、小胞体ストレス応答における Snf1 の制御機構を明らかにするために、三種類のサブユニットの小胞体ストレス応答における機能と制御を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母株の小胞体ストレス感受性の検討

ツニカマイシンは糖鎖修飾を阻害することから、小胞体ストレス誘導剤としてよく用いられる。そこで、ツニカマイシンを含む寒天培地上に野生株および各種変異株の培養液を滴下し、その後の生育を観察することで、小胞体ストレス感受性を検討した。

(2) Hog1 活性化状態の検討

Hog1 はリン酸化されると活性化する。したがって、Hog1 リン酸化状態は Hog1 活性化状態を反映する。Hog1 は哺乳類 p38 MAPK の出芽酵母オルソログであり、Hog1 のリン酸化部位周辺のアミノ酸配列は哺乳類 p38 のそれと類似している。したがって、抗リン酸化型 p38 抗体を用いたウエスタンブロットによって、リン酸化型 Hog1 を検出することができる。そこで、小胞体ストレス誘導前後の野生株および各種変異株からタンパク質抽出液を調製し、抗リン酸化型 p38 抗体を用いたウエスタンブロットをおこない、Hog1 活性化状態を調べた。

(3) Ire1 経路活性化状態の検討

出芽酵母 Ire1 経路は、小胞体膜貫通型ストレスセンサーである Ire1 と転写因子 Hac1 から構成される。小胞体ストレスによって Ire1 が活性化すると、HAC1 mRNA から翻訳に抑制的に働くイントロンがスプライシングによって取り除かれ、Hac1 タンパク質が産生され遺伝子発現を誘導する。したがって、HAC1 mRNA のスプライシング状態は Ire1 経路の活性化を反映する。そこで、小胞体ストレス誘導前後の野生株および各種変異株から RNA を回収し、逆転写反応によって cDNA に変換した後、HAC1 イントロンを挟むようにデザインしたオリゴヌクレオチドを用いて PCR をおこない、HAC1 mRNA のスプライシング状態を調べた。

(4) サブユニットタンパク質量, mRNA 量、プロモーター活性の検討

Sip1、Sip2、Gal83 それぞれのタンパク質量は、内在性遺伝子 3'末端に GFP タグを導入し、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットによって解析した。mRNA 量はリアルタイム PCR 法によって解析した。プロモーター活性については、各遺伝子上流配列約 1kbp と GFP 遺伝子を連結したコンストラクトを作製し、ゲノムに挿入した後、GFP mRNA 量をリアルタイム PCR 法によって解析することで調べた。

4. 研究成果

(1) Gal83 が小胞体ストレス応答における Ire1 経路および Hog1 経路の抑制において主要なサブユニットとして機能する。

Snf1 は小胞体ストレス応答において Ire1 経路および Hog1 経路を負に制御しており、Snf1 欠失株では野生株と比べ *HAC1* mRNA スプライシングレベルと Hog1 リン酸化レベルが上昇する。それに対して、Snf1 の不活性化因子である Reg1 の欠失株では野生株と比べ *HAC1* mRNA スプライシングレベルと Hog1 リン酸化レベルが低下する。Snf1 Reg1 二重欠失株は Snf1 欠失株と同様の表現型を示す。変化の度合いに着目すると、野生株と Snf1 欠失株の差に比べ、野生株と Reg1 欠失株の差の方が大きい。このことから、各サブユニットの小胞体ストレス応答における役割を調べる解析系として、より感度の高い Reg1 欠失条件を採用した。

Sip1、Sip2、Gal83 すべて欠失すると、Snf1 欠失と同様に、Reg1 欠失による *HAC1* mRNA スプライシングレベル低下が完全に抑圧された。三種類のサブユニットを単独もしくは二種類欠失させると、Gal83 を欠失した場合に、Reg1 欠失による *HAC1* mRNA スプライシングレベル低下の部分的な抑圧がみられた。これらの結果から、Gal83 が Ire1 経路の制御において主要なサブユニットとして機能していると考えられた。Hog1 リン酸化レベルに対する影響を同様に調べたところ、Gal83 が Hac1 経路の制御において主要なサブユニットとして機能していることを示す実験結果が得られた。次に、Reg1 欠失株が小胞体ストレス感受性を示すことから、この表現型に対するサブユニット欠失の効果を調べた。その結果、Gal83 を欠失した場合には Reg1 欠失株の小胞体ストレス感受性が部分的に抑圧され、Sip2 を欠失した場合には Gal83 欠失より弱い抑圧がみられ、Sip1 を欠失した場合には抑圧がみられなかった。以上の結果から、小胞体ストレス応答においては、Gal83 が主要なサブユニットとして機能していると考えられた。

(2) Gal83 は小胞体ストレスによって発現誘導される。

次に、Gal83 が小胞体ストレス応答における主要なサブユニットとして機能するメカニズムを解析した。まず、Sip1、Sip2、Gal83 それぞれのタンパク質量を調べた。定常条件下において Gal83 のタンパク質量は Sip1、Sip2 に比べ多く、小胞体ストレスによって Gal83 のみタンパク質量が増加した。小胞体ストレスによる Gal83 タンパク質量の増加がみられたことから、次に *GAL83* mRNA 量を調べた。その結果、小胞体ストレスによる *GAL83* mRNA 量の増加がみられた。次に、小胞体ストレスによる *GAL83* mRNA 量の増加が転写活性化によるかについて、*GAL83* 遺伝子上流配列約 1kbp と GFP 遺伝子を連結したレポーターコンストラクトに由来する GFP mRNA の量を調べることで検討した。小胞体ストレスによって GFP mRNA 量の増加がみられたことから、小胞体ストレスによって *GAL83* 遺伝子の転写が活性化すると考えられた。

(3) Gal83 は小胞体ストレスによって発現誘導される。

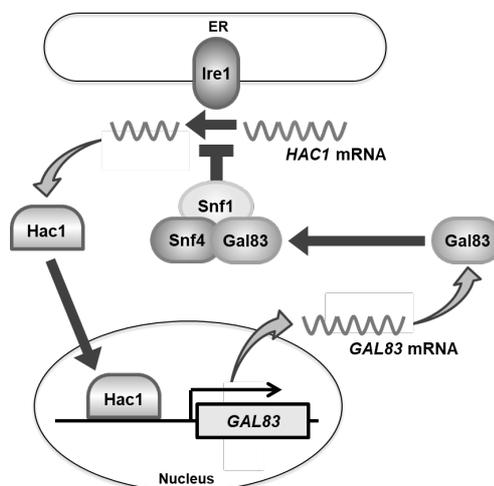
次に、Gal83 の発現を制御する因子を探索した。これまでに発芽酵母では小胞体ストレスによって複数のシグナル伝達経路が活性化することが明らかにされていた (Mori. J Biochem. 2009, Bicknell et al. JBC. 2010, Torres-Quiroz et al. JBC. 2010, Babour et al. Cell. 2010, Mizuno et. al., PLoS Genet. 2015)。そのなかでも Ire1 経路の活性化のタイムコースが *GAL83* mRNA の変動のタイムコースと似かよっていた。そこで、Ire1 経路が Gal83 の発現制御に関与するか検討した。その結果、Ire1 欠失株や Hac1 欠失株では、小胞体ストレスによる Gal83 タンパク質量および *GAL83* mRNA 量の増加が阻害されていた。これらの結果から、Ire1 経路が *GAL83* 遺伝子の転写を活性化すると考えられた。

(4) Gal83 プロモーター制御下で Sip2 を発現すると Gal83 と同程度の生理活性を有する。

サブユニットの発現量の解析から、サブユニットの相対的重要性はタンパク質の構造ではなく量によって決められている可能性が考えられたことから、この可能性を検証した。まず、定常条件下における *SIP2* プロモーターの活性を調べたところ、*GAL83* プロモーターの約 1/2 であり、Sip2 と Gal83 の相対的タンパク質量とほぼ等しかった。そこで、*GAL83* プロモーター制御下で Sip2 を発現するコンストラクトを作製し、その生理活性を *GAL83* プロモーター制御下で Gal83 を発現するコンストラクトおよび *SIP2* プロモーター制御下で Sip2 を発現するコンストラクトと比較した。その結果、*GAL83* プロモーター制御下で Sip2 を発現するコンストラクトは、*GAL83* プロモーター制御下で Gal83 を発現するコンストラクトと同程度の生理活性を示した。これらの結果から、Gal83 の小胞体ストレス応答における機能的優位性を決めているのは、タンパク質の構造ではなく、プロモーター活性であると考えられた。

(5) Snf1 と Ire 経路はフィードバックループを形成している。

我々は以前、Snf1 が小胞体ストレス応答において Ire1 経路を負に制御していることを明らかにしていた(Mizuno et. al., PLoS Genet. 2015)。本研究では、Ire1 経路が Gal83 の発現を誘導することを明らかにした。したがって、Ire1 経路は Gal83 の発現を誘導することで Snf1 の機能を強化し、自身を負に制御していると考えられる。また、Snf1 は Ire1 経路を負に制御することで Gal83 の発現を抑制し、自身の機能を下方修正していると考えられる。実際に、Snf1 活性昂進株(Reg1 欠失株)では小胞体ストレスによる Gal83 の発現誘導が抑えられていた。我々は Snf1 が小胞体ストレス応答において Hog1 経路を負に制御していることも明らかにしている(Mizuno et. al., PLoS Genet. 2015)。以上を踏まえると、出芽酵母の小胞体ストレス応答では、Snf1、Ire1 経路、Hog1 経路が複雑なシグナルネットワークを形成し、お互いの活性をチューニングしながら機能していると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Viet NTM, Duy DL, Saito K, Irie K, Suda Y, Mizuno T, Irie K.
Regulation of *LRG1* expression by RNA-binding protein Puf5 in the budding yeast cell wall integrity pathway.
Genes Cells. 23(12):988-997. 2018
doi: 10.1111/gtc.12646. Epub 2018 Oct 31.
査読有

Mizuno T, Nakamura M, Irie K.
Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*.
Sci Rep. 8(1):13078. 2018
doi: 10.1038/s41598-018-31413-6.
査読有

Kimura Y, Irie K, Mizuno T.
Expression control of the AMPK regulatory subunit and its functional significance in yeast ER stress response.
Sci Rep. 7:46713. 2017
doi: 10.1038/srep46713.
査読有

Li X, Ohmori T, Irie K, Kimura Y, Suda Y, Mizuno T, Irie K.
Different Regulations of *ROM2* and *LRG1* Expression by Ccr4, Pop2, and Dhh1 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Integrity Pathway.
mSphere. 1(5). 2016
<https://msphere.asm.org/content/1/5/e00250-16>
査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

高木亮輔・入江賢児・水野智亮
出芽酵母小胞体ストレス応答における転写因子 Sfp1 を介したリボソーム発現制御の生理学的意義
酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会
2018 年

高田奈苗・入江賢児・水野智亮
出芽酵母の小胞体ストレス応答に関するキナーゼ群の探索
酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会

2018 年

木村雄一・入江賢児・水野智亮
出芽酵母小胞体ストレスにおける AMPK 制御サブユニットの発現制御と機能
酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会
2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molcellbiol/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。