

平成22年4月16日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19107004

研究課題名（和文） 浸透圧応答 MAP キナーゼ細胞内情報伝達経路の研究

研究課題名（英文） Osmoregulatory MAP kinase signal transduction pathway

研究代表者

斎藤 春雄 (SAITO HARUO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60114485

研究代表者の専門分野：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：細胞内シグナル伝達、ストレス応答、MAP キナーゼ、浸透圧センサー、酵母

1. 研究計画の概要

細胞の環境ストレス適応機構の一般原理を解明するため、高度に発達した遺伝学的手法が適用できる出芽酵母をモデル系として活用し、1) 細胞が浸透圧変化を感知し細胞内シグナルを生成する機構、2) 細胞内での HOG シグナル伝達経路の制御機構の解明を目指す。

浸透圧のような物理的性質に細胞が応答する仕組みの解明には、応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、という手法が極めて有効である。加えて、細胞の応答を定量的に測定するための遺伝子発現リポーター、高い時空解像度で測定することの出来る FRET リポーターなども活用する。

2. 研究の進捗状況

(1) 浸透圧変化を感知し細胞内シグナルを生成する機構

① リチンに類似した多糖化タンパク質 Hkr1 および Msb2 は、SHO1 支経路に関わる第二種浸透圧センサーである。Hkr1/Msb2 の糖鎖領域が短いほど、弱い浸透圧ストレスで活性化することがわかった。Hkr/Msb2 の活性化に必須なドメインが、高浸透圧下では糖鎖領域の構造変化により露出し、Sho1 や Opy2 などと相互作用するものと考えられる。

② HOG 経路に関与する未知の情報伝達因子の探索を系統的に行い、Spa2、Sph1、Bem1、Bud6 などを見出した。細胞極性を制御することの知られているこれらの因子の関与は、細胞極性と高浸透圧応答との関連をも示唆している。

③ HOG 経路における膜アンカータンパク質 Opy2 の機能を明らかにした。Opy2 は、Ste11 MAPKKK と結合した Ste50 との結合によって Ste11 を膜局在化する。Cdc42-Ste20、Opy2-Ste50-Ste11 および Sho1-Pbs2 の各複合体がそれぞれ膜に局在することで、Ste20-Ste11 間あるいは Ste11-Pbs2 間の効率よい相互作用が起こると考えられる。

④ Opy2 の細胞質外領域には進化的によく保存された Cys-rich 領域 (CRD) がある。CRD を欠失した変異では、シグナル伝達能がほとんど失われていた。Opy2 の CRD と Sho1、Hkr1/Msb2 とが、浸透圧刺激によって相互作用し、Ste20-Ste11 および Ste11-Pbs2 の相互作用を引き起こすと予想される。

(2) HOG シグナル伝達経路の制御機構

① Hog1 MAPK や Kss1 MAPK が活性化すると、5カ所の Ser/Thr がリン酸化された Ste50 は Opy2 への結合能を失う。これらの Ser/Thr をすべて Ala に置換した変異株では、Ste50 と Opy2 との結合が構成的になり、HOG 経路や擬菌糸形成経路の過剰な活性化が観察された。つまり、Ste50 のリン酸化によってこれらの経路の活性が負にフィードバック制御されることが分かった。

② Hog1 を活性化する Pbs2 MAPKK、Hog1 を不活性化する Ptp2 チロシンホスファターゼが、それぞれ Hog1 の 2 箇所のドッキングサイトに特異的に結合することを見出した。このドッキング相互作用は、単に Pbs2 を Hog1 分子に結びつけるだけでなく、Hog1 になんらかの構造変化を引き起こして Pbs2 によるリン酸化を可能にもする。

③ Opy2 の細胞質領域には 3 つの Ste50 結合

部位 (A、B、および D サイト) があり、そのいずれかに Ste50 が結合すれば Ste11 を膜局在化することができる。この内 B は、グルコース存在下で、Yck1/Yck2 キナーゼによってリン酸化されて Ste50 と結合できるようになる。A および D は、グルコース非存在下でも Ste50 との結合能をもつ。Ste50 が B サイトに結合した場合は主に HOG 経路が活性化されるが、A サイトに結合した場合は Ste11-Ste7-Kss1 キナーゼカスケードを核とする擬菌糸形成経路が活性化することが分かった。HOG 経路および擬菌糸形成経路のシグナル伝達が、本来の刺激の他に、環境グルコース濃度による制御をも受けることを示している。

④ 高浸透圧に応答する Hog1 MAPK と貧栄養などに応答する Kss1 MAPK との間に相互の阻害反応があること、いずれかが活性化すると他方の活性化を抑制して適切な MAPK のみが活性化するような仕組みになっていることがわかった。

⑤ 第一種浸透圧センサー Sln1 は、浸透圧に応答すると、多段階リン酸転移反応によって Ssk1 の Asp554 のリン酸化状態を調節し、Ssk2/Ssk22 MAPKKK を活性化する。しかし、Ssk1-P は不安定で自律的に加水分解されて活性化型の Ssk1-OH になるので、なぜ浸透圧ストレス不在下で Ssk2/Ssk22 の活性化が起こらないのかは謎であった。新たに多数の Ssk1 変異体 (構成的活性化型変異、部分的な機能を失った変異、Ypd1 あるいは Ssk2 との結合能を失った変異など) を単離し、遺伝的・生化学的に解析した結果、リン酸化状態の Ssk1-P は、単に Ssk2/Ssk22 への結合能 (=活性化能) がないだけではなく、Ssk1-OH と共にヘテロ 2 量体 (Ssk1-OH/Ssk1-P) を形成して、この 2 量体中の Ssk1-OH による Ssk2/Ssk22 活性化を積極的に阻害することがわかった。すなわち、Ssk1-P には Ssk2/Ssk22 の活性を負に制御する機能があり、HOG 経路の活性化には十分な量の Ssk1-OH の蓄積が必要なのである。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。多くの研究項目については、ほぼ当初の目標を達成し、その派生的研究も順調に進んでいる。一方で、実験系の確立に向けた探索を続けている研究項目もあり、更なる努力が必要である。全体として平均すれば、最終的には予定どおりか、それを上回る成果をあげられるものと見込まれる。

4. 今後の研究の推進方策

昨年度までの成果により、膜アンカータンパク質 Opy2 が HOG 経路活性化において中心的な制御機能を持つことを明らかにした。

今後は、当初の計画に加えて、Opy2 に関する以下の項目の研究をも推進する。

(1) Opy2 の膜貫通 (TM) 領域および細胞質外にある Cystein-rich (CR) 領域の、HOG 経路活性化における機能を解析する。また、HOG 経路に関与する他の膜タンパク質 (Hkr1、Msb2、Sho1) と Opy2 との動的相互作用を解析する。

(2) Opy2 細胞質領域の機能はリン酸化・脱リン酸化により制御されている。Opy2 を脱リン酸化するホスファターゼを、変異株スクリーニングなどにより同定し、さらにそのホスファターゼ活性の制御機構、クロストーク制御への関与などを明らかにする。

5. 代表的な研究成果 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Yang, H.-Y., Tatebayashi, K., Yamamoto, K., and Saito, H. Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. **EMBO J.**, 28: 1380-1391 (2009) 査読有
2. Tomida, T., Takekawa, M., O'Grady, P., and Saito, H. Stimulus-specific distinctions in spatial and temporal dynamics of stress-activated protein kinase kinases revealed by a fluorescence response energy transfer biosensor. **Mol. Cell. Biol.**, 29: 6117-6127 (2009) 査読有
3. Arimoto, K., Fukuda, H., Imajo-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. **Nature Cell Biol.**, 10: 1324-1332 (2008) 査読有
4. Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. **EMBO J.**, 26: 3521-3533 (2007) 査読有

[学会発表] (計 37 件)

国際学会 4 件; 国内学会 33 件

1. Gordon Research Conference on "Sensory Transduction in Microorganisms."
Ventura, California, USA. 2010 年 1 月 27 日 招待講演
演題 "Osmosensory signal transduction in the budding yeast"

[その他]

ホームページ

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