

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：12601

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

齋藤 春雄 (SAITO HARUO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60114485

研究成果の概要（和文）： 出芽酵母は高浸透圧ストレスにさらされると Hog1 MAP キナーゼ細胞内情報伝達経路を活性化し、生存に不可欠な様々な浸透圧適応反応を引き起こす。本研究では、以前見出した第一種浸透圧センサーSln1 にくわえ、新たに同定した第二種浸透圧センサーHkr1 およびMsb2 が、いかにしてHog1 経路を活性化するのかを明らかにした。さらに、膜アンカータンパク質Opy2、膜タンパク質Sho1、アダプタータンパク質Ste50 などの動的相互作用によるHog1 経路の制御機構をも明らかにした。

研究成果の概要（英文）： When exposed to environmental hyperosmolarity, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* activates the Hog1 MAP kinase signal pathway, which governs an array of adaptive responses. In this project, we investigated how the activity of the Hog1 MAPK pathway is regulated by the two newly discovered osmosensors Hkr1 and Msb2. We also investigated the roles of the membrane anchor protein Opy2, membrane protein Sho1, and the adaptor protein Ste50 in dynamic regulation of the Hog1 MAPK pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2008年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2009年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2010年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2011年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
総計	81,800,000	24,540,000	106,340,000

研究分野：分子細胞生物学

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. 研究開始当初の背景

浸透圧変化に対する細胞の適切な応答は、原核細胞から高等動物に到る全ての生物の生存に不可欠なものであるが、その分子機構が比較的詳しく解明されているのは原核細胞のみであった。そこで、真核細胞である酵母をモデル系として、高浸透圧適応を制御する High Osmolarity Glycerol (HOG)シグナル伝達経路の解明に取りかかった。本計画開始

時までには、HOG 経路には2種の浸透圧センサー機構（Sln1 支経路と Sho1 支経路）があること、各センサーからのシグナルが最終的に共通の Pbs2 MAPKK 及び Hog1 MAPK の活性化を引き起こすことなどを見出していた。Sln1 支経路の浸透圧センサーSln1 は、膨圧変化に応答してそのヒスチジンキナーゼ活性を制御し、さらに Sln1-Ypd1-Ssk1 の多段階リン酸リレー反応を介して Ssk2 MAPKKK を活性化

し、それが Pbs2 MAPKK を活性化する。一方、Sho1 は 4 回膜貫通型タンパク質で、Cdc42 (G タンパク質)、Ste20 (PAK 様キナーゼ) を介して Ste11 (MAPKKK) を活性化し、それが Pbs2 を活性化する。Sho1 が浸透圧センシングに関与するのみならず細胞質部位にある SH3 ドメインによって Ste11 と Pbs2 との結合を促進するという足場タンパク質としての機能をも備えていること、ホスファターゼ (Ptc1、Ptp2、Ptp3) が負のフィードバック制御に関与していること等をも解明した。このような背景をふまえ、HOG シグナル経路の総合的解明の一環として、不明点の多い Sho1 支経路によるシグナル伝達機構に焦点を定めた研究を提案した。

2. 研究の目的

浸透圧応答には、浸透圧変化を感知する浸透圧センサーと、細胞内での情報伝達機構とが必要である。特定イオン種に依存せず浸透圧変化そのものを検出するメカニズムは、原核細胞においてすら不明な点が多い。また、浸透圧に応答する Hog1 MAP キナーゼ (MAPK) シグナル伝達経路は、接合フェロモンに応答する Fus3 MAPK 経路や貧栄養環境に応答する Kss1 MAPK 経路と、シグナル伝達因子を多数共有している。各経路の独自性維持機構の解明は、細胞内情報伝達一般にも関わる重要課題であった。

このような観点から、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、の解明を目的とした。

3. 研究の方法

細胞が浸透圧に応答する仕組みを解明するために、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・生化学的解析を組み合わせてもちいた。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や、膜タンパク質の多量体構造を解明するための化学クロスリンク法を活用した。

4. 研究成果

(1) 酵母による浸透圧検出機構を解析し、粘膜炎タンパク質リチンに類似した糖タンパク質 Hkr1 および Msb2 が SHO1 支経路に関わる第二種浸透圧センサーであることをみいだした。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。(発表論文 10)

(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。(発表準備中)

(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。HOG 経路の活性化の条件の一つは、Ste11 MAPKKK とアダプタータンパク質 Ste50 との複合体が構成的膜タンパク質 Opy2 と結合し、膜に局在化することであるとわかった。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。B は、培地中のグルコース濃度が高いと Yck1/Yck2 キナーゼによってリン酸化され Ste50 と結合する。低グルコース環境では B 領域はリン酸化されず、したがって Ste50 との結合も見られない。B サイトに Ste50 が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 Ste50 が結合した場合は 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される。これは、HOG 経路および擬菌糸形成経路のシグナル伝達が環境グルコース濃度による制御をも受けることを示すものである。(発表論文 3)

(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 Hkr1/Msb2 の細胞外 HMH 領域とが浸透圧刺激によって相互作用し、間接的に Ste20 と Ste11 との結合しないし Ste11 と Pbs2 との結合を引き起こすと予想される。(発表準備中)

(5) Hog1 MAPK や Kss1 MAPK が活性化すると Ste50 がリン酸化されて Opy2 への結合能を失う。その結果、これらの MAPK 経路が負にフィードバック制御されることを見出した。(発表論文 3)

(6) 変異体の解析などから、Sho1 支経路における細胞内シグナル生成には Sho1、Msb2/Hkr1、および Opy2 がそれぞれの膜貫通 (TM) 領域を介して相互作用することが重要であることが示唆された。さらに、これらの相互作用を解析する過程で、Sho1 の多様な機能には細胞膜中での Sho1 の特異的な多量体構造が必要であることが明らかになった。

まず、共沈実験により、Sho1 がホモ多量体であることがわかった。Sho1 の 4 本の膜貫通領域 (TM1~TM4) の各アミノ酸残基について

Ala あるいは Leu への置換変異を作製したところ、多量体化能を失った変異体はすべて Hog1 MAPK 活性化能をも失っていた。つまり、多量体構造は機能に必須であるとわかった。

つぎに、TM1~TM4 の各アミノ酸残基をひとつずつ Cys に置換した変異体を作製し、化学クロスリンカーをもちいたクロスリンク法で解析したところ、多量体中で隣接する Sho1 分子間でクロスリンク可能な残基が、すべての TM 領域で見出された。さらに、二個の Cys 置換変異を持つ変異体を用いた二重クロスリンク実験より、Sho1 の多量体は TM2/TM3 を境界面とした 3 量体を基本ユニットとするもので、その 3 量体がさらに TM1/TM4 の境界面で 2 量体化する、というこれまでに例のない膜タンパク質の二次元構造モデルを得た。したがって、理論的には、6 個の 3 量体で構成されるリングが 2 次元に展開する蜂の巣状の多環構造になるはずである。

システイン間の直接のジスルフィド結合を用いたクロスリンク解析でも同様の結論に達したのみならず、多量体中で隣接する Sho1 分子間の配向もある程度推定することができるようになった。

また、同様のクロスリンク解析により、Opy2 が多量体化した Sho1 とのみ結合すること、Sho1 と Opy2 との特異的結合様式なども明らかになりつつある。

これらの結果は、浸透圧応答における Sho1 タンパク質の機能を解明する上できわめて大きな影響を持つと同時に、Sho1 と類似した 4 回膜貫通型タンパク質の細胞膜中での構造を解析する手がかりを与えるものでもある。ほ乳類では、CD9、CD63 などを含む tetraspanin ファミリーだけでも 30 を超える 4 回膜貫通型タンパク質が知られており、その他にも、タイトジャンクションの Claudin、CD20 などの MS4A ファミリー、水晶体の LIM2、NK 細胞の NKG7、ミエリンの主要タンパク質 PLP など数多くある。機能面では、ウイルス感染、免疫応答、シグナル伝達、細胞融合、細胞接着、受精などへの関与が知られている。興味あることに、これらはいずれもホモあるいはヘテロの会合で多量体を形成する。したがって、これらの 4 回膜貫通型タンパク質の機能と制御をさらに詳しく解明するには細胞膜中での多量体構造の知識が必須であろう。しかし、通常のタンパク質構造解析法(結晶構造解析や NMR による解析)はこれらのタンパク質には適用が困難であり、いまだに構造が明らかになった例はない。したがって、われわれが Sho1 で行いつつある解析方法をこれらの 4 回膜貫通型タンパク質に適用すれば、きわめて広範な応用が可能となるであろう。(発表準備中)

(7) 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。(発表論文 9)

(8) 高浸透圧に応答する Hog1 MAPK と貧栄養などに応答する Kss1 MAPK との間には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。(発表論文 6)

(9) Ssk1 の二量体化による Ssk2/Ssk22 MAPKKK 活性化制御機構を明らかにした。酵母の第 1 種浸透圧センサー Sln1 はヒスチジンキナーゼ活性とリン酸転移活性とを持ち、Ypd1 を経た多段階リン酸転移反応により Ssk1 のリン酸化状態を調節する。脱リン酸化状態の Ssk1-OH は、HOG MAP キナーゼカスケードの MAPKKK である Ssk2/Ssk22 に結合することでそれらを活性化する。一方、リン酸化状態の Ssk1-P には、Ssk2/Ssk22 への結合能がないが、単に Ssk2/Ssk22 活性化能がないだけではなく、Ssk1-OH とヘテロ 2 量体 (Ssk1-OH/Ssk1-P) を形成することで、Ssk1-OH による Ssk2/Ssk22 活性化をも阻害する。このように、Ssk1 には Ssk2/Ssk22 の活性を負に制御する機能もあり、それによって浸透圧ストレス不在下での HOG 経路の偶発的活性化を抑制する。(発表論文 8)

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件) (すべて査読あり)

1. Saito H, and Posas F. Response to hyperosmotic stress. **Genetics**, in press (Yeast に関する包括的総集録「YeastBook, the Encyclopedia of the Reference Eukaryotic Cell」の 1 章として刊行)
2. Kubota Y, O'Grady P, Saito H, and Takekawa M. Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. **Nature Cell Biol.**, 13:282-291 (2011)
3. Yamamoto K, Tatebayashi K, Tanaka K, and Saito H. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2

- membrane anchor.
Molecular Cell, 40:87-98 (2010)
4. Saito H. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways.
Curr Opin Microbiol. 13:677-683 (2010)
 5. Tomida T, Takekawa M, O' Grady P, and Saito H. Stimulus-specific distinctions in spatial and temporal dynamics of stress-activated protein kinase kinase kinases revealed by a fluorescence resonance energy transfer biosensor.
Mol. Cell. Biol., 29:6117-6127 (2009)
 6. Yang HY, 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)
 7. 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)
 8. Horie T, Tatebayashi K, Yamada R, and Saito H. Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway.
Mol. Cell. Biol., 28:5172-5183 (2008)
 9. Murakami Y, Tatebayashi K, and 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)
 10. Tatebayashi K, Tanaka K, Yang HY, 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)
 11. Miyake Z, Takekawa M., Ge Q, and Saito H. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated *trans* autophosphorylation of the MTK1 kinase domain.
Mol. Cell. Biol., 27:2765-2776 (2007)
- [学会発表] (計 52 件)
- 発表者: 齋藤春雄
発表表題: Dynamic regulation of hyperosmotic stress response in the budding yeast.
学会等: Society of General Microbiology Conference 2011
発表年月日: 2011年4月13日
発表場所: Harrogate, UK
- 発表者: 齋藤春雄
発表表題: Signal transduction pathways.
学会等: Analysis and Engineering of Biomolecular Systems.
発表年月日: 2010年9月14日
発表場所: Spetses, Greece
- 発表者: 齋藤春雄
発表表題: Osmosensory signal transduction in budding yeast.
学会等: Gordon Research Conference on "Sensory Transduction in Microorganisms."
発表年月日: 2010年1月27日
発表場所: Ventura, CA, USA
- 発表者: 齋藤春雄
発表表題: Regulation of the osmoadaptive HOG MAPK pathway in the budding yeast.
学会等: Marie Curie Research & Training Network Meeting on "MAPK Signalling during Fungal Pathogenesis."
発表年月日: 2009年10月28日
発表場所: Berlin, Germany
- 発表者: 齋藤春雄
発表表題: Regulation of stress MAPK pathways in mammalian and yeast cells.
学会等: OIST 国際ワークショップ

発表年月日：2008年3月10日
発表場所：沖縄県国頭郡恩納

〔その他〕
ホームページ
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal/>

6. 研究組織

(1) 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