

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2010

課題番号：21570131

研究課題名(和文) 酵母の高浸透圧応答性 MAPK 経路におけるリン酸化、脱リン酸化を介した活性制御機構

研究課題名(英文) Study on the mechanism to regulate the yeast osmo-regulatory MAPK pathway activation via phosphorylation and dephosphorylation

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

研究成果の概要(和文)：絶えず変化する生活環境に迅速に適応するため、生物はストレス応答 MAPK 情報伝達経路(SAPK 経路)を備えている。酵母の SAPK 経路である、高浸透圧応答性の HOG 経路、貧栄養条件に応答する擬菌糸経路の活性化には、Ste11 MAPKKK の膜移行が必須である。この膜移行には Ste11 結合蛋白質の Ste50 が膜蛋白質の Opy2 と結合する必要があるが、Opy2 が2つの主要な結合部位(CR-A, B)と弱い結合部位(CR-D)をもつことがわかった。CR-A は Ste50 と恒常的に結合し、HOG 経路及び擬菌糸経路の両方にシグナルを伝達できる。一方、CR-B はグルコースに富んだ栄養環境において Yck1/Yck2 によりリン酸化をうけた場合のみ、Ste50 と結合し、HOG 経路に優先的にシグナルを伝達する。また、HOG 経路や接合経路が活性化されると Ste50 は各経路の MAP キナーゼによりリン酸化をうけ、結合した Opy2 から解離することを見いだした。これにより、HOG 経路の過剰な活性化を抑制し、接合経路の基底状態の活性を低く維持することが可能になる。以上のように、Ste50 と Opy2 の結合の動的制御が MAPK 経路のシグナルネットワークを微調整するのに重要な働きをすることが本研究で明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Membrane localization of the Ste11 MAPKKK is essential for activation of both the filamentous growth/invasive growth (FG/IG) MAP kinase (MAPK) pathway and the SHO1 branch of the osmoregulatory HOG MAPK pathway, and is mediated by binding of the Ste50 scaffold protein to the Opy2 membrane anchor. We found that Opy2 has two major (CR-A and CR-B), and a minor (CR-D), binding sites for Ste50. CR-A binds Ste50 constitutively, and can transmit signals to both the HOG and the FG/IG pathways. CR-B, in contrast, binds Ste50 only when Opy2 is phosphorylated by Yck1/Yck2 under glucose-rich conditions, and transmits the signal preferentially to the HOG pathway. Ste50 phosphorylation by the MAPKs activated by the HOG or the mating pathway dissociates Ste50 from Opy2, thereby preventing excessive activation of the HOG pathway, or reduces the basal activity of the mating MAPK pathway. Thus, dynamic regulation of Ste50-Opy2 interaction fine-tunes the MAPK signaling network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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

生物は絶えず変化する生活環境に迅速に適応するため、ストレス応答 MAP キナーゼ情報伝達経路を備えている。この経路は全ての真核生物で保存されており、高浸透圧環境によって活性化される出芽酵母の HOG 経路はその原型といえる。HOG 経路では細胞外の高浸透圧環境を細胞膜上の高浸透センサーが感知し、細胞内に活性化シグナルを伝達する。このシグナルは2つの上流支経路 (SH01、SLN1 支経路) を通じ下流に伝達され、それぞれの MAPKK キナーゼ (Ste11, Ssk2/22)、共通の Pbs2 MAPK キナーゼ、Hog1 MAP キナーゼが順次リン酸化されることで活性化される。活性化した Hog1 は転写因子をリン酸化し、高浸透圧応答遺伝子群の転写を誘導するとともに、リン酸化修飾による細胞周期や翻訳の制御などを介して細胞の高浸透圧適応を

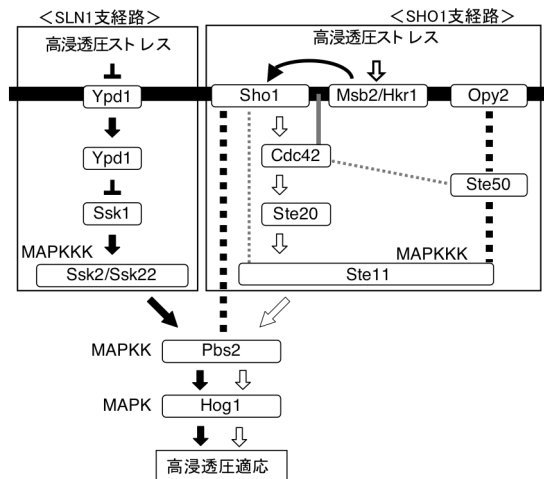


図1 酵母の高浸透圧応答性HOG MAPK経路の概略図

可能にする (図1; 矢印はシグナルの流れ、点線は結合を表す)。こうした環境ストレスへの応答には、経路を素早く適切に活性化させる正の制御機構に加え、不適切、あるいは過剰な経路の活性化を抑えるための負の制御機構も極めて重要である。環境ストレス非存在時には、活性化レベルを極力抑え余計な適応反応を防ぐ必要があるし、過度な適応反応をおこしかねない過剰な活性化も同様である。生物が環境ストレスに適切に適応する

ためには、経路活性化の負の制御機構が幾重にも精巧に働いていると考えられていた。

2. 研究の目的

これまで HOG 経路の負の活性制御については、リン酸化された活性型 Hog1 が Ptp2 などのプロテイン・フォスファターゼにより脱リン酸化されることで不活性化する仕組みが知られていた。これは経路の下流で活性化が抑制される仕組みである (図2①)。SH01 支経路の活性化には、活性化に関わる一連の因子が細胞膜にリクルートされることが必要であり、特に Ste11 MAPKKK の膜移行は経路活性化に必須である。この膜移行は Ste11 結合蛋白質 Ste50 が膜蛋白質の Opy2 と結合することで可能になる。我々の予備研究から、Ste50 と Opy2 との結合は高浸透圧刺激により低下し、Ste50 は刺激依存的かつ Hog1 依存的にリン酸化をうけることを示唆するデータが得られた。そこで、図2②に示すように、HOG 経路の活性化に応じて、上流のシグナル因子である Ste50 がリン酸化され、Opy2 との結合が低下し活性化シグナルが遮断されるという、経路活性化後の不活性化機構としての新しい負のフィードバック機構の存在を予測し、これを検証した。

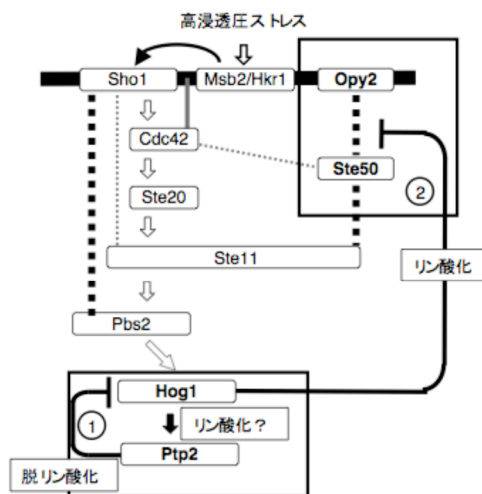


図2 HOG経路における負のフィードバック制御機構

3. 研究の方法

研究全般にわたって、分子生物学的手法、酵母の遺伝子破壊株や各種遺伝子変異体を用いた分子遺伝学的手法、異種蛋白質間の結合を解析する共沈実験などの生化学的手法を駆使して研究を行った。

(1) 変異遺伝子及び変異株の作成

酵母の遺伝子変異体はオリゴ DNA を用いた PCR 法により作成した。変異は全てシーケンシングにより確認した。また、遺伝子破壊株なども PCR をもとにした遺伝子破壊コンストラクトを酵母細胞に導入し、薬剤選択したのち、遺伝子が破壊されていることを PCR で確認した。

(2) HOG 経路活性化の測定

HOG MAPK 経路活性化の定量的測定は、我々が開発した HOG 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。具体的には調整した各細胞抽出液による基質の ONPG に対する β -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。擬菌糸経路の活性化については FUS1-lacZ レポーターを使用して同様のアッセイを行った。

MAPK の活性化は、そのリン酸化型蛋白質を特異的に検出するリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解析によって解析した。

(3) タンパク質間結合の解析

タンパク質間の結合性については、免疫共沈法などにより解析した。

4. 研究成果

(1) Ste50 リン酸化を介した HOG 経路の負のフィードバック機構の発見

予備研究でみつけた、高浸透圧依存的かつ Hog1 依存的な Ste50 のリン酸化及び高浸透圧刺激後の Ste50-Opy2 結合の低下の関係について詳細な解析を行った。

① 高浸透圧刺激による MAP キナーゼ依存的 Ste50 リン酸化

Ste50 は高浸透圧刺激により、HOG 経路の Hog1 MAP キナーゼによりリン酸化されることに加え、Hog1 が働かない細胞では、接合 MAPK 経路の MAP キナーゼである Fus3、Kss1 によ

ってもリン酸化されることを明らかにした。Ste50 内に存在する MAP キナーゼのリン酸化コンセンサス配列 7 箇所のうち、5 箇所がリン酸化をうけることがわかった。

② 高浸透圧刺激による Ste50-Opy2 結合性の低下と Ste50 リン酸化の関与

高浸透圧刺激依存的に Ste50 と Opy2 の結合は低下することがわかった。この結合低下が、上記の MAP キナーゼによる Ste50 リン酸化に起因するものかを検討した。In vitro の結合実験で、Hog1 によりリン酸化を受けた Ste50 はリン酸化を受けない Ste50 に比べて、Opy2 との結合性が低下していることを見いだした。また、リン酸化をうけない変異型 Ste50 蛋白質は野生型 Ste50 では見られた高浸透圧刺激時の Opy2 との結合性の低下が起こらなかった。したがって、高浸透圧刺激に応じて活性化された HOG 経路の Hog1 により、Ste50 がリン酸化をうけることで、Opy2 との結合性が低下することが明らかになった。

③ Ste50 リン酸化を介した負のフィードバック機構

上記のリン酸化がシグナル伝達に与える影響を調べたところ、リン酸化をうけない変異型 Ste50 蛋白質を発現する細胞では高浸透圧刺激による HOG 経路活性化が遷延することがわかった。さらに活性化された Hog1 を脱リン酸化してその活性を抑える Ptp2 ホスファターゼが発現しない細胞では非リン酸化型 Ste50 を発現させると HOG 経路の活性化はさらに遷延した。したがって、HOG 経路の活性化に応じて、上流のシグナル因子である Ste50 がリン酸化され、Opy2 との結合が低下し活性化シグナルが遮断されるという、図 2 ②で示す全く新しい負のフィードバック機構の存在が明らかになった。またこの機構は、図 2 ①のホスファターゼによる活性型 Hog1 の抑制機構と協調的に働き、細胞が高浸透圧に適応後、HOG 経路の活性化状態をもとの低いレベルにリセットするのに機能していることが明らかになった。

また接合 MAPK 経路を活性化させると Fus3/Kss1 により Ste50 はリン酸化され、この細胞に高浸透圧刺激を与えても HOG 経路の

活性化は低いレベルに抑えられることがわかった。したがって、Ste50 のリン酸化に伴って生じる Opy2 との結合性の低下は、MAPK 経路内に加え、異なる MAPK 経路間での活性制御にも働いていることがわかった。

(2) 栄養環境に応じた MAPK 経路ネットワークの制御と Opy2 リン酸化

① Opy2 の Ste50 結合部位の同定

Ste50 と Opy2 のダイナミックな結合様式の変化を理解するために、Opy2 の Ste50 結合部位を決定した。Opy2 に系統的な欠失変異を導入し Ste50 との共沈実験を行った結果、Opy2 には2つの主要な結合部位(CR-A, B)と弱い結合部位(CR-D)が存在することがわかった。Opy2 と Ste50 の結合はHOG経路の活性化だけでなく、貧栄養環境によって活性化される擬菌糸 MAPK 経路にも必須であることを我々は明らかにしたが、Opy2 の CR-A での Ste50 との結合は恒常的であり、この結合を介して HOG 経路及び擬菌糸経路の両方にシグナルを伝達できることがわかった。

② 栄養環境に依存した Opy2 CR-B のリン酸化と Ste50 結合性の上昇

Opy2 の CR-B はグルコースに富んだ栄養環境においてカゼインキナーゼの Yck1/Yck2 によってリン酸化をうけることを見いだした。CR-B ではリン酸化をうけた場合のみ Ste50 と結合することが可能になり、HOG 経路に優先的にシグナルを伝達することがわかった。したがって、Ste50-Opy2 の結合ステップは上述の経路活性化の負のフィードバックの作用

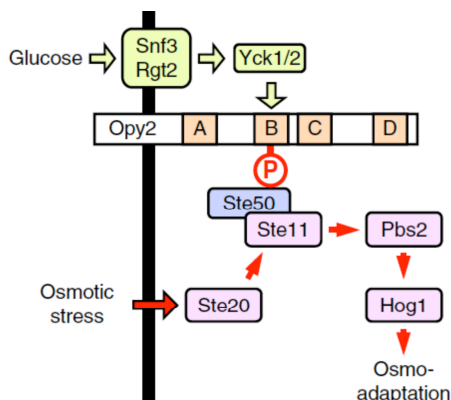


図3 Opy2-Ste50を介したグルコースシグナルによるHOG経路活性化の制御モデル

点になっているばかりでなく、栄養環境や浸透圧条件などの複数の環境刺激を統合して、適切なストレス応答を可能にする、MAPK 経路間ネットワークの制御点になっていることもわかった (図3)。

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2件)

1. #Yamamoto K, #* Tatebayashi K, Tanaka K, *Saito H. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol. Cell.* **40**:87-98. (2010)
(*;責任著者、#;同等貢献)
2. #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)
(#;同等貢献)

[学会発表] (計4件)

1. 山本勝良、舘林和夫、田中慶一郎、奈古屋美穂、斎藤春雄 足場タンパク質 Ste50 と膜蛋白質 Opy2 のダイナミックな結合による酵母 MAP キナーゼネットワークの制御 第33回 日本分子生物学会年会、第83回 日本生化学会大会、合同大会;2010年12月10日/神戸、神戸ポートアイランド
2. 田中慶一郎、舘林和夫、斎藤春雄 Polarisome mediates osmosignaling in the budding yeast. 第33回 日本分子生物学会年会、第83回 日本生化学会大会、合同大会;2010年12月10日/神戸、神戸ポートアイランド
3. 舘林和夫、山本勝良、斎藤春雄 Regulation of the yeast MAPK pathways by nutrition-dependent switching of the binding modes between the Opy2 membrane anchor and the Ste11-Ste50 complex through phosphorylation. 第32回 日本分子生物学会年会;2009年12月10日/横浜、パシフィコ横浜
4. 山本勝良、舘林和夫、斎藤春雄 Negative

feedback regulation in the SHO1 branch of the yeast HOG osmoregulatory MAPK pathway by induced dissociation of the Ste50 adaptor protein from the Opy2 membrane anchor. 第32回日本分子生物学会年会；2009年12月10日／横浜、パシフィコ横浜

〔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〕

研究室ホームページ

[<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal/index.html>]

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・准教授

研究者番号：50272498