

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440042

研究課題名(和文) 酵母MAPK経路特異性制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of MAPK pathway specificity in yeast

研究代表者

山本 勝良 (Yamamoto, Katsuyoshi)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：70508366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ムチン様膜蛋白質Msb2、膜アンカー蛋白質Opy2、アダプター蛋白質Ste50は、高浸透圧ストレス応答HOG MAPK経路と栄養飢餓応答FG MAPK経路の活性化に関与する。Opy2の細胞内Bサイトが栄養豊富条件下でリン酸化されると、Ste50が結合してHOG経路のみを活性化させる。Bサイトのリン酸化を負に制御する分子をコードする遺伝子に変異が入った変異株を単離した。Msb2とOpy2との細胞外結合が浸透圧ストレスによって変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The mucin-like membrane protein Msb2, the membrane anchor protein Opy2, and the adaptor protein Ste50 play important roles in activation of the HOG MAPK pathway and the FG MAPK pathway. When a cytoplasmic B site of Opy2 is phosphorylated by casein kinases Yck1/Yck2 under nutrient-rich conditions, it binds Ste50 and only leads to activation of the HOG pathway. Mutants were isolated that have mutations in genes encoding molecules, that negatively regulate phosphorylation of the B site. Extracellular binding between Msb2 and Opy2 was changed by osmotic stress.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞外システイン・リッチ領域の構造 浸透圧センサー

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内には、細胞外からの刺激に依存して活性化される複数の MAP キナーゼ (MAPK) シグナル伝達経路が存在する。刺激に対して適切な MAPK 経路のみが活性化することで、正しい応答反応が起こる。従って、異なる刺激によって活性化される、共通の分子を有する MAPK 経路間の誤作動が起こらない仕組みの維持は細胞にとってきわめて重要である。

真核生物である出芽酵母には、高浸透圧ストレス刺激によって活性化される HOG 経路、フェロモン刺激によって活性化される mating 経路、栄養飢餓によって活性化される FG 経路などの相互に類似した MAPK 経路が存在する。HOG 経路においては MAPK キナーゼ (MAPKK) であると同時に足場としても機能する Pbs2 が、mating 経路では足場蛋白質 Ste5 が、それぞれの経路の特異性に関与する。

HOG 経路、mating 経路、FG 経路のいずれの MAPK 経路においても、刺激に依存して経路を活性化させるためには、細胞膜上に MAPKK キナーゼ (MAPKKK) である Ste11 を局在化させる必要がある。共通の分子を必要とするにも関わらず、MAPK 経路間の誤作動は起こらない。mating 経路では、Ste5 が Ste11 を膜に局在化させる。HOG 経路と FG 経路においては、膜アンカー蛋白質 Opy2 に Ste11 と構成的に結合しているアダプター蛋白質 Ste50 が結合することによって Ste11 を膜に局在化させる。共通の Ste11 膜局在化システムを利用しているにもかかわらず、HOG 経路と FG 経路の誤作動が起こらない仕組みは不明である。

研究開始の時点において、申請者は以下の結果を見出していた。

(1) Opy2 の細胞内に存在する 3 つの Ste50 結合サイト (A, B, D) について、A サイトに Ste50 が構成的に結合し、HOG 経路と FG 経路の両方を活性化させたが、B サイトについては、グルコース (栄養豊富条件) に依存して活性化されるカゼインキナーゼ Yck1 と Yck2 によるリン酸化が入ってはじめて Ste50 が結合し、HOG 経路のみを活性化させた。

(2) Opy2 の細胞内に Yck1/Yck2 キナーゼによる B サイトのリン酸化を負に制御する C サイトが存在した。

(3) Opy2 の細胞外に存在するシステインリッチ (CR) 領域は、HOG 経路と FG 経路の活性化に関与するムチン様膜蛋白質 Msb2 との結合に必要であった。

## 2. 研究の目的

申請者が見出した出芽酵母における HOG 経路と FG 経路の活性化に関する実験結果を基に発展的な研究を行い、2 つの MAPK 経路間の特異性を制御する機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 申請者が見出した出芽酵母における HOG 経路と FG 経路の特異性を決定する、グルコースに依存して活性化されるカゼインキナーゼ Yck1/Yck2 による Opy2 の細胞内 B サイトのリン酸化を負に制御する分子をスクリーニングするための株を作成した。

(2) カゼインキナーゼ Yck1/Yck2 による Opy2 の細胞内に存在する Ste50 結合 B サイトのリン酸化はホスファターゼによって負に制御されている可能性が考えられる。既知のホスファターゼ制御サブユニットをコードする遺伝子を破壊した株を作成し、その株における B サイトのリン酸化レベルを調べた。

(3) HOG 経路と FG 経路の活性化に関与するムチン様膜蛋白質 Msb2 と膜アンカー蛋白質 Opy2 との細胞外での結合を共沈実験と *in vivo* システインスロスリンク実験によって調べた。

## 4. 研究成果

(1) 膜蛋白質 Opy2 の細胞内にアダプター蛋白質 Ste50 が結合する 3 つのサイト (A, B, D) がある。グルコース (栄養豊富条件) に依存して活性化されるカゼインキナーゼ Yck1/Yck2 によって B サイトがリン酸化されると、Ste50 が結合して HOG 経路のみを活性化させる。申請者が見出したこの結果を基に Yck1/Yck2 による B サイトのリン酸化を負に制御する分子をコードする遺伝子に変異が入った株の単離を、以下の からの順に従って進めた。

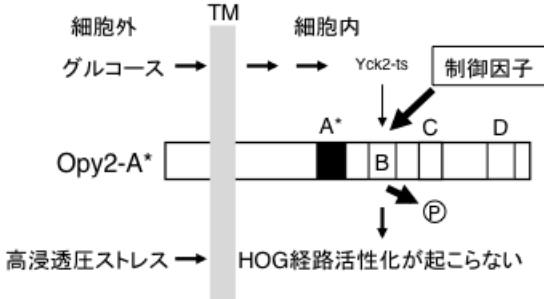
独立した 2 つの上流支経路を介して HOG 経路の活性化が起こる。本研究の対象ではない上流支経路からの HOG 経路の活性化を抑制するために *SSK2/SSK22* MAPKK が欠損した株を用いた。Yck1 と Yck2 を同時に欠損させると、酵母細胞は生育できない。そこで *YCK1* 遺伝子を破壊した上に、通常の温度下では問題ないが、高温条件下にすると Yck2 のキナーゼ活性が失われる *yck1Δ yck2-ts ssk2/22Δ* 温度感受性変異株を作成した。

A サイトに点変異を導入した Opy2-A\* は Ste50 と結合できないこと、Opy2 の Ste50 結合 D サイトのみでは HOG 経路の活性化がほとんど起こらない。これらの結果を基に B サイトを介してのみ HOG 経路が活性化される *yck1Δ yck2-ts opy2-A\* ssk2/22Δ* 株を作成した。

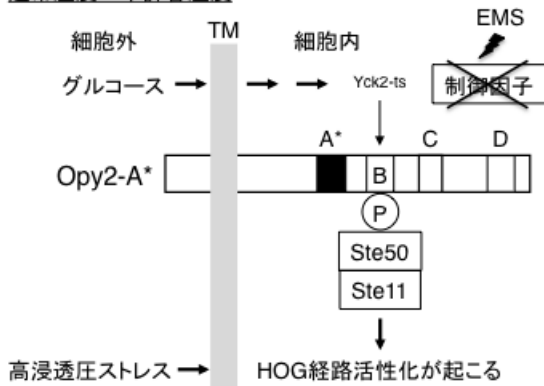
*yck1Δ yck2-ts opy2-A\* ssk2/22Δ* 株に HOG 経路の活性化をモニターする *8xCRE-CYC<sup>m</sup>-lacZ* レポーター・プラスミドを導入したのち、変異原であるメタンスルホン酸メチル (EMS)

処理を行った。栄養豊富な YPD プレートに変異原処理した細胞を広げ、通常温度下で生育させた。生育してきたコロニーをメンブレンに付着させた後、YPD+0.8 M NaCl プレートの上に乗せて半許容温度で一晩置いた。その後 *lacZ* フィルター・アッセイを行った。

通常温度→半許容温度



通常温度→半許容温度



上記で述べた変異株の単離方法が適切であるかどうかを知るため、ポジティブコントロールとして、Opy2 の B サイトのリン酸化を負に制御する C サイトを欠失させた *opy2-A\* ΔC* を用いて検証した。その結果、半許容温度条件下では、*yck1Δ yck2-ts opy2-A\* ΔC ssk2/22Δ* 株の Yck2 のキナーゼ活性は大きく低下しているにもかかわらず、青色を示し、HOG 経路が活性化していることを確認した。

*lacZ* フィルター・アッセイの結果、HOG 経路が活性化していることを示す青色の変異株を単離することに成功した。今後、単離した変異株の原因遺伝子を特定し、同定した分子についての詳細な解析を進めることで、出芽酵母における HOG 経路と FG 経路の特異性を制御している機構が前進するものと考えられる。

(2) タイプ I プロテインホスファターゼ (PP1) 触媒サブユニット Glc7 の制御サブユニットをコードする *BUD14* 遺伝子、プロテインホスファターゼ 2A (PP2A) 触媒サブユニット Pph21/22 の制御サブユニットをコードする *RTS1* 遺伝子や *CDC55* 遺伝子を破壊した株を作成した。これら破壊株で Ste50 を免疫沈降させた時、共沈してきた Opy2 バンドのシフトアップの増加は見られなかった (Opy2 の B サ

イトがリン酸化されると、Opy2 バンドの位置がシフトアップする)。他のホスファターゼ関連分子またはホスファターゼ以外の分子が Yck1/Yck2 による Opy2 の B サイトのリン酸化を負に制御している可能性が考えられる。

(3) Opy2 の細胞外に進化的に保存された 8 個のシステイン (C30, C33, C39, C42, C48, C55, C58, C63) を含むシステイン・リッチ (CR) 領域がある。1 つのシステインをアラニンに置換した Opy2 変異体 (計 8 変異体) のいずれも HOG 経路の活性化に大きな影響を与えなかった。しかしながら、2 つのシステインをアラニンに置換した変異体 (計 2 8 変異体) では、HOG 経路の活性化が起こるものと全く起こらないものと分かれた。ジスルフィド (SS) 結合を形成している 2 つのシステインをアラニンに置換しても HOG 経路の活性化は起こると考えられる。解析の結果、C30 と C55、C33 と C58、C39 と C48、C42 と C63 という組が SS 結合を形成していると推定された。Opy2 の細胞外 CR 領域は 4 組の SS 結合を介した特定の構造を形成していると推定される (図 1)。

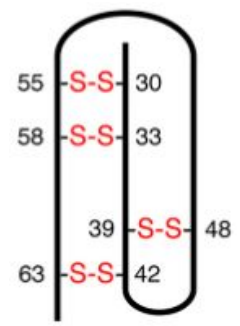


図 1 Opy2 システイン・リッチ領域の推定構造

HOG 経路と FG 経路の活性化に関わるムチン様膜蛋白質 Msb2 の細胞外に HMH と呼ばれる HOG 経路の活性化に必須な領域がある。界面活性剤ジギトニンを用いた共沈実験の結果、Msb2 の細胞外 HMH 領域と Opy2 の細胞外 CR 領域とが浸透圧条件に関わらずに結合することがわかった。浸透圧により HMH-CR 結合に構造変化が起こるかどうか調べるため、HMH 領域にシステインを挿入した Msb2 変異体と Opy2 C/A 変異体を用いた *in vivo* システインクロスリンク実験を行った。その結果、クロスリンカー M-8-02-M を用いた場合、Msb2 の S1023C と Opy2 の C39A (=C48) は通常条件下では強くクロスリンクしたが、高浸透圧条件下 (1 M NaCl または 1 M 以上のソルビトール) ではわずかにしかクロスリンクしなかった (図 2)。

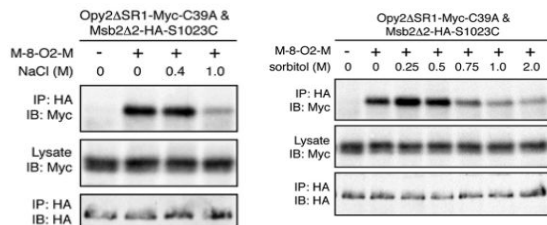


図2 Msb2-S1023C と Opy2-C39A (=C48) クロスリンクの浸透圧による変化

HMH-CR 結合は浸透圧により構造変化を起こすと考えられ、浸透圧センサーとして機能している可能性が考えられる。これらの結果は、酵母細胞が浸透圧を感知するメカニズムの解明を大きく前進させるものである。

#### (参考文献)

Yamamoto K, Tatebayashi K, Tanaka K, Saito H (2010) 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.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 4 件)

Nishimura A, Yamamoto K, Oyama M, Kozuka-Hata H, Saito H, Tatebayashi K (2016) A scaffold protein Ahk1 that associates with Hkr1, Sho1, Ste11 and Pbs2 inhibits cross-talk signaling from the Hkr1 osmosensor to the Kss1 MAPK. *Molecular and Cellular Biology* 36: 1109-1123. 査読有  
doi:10.1128/MCB.01017-15.

Yamamoto K, Tatebayashi K, Saito H (2016) Binding of the extracellular eight-cysteine motif of Opy2 to the putative osmosensor Msb2 is essential for activation of the yeast High-Osmolarity Glycerol pathway. *Molecular and Cellular Biology* 36: 475-487. 査読有  
doi:10.1128/MCB.00853-15.

\*Tatebayashi K, \*Yamamoto K, Nagoya M, Takayama T, Nishimura A, Sakurai M, Saito H (2015) Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nature Communications* 6: 6975. 査読有  
doi:10.1038/ncomms7975.

\*equal contribution

Tanaka K, Tatebayashi K, Nishimura A, Yamamoto K, Yang HY, Saito H (2014)

Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Science Signaling* 7:1-10. 査読有  
doi:10.1126/scisignal.2004780.

##### [学会発表](計 4 件)

山本勝良、西村明子、舘林和夫、斎藤春雄 浸透圧応答を制御する出芽酵母 HOG MAP キナーゼ経路における膜蛋白質 Opy2 の細胞外 cycteine-rich 領域の役割 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

山本勝良、西村明子、舘林和夫、斎藤春雄 高浸透圧ストレス応答 HOG MAPK 経路活性化に必須な膜蛋白質 Opy2 の細胞外システイン・リッチ領域の解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市中央区)

西村明子、山本勝良、舘林和夫、斎藤春雄 出芽酵母の高浸透圧センサー Hkr1 の機能解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市中央区)

舘林和夫、山本勝良、奈古屋美穂、西村晶子、斎藤春雄 四回膜貫通型 Sho1 高浸透圧センサーが形成する二次元六角格子状多量体構造とそのシグナル伝達への関与 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市中央区)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 勝良 (YAMAMOTO Katsuyoshi)  
東京大学・医科学研究所・特任助教  
研究者番号: 70508366