

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440078

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答を制御するキナーゼモジュールの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the kinase module to control the endoplasmic reticulum stress response

研究代表者

水野 智亮 (Mizuno, Tomoaki)

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体内腔への不良タンパク質の蓄積は小胞体ストレスを引き起こす。出芽酵母AMPKオルソログであるSnf1は様々な環境ストレスに対する応答において重要な役割を担っている。しかしながら、Snf1の小胞体ストレス応答における機能はほとんど明らかになっていない。本研究で、我々はSnf1が小胞体ストレス応答においてHog1 MAPキナーゼの負の制御因子として機能することを見出した。Snf1欠損は、活性化型Hog1の増加を引き起こし、小胞体ストレス耐性を誘導する。Snf1は、Hog1の上流でHog1経路活性化に機能するSsk1の発現を転写レベルで抑制している。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of unfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) causes ER stress. Snf1, the *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of AMP-activated protein kinase (AMPK), plays a crucial role in the response to various environmental stresses. However, the role of Snf1 in ER stress response remains poorly understood. In this study, we characterize Snf1 as a negative regulator of Hog1 MAPK in ER stress response. The snf1 mutants showed the ER stress resistant phenotype. Activated Hog1 levels were increased by snf1 mutation. Ssk1, a specific activator of MAPKKK functioning upstream of Hog1, was induced by ER stress and its induction was inhibited in a manner dependent on Snf1 activity. Furthermore, we show that the SSK1 promoter is important for Snf1-modulated regulation of Ssk1 expression. Our data suggest that Snf1 downregulates ER stress response signal mediated by Hog1 through negatively regulating expression of its specific activator Ssk1 at the transcriptional level.

研究分野：ストレス応答シグナル伝達経路

キーワード：小胞体ストレス MAPキナーゼ AMP活性化キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質や分泌タンパク質は、生合成の初期段階に小胞体においてホールディングや糖鎖付加を受ける。タンパク質の品質は小胞体内で厳密に管理されており、未成熟タンパク質や異常タンパク質は品質管理機構によって修復または除去される。さらに、ストレスや遺伝的要因によって、未成熟・異常タンパク質が小胞体内に蓄積した場合(小胞体ストレス)には、小胞体ストレス応答機構が活性化し、未成熟タンパク質の成熟および異常タンパク質の修復と除去が効率的におこなわれる。これまでに、IRE1-XBP1/HAC1、ATF6、PERK という3種類の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ことが示されてきた(Mori. J Biochem. 2009, Walter and Ron. Science. 2011)。一方、出芽酵母を用いた網羅的解析では、約3%の遺伝子の破壊株が小胞体ストレス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かった。

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・ホスファターゼが重要な役割を果たしており、なかでもストレス応答性 MAP キナーゼ(MAPK)の機能は不可欠である。出芽酵母では、Hog1 や Mpk1 といった MAPK が小胞体ストレスによって活性化し、小胞体ストレスに対する耐性獲得に機能している(Bicknell et al. JBC. 2010, Torres-Quiroz et al. JBC. 2010, Babour et al. Cell. 2010)。しかしながら、これらの MAPK でさえ、小胞体ストレス応答における活性化機構やターゲットが不明であった。したがって、出芽酵母小胞体ストレス応答においてタンパク質リン酸化を介した応答機構の制御メカニズムと生理学的意義はほとんど明らかになっていなかった。

そこで、我々は、この問題を解決するため、キナーゼ・ホスファターゼをコードする遺伝子について網羅的な破壊株の作製と小胞体ストレス感受性の検討を進めてきた。その過程で、エネルギー恒常性を司る AMP 活性化キナーゼ(AMPK)の出芽酵母ホモログである Snf1 の欠損によって、小胞体ストレス耐性が引き起こされることを見出してきた。

## 2. 研究の目的

Snf1 の欠損によって、小胞体ストレス耐性が引き起こされることから、Snf1 は小胞体ストレス応答を負に制御していると考えられた。しかしながら、その作用機序は不明であった。そこで、Snf1 がどのような分子基盤で小胞体ストレス応答を制御しているかを明

らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 小胞体ストレスに対する感受性の検討  
野生株と各種変異株について、糖鎖修飾を阻害して小胞体ストレスを誘導することが知られている薬剤ツニカマイシンを含む培地上に培養液を滴下した後、培養をおこない生育を観察した。

(2) Hog1 活性化レベルの検討  
Hog1 はリン酸化され、活性化する。つまり Hog1 リン酸化レベルは Hog1 活性化レベルを反映している。Hog1 は哺乳類 p38 MAPK の出芽酵母オルソログであり、Hog1 と哺乳類 p38 のリン酸化部位周辺のアミノ酸配列は保存されていることから、リン酸化型 Hog1 は抗リン酸化型 p38 抗体によって認識される。そこで、まず、野生株と各種変異株について、小胞体ストレスを誘導後、経時的に回収し、タンパク質抽出液を調製した。その後、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、Hog1 活性化レベルを解析した。

(3) Ssk1 タンパク質、SSK1 mRNA レベル、SSK1 プロモーター活性の検討  
Ssk1 タンパク質レベルは、内在性 SSK1 遺伝子の 3' 末端に Myc タグを導入し、ウエスタンブロットによって解析した。SSK1 mRNA レベルは、mRNA を回収し、逆転写反応によって cDNA に変換した後、リアルタイム PCR によって解析した。SSK1 プロモーター活性については、SSK1 遺伝子の 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 タンパク質の発現レベルをウエスタンブロットによって調べ、検討した。

## 4. 研究成果

(1) Snf1 複合体は小胞体ストレス応答を負に制御している。  
Snf1 が小胞体ストレス応答を制御しているか検討する目的で、小胞体ストレスを誘導する薬剤ツニカマイシンを含む培地上での snf1 欠失変異株の生育を観察した。その結果、野生株と比較して、snf1 欠失変異株はツニカマイシンに対して抵抗性を示した(図1)。snf1 欠失変異によるツニカマイシン抵抗性は、野生型 SNF1 遺伝子を導入することによって、救済された。それに対して、キナーゼ活性不活性型 SNF1 遺伝子を導入した場合、snf1 欠失変異によるツニカマイシン抵抗性は、救済されなかった。以上のことから、Snf1 はキナーゼ活性依存的に小胞体ストレス応答を負に制御していると考えられた。次に、Snf1 の制御サブユニットが小胞体ストレス応答に関与しているか検討した。その結果、サブユニットである Snf4 の欠損、および

サブユニットである Sip1, Sip2, Gal83 の欠損によって、Snf1 欠損と同様に、小胞体ストレス耐性が引き起こされた。以上の結果から、Snf1 複合体が小胞体ストレス応答を負に制御していると考えられた。

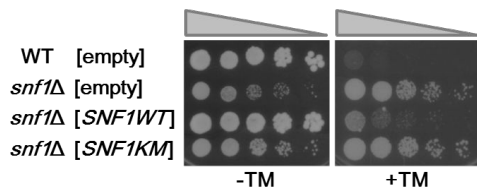


図1 Snf1 はキナーゼ活性依存的に小胞体ストレス応答を負に制御している。野生株と *snf1* 欠失変異株の培養液について、希釈系列を作製し、ツニカマイシン(TM)を含む培地・含まない培地に添加し、増殖を観察した。括弧内はそれぞれの株が保持しているプラスミドを表しており、emp は空のベクター、*SNF1WT* は野生型 *SNF1* 遺伝子、*SNF1KM* はキナーゼ活性不活性型 *SNF1* 遺伝子である。

(2) 小胞体ストレス応答における Snf1 の機能において、Snf1 のリン酸化は重要である。

Snf1 は210番目のトレオニン(T210)がリン酸化されることによって活性化される。Snf1 T210 は、Sak1, Elm1, Tos3 によってリン酸化され、Glc7-Reg1 複合体によって脱リン酸化されることが知られている。そこで、これらの因子が小胞体ストレス応答を制御しているか検討したところ、Sak1, Elm1, Tos3 の欠損によって、Snf1 欠損と同様に、小胞体ストレス耐性が引き起こされた。これに対して、Reg1 欠損は、Snf1 欠損と異なり、小胞体ストレス感受性を引き起こした(図2)。また、Reg1 と Snf1 をともに欠損すると、Snf1 欠損と同様の小胞体ストレス耐性がみられた。このことから、小胞体ストレス応答における Snf1 の機能には T210 のリン酸化が重要であると考えられた。

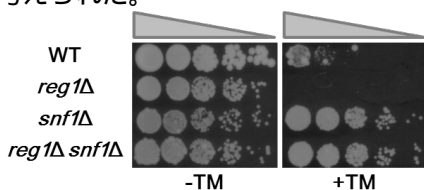


図2 Snf1 のリン酸化は Snf1 の小胞体ストレス応答における機能に重要である。野生株と各変異株の培養液について、希釈系列を作製し、ツニカマイシン(TM)を含む培地・含まない培地に添加し、増殖を観察した。

(3) 小胞体ストレス応答において Snf1 は Hog1 活性を負に制御している。

次に、Snf1 による小胞体ストレス応答の負の制御がどのようなメカニズムで引き起こされているかについて解析をおこなった。哺乳類ストレス応答性 MAPK である p38 の出芽酵母オルソログ Hog1 が小胞体ストレスに対する耐性獲得に機能していることが既に報

告されていた(Bicknell et al. JBC. 2010, Torres-Quiroz et al. JBC. 2010)。Hog1 は小胞体ストレスによってリン酸化され、活性化することが明らかになっている。そこで、小胞体ストレス応答における Hog1 活性を野生株と *snf1* 欠失変異株の間で比較した。その結果、*snf1* 欠失変異株では、野生株と比較して Hog1 活性の上昇がみられた。また、Snf1 活性が上昇している *reg1* 欠失変異株では、野生株と比較して Hog1 活性の低下がみられた(図3)。これらの結果から、小胞体ストレス応答において Snf1 は Hog1 活性を負に制御していると考えられた。また、Snf1 欠損によって生じる小胞体ストレス耐性は、Hog1 の機能に大きく依存していた。以上の結果から、Snf1 は Hog1 活性を抑制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と考えられた。

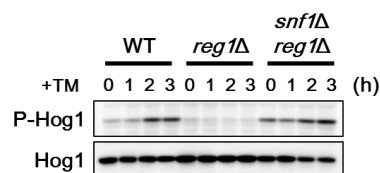


図3 小胞体ストレス応答において Snf1 は Hog1 活性を負に制御している。野生株と各変異株について、ツニカマイシン(TM)添加後、経時的(0, 1, 2, 3時間)にタンパク質抽出液を調製し、抗リン酸化型 p38 抗体および抗 Hog1 抗体を用いたウエスタンブロットをおこなった。

(4) 小胞体ストレス応答において Snf1 は *SSK1* の発現を負に制御している。

次に、Snf1 がどのようなメカニズムで Hog1 活性を負に制御しているかについて解析をおこなった。Hog1 経路は、Hog1 MAPK, Pbs2 MAPK キナーゼ(MAPKK)、Ssk2/Ssk22 MAPKK キナーゼ(MAPKKK)から構成され、Ssk2/Ssk22 は Ssk1 が結合することによって活性化することが知られている(Saito and Posas. Genetics, 2012)。そこで、Hog1 の上流で機能する Pbs2, Ssk2, Ssk22, Ssk1 のタンパク質発現レベルを調べた。その結果、Ssk1 タンパク質が小胞体ストレスによって増加することを見出した。また、小胞体ストレスによる Ssk1 の増加は *reg1* 欠失変異株ではみられなかった(図4)。さらに、この *reg1* 欠失変異表現型は *snf1* 欠失変異によって抑圧された(図4)。以上の結果から、小胞体ストレスは Ssk1 発現レベルを増加させることによって Hog1 の活性化を引き起こすこと、Snf1 は Ssk1 発現レベルを抑制することによって Hog1 活性化を負に制御していると考えられた。

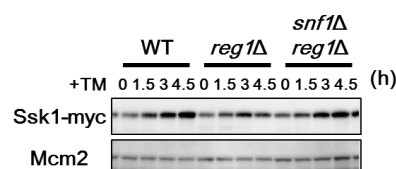


図4 小胞体ストレス応答において Snf1 は Ssk1 タンパク質レベルを負に制御している。野生株と各変異株について、ツニカマイシン(TM)添加後、経時的(0, 1.5, 3, 4.5 時間)にタンパク質抽出液を調製し、抗 Myc 抗体および抗 Mcm2 抗体を用いたウエスタンブロットをおこなった。

次に、小胞体ストレス・Snf1 がどのようなメカニズムで Ssk1 タンパク質レベルを制御しているかについて解析をおこなった。その結果、小胞体ストレス応答によって *SSK1* mRNA が小胞体ストレスによって増加することを見出した。また、小胞体ストレスによる *SSK1* mRNA の増加は *reg1* 欠失変異株ではみられなかった。さらに、この *reg1* 欠失変異表現型は *snf1* 欠失変異によって抑圧された。以上の結果から、小胞体ストレス・Snf1 は *SSK1* mRNA レベルを制御することによって Ssk1 タンパク質レベルを制御していると考えられた。

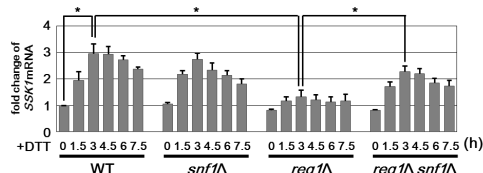


図5 小胞体ストレス応答において Snf1 は *SSK1* mRNA レベルを負に制御している。野生株と各変異株について、ジチオトレイトール(DTT)添加後、経時的(0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 時間)に RNA を回収し、リアルタイム PCR をおこなった。グラフは野生株 0 時間における *SSK1* mRNA 量を 1 としたときの相対値を表している。

次に小胞体ストレス・Snf1 がどのようなメカニズムで *SSK1* mRNA レベルを制御しているかについて解析をおこなった。*SSK1* プロモーター制御下で GFP を発現するレポーターを作製し、小胞体ストレス応答における GFP の発現パターンを調べた。その結果、小胞体ストレス応答によって GFP が小胞体ストレスによって増加することを見出した。また、小胞体ストレスによる GFP の増加は *reg1* 欠失変異株ではみられなかった。さらに、この *reg1* 欠失変異表現型は *snf1* 欠失変異によって抑圧された。以上の結果から、小胞体ストレス・Snf1 は *SSK1* プロモーター活性つまり転写レベルを制御することによって *SSK1* 発現レベルを制御していると考えられた。

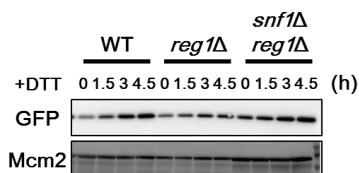


図6 小胞体ストレス応答において Snf1 は *SSK1* プロモーター活性を負に制御している。野生株と各変異株について、ジチオトレイトール(DTT)添加後、経時的(0, 1.5, 3, 4.5 時間)にタンパク質抽出液を調製し、抗 GFP 抗体および抗 Mcm2 抗体を用いたウエスタンブロットをおこなった。

ール(DTT)添加後、経時的(0, 1.5, 3, 4.5 時間)にタンパク質抽出液を調製し、抗 GFP 抗体および抗 Mcm2 抗体を用いたウエスタンブロットをおこなった。

(5)小胞体ストレス応答において、Snf1 は、*SSK1* 発現を抑制することによって、Hog1 活性を負に制御している。

以上の結果から、以下のようなメカニズムが考えられる。小胞体ストレスは *SSK1* 遺伝子の転写レベルを上昇させることによって、Ssk1 タンパク質レベルの上昇を引き起こし、結果として Hog1 活性の上昇を引き起こす。Snf1 は *SSK1* 遺伝子の転写レベルを抑制することによって、Hog1 活性化を負に制御している。しかしながら、小胞体ストレスシグナルや Snf1 からのシグナルを統合し、*SSK1* 転写レベルに反映させる分子基盤は未だ明らかにできていない。今後、*SSK1* 転写レベルを制御する転写因子を同定することは、小胞体ストレス応答におけるシグナル伝達機構の調節メカニズムの理解に貢献できると考える。

## 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 1 件)

\*Mizuno T, Masuda Y, Irie K.

(\*=corresponding author)

The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, Negatively Regulates the Hog1 MAPK Pathway in ER Stress Response.

PLoS Genetics. 11(9): e1005491, 2015

doi:10.1371/journal.pgen.1005491

査読有

[学会発表](計 3 件)

増田勇人、水野智亮、入江賢児

出芽酵母 AMPK オルソログ Snf1 による小胞体ストレス応答制御機構

第 37 回日本分子生物学会年会

2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜(横浜市)

増田勇人、水野智亮、入江賢児

出芽酵母 AMPK オルソログ Snf1 による小胞体ストレス応答における機能解析

酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会

2014 年 9 月 1 日 東京大学(東京都)

Yuto Masuda, Kesuke Majima, Tomoaki

Mizuno, Kenji Irie

Genetic interaction between KIN1/KIN2 and UBA4 in the budding yeast

12th NTU Kyoto Tsukuba joint mini-symposium

2013 年 12 月 21 日 台湾

〔その他〕

ホームページ等

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

6．研究組織

(1)研究代表者

水野 智亮 (MIZUNO TOMOAKI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80529032