

発表番号 21

## 酵母の耐塩性向上のための基礎研究

前田 達哉

東京大学 分子細胞生物学研究所

酵母は醤油・味噌・漬物といった高塩性発酵食品の生産に古くから利用されてきた。高塩濃度の発酵条件下において安定して優れた香味と高い生産性を維持するためには、生産に用いられる酵母は耐塩性に優れていることが要求される。酵母は、高塩濃度条件下では、これと対抗するためのさまざまな生理的応答反応を引き起こすことで耐塩性を獲得している。本研究では、塩ストレスで活性化されて種々の応答反応を制御する情報伝達経路として、イオンストレスに応答する Cpl1-Rim101 経路と、浸透圧ストレスに応答する HOG 経路とに焦点を当て、その制御機構の新しい局面を明らかにした。

Cpl1-Rim101 経路は、イオンストレスに応答して転写因子 Rim101 を限定分解し、活性化する経路である。この分解を触媒すると考えられているカルパイン様プロテアーゼ Cpl1 に加え、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 と呼ばれるタンパク質が経路の構成因子であることが知られているが、これらが以下のような順序で機能し、矢印で示したようなシグナルの流れがあることを遺伝学的手法を用いて明らかにした。

イオンストレス → Rim8・Rim9・Rim21 → Cpl1・Rim20 → Rim101 限定分解  
→ 耐塩性誘導

また、この経路により転写誘導される遺伝子として、ナトリウムイオンを排出するトランスポーターである Ena1 をコードする遺伝子を同定した。このことは、イオンストレスにより活性化されたこの経路が、応答反応として有害イオンの排出系の活性化を引き起こしていることを示している。

HOG 経路は、2つの浸透圧センサー機構を備えたストレス応答性 MAP キナーゼ経路であり、浸透圧ストレスによって活性化され、種々の応答反応を引き起こす働きをしている。浸透圧センサー機構の一つである Sln1 経路の構成因子である Ssk1 は、浸透圧ストレスに応答して脱リン酸化され、そのことにより活性化型となって下流の MAP キナーゼ経路を活性化することが知られている。本研究ではリン酸化を介した Ssk1 の制御に加え、脱リン酸化型の Ssk1 に選択的な分解機構が存在し、経路を負に制御していることを明らかにした。また、この分解がユビキチン・プロテアソーム系によるものであること、分解にはユビキチン結合酵素 Ubc7 とユビキチンリガーゼ Hrd1 が関与していることを示した。さらに、この分解機構は、浸透圧応答が完了した後に経路を速やかに不活性化するために働いていることを明らかにした。

酵母の耐塩性に関わるこれら2つの塩ストレス情報伝達経路の解析から、塩ストレス応答反応が精妙に統合されている様子が明らかになった。本研究で得られた知見をもとに、酵母の耐塩性獲得の分子基盤の詳細を明らかにし、耐塩性に優れた酵母株の創出のための基礎を整備することを目指したい。



## 22

助成番号 0253

## 酵母の耐塩性向上のための基礎研究

前田 達哉 (東京大学 分子細胞生物学研究所)

## ①研究目的

酵母は醤油・味噌・漬物といった高塩性発酵食品の生産に古くから利用されてきた。高塩濃度の発酵条件下において安定して優れた香味と高い生産性を維持するためには、生産に用いられる酵母は耐塩性に優れていることが要求される。酵母は、高塩濃度条件下では、これと対抗するためのさまざまな生理的応答反応を引き起こすことで耐塩性を獲得している。例えば、細胞内に流入したイオンを排出するトランスポーターを活性化したり、適合溶質を蓄積して細胞膜内外の浸透圧差を解消したりすることが知られているが、塩耐性獲得のために必要な応答反応を包括的に理解するには程遠いのが現状である。また、酵母が塩ストレス刺激を検知し、応答反応を引き起こすための情報伝達経路に関しても、不明な点が多く残されている。塩ストレスは、細胞内外のイオン環境の極端な不均衡により引き起こされるイオンストレスと、過剰な浸透圧により引き起こされる浸透圧ストレスの側面に分けて考えることができる。我々は、塩ストレスで活性化されて種々の応答反応を制御する情報伝達経路として、イオンストレスに応答する Cpl1-Rim101 経路と、浸透圧ストレスに応答する HOG 経路とに焦点を当てて研究を進めてきた。

Cpl1-Rim101 経路は、イオンストレスに応答して転写因子 Rim101 を限定分解し、活性化する経路である<sup>1)</sup>。この分解を触媒すると考えられているカルパイン様プロテアーゼ Cpl1 に加え、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 と呼ばれるタンパク質が経路の構成因子であることが知られているが、これらがどのような分子機構でイオンストレスを検知し、さらに Rim101 の限定分解を制御しているのかは分かっていない。これらの構成因子が欠損した変異株においては、いずれも共通して Rim101 の限定分解が起こらず、それに伴って耐塩性が低下することが観察されている。本研究では、これらの欠損変異株とは逆に、イオンストレスにさらされていない条件下でも、経路が恒常的に活性化され Rim101 の限定分解が昂進したような変異株の単離を試みる。得られた変異と上記諸因子の欠損変異との二重変異株において、Rim101 の限定分解が起こるか否かを検

討することにより、諸因子が経路内で機能する順序を遺伝学的に決定する。さらに、Cpl1に関する生化学的解析を組み合わせ、ストレス検知と限定分解制御の分子機構を明らかにすることを目指す。

HOG 経路は、2つの浸透圧センサー機構を備えたストレス応答性 MAP キナーゼ経路である<sup>2)</sup>。これまでに浸透圧センサーも含めた経路の主要な構成因子を同定し、その作用機構の大枠を明らかにしてきた。HOG 経路は、浸透圧ストレスによって活性化され種々の応答反応を引き起こすが、細胞が浸透圧ストレスにさらされていない状態や、ストレス応答の結果として高浸透圧状態に適応した状態では不活性に保たれていることが知られている。本研究では、経路不活性化の新しい機構を明らかにすることを目指す。浸透圧センサー機構の一つである Sln1 経路は、センサー分子 Sln1 からリン酸基転移中間体である Ypd1 を経てレスポンスレギュレーター Ssk1 へという2段階のリン酸基転移反応を介して Ssk1 のリン酸化状態を調節し、これにより Ssk1 の活性を制御している。このリン酸化による制御に加えて、プロテアソーム依存的タンパク質分解系が Ssk1 の分解を介してこの経路を負に制御している機構について、その生理的意義を含めて明らかにする。

塩ストレス応答反応に関わるこれら2つの情報伝達経路の解明を通じて、酵母の耐塩性獲得の分子基盤の詳細を明らかにし、耐塩性に優れた酵母株の創出のための基礎を整備することを目指す。

## ②研究方法

### 1. Cpl1-Rim101 経路が恒常的に活性化される変異株の単離

Rim9 欠損変異株から、耐塩性を回復したような変異株を、塩化リチウムに対する耐性を指標に単離した。得られた耐塩性を回復した変異株において、Rim101 の限定分解が同時に回復しているかどうかを、Rim101 に対するウエスタン法を用いて検討した。Rim101 の限定分解が回復したものは、経路が恒常的に活性化される変異株の候補と考えられる。Rim101 限定分解の回復の原因となっている変異を、Rim9 欠損変異から分離して単独変異とした場合に、イオンストレスにさらされていない条件下でも Rim101 の限定分解が昂進しているかどうかをウエスタン法を用いて検討した。

### 2. Cpl1-Rim101 経路の構成因子が経路内で機能する順序の決定

得られた恒常的活性化変異と、経路構成因子 Cpl1、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 のいずれかの欠損変異との二重変異株を作製し、二重変異株で Rim101 の限定分解が起こっているか否かをウエスタン法により検討した。恒常的活性

化変異の原因遺伝子がコードしているタンパク質を X、二重変異として組み合わせさせた経路構成因子を Y とすると、Rim101 の限定分解が起こっていれば、X は Y よりも経路において下流で機能すると考えられ、逆に限定分解が起こっていなければ X は Y よりも上流で機能すると考えられる。可能な全ての組み合わせで二重変異株を作製することにより、経路を構成する諸因子が経路内で機能する順序を決定した。

### 3. Cpl1 を含むタンパク質複合体の生化学的解析

精製のためのエピトープタグを Cpl1 の C 末端に導入した株を作製し、その株の細胞抽出液からアフィニティー精製法により Cpl1 を含むタンパク質複合体を精製した。精製標品を SDS-ゲル電気泳動と銀染色により解析し、Cpl1 と共精製されるタンパク質を検出した。

### 4. Cpl1-Rim101 経路の標的遺伝子の同定

Rim101 の限定分解が起こる部位より C 末端側を欠失させると、活性化のために限定分解を必要としない活性化型変異体となる<sup>3),4)</sup>。この活性化型 Rim101 を持つ細胞は、イオンストレスにさらされていない条件下でも、経路が活性化された場合と同じ表現型を示す。このことを利用して、Rim101 により転写が制御される遺伝子の同定を以下のような方法で試みた。トランスポゾンを利用した *lacZ* 遺伝子挿入ゲノムライブラリーがある。このライブラリーを用いると、ゲノムにランダムに *lacZ* 遺伝子を挿入することができる。Rim101 により転写が制御される遺伝子に挿入が起こった場合には、活性化型 Rim101 を持った細胞と Rim101 を欠損させた細胞とで *lacZ* 遺伝子の発現が異なり、その差を X-Gal を基質として  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の差異として検出することができる(期待される(エンハンサー・トラップ)。多数の *lacZ* 遺伝子挿入株について活性化型 Rim101 の有無による発現の変化を評価し、発現の変化の見られる複数の *lacZ* 遺伝子挿入株を同定した。それぞれの挿入箇所を決定することにより、Rim101 により転写が制御される遺伝子の候補を同定した。これらの遺伝子が実際にイオンストレスで制御を受けるか否か、またその制御が Rim101 に依存するか否かについて、ノザン法を用いて検討を加えた。

### 5. Ssk1 分解に対するプロテアソームの関与の検討

プロテアソームの構成サブユニット Rpn9、Rpn12 の温度感受性変異株を用いて、Ssk1 の分解に対するプロテアソームの関与を検討した。Ssk1 の転写・翻訳を停止させると同時に変異株を制限温度に移し、細胞内の Ssk1 の量をウエス

タン法により経時的に測定することで、プロテアソームの活性が低下した場合の Ssk1 の分解速度を評価した。

#### 6. Ssk1 分解のリン酸化依存性の検討

Ssk1 のリン酸化状態がその分解に及ぼす効果について次のような方法で検討した。通常の浸透圧条件下では Ssk1 はリン酸化状態にあるが、リン酸基転移中間体 Ypd1 を欠損させると Ssk1 のリン酸化は起こらない。野生株と Ypd1 欠損変異株における Ssk1 の分解速度を 5. と同様の方法を用いて比較した。さらに、分解に対するプロテアソームの関与を検討するために、Rpn9 欠損変異株と Rpn9 Ypd1 二重欠損変異株における Ssk1 の分解速度を同様に比較した。

#### 7. Ssk1 分解に関わるユビキチン結合酵素・ユビキチンリガーゼの同定

ユビキチン結合酵素 Ubc7 とユビキチンリガーゼ Hrd1 の、Ssk1 の分解への関与の可能性について、野生株と Ubc7 欠損変異株、あるいは Hrd1 欠損変異株における Ssk1 の分解速度を 5. と同様の方法を用いて比較することにより検討した。

#### 8. Ssk1 分解の HOG 経路不活性化における役割の検討

Ssk1 の分解が HOG 経路の不活性化に果たす役割を検討するため、浸透圧刺激後の Hog1 MAP キナーゼの活性化状態の変化を、野生株と Ubc7 欠損変異株とで比較した。Hog1 の活性化状態は、リン酸化 Hog1 を認識する抗体を用いたウエスタン解析により評価した。

### ③研究結果

#### 1. Cpl1-Rim101 経路の遺伝学的解析

これまでに同定されたこの経路の構成因子 Cpl1、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 のいずれかを欠損した変異株は、共通して Rim101 の限定分解が起こらず、それに伴い耐塩性が低下する。そこで、Rim9 欠損変異株から、耐塩性と Rim101 の限定分解を同時に回復した変異株（抑圧変異株）を単離した。回復の原因となっている変異を、Rim9 欠損変異から分離して単独変異とすると、イオンストレスにさらされない条件下でも Rim101 の限定分解が昂進していたため、この変異を持つ細胞では経路が恒常的に活性化されていることが明らかになった（データは示していない）。得られた恒常的活性化変異と、経路構成因子である Cpl1、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 のいずれかの欠損変異との二重変異株を作製し、それぞれにおいて Rim101 の限定分解が起こるか否かを検討したとこ

ろ、Rim8、Rim9、Rim21 との二重変異株においては限定分解が起こっているのに対し、Cpl1、Rim20 との二重変異株においては限定分解が起こっていなかった（データは示していない）。また二重変異株の耐塩性は、限定分解の回復と一致して回復した。このことから、恒常的活性化変異の原因遺伝子の遺伝子産物を X とすると、この経路では構成因子が Fig. 1 に示した順序で機能し、黒矢印で示したシグナルの流れがあることが明らかになった。

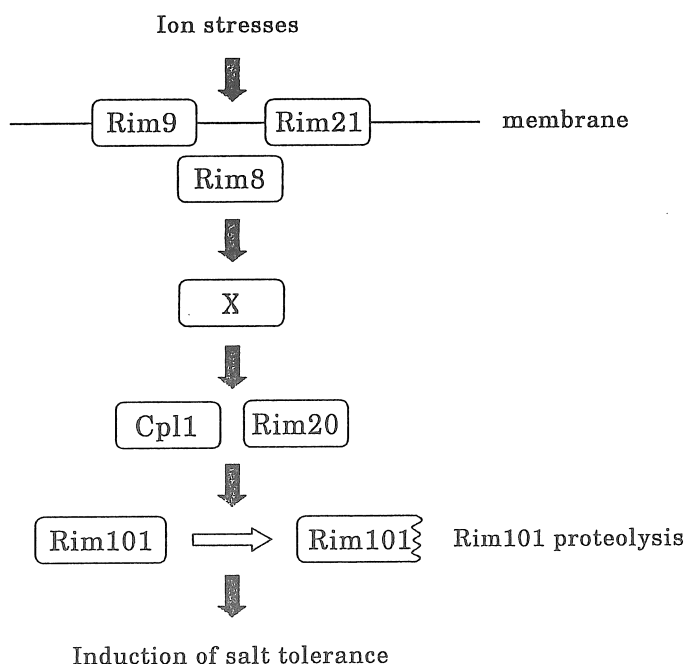


Fig. 1. Signal flow in the Cpl1-Rim101 pathway.

## 2. Cpl1-Rim101 経路の生化学的解析

これまでに知られている経路構成因子の欠損変異株の表現型が共通であることから、これらの因子が一つの複合体を形成して機能している可能性が考えられる。その可能性について生化学的手法を用いて検討した。複合体精製のためのエピトープタグをプロテアーゼである Cpl1 に導入した株を作製し、その株の細胞抽出液からアフィニティー法により Cpl1 を含むタンパク質複合体を精製した。しかしながら、SDS ゲル電気泳動では Cpl1 のバンドは確認されたものの、他のタンパク質のバンドは確認できなかった（データは示していない）。このことは、イオンストレスにさらされていない条件下では、Cpl1 と化学量論的に結合している因子が存在していないことを示唆している。

### 3. Cpl1-Rim101 経路の標的遺伝子の同定

活性化された Cpl1-Rim101 経路は、最終的に多数の遺伝子の転写制御を介して耐塩性の獲得に寄与していると考えられる。

*lacZ* をレポーター遺伝子としたエンハンサー・トラップを行い、活性化型 Rim101 により転写が制御される遺伝子をスクリーニングした。転写が誘導されるものとして、*Ena1*、*Stv1*、*Pho8*、*Shc1* をコードする4つの遺伝子、抑制されるものとして *Prb1* をコードする遺伝子を同定した。これらの遺伝子が実際にイオンストレスで制御を受けるか否かを検討したところ、*Stv1* をコードする遺伝子以外のものについては、活性化型 Rim101 を用いた場合と同様の制御を受けることが明らかになった（データは示していない）。また、また Rim101 欠損変異株において同様の解析を行うことにより、観察された転写制御が Rim101 に依存するか否かを検討したところ、*Stv1* をコードする遺伝子以外のものについては依存していることが明らかになった（データは示していない）。

### 4. Ssk1 分解に対するプロテアソームの関与の検討

酵母のプロテオームを対象としたタンパク質間相互作用の網羅的解析が行われ、その結果が公表されている<sup>5)</sup>。これを参照し、*Ssk1* はユビキチンならびにユビキチン結合酵素である *Ubc7* と結合することを見出した。このことは *Ssk1* がユビキチン・プロテアソーム系と何らかの関係を持つことを示唆している。そこでまず、プロテアソームの構成サブユニット *Rpn9* と *Rpn12* のそれぞれの温度感受性変異株を用いて、*Ssk1* の分解に対するプロテアソームの関与を検討した。*Ssk1* の転写・翻訳を停止させると同時に変異株を制限温度に移し、細胞内の *Ssk1* の量を経時的に測定すると、いずれの温度感受性変異株においても、野生株と比較して *Ssk1* が顕著に安定化されていることが明らかになった（データは示していない）。このことは *Ssk1* の分解がプロテアソーム系に依存して起こることを示している。

### 5. Ssk1 分解のリン酸化依存性の検討

*Ssk1* の活性はそのリン酸化状態により制御されている。リン酸化型が不活性型で脱リン酸化型が活性型である。このリン酸化状態が *Ssk1* の分解に及ぼす効果について以下のように検討した。通常の浸透圧条件下では *Ssk1* はリン酸化状態にあるが、リン酸基転移中間体 *Ypd1* を欠失させると *Ssk1* のリン酸化は起こらない。野生株と *Ypd1* 欠損変異株における *Ssk1* の分解速度を比較したところ、*Ypd1* 欠損変異株では *Ssk1* 分解が顕著に昂進していることが明らかになった



(Fig. 2)。このことは脱リン酸化型の Ssk1 が選択的に分解されていることを示している。

さらに、この脱リン酸化型 Ssk1 に選択的な分解に対するプロテアソームの関与を検討するために、野生株と Ypd1 欠損変異株において Rpn9 を同時に欠損させた株において Ssk1 の分解速度を比較したところ、Ypd1 欠損により引き起こされた Ssk1 分解の昂進が認められなくなった (Fig. 2)。このことは、上で見られた脱リン酸化型 Ssk1 に選択的な分解が、プロテアソーム系に依存して起こることを示している。

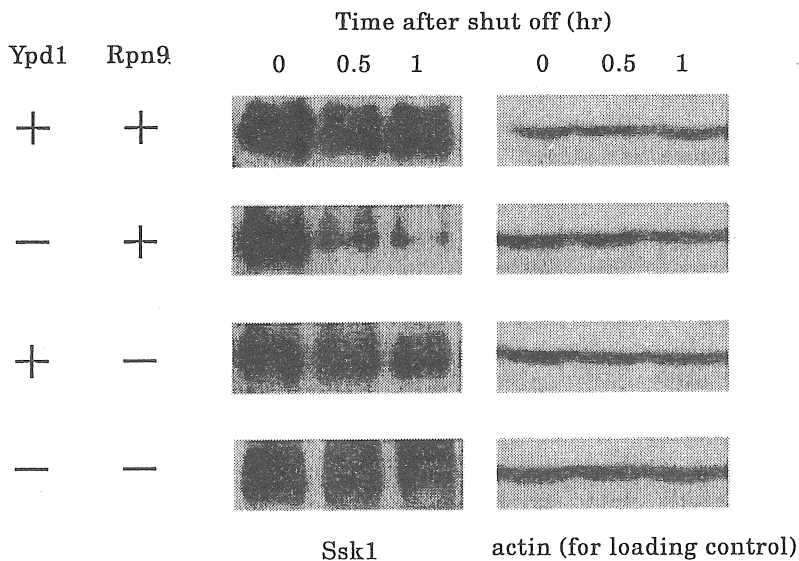


Fig. 2. Phosphorylation-regulated, proteasome-dependent degradation of Ssk1.

## 6. Ssk1 分解に関わるユビキチン結合酵素・ユビキチンリガーゼの同定

4. で述べたとおり、Ssk1 とユビキチン結合酵素 Ubc7 の結合が報告されている。Ssk1 の分解への Ubc7 の関与の可能性について以下のように検討した。野生株と Ubc7 欠損変異株における Ssk1 の分解速度を比較したところ、顕著な差異は認められなかった。これに対して、Ypd1 欠損変異株と Ypd1 Ubc7 二重欠損変異株における Ssk1 の分解速度を比較したところ、Ypd1 Ubc7 二重欠損変異株では Ssk1 が顕著に安定化されていることが明らかになった (データは示していない)。このことは、脱リン酸化型 Ssk1 に選択的な分解に Ubc7 が関与

していることを示している。

さらに、Ubc7 と協調して機能することが知られているユビキチンリガーゼ Hrd1 についても同様な検討を行ったところ、脱リン酸化型 Ssk1 に選択的な分解に Hrd1 も関与していることが明らかになった (データは示していない)。

## 7. Ssk1 分解の HOG 経路不活性化における役割の検討

Ssk1 の分解が HOG 経路の不活性化に果たす役割を検討するため、浸透圧刺激後の Hog1 MAP キナーゼの活性化状態の変化を、野生株と Ubc7 欠損変異株とで比較した。野生株では、浸透圧刺激後速やかに Hog1 の不活性化が起こるのに対し、Ubc7 欠損変異株では Hog1 の活性化が持続していた (Fig. 3)。

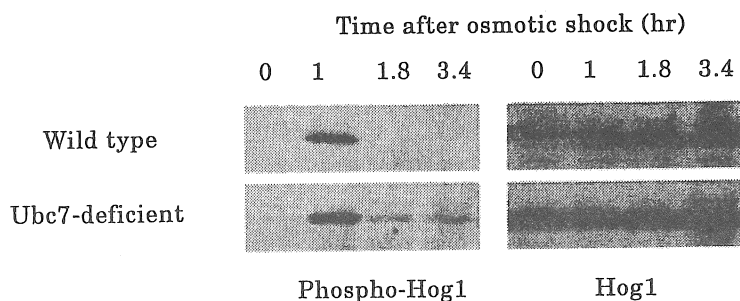


Fig. 3. Sustained activation of the HOG pathway in Ubc7 deficient cells.

### ④考察

塩ストレスに応答して活性化され酵母に耐塩性を付与する2つの情報伝達経路に関して解析を進めた。

イオンストレスに応答する Cpl1-Rim101 経路に関しては、経路が恒常的に活性化される変異を単離した。また、この変異を用いた遺伝学的解析から、既存の経路構成因子の機能する順序を決定した (Fig. 1)。この解析で経路の最も上流に位置づけられたのが Rim8、Rim9、Rim21 で、これらはイオンストレスのセンサーとして作用している可能性が考えられる。この内、Rim9 と Rim21 はアミノ酸配列から細胞膜を貫通する構造を有していることが予想され、センサーの有力な候補であると考えられる。また、経路の下流で Rim101 に最も近くに位置づけられたのは Cpl1 と Rim20 である。このことは、Cpl1 が Rim101 を限定分解しているプロテアーゼである可能性と矛盾せず、さらに Rim20 と Rim101 の結合が報告されていることとも一致する<sup>6)</sup>。

生化学的手法を用いて Cpl1 と複合体を形成しているタンパク質を検索したが、Cpl1 と化学量論的に結合している因子は検出することができなかった。精製条件などに一層の検討が必要であるものの、イオンストレスにさらされていない条件下では、Cpl1 は他のタンパク質と複合体を形成していない可能性が高い。経路の活性化はイオンストレスに応答して起こることから、Cpl1 がタンパク質複合体として機能しているとしても、複合体形成はストレス刺激に依存して起こる可能性が考えられる。本研究で単離した、経路が恒常的に活性化される変異株を用いて同様の精製を行うことにより、イオンストレスに依存して形成される複合体を同定できることが期待される。

また、Cpl1-Rim101 経路により転写を制御される遺伝子として、Ena1、Stv1、Pho8、Shc1、Prb1 をコードする遺伝子を同定した。この内、Ena1 は、ナトリウムなど細胞内に蓄積すると有害であるイオンを排出するためのポンプである。このことは、この経路を介して制御される塩ストレス応答反応として、ナトリウムイオン排出系の活性化があることを示している。

浸透圧ストレスに応答する HOG 経路に関しては、センサー経路の一つである Sln1 経路の構成因子 Ssk1 が、ユビキチン・プロテアソーム系により分解されることを明らかにした。この分解は、脱リン酸化型の Ssk1 に選択的に起こるものであり、ユビキチン結合酵素 Ubc7 とユビキチンリガーゼ Hrd1 を介するものであることが明らかになった。この選択的分解が欠損した Ubc7 欠損変異株では、浸透圧ストレス刺激後の HOG 経路の活性化が、野生株に比較して長く持続することから、この分解系は応答反応が終了した後に脱リン酸化型に留まっている Ssk1 を分解することにより、速やかに経路を不活性化する働きをしていると考えられる。

なお、本研究のうち、HOG 経路に関する部分は現在、国際的学術雑誌に印刷中である。

#### ⑤今後の課題

Cpl1-Rim101 経路に関しては、構成因子が機能する順序を決定することができたが、この知見をもとに各因子が実際にどのような分子機構でシグナルを伝達しているのかを明らかにする必要がある。特に、イオンストレスセンサーの同定は今後に残された大きな課題である。さらに、経路が恒常的に活性化されている変異の原因遺伝子のコードしているタンパク質 X の実体が不明であり、その同定は経路の全容解明に欠くことができない。また、この経路により誘導されるタンパク質として、ナトリウムイオンの排出に関わるトランスポーターである Ena1 を同定したことで、イオンストレスに抗する応答反応として、有

害イオンの排出機構活性化の重要性が確認された。この経路で誘導される他のタンパク質についても、塩ストレス応答における役割を検討し、耐塩性付与の新しい分子機構を明らかにできると期待される。

HOG1 経路に関しては、新しい負の制御機構を明らかにすることができたが、既知の制御機構と協調してどのように浸透圧耐性に寄与しているのかを明らかにする必要がある。

耐塩性に優れた酵母株の創出のためには、これら 2 つの塩ストレス情報伝達経路がどのように耐塩性に関わる種々の応答反応を適切に統合しているのかを明らかにする必要がある。本研究で得られた知見をもとに酵母の耐塩性獲得の分子基盤を明らかにし、耐塩性を賦活化する方法論を確立することが必要である。

#### ⑥文献等

- 1) Penalva MA, Arst, HN Jr.  
Microbiology and Molecular Biology Review, 66: 426-446 (2002)
- 2) O'Rourke SM, Herskowitz I, O'Shea EK.  
Trends in Genetics, 18: 405-412 (2002)
- 3) Futai E, Maeda T, Sorimachi H, Kitamoto K, Ishiura S, Suzuki K.  
Molecular and General Genetics, 260: 559-568 (1999)
- 4) Li W, Mitchell AP.  
Genetics, 145: 63-73 (1997)
- 5) Ho Y, *et al.*  
Nature, 415: 180-183 (2002)
- 6) Xu W, Mitchell AP.  
Journal of Bacteriology, 183: 6917-6923 (2001)
- 7) Naoto Sato, Hiroyuki Kawahara, Akio Toh-e, Tatsuya Maeda  
Molecular and Cellular Biology (in press)

## Basic research towards improvement in the salt tolerance of yeasts

Tatsuya Maeda

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Yeasts has been used for the production of fermented high salt foods, including soy sauce, miso, and pickles. To maintain superior flavor and continue high production of these foods under high salt fermentation conditions, yeasts used for the fermentation must be highly salt tolerant. Yeasts achieve the salt tolerance by exerting various physiological responses under high salt conditions to adapt to the stressful condition. In this study, among the signal transduction pathways activated by the salt stress to induce various adaptive responses, we focused the Cpl1-Rim101 pathway, which responds to ion stresses, and the HOG pathway, which responds osmotic stress, and elucidated novel regulatory mechanisms of these pathways.

The Cpl1-Rim101 pathway responds ionic stress by proteolytically cleaving and thus activating the Rim101 transcription factor. Cpl1, a calpain-like protease implicated in the Rim101 cleavage, as well as Rim8, Rim9, Rim20, and Rim21 have been identified as constituents of this pathway. In this study, we determined the order of actions among these constituents in the pathway as follows.

Ion stresses → Rim8 · Rim9 · Rim21 → Cpl1 · Rim20 → Rim101 cleavage →  
Induction of salt tolerance

In addition, a gene encoding Ena1, a membrane transporter extruding the toxic sodium ion, was identified to be induced by this pathway. This observation indicates that ion stress activate the pathway to induce the extrusion system for the toxic ions as an adaptive response.

The HOG pathway is the yeast stress responsive MAP kinase pathway with two osmotic sensor mechanisms. The pathway is activated by the osmotic stress to induce various adaptive responses. Ssk1 is a key component of one of the sensor mechanisms, the Sln1 pathway. Upon osmotic stress, Ssk1 is rapidly dephosphorylated and thus activated, and it in turn activates the downstream MAP kinase pathway. In this study, a degradation mechanism specific to dephosphorylated Ssk1 was found to downregulate the pathway. This degradation was performed by the ubiquitin-proteasome system and a ubiquitin-conjugating enzyme Ubc7 and a ubiquitin ligase Hrd1 participate in the degradation. In addition, we found the physiological role of this degradation is to inactivate the HOG pathway timely after the osmotic adaptation completes.

The analysis of these two salt stress-responsive signal transduction pathways elucidates the elaborate regulatory mechanism coordinating the salt stress responses. Based on the observation obtained in this study, we would like to clarify the molecular basis for the acquisition of the yeast salt tolerance, and to design highly salt tolerant yeast strains.