

発表番号 23

酵母を用いた耐塩性・耐浸透圧性の分子機構の解析

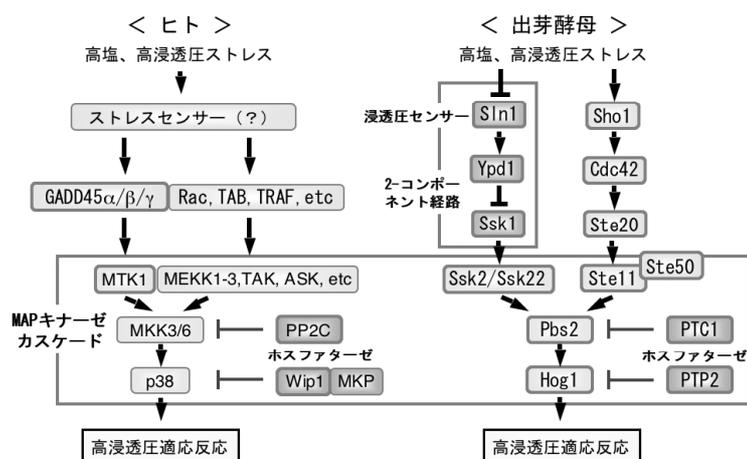
助成研究者：館林和夫（東京大学医科学研究所）

共同研究者：武川睦寛（東京大学医科学研究所）

齋藤春雄（東京大学医科学研究所）

本研究では、植物や動物のきわめて良いモデル生物である出芽酵母（パン酵母）をもちいて、高食塩濃度に起因する高浸透圧への耐性を、とくに高浸透圧シグナル伝達機構に焦点を当てて解析した。出芽酵母は、300mM以上のNaCl濃度にさらされると、その浸透圧を感受し、HOG MAPキナーゼ経路を活性化することにより、高浸透圧環境に適応する。活性化したHog1 MAPキナーゼは細胞核に輸送され、転写因子のリン酸化によって浸透圧適応に必要な遺伝子群の発現制御を行う。したがって、Hog1 MAPキナーゼ経路（HOG経路）が欠損した酵母では高濃度NaCl存在下での生育が不可能である。また、浸透圧変化はヒト細胞にも甚大なストレス作用を及ぼし、Hog1 MAPキナーゼ経路と極めて高い類似性のあるp38 MAPキナーゼ経路の活性化を引き起こす。

酵母およびヒトの高塩・高浸透圧ストレスシグナル伝達経路におけるMAPKKKとMAPKKとの特異的相互作用を制御する機構の解明を目指した。その結果、いずれの生物においても、シグナル特異性の決定には、MAPKKK-MAPKKのドッキング相互作用が重要であることが示された。また、このドッキング相互作用を阻害すると、高浸透圧ストレスによるシグナル伝達が阻害されることも示唆された。ヒトのストレス応答MAPキナーゼ経路の異常活性化を抑制するような化合物を見出すことにより、癌や自己免疫疾患の治療薬の開発に役立つと考えられる。また、きわめて類似したストレスMAPK経路は高等植物にも存在するので、当研究の成果を利用して耐塩性植物の開発、さらには食糧生産の増加にも貢献できると期待される。



発表論文

Takekawa M, Tatebayashi K, and Saito H. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Molecular Cell*, **18**: 295-306 (2005).

酵母を用いた耐塩性・耐浸透圧性の分子機構の解析

助成研究者 舘林和夫 (東京大学医科学研究所)
 共同研究者 武川睦寛 (東京大学医科学研究所)
 齋藤春雄 (東京大学医科学研究所)

1. 研究目的

食塩による植物の生育阻害は、「Na および Cl イオンによる化学的作用」と「塩溶液のもつ浸透圧による物理化学的作用」との複合的な効果である。植物に効率よく耐塩性を付与するためには、イオン耐性のみではなく浸透圧耐性をも考慮する必要がある。本研究では、植物や動物のきわめて良いモデル生物である出芽酵母 (パン酵母) をもちいて、高食塩濃度に起因する高浸透圧への耐性を、とくに高浸透圧シグナル伝達機構に焦点を当てて解析した。さらに、得られた成果を利用して、酵母と極めて類似点の多いヒトの高浸透圧ストレスシグナル伝達経路における全く新しい制御機構をも解明した。

助成研究者の属する東京大学医科学研究所の齋藤らは酵母の浸透圧センサー (Sln1 と Sho1) をみいだし、また浸透圧シグナル伝達系に關与することが知られている遺伝子の大半を同定した (Fig 1) [文献 1-7]

出芽酵母は、300 mM 以上の NaCl 濃度にさらされると、その浸透圧を感受し HOG MAP キナーゼ経路を活性化することにより、高浸透圧環境に適応する。活性化した Hog1 MAP キナーゼは細胞核に輸送され [文献 6] 転写因子のリン酸化によって浸透圧適応に必要な遺伝子群の発現制御を行う。したがって、Hog1 MAP キナーゼ経路 (HOG 経路) が欠損した酵母では高濃度 NaCl 存在下での生育が不可能である。上記の如く、酵母には Sln1 と Sho1 の 2 種の浸透圧センサーが存在する [文献 1,2]

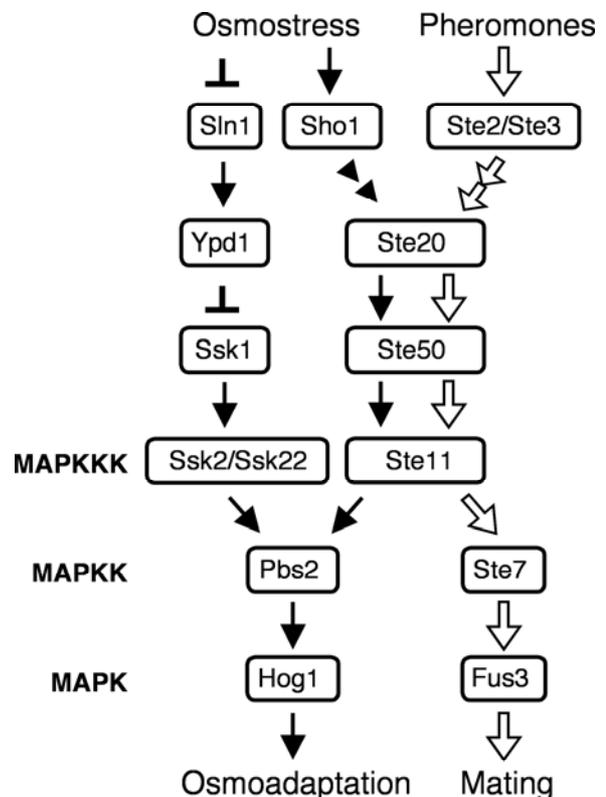


Fig 1. Schematic diagram of the HOG osmoregulatory pathway and the mating pheromone pathway in the budding yeast.

Sln1 浸透圧センサーは二回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞外のセンサー領域で浸透圧変化を感受し、細胞質内にあるヒスチジンキナーゼ・ドメインの活性を制御すると考えられている [文献 9]。カビ類や高等植物には Sln1 にきわめて類似性の高い遺伝子が知られており、当研究の成果を利用して耐塩性植物の開発、さらには食糧生産の増加に貢献できると期待される。

Sln1 は Ypd1 蛋白質を介した「リン酸リレー反応」によって、Ssk1 蛋白質のリン酸化状態を制御する [文献 3]。Ssk1 は Hog1 MAP キナーゼの上流因子である Ssk2 MAPKKK に結合してそれを活性化すると考えられている [文献 6]。活性化された Ssk2 MAPKKK は Pbs2 MAPKK をリン酸化することにより活性化し、活性化された Pbs2 が Hog1 MAPK をリン酸化・活性化する。しかし、酵母細胞内には類似性の高い MAPK 経路が数多く存在し、それぞれ異なった機能を担っている [文献 11]。したがって、いかにしてそれぞれの MAPKKK が特定の決まった MAPKK のみを認識し、それを活性化するのは、きわめて重要な問題である。助成研究者らは HOG 経路の Ssk2 MAPKKK と Pbs2 MAPKK に着目して、まず Pbs2 の様々な変異株を解析することにより、Ssk2 と Pbs2 との特異的結合を明らかにすることを目的とする解析を行った。

浸透圧変化はヒト細胞にも甚大なストレス作用を及ぼし、Hog1 MAP キナーゼ経路と極めて高い類似性のある p38 MAP キナーゼ経路 [文献 8] の活性化を引き起こす。そこで、酵母で得られた結果をヒト p38 MAP キナーゼ経路へと敷衍して p38 MAP キナーゼ経路における MAPKKK と MAPKK の特異的相互作用を制御する機構の解明を目指した。

2. 研究方法

変異株の作成 酵母の遺伝子およびヒト cDNA の変異体は変異原性オリゴペプチドを用いた PCR 法、あるいは error-prone PCR 法により作成した。

MAP キナーゼ (MAPK) の活性化 リン酸化に依存する MAPK の活性化は、リン酸化 MAPK 特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析によって検出した。

タンパク質結合の解析 タンパク質とタンパク質の結合は、2 ハイブリッド法および免疫共沈法により解析した。

ペプチド ペプチドは HPLC により 95%以上の純度に精製したものを使用した。DVD ペプチドを細胞へ導入するためには、DVD ペプチドの N 末端にアルギニン 11 個とグリシン 3 個 (RRRRRRRRRRRGGG) を加えたものを用いた。

ヒト cDNA の発現 HeLa 細胞を 10%牛胎児血清を含む DMEM 培地で培養し、Effectene Transfection Reagent (Qiagen)を用いて cDNA を形質導入した。

その他 用いた酵母変異株、cDNA コンストラクト、ウエスタン法に用いた抗体、などについては文献 8、10、12 に詳述されている。

3. 結果と考察

3.1. 酵母の高塩・高浸透圧ストレス情報伝達経路の制御機構

Fig 1 に見られるように、酵母においては、Sln1 浸透圧センサーの働きにより活性化された Ssk2/Ssk22 MAPKKK が HOG 高浸透圧制御経路における鍵分子である Pbs2 MAPKK を活性化することが知られている。しかし、細胞内には Pbs2 の他に Ste7 とよばれる類似した MAPKK が存在するが、Ssk2/Ssk22 は Pbs2 のみを活性化する。他方、Ste11 MAPKKK は浸透圧および接合因子により活性化され、それぞれの状況に応じて Pbs2 あるいは Ste7 MAPKK を活性化することも知られている。そこで、なぜ Ssk2 は Pbs2 のみを活性化し、Ste7 は活性化できないのかを調べるために、Pbs2 の部分欠損変異株を系統的に作成した (Fig 2A)。Pbs2 の N-末端領域 (5-54) を欠損した変異株は、Ste11 に依存した高浸透圧感受性を示した (Fig 2B)。

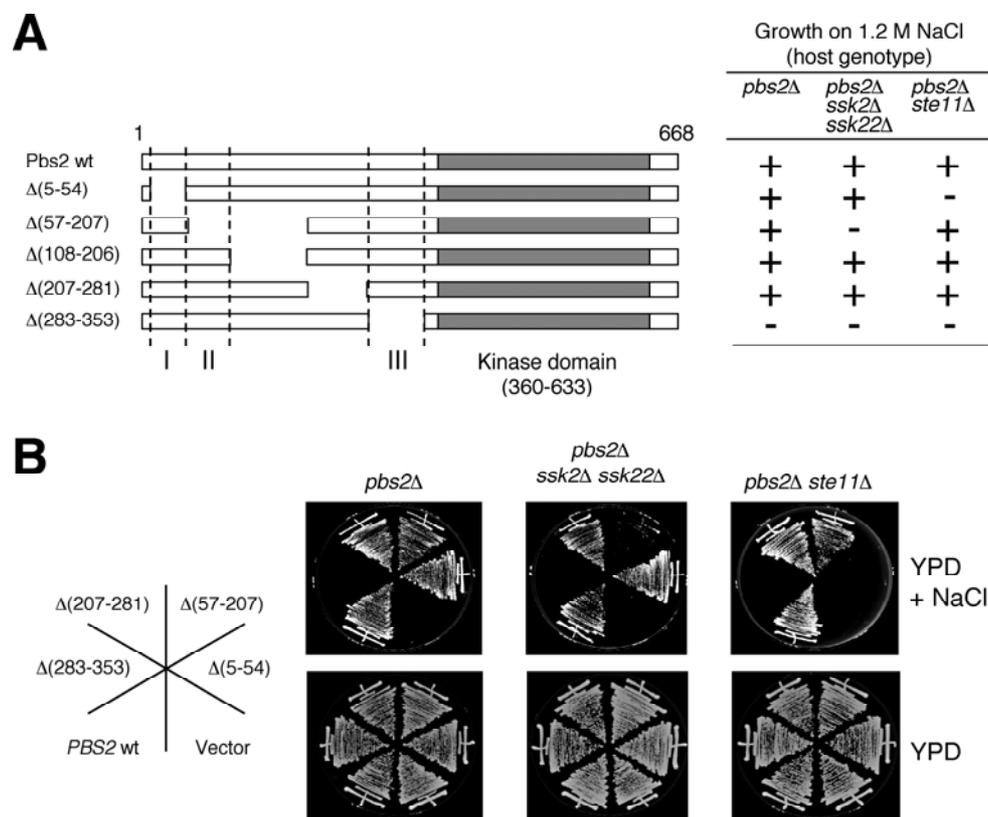


Fig 2. Functional analyses of the Pbs2 N-terminal regulatory region. (A) Summary of the analyses. (B) Osmosensitivity of selected mutant strains. Cells were streaked on YPD or YPD + 1.2 M NaCl plates, and incubated at 30°C.

正常な Pbs2 を持つ酵母株では、Hog1 MAPK の活性化は Ssk2/Ssk22 あるいは Ste11 のいずれかのみがあれば充分であるが、この領域を欠損した Pbs2 変異株では、高浸透圧による Hog1 の活性化 (リン酸化) も Ste11 に依存していた (Fig 3)。

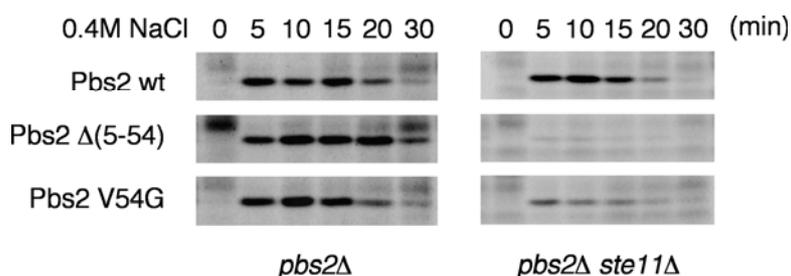


Fig 3. Effect of Pbs2 N-terminal mutations on Hog1 activation. *pbs2Δ* or *pbs2Δ ste11 Δ* mutant strain was transformed with a plasmid expressing either Pbs2 wt, Pbs2Δ(5-54), or Pbs2 V54G. Cells were collected at the indicated times after addition of 0.4 M NaCl, and Hog1 activation was examined by immunoblotting with an anti-phospho-p38 antibody.

更に error-prone PCR 法を用いて Pbs2 N 末端領域に点変異を導入し、詳細な解析を行った結果、45~56 番目のアミノ酸が重要であることが分かった。この領域に欠損あるいはアミノ酸置換が生じると、Ssk2/Ssk22 によってまったく活性化できなくなっていた。にもかかわらず、これらの Pbs2 変異株は Ste11 によっては正常に活性化されることから、キナーゼとしての本来の機能には何らの欠陥も見いだせなかった。

この領域の機能を更に詳細に検討する目的で、Ssk2 と Pbs2 の結合性について 2 ハイブリッド法で解析を行ったところ、Ssk2 の C 末端にあるキナーゼ領域が Pbs2 の N 末端に結合した (Fig 4)。その結合は、Val54 が Gly になった V54G 変異では全く失われていた。

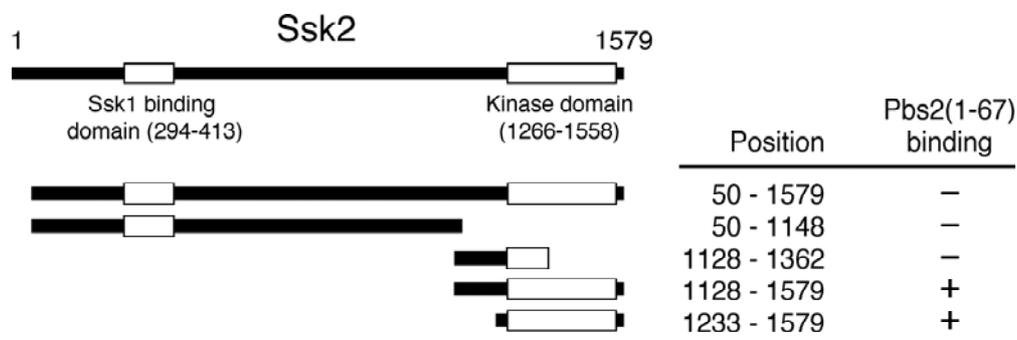


Fig 4. Two-hybrid analysis of the binding of Ssk2 MAPKKK to Pbs2 MAPKK. The indicated segments of Ssk2 were fused to the Gal4 activation domain, and their binding to LexA-Pbs2(1-67) was evaluated with a β-galactosidase filter assay.

さらに、この結合が実際に細胞内で起きていることを調べるために、GST タグを付けた Ssk2 と HA タグを付けた Pbs2 の全長あるいは N 末配列 (1-354) とを同一細胞内で発現した。グルタチオン・ビーズを用いて GST-Ssk2 を精製したところ、HA-Pbs2 全長あるいは HA-Pbs2 (1-354) は共沈したが HA-Pbs2(V54G) 変異タンパク質は共沈しなかった。これらの結果は、Pbs2 N 末端に Ssk2 (および Ssk22) との特異的結合部位 (ドッキングサイト) が存在すること、およびそのドッキングサイトを介した結合がシグナルの伝達に必須であ

ることなどを示した。

次に、Ste7 MAPKK が Ssk2 によっては活性化されないのは、Ssk2 特異的なドッキングサイトが無いからではないか、と考えて Pbs2 のドッキングサイトを含むN末端 67 アミノ酸を Ste7 のN末端に融合した変異タンパク質 (Pbs2-Ste7) を作成した (Fig 5)。

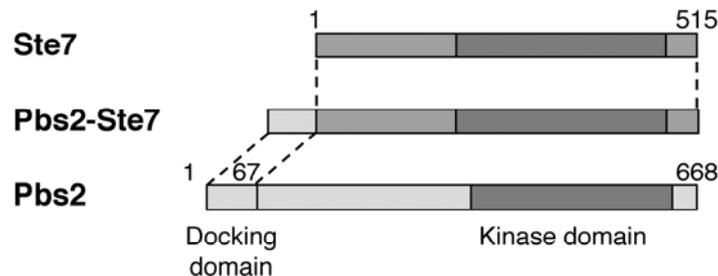


Fig 5. Schematic diagram of the Pbs2-Ste7 fusion protein used in this work.

Fig 6A に見られるように、Pbs2 の N 末端領域が融合した Ste7 は食塩ストレスによって活性化された。通常の Ste7 や V54G 変異を持つ Pbs2-Ste7 融合タンパク質は、食塩ストレスによっては活性化できなかった。Ste11 MAPKKK を介して Ste7 を活性化する接合フェロモンを用いた場合は、Pbs2-Ste7 と Pbs2(V54G)-Ste7 とは同程度に活性化されることから、これらのタンパク質の発現や機能に欠損はないことが分かる (Fig 6B)。

以上をまとめると、Ssk2 が Pbs2 のみを活性化し、Ste7 を活性化することが出来ないのは、特異的ドッキングサイトが欠損しているからであると結論できる。言い換えると、特異的ドッキングサイトが MAPKKK-MAPKK 相互作用の特異性を決定しているとも言える。

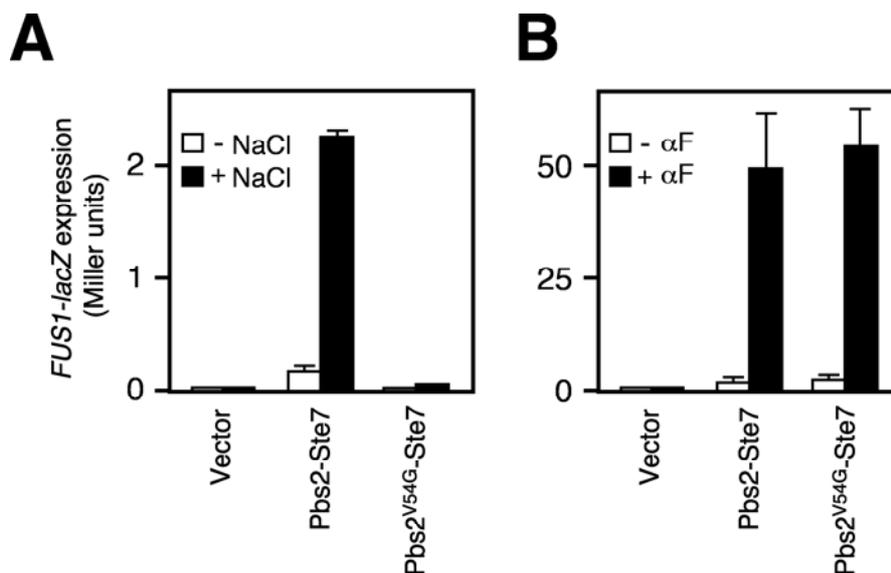


Fig 6. *FUS1-lacZ* expression induced by osmotic stress via the Pbs2-Ste7 fusion protein. Yeast KT005 (*pbs2Δ ste11Δ*) cells expressing either Pbs2-Ste7, Pbs2(V54G)-Ste7, or none (vector) are stimulated either by NaCl (A) or by α mating factor (B). β -galactosidase (β -gal) activities are expressed in Miller units.

さらに、Mixed-oligo 法をもちいて、DVD ドメイン内の各アミノ酸部位毎に数種の置換変異体を作成して、それらの MTK1 結合能を 2 ハイブリッド法により調べたところ、数カ所のアミノ酸の置換変異体は MTK1 結合活性をほとんど失っていた (Table 1)。以下の実験では、もっとも効果の大きい V328G(V/G)あるいは F327D(F/D)変異体を用いた。

DB-MKK6	β -gal (Miller unit)	
	ACT-MTK1	ACT-ASK1
WT	145	855
T315V	115	300
L316D	80.3	246
H317L	1.2	0.5
E318G	15.5	39.6
S319D	111	277
K320Q	89.9	464
G321Q	0.5	0.5
T322L	0.9	3.7
D323G	17.1	33.5
V324G	3.0	1.9
A325Y	113	274
S326D	147	180
F327D	0.2	0.1
V328G	0.1	0.2
K329T	141	384
L330Q	141	444
I331D	0.1	0.1
L332D	60.4	136
G333K	113	1120
D334C	143	743

Table 1. Two-hybrid analyses of amino acids critical for MTK1-MKK6 and ASK1-MKK6 interactions. The wild-type DB-MKK6 construct encodes aa 133-334 of MKK6. ACT-MTK1 and ACT-ASK1 encode only the kinase domain of MTK1 or ASK1 respectively. β -galactosidase (β -gal) activities are expressed in Miller units.

Flag-MTK1 と HA-MKK6 を用いた免疫共沈実験によっても、V328G 変異が MTK1 と MKK6 との特異的結合を阻害することがわかった (Fig 9)。

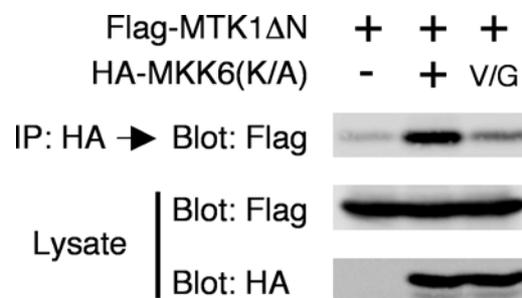


Fig 9. In vitro binding of MKK6 with MTK1 kinase domain. Flag-tagged MTK1 Δ N and HA-tagged MKK6(K/A) were separately expressed in COS-7 cells. Cell extracts were mixed, HA-MKK6(K/A) was immunoprecipitated, and coprecipitating Flag-MTK1 Δ N was detected by blotting.

MKK6 は浸透圧 (0.5M sorbitol)、タンパク質合成阻害剤 (Anisomycin)、酸化ストレス (H₂O₂)、紫外線 (UV) などの細胞ストレスにより活性化されるが、V328G 変異を持つ MKK6 は全く活性化が見られなかった (Fig 10)。

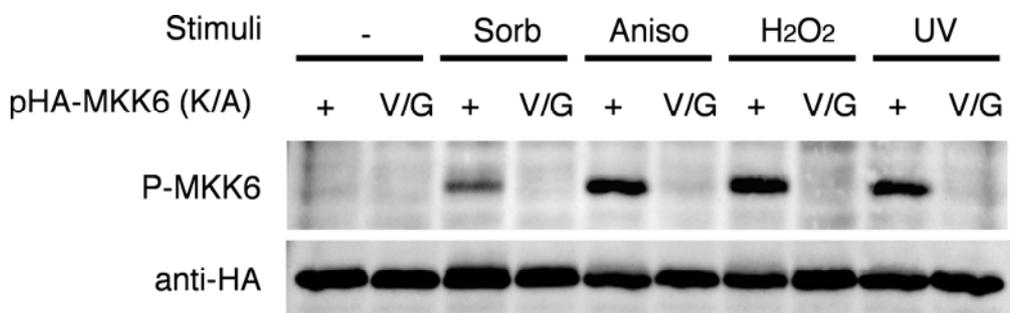


Fig 10. DVD docking is essential for activation of MKK6 *in vivo*. COS-7 cells were transfected with MKK6(K/A) or its V328G (V/G) mutant followed by stimulation with the indicated stresses. Sorb, sorbitol; Aniso, anisomycin.

これらのことから、DVD ドメインを介した MTK1 や他の MAPKKK と MKK6 との特異的結合が、MKK6 の活性化に必須であることが分かった。そこで、DVD ドメインの配列を持ったペプチド (Fig 11A) は MKK6 の DVD ドメインと競合して MKK6 の活性化を阻害できるのではないかと考え、まず *in vitro* でそのことを検証した。Fig 11B に見られる如く、DVD ドメインを含む 28 残基あるいは 24 残基のペプチドは MKK6 の活性化を強く阻害することが分かった。20 残基より短いペプチドではほとんど効果が見られなかった。



Fig 11. MAPKK activation by MAPKKKs can be specifically inhibited by DVD oligopeptides *in vitro*. (A) Sequences of the oligopeptides used in these *in vitro* experiments. (B) Inhibition by synthetic MKK6 DVD peptides of the *in vitro* phosphorylation reactions.

次に、高浸透圧ストレスによるヒト細胞内の MAP キナーゼ経路活性化を DVD ペプチドが阻害できるかどうか、調べるために、DVD ペプチドに細胞膜透過性のあるアルギニン残基 11 個を付加したもの (11R-MKK6-C24) を作成した。Fig 12 に見られるように、11R-MKK6-C24 で処理したヒト由来 HeLa 細胞では浸透圧ストレスによる p38 MAPK の活性化が強く抑制されていた。さらに、MTK1 との結合能を失った F327D 変異を持つ

11R-MKK6-C24(F/D) ペプチドではそのような阻害が全く見られないことから、11R-MKK6-C24 による阻害が DVD ドッキングドメインによる結合によるものであることが示された。

この結果は、MAPKKK-MAPKK 相互作用を阻害するような化合物に開発によって、ストレス応答 MAP キナーゼ経路の活性化の調節が可能になることを示唆する。ヒトのストレス応答 MAP キナーゼ経路の異常な活性化は、関節リウマチなどの自己免疫疾患や癌などの病因であるから、この経路の阻害剤の開発が様々な疾病の治療に繋がる可能性は高い。

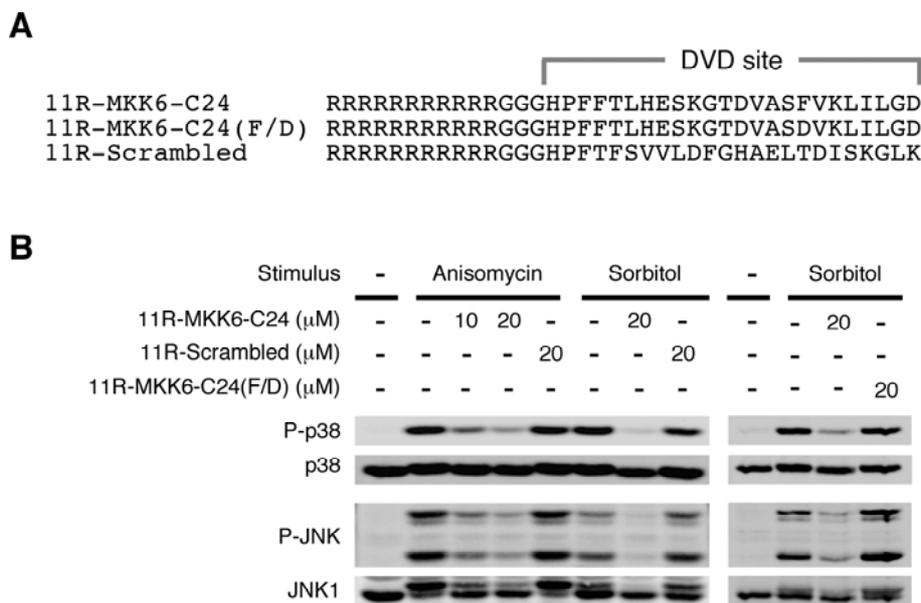


Fig 12. The cell-permeable 11R-MKK6-C24 peptide inhibits the stress-induced p38 and JNK activation *in vivo*. (A) Sequences of the oligopeptide used in *in vivo* experiments. (B) HeLa cells were treated with 11R-MKK6-C24, and stimulated either by anisomycin or by sorbitol. Phosphorylation of the endogenous p38 and JNK1/2 was detected by immunoblotting.

4. 今後の課題

今回の報告において、我々は、酵母およびヒトの高塩・高浸透圧ストレスシグナル伝達経路におけるシグナル特異性の決定に MAPKKK-MAPKK のドッキング相互作用が重要であることを示した。また、このドッキング相互作用を阻害すると、高浸透圧ストレスによるシグナル伝達が阻害されることをも示した。既に述べたように、ヒトのストレス応答 MAP キナーゼ経路の異常活性化を抑制するような化合物を見出すことにより、癌や自己免疫疾患の治療薬の開発に役立つと考えられる。また、きわめて類似したストレス MAPK 経路は高等植物にも存在するので、当研究の成果を利用して耐塩性植物の開発、さらには食糧生産の増加にも貢献できると期待される。

謝 辞

本研究にご援助頂きましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Maeda T, Wurgler-Murphy SM, and Saito H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature (London)*, **369**: 242-245.
- 2) Maeda T, Takekawa M, and Saito H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, **269**: 554-558.
- 3) Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, and Saito H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multi-step phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, **86**: 865-875.
- 4) Posas F, and Saito H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, **276**: 1702-1705.
- 5) Posas F, and Saito H. (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.* **17**: 1385-1394.
- 6) Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, and Silver PA. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* **17**: 5606-5614.
- 7) Raitt DC, Posas F, and Saito H. (2000) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* **19**: 4623-4631.
- 8) Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K, and Saito H. (2002) Smad-dependent GADD45 expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- β . *EMBO J.* **21**: 6473-6482.
- 9) Reiser V, Raitt DC, and Saito H. (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* **161**: 1035-1040.
- 10) Tatebayashi K, Takekawa M, and Saito H. (2003) A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.*, **22**: 3624-3634.
- 11) Saito H, and Tatebayashi K. (2004) Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* **136**: 267-272.
- 12) Takekawa M, Tatebayashi K, and Saito H. (2005) Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol. Cell*, **18**: 295-306.

Molecular mechanism of salt- and osmo-tolerance in yeast

Kazuo Tatebayashi, Mitsuhiro Takekawa, and Haruo Saito

Division of Molecular Cell Signaling, the Institute of Medical Science, University of Tokyo

Summary

Adaptation to high salt and high osmolarity conditions is a fundamentally important biological response of all types of cells, ranging from bacteria, fungi, plants, and animals. In yeast, for example, external high salt and high osmolarity conditions activate the HOG (High Osmolarity Glycerol) MAP kinase (MAPK) pathway, which is essential for yeast to adapt to and survive on those conditions.

MAP kinase cascades are conserved signaling modules composed of three sequentially activated kinases (MAPKKK, MAPKK, and MAPK). The HOG pathway consists of two upstream branches, including two independent osmosensors Sho1 and Sln1, and common downstream elements including the Pbs2 MAPKK and the Hog1 MAPK.

The Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the Sln1 branch, when activated, exclusively phosphorylate the Pbs2 MAPKK, but not another yeast MAPKK, Ste7. We found that this was due to an Ssk2/Ssk22-specific docking site in the Pbs2 N-terminal region. The Pbs2 docking site constitutively bound the Ssk2/Ssk22 kinase domain. Docking site mutations drastically reduced the Pbs2-Ssk2/Ssk22 interaction and hampered Hog1 activation by the Sln1 branch. Fusion of the Pbs2 docking site to Ste7 allowed phosphorylation of Ste7 by Ssk2/Ssk22, showing that the docking interaction is an important specificity determinant of MAPKKK-MAPKK interaction.

An analogous MAPK cascade controls cellular response to external hyperosmolarity in mammalian cells. A conserved docking site, termed DVD, was found in the mammalian MAPKKs. DVD site is a stretch of about 20 amino acids immediately on the C-terminal side of the MAPKK catalytic domain. The DVD sites were found to bind their specific upstream MAPKKKs, including MTK1 and ASK1. Mutations in the DVD site strongly inhibited MAPKKs from binding to, and being activated by, their specific MAPKKKs, both *in vitro* and *in vivo*. DVD site mutants could not be activated by various external stimuli *in vivo*. Synthetic DVD oligopeptides inhibited specific MAPKK activation, both *in vitro* and *in vivo*, demonstrating the critical importance of the DVD docking in MAPK signaling.

These studies demonstrate that docking interaction between MAPKKK and MAPKK contributes to both efficiency and specificity of stress-responsive MAPK signaling, in both mammalian and yeast, and perhaps in any eukaryotic organism.