

助成番号 0626

酵母を用いた耐塩性・耐浸透圧性の分子機構の解析(II)

舘林 和夫, 山本 勝良, 斎藤 春雄

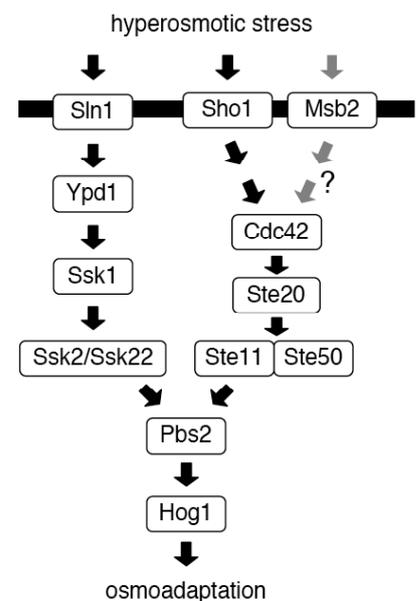
東京大学医科学研究所

概要 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を用いて、高食塩濃度に起因する高浸透圧への耐性を、特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、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、転写因子のリン酸化によって浸透圧適応に必須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。

図に示すように酵母には Sho1 と Sln1 の 2 種の膜蛋白質から活性化シグナルを伝達する独立した上流支経路(SHO1 経路と SLN1 経路)が存在する。SLN1 経路では Sln1 から Ypd1, Ssk1 へと続く「リン酸リレー反応」が高浸透圧に制御され、Ssk1 の Ssk2/Ssk22 MAPKKK への結合を介してそれを活性化すると考えられている。一方、SHO1 経路では、膜蛋白質である Sho1 が経路の最上位に位置しており、活性化シグナルを下流に伝達すると考えられている。G 蛋白質である Cdc42 が活性化され Ste20 と結合することで、Ste20 は活性型になり、Ste11 MAPKKK をリン酸化・活性化する。活性化された Ste11 は Ssk2/22 と同様、Pbs2 MAPKK をリン酸化・活性化する。このように SHO1 経路の活性化の流れはわかってきているものの、高浸透圧に応じて Ste11 のリン酸化、Pbs2 のリン酸化など各活性化反応がどのように起きているのか、その詳細な分子メカニズムについて不明な点が多い。

そこで本研究では特に SHO1 経路における活性化の分子機構に関して解析を行った。その結果、活性化に必須な「キナーゼ(酵素)による下流のキナーゼ(基質)のリン酸化」という反応ステップには、これまでドッキング・サイトを介した酵素と基質との直接の結合が重要であることが我々の研究などからわかっていたが、SHO1 経路では酵素、基質それぞれと結合するアダプター蛋白質同士の結合を介して複合体が形成され、酵素、基質は間接的に結合し、反応の場を提供されるという極めて精巧な活性化メカニズムで活性化が起きることがわかった。

<発表論文> [Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, and Saito H. \(2006\) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.*, **25**: 3033-3044.](#)



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。

助成研究者の属する東京大学医科学研究所の斎藤らは酵母の浸透圧センサーをみいだし、また浸透圧シグナル伝達系に関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]。

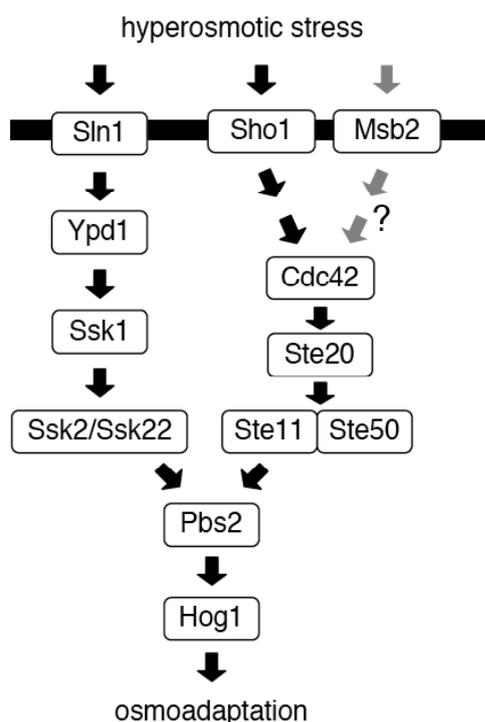


Fig. 1 Schematic diagram of the HOG osmoregulatory pathway and the mating pheromone pathway in the budding yeast.

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須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 Sho1 と Sln1 の 2 種の膜蛋白質から活性化シグナルを伝達する独立した上流支経路が存在する[文献 1, 2]。

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]。Ypd1 蛋白質を介した「リン酸化リレー反応」によって、Ssk1 蛋白質のリン酸化状態を制御し[文献 3]、Ssk1 は Hog1 MAP キナーゼの上流因子である Ssk2/Ssk22 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 Ssk2/22 はドッキング・サイトを介し Pbs2 と結合し、これをリン酸化・活性化する。

一方、SHO1 経路では、膜蛋白質である Sho1 が経路の最上位に位置しており、活性化シグナルを下流に伝達す

ると考えられている[文献 2]。また、Sho1 は下流の Pbs2 MAPK キナーゼと結合することも知られている。さらに G 蛋白質である Cdc42 が活性化され Ste20 と結合することで、Ste20 は活性型になり、Ste11 MAPKKK をリン酸化・活性化する[文献 7]。活性化された Ste11 は Ssk2/22 と同様、Pbs2 MAPKK をリン酸化・活性化する[文献 4]。SHO1 経路を構成する因子は上記のように多数同定されているものの、その活性化機構には不明な点が多い。

- (1) SHO1 経路における高浸透圧センサーが特定できていない。
- (2) Cdc42 活性化に至る活性化のステップが不明である。
- (3) Cdc42 活性化から Ste11 活性化に至る詳しい分子機構が不明である。
- (4) 活性化された Ste11 が Pbs2 を活性化する詳しい分子機構が不明である。

上記、4 点のうち、(3)、(4)に焦点をしばり、その分子機構を解明したので報告する。

2. 研究方法

変異株の作成

酵母の遺伝子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。

HOG 経路活性化の測定

HOG MAPK 経路活性化の定量的測定は、我々が本研究で開発した 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。

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、免疫共沈法により解析した。

その他

用いた酵母変異株、及び変異株スクリーニング法、DNA 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 9, 12 に詳述されている。

3. 結果と考察

3.1 SHO1 経路における Ste11 の活性化機構

3. 1. 1 Ste20 と Cla4 は Ste11 の活性化に重複した機能を有する

Fig. 1 に見られるように、出芽酵母の SHO1 経路では高浸透圧に応じて Cdc42 から Ste20, そして Ste11 へと順次活性化がおこると考えられている。我々は HOG 経路の活性化を定量的に捉えるために、HOG 経路活性化により転写誘導される CRE-lacZ レポーターを開発し、各因子の経路活性化への関与を詳細に調べた。CRE-lacZ レポーターを用いた場合も Hog1 リン酸化を指標に HOG 経路活性化を調べた場合と同様、SHO1, SLN1 経路の下流で共通に働く Pbs2, Hog1 を欠く株、Ssk2/22 Ste11 を同時に欠失させたことで SLN1, SHO1 経路の両経路のシグナルを遮断する株では高浸透圧に応じた HOG 経路活性化が全くおこらなかったが、SLN1 経路 (Ssk2/22 の欠失)あるいは SHO1 経路 (Ste11 の欠失)どちらか一方からのシグナルを遮断した場合には活性化が起こった (Fig. 2A)。興味深いことに、同じ SHO1 経路の構成因子で Ste11 活性化に働く Ste20 を欠失した株 [以下の実験では、SHO1 経路の構成因子の HOG 経路活性化 (=SHO1 経路活性化)を調べるため、いずれの株も Ssk2/22 を欠失して SLN1 経路のシグナルを遮断してある。]では、Ste11 とは異なり弱いながらも活性化は起きた。我々は Ste11 を活性化する因子が Ste20 の他にも存在する可能性を考え、Ste20 に類似した PAK 様キナーゼである Cla4 単独、あるいは Ste20, Cla4 いずれの機能も失った株で活性化への影響を調べた。その結果、Cla4 単独では活性化の低下はごくわずかであるのに対し、

Ste20, Cla4 両者の機能を失った株では SHO1 経路活性化が全く起きなかった (Fig. 2B)。したがって SHO1 経路において Ste20 及び Cla4 は Ste11 を活性化する機能を重複して有していることがわかった。

3. 1. 2 活性化に Ste20, Cla4 を必要としない活性型 Ste11 変異の単離

さらに我々は Ste20, Cla4 によってリン酸化されなくても SHO1 経路を活性化できる Ste11 の活性型変異を複数単離した (Fig. 3A)。Ste11 は Ste20 (Cla4) により N 末の制御領域にリン酸化を受け活性化されるが、活性型変異はこのリン酸化部位の周辺と C 末のキナーゼドメイン内の特定箇所に集中していた (Fig. 3B)。Ste11 は通常、N 末の制御領域が C 末のキナーゼドメインと結合しその活性を抑制しており、リン酸化によりこの結合が解除されて活性化されると考えられる。したがってこれらの活性型変異はリン酸化 Ste11 を模倣した変異であると考えられる。実際、Ste20 及び Cla4 の機能を失った株でも活性型 Ste11 (Ste11-Q/P) を発現すると SHO1 経路の活性化は起こった (Fig. 3D)。

興味深いことに活性型 Ste11 を発現する株においても、高浸透圧刺激がないと SHO1 経路の活性化はおこらず、また活性化には Sho1 及び Ste50 が必要であった (Fig. 3E)。このことは Ste11 が活性化した後 Pbs2 をリン酸化するステップ (Ste11 活性化後ステップ) にも高浸透圧に依存した活性化メカニズムが働いており、Ste50, Sho1 がこのステップに関与していることを示唆する (詳細は 3. 2 の項)。

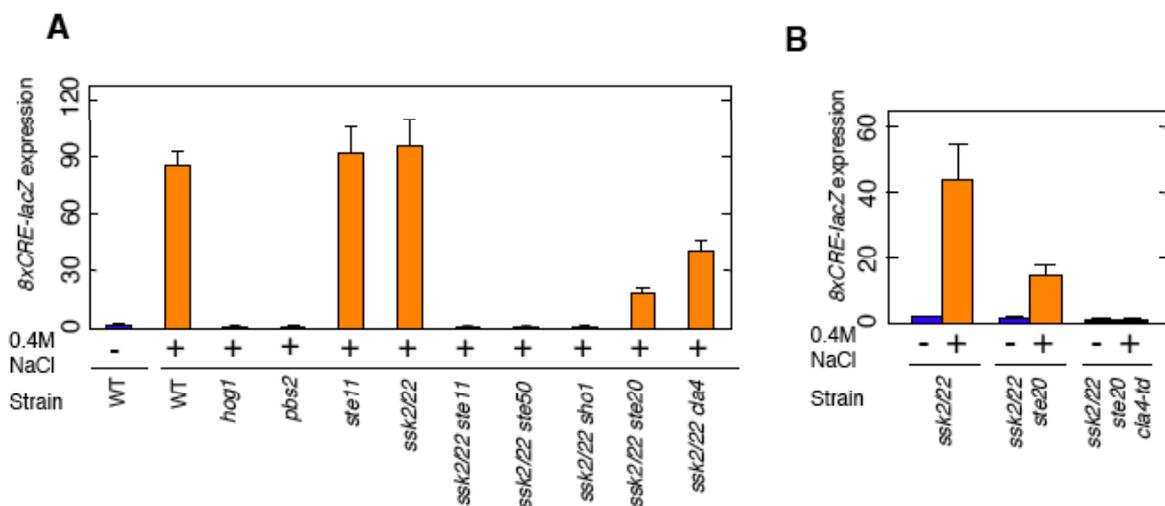


Fig. 2 (A) Osmo-stress induced activation of the HOG pathway in various mutant strains. (B) Ste20 and Cla4 are redundant in the SHO1 branch.

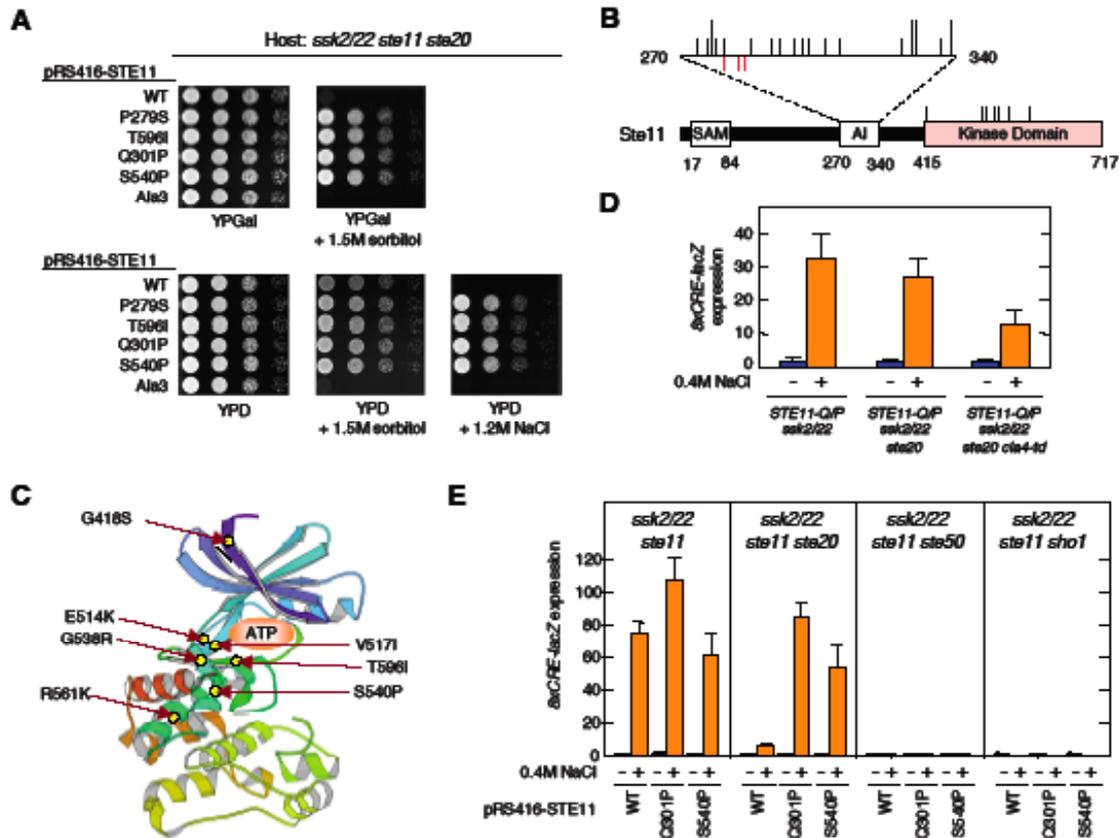


Fig. 3 Characterization of constitutively-active Ste11 mutants.

3. 1. 3 Ste11 活性化には Ste50 と Cdc42 の相互作用が必要である

我々は Cdc42 が SHO1 経路活性化に重要であることを、Cdc42 の活性型を用いて確認した。活性型 Cdc42 の発現により SHO1 経路は活性化し、この活性化には Ste20、Ste50、Sho1 が必要であった (Fig. 4A)。Ste11 MAPKK キナーゼの結合蛋白質である Ste50 は Ste11 との結合に関わる SAMドメインを N 末に、G 蛋白質との結合に関わる RAドメインを C 末に有し、これらは SHO1 経路におけるシグナル伝達に必須である (Fig. 4B)。

最近 Thorner のグループは Ste50 の RA ドメインが Cdc42 と結合することを報告した。我々が新たに単離した SHO1 経路を活性化できない変異株 (mut-153; Fig. 4C) は Ste50 の RA ドメイン内に変異をもっており、Cdc42 との相互作用に欠損がある可能性が考えられた。Cdc42 内に変異型 Ste50 との結合性を回復する変異が入ることでシグナル伝達が回復すると考え、mut-153 変異株の高浸透圧感受性を抑圧するような CDC42 変異スクリーニングを行ったところ、4 残基目のロイシンがプロリンに置換した CDC42

変異が単離された。このことは Cdc42 と Ste50 RAドメインとの相互作用がシグナル伝達に極めて重要であることを示す。Cdc42 は細胞膜上で Ste20 と結合するが、Ste50 と Cdc42 との結合は Ste20 の基質となる Ste11 を Ste11 結合蛋白質である Ste50 を介して細胞膜に移行させ、Ste20 による Ste11 のリン酸化反応の場を提供していることが予想される。実際、Ste50 の RA ドメインをもたない Ste50Δ1 に膜局在シグナル (Cpr) をつけると、高浸透圧刺激に応じて Sho1 経路の活性化がおこり (Fig. 4E)、この考えが支持された。また活性型 Ste11 を発現する株で Cpr 付加により Ste50 を膜局在させると、高浸透圧刺激なしで SHO1 経路は活性化された (Fig. 4F)。このことは Ste11 活性化後ステップでは Ste50 の細胞膜への移行が高浸透圧刺激に応じて起きていることを予想させる。

3. 2 活性化 Ste11 による Pbs2 リン酸化の分子機構

活性化した Ste11 が Pbs2 をリン酸化するステップにも高浸透圧に依存したメカニズムが働いており、Ste50 及び Sho1 が必須であることから、これらの関与について解析を行った。

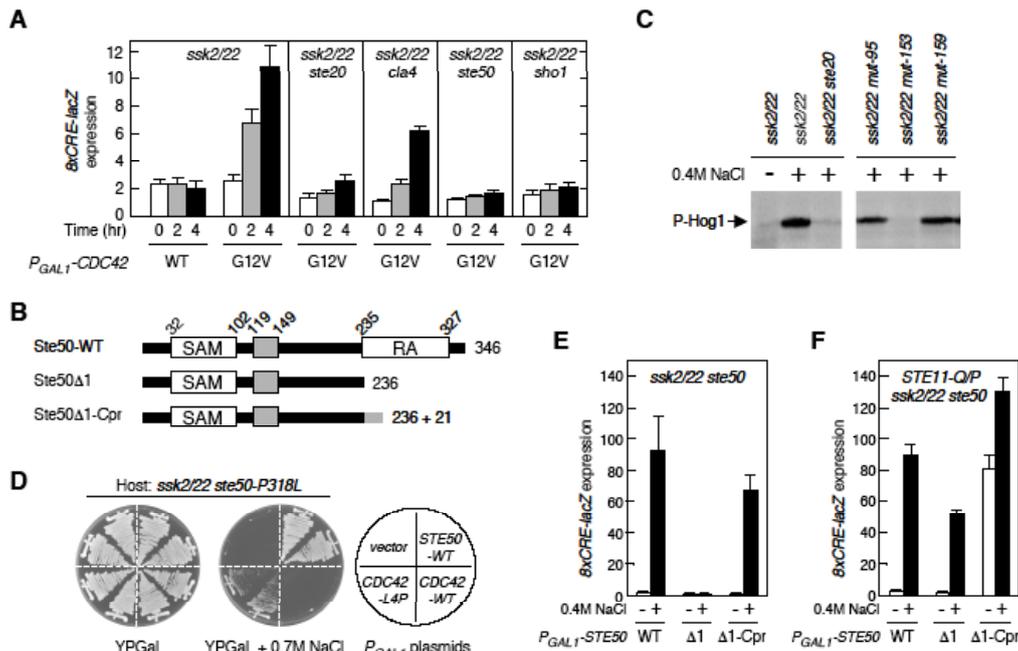


Fig. 4 Interaction between Cdc42 and Ste50.

3. 2. 1 活性型 Ste50 は高浸透圧刺激非依存的に活性型 Ste11 による SHO1 経路活性化を引き起こす

3. 1. 3 でふれたように、Ste50 を膜に移行させておくと、活性化後 Ste11 は高浸透圧刺激無しに SHO1 経路を活性化する。このことは Ste11 活性化後ステップでは、高浸透圧刺激に応じて Ste50 が活性型となり膜に移行して働く可能性が考えられる。そこで我々は細胞膜移行型 Ste50 と同様、活性型 Ste11 (Ste11-Q/P) を発現する細胞において、高浸透圧刺激がなくても SHO1 経路を活性化できる Ste50 変異を単離した。その結果、146 番目のアスパラギン酸 (D) がフェニルアラニン (F) などに置換された Ste50 変異蛋白質 (D/F) は活性型 Ste11 発現株の SHO1 経路活性化を引き起こすことがわかった (Fig. 5A)。RA ドメインをもたない Ste50Δ1 に D/F 変異を導入すると、膜移行シグナルを付加した場合と同様、野生型 Ste11 発現株では高浸透圧刺激に応じて (Fig. 5B,C)、活性型 Ste11 発現株では高浸透圧刺激無しで SHO1 経路が活性化され (Fig. 5C)、活性型 Ste50 は構成的に細胞膜に移行することが示唆された。またこの場合の活性化は依然として膜蛋白質の Sho1 に依存した (Fig. 5D)。

3. 2. 2 活性型 Sho1 は高浸透圧刺激非依存的に活性型 Ste11 による SHO1 経路活性化を引き起こす

細胞膜移行型と考えられる活性型 Ste50 による SHO1 経路活性化に依然として膜蛋白質である Sho1 が必須で

あることから、Sho1 は Ste50 の膜移行に働く可能性が考えられた。そこで Ste50 の場合と同様、活性型 Ste11 (Ste11-Q/P) を発現する細胞において、高浸透圧刺激がなくても SHO1 経路を活性化できる Sho1 変異を単離した。その結果、細胞内領域にある C 末の SH3 ドメイン内の 342 番目のアルギニン (R) がグリシン (G) に、あるいは 346 番目のグリシン (G) がセリン (S) に置換された Sho1 変異蛋白質 (R/G, G/S) は活性型 Ste11 発現株の SHO1 経路活性化を引き起こすことがわかった (Fig. 6A-C)。

3. 2. 3 活性化依存的に誘導される Sho1-Ste50, Sho1-Ste11 の相互作用

活性型 Ste50、Ste11 変異は Ste50/Ste11 複合体を Ste11 活性化後に協調して膜にリクルートする可能性が考えられた。そこで Sho1 と Ste50, Ste11 との結合を野生型、活性型蛋白質について共沈実験により調べた。その結果、Sho1 は野生型の Ste50 とは結合しないのに対し、活性型の Ste50-D/F とは結合した。同様に野生型、活性型の Sho1 と Ste50 との結合性を調べたところ、活性型 Sho1 と Ste50 との結合が観察された。さらに、活性型の Sho1 は Ste11 の N 末領域とも結合した。以上の結果から、高浸透圧に応じて Ste11 が活性化すると、さらに高浸透圧依存的に Ste50/Ste11 複合体と Sho1 との結合が誘導され、結果として、Sho1 との結合が知られている Pbs2 を Ste11 がリン酸化できると考えられる。

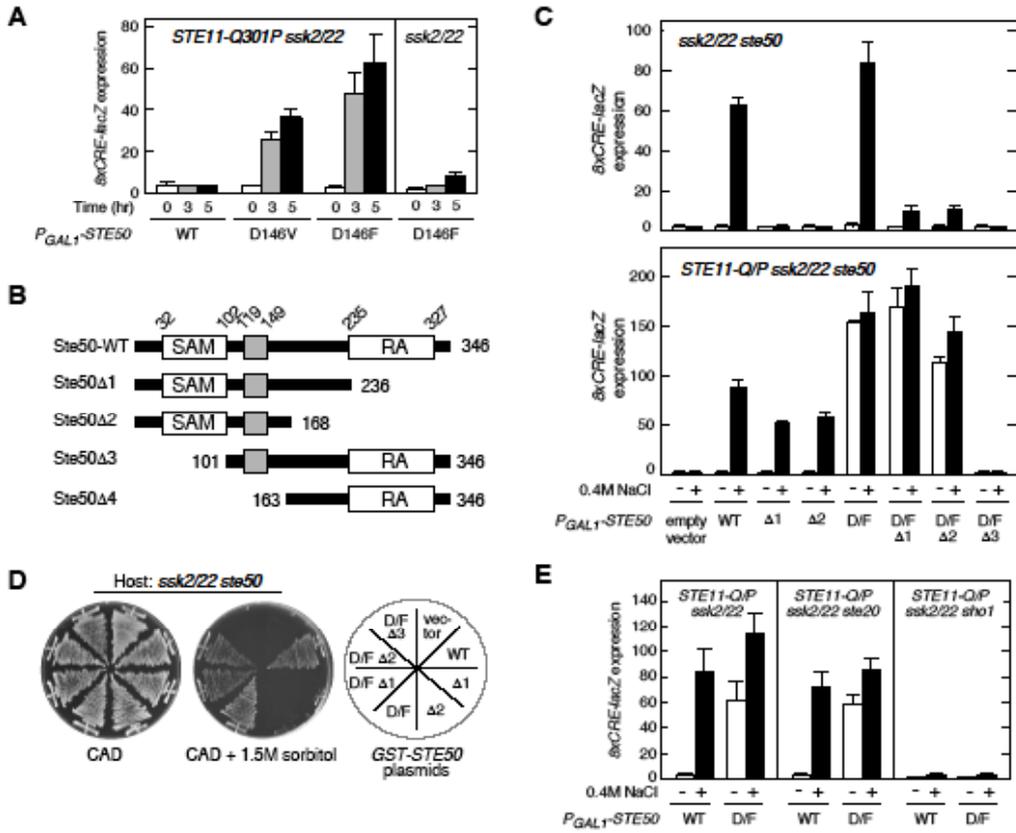


Fig. 5 Constitutively-active Ste50 mutants

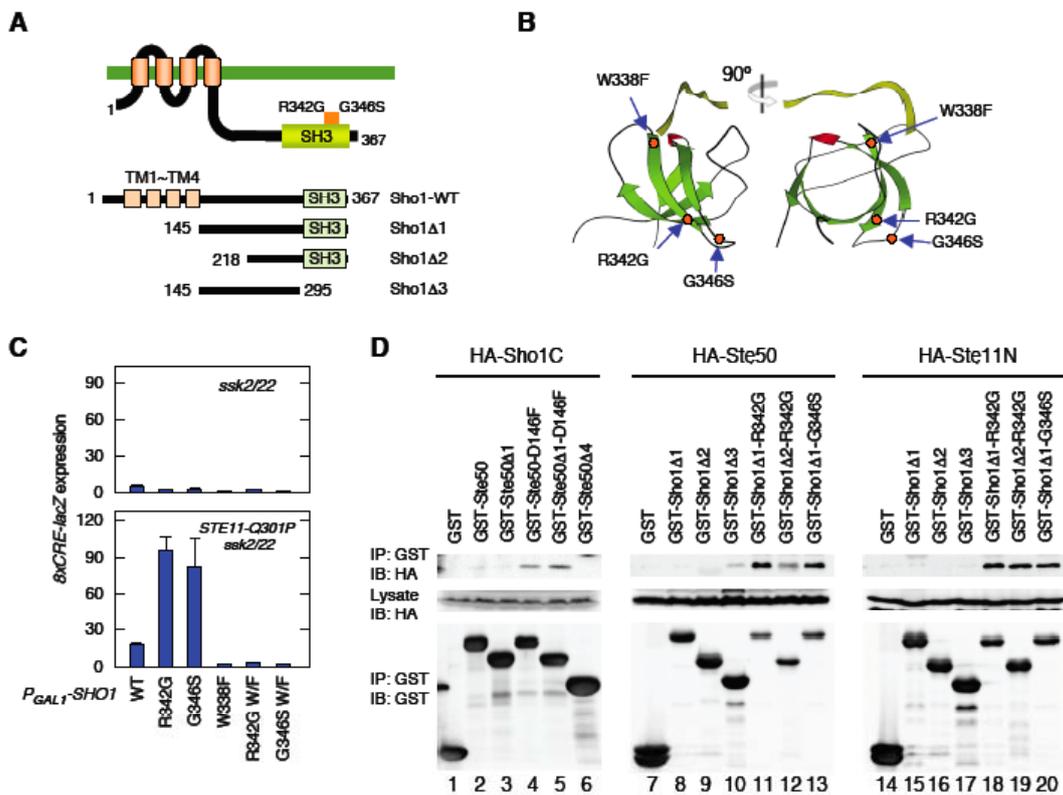


Fig. 6 (A)-(C) Constitutively-active Sho1 mutants. (D) Interaction between Sho1 and Ste50 or Ste11.

3. 3 Cdc42, Sho1, Ste50 のアダプター機能を介した連続的な複合体形成は高浸透圧刺激による SHO1 経路活性化反応の場を提供する

以上より、SHO1 経路において Cdc42, Sho1, Ste50 は高浸透圧に応じて複数の構成因子と結合するアダプター機能によって、キナーゼとその基質(Ste20 と Ste11, Ste11 と Pbs2)を膜にリクルートし、反応の場を提供することが考えられた。この一連の活性化機構に関するモデルを Fig. 7 に示す。

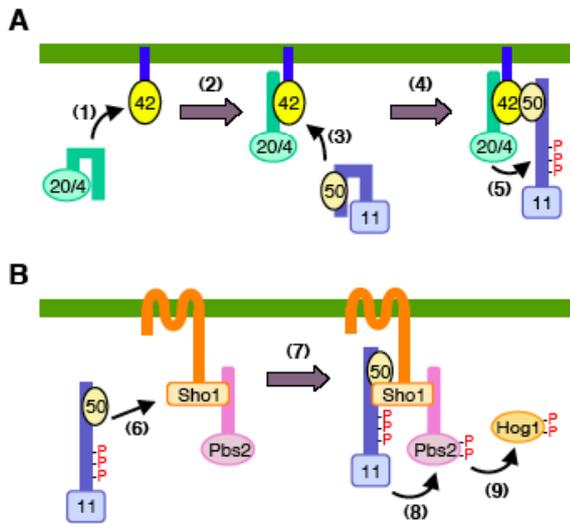


Fig 7. Schematic model of the sequential docking interactions in the SHO1 pathway. (A) Activation of Ste11 by Ste20 is mediated by indirect docking via Ste50 and Cdc42. (B) Activation of Pbs2 by Ste11 mediated by indirect docking via Ste50 and Sho1.

4. 今後の課題

本研究では、我々は酵母の高浸透圧応答 MAPK 経路である HOG 経路の活性化メカニズムについて、特に不明の点が多い SHO1 経路に焦点をしばって解析を行った。その結果、活性化経路の中核をなすリン酸化ステップは、キナーゼとその基質に加え、両者と結合し共通の反応の場にリクルートするアダプター蛋白質が必須な働きをすることを明らかにした。MAP キナーゼ経路におけるリン酸化反応には、キナーゼと基質の間のドッキング・サイトによる直接の結合が必須であることを我々は報告していたが[文献 9, 11]、これに加えてアダプター因子がキナーゼ、基質それぞれと結合することで、間接的に両者の結合及び反応を媒介するという極めて精巧な活性化メカニズムを明らかにした。上述のように SHO1 経路には「高浸透圧感知はいかにおこるか?」という大きな問題が解決されていない。

今後、高浸透圧センサーとして働く因子の同定を行い、高浸透圧感知の分子機構解明を目指していきたい。

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。

なお、本研究は、*EMBO J* 誌 (2006) 25: 3033-3044. に発表いたしました(別刷送付済)。

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 MAPKKs 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 β 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) 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.

- 9) Tatebayashi K, Takekawa M, and Saito H. (2003) A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.*, 22: 3624-3634.
- 10) Saito H, and Tatebayashi K. (2004) Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* 136: 267-272.
- 11) 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.
- 12) Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, and Saito H. (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.*, 25: 3033-3044.

No. 0626

Molecular Mechanism of Salt- and Osmo-Tolerance in Yeast (II)

Kazuo Tatebayashi, Katsuyoshi Yamamoto, Keiichiro Tanaka, Taichiro Tomida,
Takashi Maruoka, Eri Kasukawa, and Haruo Saito

Division of Molecular Cell Signaling,
Institute of Medical Science, the 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 yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway can be activated by either of two upstream pathways, termed the SHO1 or SLN1 branches. When stimulated by high osmolarity, the SHO1 branch activates an MAP kinase module composed of the Ste11 MAPKKK, the Pbs2 MAPKK and the Hog1 MAPK.

To investigate how osmostress activates this MAPK module, we isolated and characterized constitutively activated alleles in three key genes involved in the pathway, namely *STE11*, *STE50*, and *SHO1*. We found that Cdc42 not only activates the upstream kinases in the HOG pathway, Ste20 and Cla4, but also binds to Ste11-bound Ste50, thereby bringing activated Ste20/Cla4 and their substrate Ste11 together. Subsequently, activated Ste11 and its HOG pathway-specific substrate, Pbs2 MAPKK, are brought together by binding of the Ste50-Ste11 complex to the cytoplasmic domain of Sho1, to which Pbs2 is also bound. Thus, both Sho1 and Ste50 act as adaptive docking proteins that restrict the flow of the osmostress signal from Ste20/Cla4 to Pbs2, via Ste11.