

耐塩性・耐浸透圧性に関わる酵母の高浸透圧感知機構の解明

舘林 和夫, 齋藤 春雄

東京大学医科学研究所

概要 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。したがって耐塩性を考える場合、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、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獲得に関わるシグナル伝達経路について、高浸透圧を感知する分子機構に焦点をあてて解析した。

出芽酵母には高浸透圧環境に適応するため、Hog1 MAP キナーゼ経路 (HOG 経路) が存在し、これは真核生物で広く保存されているストレス応答 MAPK 経路の原型と考えられている。細胞が一定濃度以上の NaCl にさらされると、酵母はその浸透圧を感受し HOG 経路を活性化し、活性化した Hog1 MAP キナーゼは転写因子など様々な基質のリン酸化を通じて高浸透圧適応に働く。したがって、HOG 経路が欠損した酵母は高濃度 NaCl 存在下での生育が不可能である。経路の活性化には細胞が高浸透圧を感知することが必須であり、ここには高浸透圧センサーの Hkr1 や Msb2 が 4 回膜貫通蛋白質の Sho1 と協同して働くことが知られているが、その分子機構については不明の点が多かった。そこで本研究では、酵母の高浸透圧感知に中心的な役割を果たす Sho1 について、その多量体化と経路活性化への関与、多量体の詳細な構造を解析し、高浸透圧感知の分子メカニズムの理解を目指した。

共沈実験などから、Sho1 は自身の膜貫通領域を介して多量体を形成していることがわかった。4つの膜貫通(TM)領域をもつ Sho1 の多量体構造を明らかにするため、Sho1 の TM 内に Cys 置換変異を系統的に導入し、化学的クロスリンカーを用いてクロスリンク実験を行った。2つの TM 領域が相互作用する場合、インターフェイスにあるアミノ酸は互いに近接しておりクロスリンカーにより共有結合されるため、TM 領域同士の相互作用の有無、距離の遠近を知ることができる。Sho1 の TM 領域内に導入した約 50 個の Cys 置換変異のうち、同一の Cys 同士の間でクロスリンク(ホモのクロスリンク)できる部位が、4つの TM 全てで計 13 個見つかった。さらにホモのクロスリンクが可能な Cys 変異を一分子中に二つ導入すると、TM2 と 3 の二重 Cys 変異では Sho1 のホモ三量体が形成された。一方 TM1 と 4 の二重 Cys 変異のクロスリンクでは二量体までしか形成されず、TM1 と 2、1 と 3、2 と 4 の二重 Cys 変異では少なくとも七量体までの多量体が検出された。こうしたデータから、Sho1 は TM2/3 をインターフェイスとした三分子間結合、TM1/4 を別のインターフェイスとした二分子間を介して多量体化し、この結合の繰り返しにより細胞膜上にユニークな二次元多量体構造を形成していると考えられた。

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)を用

いて、高食塩濃度に起因する高浸透圧への耐性獲得に関わるシグナル伝達経路の活性化メカニズム、特に高浸透圧を感知する分子機構について解析した。

出芽酵母には高浸透圧環境に適応するため、Hog1 MAP キナーゼ経路 (HOG 経路) が存在し、これは真核生物で広く保存されているストレス応答 MAPK 経路の原型と考えられている。細胞が一定濃度以上の NaCl にさらされ

ると、酵母はその浸透圧を感受し HOG 経路を活性化し、活性化した Hog1 MAP キナーゼは細胞核に輸送され、リン酸化を介した高浸透圧応答遺伝子群の転写誘導、細胞周期や翻訳の制御などを通じて高浸透適応を可能にする。したがって、HOG 経路が欠損した酵母は高濃度 NaCl 存在下での生育が不可能である。

HOG 経路では細胞外の高浸透圧環境を細胞膜上の高浸透圧センサーが感知し、細胞内に活性化シグナルを伝達する。このシグナルは2つの上流支経路 (SHO1、SLN1 支経路) を通じ下流に伝達され、それぞれの MAPKK キナーゼ (Ste11、Ssk2/22)、共通の Pbs2 MAPK キナーゼ、Hog1 MAP キナーゼが順次リン酸化されることで活性化され、細胞の高浸透圧適応を可能にする (図 1; 矢印はシグナルの流れ、点線は結合を表す。SLN 経路は省略 (文献 1, 2))。

高浸透圧センサーとして、SLN1 経路ではヒスチジンキナーゼ活性をもつ膜蛋白質の Sln1 が働くことが知られていた。一方、SHO1 経路では4回膜貫通蛋白質の Sho1 が経路の上位で働くことが知られていたが、何が高浸透圧をセンスするのかは長い間不明であった。我々は遺伝学的スクリーニングを通して、2種のムチン様膜タンパク質 (Hkr1 と Msb2) が SHO1 経路の高浸透圧センサーとして Sho1 と協同して高浸透圧感知に働くことを見いだした (文献 4)。図 1 で示すように、SHO1 支経路では Pbs2 MAPKK と Sho1 との複合体、Ste11 MAPKKK と Opy2、Ste50 との三者複合体、Ste20 キナーゼと Cdc42 の複合体が細胞膜近傍で形成され (文献 3, 5)、さらに複合体同士の相互作用が誘導され、順次リン酸化反応が進む (Ste20→Ste11→Pbs2) と考えられる。この複合体間の動的な相互作用を誘導する引き金として、高浸透圧刺激を感知する細胞膜上の高浸透圧センサーや共センサーの Sho1、膜蛋白質の Opy2 の関与が考えられる。Sho1 は自身で多量体化することが知られており、また Pbs2 だけでなく高浸透圧センサーの Hkr1/Msb2 や膜蛋白質 Opy2 とも結合する (文献 4、山本、舘林、斎藤、未発表データ)。従って Sho1 の多量体構造が、高浸透圧に応じて膜蛋白質同士の相互作用が誘導されるプラットフォームとして機能している可能性がある。そこで、本研究では Sho1 蛋白質の多量体化に焦点を当て、経路活性化への関与を調べるとともにその詳細な構造解析を行った。

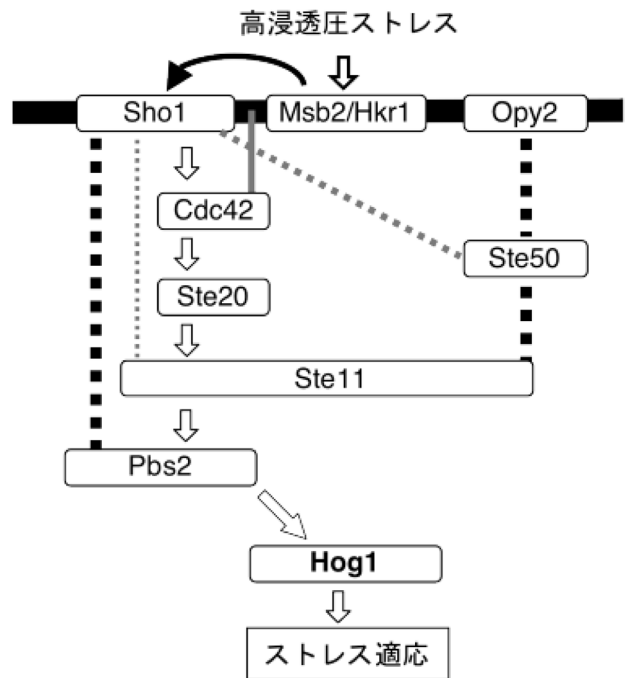


図 1. HOG 経路の概略図

2. 研究方法

研究全般にわたって、分子生物学的手法、分子遺伝学的手法、生化学的手法を駆使して研究を行った。

2. 1 Sho1 変異遺伝子の作成

本研究では、Sho1 の膜貫通領域内に数々の変異を導入したが、変異遺伝子はオリゴ DNA を用いた PCR 法により作成した。変異は全てシーケンシングにより確認した。

2. 2 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。

2. 3 Sho1 蛋白質の多量体化の生化学的解析

2. 3. 1 共沈実験

Sho1 の二量体形成については、HA、GST タグをつけた Sho1 の各種コンストラクトを酵母細胞内で共発現し、その細胞抽出液を調製した。グルタチオンセファロースビーズを用いて、各種の GST-Sho1 を回収し、これを SDS-PAGE、ウェスタンブロットすることで結合し共沈する HA-Sho1 を検出した。

2. 3. 2 化学クロスリンク実験

3. 2. 1で示すように、TM 領域に Cys 変異を導入した Sho1 について、クロスリンク距離の異なる、*o*-PDM、*p*-PDM、BMH の三種で化学クロスリンクを行った。各種 Sho1 を発現する細胞の懸濁液にグラスビーズを添加しボルテックスで破碎後、細胞壁を含む細胞破砕片を低速遠心で除去した。これを 13,000g 10 分遠心し、得られた沈殿を膜フラクションとして TE バッファーに懸濁した。この膜フラクションに各クロスリンカーを 0.2 mM 加え室温 20 分インキュベートした後、SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行った。

3. 結果

3. 1 膜貫通領域を介した Sho1 の多量体化と SHO1 経路活性化における機能

3. 1. 1 Sho1 の膜貫通領域は Sho1 二量体化に必要な

Sho1 は N 末に膜貫通領域を四つ (TM1-4) もち、C 末の細胞質領域内に Pbs2 と結合する SH3 ドメインをもつ膜蛋白質である (図 2A)。Sho1 は多量体を形成することが知られている。Sho1 に HA、GST の異なるタグをつけた共沈実験用のコンストラクトを作製し、Sho1 同士が結合することを確かめた。さらに膜貫通領域や Pbs2 と結合する SH3 ドメインなどを欠いた Sho1 の欠失変異を複数作製し、その二量体形成能を調べた (図 2B, C)。その結果、Sho1 二量体化には、膜貫通領域が必要で、SH3 ドメインを必要としな

いことがわかった。

3. 1. 2 Sho1 膜貫通領域の系統的変異導入と SHO1 経路活性化への影響

多量体化に必要な Sho1 膜貫通領域に系統的変異を導入し、SHO1 経路活性化や多量体化への影響を検討した。TM 内のアミノ酸残基について、側鎖が比較的小さい Gly、Ala、Ser などについては側鎖の大きい Leu に、側鎖の大きい Ile、Leu、Phe などについては Ala に置換した変異型 Sho1 を系統的に作製した。この変異型 Sho1 を SHO1 欠失細胞に導入し、高浸透圧に依存した SHO1 経路活性化への影響を、HOG 経路の活性化特異的に発現が誘導される 8xCRE-lacZ レポーターを使い定量した。その結果、TM1、2、3 内にそれぞれ2つ、TM4 内に6つの変異が SHO1 経路活性化を抑制することがわかった。

3. 1. 3 Sho1 多量体形成と SHO1 経路活性化

SHO1 経路活性化を抑制する TM 内の変異が Sho1 多量体化に及ぼす影響を共沈実験により解析した (一部を図 3 に示す)。TM 変異の導入により Sho1 多量体形成能が大きく低下するものが多数存在し、Sho1 の膜貫通領域を介した多量体形成が経路活性化に重要であることが示唆された。

3. 2 Sho1 蛋白質の多量体構造の解析

3. 2. 1 化学クロスリンクを用いた Sho1 多量体構造の解析法

Sho1 は Opy2 や高浸透圧センサーの Hkr1、Msb2 といった膜蛋白質とその膜貫通領域を介して相互作用し、高

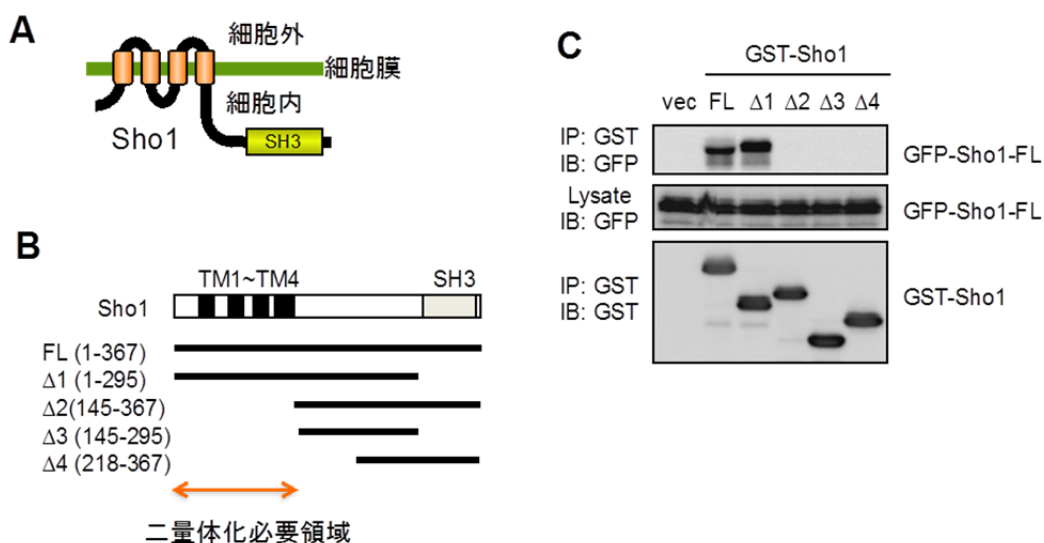


図 2. Sho1 の膜貫通領域は二量体形成に必要なである

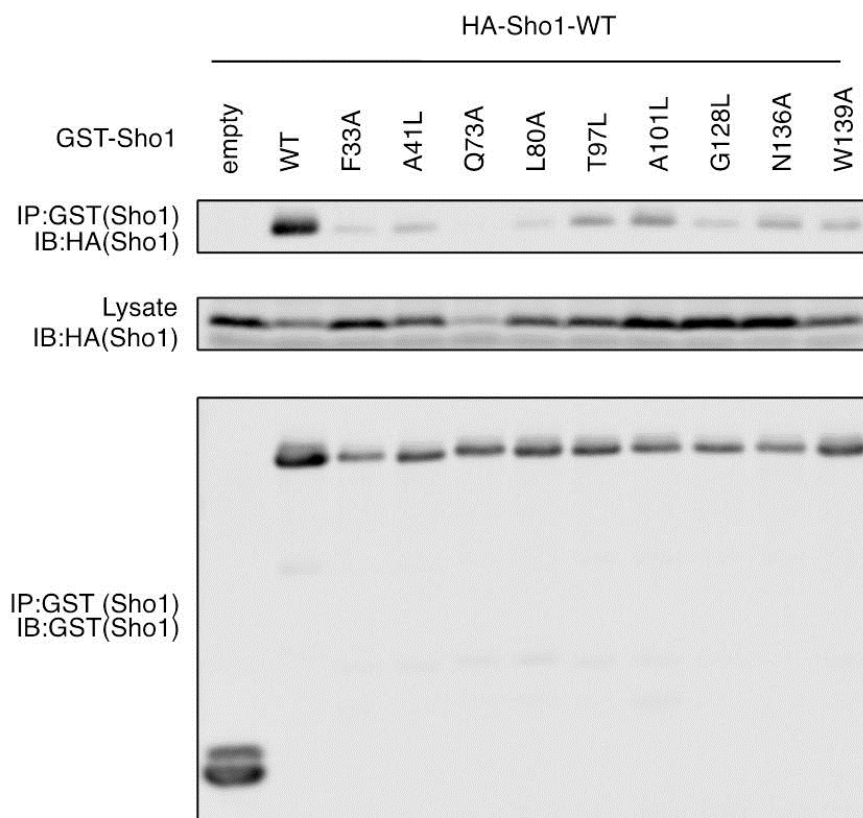


図3. SHO1 経路活性化に欠損のある Sho1 TM 変異体 (GST-Sho1) の野生型 SHO1 (HA-SHO1) に対する結合性の検討 (共沈実験)

浸透圧感知のプラットフォームとして働くと考えられる。膜貫通領域を介した Sho1 の多量体構造が高浸透圧感知機構に重要であると考え、その詳細な構造解析を行った。

TM 領域を介した Sho1 多量体の構造を解明するためには、4 本ある TM 領域の相互の位置関係や距離情報を得る必要がある。TM 領域同士の相互作用の有無、距離の遠近を知る手段として、相互作用する TM 領域同士を化学的クロスリンカーで共有結合させる解析法を用いた。2 つの TM 領域が相互作用する場合、インターフェイスにあるアミノ酸は互いに近接している。TM 領域に系統的に Cys 変異を導入した場合、近接した Cys 残基同士を化学的クロスリンカー処理により共有結合することができる。すなわち共有結合の有無によって、TM 間の遠近を知ることができる。クロスリンクにより共有結合した Sho1 は SDS-PAGE で分子量の違いから容易に検出できる。クロスリンクには o-PDM、p-PDM、BMH というクロスリンク距離の異なる 3 種のクロスリンカー (順に 6 Å、10 Å、5-16 Å) を使用した (図 4)。

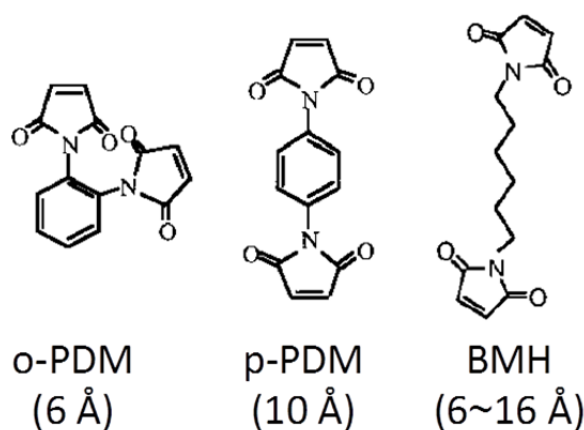


図 4. 使用した化学クロスリンカーとクロスリンク距離

3. 2. 2 クロスリンク法による Sho1 の TM 領域間結合の検出 (ホモ・クロスリンク)

Sho1 TM 領域の位置関係をクロスリンク法により明らかにするため、Sho1 の 4 つの TM 領域内に Cys 置換変異を導入した。Sho1 は C78、C85 の 2 つの Cys 残基を TM2 内に持つため、まず HA タグのついた Sho1 (HA-Sho1) 内の

Cys 残基を Ser に置換した。この変異 (C78S C85S) は Sho1 の高浸透圧に依存した SHO1 経路活性化の機能に影響がないことを、上記のレポーターアッセイにより確認した。この Cys を持たない HA-Sho1 の各 TM 内に Cys を導入したコンストラクトを約 50 個作製した。各 Sho1 Cys 変異蛋白質を発現させた細胞から細胞膜画分を回収し、BMH によるクロスリンク処理を行った。同一の Cys 同士の間でクロスリンク (ホモのクロスリンク) がおきて、Sho1 のダイマーが検出された部位が、4つの TM 領域から計 13 個見つかった。図 5 に例を示す。これらについて、クロスリンク距離の異なるクロスリンカーを用いて同様のクロスリンク実験を行ったところ、いずれのクロスリンカーでも同程度のクロスリンク効率を示すものに加え、クロスリンク距離が短い *o*-PDM を使った方が *p*-PDM より強いクロスリンクが起きるもの (I94C)、逆に *o*-PDM ではクロスリンクされないもの (T66C) などが存在し、各アミノ酸の相対的な距離の長短が推測できた。

3. 2. 3 クロスリンク法による Sho1 の TM 領域間結合の検出 (ダブルクロスリンク)

次にホモのクロスリンクが可能な Cys 変異を一分子中に 2つ導入したコンストラクトを作製し、ダブルクロスリンク実験を行った (図 6)。TM2 の T66C と TM3 の I94C や T112C をもつ二重 Cys 変異体 T66C I94C、T66C T112C を BMH によりクロスリンクすると、驚いたことに Sho1 の三量体が形成された。TM3 内の異なる位置の Cys 置換を組み合わせさせた I94C T112C においても同様の結果がえられた。このことは、Sho1 が TM2 と TM3 における 3 回対称の結合面を有していることを示している。

一方、TM1 の G50C と TM4 の A124C を組み合わせた G50C A124C では、クロスリンクなしで二量体を形成し、BMH クロスリンク処理でもそれ以上の多量体にはならなかった。2-メルカプトエタノールによる還元処理でこの二量体は減少したことから (図は省略)、クロスリンクなしで生じた二量体は G50C、A124C の間でのジスルフィド結合を介

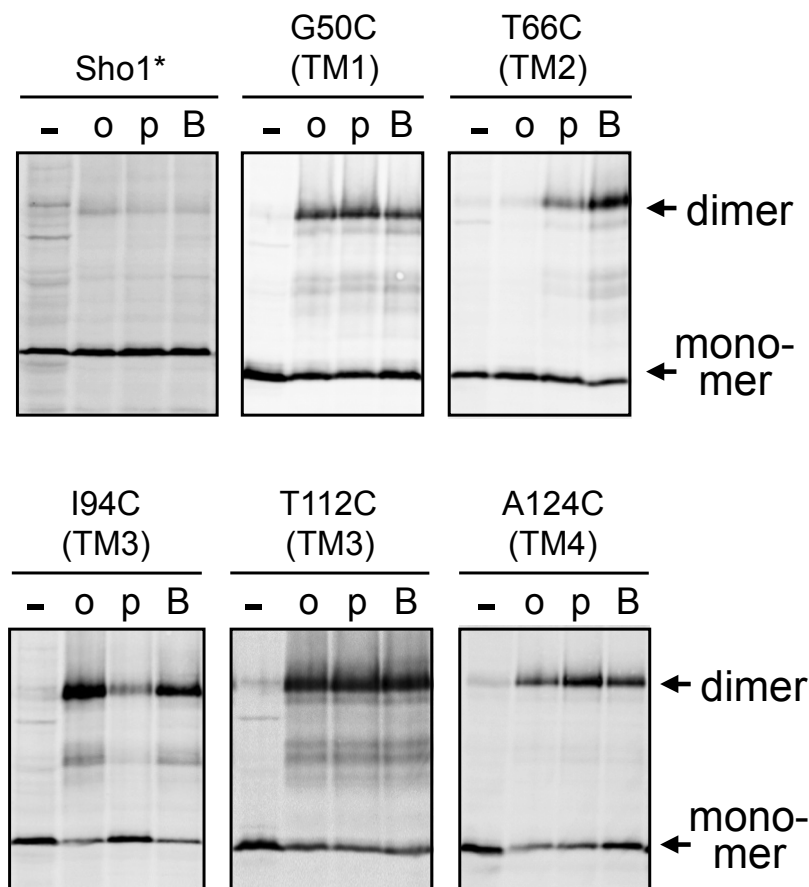


図 5. Sho1 の各 TM 内に導入した Cys におけるホモの化学クロスリンク実験

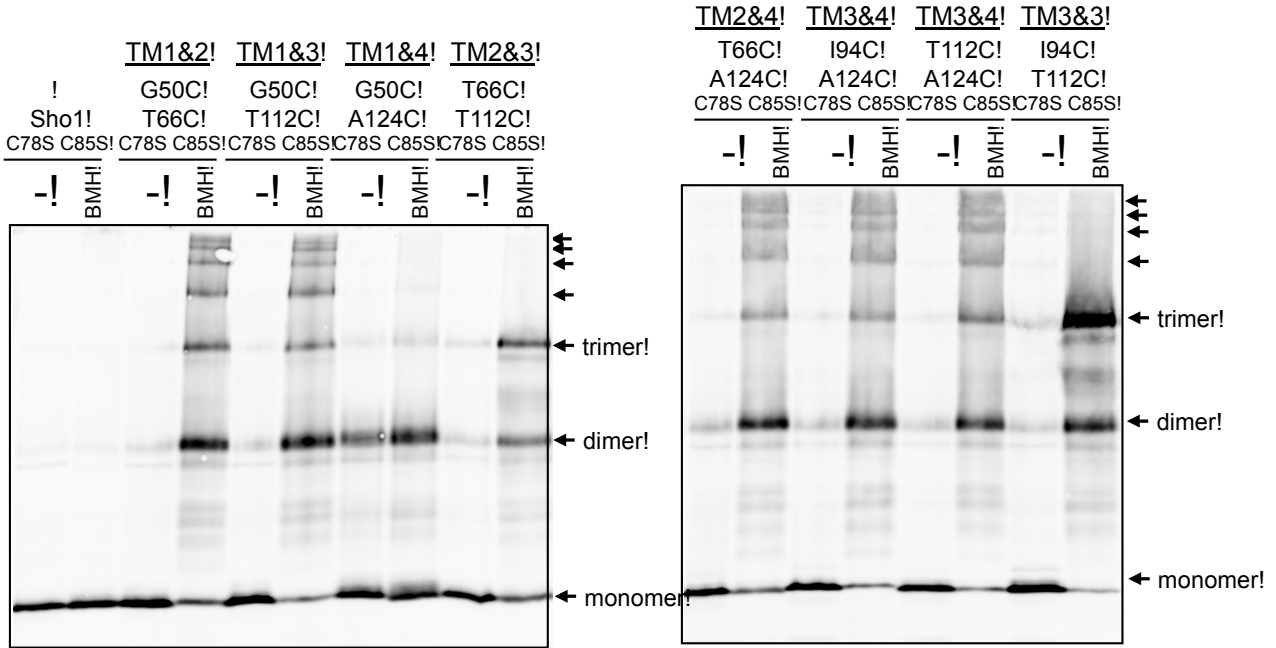


図 6. Sho1 の各 TM 内に導入した二重 Cys におけるダブルクロスリンク実験

して形成されており、TM1 と TM4 は G50 と A124 を含む結合面で相互作用していると考えられる。一方、TM1 と 2 (G50C T66C)、TM1 と 3 (G50C T112C)、TM3 と 4 (T112C A124C) の二重 Cys 変異の組み合わせでは、BMH 処理により Sho1 が少なくとも七量体を形成することが観察された。

4. 考察と今後の展望

本研究では高食塩濃度などに起因する高浸透圧環境への適応に必須な細胞の高浸透圧感知のメカニズムを明らかにするため、細胞膜に局在し高浸透圧センサーと協同して高浸透圧感知に働く 4 回膜貫通蛋白質の Sho1 の構造と機能に関して解析を行った。その結果、Sho1 が膜貫通 (TM) 領域を介して多量体を形成し、これが高浸透圧に依存した適応経路の活性化に重要な働きをもつことがわかった。

膜蛋白質同士の結合や多量体の形成は、多くのシグナル伝達経路の活性化に必要な過程であり、近年特に TM 領域を介した相互作用の重要性が認識されている。しかし、結晶構造解析の困難さなどから、膜蛋白質の TM 領域間の相互作用に関する立体構造上の理解は立ち後れていた。本研究では、困難の伴う Sho1 膜蛋白質の多量体

構造を解明するための手法として化学クロスリンク法を駆使し、Sho1 は TM2/3 をインターフェイスとした三分子間結合、TM1/4 を別のインターフェイスとした二分子間結合を形成することを明らかにした。この2種類のインターフェイスでの結合が繰り返されることで、Sho1 は細胞膜上に二次元に広がるユニークな編目構造を形成することが考えられる (図 7)。上述のように、酵母の高浸透圧感知と適応経路の活性化には、Sho1 をはじめ、Opy2 や高浸透圧センサーの Hkr1/Msb2 といった膜蛋白質の間で高浸透圧に依存して相互作用が誘導されることが必要だと考えられる。細胞膜に二次元に広がった Sho1 の多量体構造がプラットフォームになり、高浸透圧による細胞膜の変化や膜蛋白質の構造変化に伴い、複数の膜蛋白質間相互作用が誘導されることが予想される。平成24年度も引き続きソルト・サイエンス研究財団より研究の助成をいただけることになり、本研究で得た新知見を発展させ、高浸透圧感知のプラットフォームとなりうる Sho1 の多量体構造の詳細な解析と、Sho1 多量体と Hkr1、Msb2 や Opy2 といった他の膜蛋白質との高浸透圧に依存した動的な相互作用について解析を進め、高浸透圧感知の分子機構の一層の理解に努めたい。

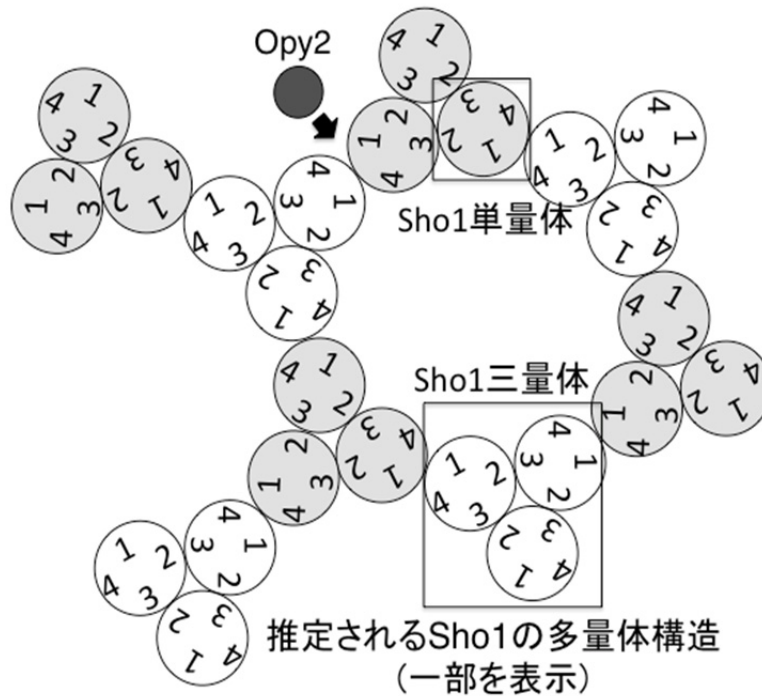


図 7. Sho1 多量体化によって形成されると推測される二次元網目構造

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) 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.
- 2) Saito H, and Tatebayashi K. (2004) Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* **136**: 267-272.
- 3) 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.

- 4) Tatebayashi K, Tanaka K, Yang HY, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M. and Saito H. (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* **26**: 3521-3533.
- 5) Yamamoto K, Tatebayashi K, Tanaka K, and Saito H. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol. Cell.* **40**: 87-98. (2010)

Analysis of an Osmo-Sensing System That is Involved in Salt- and Osmo-Tolerance in Yeast

Kazuo Tatebayashi, 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 HOG pathway can be activated by either of two upstream pathways, termed the SHO1 or SLN1 branches. However, the osmosensing mechanism in the SHO1 branch has not been clearly defined.

In this study, we showed that Sho1 formed a homomultimer via its transmembrane regions. Sho1 is a tetra-membrane-spanning protein to play a crucial role in osmosensing in concert with osmosensors Hkr1/Msb2. Intermolecular thiol cross-linking experiments revealed that Sho1 molecules were associated at two distinct interphases of TM1/4 and TM2/3 to form a homomultimer. Three Sho1 molecules bound at the TM2/3 interphase, while two bind at the TM1/4 one. These interactions of Sho1 result in formation of a lateral polymer structure on the plasma membrane, in which other membrane proteins such as Hkr1, Msb2 and Opy2 may interact and coordinately work with Sho1 for osmosensing.