

耐塩性・耐浸透圧性に関わる膜蛋白質を介した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。我々は昨年度の助成研究で酵母の高浸透圧感知に中心的な役割を果たす Sho1 がユニークな多量体を形成することを明らかにした。そこで今年度の助成研究ではその多量体構造をさらに詳細に解析するとともに、多量体構造形成がシグナル伝達において果たす機能を調べた。

Sho1 は TM2/3 面で三量体を、TM1/4 面で二量体を形成することを示唆する知見を昨年度の助成研究で得たが、今年度はマレイミド基を3つもつクロスリンカー TMEA を使ったクロスリンク実験によりこうした多量体構造を Sho1 が形成することを示した。また、Sho1 の TM 内に系統的に導入した Cys 変異のうち、S-S 結合をつくる組み合わせを複数みつけた。S-S 結合は Cys 残基同士が極めて近傍にあると形成されるため、これらのアミノ酸は TM2/3 及び TM1/4 のインターフェイスを構成すると考えられた。

さらに Sho1 の多量体形成がシグナル伝達にどのような機能をもつかを調べるため、多量体形成が阻害される TM 内変異を探索した。その結果、Sho1 の TM2/3 面での三量体形成が阻害される変異 (WW 変異) の単離に成功し、Hkr1/Msb2 の活性化型変異による SHO1 経路の活性化は Sho1 WW 変異により抑制されることがわかった。したがって、Sho1 三量体形成は SHO1 経路の活性化シグナルの伝達に必要なことが明らかになった。

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圧適応を可能にする。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。SLN1 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。平成 23 年度の助成研究により 4 回膜貫通タンパク質の Sho1 はその膜貫通領域 (以降 TM) の 2 と 3 で三量体を形成し、さらに TM1 と 4 で二量体を

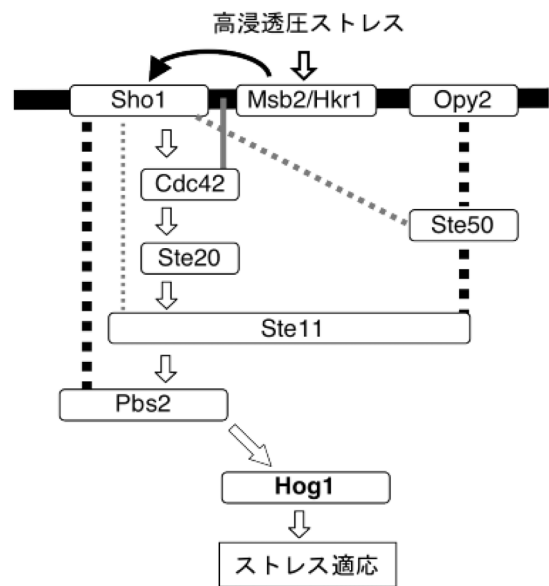


図 1. HOG 経路の概略図

形成することが示唆された。そこで、本研究では Sho1 多量体構造の詳細を明らかにするとともに、多量体形成のシグナル伝達における機能を変異体解析などから明らかにした。

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 化学クロスリンク実験

TM 領域に Cys 変異を導入した Sho1 について、マレイミド基を分子内に 2 つ有する o-PDM、p-PDM、BMH、3 つのマレイミド基を有する TMEA を用いて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。

2. 3. 2 S-S 結合検出実験

上記クロスリンク実験はクロスリンカーを用いて、近接した Cys 残基をクロスリンクするものだが、極めて近傍に位置する Cys 同士は酸化により S-S 結合を形成する。クロスリンク実験と同様に膜フラクションを回収し、還元剤を含まない条件で SDS-PAGE、ウェスタンブロットを行い、S-S 結合産物を検出した。

3. 結果

3. 1 Sho1 多量体構造の詳細な解析

3. 1. 1 Sho1 の TM1/4 面を介した二量体、TM2/3 面を介した三量体形成

平成23年度の助成研究で、Sho1 の TM 内に系統的に導入した Cys 変異の間でのクロスリンカーによる化学的クロスリンク実験により、Sho1 は TM2/3 面で三量体を、TM1/4 面で二量体を形成することが示唆された。上述のクロスリンク実験は マレイミド基を2つもつクロスリンカーを使っての実験であり、特に TM2/3 面での三量体形成を検出するためには TM2、3 内に少なくとも2つの Cys を導入しないと検出できなかった。そこで、マレイミド基を3つもつクロスリンカー TMEA を用いて、TM1-4 のいずれかにクロスリンク可能な Cys 残基を1つだけもつ Sho1 変異体に対してクロスリンク実験を行ったところ、TM1 と 4 については二量体が検出されたのに対し、TM2、3 については三量体が検出され、TM1/4 面での二量体形成、TM2/3 面での三量体形成が裏付けられた(図2)。

3. 1. 2 TM1/4、TM2/3 の結合インターフェイス

Sho1 TM 内に系統的に導入した Cys のうち、S-S 結合を形成し、非還元状態で SDS-PAGE で二量体などとして検出されるものを複数見いだした。TM1/4 の結合面においては、TM4 内の A123C(123 番目の Ala が Cys に置換されたもの)同士での S-S 結合、G50C(TM1)と A124C(TM4)の間での S-S 結合による二量体が非還元状態で

行った SDS-PAGE で観察された。また、TM2/3 面については S66C(TM2)と T112C(TM3)の二重変異を使用すると S-S 結合により三量体が、TM3 の V105C 同士の間では二量体が検出された。これら検出された多量体は、還元処理により減少し、酸化処理をすると増加することから、S-S 結合によるものであることが確認できた(図3にこれらの例をあげた)。Sho1 の TM 内の Cys 残基間で S-S 結合が形成されるためには、両者が極めて近傍に位置する必要があり、これらのアミノ酸が TM1/4 や TM2/3 での結合面のインターフェイスに位置していると考えられた。

3. 2 Sho1 多量体形成とシグナル伝達

3. 2. 1 Sho1 の TM2/3 面結合が低下する変異の単離

Sho1 多量体化と機能の関係を明らかにするために、TM2/3 面における三量体形成を抑制する変異を各 TM 内

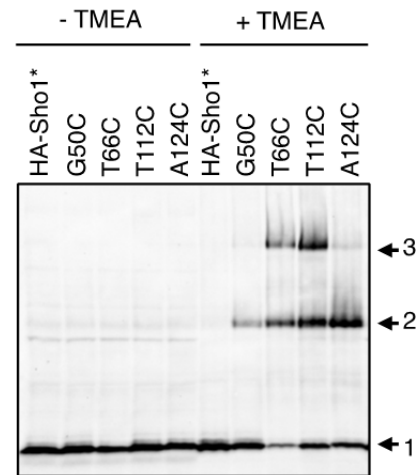


図2. TMEA による Sho1 の TM 内 Cys 間のクロスリンク

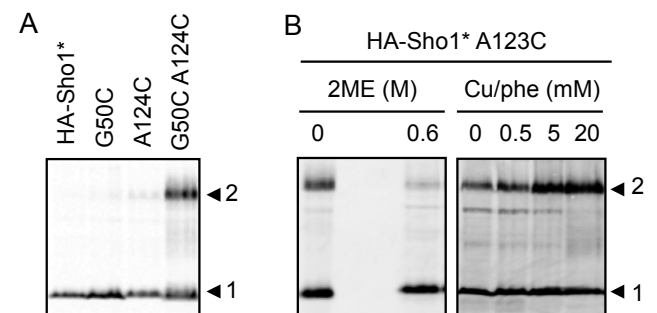


図3. Sho1 TM 内 Cys 間における S-S 結合形成。A) G50C A124C 間での S-S 結合、B) A123C 間での S-S 結合と還元(2ME)、酸化(Cu/phe)の影響。

に Trp 置換変異を系統的に導入し探索した。その結果、TM1/4 間(G50C-A124C)の S-S 結合には影響を与えず、TM2/3 間(T66C-T112C)の S-S 結合のみ低下する二重 Trp 変異(以下 WW 変異と呼ぶ)を単離した(図 4)。TM3 同士の BMH によるクロスリンク効率も WW 変異により顕著に低下しており、この変異は TM2/3 面による三量体形成を阻害すると考えられる。

3. 2. 2 TM2/3 面における Sho1 の三量体形成と SHO1 経路活性化における機能

WW 変異による TM2/3 面を介した三量体形成の欠損が SHO1 経路活性化にいかなる影響を与えるかを、Hog1 活性化に依存して転写が誘導される 8xCRE-lacZ レポーターを指標にして解析した。その結果、高浸透圧センサーの Hkr1 や Msb2 の活性化型タンパク質による SHO1 経路の活性化は完全に抑えられた(図 5)。したがって、Sho1 三量体形成は Hkr1/Msb2 からの活性化シグナルの伝達に必須であることがわかった。

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。平成 23 年度の助成研究では Sho1 が膜貫通(TM)領域を介して多量体を形成することを示唆する知見を得ていた。本年度の助成研究では、3つの官能基を有するクロスリンカーを用いた実験、S-S 結合形成部位の系統的探索などから、Sho1 が TM2/3 面を介して三量体を、TM1/4 面を介して二量体を形成することを確認し、さらにそれらのインターフェイスに位置するアミノ酸の同定に成功した。結合のインターフェイスをはじめ、Sho1 単量体構造の詳細がわかってきたので、今後はこの情報をもとに、高浸透圧刺激による Sho1 の多量体構造やコンフォメーションの変化等について、検討していきたい。

また、本年度の助成研究の大きな収穫として、Sho1 のユニークな多量体構造が高浸透圧センサーからの活性化シグナルの伝達に必要であることを明らかにした点があげられる。

Sho1 の TM2/3 面での結合が低下する WW 変異によ

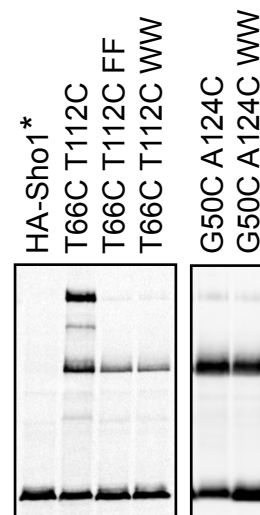


図 4. WW 変異の Sho1 TM2/3 面での三量体形成、TM1/4 面での二量体形成への影響

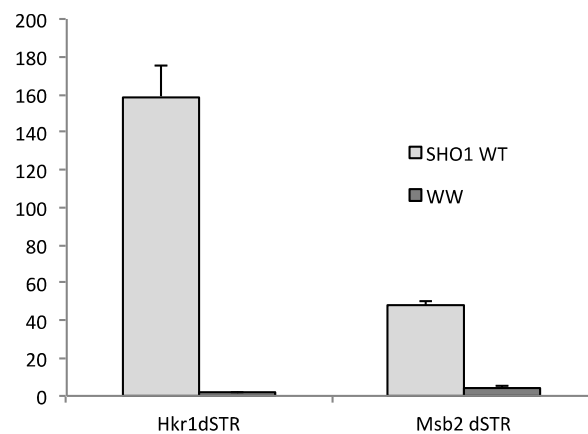


図 5. 活性化型 Hkr1、Msb2 による SHO1 経路活性化に対する SHO1 WW 変異の影響

り、高浸透圧センサー Hkr1 と Msb2 の活性化型変異による経路活性化が抑えられた。したがって、Sho1 の三量体形成が Hkr1/Msb2 高浸透圧センサーによる経路活性化に必須であると考えられた。Sho1 三量体がいかにして経路活性化に関与するかが今後の大きな課題であるが、センサータンパク質をはじめとする経路活性化に関わる膜蛋白質との相互作用に三量体構造が必要なのもかもしれない。Hkr1/Msb2 をはじめとする他の膜蛋白質と Sho1 との相互作用に焦点を絞り、解析を進めていきたい。また、TM1/4 面での二量体形成のシグナル伝達への関与についても明らかにする必要がある。TM2/3 面と同様、TM1/4 面についても二量体形成に影響を与える変異の単離を試

み、そのシグナル伝達への影響を検討したい。

今後、本研究で得た新知見を発展させる形で上記の課題について研究を進め、Sho1 多量体をコアとする膜蛋白質群による高浸透圧感知の分子機構の一層の理解に努めたい。

謝 辞

本研究にご援助頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団様に心より感謝申し上げます。

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 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 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.

Sho1 is a tetramembrane-spanning protein to play a crucial role in osmo-sensing in concert with osmosensors Hkr1/Msb2 in the SHO1 branch. As reported last year, Sho1 molecules are associated at two distinct interphases of TM (transmembrane)1/4 and TM2/3 to form a homomultimer. In this study, several pairs of amino acids in the Sho1 TM regions were shown to be within proximity at the interphases of TM1/4 and TM2/3 based on their capability to form disulfide bonds spontaneously when replaced by Cys residues. These findings provided structural insight into the Sho1 homomultimer. In addition, we isolated a mutation that abrogated not only a trimer formation of Sho1 at the TM2/3 interphases but also the activation of the SHO1 branch by the expressions of the active Hkr1/Msb2 mutants. The results indicated that the multimer formation of Sho1 is required for the activation of the SHO1 branch.