

## 過剰塩摂取で上昇する自己免疫疾患リスクに関わる p38 MAPK の新規活性化機構の検討

舘林 和夫<sup>1</sup>, 斎藤 春雄<sup>1</sup>, 富田 太一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学医学研究所, <sup>2</sup> 東邦大学医学部

**概要** 細胞内外の塩環境は生理的活動に多大な影響を与え、食塩の過剰摂取は様々な疾患の要因となりうる。高血圧などの生活習慣病の誘引がその好例であるが、自己免疫疾患のリスクを高めることも報告されている。後者では、高塩によりもたらされる高浸透圧刺激によって活性化されるp38 MAPキナーゼ(MAPK)の関与が示されている。p38は高浸透圧やUVなど様々な環境ストレスによって活性化され、環境ストレス応答や炎症反応に重要な働きを持つことが知られているが、高浸透圧を何がどのように感知してp38の活性化に至るのかについては不明の点が多かった。

そこで本研究ではp38活性化に繋がる高浸透圧感知の機構を明らかにする目的で、まず、p38経路の原型と考えられる酵母のHog1 MAPK経路において高浸透圧を感知する機構を解析した。これまで我々は酵母の高浸透圧センサーとしてSho1やHkr1といった複数の膜タンパク質の同定に成功したが、本研究の分子遺伝学的解析から、酵母のHog1 MAPK活性化には、センサー膜タンパク質を介した上流からのシグナルと同時に、Hog1自身が刺激を感知しリン酸化を受けやすい構造(primed構造と名付ける)に変化する必要があることが考えられた。すなわち、高浸透圧刺激はMAPKの上流因子とMAPK自身の両者に作用することになり、高浸透圧によるHog1の2段階活性化モデルが導出された。変異体スクリーニングにより、高浸透圧によるprimed構造を模倣する、刺激なしでも上流からのリン酸化を受けやすくなった恒常活性型Hog1変異体の単離に成功しており、Hog1の2段階活性化モデルの妥当性を支持している。

恒常活性型Hog1の変異部位(2箇所のミスセンス変異)はp38においても完全に保存されていたため、同様の変異をp38に導入したところ、Hog1同様p38も恒常的活性型となった。これはp38もHog1同様、上流からの活性化刺激に加え、自身も高塩刺激に反応して活性化する可能性を示しており、p38 MAPK経路の高浸透圧感知と活性化に関わる新たな分子機構の解明に繋がることが期待される。

### 1. 研究目的

#### 1.1 過剰塩摂取による自己免疫疾患リスクの上昇とp38 MAPキナーゼの関与

細胞内外の塩環境は生理的活動に多大な影響を与える。そのため食塩の過剰摂取は高血圧などの生活習慣病の健康リスクを高める。食塩の過剰摂取が自己免疫疾患リスクを高めることが2013年に報告された<sup>(1, 2)</sup>。細胞外の高塩環境によって活性化されたp38 MAPキナーゼがその基質であるSGK1キナーゼや転写因子のNFAT5を介し、CD4<sup>+</sup>T細胞から自己免疫疾患の重要なドライバーであるT<sub>H</sub>17ヘルパーT細胞への分化を促進することで、高塩摂

取による自己免疫疾患を誘発することがマウスで示されている。したがって過剰塩摂取による自己免疫疾患の誘発において、高塩によるp38の活性化は中心的な働きを持っていると考えられる。

#### 1.2 p38 MAPK経路の高塩による活性化

p38は高浸透圧、UVなど様々な環境ストレスによって活性化されるストレス応答MAPキナーゼ経路の中核をなすタンパク質である。ストレス刺激によって、上流のMAPKKK、MAPKKが順次リン酸化・活性化し、最終的にp38がリン酸化されると活性型p38が転写因子を含む様々な基質のリン酸化等を通じて適応反応をひき起こす。

高塩によって生じる高浸透圧ストレスが p38 経路の一連のキナーゼが活性化されることはよく解析されていたが、何が高浸透圧を感知して p38 経路を活性化させるかは不明であった。

### 1.3 p38 MAPK 経路の原型としての酵母の高浸透圧応答性 Hog1 MAPK 経路

p38経路の原型として、酵母の高浸透圧応答性の Hog1 MAPK 経路が知られている (Fig. 1)。その活性化機構に保存性が高いため、酵母の Hog1 MAPK 経路は p38 経路研究の良いモデル系と考えられる。私はソルト・サイエンス研究財団からの助成研究などで、これまで酵母の Hog1 MAPK 経路における高浸透圧を感知する機構を解析し、ほ乳類細胞では見つかっていない高浸透圧センサーの発見に成功した<sup>(3, 4)</sup>。酵母ではこれらのセンサー (Sho1, Hkr1/Msb2, Sln1) が高浸透圧を感知し、活性化シグナルを細胞内に伝達し、ほ乳類と同様 MAPKKK, MAPKK (Pbs2), MAPK (Hog1) が順次活性化されて高浸透圧適応に働くことが知られている (Fig. 2)。

### 1.4 本研究の目的 -高塩・高浸透圧による MAPK の新規活性化機構の解明-

予備研究から、酵母の Hog1 MAPK 経路では上流の膜センサーのみならず、下流の Hog1 キナーゼ自身も高浸透圧刺激により同時に活性化される可能性が示された。この全く予期しなかった MAPK の高浸透圧による2段階の活性化機構を検討することで、これまで明らかにならなかった p38 の活性化に繋がる高塩が引き起こす高浸透

圧ストレスの感知機構の解明を目指し、本研究を行った。

## 2. 研究方法

分子遺伝学的、分子生物学的、生化学的解析手法を駆使して、研究全般を遂行した。

### 2.1 変異遺伝子の作製

Hog1 MAPK 経路の各遺伝子について、数々のミスセンス変異を導入したが、変異遺伝子はオリゴ DNA を用いた PCR 法により作製した。また、HOG1 恒常的活性型変異体のスクリーニングのための変異導入では、0.2 mM の MnCl<sub>2</sub> 存在下、error prone PCR を行うことで変異体ライブラリーを作製した。

変異は全てシーケンシングにより確認した。

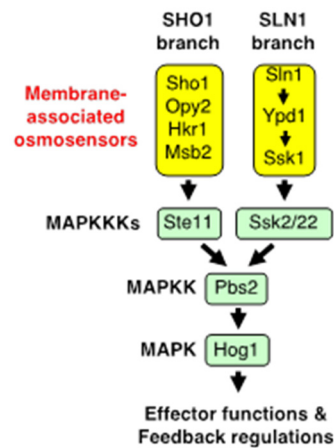


Fig 2. A schematic diagram of the Hog1 MAPK pathway

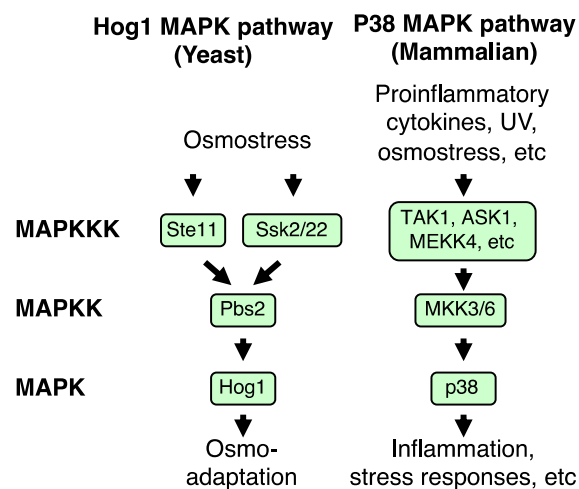


Fig 1. Yeast Hog1 MAPK and mammalian p38 MAPK pathways

## 2. 2 Hog1 MAPK 経路活性化の測定

### 2. 2. 1 Hog1 MAPK 経路活性化の定量的測定

Hog1 MAPK 経路活性化の測定には、我々が開発した Hog1 MAPK 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<sup>(6)</sup>。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  $\beta$ -galactosidase 反応を OD<sub>420</sub> 値として計測し、細胞量、反応時間で標準化した。

### 2. 2. 2 Hog1 のリン酸化の検出と定量

Hog1 の活性化を引き起こす T174 Y176 のリン酸化の検出および定量は、①リン酸化型 Hog1 を検出する抗リン酸化 p38 抗体の使用、及び②Phos-tag を含む SDS-PAGE におけるリン酸化 Hog1 と非リン酸化型 Hog1 の泳動度の違いによる検出<sup>(6)</sup>、という2種類の方法で行った。

### 2. 3 p38 活性化の測定

p38 の活性測定は、p38 の FRET プローブ PerKy-p38 を用いて、先行論文で述べられた手法と同様に行なった<sup>(7)</sup>。

## 3. 研究結果

### 3. 1 酵母の Hog1 MAPK 経路には既知の膜センサー以外に高塩に応答する細胞内センサーが存在する

#### 3. 1. 1 既知の膜センサー由来活性化シグナルを遮断しても高塩により Hog1 は活性化する

Fig. 2 に示したように、Hog1 MAPK 経路では、SHO1 上流支経路のセンサー膜タンパク質 (Sho1, Opy2, Hkr1, Msb2) と SLN1 上流支経路のセンサー膜タンパク質 (Sln1) が高浸透圧を感知し、下流に活性化シグナルを伝達する。両上流支経路はそれぞれ独立に活性化されるため、どちらか一方が遮断されても他方から活性化シグナルが流れて、Hog1 は活性化する (例: Fig. 3 の *ssk2/22Δ*, SLN1 上流支経路のみ破壊しても Hog1 のリン酸化 (=Hog1-P) は検出される)。したがって両上流支経路を遮断してはじめて下流への活性化シグナルは抑制されると考えられる。しかし驚いたことに、SHO1 上流支経路の4つの膜センサーを全て破壊し (=ΔS/O/H/M)、さらに SLN1 上流支経路の MAPKKK (Ssk2/22) を破壊した (= *ssk2/22Δ*) ΔS/O/H/M *ssk2/22Δ* 株は 0.4 M NaCl ではほとんど活性化しないものの、濃度を 1 M にあげると Hog1 のリン酸化が検出できた (Fig. 3 ΔS/O/H/M *ssk2/22Δ*)。このことは上流の膜センサ

一以外に、Hog1 活性化に繋がる高浸透圧を感知するセンサーが存在することを示唆する。

#### 3. 1. 2 既知の膜センサー以外の高塩感知は Hog1 MAPK のレベルで働く

高浸透圧感知が Hog1 経路のどこで起きているのかを明らかにするために、ΔS/O/H/M *ste11Δ ssk2/22Δ* 株を作製した。この株は全ての MAPKKK が存在しないため、Pbs2 MAPKK の活性化ループの S514 T518 のリン酸化は起きず Pbs2 は活性化しないため、1M NaCl でも Hog1 は活性化されない。一方、S514, T518 を共にアスパラギン酸 (=D) に置換しリン酸化模倣型にした Pbs2 S514D T518D (=Pbs2-DD) を発現させると、Hog1 は刺激なしでは活性化しないが、高塩刺激条件 (特に 1M NaCl でより強く) でリン酸化された (Fig. 4)。このことから、高浸透圧の感知は Pbs2 MAPKK → Hog1 MAPK のステップで起きていることが明らかになった。

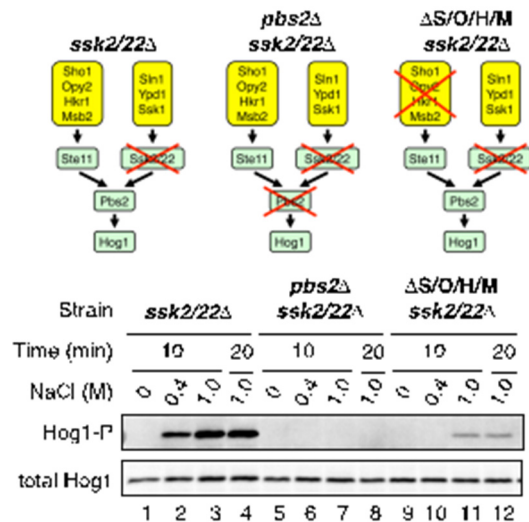


Fig.3 High salt induces Hog1 phosphorylation even in the absence of all the known osmosensors

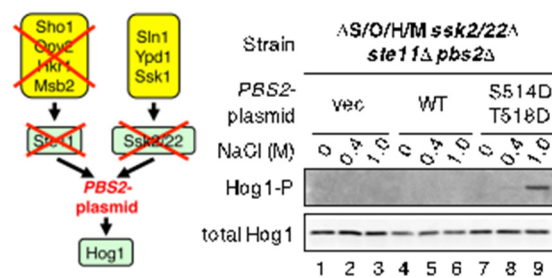


Fig. 4 Membrane proteins-independent sensor functions at the level of Hog1 itself.

### 3. 2 Hog1 の Pbs2 活性依存的な恒常活性型変異体の単離と解析

#### 3. 2. 1 Hog1 の恒常的活性型変異体の単離

Pbs2 MAPKK→Hog1 MAPK のステップで起きる高浸透圧感知の機構を調べるために、高塩刺激なしでも Pbs2 からリン酸化を受けることが可能な Hog1 変異体のスクリーニングを行なった。上述のように、高塩刺激による Hog1 経路活性化は、膜センサーと MAPKK→MAPK ステップの両者が高塩刺激に応答しなくてはならないと考えられる。従って、膜センサーの高塩刺激による活性化をバイパスするため 高塩刺激なしで活性化状態にある Ste11 MAPKKK の活性型変異体(=Ste11-Q/P)を発現させ、さらに上流シグナルを遮断した  $\Delta S/O/H/M$  *ssk2/22\Delta* *STE11-Q/P* 株を用いて、Hog1 の恒常活性型変異体を探索した。Mn 存在下の error prone PCR で変異 *HOG1* 遺伝子断片を増幅し、gap repair 法によって  $\Delta S/O/H/M$  *ssk2/22\Delta* *STE11-Q/P* 株で *HOG1* 変異遺伝子を持った変異体ライブラリーを作製した。この変異体ライブラリーのうち、Hog1 経路の活性化によって誘導される CRE-lacZ レポーターの発現が高塩刺激なしでも上昇している活性型変異体を選択した。これまで Hog1 の自己リン酸化能が亢進して Pbs2 MAPKK 非依存的にリン酸化される Hog1 の恒常活性型変異体が別グループにより報告されていた<sup>(8)</sup>。求める活性型変異はこうした自己リン酸化能亢進型ではなく、Pbs2 MAPKK にリン酸化を受けやすいタイプであるため、その活性化は Pbs2 活性に依存するものはずである。これに合致した変異として、Hog1 のキナーゼドメインに 2つのミスセンス変異をもつ N/H D/G 変異が単離された (Fig. 5 でスクリーニングの際に使用した *STE11-Q/P* 株での N/H D/G 変異及びその各単独変異の Hog1 活性化を示す)。

#### 3. 2. 2 Hog1 の恒常的活性型変異体の解析

Hog1-N/H D/G は Pbs2 MAPKK より上流のシグナルを完全に遮断しても ( $\Delta S/O/H/M$  *ste11\Delta* *ssk2/22\Delta*)、活性型 Pbs2-DD により高塩刺激なしで Hog1 が活性化 (Fig. 6. B: CRE-lacZ レポーターによる Hog1 活性化の評価) することがわかった。Phos-tag を用いてリン酸化 Hog1 を定量的に測定したところ、N/H や D/G の単独変異では弱く、N/H D/G の二重変異により極めて強く、刺激非依存的に Pbs2-DD からのリン酸化を受けることがわかった (Fig. 6.

C)。

以上のように高浸透圧感知による活性化を模倣したと考えられる Hog1 変異体が単離されたことから、高浸透圧刺激を感知しているのは Hog1 自身であることが示唆された。

#### 3. 3 p38 の依存的恒常活性型変異体の単離

以上のように酵母の Hog1 MAPK はそれ自身直接的または間接的に高塩刺激を感知することが示された。このことは、Hog1 と構造的及び機能的に保存性の高いほ乳類ホモログである p38 も同様の性質をもつ可能性を示す。恒常活性型 Hog1-N/H D/G の2つの変異部位のアミノ酸は両者で完全に保存されていたため、p38 $\alpha$ に N/H D/G 変異を導入してその活性を調べた。p38 の活性をモニターする FRET プローブを用いて、非刺激状態における細胞内の p38 活性を調べたところ、p38 $\alpha$ -N/H D/G を発現する細胞は有意に p38 活性が上昇していることがわかった (Fig. 7: YFP/CFP ratio が高いほど p38 の活性が高い)。したがって、p38 においても酵母の Hog1 のように MAPK レベルで高浸透圧を感知する機構が存在する可能性が考えられた。

### 4. 考察と今後の課題

p38 は高浸透圧や UV など様々な環境ストレスによって活性化されるストレス応答 MAP キナーゼであるが、過剰塩摂取によって生じる高浸透圧ストレスによる p38 の活性化が自己免疫疾患リスクを誘引することが報告されてい

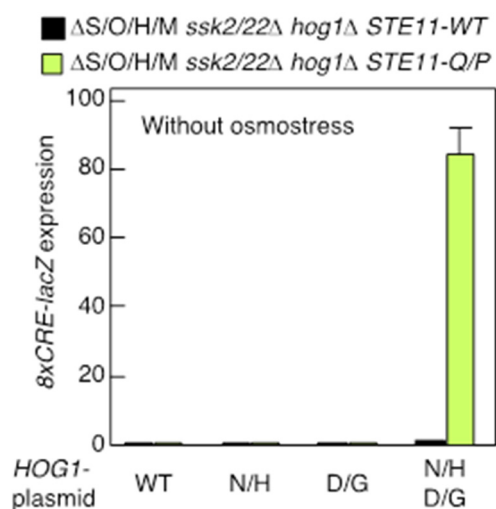


Fig. 5 Isolation of Hog1-N/H D/G mutant which is activated in the *STE11-Q/P* cell without osmotic stress.

る。p38 MAP キナーゼ経路のシグナル伝達メカニズムはかなり詳細にわかっているが、高浸透圧を何が感知し p38 の活性化に繋がるのかについては不明である。そこで本研究では p38 の原型であるモデル生物の酵母 Hog1 MAP キナーゼの研究を通じ、その知見を p38 経路の高浸透圧感知機構の解明に応用することを考えた。

本研究の大きな成果の一つは、酵母の Hog1 MAPK 経路において、高塩によって生じる高浸透圧刺激が細胞膜に存在する複数の高浸透圧センサーを活性化すると同時に、Hog1 MAPK 自身にも直接的、あるいは間接的に作用し活性化に働くことを見出した点である。Hog1 経路の高浸透圧刺激に対する活性化メカニズムとして、Fig. 8 に示

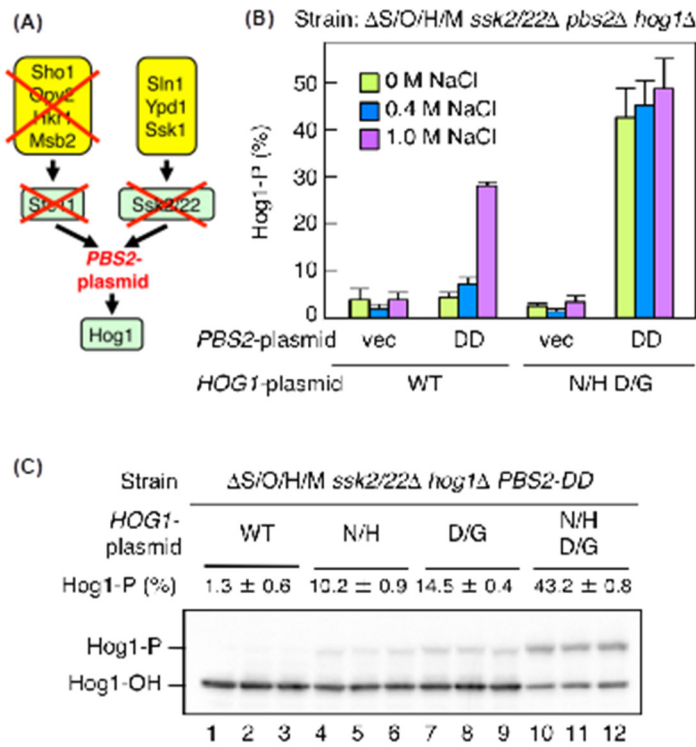


Fig. 6 Hog1-N/H D/G mutant is constitutively phosphorylated and activated by constitutively-active Pbs2-DD even without stress.

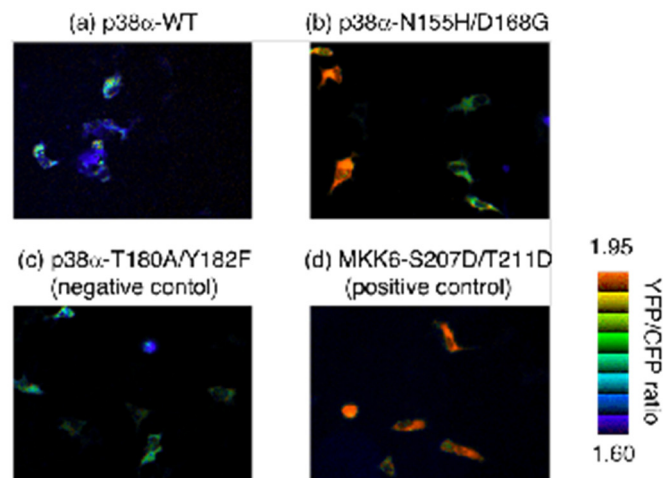
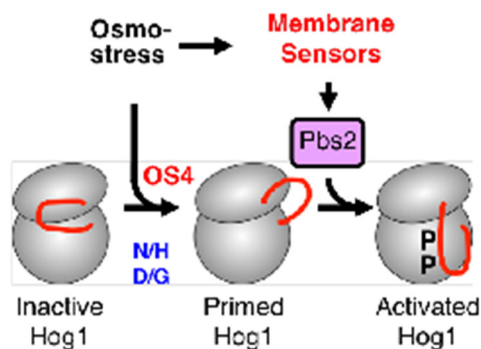


Fig. 7 p38-N/H D/G mutant is activated by basal MAPKK activities.





**Fig. 8 A proposed two-step mechanism of osmostress-induced Hog1 activation.**

す2段階活性化モデルが考えられる。Hog1の活性化ループは不活性状態では閉じ込められておりPbs2 MAPKKによるリン酸化(=活性化)を受けない。高浸透圧刺激がHog1に作用し活性化ループが露出する(第一段階:Primed状態)ことで初めて、別途高浸透圧刺激によって活性化されたPbs2によるリン酸化・活性化(第二段階)が可能になる。すなわち、Hog1 MAPKの活性化には上流からのシグナルと同時に、Hog1自身の高浸透圧刺激の感知が必要であり、この活性化メカニズムにより特定の外部刺激に対して極めて高い特異性を持った活性制御が保障されると考えられる。今後の課題としては、Hog1が高浸透圧を直接感知しているのか、あるいは他の細胞内センサーを介した間接的な感知機構なのか、その詳細なメカニズムを生化学的解析や構造生物学的解析を通じて解明する必要がある。

一方、酵母のHog1から出発した本研究は、p38の活性化機構にも大きなヒントを与えた。Hog1の恒常活性型変異と同様の変異導入により、p38においても恒常的に活性化することが見出されたことから、高浸透圧はp38経路においても経路の上流だけでなくp38自身にも作用する可能性が考えられる。今後p38について詳細な解析を行い、Hog1同様、2段階活性化モデルが当てはまるのかを検証したい。

## 5. 文献

1) Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, and Kuchroo VK. (2013) Induction of

pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, 496: 513-7.

- 2) Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, and Hafler DA. (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496: 518-22.
- 3) 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.
- 4) Tatebayashi K, Yamamoto K, Nagoya M, Takayama T, Nishimura A, Sakurai M, Momma T, and Saito H. Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nature Communications*, 6: 6975 (2015)
- 5) 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.
- 6) English, J.G, Shellhammer, J.P, Malahe, M, McCarter, P.C, Elston, T.C, and Dohlman, H.G. (2015). MAPK feedback encodes a switch and timer for tunable stress adaptation in yeast. *Sci. Signal.* 8, ra5.
- 7) Tomida, T., Takekawa, M., and Saito, H. (2015). Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nat. Commun.* 6, 8350.
- (8) Bell, M., Capone, R., Pashtan, I., Levitzki, A., and Engelberg, D. (2001). Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation. *J. Biol. Chem* 276, 25351-25358.

## 6. 謝辞

本研究を遂行する上で多大なるご支援を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝申し上げます。

## Analysis of a Novel Mechanism of p38 MAPK Activation by High Salt, Which Drives Autoimmune Disease

Kazuo Tatebayashi<sup>1</sup>, Haruo Saito<sup>1</sup>, Taichiro Tomida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Science, the University of Tokyo,

<sup>2</sup>School of Medicine, Faculty of Medicine, Toho University

### Summary

It was reported that excessive dietary salt intake might increase the risk of developing autoimmune diseases. One of crucial factors was shown to be the p38 MAP kinase (MAPK) that is activated by high osmolarity upon high salt conditions. p38 is a stress responsive MAPK, which is activated by various kinds of environmental stresses for adaptation and inflammation. However, the mechanism of sensing high osmolarity in the p38 MAPK pathway remains largely elusive.

To get an insight into the osmosensing mechanism in the p38 MAPK pathway, we, first, investigated the osmosensing mechanisms in the yeast osmoregulatory Hog1 MAPK pathway. Hog1 is a prototype of p38, and both MAPKs have conserved structures and functions. In this study, we found that activation of Hog1 by high osmolarity requires, in addition to the previously identified transmembrane osmosensors (Sho1/Opy2/Hkr1, Sho1/Opy2/Msb2 and Sln1), a fourth, cytoplasmic osmosensor, which is actually Hog1 itself. The properties of a constitutively-active Hog1 mutant suggest a two-step activation mechanism, in which a conformational change of Hog1 by osmostress is necessary to allow it to be activated/phosphorylated by Pbs2 that has been activated separately by upstream osmosensors. Interestingly, the introduction of equivalent mutations of a constitutively-active Hog1 mutant conferred higher kinase activity to the mammalian p38 MAPK, suggesting a possibility that p38 activation by high osmolarity also requires both osmotic stimulation of the upstream sensors and osmotic priming of p38 itself.