

助成番号 0715

## 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析

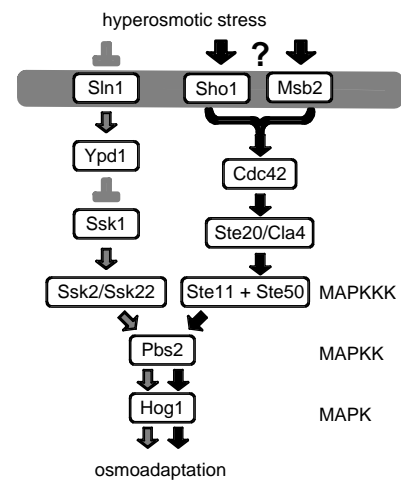
館林 和夫, 田中 慶一郎, 楊 ケイユ, 斎藤 春雄

東京大学医科学研究所

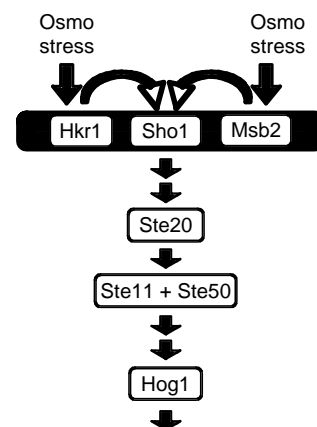
**概要** 本研究では、植物や動物のきわめて良いモデル生物である出芽酵母を用いて、高食塩濃度に起因する高浸透圧への耐性を、特に高浸透圧シグナル伝達機構に焦点を当てて解析した。出芽酵母は一定濃度以上の NaCl にさらされると、その浸透圧を感受し、HOG MAP キナーゼ経路を活性化することにより、高浸透圧環境に適応する。活性化した Hog1 MAP キナーゼは細胞核に輸送され、転写因子のリン酸化による高浸透圧応答遺伝子群の転写誘導などを介して細胞の高浸透圧適応を可能にする。したがって HOG 経路が欠損した酵母では高濃度 NaCl 存在下での生育が不可能である。

HOG 経路には Sho1 と Sln1 の二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 (Fig. 1)。SHO1 経路では Sho1 が経路の上位で働くことはわかっていたが、高浸透圧を感知するセンサー因子については全く不明であった。我々は遺伝学的スクリーニングを通じて、Hkr1、Msb2 という二つの膜タンパク質が SHO1 支経路の最上位で働く高浸透圧センサーであることを発見した。遺伝学的、生化学的解析から Hkr1/Msb2 は膜貫通ドメインを介して Sho1 と結合しており、高浸透圧刺激により Sho1 を介して細胞内に活性化シグナルを伝達することがわかった (Fig. 2)。Hkr1/Msb2 はセリン・トレオニンに富み高度に糖鎖修飾された細胞外ドメインを有しており、この領域は活性化を負に制御していることから、我々は SHO1 経路における高浸透圧感知の分子機構として、Hkr1/Msb2 細胞外領域における糖鎖のゲル構造が高浸透圧環境下で変化し、マスクされていた Sho1 との相互作用ドメインが Sho1 と結合して活性化シグナルを細胞内に伝達する、という活性化モデルを提唱した。

<発表論文> [Tatebayashi K, et al. EMBO J. 26:3521-3533. \(2007\),](#)  
[Murakami Y, Tatebayashi K, Saito H. Mol. Cell Biol. 28:2481-2494 \(2008\)](#)



**Fig. 1.** A schematic model of the Yeast HOG pathway



**Fig. 2.** A schematic model of the activation mechanism by Hkr1 and Msb2 in the SHO1 branch

## 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獲得のメカニズムについて、特に高浸透圧の感知機構に焦点を当てて解析した。

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知し 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。Fig. 1 に示すように、HOG 経路には SLN1 経路、SHO1 経路という二つの独立した上流支経路が存在し、これらの MAPKK キナーゼの Ssk2/22 あるいは Ste11 が活性化されると、共通の MAPK キナーゼの Pbs2 をリン酸化・活性化し、さらに活性化した Pbs2 は Hog1 をリン酸化・活性化する(文献 1-7, 9, 10)。細胞がいかにして細胞外の高浸透圧環境を感知するのかについては、SLN1 経路でヒスチジンキナーゼ活性を有する膜蛋白質の Sln1 が細胞の膨圧変化を感知し経路の活性化を引き起こすことが明らかになっている(文献 8)。これに対し SHO1 経路における高浸透圧感知の機構はほとんど不明であった。経路名の由来となった膜蛋白質の Sho1 は SHO1 経路活性化に必須な因子であり、HOG 経路の複数の因子と結合しこれらを膜にリクルートするアダプター蛋白質であることを我々は報告した(文献 11)が、Sho1 が高浸透圧センサーとして働く直接的な証拠は得られていない。他に膜蛋白質である Msb2 が高浸透圧センサーとして候補にあげられていたが、Msb2 を欠失した細胞でも SHO1 経路の活性化が起きるため、Msb2 が SHO1 経路における高浸透圧センサーとして働くとは言えなかった。予備的な研究から我々は Msb2 が高浸透圧センサーとして十分働

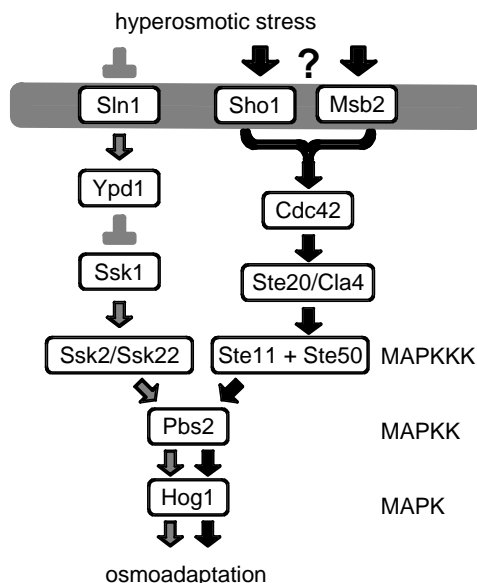


Fig. 1. A schematic model of the Yeast HOG pathway

きうと考え、Msb2 を欠失した細胞でも SHO1 経路の活性化が起きるのは Msb2 と重複した因子が存在するためであるという仮説のもと、遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、Msb2 と Hkr1 という二つの膜タンパク質が SHO1 経路における高浸透圧センサーとして重複した機能を有することを明らかにしたので、その詳細を報告する。

## 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  $\beta$ -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。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 12 に詳述されている。

### 3. 結果

#### 3.1 Hkr1 と Msb2 は SHO1 経路の活性化において重複した機能を有する

Msb2 が SHO1 経路の高浸透圧センサーとして働くのなら、Msb2 を欠失した細胞では SHO1 経路の活性化が起きないはずである。しかしながら、Msb2 欠失株でも SHO1 経路が活性化するのは、Msb2 と重複した因子が存在するためであるという仮説のもとで遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、変異原処理により Msb2 欠失細胞に突然変異を誘起させ、まず SHO1 経路が活性化できずに高浸透圧感受性になった変異株を選択し、さらにこの高浸透圧感受性が Msb2 の発現により回復できるものを、Msb2 と機能重複した因子の変異株とした。こうして単離された複数の変異株について原因遺伝子を同定したところ、いずれにおいてもその原因遺伝子は *HKR1* であった。Fig. 2 で示すように、HOG 経路活性化の指標となる (B) 高浸透圧耐性、(C) Hog1 のリン酸化、(D) HOG 経路レポーターの発現、

のいずれについても Hkr1、Msb2 の単独欠失変異は影響を与えなかったが、Hkr1 と Msb2 の二重欠失変異株では全く経路活性化が起こらなかった。この結果は Hkr1、Msb2 が SHO1 経路活性化において重複した機能を有していることを示している。Hkr1 は Fig. 2E で示すように、Msb2 と極めて類似した構造を持っていた。いずれも 1 回膜貫通ドメインをはさんで N 末領域に長い細胞外ドメインを、C 末領域に細胞質内ドメインを有する。特徴的なのは N 末領域に存在するセリン・スレオニン含量の極めて高い (ST-rich) 長大なドメインであり、高度に糖鎖修飾を受けていると考えられている。

#### 3.2 Hkr1 と Msb2 の機能ドメイン解析—活性を負および正に制御するドメインの同定

各ドメインの欠失変異が SHO1 経路活性化に与える影響を調べたところ、Hkr1/Msb2 の ST-rich ドメインの欠失により SHO1 経路は高浸透圧刺激なしでも恒常的に活性化することがわかった (Fig. 3)。したがって糖鎖修飾をうける

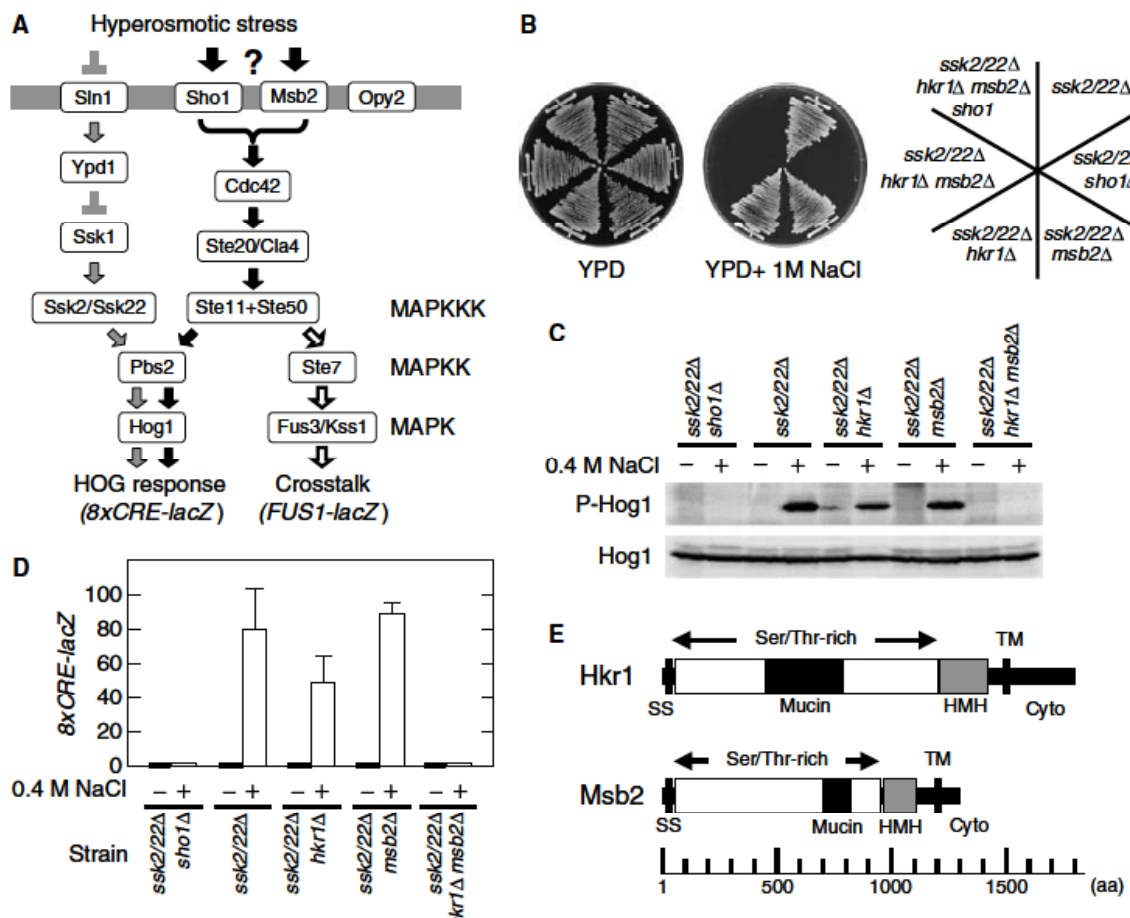


Fig. 2

ST-richドメインはHkr1/Msb2の活性を負に制御していると考えられた。また、N末に存在するHkr1とMsb2の間でアミノ酸配列が唯一保存された領域(HMHドメイン)の欠失は経路の活性化に必須であること、C末の細胞質領域は活性化には必須でないことも明らかになった。

### 3.3 Hkr1とMsb2はSho1と同様の細胞膜局在をする

Hkr1、Msb2の細胞内局在を調べるために、それぞれGFPとの融合タンパク質を作製しその局在を調べた(Fig. 4)。その結果、Hkr1、Msb2は細胞膜(特に出芽領域の細胞膜)に局在すること、またこの局在はSho1の細胞内局在と極めて似ていることがわかった。

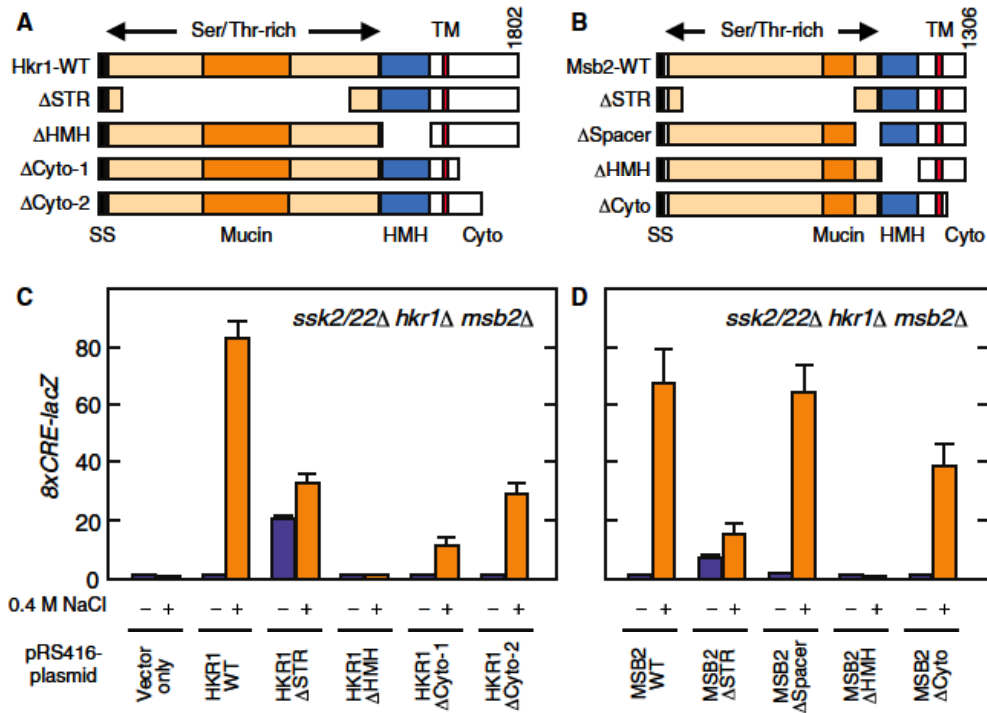


Fig. 3

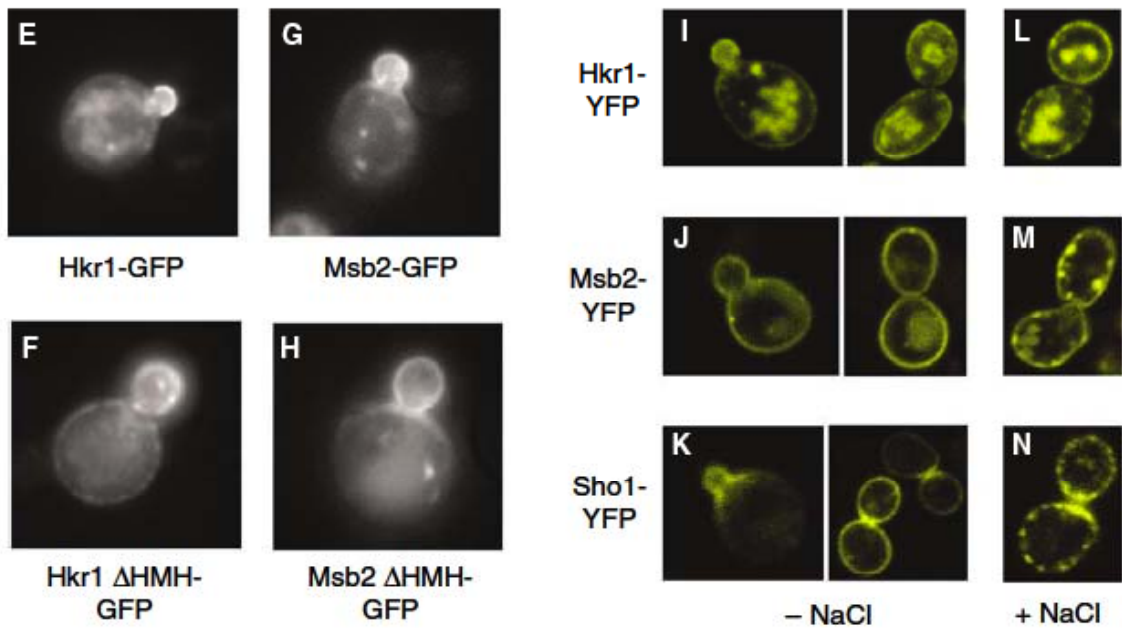


Fig. 4

### 3. 4 Hkr1とMsb2はSHO1経路の最上位で働く因子である

Hkr1/Msb2とSho1はSho1経路の活性化に必須な膜蛋白質であるが、これらの機能的上下関係を遺伝学的に解析した。ST-richドメインを欠失したHkr1/Msb2はSHO1経路を恒常的に活性化する(Fig. 5 A-D)。これに対し、Sho1、Ste20、Ste11、Ste50といったSHO1経路に関わる因子の欠失変異細胞ではこの活性化は起こらなかった(Fig. 5 E, F, data not shown)。

一方、我々は新たに恒常的活性型のSho1変異の単離に成功した。この恒常的活性型Sho1タンパク質を発現させると、高浸透圧刺激なしでもHOG経路は活性化する(Fig. 6 A-C)。さらに興味深いことに、このSHO1経路活性化は下流のSte50やSte20の欠失した細胞ではみられな

い(Fig. 6 D)が、Hkr1/Msb2を欠失した細胞では依然として活性化がおこることがわかった(Fig. 6 E)。以上より、Hkr1/Msb2はSho1よりも上位、すなわちSHO1経路の最上位で経路活性化に働くことが示された。

### 3. 5 Hkr1/Msb2はSho1を介して活性化シグナルを細胞内に伝達する

ST-richドメインを欠失したHkr1/Msb2による活性化にはSho1の膜貫通ドメイン及び細胞外領域が必須であることがわかった(data not shown)。そこでHkr1/Msb2とSho1の相互作用を調べたところ、両者は膜貫通ドメインを介して結合しており、この結合は経路活性化に必須であることが、Sho1膜貫通ドメイン内の変異体の解析やその共沈実験などからわかった(Fig. 7)。

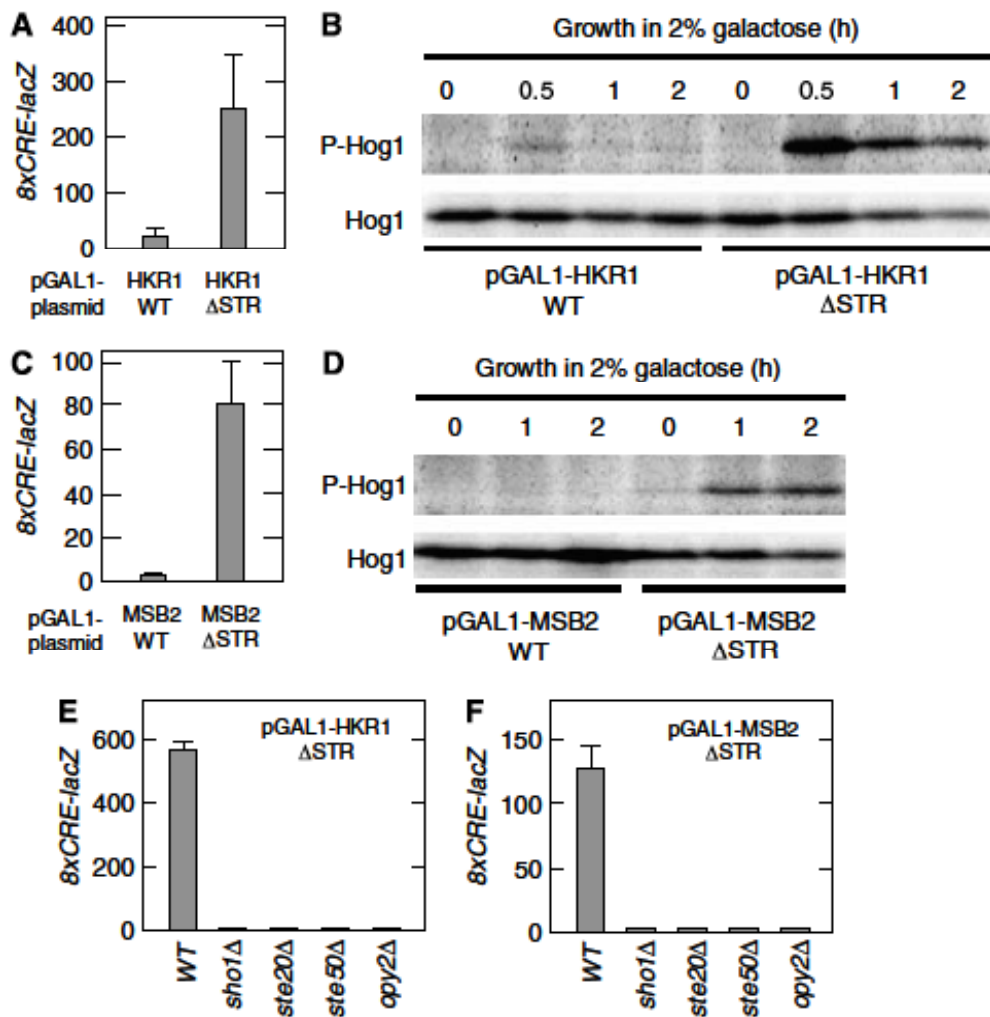


Fig. 5

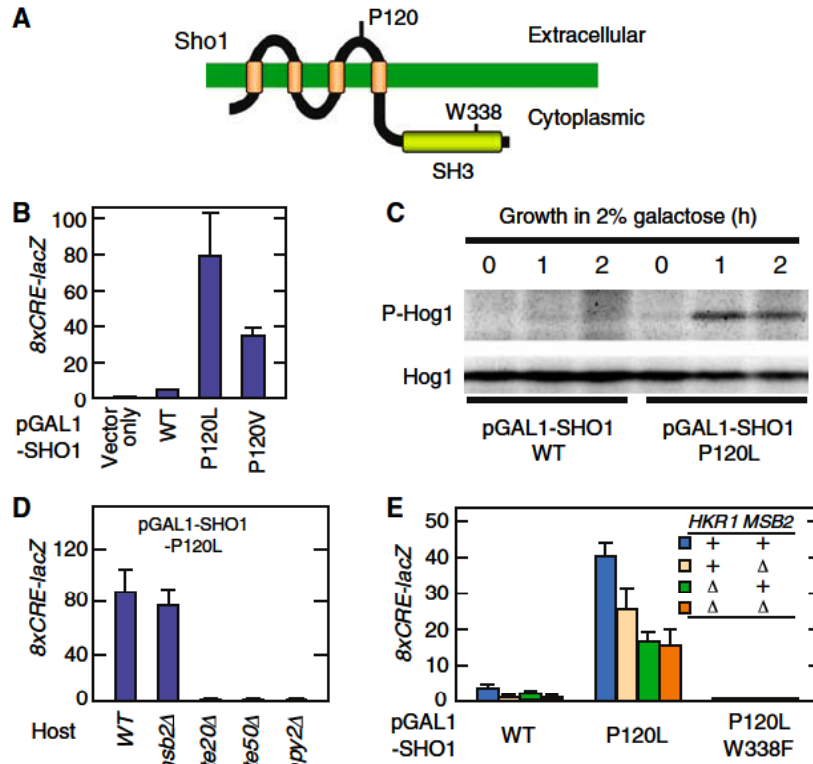


Fig. 6

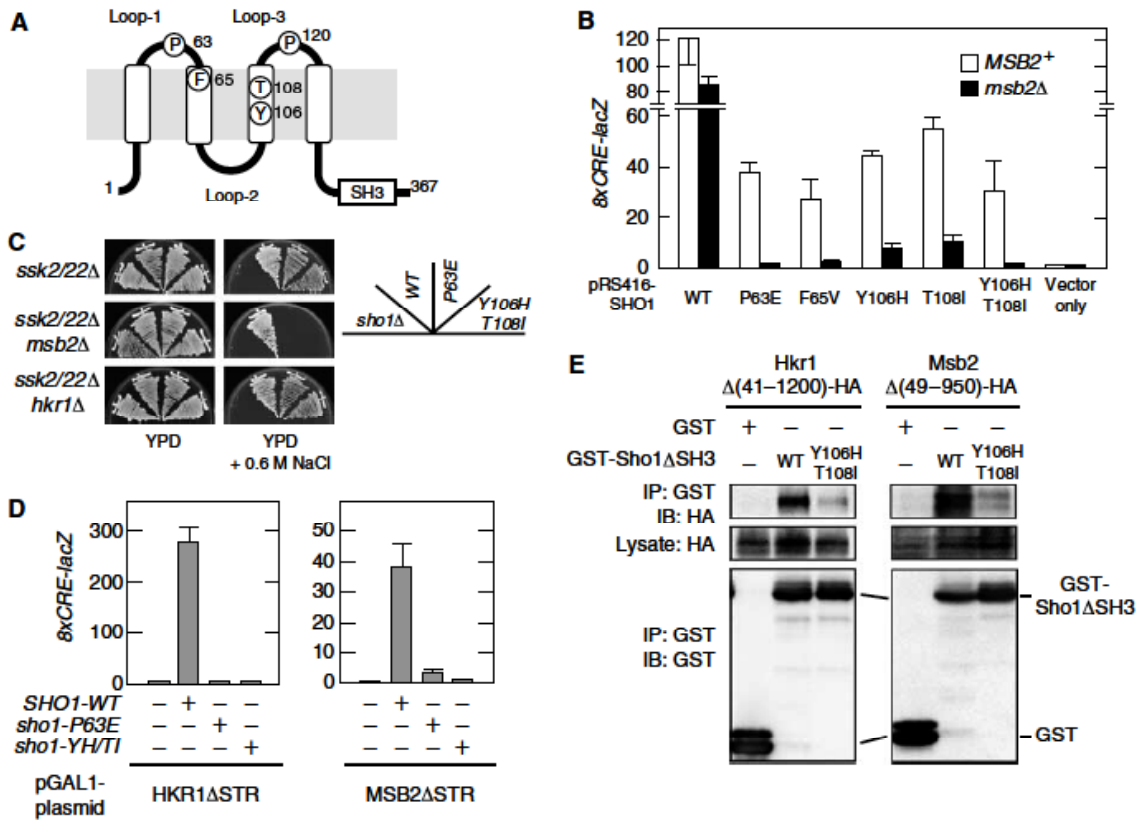


Fig. 7

#### 4. 考察および今後の展望

以上の結果より、SHO1 経路において Hkr1、Msb2 という二つの膜タンパク質が経路の最上位で高浸透圧センサーとして働くことを見いだした。Hkr1/Msb2 は高浸透圧によって活性化されると、膜貫通ドメインで結合する Sho1 に活性化シグナルを伝達し、Sho1 がそのシグナルを細胞内に伝えることがわかった。(Fig. 8)

さらに我々は SHO1 経路における高浸透圧センシングの分子メカニズムとして以下のモデルを提唱した。Hkr1/Msb2 の細胞外領域は糖鎖修飾を高度に受けており、これが通常の浸透圧条件では膨潤し立体障害として正の活性化領域である HMH ドメインをマスクしている。高浸透圧刺激下、糖鎖のゲル状構造に変化(水と度の高い膨潤状態から収縮状態への変化)が生じ、この立体障害が解除されることで、HMH ドメインと Sho1 の細胞外部位との相互作用が可能になり、この結合が細胞内シグナルを生成する、というものである(Fig. 9)。今後はこのモデルを生化学的、物理化学的アプローチにより検証していきたい。

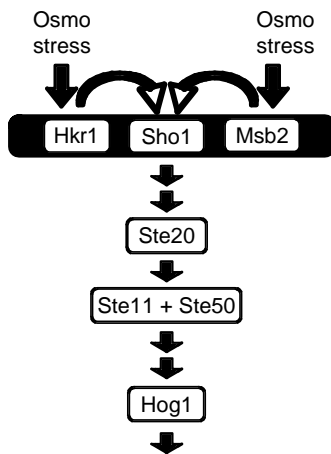


Fig. 8

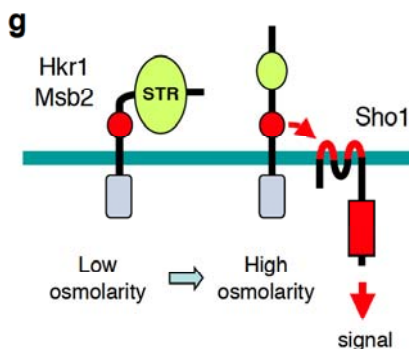


Fig. 9

#### 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 (2007) **26**: 3521-3533. に発表いたしました。

#### 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, Koepf D, Saito H, and Silver PA. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin  $\beta$  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 MAPKKKs 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) 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.
- 12) 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.



No. 0715

## Analysis of the Osmo-Sensing Mechanism in Yeast

Kazuo Tatebayashi, Keiichiro Tanaka, Hui-Yu Yang , Katsuyoshi Yamamoto,  
Yusaku Matsushita, Taichiro Tomida, Midori Imai, 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. However, neither the osmosensor nor the signal generator of the SHO1 branch has been clearly defined.

Here, we show that the mucin-like transmembrane proteins Hkr1 and Msb2 are the potential osmosensors for the SHO1 branch. Hyperactive forms of Hkr1 and Msb2 can activate the HOG pathway only in the presence of Sho1, while a hyperactive Sho1 mutant activates the HOG pathway in the absence of both Hkr1 and Msb2, indicating that Hkr1 and Msb2 are the most upstream known elements in the SHO1 branch. Hkr1 and Msb2 individually form a complex with Sho1, and, upon high external osmolarity stress, appear to induce Sho1 to generate an intracellular signal. Furthermore, Msb2, but not Hkr1, can also generate an intracellular signal in a Sho1-independent manner.