

助成番号 0907

## 耐塩性・耐浸透圧性に関わる酵母の高浸透圧応答経路の制御機構

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獲得に関わるシグナル伝達経路(HOG MAPK 経路)において、特にその活性制御の分子メカニズム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 2 種の膜タンパク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(図 1)。このうち、SHO1 経路では高浸透圧センサーをはじめとする膜タンパク質から活性化シグナルが順次伝達されるために、多くのシグナル伝達因子が細胞膜にリクルートされることが必要である。Ste11 MAPKKK も例外でなく、Ste11 結合タンパク質の Ste50 と膜タンパク質の Opy2 との結合を介して細胞膜にリクルートされ、同じく Cdc42 との相互作用により細胞膜に局在化した Ste20 によるリン酸化・活性化を受ける。本研究では、経路活性化に必須な Ste11 の膜局在化を制御する Ste50 と Opy2 の結合に焦点を絞り、両者の結合制御を通じた経路活性化の動的制御機構を解析した。その結果、Ste50 は高浸透圧条件下で HOG 経路の Hog1 MAP キナーゼ、接合経路の Fus3/Kss1 MAP キナーゼにより複数の部位にリン酸化を受けること、このリン酸化により Ste50 と Opy2 との結合性が低下することを見いだした。さらにリン酸化部位に変異を導入した非リン酸化型 Ste50 のみを発現する細胞では、高浸透圧刺激時の Hog1 リン酸化が野生型に比べ遷延した。したがって高浸透圧刺激により HOG 経路が活性化したのち、Hog1 による Ste50 リン酸化により Ste50-Opy2 複合体が解離してシグナル伝達を遮断する、負のフィードバック制御機構の存在が見いだされた。

<発表論文> Yang, Tatebayashi, et al. **EMBO J.** 28: 1380-1391. (2009)

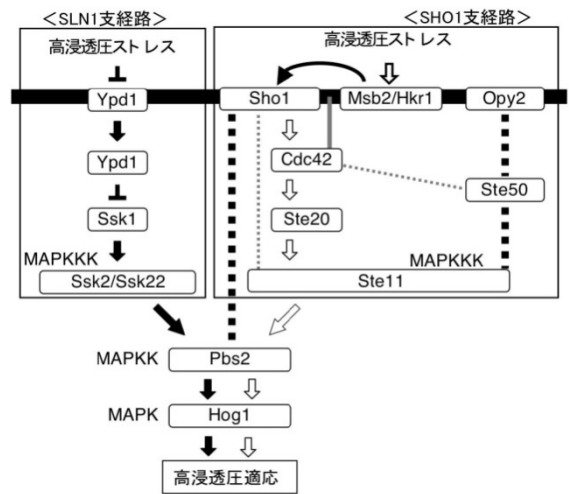


図 1. 酵母の高浸透圧応答性 HOG MAPK 経路

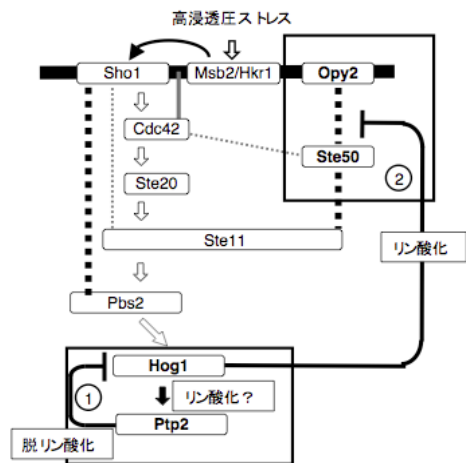


図 2. HOG 経路における負のフィードバック制御

### 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に関わるシグナル伝達経路の活性制御メカニズムについて解析した。

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。このシグナルは二つの上流支経路(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、上述のように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<sup>1,2)</sup>)。こうした環境ストレスへの応答には、経路を素早く適切に活性化させる正の制御機構に加え、不適切、あるいは過剰な経路の活性化を抑えるための負の制御機構も極めて重要である。環境ストレス非存在時には、活性化レベルを極力抑え不適切な適応反応が起こるのを防ぐ必要がある。また過剰な経路の活性化は時に細胞の生育などに不利に働くため、一定の活性化レベルに調節することも必要である。また環境適応後には経路の活性化状態をもとの低いレベルにリセットし、新たな環境変化に反応しうる状態に戻す必要もある。実際、高浸透圧による Hog1 の活性は、刺激後 10 分で頂点に達し、30 分後には刺激前のレベルにまで減衰することから、複数の負のフィードバック機構の関与がうかがえる。こうした負のフィードバックとして、図2の①に示すように、Hog1 がリン酸化・活性化されると Ptp2 ホスファターゼがリン酸化された Hog1 を脱リン酸化することでその活性を負に抑える機構が我々の研究等から知られていた<sup>3)</sup>。

一方、我々は HOG 経路の上流支経路である SHO1 経路においても、下記に示すように、予備研究から新たな活性制御メカニズムの存在を見いだした。SHO1 支経路については何が高浸透圧を感知するかを含めて不明の点が多かったが、近年、我々は SHO1 経路において 2 種のムチン様膜タンパク質(Hkr1 と Msb2)が浸透圧センシング機能をもっており、膜タンパク質の Sho1 がこれらセンサーと

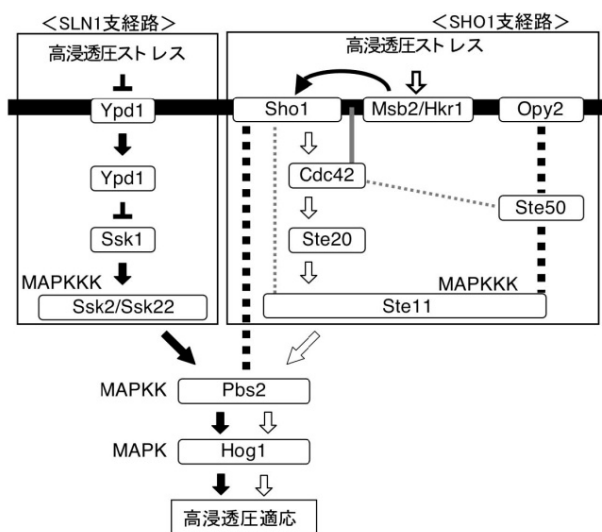


図1. 酵母の高浸透圧応答性 HOG MAPK 経路の概略図

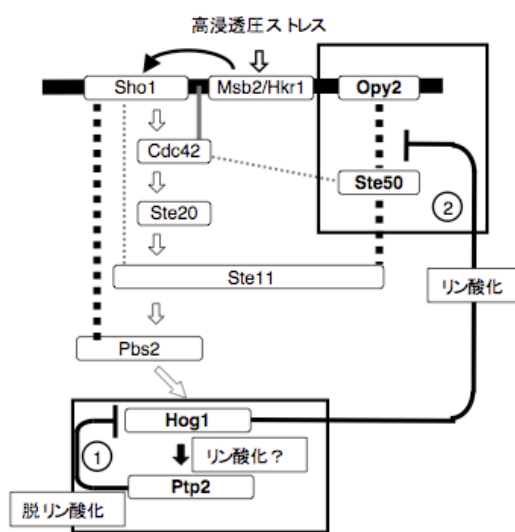


図2. HOG 経路における負のフィードバック制御機構

細胞因子とのシグナル伝達に必要であることを見いだした<sup>4)</sup>。また Sho1 からの活性化シグナルは Cdc42、Ste20/Cla4 を介して Ste11 に伝達すること、Sho1、Cdc42、Ste50 がアダプターとして各因子と結合、複合体を形成し、細胞膜上での Ste11 と Pbs2 との間接的な結合及び Ste11 による Pbs2 のリン酸化・活性化を実現することを明らかにした<sup>5)</sup>。SHO1 支経路の活性化に必須な膜タンパク質の Opy2 は Ste50 の膜アンカーとして考えられた<sup>4)</sup> ため、Opy2 と Ste50 との結合について検討したところ、Opy2 は C 末領域で Ste50 と結合し、この結合はシグナル伝達に必須であった。興味深いことに高浸透圧刺激により両者の結合は低下し、Ste50 は刺激依存的かつ Hog1 依存的にリン酸化をうけることを示唆する予備的データが得られた。以上より、図2 ②に示すように、HOG 経路の活性化に応じて、上流のシグナル因子である Ste50 がリン酸化され、Opy2 との結合が低下し活性化シグナルが遮断されるという、全く新しい負フィードバック機構の存在が考えられた。そこで本研究ではこの新規制御機構の分子レベルでの解明を目的に、詳細な解析を行った。

## 2. 研究方法

研究全般にわたって、分子生物学的手法、酵母の遺伝子破壊株や各種遺伝子変異体を用いた分子遺伝学的手法、異種タンパク質間の結合を解析する共沈実験などの生化学的手法を駆使して研究を行った。

### 2.1 変異遺伝子及び変異株の作成

酵母の遺伝子変異体はオリゴ 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。また、遺伝子破壊株なども PCR をもとにした遺伝子破壊コンストラクトを酵母細胞に導入し、薬剤選択したのち、遺伝子が破壊されていることを PCR で確認した。

### 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  $\beta$ -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。

MAPK の活性化は、そのリン酸化型タンパク質を特異的に検出するリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解

析によって解析した。

### 2.3 タンパク質結合の解析

異種タンパク質間の結合は、免疫共沈法により解析した。

## 3. 結果

### 3.1 Ste50 は異なる MAPK 経路の MAPK である Hog1、Fus3、Kss1 によってリン酸化される

#### 3.1.1 Ste50 は高浸透圧依存的にリン酸化される

共沈実験により Opy2 と Ste50 は結合することがわかったが、興味深いことに 0.4 M NaCl 存在下その結合性は低下した(図3 A)。このとき、GST タグと融合した Ste50 の泳動度がわずかに遅れる現象を見いだしたので、Ste50 の翻訳後修飾が Opy2 との結合性に関わる可能性を検討した。翻訳後修飾の検出を容易にするため GST より分子量の小さい HA タグをつけた Ste50 を使って解析したところ、図3 B に示すように NaCl 添加により SDS-PAGE での電気泳動度が遅い Ste50 の分子種がバンドシフトとしてはっきりと検出された。このタンパク質を試験管内でホスファターゼ処理するとバンドシフトが消失したことから、Ste50 のバンドシフトはリン酸化修飾によることがわかった(図3 C)。

#### 3.1.2 Ste50 は複数の MAP キナーゼによりリン酸化される

変異株を使った詳細な解析などから、Ste50 は高浸透圧により活性化される HOG 経路の Hog1 MAP キナーゼによりリン酸化されるとともに、別の MAPK 経路である接合経路の Fus3 及び Kss1 MAP キナーゼによってもリン酸化されることがわかった(図3 D, E)。MAP キナーゼがリン酸化しうるアミノ酸はプロリンが後に続くセリン、スレオニン(SP, TP)であることが知られており、Ste50 には図3 F で示す 7 カ所(N末に近い順に 1-7 とする)が知られている。これらのアミノ酸を一つずつ、あるいは複数の組み合わせでアラニン(A)に置換したところ、2、3、4、5、6 の 5 カ所をまとめて A 置換した場合 (= Ste50-23456A、あるいは Ste50\* と表記)、リン酸化による Ste50 のバンドシフトは消失した(図3 G, H)。以上より、Ste50 は MAP キナーゼによりその 5 カ所でリン酸化を受けることが明らかになった。

#### 3.1.3 高浸透圧刺激による Ste50-Opy2 結合性の低下と Ste50 リン酸化の関与

図3 A に示すように細胞を 0.4 M NaCl 処理すると Ste50

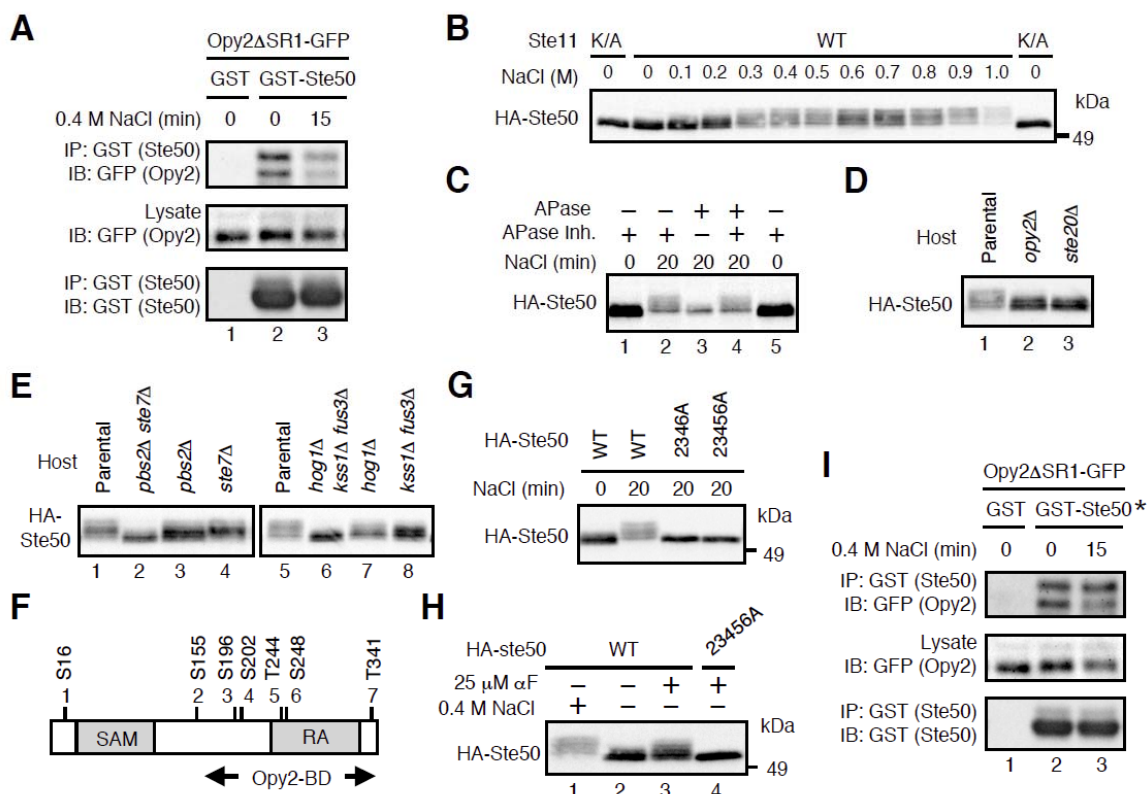


図 3

とOpy2との結合性が低下した。これに対しMAPキナーゼによるリン酸化を受けない Ste50-23456A (=Ste50\*)は 0.4 M NaCl 処理しても Opy2 との結合性は変わらなかった。このことは高浸透圧刺激により、Ste50 と Opy2 との結合性が負に制御されている可能性を示した。

### 3. 2 リン酸化による Ste50-Opy2 結合性の低下と HOG 経路の負の活性制御機構

#### 3. 2. 1 Ste50 リン酸化は Opy2 との結合性を低下させる

Ste50 のリン酸化による Opy2 との結合性への影響を *in vitro* の共沈実験により詳細に調べた。Ste11 活性型変異タンパク質(Q/P)を発現させて活性化した MAP キナーゼによりリン酸化を受けた Ste50(P)、あるいはキナーゼ活性を失った Ste11(K/A)変異タンパク質と共発現した非リン酸化型 Ste50(U) を含むタンパク質抽出液と、Opy2 を含むタンパク質抽出液をそれぞれ試験チューブ内で混合して両者の結合をみたところ、リン酸化型 Ste50 は非リン酸化型 Ste50 に比べて Opy2 との結合性が顕著に低下していた(図4 A)。一方、リン酸化を受けない Ste50-23456A タンパク質では、MAP キナーゼの活性化に依存した Opy2 との

結合性の低下は認められなかった(図4 B)。また、Ste50 のリン酸化は結合タンパク質の Ste11 との結合性には影響を与えなかったことから、Ste50 のリン酸化は Ste50-Opy2 との結合を特異的に抑制していることがわかった。

#### 3. 2. 2 Ste50 のリン酸化は HOG 経路活性化の持続時間を負に制御する

Ste50 がリン酸化されて Opy2 との結合性が低下することが、いかなる生物学的意味をもつのか、HOG 経路の高浸透圧刺激後の活性化状態を経時的にモニターすることで検討した。HOG 経路の活性化の指標であるリン酸化型 Hog1 (P-Hog1) について、特異的に検出可能なリン酸化抗体を使い、高浸透圧刺激後の量の推移を調べた。その結果、野生型 Ste50 を発現する細胞に比べて、Ste50-23456A を発現する細胞では HOG 経路の活性化(Hog1 がリン酸化されている状態)が遷延することを見いだした(図4 D)。さらに、HOG 経路の負の制御因子である Ptp2 を発現しない細胞で Ste50-23456A を発現させると、Hog1 リン酸化の遷延の程度はさらに増強された。以上のことから、HOG 経路活性化の負の制御機構として、経路の下流における Ptp2 ホスファターゼによる Hog1 の脱リン酸化を

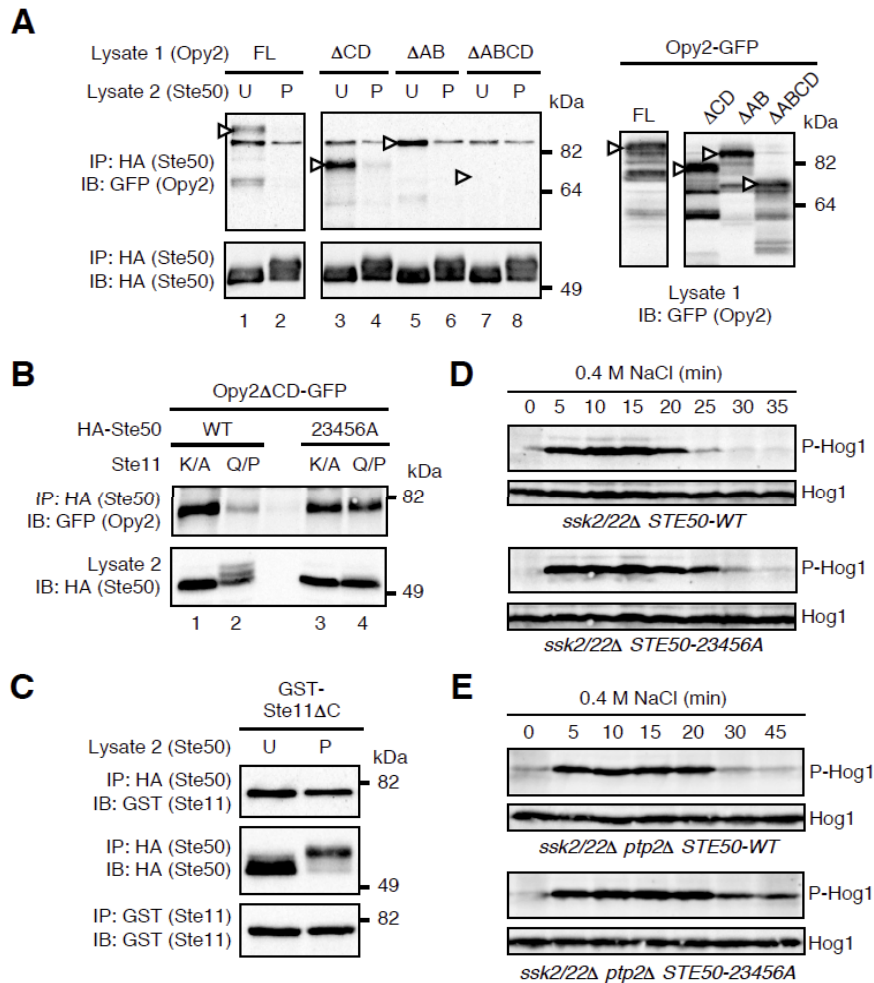


図 4

介した抑制メカニズムに加えて、Ste50 のリン酸化を介して Ste50 と Opy2 解離させることで経路の上流でシグナルの流れを遮断する機構が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酵母のストレス応答シグナル伝達経路 (HOG MAPK 情報伝達経路) の活性を負に制御するフィードバック経路を新たに見いだした。HOG 経路活性化の重要ステップである Ste11 MAPKKK の膜移行は Ste11 結合タンパク質 Ste50 と膜タンパク質 Opy2 の結合を介してダイナミックに制御されており、経路活性化に続いておこる Ste50 リン酸化とそれに伴う Ste50 と Opy2 の解離により上流からのシグナルは遮断され、さらなる経路の活性化が抑制されることがわかった。HOG 経路の負の制御機構として、活性化した Hog1 を Ptp2 ホスファターゼが脱リン酸化・不

活化する制御が経路の最下流で働くことが知られていたが、Ste50-Opy2 の解離を介した制御は経路の上流での制御機構であり、異なる二つの制御機構により、非刺激状態における不必要な HOG 経路の活性化を抑えるとともに、高浸透圧環境適応後、HOG 経路活性化の強さ、持続時間を精巧に制御することが可能になる。このシステムは自動車のクラッチとブレーキによる二重の速度制御機構に例えることが可能で、Ste50-Opy2 のシグナルを遮断する機構が動力伝達を遮断するクラッチの役目、Ptp2 による Hog1 の脱リン酸化を介した Hog1 の不活性化が直接回転する車輪の動きを抑えるブレーキの役目を果たしていると思える。細胞外の高浸透圧環境に迅速かつ適切に適応する機構として、本研究で見いだされた機構が使われていると考えられる。

Ste50 のリン酸化は高浸透圧環境で活性化される Hog1 MAPK キナーゼのみならず、接合経路の活性化に関わる

Fus3/Kss1 MAP キナーゼによってもリン酸化されることが本研究で明らかになっている。HOG 経路や接合経路では共通する複数の因子をそれぞれのシグナル伝達に使っているにもかかわらず、固有の刺激に対して対応する経路だけが活性化を起こす。こうしたシグナル特異性を規定する要因は複数考えられるが、例えば接合フェロモンにより活性化された接合経路の Fus3/Kss1 MAP キナーゼによる Ste50 のリン酸化を介して HOG 経路の活性化が抑制され、結果的に接合経路のみの活性化が可能になるという、いわゆるクロストーク制御を実現している可能性が考えられる。今後は我々が見いだした Ste50 リン酸化を介した負の活性制御機構が MAPK 経路内のみならず、異種 MAPK 経路間で機能している可能性を実験的に検証していきたいと考えている。

#### 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) Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, and Saito H. (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1289-1297
- 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) 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. 0907

## Molecular Mechanism of the High-Osmolarity Responsive MAPK Pathway That Is Involved in Salt- and Osmo-Tolerance in Yeast

Kazuo Tatebayashi, Katsuyoshi Yamamoto, 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.

Membrane localization of the Ste11 MAPKKK is essential for activation of both the filamentous growth/invasive growth (FG/IG) MAP kinase (MAPK) pathway and the SHO1 branch of the osmoregulatory HOG MAPK pathway, and is mediated by binding of the Ste50 scaffold protein to the Opy2 membrane anchor. Here we show that Ste50 phosphorylation by the MAPKs activated by the HOG or the mating pathway dissociates Ste50 from Opy2, thereby preventing excessive activation of the HOG pathway, or reduces the basal activity of the mating MAPK pathway. Thus, dynamic regulation of Ste50-Opy2 interaction fine-tunes the MAPK signaling network.