

浸透圧応答 MAP キナーゼ細胞内情報伝達経路の研究 Osmoregulatory MAP kinase signal transduction pathway

齋藤 春雄 (SAITO HARUO)
東京大学・医科学研究所・教授



研究の概要

本研究は、細胞の環境ストレス適応機構の一般原理を解明するため、高度に発達した遺伝学的手法が適用できる出芽酵母をモデル系として活用し、1) 細胞が浸透圧変化を感知し細胞内シグナルを生成する機構、2) 細胞内での HOG シグナル伝達経路の制御機構の解明を目指す。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内シグナル伝達、ストレス応答、MAP キナーゼ、浸透圧センサー、酵母

1. 研究開始当初の背景

浸透圧変化に対する細胞の適切な応答は、原核細胞から高等動物に到る全ての生物の生存に不可欠なものであるが、その分子機構が比較的詳しく解明されているのは原核細胞のみであった。そこで、一步進めて真核細胞である酵母をモデル系とし、高浸透圧適応を制御する High Osmolarity Glycerol (HOG) シグナル伝達経路の解明に取りかかった。今回の計画は前回の基盤研究 (S) の成果をもとに発展を目指すものである。

2. 研究の目的

浸透圧応答には、浸透圧変化を感知する浸透圧センサーと、細胞内での情報伝達機構とが必要である。特定イオン種に依存せず浸透圧変化そのものを検出するメカニズムは、原核細胞においてすら不明な点が多い。また、浸透圧に応答する Hog1 MAP キナーゼ

(MAPK) シグナル伝達経路は、接合フェロモンに応答する Fus3 MAPK 経路や貧栄養環境に応答する Kss1 MAPK 経路と、シグナル伝達因子を多数共有している。各経路がいかんして独自性を維持しているかは、細胞内情報伝達一般にも関わる重要課題である。

このような観点から、1) 細胞が浸透圧変化を感知し細胞内シグナルを生成する機構、2) 細胞内での HOG シグナル伝達経路の制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

細胞が浸透圧のような物理的性質に応答する仕組みを解明するには、応答に異常の見られる変異株の分離とその原因遺伝子の同定、さらにその遺伝子産物の機能の細胞生物学的・生化学的解析、という手法が極めて有効である。加えて、細胞の応答を定量的に測定するための遺伝子発現リポーター、高い時空解像度で測定することの出来る FRET リポーターなども活用する。

4. これまでの成果

1) 浸透圧変化を感知し細胞内シグナルを生成する機構

i) リチンに類似した多糖化タンパク質 Hkr1 および Msb2 は、SHO1 支経路に関わる第二種浸透圧センサーである。Hkr1/Msb2 の糖鎖領域が短いほど、弱い浸透圧ストレスで活性化することがわかった。Hkr/Msb2 の活性化に必須なドメインが、高浸透圧下では糖鎖領域の構造変化により露出し、Sho1 や Opy2 などと相互作用するものと考えられる。

ii) HOG 経路に関与する未知の情報伝達因子の探索を系統的に行い、Spa2、Sph1、Bem1、Bud6 などを見出した。細胞極性を制御することの知られているこれらの因子の関与は、細胞極性と高浸透圧応答との関連をも示唆している。

iii) HOG 経路における、膜アンカータンパク質 Opy2 の機能を明らかにした。Opy2 は、Ste11 MAPKKK と結合した Ste50 との結合によって Ste11 を膜局在化する。Cdc42-Ste20、Opy2-Ste50-Ste11 および Sho1-Pbs2 の各複合体がそれぞれ膜に局在することで、Ste20-Ste11 間あるいは Ste11-Pbs2 間の効率よい相互作用が起こると考えられる。

iv) Opy2 の細胞質外領域には進化的によく保存された Cys-rich 領域(CRD)がある。CRD を欠失した変異では、シグナル伝達能がほとんど失われていた。Opy2 の CRD と Sho1、Hkr1/Msb2 とが浸透圧刺激によって相互作用し、Ste20-Ste11 および Ste11-Pbs2 の相互作用を引き起こすと予想される。

2) 細胞内情報伝達の制御機構

v) Hog1 MAPK や Kss1 MAPK が活性化すると Ste50 がリン酸化されて Opy2 への結合能を失う。その結果、これらの MAPK 経路が負にフィードバック制御されることを見出した。

vi) Hog1 を活性化する Pbs2 MAPKK、Hog1 を不活性化する Ptp2 チロシンホスファターゼが、それぞれ Hog1 の 2 箇所のドッキングサイトに特異的に結合することを見出した。

vii) Opy2 の B サイトが高グルコース環境で Yck1/2 キナーゼによるリン酸化を受けて初めて Ste50 に結合出来るようになることを解明した。HOG 経路が、浸透圧の他、環境グルコース濃度による制御をも受けることが分かった。

viii) 高浸透圧に応答する Hog1 MAPK と貧栄養などに応答する Kss1 MAPK との間には相互の阻害反応があること、いずれかが活性化すると他方の活性化を抑制して適切な MAPK のみが活性化するような仕組みになっていることがわかった。

ix) Ssk1 の二量体化による Ssk2/Ssk22 MAPKKK 活性化制御機構を明らかにした。

5. 今後の計画

昨年度までの成果をもとに、以下の項目についての研究を推進する。

i) HOG 経路活性化における膜アンカータンパク質 Opy2 の機能。Opy2 の Cystein-rich (CR) 領域と膜貫通 (TM) 領域の機能を解析する。また、HOG 経路に関与する 4 種の膜タンパク質 (Hkr1、Msb2、Opy2、Sho1) の動的相互作用を解析する。

ii) Opy2 細胞質領域のリン酸化・脱リン酸化による HOG 経路の制御機構。Opy2 を脱リン酸化するホスファターゼを、変異株スクリーニングにより同定する。さらにそのホスファターゼ活性の制御機構、クロストーク制御への関与などを解明する。

iii) HOG 経路にかかわる新規因子の機能解析。昨年度までに、HOG 経路に関与する未知の情報伝達因子の探索を系統的に行い、Spa2、Sph1、Bem1、Bud6 などを見出した。今後は、これらの因子の HOG 経路における機能を明らかにする。

6. 発表論文 (研究代表者は二重下線)

1. Yang, H.-Y., Tatebayashi, K., Yamamoto, K., and Saito, H. Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. **EMBO J.**, 28: 1380-1391 (2009)
2. Tomida, T., Takekawa, M., O'Grady, P., and Saito, H. Stimulus-specific distinctions in spatial and temporal dynamics of stress-activated protein kinase kinase revealed by a fluorescence response energy transfer biosensor. **Mol. Cell. Biol.**, 29: 6117-6127 (2009)
3. Murakami, Y., Tatebayashi, K., and Saito, H. Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 Mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. **Mol. Cell. Biol.**, 28: 2481-2494 (2008)
4. Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., and Saito, H. Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 MAP kinase kinase in the yeast HOG osmoregulatory pathway. **Mol. Cell. Biol.**, 28: 5172-5183 (2008)
5. Arimoto, K., Fukuda, H., Imajo-Ohmi, S., Saito, H., and Takekawa, M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. **Nature Cell Biol.**, 10: 1324-1332 (2008)
6. Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. **EMBO J.**, 26: 3521-3533 (2007)
7. Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q., and Saito, H. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. **Mol. Cell. Biol.**, 27: 2765-2776 (2007)

ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/MolCellSignal/>