

論文審査の結果の要旨

氏名 佐藤直人

本論文は、出芽酵母の浸透圧応答経路(Hog1 経路)の一つである Sln1 経路が、その構成因子、Ssk1p、の蛋白質分解による制御を受けることを明らかにし、この蛋白質分解の生理的機能について述べている。

細胞は、外環境の変化に対して適切に応答し恒常性を維持するための機構を備えている。中でも浸透圧応答は、細菌から高等動植物まであらゆる細胞に普遍的に存在する機構である。酵母の浸透圧応答に関与する情報伝達経路の根幹を構成するのが、ストレス応答性 MAP キナーゼカスケードの Hog1 (High osmolarity glycerol response) 経路である。浸透圧応答経路はさらに、細胞膜で浸透圧の変化を検知して Hog1 経路を活性化するセンサー部と、Hog1 経路により活性制御を受け浸透圧応答に関与する標的蛋白質群を含む。本研究において解析の対象としたのは、浸透圧センサー部のうち、蛋白質間のリン酸基転移により Hog1 経路の活性を制御する経路である。浸透圧ストレスが存在しない状態では、細胞膜上のヒスチジンキナーゼ Sln1p からホスホトランスミッター Ypd1p、さらにレスポンスレギュレーター Ssk1p へのリン酸基転移機構が機能している。リン酸化型 Ssk1p は、Hog1 経路の構成因子である Ssk2/22p (MAPKKK) を活性化せず、浸透圧応答は起こらない。細胞が高浸透圧にさらされると、上記のリン酸基転移機構が不活性化され、非リン酸化型 Ssk1p の量が増大する。非リン酸化型 Ssk1p は Ssk2/22p と結合して活性化し、これにより Hog1 経路が活性化されて浸透圧応答が起こる。このように Ssk1p の活性制御にはリン酸化の有無が重要である。一方、Ssk1p はユビキチン-プロテアソーム系により蛋白質分解を受けることによっても制御される。

Ssk1p は C 末端領域に、Ypd1p からのリン酸基転移に必要なレシーバードメインと呼ばれる領域を有する。一方、ホモロジーサーチにより、Ssk1p の N 末端領域にユビキチン様 (UBL) ドメインが存在することを見出した。このことから、Ssk1p がユビキチン-プロテアソーム系と相互作用することが示唆された。まず、Ssk1p がプロテアソームの活性により分解される可能性を検討した。19S プロテアソーム調節因子のサブユニットの変異株 *rpn9Δ* および *rpn12-1* において、ガラクトース誘導性プロモーターの下流で Ssk1p (C 末端に HA タグを付加した) を一過的に発現させた後、シクロヘキシミドを含むグルコース培地に移すことにより転写・翻訳を抑制して制限温度下で培養し、Ssk1p の安定性をウェスタンブロットングにより評価した。その結果、*rpn9Δ* および *rpn12-1* 変異株においては、野生株の場合と比較して Ssk1p の安定性が高まっており、Ssk1p がプロテアソームによる蛋白質分解を受けていることが示された。Ssk1p の活性はリン酸化、脱リン酸化により制御されているが、これらのリン酸化状態と蛋白質の安定性との関連を検討した。YPD1⁺ 株と *ypd1Δ* 株において上記と同様に Ssk1p の安定性を検討したところ、*ypd1Δ* 株においては YPD1⁺ 株と比較して Ssk1p の安定性が低く、さらに RPN9 を欠損させることにより Ssk1p の安定性が上昇した。このことから、非リン酸化型 Ssk1p はリン酸化型 Ssk1p よりも不安定であり、これはプロテアソーム依存的に分解されることによるものであると考えられる。なお、Ssk1p と結合できるがリン酸基転移はできない Ypd1(H64Q)p を発現させても Ssk1p の安定性は上昇しないことから、Ypd1p-Ssk1p 相互作用の有無ではなく、Ssk1p のリン酸化状態自体が安定性の決定要因であることが示された。

最近の網羅的なプロテオーム解析[Nature 415, 180- 183 (2002)]により, Ssk1p が Ssk2p, Ubc7p, ユビキチンと複合体を形成することが示唆された。そこで、Ssk1p が Ubc7p 依存的 ERAD 経路により分解される可能性を検討した。YPD1+株においては、UBC7 の有無に関わらず Ssk1p は比較的安定であったが、ypd1Δ株においては、UBC7 を欠損させた場合に UBC7 を保持する場合と比較して Ssk1p の安定性が上昇していた。また、UBC7 の過剰発現により Ssk1p の安定性は低下した。これらの結果は、非リン酸化型 Ssk1p が Ubc7p の機能により選択的にユビキチン化を受け、分解されることを示唆する。さらに、ERAD 経路において Ubc7p と協調して機能する Hrd1p (Ubiquitin ligase, E3) を欠損した場合、Ssk1p の安定性が増大したことから、Hrd1p が Ssk1p の分解における E3 として機能することが示された。なお、SSK2 および 22 を欠損しても非リン酸化型 Ssk1p の安定性に顕著な変化は観察されず、Ssk2/ 22p 自体は Ssk1p の安定性の制御には関与しないことが示唆された。UBC7 を欠損すると Ssk1p の分解能力が低下し、Hog1 経路が過剰に活性化されると考えられた。実際に ubc7Δ株においては、SSK1 の過剰発現により細胞の生育が阻害された。さらに、ubc7Δ ptp2Δ株 (Ptp2p は Hog1p の不活性化に関与するホスファターゼ) においては、この阻害効果は増強されて細胞が致死となった。この致死性は HOG1 を欠損させると抑圧されたことから、Ubc7p はホスファターゼと協調して Hog1 経路を負に制御することが示唆された。さらに、ubc7Δ株に浸透圧刺激を与えた後に Hog1p のリン酸化状態をモニターしたところ、浸透圧応答終了後もリン酸化 Hog1p の量が高く維持されていた。従って、Ubc7p は主に浸透圧応答終了後に非リン酸化型 Ssk1p を分解することにより Hog1 経路を不活性化すると考えられる。

細胞の浸透圧応答が終了した時点では、非リン酸化型 Ssk1p が通常の条件と比較して過剰に存在していると考えられる。このような非リン酸化型 Ssk1p は Ssk2/ 22p と結合し、浸透圧ストレスの非存在下で Hog1 経路を活性化する可能性がある。Ubc7p は非リン酸化型 Ssk1p の分解を促進することにより、Ypd1p による Ssk1p の不活性化機構およびホスファターゼによる Hog1p の不活性化機構と協調して、Hog1 経路を負に制御すると考えられる。

Ssk1p の分解経路は新奇の Hog1 制御に係わるという発見は論文として公表された。論文は共著であるが、本研究の立案、実行は申請者によるもので、他の共著者は指導教官と実験材料の提供者である。申請者が博士（理学）の学位を受けるのに十分な専門知識および研究能力を有することが審査員全員によって認められた。