

## 論文内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成14年度 進学

氏 名 谷川 美頼  
指導教員名 豊島 近

論文題目 酵母の浸透圧応答における膜タンパク質 Sho1p と WASP ホモログ  
Las17p の機能解析

### はじめに

細胞は絶えず変化する環境に適応し生き抜くための多様な適応応答機構を備えている。外界からの刺激は、その刺激に対するセンサーを活性化させ、細胞内へ情報を伝達し、適切な応答反応を引き起こす。本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のストレス応答について解析している。第一章では、WASP ホモログである Las17p の解析からストレス時のアクチン骨格制御について考察する。第二章では、Las17p とストレス応答性 MAPK 経路の構成因子 Sho1p との結合解析から、MAPK 経路の特異性の保持機構について考察する。

### 第一章 浸透圧ストレス依存的な Las17p のリン酸化とアクチン骨格制御

<序論> 酵母は、高浸透圧、低浸透圧、過酸化水素、熱などの刺激をうけると、アクチンが脱局在する。しかし、実際にどのような分子メカニズムで脱局在が引き起こされるのか、またその生理的な意義については不明である。そこでわれわれは、アクチン重

合を制御する分子、Las17p のストレス時の振る舞いを解析することで、アクチン骨格制御についての知見を得ることを試みた。Las17p は *S. cerevisiae* における唯一の WASP ホモログである。WASP ははじめヒト遺伝性免疫疾患である Whiscott-Aldrich syndrome の原因遺伝子産物として同定された。その機能は、アクチン重合の核となる分子 Arp2/3 複合体を活性化してアクチン重合を活性化することである。Las17p も WASP と同様に Arp2/3 複合体を活性化する。Las17p はエンドサイトーシスや細胞極性の維持などアクチン重合を必要とする細胞内の様々なプロセスに重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、Las17p 自身の活性制御に関する知見は乏しい。本章では、Las17p がストレス依存的にリン酸化されることを見出し、その生理的意義について考察する。

#### <結果> 1) Las17p は浸透圧ストレス依存的に GSK-3 によってリン酸化される

Las17p が浸透圧ストレスによってリン酸化されることを見出した。このリン酸化は、浸透圧刺激後直ちに観察され、且つ一過的な現象であった。

次に Las17p のリン酸化を担うキナーゼの同定を試みた。その結果、GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) のホモログをコードする *MCK1*, *MDS1(RIM1)*, *MDK1*, *YOL128c* を四重破壊した *gsk-3Δ* 株において浸透圧依存的な Las17p のリン酸化が低下することを見出した。GSK-3 は、進化的に広く保存されたプロテインキナーゼで、様々な分子をリン酸化し、多くの経路を制御していることが知られている。実際に、GSK-3 が Las17p を基質とするのかを検討するために、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、Las17p は GSK-3 によってリン酸化された。この実験において、浸透圧刺激の有無で GSK-3 のキナーゼ活性に影響はなかったが、Las17p が浸透圧刺激に依存して GSK-3 以外のキナーゼにより予めリン酸化されることにより、GSK-3 によるリン酸化効率が上昇することが示された。一般に GSK-3 は、基質認識に他のキナーゼによる基質のリン酸化を必要とすることが多い。Las17p の場合も、未知のキナーゼによる Las17p のリン酸化が引き金となり GSK-3 のリン酸化が引き起こされるようである。

#### 2) 浸透圧刺激は Las17p の脱局在を引き起こす

次に Las17p の局在を免疫染色により観察した。ストレスを与えない細胞では、これまでの報告通り Las17p は bud tip や bud neck といった細胞伸長部に局在していた。しかし、細胞を浸透圧で刺激すると Las17p の脱局在が観察された。さらに、この脱局在における Las17p の刺激依存的なリン酸化の関与を検討するために、*gsk-3Δ* 株で Las17p の局在を観察した。その結果、*gsk-3Δ* 株では刺激後の脱局在する細胞の割合が有意に低下していた。このことは GSK-3 のリン酸化が、Las17p の細胞伸長部からの脱局在を引き起こしていることを示唆している。

4) *gsk-3Δ*株ではアクチンの脱局在は野生株より遅れて起こる

浸透圧刺激後、直ちに Las17p の脱局在が観察されるのに対して、アクチンの脱局在はそれよりもかなり遅れて起こる。このことからアクチンの脱局在は、Las17p のようなアクチン重合を制御する分子の脱局在によって引き起こされるのではないかと考えた。そこで、浸透圧刺激後も Las17p が局在を維持し続ける *gsk-3Δ*株のアクチンを観察した。その結果 *gsk-3Δ*株では、アクチンの脱局在は野生株よりも遅れて起こることがわかった。この結果は上に述べた仮説を支持しており、GSK-3 が浸透圧ストレス下でのアクチン骨格制御に関与していることを示唆している。今後、Las17p のリン酸化部位を同定し変異を導入することで、*gsk-3Δ*株と同様にアクチンの脱局在が遅延するか否かを検討したい。

## 第二章 浸透圧応答における膜タンパク質 Sho1p と WASP ホモログ Las17p の結合解析

<序論> 膜タンパク質 Sho1p は二つの MAPK 経路の構成因子である。一つは高浸透圧によって活性化される HOG 経路で、もう一つは栄養源飢餓によって活性化される擬菌糸形成経路である。どちらの経路においても Sho1p は遺伝学的に最上流に位置しており、センサーの一部であると考えられている。Sho1p は C 末端側の細胞質領域に SH3 ドメインをもつ。浸透圧ストレス時には、この SH3 ドメインを介して HOG 経路の MAPKK Pbs2p と結合して経路を活性化する。擬菌糸形成経路においては、どのように Sho1p が経路の活性化に関わっているのかについては不明である。また、Sho1p がもしセンサーであるとしたら、実際に何を感知し、二つの異なる経路を制御しているのかについても不明である。

近年、*S. cerevisiae* の各々の SH3 ドメインに対して結合するコンセンサスマチーフを同定した解析により、Sho1p の SH3 ドメインが Las17p 上の配列、<sup>311</sup>RPLPQLP<sup>317</sup>、と結合する可能性が報告された。Sho1p はアクチン近傍に局在することが知られており、アクチンの制御因子である Las17p との結合を示唆するこの報告は興味深い。そこで第二章では、Las17p と Sho1p の関係を明らかにすることを目標に行った。

<結果> 1) Las17p は Sho1p と浸透圧依存的に結合する

ホルマリンを用いた *in vivo* クロスリンク法により、生理的な条件下でのタンパク質間結合を検出する技術を確立した。これにより、Sho1p が Pbs2p のみならず、Las17p とも浸透圧刺激依存的に結合することを明らかにした。Sho1p と Las17p の結合は Sho1p と Pbs2p の結合と比較して、刺激後より早い時間の一過的なものであった。また、Las17p 上の Sho1p との結合が予想された配列の Pro314 に変異を導入した Las17p(P314A) 変異体は Sho1p と結合できないことを示した。

2) *las17(P314A)*変異株では、浸透圧刺激によって HOG 経路のみならず擬菌糸形成経

路の活性化がおこる

次に、*las17(P314A)*変異株の HOG 経路に与える影響を検討した。その結果、この変異株においても、野生株と同様に浸透圧依存的に HOG 経路は活性化され、高浸透圧培地での生育も可能であった。ただし、刺激直後は野生株より強く Hog1p がリン酸化されていた。

前述したように、Sho1p は擬菌糸形成経路の構成因子でもある。よって、この経路への *las17(P314A)*変異の影響も検討した。その結果、変異株では浸透圧刺激によって擬菌糸形成経路の MAPK Kss1p が強く活性化された。この結果は、Las17p は Sho1p と結合することで、擬菌糸形成経路へのクロストークを押さえていることを示唆している。

## 総合討論

第一章では、Las17p の浸透圧依存的な GSK-3 によるリン酸化と、Las17p の脱局在について述べた。*gsk-3Δ*株で浸透圧刺激による Las17p の脱局在が観察されないことは、GSK-3 のリン酸化が Las17p の脱局在を引き起こしていることを示唆している。Las17p は細胞伸長部でのアクチン重合の起点となっているという報告があり、Las17p の bud tip への局在により極性成長が促されていると考えられている。浸透圧刺激によって引き起こされる Las17p の脱局在の生理的意義とは、ストレス環境下での極性成長をキャンセルすることではないかと考えている。また、Las17p のリン酸化は *in vitro* で Sho1p との結合の低下をもたらしたが、Las17p の脱局在に Sho1p は必要ではなかった。従って、Las17p のリン酸化は Sho1p のみならず、他の局在を決定している分子との結合も阻害していることが予想される。今後は Las17p のリン酸化部位、及び GSK-3 によるリン酸化を引き起こすプライミングキナーゼの同定が課題であろう。

第二章では Las17p と Sho1p が浸透圧によって結合することを明らかにし、それが経路の特異性の保持に寄与している可能性を示した。HOG 経路には Sho1p によらないもう一方の上流経路、Sln1p 経路が存在するが、Sln1p 経路欠損株においては Kss1p の強いリン酸化が観察された。つまり Sln1p 経路には、擬菌糸形成経路を積極的に抑制する機構が存在するようである。またこの結果は、Sho1p が浸透圧ストレスによって HOG 経路のみならず擬菌糸形成経路も活性化しうることも示唆している。Sho1p と Las17p の結合の意義とは、刺激直後に HOG 経路、擬菌糸形成経路、双方の活性化を抑制し、Sln1p 経路の活性化により HOG 経路の特異性が確保されるための時間的猶予を与えることなのではないかと考えている。実際に野生株では Sho1p 経路は Sln1p 経路より遅れて活性化される。このことは、HOG 経路の特異性を確保する上で、その時間的要素もまた厳密に制御されていることを示唆している。