

論文内容の要旨

論文題目

Roles of docking site of Hog1 MAPK for regulation of the yeast HOG pathway

(出芽酵母 HOG 経路の活性制御における Hog1MAPK のドッキングサイトの機能)

氏 名 村上 優理亜

ストレス応答 MAP キナーゼは真核細胞に普遍的な機構であり、外部からのさまざまなストレスやサイトカインによって活性化され、ストレス適応に必要な遺伝子発現を誘導することでストレス適応、アポトーシス、細胞増殖、癌化、免疫応答などを制御する。ストレス応答 MAPK 経路において、MAP キナーゼカスケードとよばれる3つのタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）が細胞質から核へシグナルを運び、最終的に遺伝子発現に結びつける役割を果たしている。MAPKKK（MAP キナーゼキナーゼキナーゼ）から MAPKK（MAP キナーゼキナーゼ）、MAPK（MAP キナーゼ）へと至る連続したリン酸化反応による活性化を介して、シグナルが核に伝達される。ストレス応答 MAPK のプロトタイプである出芽酵母の Hog1 MAPK は、高浸透圧によって活性化される HOG（High Osmolarity Glycerol）経路において、ストレス応答遺伝子の発現に関わる転写因子や翻訳を制御するキナーゼの活性を制御する。

MAP キナーゼカスケードは近年、その制御機構の側面から研究が進められている。タンパク質のリン酸化反応において、キナーゼの酵素活性中心と基質のリン酸化部位との一過性の相互作用は、反応の特異性を規定する重要な要素と考えられている。それに加えて、酵素活性中心とは異なる部分で酵素と基質を安定に結合させることも、酵素反応の特異性、

確実性を規定する重要なメカニズムのひとつである。MAPK の非キナーゼドメインの C 末端に位置する酸性アミノ酸に富む配列は、活性化因子 MAPKK、制御因子ホスファターゼ、標的因子 MAPKAPK のいずれとも結合することが明らかになり、CD (common docking) ドメインとよばれている。CD ドメインは MAPK ファミリーに保存されており、CD ドメインを介したドッキングのシグナル伝達における重要性が報告されている。

シグナル特異性の維持に重要なもうひとつのメカニズムとして、足場 (scaffold) タンパク質がある。足場タンパク質は、シグナルカスケードを構成する分子群を空間的に接近させ、局所的にシグナル分子の濃度を上げることによりシグナル分子間の酵素反応を迅速かつ正確に行わせる役割を果たすと考えられている。HOG 経路の Pbs2 は、接合フェロモン経路の Ste5 とともに出芽酵母の MAPK カスケードで機能する足場タンパク質として知られている。Ste11 MAPKKK は HOG 経路だけでなく接合フェロモン応答 MAPK 経路においても機能するが、一方の刺激によって活性化された Ste11 が、誤って他方の応答経路の MAPKK を活性化することはない。このように足場タンパク質は、経路のシグナル分子と複合体を形成することで、異なる MAPK 経路間のクロストークを防ぐ重要なメカニズムでもある。

Pbs2 は自身が MAPKK として機能するのに加え、膜タンパク質 Sho1, Ste11 MAPKKK, Ssk2/Ssk22 MAPKKK, Hog1 MAPK と結合する足場タンパク質でもある。実際に、Sho1, Ssk2/Ssk22, アダプタータンパク質 Nbp2 と Pbs2 がそれぞれドッキングし、HOG 経路の活性化を制御することが示されている。しかしながら Hog1 との Pbs2 間の結合による HOG 経路の活性化機構の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、Hog1 の活性化機構を、シグナル制御に関わる特異的結合の観点から解明することを目的とした。

1. Pbs2 の Hog1 結合ドメインの同定とリン酸化シグナルへの影響

まず Hog1 を活性化する Pbs2MAPKK において、Hog1 に特異的に結合する領域を決定した。Pbs2 の N 末非キナーゼドメインに欠失領域をもつ Pbs2 変異体のプラスミドを系統的に作製し、in vivo 共沈法により Hog1 との結合を検討した。その結果、Pbs2 の 136-245 アミノ酸領域が Hog1 との結合に必要十分であることを見だし、この領域を HBD-1 (Hog1-Binding Domain-1) ドメインとした。この領域は、すでに決定されている Sho1 や Ssk2/Ssk22 との結合ドメインとは異なる、機能未知の領域であった。HBD-1 ドメインを欠いた Pbs2 変異体は、高浸透圧刺激による Hog1 のリン酸化 (活性化) が減弱したことから、HBD-1 ドメインが Hog1 との結合および活性化に関与していることが示された。

2. Hog1 の Pbs2 結合ドメインの同定とリン酸化シグナルへの影響

MAPK ファミリーに保存されており、CD ドメインを介したドッキングのシグナル伝達における重要性が報告されている。Hog1 MAPK の C 末非キナーゼドメインに欠失領域をもつ Hog1 変異体のプラスミドを系統的に作製し、*in vivo* 共沈法により Pbs2 との結合を検討した。その結果、CD ドメインに加え、CD ドメインに非依存的に Pbs2 に結合するドメインを見だし、PBD-2 (Pbs2-Binding Domain-2) ドメインとした。PBD-2 ドメインを含む(320-350 a.a) 断片だけで Pbs2 との結合がみられ、この断片の過剰発現によって野生型 Hog1 の高浸透圧刺激によるリン酸化がドミナントに抑制された。CD および PBD-2 ドメインの変異体を用いて高浸透圧刺激時の Hog1 のリン酸化におよぼす影響を調べた結果、どちらか一方のドメインを変異させた場合は Hog1 の脱リン酸化が抑制されたのに対して、両者をもとに変異させた場合には Hog1 はリン酸化されなくなった。2つのドメインの二重変異体において、HOG 経路活性化に特異的なレポーター遺伝子 *CRE-lacZ* の転写誘導や高浸透圧耐性も失われたことから、CD および PBD-2 ドメインは Hog1 の活性化に重要であることが示された。

3. Hog1 の CD および PBD-2 ドメインが Hog1 の不活性化に及ぼす影響

Hog1-CD および PBD-2 ドメインの二重変異体はリン酸化されないが、どちらか一方を変異させた Hog1 は脱リン酸化が抑制されたことから、ドメインの変異によって Hog1 とプロテインホスファターゼとの相互作用が変化していることが予想された。実際に、多くの MAPK において CD ドメインを介したホスファターゼとの結合が知られている。そこで、Hog1 の脱リン酸化（不活性化）に中心的役割をもつ Ptp2 プロテインチロシンホスファターゼとの結合に、Hog1 の2つのドメインが及ぼす影響の検討をおこなった。

先行研究により、Ptp2 と Hog1 の結合の安定性は、Hog1 のリン酸化状態に依存することが示されている。野生型 Ptp2 は Hog1 を脱リン酸化するため、リン酸化チロシンを基質とする野生型 Ptp2 と Hog1 の結合は不安定になるのに対し、酵素活性中心のシステインが変異した活性のない Ptp2-C/S 変異体は Hog1 と安定に結合する。Hog1-CD ドメイン変異体と Ptp2-C/S との結合を *in vivo* 共沈法で調べた結果、結合がみられなかったことから、Hog1-CD ドメイン変異体において脱リン酸化が抑制されたのは、CD ドメインを介した Ptp2 との結合が失われたためと考えられた。

これに対して、Hog1-PBD-2 ドメイン欠失変異体は Ptp2-C/S 変異体と安定な結合がみられた。さらに Hog1-PBD-2 ドメイン変異体のリン酸化状態と Ptp2 の結合性の関係を検討するため、Pbs2 破壊株を用いて野生型 Ptp2 との結合を *in vivo* 共沈法で同様に調べた。

その結果、Hog1-PBD-2 ドメイン欠失変異体はそのリン酸化状態によらず、野生型 Ptp2 とともに Ptp2-C/S 変異体とも構成的に結合することがわかった。

そこで、Hog1-PBD-2 変異体において脱リン酸化が抑制されるのは、PBD-2 変異体が Ptp2 の発現や活性に影響を及ぼすためか、あるいは PBD-2 変異体自身が脱リン酸化を受けにくい構造変化を起こしているためかを検討するため、野生型 Hog1 との共発現系で高浸透圧刺激によるリン酸化を調べた。その結果、共発現させた野生型 Hog1 の脱リン酸化は抑制されなかったことから、PBD-2 変異体が Ptp2 の活性に影響するのではなく、自身が脱リン酸化されにくい構造に変化している可能性が示された。一方、PBD-2 ドメインを含む断片が野生型 Ptp2 に結合したことから、Ptp2 との結合においても Hog1 の CD および PBD-2 ドメインが協調的に機能し、PBD-2 ドメインを介した Ptp2 との結合により、Hog1 のリン酸化チロシンが脱リン酸化されやすくなるよう構造が変化する可能性が示された。

以上の結果より、Pbs2、Ptp2 との結合による Hog1 の活性制御機構について、以下の仮説が導かれた。

(Step 1) Hog1 が Pbs2 に CD ドメインを介して結合する。

(Step 2) PBD-2 ドメインが露出し、PBD-2 ドメインを介した結合により Pbs2 との結合が安定化する。

(Step 3) Pbs2 によって Hog1 がリン酸化される。

(Step 4) リン酸化された Hog1 が CD ドメインを介して Ptp2 と結合する。

(Step 5) リン酸化された Hog1 が PBD-2 ドメインを介して Ptp2 と結合する。

(Step 6) PBD-2 を介した結合によりリン酸化チロシン(Tyr176) が Ptp2 の酵素活性中心で基質として認識される。脱リン酸化されると Ptp2 が Hog1 から解離する。

このように、Hog1 の PBD-2 ドメインは CD ドメインとともに、Pbs2 および Ptp2 との特異的結合を担っており、Hog1 の活性化および不活性化の制御に関与することが明らかになった。