

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 17 年度博士課程 進学

氏 名 寺島 農

指導教員名 豊島 近

論文題目 酵母浸透圧応答経路の新規活性化機構の解析

はじめに

細胞は、自身の恒常性を維持するために、外部環境からのストレスに対してさまざまな適応反応を有している。なかでも浸透圧ストレス応答は、あらゆる細胞に普遍的に認められるストレス応答反応である。酵母においても、浸透圧ストレスに応答して活性化される情報伝達経路が存在する。それがHOG (High Osmolarity Glycerol) 経路である。HOG経路には、MAPキナーゼ (MAPK) であるHog1p、およびMAPKキナーゼ (MAPKK) であるPbs2pという、中心的な役割を担う 2 つの因子が存在する。高浸透圧ストレス下でHog1pはPbs2pによりチロシンおよびスレオニン残基のリン酸化を受けて活性化する。活性化したHog1pは核へ移行し、浸透圧ストレス耐性に必要な遺伝子群の転写を制御する。

一方、Pbs2pを活性化する機構は 2 つの独立した経路が担う(図)。一方のSln1p経路はMAPKKキナーゼ (MAPKKK) であるSsk2p、およびSsk2pと機能が重複したSsk22pが、His-Aspリン酸基リレー系の構成因

子であるSsk1pに活性化されることにより、Pbs2pを活性化する。もう一方のSho1p経路はMAPKKKであるSte11pが、細胞膜アンカーSho1pにリクルートされることによりPbs2pを活性化する。

これまでHOG経路の活性化機構はこれら 2 つの経路以外は存在しないと考えられていた。なぜならこれら 2 つの経路が両方も機能しない変異株である*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株は高浸透圧ストレス下で生育不良となり、さらにHog1pのリン酸化(活性化)が検出できなかったからである。本研究で私はHog1pの活性化を高感度に検出することにより、*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株でも高浸透圧ストレス刺激に依存してHog1pが活性化されることを見出した。そこで、この活性化がどのようにして起こっているのか、その活性化機構を解析した。

HOG経路の新たな活性化機構「Input」の発見

これまでに*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株では、高浸透圧ストレス刺激に依存したHog1pの活性化は検出されていなかったものの、活性化されたHog1pによって転写誘導される浸透圧応答遺伝子群が誘導されることが知られていた。そこで*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株では本当に高浸透圧ストレス刺激に依存してHog1pが活性化されないのかどうか確かめるため、レポーターアッセイおよび高感度な発光試薬を用いたウェスタン解析により、Hog1pの活性化の検出を試みた。その結果、野生株より一過的で弱いものの、活性化されたHog1pがはっきりと検出された。さらに*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株は、野生株より生育は悪いものの、*hog1Δ* 破壊株が全く生育できない高浸透圧培地で生育できた。よって*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株では高浸透圧ストレス刺激に依存してHog1pが活性化され、その活性化が細胞の高浸透圧耐性に寄与することが示唆された。*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株において高浸透圧ストレス刺激に依存してHog1pを活性化する機構を以後「Input」、*ssk1Δ ste11Δ* 二重破壊株をInputのみによってHog1pが活性化される株という意味で「Input株」と呼ぶ。

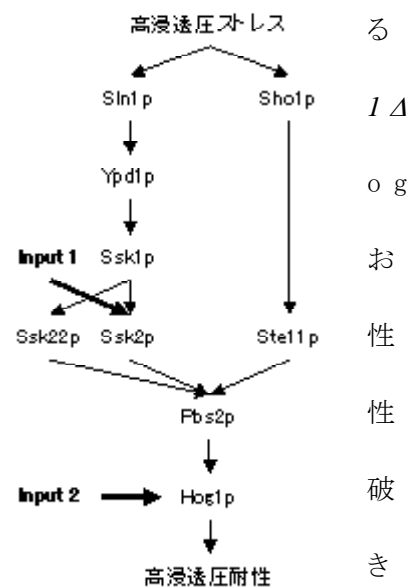


図 HOG経路の概略図

次にSsk1pおよびSte11pより下流に位置するHOG経路の構成因子Ssk2p、Ssk22pおよびPbs2pがInputによるHog1pの活性化に必要であるかどうか調べた。Input株のSSK2 またはPBS2 を破壊すると高浸透圧ストレス刺激に依存したHog1pの活性化は検出されず、かつ高浸透圧培地で生育できなかった。また、Input株のSSK22 を破壊しても高浸透圧ストレス刺激に依存してHog1pの活性化が検出され、かつ高浸透圧培地で生育できた。以上より、InputによるHog1pの活性化にSsk22pは必要なく、Ssk2pおよびPbs2pが必要であることが示された。しかし、InputによるHog1pの活性化に必要なSsk2pの機能はSsk22pの過剰発現により抑圧されることから、Inputに対するSsk2pとSsk22pの機能の違いは定量的なものであることが示唆された。

Inputの分子機構の解析

これまでの結果からInputが高浸透圧ストレス刺激に依存してHog1pを活性化する機構として 2 つの可能性が考えられた。1 つはSsk2pおよびPbs2pを介してHog1pを活性化する機構、もう 1 つは通常の浸透圧条件下ではHog1pの活性を低く抑えている負の制御因子を高浸透圧ストレス刺激依存的に不活性化することによりHog1pを活性化する機構である。高浸透圧ストレス刺激にさらされたInput株より精製したPbs2pのキナーゼ活性が亢進していたことから、前者の機構が存在することが示唆された。さらに恒常的活性化型であるPbs2^{DD}pもしくはSsk2 Δ Npを発現させたInput株でも、高浸透圧ストレス刺激に依存したHog1pの活性化が検出できたことから、後者の機構も存在することが示唆された。以後、前者の機構を「Input 1」、後者の機構を「Input 2」と呼ぶこととする(図)。

Inputの分子機構を明らかにするため、InputによるHog1pの活性化がおこらない「Input欠損株」を以下のようにして探索した。Input株に変異原EMS処理した約 40,000 クローンより、高浸透圧培地で生育できない 409 クローンの変異株を取得した。さらにこれらの変異株より高浸透圧ストレス刺激に依存したHog1pの活性化がおこらないInput欠損株 4 クローンを得た。これら 4 クローンのうち 3 クローンの原因遺伝子は、取得されると予想されたSSK2 およびPBS2 であった。もう 1 クローンは二重変異株で、原因遺伝子の 1 つはユビキチンリガーゼであるRsp5pであった。よってRsp5pがInputに関与している可能性が示唆された。

恒常的活性化型変異体であるPbs2^{DD}p によるHog1pのリン酸化が、高浸透圧ストレス刺激に応答して亢

進することから、Input 2 の分子機構にはHog1pの主な負の制御因子であるチロシンホスファターゼPtp2p、またはセリン/スレオニンホスファターゼPtc1pが関与していると考えられた。そこでInput株の*PTP2* もしくは*PTC1* を破壊した株でInputによるHog1pの活性化に影響があるかを調べたが顕著な差は見られなかった。よって他のホスファターゼの不活性化がInput2 によるHog1pの活性化に関与している可能性が示唆された。

まとめおよび今後の展望

以上より、新たなHog1pの活性化機構、Inputが存在することを示した。またInputによるHog1pの活性化にSsk2pおよびPbs2pが必要であることが示された。さらにその機構はSsk2pおよびPbs2pを介してHog1pを活性化する機構であるInput 1 と、通常の浸透圧条件下ではHog1pの活性を低く抑えているホスファターゼを高浸透圧ストレス刺激依存的に不活性化することによりHog1pを活性化する機構であるInput 2 の 2 つが存在することが示唆された。HOG経路に関する既知の情報を考え合わせると、Inputの生理的意義として 2 つのモデルが予想される。1つは未知の浸透圧センサーが高浸透圧を検知し、Hog1pを活性化するというモデル、もう 1 つはHOG経路以外のMAPK経路が経路同士の混線を防ぐためにHog1pを活性化するというモデルである。今後、Inputの分子機構の詳細を解明することで、その生理的意義を明らかにすることができると考えられる。