

**Identification and characterization of the scaffold protein Ahk1, which functions in the yeast osmoregulatory Hog1 MAPK pathway**  
(出芽酵母の高浸透圧応答 HOG 経路に関する新規足場タンパク質 Ahk1 の同定と機能解析)

西村晶子

出芽酵母の HOG 経路は高浸透圧適応に働く情報伝達経路で、真核生物に広く保存されているストレス応答経路の原型である。HOG 経路では SHO1、SLN1 という独立の上流支経路で高浸透圧が感知され、それぞれの MAPKK キナーゼ (Ssk2/22、Ste11)、共通の Pbs2 MAPK キナーゼ、Hog1 MAP キナーゼにリン酸化の形で活性化シグナルが伝達される。活性化 Hog1 は基質のリン酸化、転写制御などを介し高浸透圧適応に働く(図 1)。

SHO1 支経路はさらに HKR1、MSB2 の副支経路に分かれる。HKR1 副支経路では高浸透圧センサーの Hkr1 が Sho1 センサー、Opy2 膜アンカーと協同して高浸透圧を感知し経路下流へ情報を伝達する。MSB2 副支経路では、Hkr1 と重複した機能を持つ Msb2 がセンサーとして、Sho1、Opy2 と協同的に高浸透圧感知を行う。Hkr1、Msb2 はいずれもムチン様一回膜貫通タンパク質で、細胞外領域の構造は類似しており、HOG 経路を正負それぞれに制御するドメインを有する。しかしその細胞内領域

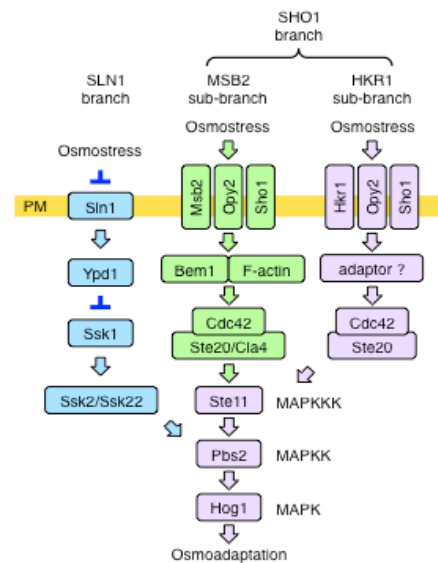


図 1 HOG 経路の模式図

(Hkr1-cyto / Msb2-cyto) の配列に相同性は見られず、それぞれの副支経路特異的な機能を持つと予想される。近年 Msb2 は足場タンパク質 Bem1 と結合し、Ste11 MAPKKK のキナーゼである Ste20 を膜近傍に誘導することで、Ste20 による Ste11 活性化を効率化していることが示された。しかし Hkr1 は Bem1 や Ste20 とは結合せず、Msb2 とは異なるメカニズムにより細胞内のシグナル伝達を行っていると考えられる。しかし Hkr1-cyto の詳細な機能は未解明だった。

Hkr1-cyto を欠失させても、高浸透圧刺激による Hog1 の活性化には部分的な影響しか与えなかった。しかし恒常的活性型変異体 Opy2 や Ste50 による経路活性化は Hkr1-cyto の欠失により完全に阻害された。よって Hkr1-cyto は何らかの形で Hog1 の活性化に寄与していると考えられる。Hkr1-cyto の機能ドメインを特定する目的で、NCBI のデータベースを用いてホモロジーサーチを行ったが、酵母近縁種の Hkr1 ホモログ以外で Hkr1-cyto と似た配列をもつタンパク質は見つからなかった。Hkr1-cyto は既知の酵素配列も持たないことから、HOG 経路因子の結合サイトを持つと予想した。そこで FLAG タグを付加した Hkr1-cyto を酵母細胞内で過剰発現し、共沈降によって得られた Hkr1-cyto 結合タンパク質のマス解析を行った。その結果 Ydl073w, Rpn1, Vma2, Pgi1, Far1 の5つのタンパク質が Hkr1-cyto 相互作用因子の候補として単離された。このうち Rpn1 はプロテアソームのリガンド認識因子であることから、非特異的に結合したと予想される。また Vma2 は液胞に、Far1 は核に局在すること、Pgi1 は糖代謝にはたらく酵素であることから、これらの因子も候補から除外した。一方、Ydl073w はこれまでにハイスループットのツーハイブリッド解析によって Sho1 と結合することが示されており、HOG 経路で機能する Hkr1-cyto 結合因子であることが期待された。そこで Ydl073w を Ahk1 (Associated with Hkr1) と名付け解析を行った。

Ahk1 は 984 残基の比較的大きなタンパク質だが、シグナル配列や TM 様ドメインを持たない。しかし GFP を Ahk1 の C 末端に付加した Ahk1-GFP を *GAL1* プロモーターのもとで過剰発現すると、bud の先端や bud neck に局在した。これは Sho1 や Hkr1 と似た局在である。しかし SHO1 支経路上流のセンサータンパク質を全て欠失させた株 (*ssk2/22Δ sho1Δ hkr1Δ msb2Δ opy2Δ*) においても、Ahk1-GFP は同様の局在を示した。よって Ahk1 の局在は HOG 経路の膜タンパク質非依存的なものだと言える。Ahk1 の局在化がどのようなメカニズムによるものなのかは今のところわかっていない。また、NCBI ゲノムデータベース上で BLAST 検索を行った結果、Ahk1 のホモログはいわゆる *Saccharomyces complex* と呼ばれる *Saccharomycetaceae* (サッカロミケス科) に属する種のみが持っているタンパク質であることが分かった。Hkr1 のホモログもまた同様にこのファミリーにのみ保存されていた。また Ahk1 は Hkr1 とは結合する

が、Msb2 とは結合しなかった。このことから、HKR1 副支経路特異的な機能を持つことが期待された。また恒常的活性型変異体 Opy2 や Ste50 による経路活性化への AHK1 遺伝子破壊の影響を調べた結果、*ahk1Δ*株では恒常的活性型変異体 Opy2、Ste50 ともに HOG 経路活性が著しく低下した(Figure 2)。Ahk1 は Hkr1-cyto と同様、恒常的活性型変異体 Opy2 や Ste50 による HOG 経路活性化に必須であることが示された。

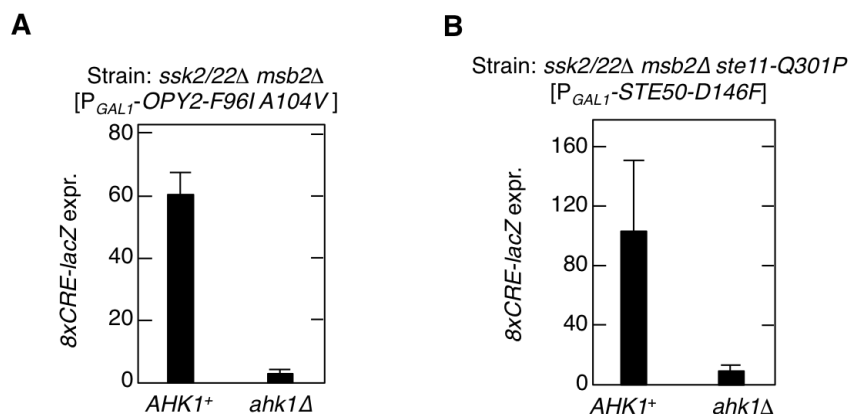


Figure 2 HOG 経路特異的レポーター遺伝子 *8xCRE-lacZ* を用いた経路活性測定  
*ahk1Δ*株に Opy2-F96I A104V(A)もしくは Ste50-D146F(B)と野生型 Ahk1 プラスミド、レポータープラスミドを導入し、恒常的活性型変異体を過剰発現させて HOG 経路活性を測定した。  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を Miller units で示した。エラーバーは SD を示す。(n $\geq$ 3)

そこで SHO1 支経路のシグナル因子との結合を共沈降実験により検討した結果、Ahk1 は Hkr1 に加えて SHO1 支経路の膜センサー Sho1、Ste11 MAPKKK、Pbs2 MAPKKとも結合することが明らかになった。Ahk1 は SHO1 支経路の膜センサー Sho1 の Src-homology 3 (SH3)ドメインと恒常的に結合した。Ahk1 は C 末端領域にプロリンに富んだ配列 (MKPLPVPKD) を持つ。標準的な SH3 ドメインの認識配列モチーフ (PXXP) とは異なるが、既知の Sho1 結合タンパク質である Pbs2 MAPKK の結合サイト (NKPLPPLPVA) と配列が似ていることから、このサイトを Sho1 の結合ドメインと予想した。そこで Ahk1 のこの配列に含まれるプロリンをセリンに置換した変異体 (Ahk1-3P/S) を作成し、Sho1 との結合実験を行ったところ、Ahk1-3P/S 変異体は Sho1 との結合が大きく損なわれた。よって Ahk1 は C 末端のプロリン配列を介して Sho1 の SH3 ドメインに結合していることが示された。続いて Ahk1 と Ste11 MAPKKK の結合ドメインを検討した結果、Ahk1 は Ste11 N 末端領域内の auto-inhibitory (AI)ドメインと恒常的に結合することがわかった。さらに Pbs2 MAPKK の N 末端 120-150 残基の領域と高浸透圧刺激依存的に結合することを確認した。さらに Ahk1 の Ste11,

Pbs2 それぞれの結合サイトについても詳細なマッピングを行い、結合領域を特定した。それぞれの結合ドメインは Ahk1 の C 末端の領域に集中していることが明らかになった。

HOG 経路は通常他経路の異常な活性化を抑制しており、高浸透圧刺激時には HOG 経路のみが応答を示す。しかし Pbs2 MAPKK や Hog1 MAPK を欠損した株では経路の混線が起こり Kss1 MAPK 経路が活性化する。これを cross-talk という。この cross-talk は MSB2 副支経路では強い活性を示すが、HKR1 副支経路では弱い活性化しか起こらない。HKR1 副支経路依存的にのみ cross-talk が起こる条件の下で AHK1 を欠損させると、cross-talk 活性が亢進した(Figure 3)。よって Ahk1 は HKR1 副支経

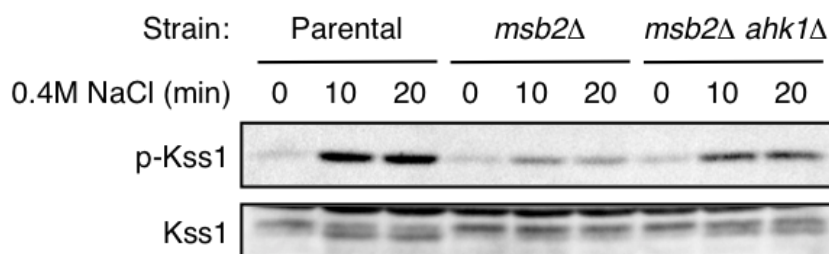


Figure 3 高浸透圧刺激による Kss1 リン酸化プロット

YPD 培地で対数増殖期まで培養した細胞に 0.4M NaCl 高浸透圧刺激を加え一定時間後に回収した。各レーンには 20 $\mu$ g のタンパク質を使用し、リン酸化 Kss1 と全 Kss1 の量を免疫ブロットにより決定した。Parental = *ssk2/22Δ hog1Δ*株

路から Kss1 MAPK 経路へのシグナルの混線を抑制し、HOG 経路の特異性を維持する機能を有していると考えられる。SHO1 支経路の各因子 (Sho1, Hkr1, Ste11, Pbs2) と Ahk1 の結合は、HOG 経路活性化だけでなく、cross-talk の抑制においても重要な機能を持つことが明らかになった。これらの結果より Ahk1 は、浸透圧センサーやキナーゼといった HKR1 副支経路の複数のシグナル伝達因子と結合し、HOG 経路活性化および経路混線の抑制において非常に重要な機能を持つ、HOG 経路新規足場タンパク質であると結論づけた。