

学位論文

**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 経路に関与する  
新規足場タンパク質 Ahk1 の同定と機能解析)

平成27年12月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

西村晶子

## 略語一覧

Table 1 本文中に使用する略語一覧

MAPK	mitogen-activated protein kinase
HOG pathway	High Osmolarity Glycerol pathway
STR domain	Ser / Thr rich domain
HMH domain	Hkr1-Msb2 homology domain
TM	transmembrane
cyto	cytoplasmic region 細胞内領域
BD	binding domain 結合領域
KD	kinase domain キナーゼドメイン
WT	wild type 野生型

## タンパク質名一覧

Table 2 本文中に登場する主なタンパク質名一覧

Ahk1	HKR1 副支経路ではたらく新規足場タンパク質
Hog1	HOG MAPK 経路の MAPK
Sln1	SLN1 支経路ではたらくセンサー膜タンパク質
Sho1	SHO1 支経路ではたらくセンサー膜タンパク質
Hkr1	HKR1 副支経路ではたらくセンサー膜タンパク質
Msb2	MSB2 副支経路ではたらくセンサー膜タンパク質
Opy2	SHO1 支経路ではたらくアンカー膜タンパク質
Bem1	MSB2 副支経路ではたらく足場タンパク質
Ste11	SHO1 支経路の MAPK キナーゼキナーゼ (MAPKKK)
Ssk2/Ssk22	SLN1 支経路の MAPKKK
Pbs2	HOG MAPK 経路の MAPK キナーゼ (MAPKK)
Ste50	SHO1 支経路ではたらくアダプタータンパク質

## Abstract

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。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 (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-F96I A104V や Ste50-D146F 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。さらに MSB 副支経路ではこれらの変異体による経路活性化はほとんど起こらなかったが、Msb2-cyto を Hkr1-cyto に置換すると、活性が亢進した。逆に Hkr1-cyto を Msb2 に置換すると活性が大きく減弱した。よってこれらの恒常的活性型変異体による HOG 経路活性化に Hkr1-cyto が必要であることがわかった。Hkr1-cyto のより詳細な機能解析のため、Hkr1-cyto の共沈タンパク質を質量分析法によって解析し、機能未知の Ydl073w を結合因子として同定した。そこで Ydl073w を Ahk1 (Associated with Hkr1) と名付け解析を行った。その結果、Ahk1 は Hkr1-cyto と同様、恒常的活性型変異体 Opy2 や Ste50 による HOG 経路活性化に必要であることが示された。また Ahk1 は Hkr1 とは結合するが、Msb2 とは結合せず、HKR1 副支経路特異的な機能を持つことが期待された。そこで HKR1 副支経路のシグナル因子と Ahk1 の結合を共沈降実験により検討した。その結果 Ahk1 は Hkr1 に加えて SHO1 支経路の膜センサー Sho1、Ste11 MAPKKK と恒常的に、Pbs2

MAPKK と高浸透圧刺激依存的に結合することが明らかになった。高浸透圧刺激によって HKR1 副支経路が活性化されても、Filamentous growth 経路の Kss1 MAPK は活性化されない。しかし *AHK1* を欠損させると、HKR1 副支経路を介した cross-talk による Kss1 の活性化が起こった。よって Ahk1 は HKR1 副支経路から他経路へのシグナルの混線を抑制し、経路特異性を維持する機能を有していると考えられる。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する足場タンパク質として HOG 経路活性化に寄与するとともに、経路特異性の維持にも重要なはたらきを持つと結論づけた。

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, osmostress activates the Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK), which regulates diverse osmoadaptive responses. The upstream of the HOG pathway comprises the functionally redundant, but mechanistically distinct, SLN1 and SHO1 branches. Each branch activates its specific MAPKKKs (Ssk2/22 and Ste11 respectively), which then sequentially activates common MAPKK Pbs2 and MAPK Hog1. The activated Hog1 regulates diverse osmoadaptive responses that include changes in the global pattern of gene expression and protein synthesis, and temporary arrest of the cell cycle at multiple phases to gain time for adaptation. Furthermore, the SHO1 branch itself also involves the two functionally redundant osmosensor Hkr1 and Msb2. Because the signaling mechanisms employed by Hkr1 and Msb2 appear to be significantly different, the SHO1 branch is further divided into the HKR1 and MSB2 sub-branches. Hkr1 and Msb2 are single-path TM proteins, and their extracellular regions share many structural and functional similarities. The extracellular regions of Hkr1 and Msb2 contain both a positive and negative regulatory domains. In contrast, the cytoplasmic regions of Hkr1 and Msb2 share no structural similarity and the signaling mechanism by which HKR1 or MSB2 sub-branch stimulates the Hog1 cascade seems specific to each pathway. The activation of Hog1 cascade by MSB2 sub-branch requires the scaffold protein Bem1. Msb2 cytoplasmic region binds to Bem1 and recruits the kinase Ste20 to the membrane where Ste20 can activate Ste11 MAPKKK. However Hkr1 cytoplasmic (Hkr1-cyto) region does not interact with Bem1 and the function of Hkr1-cyto is unknown.

I found that deletion of Hkr1-cyto only partially inhibited osmostress-induced Hog1 activation. However, the same deletion mutation completely inhibited Hog1 activation by constitutively-active mutants of Opy2 or Ste50, indicating that Hkr1-cyto participates in certain aspect of Hog1 activation. Using a mass spectrometric method, I identified a protein, termed Ahk1 (Associated with Hkr1), which binds to Hkr1-cyto. Hog1 could not be activated at all by constitutively-active mutants of the Hog1 pathway signaling molecules Opy2 or Ste50 in *ahk1* $\Delta$  cells, whereas robust Hog1 activation occurred in *AHK1*<sup>+</sup> cells. Thus the lack of Ahk1 and the lack of Hkr1-cyto had similar effects on Hog1 activation. I

confirmed that Hkr1 associated with Ahk1 by *in vivo* co-immunoprecipitation (co-IP) assay. In contrast, Msb2 did not bind Ahk1 at all, indicating that Ahk1 specifically bound to Hkr1. In addition to Hkr1-cyto binding, Ahk1 also bound to other signaling molecules in the HKR1 sub-branch, including Sho1, Ste11, and Pbs2. Although osmotic stimulation of Hkr1 does not activate the Kss1 MAPK, deletion of *AHK1* allowed Hkr1 to activate Kss1 by cross-talk. Thus Ahk1 is a scaffold protein in the HKR1 sub-branch, and prevents incorrect signal flow from Hkr1 to Kss1.

## 目次

### 1. イントロダクション

- 1.1 浸透圧ストレス応答
- 1.2 MAP キナーゼ経路
- 1.3 出芽酵母の MAP キナーゼ経路
- 1.4 High Osmolarity Glycerol (HOG) 経路
- 1.5 足場タンパク質
- 1.6 cross-talk
- 1.7 本研究の目的

### 2. 結果

- 2.1 高浸透圧センサーHkr1 の機能解析
- 2.2 nanoLC-ESI-MS/MS 解析を用いた Hkr1-cyto 結合因子のスクリーニング
- 2.3 Ahk1 は bud の先端や bud neck に局在する
- 2.4 Ahk1 は Hkr1-cyto に結合する
- 2.5 Ahk1 は恒常的活性型変異体 Opy2 および Ste50 による HOG 経路活性化に必須である
- 2.6 Ahk1 は Sho1 の SH3 ドメインを介して Sho1 と結合する
- 2.7 Ahk1 は高浸透圧ストレス依存的に Pbs2 MAPKK に結合する
- 2.8 Ahk1 は Ste11 MAPKKK と結合する
- 2.9 Ahk1 は HKR1 副支経路を介した cross-talk を抑制する

### 3. 考察

- 3.1 Ahk1 は HKR1 副支経路の足場タンパク質として HOG 経路を安定化する
- 3.2 Ahk1 は恒常的活性型変異体 Opy2, Ste50 による経路活性化に必須である
- 3.3 Ahk1 は HKR1 副支経路の経路特異性を維持する

### 4. 展望

- 4.1 Ahk1 の機能解析
- 4.2 HKR1 副支経路のシグナル伝達機構の解明



## 5. 実験方法

5.1 酵母株

5.2 培地、バッファー

5.3 プラスミド

5.4 レポーターアッセイ

5.5 *In vivo* 結合実験

5.6 ショットガンプロテオミクス解析法

謝辞

参考文献

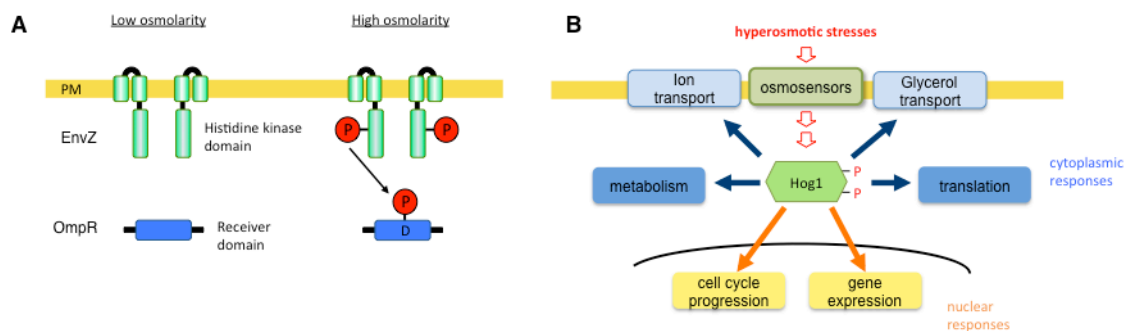
## 1. イントロダクション

### 1.1 浸透圧ストレス応答

浸透圧変化に適応することは、原核生物から高等動物に至るまであらゆる生物の生存に必須の機構である。高浸透圧刺激にさらされると、水やイオンが流出し、細胞内のイオンバランスが崩れる。ただちに適合溶質の取り込みや合成が行われて細胞内の浸透圧が上昇し、細胞外から再び水やイオンの取り込みが起こる。さらに真核生物では遺伝子発現制御等の長期的適応反応が起こる[1,2]。

#### 1.1.1. 原核生物の高浸透圧応答機構

原核生物は、高浸透圧を感知するとアミノ酸や糖などの適合溶質の取り込みを介して高浸透圧環境に適応する。原核生物においては、これが唯一知られている浸透圧変化適応方法である。原核生物は一般に膜に存在するヒスチジンキナーゼをセンサーとして浸透圧変化を感知する。特に大腸菌 *Escherichia coli* の浸透圧感知機構はよく知られている。*E. coli* の浸透圧感知経路は EnvZ と OmpR からなる。高浸透圧環境にさらされると、内膜の浸透圧センサー EnvZ の自己リン酸化が起こる。転写制御因子 OmpR へとリン酸化リレーが起こり、活性化された OmpR が下流の遺伝子の発現を制御する (Figure 1A) [3,4]。



**Figure 1** 高浸透圧ストレス応答 (A) *Escherichia coli* の EnvZ-OmpR 経路。高浸透圧環境下で EnvZ が活性化、リン酸化されると、OmpR にリン酸基転移が起こる。リン酸化された OmpR は高浸透圧応答遺伝子の発現を誘導する。(B) 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Hog1 MAPK による高浸透圧ストレス応答機構

#### 1.1.2 真核生物の高浸透圧応答機構

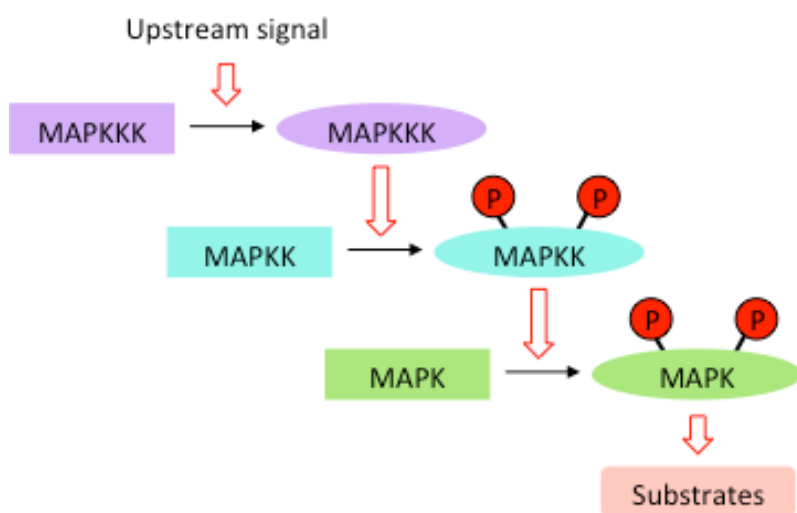
原核生物では高浸透圧センサータンパク質が直接転写制御因子を制御するのに対し、真核生物では複数の因子から構成される高浸透圧感知機構と下流の mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードからなるシグナル伝達経路によって高浸透圧応答

を行っている。最も研究の進んでいる出芽酵母ではHOG (high osmolarity glycerol) MAPK経路が高浸透圧刺激を受けて活性化する。リン酸化され活性化したHog1 MAPKは核へと移行し、グリセロールの合成や転写制御因子を介した高浸透圧応答遺伝子群の発現誘導により高浸透圧応答を行う。さらにHog1は細胞周期やタンパク質合成など様々な機構をコントロールしている(Figure 1B)。HOG経路の高浸透圧センサーの一つであるSln1は*E. coli*のEnvZとよく似た構造と機能を持ち、two-componentシステムによってシグナルを伝達する[5]。

哺乳細胞も、高浸透圧ストレスによって活性化されるMAPK経路を持つ。細胞内のMAPKカスケードは酵母からヒトまで高度に保存された経路を持つのに対し、哺乳細胞のシグナルカスケード上流で働くセンサータンパク質は特定されていない。進化の過程で、受容体型チロシンキナーゼやGタンパク質共役受容体など、センサー機能も複雑化してきた。哺乳細胞では、高浸透圧センサーもこのようなセンサーに代替されるようになった可能性があるが、詳細な高浸透圧感知機構は今のところ未解明である[6]。

## 1.2 MAP キナーゼ経路

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナル経路は真核生物の間で広く保存されているセリン・スレオニンキナーゼファミリーで、細胞増殖や分化、細胞死のように、多くの細胞のプログラムに関わる。MAPK シグナルカスケードは三階層のモジュールから構成される(Figure 2)。MAP キナーゼ (MAPK) は MAPK キナーゼ



(MAPKK) によってリン酸化され活性化する。MAPK キナーゼも同様に MAPKK キナーゼ (MAPKKK) によってリン酸化・活性化を受ける。MAPK 経路は様々な外部刺激によって活性化される。全ての真核生物は複数の MAPK 経路を持っており、それぞれ特異的な刺激を受容して適切な経路のみを

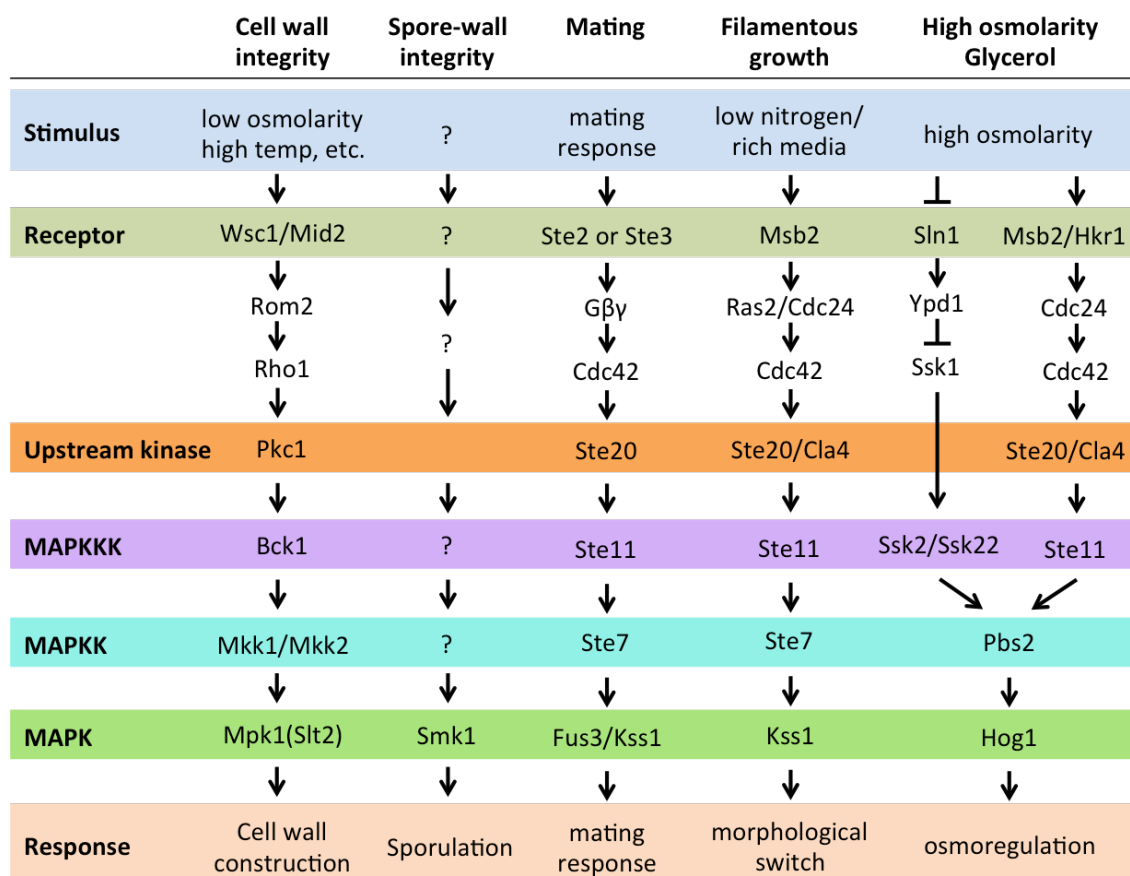
**Figure 2** MAPK シグナルカスケード

上流のシグナルが MAPKKK を活性化すると、下流へと連続的にシグナルが伝達される。

選択的に活性化する。哺乳類ではホルモンやサイトカイン、また紫外線や酸化ストレスなどの環境的刺激によって活性化する[7-9]。出芽酵母では、高浸透圧または低浸透圧ストレス、フェロモン刺激、飢餓ストレスなどによって、それぞれに対応した MAPK 経路が活性化する。活性化した MAPK は応答遺伝子群の転写やタンパク質合成、細胞周期の制御、さらには細胞死や分化によって、刺激に応答する[10,11]。

### 1.3 出芽酵母の MAP キナーゼ経路

出芽酵母は運動能を持たないため、様々な外環境からのストレスに適応する必要がある。出芽酵母は5つの MAPK シグナル経路を持つ。Cell-wall integrity 経路、Spore-wall assembly 経路、Filamentous growth 経路、Mating 経路、HOG 経路の5つである (Figure 3) [10]。



**Figure 3** 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の5つの MAPK 経路

### 1.3.1 Cell-wall integrity 経路

Cell-wall integrity 経路は細胞周期依存的な細胞壁合成や、細胞の成長、温度、低浸透圧等の環境ストレスに対する応答を司る。細胞表層でこれらシグナルを細胞内へと伝達しているセンサータンパク質は、1回膜貫通タンパク質の Wsc1 と Mid2 である。これらの膜タンパク質はグアニン交換因子 Rom2 を介して small G タンパク質 Rho1 を活性化し、Rho1 から下流のシグナルカスケードへと情報を伝達する[12]。Cell-wall integrity 経路の MAPK カスケードは、MAPKKK の Bck1、重複した機能を持つ MAPKK の Mkk1/Mkk2、MAPK の Mpk1 (Slt2)からなる。このカスケードが活性化されると下流の転写因子 Rlm1, Swf4, Swf6 などにより細胞壁合成に必要な遺伝子の転写が誘導される[13]。

### 1.3.2 Spore-wall assembly 経路

Spore-wall assembly 経路は、胞子形成にはたらく MAPK 経路である。胞子形成は複数のステップからなる。まず通常の細胞周期を停止し、第一、第二減数分裂を行うために遺伝子の発現パターンを連続的に変化させ、さらに4つの核の周りに胞子壁を形成しなくてはならない。Spore-wall assembly 経路はこの最後のステップである胞子壁の形成にはたらく。MAPK が Smk1 であることはわかっているが、Smk1 の基質や上流のキナーゼ、センサー因子などは未解明である[14]。

### 1.3.3 Filamentous growth 経路

Filamentous growth 経路は酵母細胞が飢餓状態にさらされると活性化する。細胞の形態を変化させることで、新しい環境へ移動することが可能になる。多くの真菌で filamentous growth が見られるが、出芽酵母の場合一つ一つの細胞は完全にわかれており、細胞壁でつながった状態の仮性菌糸を形成する。膜タンパク質 Msb2, Sho1 が細胞表層で協同的にはたらき GTPase の Cdc42 を活性化することでシグナルを開始する[15]。しかしこれらの膜タンパク質がどのような仕組みで経路活性を制御しシグナル伝達をおこなっているかはわかっていない。細胞内では、small GTPase の Cdc42 と Ras2 によって p21-activated protein (PAK)の Ste20 が活性化される[16]。続いて MAPKKK Ste11→MAPKK Ste7→MAPK Kss1 の順にシグナルが伝達される。活性化した Kss1 は Tec1 と Ste12 転写因子を介して形態変化を誘導する[17,18]。

### 1.3.4 Mating 経路

出芽酵母は一倍体、二倍体いずれの状態でも存在することができる。一倍体細胞は

mating タイプ (a または  $\alpha$ ) の異なる細胞とのみ接合し二倍体を形成する。a 細胞と  $\alpha$  細胞はそれぞれ a ファクター、 $\alpha$  ファクターと呼ばれるフェロモンを分泌し、自分と異なるフェロモン刺激にのみ応答する。接合フェロモンを細胞表層の受容体で感知すると、通常の細胞周期を G1 期で停止して接合を開始する。接合では互いの細胞に向かって接合突起を形成し、細胞内では細胞接着、細胞融合、核融合に必要な遺伝子の発現が誘導される [19,20]。

a ファクターの受容体は Ste3、 $\alpha$  ファクターの受容体は Ste2 というそれぞれ 7 回膜貫通タンパク質で、活性化すると三量体 G タンパク質の乖離を促す。足場タンパク質 Ste5 によって安定化される Ste11(MAPKKK)、Ste7(MAPKK)、Fus3(MAPK)カスケードが活性化され、接合がおこる。Filamentous 経路と多くの因子を共有しているが、足場タンパク質 Ste5 が Ste11, Ste7, Fus3 モジュールと結合して抱え込むことにより、シグナル伝達を効率化し経路の混線を抑制している。活性化された Fus3 は Far1, Dig1, Dig2 などの因子をリン酸化し mating を行う [21-23]。

## 1.4 High Osmolarity Glycerol (HOG) 経路

### 1.4.1 HOG 経路概要

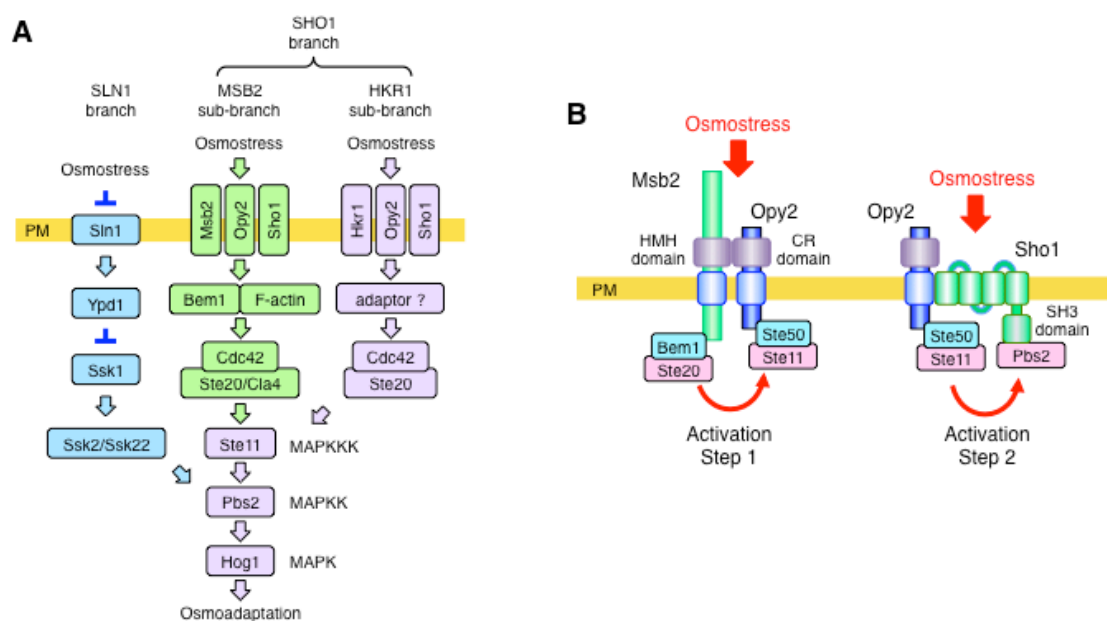
出芽酵母 *S. cerevisiae* は高浸透圧ストレスにさらされると、HOG MAPK 経路を活性化して適応する。MAPK の Hog1 はリン酸化によって活性化されると核に移行し、高浸透圧応答遺伝子群の発現を誘導する。Hog1 は転写因子以外にも高浸透圧耐性に重要なタンパク質のリン酸化を行っている。例えば Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>トランスポーターNha1 や K<sup>+</sup>チャンネル Tok1 を活性化し、溶質濃度上昇の抑制を行う [40]。また細胞周期の制御にも関わる。G1 期に高浸透圧ストレスを受けると、Hog1 は CDK インヒビターの Sic1 をリン酸化して安定化し、細胞周期の進行を遅らせたり停止させたりする [41]。

HOG 経路の上流は重複した機能を持つ二つの支経路 (SLN1 支経路、SHO1 支経路) に別れている (Figure 4A)。膜上のセンサーから MAPKKK に至るまではそれぞれ異なる経路を持つ。MAPKK の Pbs2 がリン酸化されて活性化し、MAPK の Hog1 をリン酸化、活性化するステップは共通している [24-26]。SLN1, SHO1 支経路のいずれかが機能すれば、酵母細胞は高浸透圧ストレス環境に適応することができる。

### 1.4.2 SLN1 支経路のシグナル伝達

SLN1 支経路は Sln1-Ypd1-Ssk1 からなる two-component システムと呼ばれるシステムを持つ [26]。two-component システムは原核生物や酵母、植物によく保存されている系で、センサーヒスチジンキナーゼ(HK)とレスポンスレギュレーター(RR)からなる。

HK が活性化し特定のヒスチジン残基がリン酸化されると、リン酸基は RR のアスパラギン酸残基にリン酸基転移される。リン酸化された RR は活性化してさらに下流の反応へとつながる[27]。SLN1 支経路のセンサーは膜型のヒスチジンキナーゼ Sln1 である。Sln1 の HK は通常活性状態になっており、Ssk1 は Ypd1 によって常にリン酸化され不活性状態になっている。高浸透圧ストレスにさらされると Sln1 センサーが高浸透圧による膨圧の変化を感知し、リン酸化リレーが停止する[28,29]。脱リン酸化され活性化された Ssk1 は MAPKKK の Ssk2/Ssk22 と結合し活性化させる[30]。活性化された Ssk2/Ssk22 から Pbs2 MAPKK, Hog1 MAPK へとシグナルが伝わる[31]。



**Figure 4** HOG 経路模式図 (A)HKR1 副支経路で機能するタンパク質はラベンダー色、SLN1 支経路のタンパク質は青、MSB 副支経路のタンパク質は緑で示した。スラッシュ(/)で併記したタンパク質は重複した機能を持つタンパク質である。PM=plasma membrane (B) MSB2 副支経路における 2 ステップの活性化モデル図。activation step 1 では、高浸透圧によって Msb2 HMH ドメインと Opy2 CR ドメインを介して結合した複合体の構造が変化する。これにより Ste20 による Ste11 キナーゼの活性化が引き起こされる。activation step 2 では、高浸透圧刺激により Sho1 の TM ドメインの構造変化が起きて Ste11 と Pbs2 の結合がより強くなる。

#### 1.4.2 SHO1 支経路のシグナル伝達

SHO1 支経路の膜上では、Sho1, Hkr1, Msb2, Opy2 の 4 つの膜タンパク質が機能する。Sho1 は 4 回膜貫通型タンパク質で、多量体を形成している[32]。Hkr1 と Msb2 は細胞外領域が高度に糖鎖修飾された 1 回膜貫通タンパク質で重複した機能を持ち、

SHO1 支経路をさらに HKR1, MSB2 副支経路に分岐させる[33]。Opy2 はアダプタータンパク質の Ste50 を介して Ste11 MAPKKK を膜にリクルートする[34]。これらの膜タンパク質が協同的に高浸透圧を感知すると、膜に局在する small G タンパク質 Cdc42 によって PAK 様キナーゼ Ste20/Cla4 が活性化される。活性化した Ste20/Cla4 は MAPKKK の Ste11 をリン酸化して活性化する。Ste11 は不活性状態の時には N 末の autoinhibitory (AI)ドメインが C 末のキナーゼドメインに結合して活性化が抑制されている。Ste20/Cla4 により AI ドメインがリン酸化されるとこの抑制が解かれ Ste11 が活性化する[35]。しかし Ste11 の自己抑制が解除されただけでは、Ste11 による Pbs2 のリン酸化は起こらない。このリン酸化反応が起こるためには高浸透圧刺激が必要である。つまり、高浸透圧刺激は Ste20 による Ste11 リン酸化後のステップの活性化も行っているといえる[36,37]。Ste20 によって活性化された Ste11 は続いて、Sho1 と結合して膜近傍に存在する MAPKK の Pbs2 をリン酸化、活性化する[38]。Pbs2 が MAPK の Hog1 を活性化すると Hog1 はインポーチンβホモログの Nmd5 によって核内へと運ばれ、一連の高浸透圧ストレス応答遺伝子群の発現を誘導する[39]。

#### 1.4.3 MSB2 副支経路のシグナル伝達

高浸透圧刺激は HOG 経路の複数のステップを段階的に活性化していると考えられる(Figure 4B)。先行研究により MSB2 副支経路におけるシグナル伝達メカニズムが少しずつ明らかになって来た。Msb2 の細胞内領域 (Msb2-cyto) は足場タンパク質 Bem1 と相互作用する[42]。Bem1 は Ste11 のキナーゼである Ste20 および Ste20 を活性化する small GTPase の Cdc42 と結合している。Msb2 と Bem1 が結合することで、Ste20 が膜上で活性化し Ste11 のリン酸化を行うステップを助けていると考えられる。(activation step1) また Msb2 は細胞外領域で Opy2 と結合する。Opy2 はアダプタータンパク質 Ste50 を介して Ste11 を膜へとリクルートしている。このことも activation step1 の活性化に寄与している。高浸透圧刺激は Ste11 活性化以降のステップも制御している。Ste11 MAPKKK の結合タンパク質 Ste50 と、Pbs2 MAPKK の結合タンパク質 Sho1 の結合は高浸透圧刺激依存的に誘導される。この結合によって Ste11 による Pbs2 の活性化が促進されていると考えられる(activation step2)。一方 HKR1 副支経路のシグナル伝達システムについて詳細な機構は未解明である。

#### 1.4.4 HOG 経路の恒常的活性型変異体

これまでに HOG 経路因子の恒常的活性型変異体が複数特定されて来た。それらの変異体による HOG 経路活性化は、HOG 経路の特定の活性化段階のみを模倣するため、



導入した変異がどのステップに影響を与えるかを検討するにあたり、非常に優れたプローブとなる。

#### 1. Opy2-F96I A104V

SHO1 支経路の膜タンパク質 Opy2 の膜貫通(TM)ドメインの変異体 F96I, A104V はそれぞれ *ste11-Q301P* 保有株で過剰発現させると、高浸透圧非依存的な経路活性化を誘導する変異体である。Ste11-Q301P 変異は、Ste11 のキナーゼ Ste20 による Ste11 のリン酸化状態を模倣する活性型変異体である。この Opy2 の2つの変異体は *STE11 WT* の株で過剰発現しても活性化しないが、両方を併せ持つ Opy2-F96I A104V は相乗的に働いてより強い活性を示し、*STE11 WT* の株でも経路活性化を引き起こす。Opy2-F96I A104V 変異体の二カ所の変異のうち、A104V 変異は、Opy2 と Sho1 の結合を強めることが分かっている[32]。

#### 2. Ste50-D146F

Ste11 と Opy2 に結合するアダプタータンパク質 Ste50 は3つの保存されたドメインを持つ。その保存領域内に位置する D146F 変異体は、*STE11 WT* の株で過剰発現しても活性化しないが、活性型変異体 *ste11-Q301P* 株で過剰発現させると Hog1 の活性化を誘導する[36]。また Ste50-D146F 変異体は Sho1 との結合が Ste50-WT に比べ強くなる。

#### 3. Ssk2ΔN

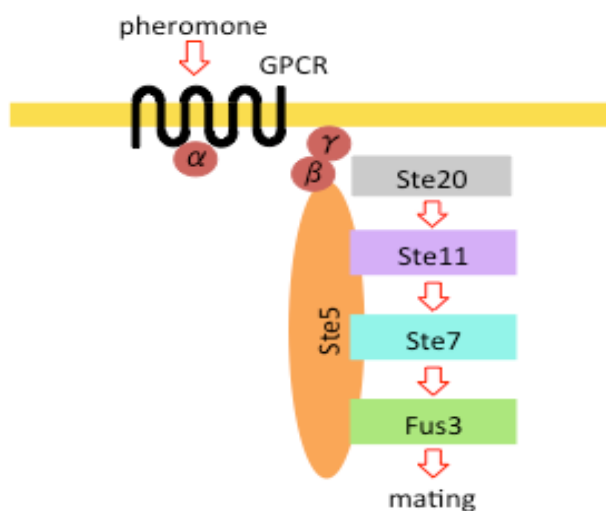
SLN1 支経路の Ssk2 MAPKKK は N 末の auto-inhibitory (AI) ドメインが C 末のキナーゼドメインに結合してその機能を抑制している。この AI ドメインを欠失させた Ssk2ΔN は恒常的活性を示す。

#### 1.4.5 HOG 経路特異的レポーター遺伝子 *8xCRE-lacZ*

HOG 経路の活性化を定量的に評価するため、*8xCRE-lacZ* 遺伝子を用いた。*8xCRE-lacZ* は HOG 経路活性依存的に発現が誘導される *ENA1* 遺伝子プロモーター中の CRE 配列を *lacZ* 遺伝子上流に8個並べたものである。*ENA1* は Na<sup>+</sup>-ATP アーゼエクスポンターをコードする遺伝子である。通常条件下では、CRE 結合タンパク質 Sko1 が *ENA1* 遺伝子の CRE 配列を認識して結合し、*ENA1* の発現を抑制している。HOG 経路が活性化し、活性型 Hog1 が核に移行すると、Sko1 が Hog1 によってリン酸化されるとこの抑制が解除され *ENA1* の発現が誘導される[73]。同様に *8xCRE-lacZ* 遺伝子では HOG 経路活性依存的に β ガラクトシダーゼの発現が誘導される。CRE 配列を8回繰り返すことにより、Sko1 による効率的な発現抑制が起き、非刺激時の活性を低く抑えている[36]。

## 1.5 足場タンパク質

細胞のシグナル伝達に関わるタンパク質は、互いに近接することで効率的に情報伝達を行う。またいくつかのシグナル因子は、複数の経路で機能している。刺激に応じて、適切なシグナル経路のみを迅速に活性化するための機構のひとつに、足場タンパク質がある。足場タンパク質はシグナル経路の複数のタンパク質に結合することで適切なシグナル経路因子のみを集積させ、経路間の混線を防ぐ。出芽酵母の Ste5 は Mating

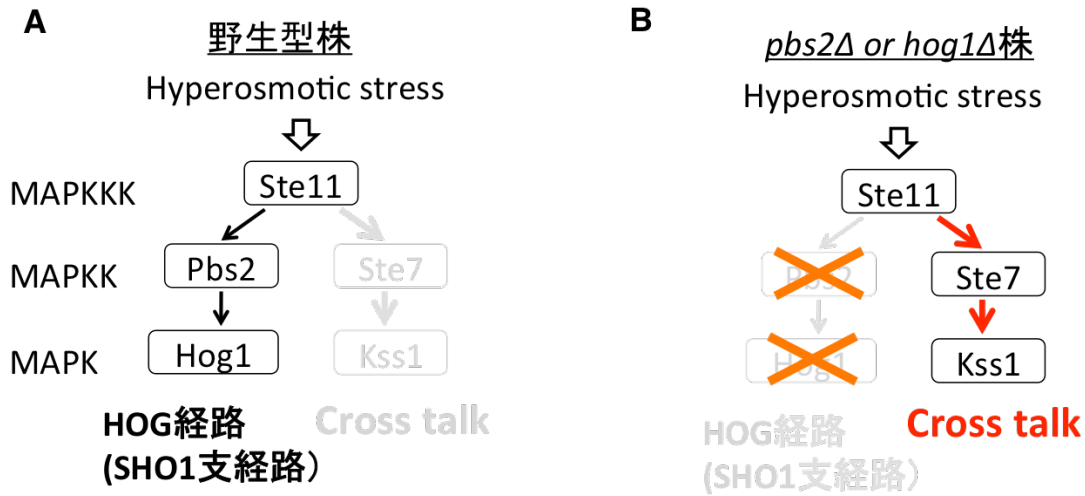


**Figure 5** Ste5 は Mating 経路の足場タンパク質としてはたらく

る。脂質膜及び G $\beta\gamma$  複合体に結合して膜に局在し、Mating 経路の Ste11 MAPKKK, Ste7 MAPKK, Fus3 MAPK のすべてと結合することにより、これらの因子を膜に集積させている(Figure 5) [43,44]。Ste5 はシグナル伝達の効率化、混線の防止だけでなく、細胞周期の適切なタイミングに Mating 経路を活性化させる役割もはたしている[45]。さらに Ste7 に結合することでその構造を変化させ、Ste7 によるリン酸化が起りやすくしている[46]。

HOG 経路の SHO1 支経路においても、複数の足場タンパク質の存在が知られている。膜タンパク質 Sho1 は膜上で多量体を形成し、膜タンパク質の Opy2 や Hkr1, Msb2 と結合して膜上で複合体を形成している[32]。さらに細胞質の SH3 ドメインを介して Ste20 (Ste11 の activator) および Pbs2 MAPKK と結合する。また Pbs2 MAPKK は Sho1, Ste11 MAPKKK, Hog1 MAPK と結合しシグナルカスケードを安定化していると考えられている[38]。

## 1.6 cross-talk



**Figure 6** cross-talk 模式図 (A) 通常条件下では高浸透圧刺激によって HOG 経路のみが活性化する。(B) HOG 経路の MAPKK Pbs2 もしくは MAPK Hog1 の欠損株に高浸透圧刺激を加えると cross-talk によって Filamentous growth 経路の MAPK Kss1 が活性化する。

Figure 3 に示した通り、出芽酵母のシグナル因子の中には複数の MAPK 経路で共通して機能するものが存在する。Ste11 MAPKKK は Mating 経路, Filamentous growth 経路, HOG 経路の 3 つの経路で機能している。しかし通常、高浸透圧刺激時には Ste11 は HOG 経路のみを活性化し、Mating 経路や Filamentous growth 経路は活性化しない (Figure 6A)。しかし HOG 経路の Pbs2 MAPKK もしくは Hog1 MAPK を欠損させた株に高浸透圧刺激を加えると、Ste11 MAPKKK が Filamentous growth 経路の Ste7 MAPKK を活性化し Filamentous growth 経路の活性化が起こる。この現象を cross-talk とよぶ。cross-talk は Sho1 依存的な反応である。そのため、SLN1 支経路では活性化しない。また HKR1 副支経路でもほとんど活性が見られない。*sho1Δ*株や *msb2Δ*株では部分的な cross-talk 活性が起こるのに対し、*sho1Δ msb2Δ*二重欠損株では cross-talk が完全に阻害される[47,48]。このことから cross-talk が HOG 経路と Filamentous growth 経路間で起こる現象であることが分かる。

高浸透圧ストレスがかかると、HOG 経路だけでなく Filamentous growth 経路の Kss1 MAPK も一過的にリン酸化・活性化するが、すぐに脱リン酸化し下流の反応は起こらない。HOG 経路の MAPK Hog1 は Kss1 の下流ではたらく転写因子 Tec1 の機能を阻害することで Filamentous growth 経路の活性化を阻害していると考えられる[49]。*pbs2Δ*株や *hog1Δ*株では、活性化 Hog1 によるこの抑制がかからなくなるために cross-talk が起こると予想されるが、その詳細なメカニズムは未解明である

## 1.7 本研究の目的

SHO1 支経路には HKR1, MSB2 副支経路という二つの独立した経路が存在するが、それぞれ異なる方法で細胞内の情報伝達を行っていることが明らかになってきた。しかし HKR1 副支経路のシグナル伝達方法や、Hkr1 の細胞内領域 Hkr1-cyto の詳細な機能は未解明だった。Hkr1 と Mbs2 は重複した機能を持つにも関わらずその細胞内領域 cyto に相同性は見られず、Msb2 の結合因子である足場タンパク質 Bem1 は Hkr1 とは結合しない。

MSB2 支経路では、足場タンパク質 Bem1 が膜タンパク質 Msb2, Sho1 と細胞質のキナーゼ Ste20 を膜近傍に集積させることで activation step 1 の効率的な活性化を実現している。HKR1 支経路においても同様に足場タンパク質が存在し、センサー膜タンパク質群と細胞質のキナーゼカスケードの効率的な反応を助けていると考えられる。Hkr1-cyto の新規相互作用因子を探索して HKR1 副支経路における機能を明らかにし、HKR1 副支経路の高浸透圧応答機構を解明することを目的として研究を行った。

## 2. 結果

### 2.1 Hkr1 の機能解析

Hkr1 と Msb2 は重複した機能を持つ高浸透圧センサーで、SHO1 支経路をさらに HKR1, MSB2 副支経路に分岐させる。どちらか一方を欠失させても SHO1 支経路は機能する。Hkr1 と Msb2 の細胞外領域は類似した構造を持ち、セリン・スレオニンに富み経路活性を負に制御する STR(Ser/Thr-rich)領域と、配列の相同性が高く経路活性を正に制御する HMH (Hkr1-Msb2 homology) 領域からなる[33]。Hkr1 の HMH 領域は Opy2 の細胞外に位置する CR (cysteine-rich) 領域と結合する。Opy2 の CR 領域はシステインに富んだ細胞外領域で、Hkr1 の HMH 領域および Opy2 の CR 領域はともに HOG 経路の活性化に必須である。さらに Hkr1 は膜貫通領域 (TM) を介して Sho1 とも結合している[32]。

一方で、cyto は保存された機能ドメインを持たず、Hkr1 と Msb2 の間で相同性も見られない。MSB2 副支経路では、Msb2-cyto が足場タンパク質 Bem1 およびアクチン細胞骨格を介して、細胞外領域で感知した高浸透圧刺激情報を下流に伝達している。しかし HKR1 副支経路では、Hkr1-cyto は Bem1 やアクチン細胞骨格とは相互作用せず、異なる機構によって情報伝達が行われていると考えられるが、詳細なメカニズムは未解明だった。

Hkr1-cyto の機能を調べるため、Hkr1-cyto の部分欠失体を作成し (Figure 7A,C)、高浸透圧刺激依存的な HOG 経路活性化への影響を調べた。これらの変異体を *HKR1* プロモーター ( $P_{HKR1}$ ) につなぎ、シングルコピープラスミドに導入した。Hkr1 の影響を調べるためには、HKR1 副支経路以外の上流経路を不活性化させる必要がある。そこで SLN1 支経路を不活性化させるために *ssk2/22Δ*変異を、MSB2 副支経路を不活性化させるために *msb2Δ*変異を導入した株を用いた。*ssk2/22Δ msb2Δ hkr1Δ*株に作成した各 Hkr1-cyto 欠失変異体と HOG 経路特異的レポーター遺伝子 *8xCRE-lacZ*を導入した。0.4M の NaCl によって 30 分間高浸透圧刺激を加えた後、細胞を回収しレポーター遺伝子の発現量により経路活性を測定した[36]。Hkr1 を発現しない空ベクターを導入した細胞は、上流のセンサー全てが機能しないため、高浸透圧刺激を加えても HOG 経路の活性化は起こらない。野生型 Hkr1 (Hkr1-WT) を導入した細胞では HOG 経路活性化が回復した。一方 Hkr1- $\Delta$ C1 では活性が4分の1程度にまで低下した(Figure 7B)。さらに、Hkr1-cyto を 50 残基ずつ欠失させた変異体群を作成し、活性への影響を測定した。 $\Delta$ C4 や  $\Delta$ C8 で活性が大きく低下したことから、Hkr1-cyto の N, C 両末端が経路活性化に重要だと考えられた(Figure 7D)。

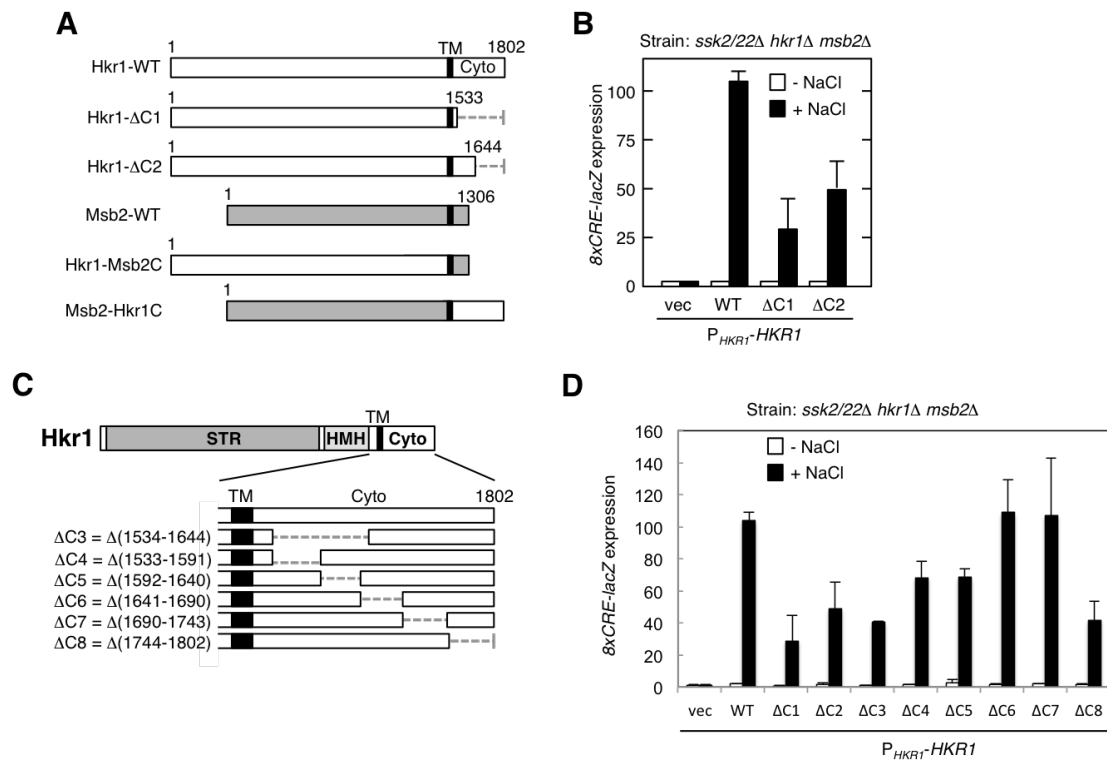


Figure 7 Hkr1-cyto の HOG 経路における機能 (A, C)Hkr1 と Msb2 の模式図。点線は欠損部分。白色棒は Hkr1、灰色棒は Msb2。数字は残基数。STR, Ser/Thr rich domain; HMH, Hkr1-Msb2 homology domain; TM,transmembrane domain; Cyto,cytoplasmic region (B, D) *8xCRE-lacZ* レポーター遺伝子を用いた HOG 経路活性測定。β ガラクトシダーゼ活性 (Miller units) を算出した。エラーバーは標準偏差を表す (n≥3) KT063 (*ssk2/22Δ hkr1Δ msb2Δ*) 株で、自身のプロモーターを持つ Hkr1 もしくは Msb2 シングルコピープラスミドとレポータープラスミドを発現させた。0.4M NaCl で 30 分刺激を加えた後 *8xCRE-lacZ* の発現を測定した。

膜タンパク質 Opy2 の恒常的活性型変異体 Opy2-F96I A104V を過剰発現させると、高浸透圧刺激非依存的な経路活性化が起こる [32]。上流支経路を全て不活性化させた *ssk2/22Δ msb2Δ hkr1Δ* 株に *P<sub>GALI</sub>-Opy2-F96I A104V*、自身のプロモーターにつないだ Hkr1 もしくは Msb2 プラスミド、レポータープラスミドを導入し、ガラクトースを添加して Opy2-F96I A104V を過剰発現させた。空ベクター導入細胞では全支経路が機能せず経路活性化が起こらなかったが、Hkr1-WT 導入細胞では HOG 経路活性化が起こった。しかし Hkr1-cyto を欠失させた Hkr1-ΔC1, ΔC2 導入細胞では活性化が起こらなかった (Figure 8A)。同様に Msb2-WT を導入した細胞でも恒常活性型変異体 Opy2-F96I

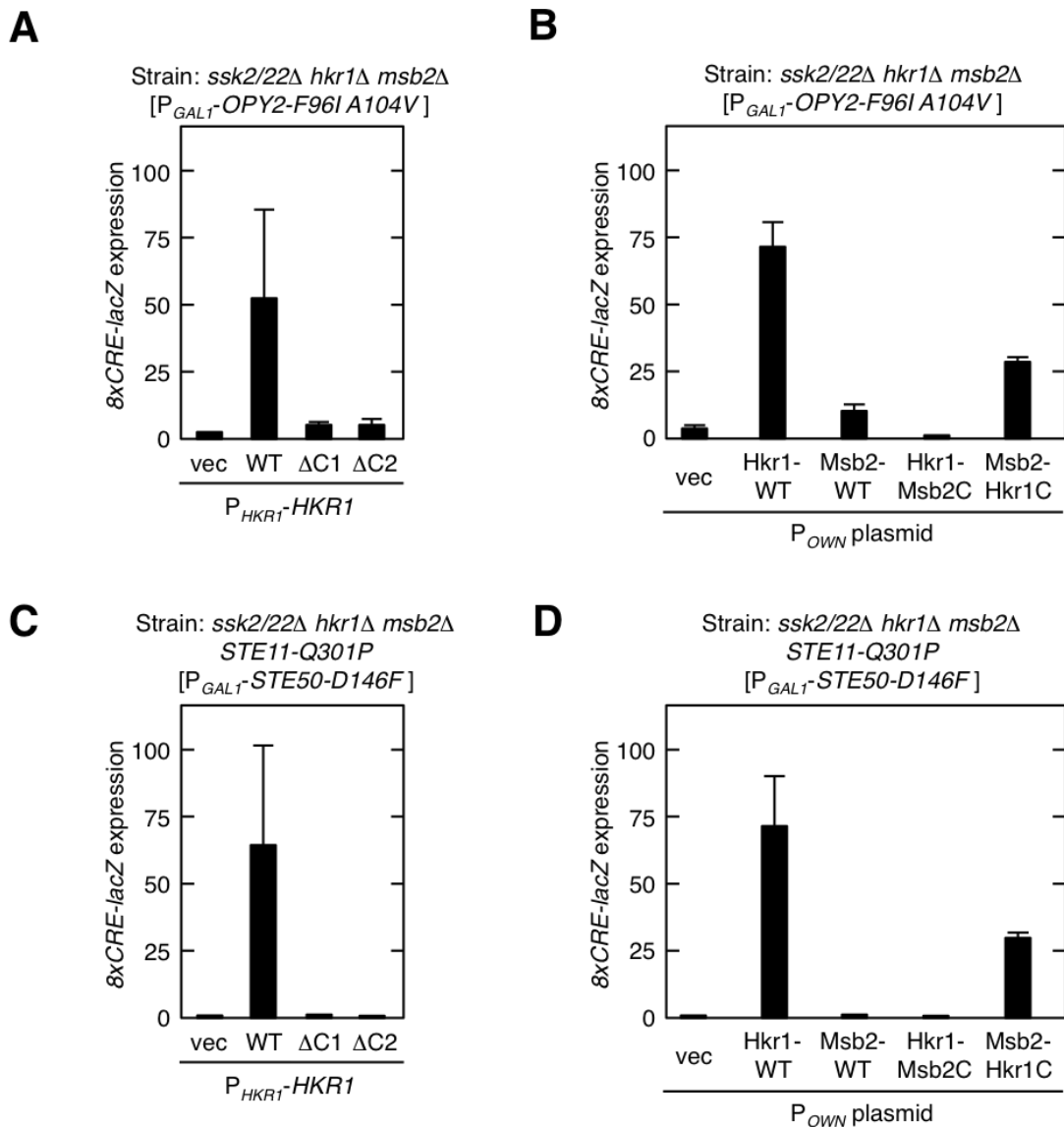


Figure 8 恒常活性 Opy2, Ste50 による経路活性化には Hkr1-cyto が必要である。

(A, B)KT063 株に、自身のプロモーターにつないだ Hkr1 もしくは Msb2 のシングルコピープラスミド、GAL1 プロモーターにつないだ Opy2-F96I A104V のシングルコピープラスミド、レポータープラスミドを導入した。2%のガラクトースを培地に加えて 2 時間震盪することにより Opy2-F96I A104V の発現を誘導し、8xCRE-lacZ の発現を測定した。(C, D)AN01 (*ssk2/22 hkr1Δ msb2Δ STE11-Q301P*)株に自身のプロモーターにつないだ Hkr1 もしくは Msb2 のシングルコピープラスミド、GAL1 プロモーターにつないだ Ste50-D146F のシングルコピープラスミド、レポータープラスミドを導入した。2%のガラクトースを培地に加えて 2 時間震盪することにより Ste50-D146F の発現を誘導し、8xCRE-lacZ の発現を測定した。

A104V の過剰発現による経路活性化を測定したが、活性はほとんど起こらなかった。よって恒常的活性型変異体 Opy2 による経路活性化は HKR1 副支経路特異的な反応であるといえる (Figure 8B)。さらに Hkr1 と Msb2 の cyto を置換したキメラ変異体を作成し、恒常的活性型変異体 Opy2 による経路活性化を測定した。その結果、Hkr1 の cyto を Msb2-cyto に置換すると (Hkr1-Msb2C) 活性が大幅に低下した。一方 Msb2 の cyto を Hkr1-cyto に置換すると (Msb2-Hkr1C) HOG 経路活性化が亢進した (Figure 8B)。よって、恒常的活性型変異体 Opy2-F96I A104V による経路活性化は、Hkr1-cyto 依存的な反応である。

さらにアダプタータンパク質 Ste50 の恒常的活性型変異体 Ste50-D146F による経路活性化にも Hkr1-cyto が必須であることが明らかになった。Ste50-D146F を、活性型変異体 *ste11-Q301P* 株で過剰発現させると Hog1 の活性化を誘導する [36]。 *ssk2/22Δ msb2Δ hkr1Δ ste11-Q301P* 株に *P<sub>GALI</sub>-Ste50-D146F*, 自身のプロモーターにつないだ Hkr1 もしくは Msb2, レポータープラスミドを導入し、ガラクトースを添加して Ste50D-146F 変異体を過剰発現させ経路活性を測定した。その結果 Figure 8C, D に示した通り、Msb2 ではなく Hkr1-cyto 特異的に Ste50-D146F による経路活性化が起きた。このことから Opy2 を介した HOG 経路活性化に Hkr1 特異的機能があることが示唆された。

この結果より、Hkr1-cyto が Hog1 MAPK シグナル経路の活性化に関与していると結論づけた。高浸透圧刺激依存的な HOG 経路活性化に Hkr1-cyto が必須でないことから、Hog1 活性化には、また別に異なるメカニズムが存在する可能性がある。

## 2.2 nanoLC-ESI-MS/MS 解析を用いた Hkr1-cyto 結合因子のスクリーニング

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 (FLAG-Hkr1-cyto) を酵母細胞内で過剰発現し、免疫沈降させた。共沈によって溶出した全結合タンパク質溶液を nanoLC-ESI-MS/MS 解析にかけた。得られた結合タンパク質のうち、FLAG タグのみコントロールサンプルにも結合した因子を除外した。また非特異的に結合していると考えられる Hsp70 などのタンパク質も除外した。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[50]。また Ydl073w はそれまでほとんど解析が行われていない機能未知のタンパク質である。そこでこのタンパク質の機能解析を行うこととし、Ydl073w を Ahk1 (Associated with Hkr1) と名付けた。

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[51]。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ることも、特筆すべき点である。

### 2.3 Ahk1 は bud の先端や bud neck に局在する

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 プロモーターで過剰発現すると、bud の先端や bud neck に局在した(Figure 9A)。これは Sho1 や Hkr1 と似た局在である[29,33]。後述の 5.3, 5.5 に示す通り Ahk1 は Hkr1 と Sho1 に恒常的に結合している。そこで Hkr1 や Sho1 に

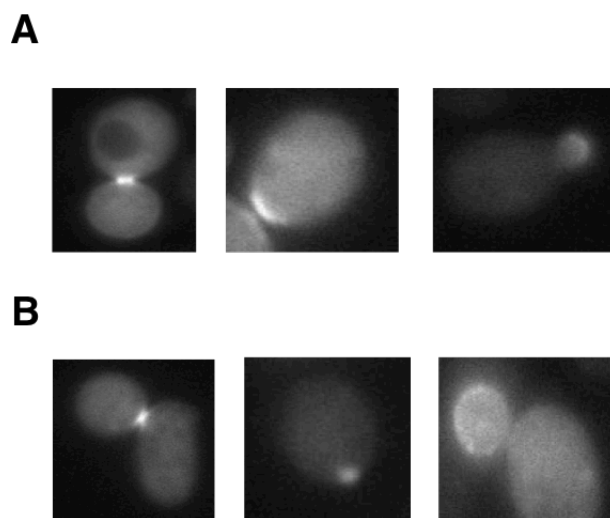


Figure 9 Ahk1-GFP の局在。

(A) Ahk1 の C 末端に GFP を付加したコンストラクトを作成し、GAL1 プロモーターにつないでシングルコピープラスミドを作成した。このプラスミドを TM257 (*ssk2/22Δ*) 株に導入し、2%濃度のガラクトースを加えて 4 時間震盪して Ahk1-GFP の発現を誘導したのち、局在を観察した。

(B) KY594 (*ssk2/22Δ sho1Δ opy2Δ hkr1Δ msb2Δ*) 株に P<sub>GAL1</sub>-Ahk1-GFP を導入し 2% 濃度のガラクトースで 4 時間発現を誘導してから局在を観察した。

よって Ahk1 が膜に局在化されている可能性が考えられた。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(Figure 9B)。よって Ahk1 の局在は HOG 経路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かは今のところわかっていない。

## 2.4 Ahk1 は Hkr1-cyto に結合する

Ahk1 が Hkr1-cyto に結合することを確認するため、N 末に GST タグを付加した Ahk1 (GST-Ahk1) と FLAG-Hkr1-cyto を酵母細胞で共発現させた。ライセートを調製し、抗 FLAG 抗体を用いて FLAG-Hkr1-cyto を免疫沈降させた。

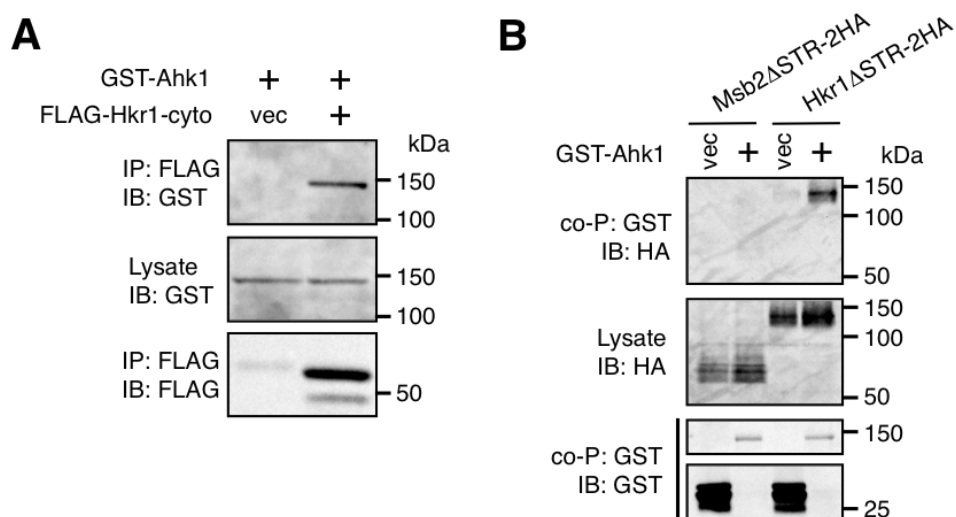


Figure 10 Ahk1 は Hkr1-cyto に結合する。

(A) Ahk1 と Hkr1-cyto の *in vivo* 結合実験。TM257(野生型) 株に、*GAL1* プロモーターにつないだ GST-Ahk1 と Flag-Hkr1-cyto (もしくは空の Flag ベクター, vec) を導入した。CARaf 培地で細胞を培養し 2%ガラクトースを加えて 2 時間発現を誘導した。Buffer A を用いて抽出液を調整し、目的のタンパク質を抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降 (immunoprecipitation, IP) したのち、GST もしくは FLAG 抗体を用いてブロット (immunoblot, IB) した。

(B) Ahk1 と膜局在型 Hkr1 の共沈降実験。TM257 株に GST-Ahk1(もしくは空の GST ベクター, vec)と、HA タグをつけた Hkr1ΔSTR(Hkr1ΔSTR-2HA)もしくは Msb2ΔSTR-2HA を導入した。GST ビーズを用いて共沈降(coprecipitation, co-P)を行い結合タンパク質を得た。GST, HA 抗体を用いてブロットした。細胞の培養、抽出液の調整の条件は(A)と同様に行った。

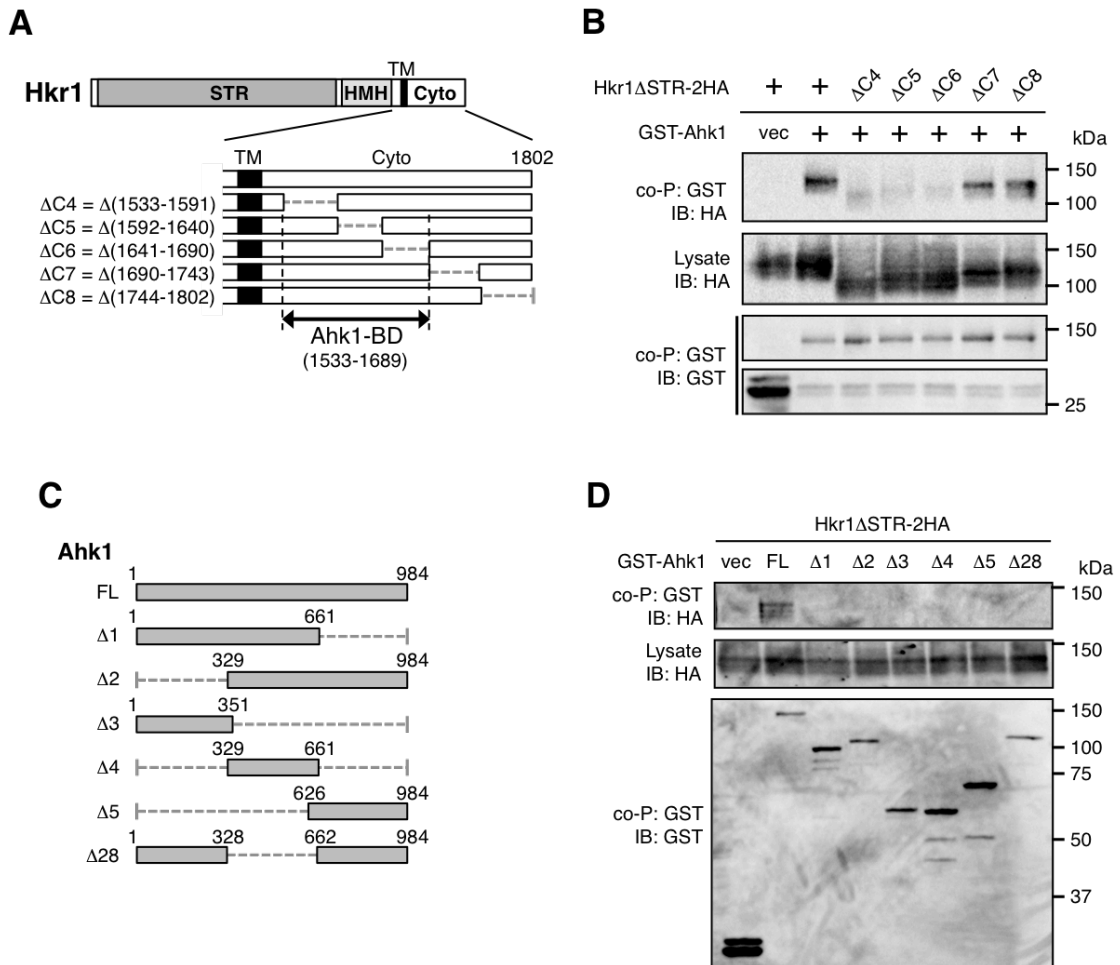


Figure 11 Ahk1 と Hkr1 の *in vivo* 結合実験。

(A)Hkr1-cyto の部分欠失体模式図。BD, binding domain (B)Ahk1 と膜局在型 Hkr1 の共沈降実験。Fig. 3A に示した Hkr1ΔSTR-2HA の cyto 欠失体を用いて、Fig. 10B と同様に共沈降を行った。(C)Ahk1 の部分欠失体模式図。(D)Ahk1 と膜局在型 Hkr1 の共沈降実験。行程は Fig. 10B に示した通り。

その結果、FLAG-Hkr1-cyto の沈降物からは GST-Ahk1 が検出されたが、コントロールの FLAG タグのみの沈降物からは検出されなかった(Figure 10A)。よって Ahk1 は Hkr1-cyto に結合することが示された。

さらに膜局在型の Hkr1 が Ahk1 に結合するか検討するため、Hkr1ΔSTR-2HA と GST-Ahk1 を細胞に共発現させた。ΔSTR (= Δ(41-1200))変異は、高度に糖鎖修飾されている Hkr1 の STR 領域を欠失させたコンストラクトで、SDS-PAGE で泳動した際タ

ンパクを均一に移動させることを目的として用いた。この結果、膜局在型 Hkr1 も Ahk1 と結合することが確認された。一方 Msb2 $\Delta$ STR-2HA は GST-Ahk1 と結合せず、Ahk1 は Hkr1-cyto 特異的に結合することが明らかになった(B)。

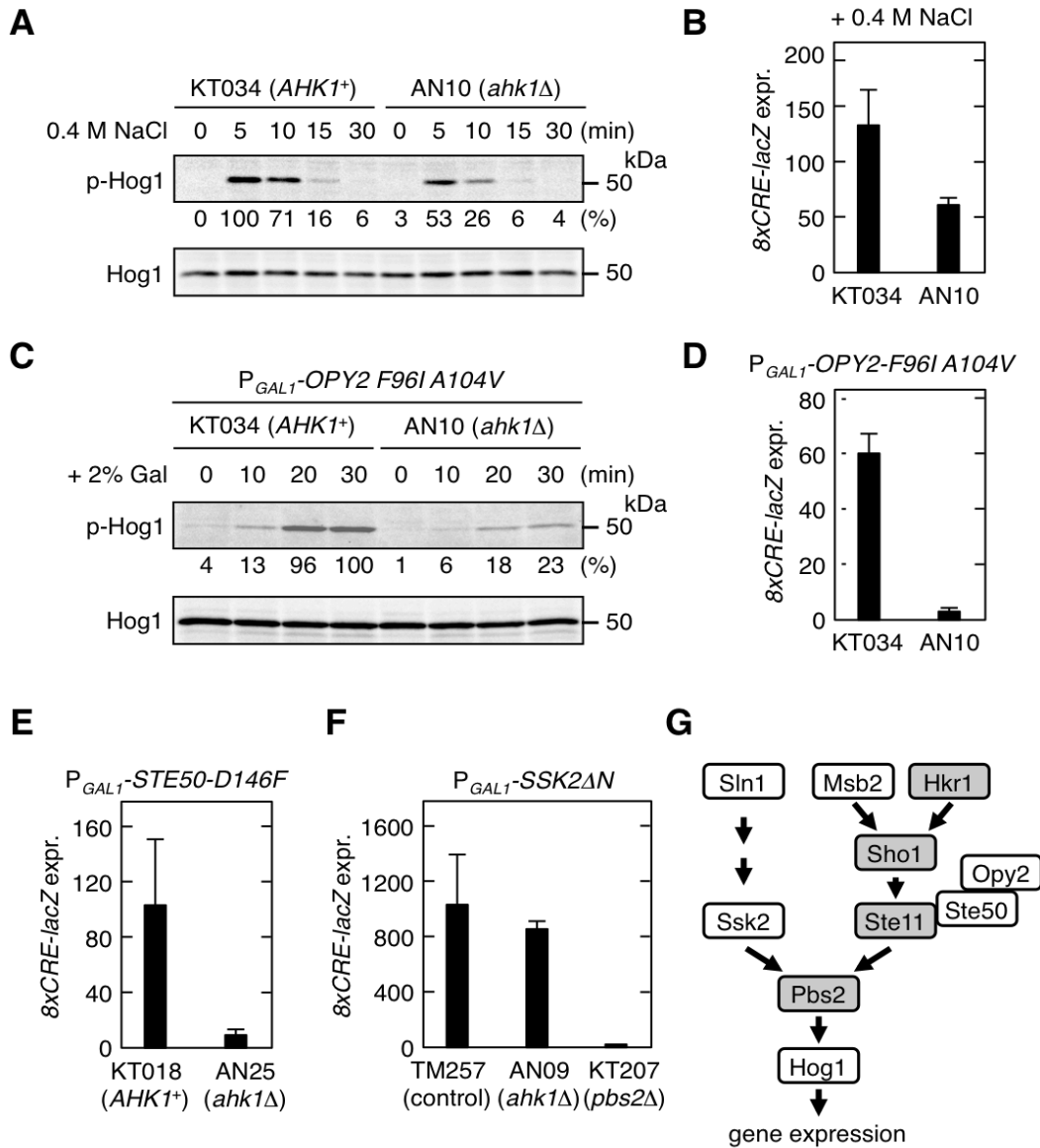
Ahk1 が Hkr1-cyto のどの領域に結合するかを特定するため、Hkr1 $\Delta$ STR-2HA をもとに cyto の部分欠失体を作成し、GST-Ahk1 との結合を検討した。その結果 Hkr1-cyto のうち $\Delta$ 4C~ $\Delta$ 6C (Figure 11A) の cyto N 末端欠失体で Ahk1 と Hkr1 の結合が阻害された (Figure 11B)。よって Ahk1 の結合ドメインは Hkr1 の 1533-1689 残基と特定された。Hkr1 $\Delta$ C6 欠失変異体は Ahk1 との結合が損なわれるが、高浸透圧刺激による HOG 経路活性化においては Hkr1 WT と同程度の活性を示す(Figure 7C, D)。よって Ahk1 と Hkr1 の結合は HOG 経路の活性化には関与しないのかもしれない。両因子の結合が HOG 経路においてどのような意義を持つかは今後の検討課題である。

Ahk1 内の Hkr1 結合サイトを検討する目的で、Ahk1 の種々の欠失体を作成したが、 $\Delta$ 1~ $\Delta$ 5,  $\Delta$ 28 いずれの部分欠失体でも Hkr1 との結合が消失した(Figure 11C, D)。よって Hkr1 との結合には Ahk1 内の 2 つ以上の領域が必要か、全体の構造が保たれている必要があると考えられる。

## 2.5 Ahk1 は恒常的活性型変異体 Opy2 および Ste50 による HOG 経路活性化に必須

Ahk1 が Hog1 MAPK の活性化に必要なか検討するため、HKR1 副支経路のみが機能する *ssk2/22 $\Delta$  msb2 $\Delta$* 株の *AHK1* 遺伝子を破壊し、0.4M NaCl を加えて高浸透圧刺激をかけた際の Hog1 リン酸化と経路活性を測定した。いずれの測定においても、*ahk1 $\Delta$* 株は *AHK1*株に比べ Hog1 の活性が半分程度まで低下した(Figure 12 A, B)。恒常的活性型変異体 Opy2 または Ste50 の過剰発現における *AHK1* 遺伝子破壊の影響を調べるため、高浸透圧刺激時と同様に Hog1 のリン酸化とレポーターの活性を測定した。その結果、*ahk1 $\Delta$* 株では Opy2-F96I A104V (Figure 12C, D)、Ste50-D146F (Figure 12E) とともに Hog1 の活性が著しく低下した。よって Ahk1 と Hkr1-cyto の欠失は、高浸透圧刺激においても恒常的活性型変異体においても、Hog1 の活性化によく似た影響を与えることが明らかになった。

*ahk1 $\Delta$* 株は、SLN1 支経路の MAPKKK である Ssk2 の活性型変異体 Ssk2 $\Delta$ N の過剰発現による HOG 活性化には影響しなかった(Figure 12F) [24]。このことから *ahk1 $\Delta$* 株は、Pbs2 による Hog1 の活性化や、Hog1 による遺伝子発現の促進などの SLN1, SHO1 支経路に共通したステップを阻害するものではないことが示された。よって Ahk1 は SHO1 支経路、あるいは特に HKR1 副支経路特異的にはたらく因子であると

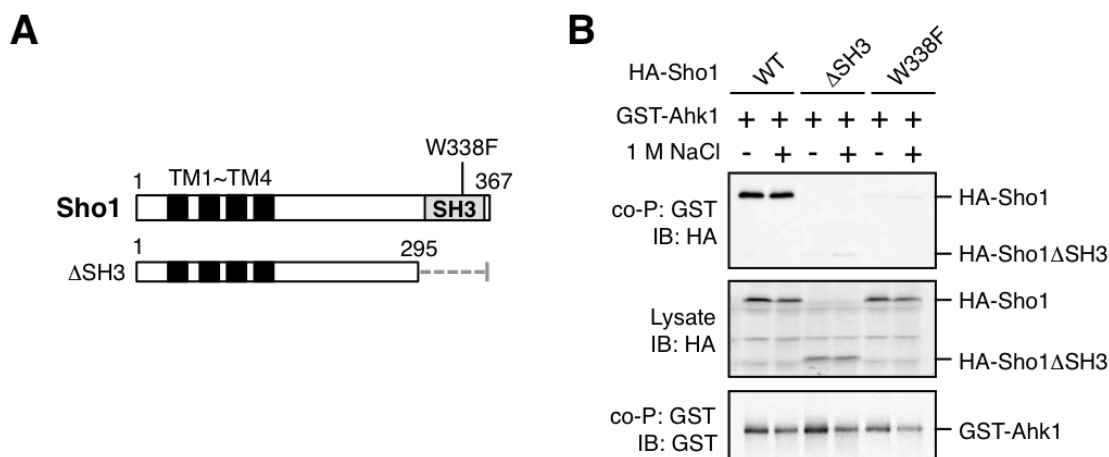


**Figure 12** Ahk1 は恒常的活性型変異体 Opy2 や Ste50 による経路活性化に必須 (A, C) KT034 (*ssk2/22 $\Delta$  msb2 $\Delta$* )株と AN10 (*ssk2/22 $\Delta$  msb2 $\Delta$  ahk1 $\Delta$* )株における高浸透圧刺激時(A), Opy2-F96I A104V 過剰発現時(C)の Hog1 リン酸化測定。リン酸化 Hog1 (p-Hog1) と全 Hog1 (Hog1)の量を免疫ブロットにより検出した。(B, D)KT034, AN10 株にレポータープラスミドを導入し、0.4M NaCl 刺激(B)または Opy2-F96I A104V を過剰発現させて(D) *8xCRE-lacZ*の発現量を測定した。(E, F) Ste50-D146F (E)または Ssk2 $\Delta$ N (F)を発現させた細胞でレポーター遺伝子の発現を測定した。(E)で用いた KT018, AN25 は *ste11-Q301P* 変異株。(G) HOG 経路の単純化模式図。灰色に示したものは Ahk1 の結合因子。

考えられる。そこで Ahk1 が HKR1 副支経路の因子に結合するかを検討した。Ahk1 は Opy2, Ste20, Ste50, Hog1 とは結合しなかった(data not shown)。一方、Hkr1-cyto だけでなく Sho1, Ste11, Pbs2 も Ahk1 と結合することが明らかになった。2.6 以降の章では、これらの結合についての解析結果を示す(Figure 12G)。

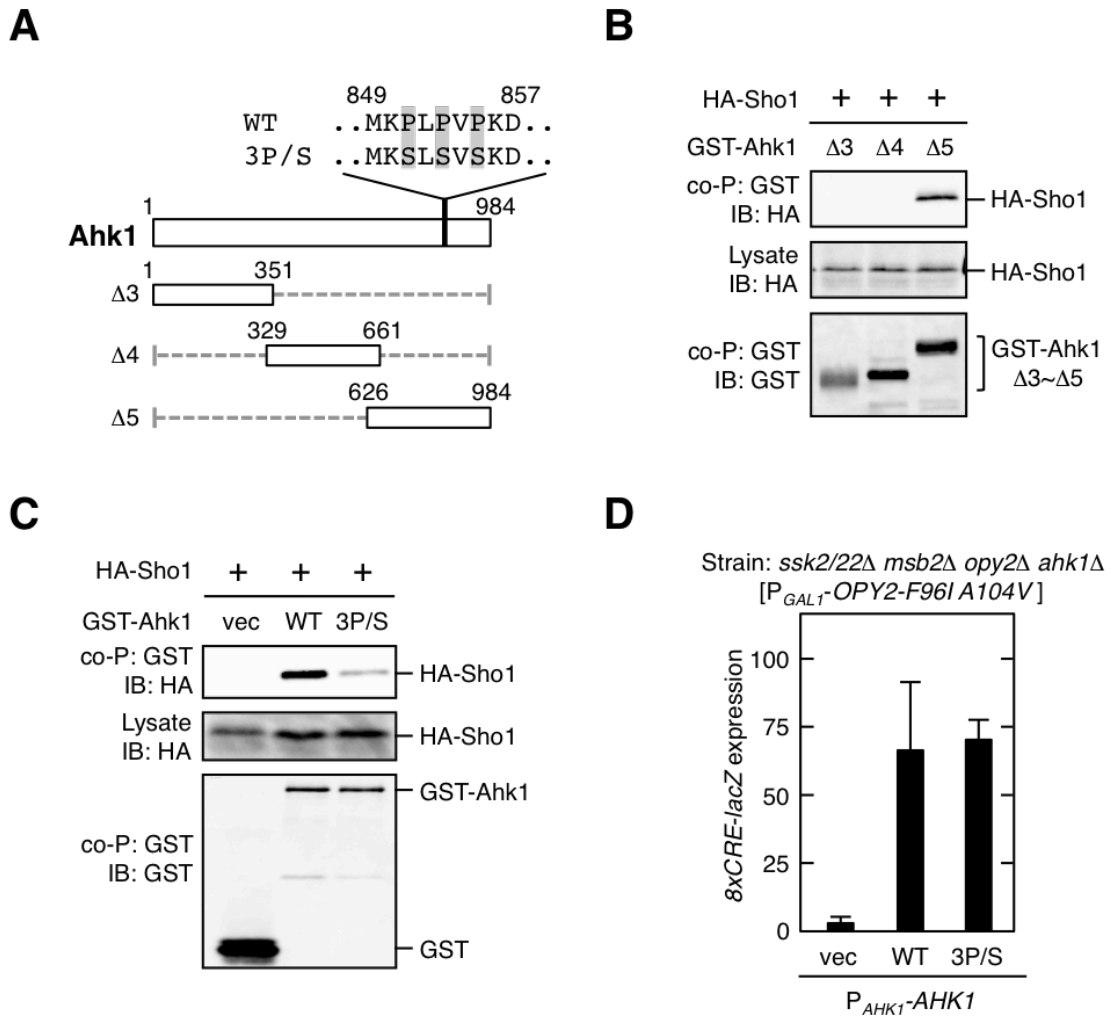
## 2.6 Ahk1 は Sho1 の SH3 ドメインを介して Sho1 と結合する

ツーハイブリッド実験で Sho1 と Ahk1 が結合するとして報告の追試のため[50]、Ahk1 と Sho1 の共沈降実験を行った。N 末に HA を付加した Sho1 (HA-Sho1) と GST-Ahk1 を細胞に共発現させ、GST-Ahk1 を共沈降させた結果、Sho1 は高浸透圧刺激 (1M NaCl) の有無にかかわらず恒常的に Ahk1 に結合した。SH3 ドメインを欠失させた Sho1 $\Delta$ SH3 変異体や SH3 ドメインの結合を阻害する W338F 変異体では Ahk1 との結合が見られなかった(Figure 13B)。これらの結果より、Ahk1 は Sho1 の SH3 ドメインに結合すると考えられる。



**Figure 13** Ahk1 は Sho1 の SH3 ドメインに恒常的に結合する

(A) Sho1-WT と変異体模式図。SH3, Src-homology 3 domain。(B) Sho1 と Ahk1 の *in vivo* 結合実験。TM257 株に GST-Ahk1 と HA タグを付加した Sho1 (HA-Sho1) もしくは(A)で示した Sho1 変異体を導入し 2%ガラクトースを添加して 2 時間タンパク質の発現を誘導した。さらに 1M NaCl を加え(+)3 分培養したのち、細胞を回収し Buffer A を用いて細胞抽出液を調整した。co-P, IB は Fig. 10B と同様に行った。



**Figure 14** Sho1 は Ahk1 のプロリン配列に結合する

(A) Ahk1 の欠失体模式図。Sho1 結合ドメインとその 3P/S 変異体のアミノ酸配列を Ahk1 全長図の上に示した。WT, wild type; 3P/S, P851S P853S P855S 三重変異 (B, C) Ahk1 と Sho1 の *in vivo* 結合実験。Fig. 10B と同様に共沈降を行った。NaCl は加えていない。vec, vector. (D) AN18 (*ssk2/22Δ msb2Δ opy2Δ ahk1Δ*)株に  $P_{GAL1}\text{-Opy2-F96I A104V}$ , Ahk1, レポータープラスミドを導入した。2%ガラクトースを加えて2時間 Opy2 の発現を誘導した後細胞を回収し  $8xCRE\text{-lacZ}$  の発現を測定した。エラーバーは標準偏差( $n \geq 3$ )

一方 Ahk1 の Sho1 結合サイトを特定するため、3分の1ずつに分けた Ahk1 コンストラクト ( $\Delta 3\sim\Delta 5$ ) を作成し、Sho1 との結合を検討した。その結果 Sho1 は Ahk1 の C 末 3分の1 のコンストラクトに結合することが分かった (Figure 14A,B)。この領域の配列を探索した結果、プロリンを多く含む配列 (MKPLPVPKD) が含まれていた。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[52]、既知の Sho1 結合タンパク質 Pbs2 の結合サイト (NKPLPPLPVA) と配列が似ていることから[24]、このサイトが Sho1 の結合ドメインだと予想した。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結果、Ahk1-3P/S 変異体は Sho1 との結合が大きく損なわれた(Figure 14C)。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。

次に Ahk1 と Sho1 の結合が恒常活性型変異体 Opy2-F96I A104V による経路活性化に重要であるか検討するため、恒常的活性型変異体 Opy2 と Ahk1-3P/S 変異体を *ssk2/22 $\Delta$  msb2 $\Delta$  opy2 $\Delta$  ahk1 $\Delta$* 株に導入し、HOG 経路活性を測定した。しかし Ahk1-3P/S 変異体は野生型 Ahk1 と同程度の活性を示した(Figure 14D)。よって Ahk1-Sho1 結合は恒常的活性型変異体 Opy2 による Hog1 の活性化に必須ではないと考えられる。Sho1 と Ahk1 の結合がどのような役割を持つかは今のところ未解明である。

## 2.7 Ahk1 は高浸透圧ストレス依存的に Pbs2 MAPKK に結合する

Ahk1 が Pbs2 MAPKK に結合するか検討するため、N 末端に GST タグを付加した Pbs2 (GST-Pbs2) を用いて共沈降を行った。全長型の Pbs2 は Ahk1 に結合しなかったが、N 末半分のコストラクト (Pbs2- $\Delta$ C) は 1M NaCl の高浸透圧刺激を加えると Ahk1 との結合が誘導された(Figure 15A, B)。Pbs2N 末端領域は、Ssk2/22[53], Sho1[24], Hog1[54], Nbp2[55]など HOG 経路ではたらく複数の因子の結合領域を含んでいる。Ahk1 の結合領域を特定するため、Pbs2 の N 末領域の種々の欠失体を作成し、Ahk1 との結合実験を行った。その結果、Pbs2 の Ahk1 結合領域は 120-150 残基の間と特定された(Figure 15C, D)。この領域は Ssk2/22 や Sho1 の結合サイトとは異なるが、Hog1 の結合サイトの 1つ (HBD-1, 136-245 残基) [54]と一部重複した。

続いて Ahk1 の Pbs2 結合サイトを特定した。Pbs2 は Ahk1 の C 末 3分の1 のコンストラクト( $\Delta 5$ )に高浸透圧刺激依存的に結合した(Figure 16 A, B)。この領域を詳細に検討したところ、Pbs2 は Ahk1 $\Delta 7$ 断片(721-810 残基)に結合した(Figure 16C, D)。最終的に Pbs2-BD を 766-810 残基の領域と特定した (Figure 16 E, F)。この高浸透圧



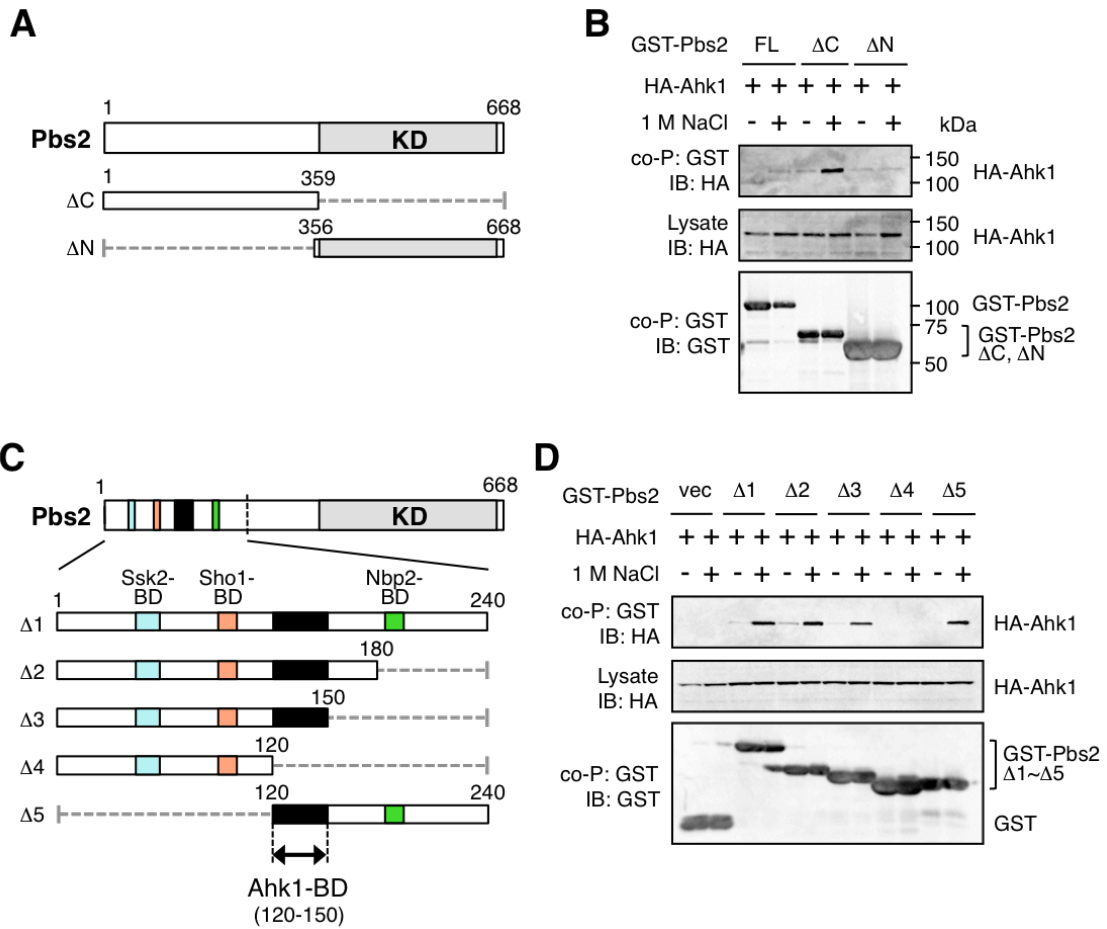
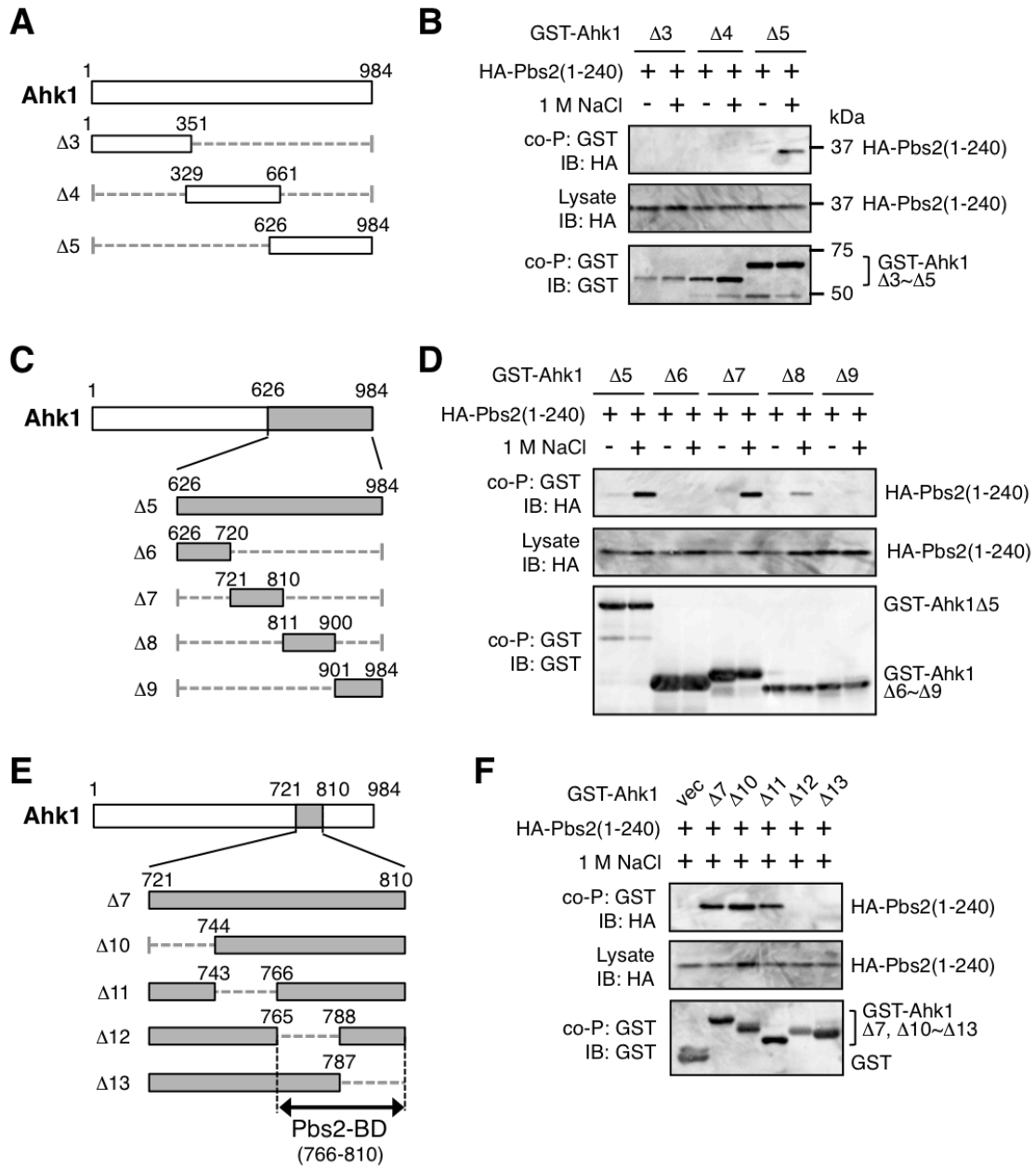


Figure 15 Ahk1 は Pbs2 の N 末端領域に高浸透圧刺激依存的に結合する

(A, C) Pbs2 欠失体模式図。(C)では N 末端領域を拡大して示している。既知の結合領域を色付きで示した。KD, kinase domain (B, D) *in vivo* 結合実験。TM257 に *GAL1* プロモーターにつないだ HA-Ahk1 と(A, C)で示した GST-Pbs2 を導入し、Fig. 10B と同様に共沈降実験を行った。FL, full-length; vec, GST vector.

刺激依存的な結合は、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*) や MAPK を欠失させた株 (*ssk2/22Δ hog1Δ fus3Δ kss1Δ*)、HOG 経路の MAPKKK を欠失させた株 (*ssk2/22Δ ste11Δ*) いずれにおいても確認された(data not shown)。よってこの刺激依存的結合は経路上流や下流からのシグナルによって誘導されているわけではない。Pbs2 もしくは Ahk1 自身が高浸透圧刺激によって構造変化などを行うことで、結合が誘導されていると予想される。



**Figure 16** Pbs2 の Ahk1 結合ドメインのマッピング

(A, C, E) Ahk1 の欠失体模式図。(B, D, F) *in vivo* 結合実験。TM257 に *GAL1* プロモーターにつないだ HA-Pbs2 の N 末断片 (HA-Pbs2(1-240)) と(A, C, E)で示した GST-Ahk1 変異体を導入し、Fig. 10B と同様に共沈降実験を行った。

## 2.8 Ahk1 は Ste11 MAPKKK と結合する

Ahk1 は SHO1 支経路の Ste11 MAPKKK とも結合することが分かった。Ste11 は Pbs2 同様、Ahk1 の C 末端 3 分の 1 に結合したが、Pbs2 とは異なり、恒常的に結合した(Figure 17A)。さらに $\Delta 5$  断片をより細かく分け共免疫沈降を行ったところ、 $\Delta 8$  (811-900 残基)の領域に結合した(Figure 17B)。よって Pbs2 と Ste11 は隣り合っているが、それぞれ明らかに異なる Ahk1 内の領域に結合することが示された。 $\Delta 5$  をもとに、詳細な部分欠失体を作成し結合領域を検討した結果、Ahk1 の Ste11 結合サイトは

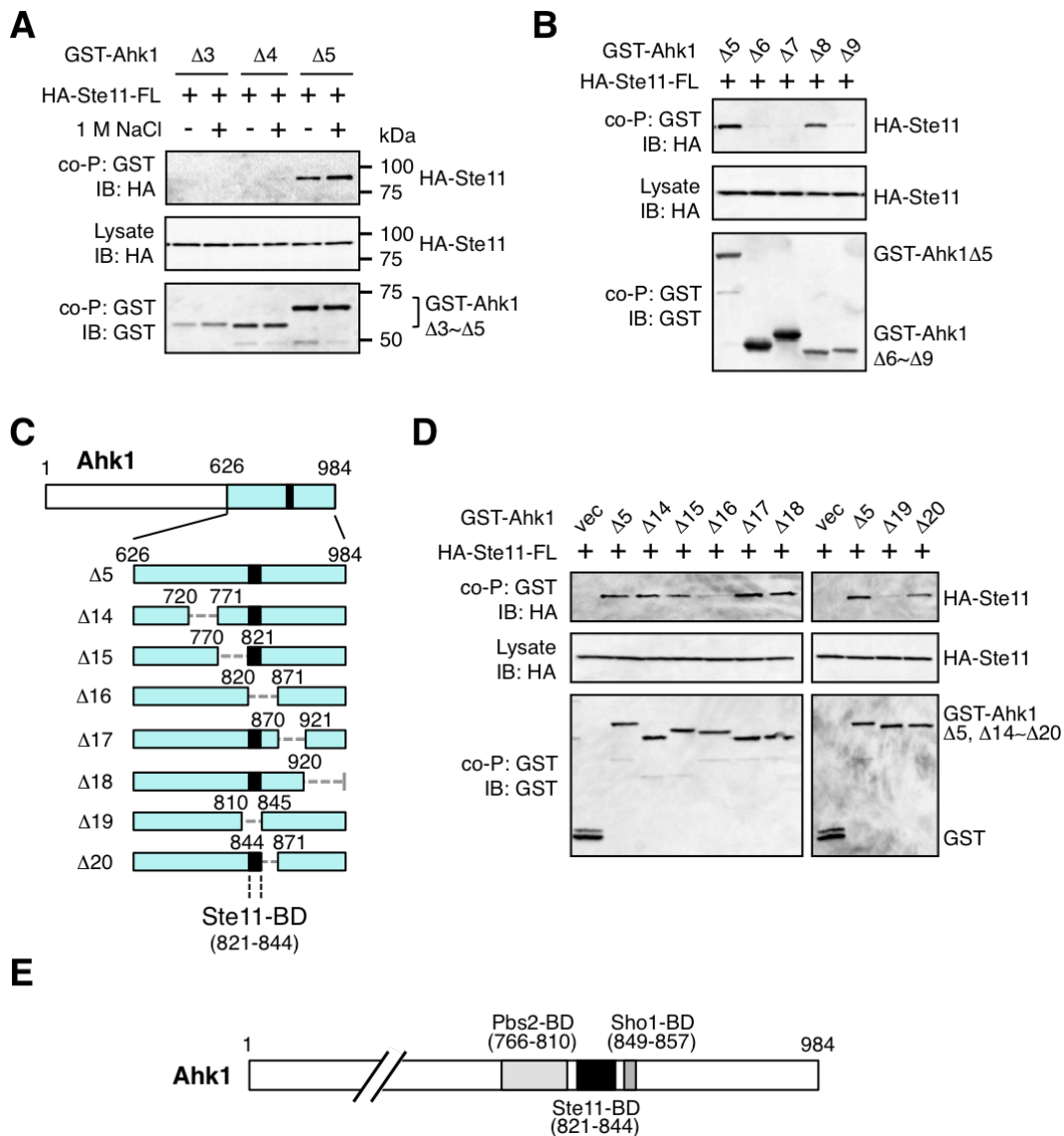


Figure 17 Ste11 の Ahk1 結合ドメインのマッピング

(A, B, D) Ahk1 と Ste11 の *in vivo* 結合実験。TM257 に HA-Ste11 と Fig. 17C で示した GST-Ahk1 変異体を導入し Fig. 10B と同様に共沈降を行った。(C) Ahk1 欠失体模式図 (E) Ahk1 内の結合領域のまとめ。

821-844 残基であることがわかった(Figure 17C, D)。Sho1, Ste11, Pbs2 はいずれも Ahk1 C 末端の近接した領域(766-857 残基)に結合するが、それぞれ異なる結合サイトを持っていた。

一方 Ahk1 は Ste11 の N 末端半分に結合した。この領域はいくつかのタンパク質の結合領域を含む。最も N 末に位置する SAM (sterile alpha motif)ドメイン (21-83 残基)には、アダプタータンパク質 Ste50 が[34,56,57]、RBL (Ras-binding-domain-like)ドメイン (116-236 残基)には mating 経路の足場タンパク質 Ste5 が結合する[58]。AI

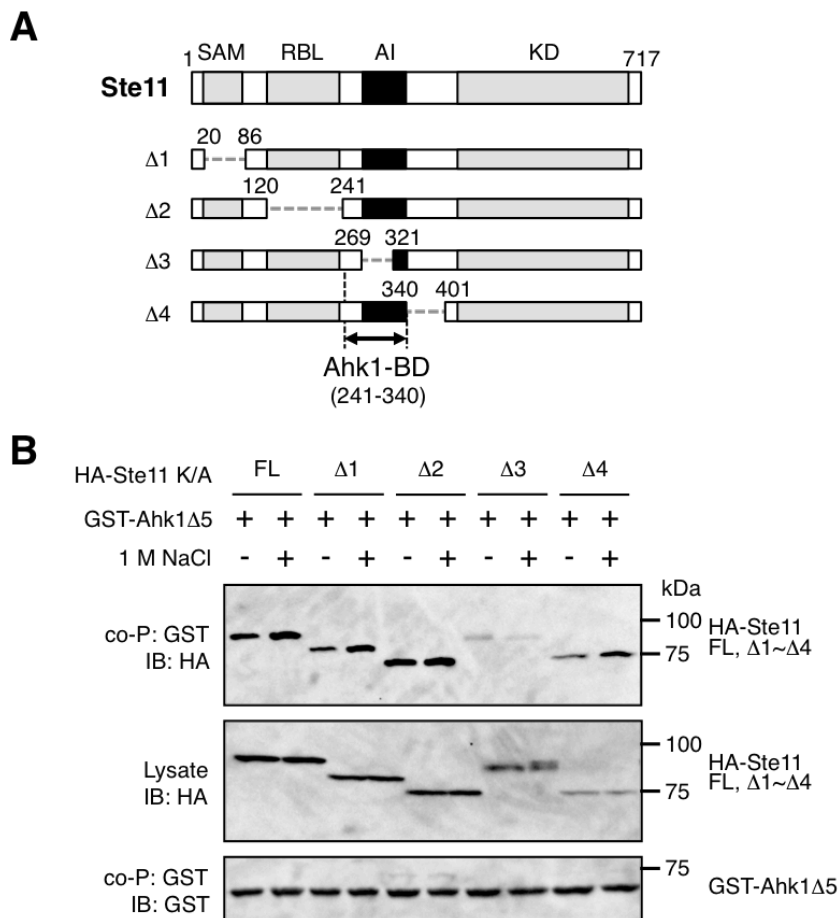


Figure 18 Ahk1 の Ste11-BD のマッピング

(A) Ste11 の欠失体模式図。SAM, sterile alpha motif domain; RBL, Ras-binding-domain-like domain; AI, auto-inhibitory domain; KD, kinase domain; BD, binding domain (B) Ahk1 と Ste11 の *in vivo* 結合実験。共沈降は Fig. 10B と同様に行った。FL, full-length

(autoinhibitory) ドメイン (270-340 残基) は C 末のキナーゼドメインに結合することで、自身の活性化を抑制している。PAK 様キナーゼ Ste20 によってリン酸化されると AI ドメインによる自己抑制が解除される [35,36]。Ahk1 の結合サイトを特定するため、Ste11 N 末のそれぞれの機能ドメインを欠失させた変異体を作成した (Figure 18A)。その結果、Ahk1 は AI ドメインを欠失させると、Ste11 に結合できなくなったが、SAM ドメインと RBL ドメインを欠失させても、結合に影響は見られなかった (Figure 18B)。Ahk1 は Ste11 AI ドメインに結合することで、Ste11 の活性制御に関与している可能性がある。Ste11 活性制御における Ahk1 の役割は今後の検討課題である。

## 2.9 Ahk1 は HKR1 副支経路を介した cross-talk を抑制する

Ahk1 が HKR1 副支経路の 4 つの因子 (Hkr1, Sho1, Ste11, Pbs2) に結合することから、Ahk1 が HKR1 副支経路の足場タンパク質として機能すると予想された。足場タンパク質の中には、活性化したキナーゼが異なる経路の基質と相互作用することを抑制し、経路の特異性を維持するものがある。Ahk1 が HKR1 副支経路のシグナル特異性維持に寄与している可能性を検討した。

野生型株に高浸透圧刺激を加えると、Filamentous growth 経路の Kss1 MAPK の一過的な活性化 (リン酸化) が起こるが、このリン酸化はすぐに消失する。しかし HOG 経路の Pbs2 MAPKK や Hog1 MAPK の欠損株に高浸透圧刺激を加えると、活性化された SHO1 支経路の Ste11 MAPKKK が Filamentous growth 経路の Ste7 MAPKK, Kss1 MAPK を活性化する cross-talk が起こり (Figure 6)、Kss1 の活性化ははるかに長く継続する (Figure 19) [49]。

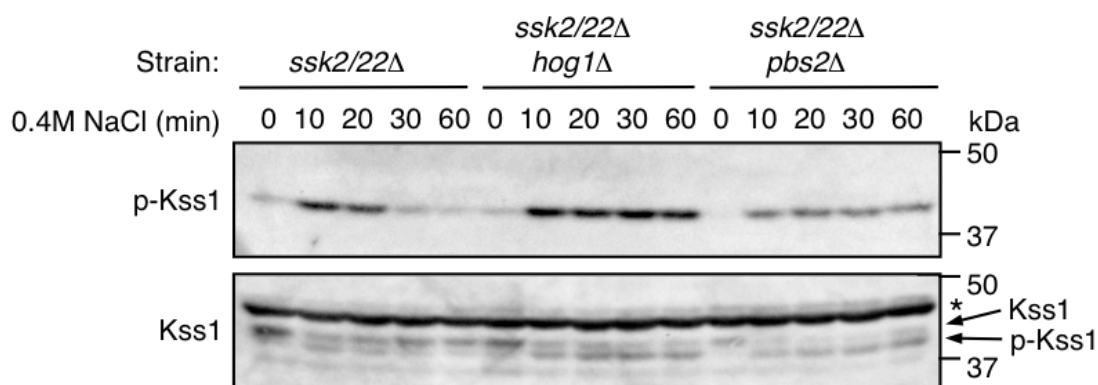


Figure 19 高浸透圧刺激による Kss1 リン酸化

YPD で対数増殖期まで培養した TM257 (*ssk2/22Δ*), FP20 (*ssk2/22Δ hog1Δ*), KT207 (*ssk2/22Δ pbs2Δ*) 細胞に 0.4M NaCl 刺激を加え一定時間後に回収した。各レーンには 20μg のタンパク質を使用し、リン酸化 Kss1 と Kss1 の量を免疫ブロットにより決定した。

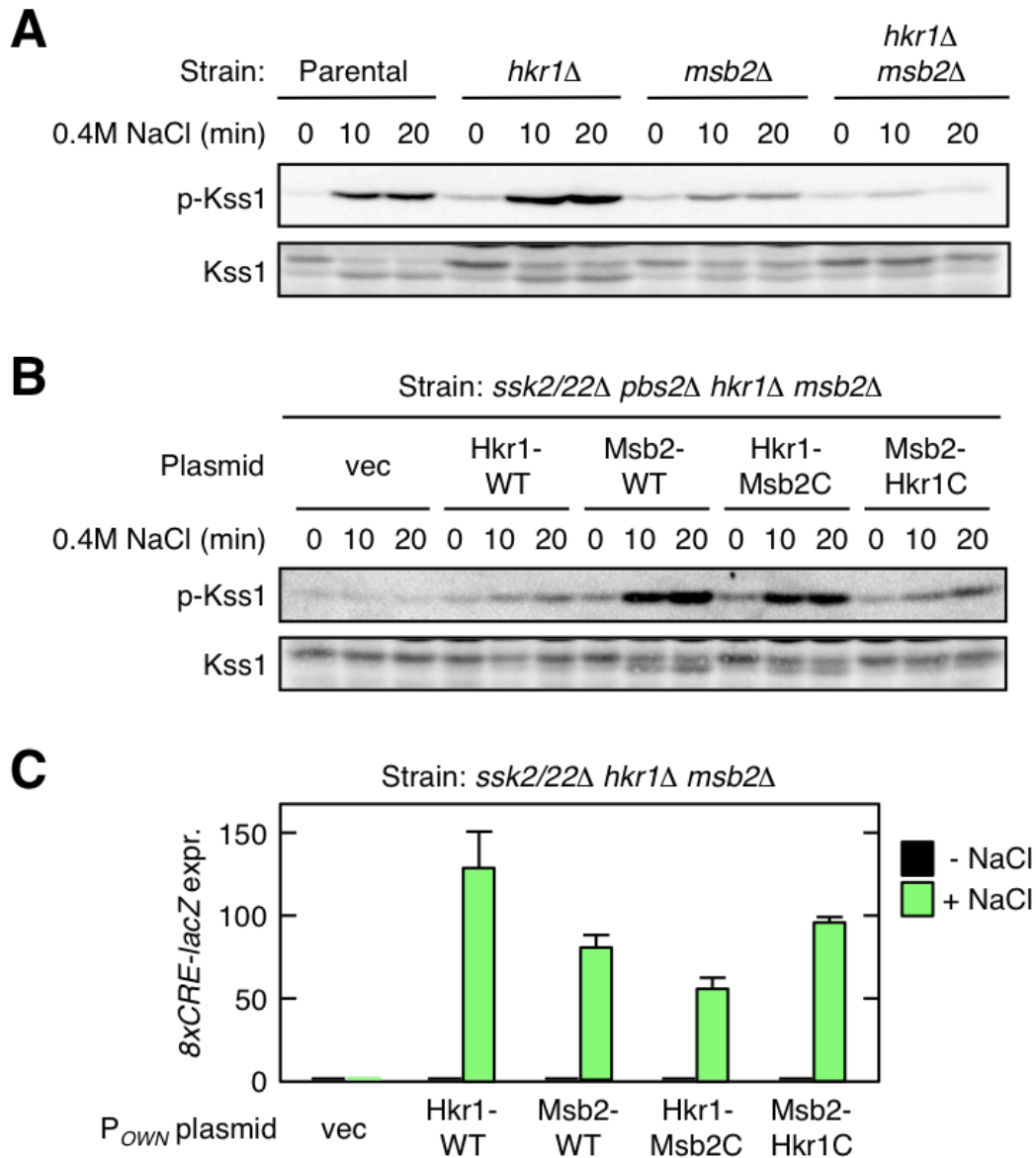


Figure 20 HKR1, MSB2 副支経路を介した Kcross-talk

(A,B) Figure 19 と同様の手順で Kss1 リン酸化プロットを行った。用いた株は下記の通り。(A) KT207 (*ssk2/22Δ pbs2Δ*) = Parental, KT071 (*ssk2/22Δ pbs2Δ hkr1Δ*), KT037 (*ssk2/22Δ pbs2Δ msb2Δ*), KT074 (*ssk2/22Δ pbs2Δ hkr1Δ msb2Δ*) (B) KT074 (*ssk2/22Δ pbs2Δ hkr1Δ msb2Δ*) 株に示したプラスミドを導入した。vec, empty vecto (C) KT074 株に自身のプロモーターを持つ Hkr1 もしくは Msb2 シングルコピープラスミドとレポータープラスミドを導入した。0.4M NaCl で 30 分間高浸透圧刺激を加えた後細胞を回収し *8xCRE-lacZ* の発現を測定した。

cross-talk は SHO1 支経路特異的に起こる反応である。しかし Ste11 が MSB2 副支経路を介して活性化された(*ssk2/22Δ hkr1Δ pbs2Δ*)ときには Kss1 の十分な活性化が起こるのに対し、HKR1 副支経路を介して活性化された(*ssk2/22Δ msb2Δ pbs2Δ*)際には弱い活性化しか起こらなかった(A)。さらに Hkr1 と Msb2 の cyto キメラ変異体を用いて cross-talk 活性を測定した結果、Hkr1-Msb2C では Kss1 の活性化が起こったが、Msb2-Hkr1C では起こらなかった(Figure 20B)。一方、Hkr1 や Msb2-Hkr1C は、高浸透圧刺激時に Msb2 WT や Hkr1-Msb2C と同程度もしくはそれ以上の Hog1 活性を誘導した(Figure 20C)。よってこれらのプラスミドを介した Ste11 活性化は問題なく起こると言える。これをふまえて考えると、Figure 20B の結果は、Hkr1-cyto を介した高浸透圧刺激は、cross-talk を起こさないと結論づけられる。この原因は2つの可能性が考えられる。1つめは Hkr1-cyto からのシグナルは FG 経路を活性化できないこと、2つめは Hkr1-cyto を介した FG 経路への cross-talk の抑制機構が存在することである。

Hkr1-cyto に結合し足場タンパク質として機能する *AHK1* の欠損株で cross-talk 活性を測定したところ、*ahk1Δ*株では Hkr1-cyto を介した cross-talk 活性が亢進した。よって Ahk 1 は Hkr1-cyto を介した cross-talk を抑制し、HKR 1 副支経路の経路特異性の維持に寄与していることがわかった(Figure 21)。

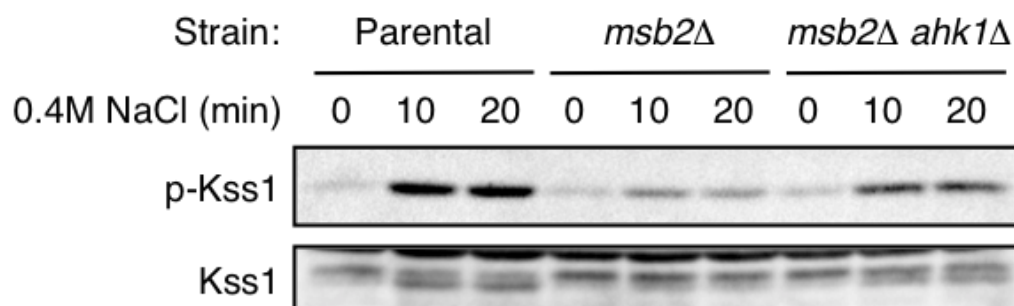


Figure 21 Ahk1 は HKR1 副支経路を介した cross-talk を抑制する

Figure 19 と同様の手順で Kss1 リン酸化プロットを行った。用いた株: FP20 (*ssk2/22Δ hog1Δ*) = Parental, TA124 (*ssk2/22Δ hog1Δ msb2Δ*), AN33 (*ssk2/22Δ hog1Δ msb2Δ ahk1Δ*)

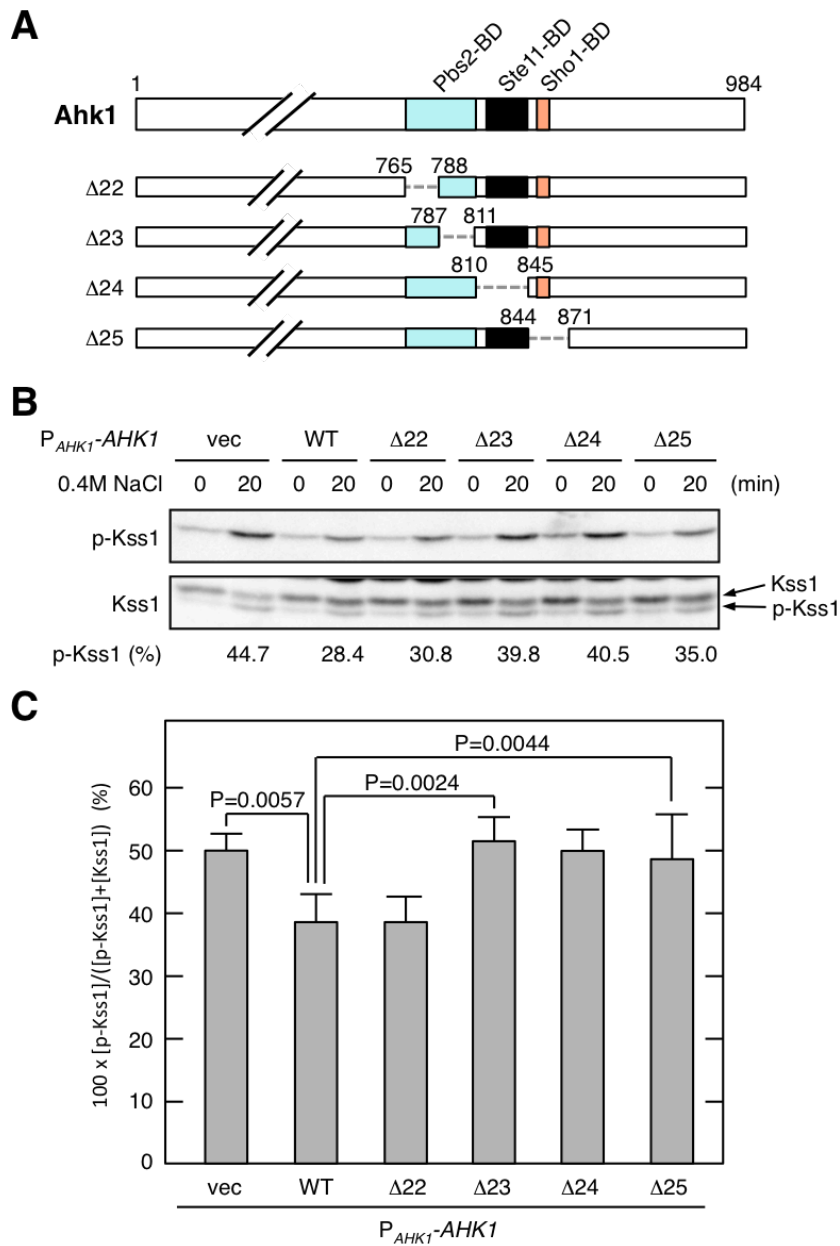


Figure 22 cross-talk の抑制に必要な Ahk1 ドメイン

(A) B,C の実験で用いた Ahk1 欠失体模式図。点線は欠失領域を示す。(B-C) 高浸透圧刺激時の Kss1 リン酸化。AN33 (*ssk2/22Δ hog1Δ msb2Δ ahk1Δ*)株に空ベクターもしくは Ahk1 プラスミドを導入し、0.4M NaClを加えて表示時間ごとに細胞を回収。リン酸化 Kss1 と全 Kss1 量を免疫プロットによって決定した。p-Kss1 と Kss1 バンド強度は Image Lab プログラム (Bio Rad) を用いて定量した。代表的な結果を(B)に示した。独立した 5 回の実験結果をまとめた(C) エラーバーは標準誤差を表す(n=5)。統計：スチューデントの両側 t 検定



そこで続いて Ahk1 内のいずれかの BD が cross-talk 抑制に重要であるかを検討した。そのため Pbs2, Ste11, Sho1 のそれぞれの BD を欠失した変異体を作成した (Figure 22A)。この変異体を *ssk2/22Δ hog1Δ msb2Δ ahk1Δ*株に導入し、高浸透圧刺激時の cross-talk 活性を測定した。Figure 22B にはその典型的な Kss1 リン酸化プロットを示した。Ahk1-WT 発現させると、空ベクターのコントロールに比べ明らかに Kss1 のリン酸化が減少し、Ahk1 による cross-talk 抑制が確認された。Ahk1 による cross-talk 抑制を定量的に算出するため、SDS-PAGE の際にリン酸化型 Kss1 (p-Kss1) と非リン酸化型 Kss1 (Kss1) の泳動度が異なるという事実に着目した。(Figure 22B 下段パネル参照) そこで下記の計算式をもとに Kss1 リン酸化量を計算した。

$$\text{Kss1 リン酸化 (\%)} = 100 \times [\text{p-Kss1}] / ([\text{p-Kss1}] + [\text{Kss1}])$$

ここで [p-Kss1], [Kss1] とは、それぞれのバンド強度を意味する。

4つの Ahk1 部分欠失変異のうち、3つ(Δ23, Δ24, Δ25)は cross-talk を抑制しなかった (Figure 22C)。よって Ste11, Sho1 と Ahk1 の結合が cross-talk の抑制に重要だと考えられる。Pbs2 との結合が cross-talk 抑制に重要であるかは明らかでない。Pbs2 との結合が阻害される変異体2つのうちの1つ(Δ22)は依然として cross-talk を抑制した。(Figure 16E, F 参照) Ahk1-Δ22 変異により減弱した Pbs2 結合でも、cross-talk 阻害には十分なかもしれない。これらの結果より Ahk1 は、Hkr1 高浸透圧センサーからのシグナルが Kss1 MAPK へと誤って伝達されないために重要な役割を果たしていると結論づけた。

### 3. 考察

#### 3.1 Ahk1 は HKR1 副支経路の足場タンパク質として HOG 経路を安定化する

足場タンパク質はシグナル経路上の複数のタンパク質と結合し、経路の特異性やシグナル伝達効率を決定する重要な因子である[59,60]。哺乳細胞において、細胞間シグナル分子や環境ストレスなどの細胞外刺激は、細胞表面のセンサーや受容体によって感知され細胞内へと伝えられる。細胞質では何千もの分子によってこのシグナルが伝達され、多くの場合最終的に核内において遺伝子発現や細胞周期が制御される。この過程には何千ものシグナル分子が存在するが、相同タンパク質ファミリーの数はそれに比べて少なく、同じファミリーのタンパク質は活性化メカニズムや基質特異性も類似している傾向にある。例えば出芽酵母は5つのホモログ MAPK (Fus3, Kss1, Hog1, Slt2, Smk1) を持つが、これらは全て活性ループ内の TXY モチーフを二箇所リン酸化されることで活性化し、基質の S/T-P モチーフをリン酸化する[61,62]。

本研究は、機能未知のタンパク質 Ydl073w = Ahk1 が HKR1 副支経路ではたらくシグナル因子 Hkr1, Sho1, Ste11, Pbs2 と結合し、HOG 経路の足場タンパク質として機能することを初めて示したものである。HOG 経路ではこれまで Pbs2 MAPKK が Sho1, Ste11, Hog1 に結合する足場タンパク質として機能することが知られていた [24,26]。また4回膜貫通型のセンサー膜タンパク質である Sho1 は、膜貫通領域(TM)を介してホモ多量体を形成するとともに、Opy2 や Hkr1 とともに結合し、足場タンパク質として Opy2-Sho1-Hkr1 複合体を形成している[32]。さらに Opy2 と Hkr1 同士も細胞外領域で結合することにより、Opy2-Sho1-Hkr1 複合体を安定化している(Figure 23)。この膜タンパク質複合体はさらに細胞質のシグナル伝達因子とも複合体を形成する。まず Sho1 は Pbs2 MAPKK と恒常的に結合しており、さらに高浸透圧刺激依存的にアダプタータンパク質の Ste50 と結合する。Opy2 は Ste50 を介して Ste11 MAPKKK と結合する。これらの結合により、Opy2-Sho1-Hkr1 複合体は細胞膜における MAPK カスケードの進行に中心的な役割をはたす。

本研究では MAPK カスケードの効率的な進行に、新たな足場タンパク質 Ahk1 が関与することを示した。Ahk1 は Hkr1, Sho1, Ste11 と恒常的に、Pbs2 と高浸透圧刺激依存的に結合する。これらの結合が全て一斉に起こると、Figure 23 に示したように Ste11-Pbs2-Hog1 MAPK カスケードが、膜の Opy2-Sho1-Hkr1 複合体(水色)と、細胞質の Ahk1 足場タンパク質(緑色)によって二重に安定化されることになる(Figure 23)。実際 *ahk1Δ*株は *AHK1+*株に比べ、高浸透圧刺激時の HOG 経路活性が半分程度にまで低下した。Ahk1 の足場機能は、後述するシグナル特異性の維持に加え、HKR1 副支経路を最大限の効率で活性化させるのに役立っていると考えられる。一方で Hog1



ことで、Ste11-Pbs2 間の相互作用をさらに促進し、Pbs2 の活性化を促しているのかもしれない。Ahk1 は Ste11 の AI ドメインに恒常的に結合する。HOG 経路活性化において、この結合がどのような役割を果たしているかは未解明だが、Ste11 内の AI ドメインとキナーゼドメインの結合が切れて自己抑制が解除されると、Ahk1-Ste11 結合が開いた Ste11 の構造を安定化し、Ste11 による Pbs2 活性化を補助している可能性がある。Ahk1 と各シグナル因子との結合と経路活性化の関係性は未解明であり、今後明らかにしていくべき重要な課題である。

### 3.3 Ahk1 は HKR1 副支経路の経路特異性を維持する

経路間の特異性が保たれることは、ストレス環境を生き抜くために非常に重要なメカニズムである。Mating 経路や Filamentous growth 経路が活性化して細胞の形状の変化が起こる際には、細胞の形状維持に重要な細胞壁の再構築が起こるため、高浸透圧ストレスに特に弱い状態になる。高浸透圧環境において HOG 経路のみが活性化し、Mating 経路や Filamentous growth 経路の活性が抑えられることは、高浸透圧ストレス環境を生き抜くために非常に重要だと考えられる。一方で複数の経路間で cross-talk が起こることが生存に有利にはたらく場合もある。高浸透圧に持続的にさらされた細胞では高浸透圧適応が完了し HOG 経路は不活性化される。その後フェロモンにより Mating 経路が活性化されると、これが引き金となって HOG 経路の再活性化が誘導される。これは接合で形態が変化する際に細胞内の浸透圧低下が起こるため、HOG 経路の再活性化が必要になるからだと考えられている[74]。経路間で cross-talk をおこすことで環境適応に働く好例である。多種多様な環境ストレスに応答するためには、経路の特異性を維持する機構と、複数の経路を活性化する機構の両方が必要であり、ストレス刺激に応じた複雑なバランスが保たれていると考えられる。

本研究では経路特異性維持機構に注目し、HOG 経路の特異性維持に関する新たな知見を得た。足場タンパク質は経路特異性の維持において重要な機能をもつことが知られている。Mating 経路の足場タンパク質 Ste5 は、Gβy(Ste4/Ste18), Ste11, Ste7, Fus3 に同時に結合することでフェロモン受容体からのシグナルの流れを Mating 経路のみに限定している[63-66]。Ste5 が欠失すると、Filamentous growth 経路を制御する Ste11-Ste7-Kss1 シグナルカスケードが活性化される[67-69]。Ste5 が Mating 経路において Ste11-Ste7-Fus3 経路の特異性を保つと同様に、HOG 経路の新規足場タンパク質 Ahk1 のはたらきにより、高浸透圧センサー Hkr1 を介したシグナルは Ste11-Pbs2-Hog1 MAPK カスケードへと適切に伝達される(Figure 24)。Ahk1 足場タンパク質がないと、高浸透圧刺激によって Hkr1 が活性化され生じたシグナルは

cross-talk により Ste11-Ste7-Kss1 シグナルカスケードへと伝達される。HKR1 副支経路を介した Filamentous growth 経路への cross-talk を抑制する機構を示した例は今までになく、非常に重要な知見である。

しかし Ahk1 がどのようにして cross-talk の抑制を行っているかは今のところ未解明である。Ahk1 が Ste11 から Pbs2 へのシグナル伝達を補助することで Filamentous growth 経路への cross-talk を抑制している可能性が考えられた。しかし、Pbs2 との結合ができない Ahk1- $\Delta$ 22 変異体でも cross-talk が抑制されたことから、Ahk1-Pbs2 結合は cross-talk 抑制に必須ではないと考えられる。一方 Sho1 及び Ste11 の結合ドメイン欠失変異体 Ahk1- $\Delta$ 23, $\Delta$ 24, $\Delta$ 25 では、cross-talk 抑制が起こらなかった。よって、Sho1, Ste11 と Ahk1 が結合することが cross-talk 抑制に重要である可能性がある。Ahk1 が Sho1 と Ste11 の両方と同時に結合することで、活性化した Ste11 が Filamentous growth 経路の Ste7 MAPKK と結合し活性化することを阻害しているのかもしれない。

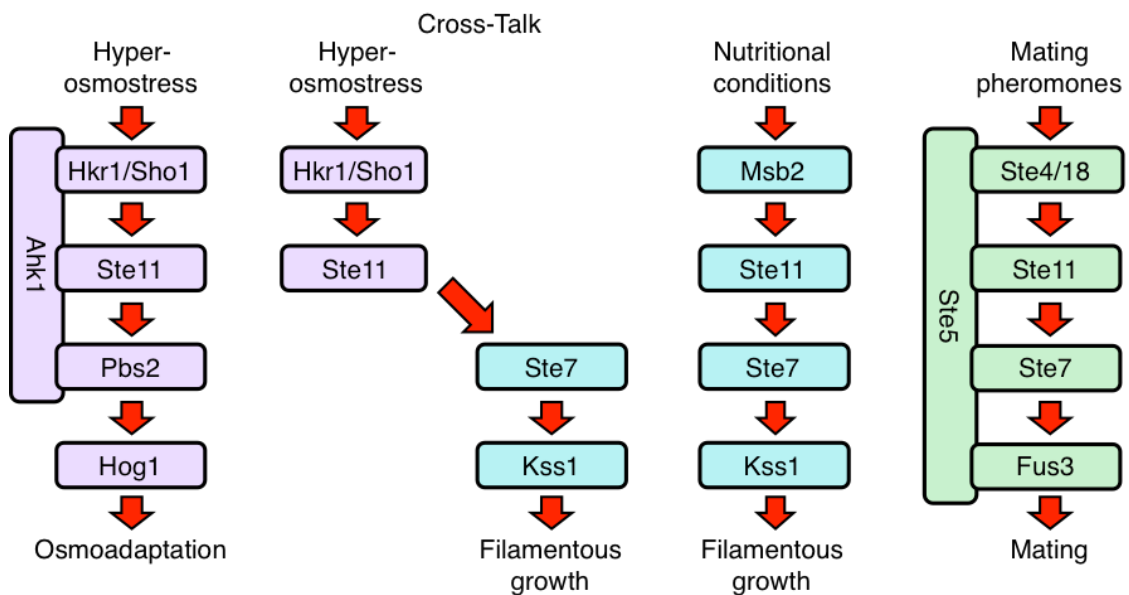


Figure 24 Ste11 MAPKKK を共通して用いる MAPK カスケードの模式図

シグナルの流れは赤矢印で示した。各経路は簡略化のためシグナル分子を省略して示した。

## 4. 展望

### 4.1 Ahk1 の機能解析

Ahk1 は HKR1 副支経路の足場タンパク質として4つのシグナル因子と結合し、HOG 経路活性化とシグナル特異性の維持にはたらくことが明らかになった。しかし詳細なメカニズムについては、未解明な点が残されている。

1. Ahk1 と HKR1 副支経路の各シグナル因子間の結合と、HOG 経路活性化の関係性
2. 恒常的活性型変異体 Opy2, Ste50 の過剰発現による HOG 経路活性化における Ahk1 の機能
3. Ahk1 による HKR1 副支経路を介した cross-talk の抑制機構

これらを明らかにすることで、Ahk1 の HKR1 副支経路における足場タンパク質としての機能を解明する。本研究で詳細にマッピングしたそれぞれのシグナル因子の結合ドメインに関するデータは、これらの問題を解くにあたり非常に重要な知見になると期待される。

### 4.2 HKR1 副支経路のシグナル伝達機構の解明

Hkr1-cyto はその N 末と C 末の両末端の欠失で HOG 経路活性が低下する。しかし今回見つけた結合因子 Ahk1 の結合領域は N 末領域であり、C 末端の領域については結合因子や機能がわかっていない。Hkr1-cyto の C 末端の機能解析も HKR1 副支経路のシグナル伝達機構解明において極めて重要だと考えられる。MSB2 副支経路では Ste11 MAPKKK のキナーゼ Ste20 / Cla4 を膜にリクルートすることで、シグナル伝達の効率化を実現していた。Hkr1-cyto の C 末端は Ste20 による Ste11 活性化に関わる機能を持つのかもしれない。

本研究が示した通り、HKR1 副支経路と MSB2 副支経路では、細胞内におけるシグナル伝達のメカニズムが異なる。しかし高浸透圧応答における機能に大きな違いは見られない。なぜこのような重複した経路が存在するのか、それぞれの経路に役割の違いはあるのかについても、今後明らかにすべき課題である。

## 5. 実験方法

### 5.1 酵母株

本研究で用いた酵母株はいずれも S288C 株をもとに作成した (Table 3)。遺伝子破壊は PCR 産物をもとに行い、ミスセンス変異や欠失変異はオリゴヌクレオチドをもとに変異を導入した [53]。

Table 3 使用した酵母株

Strain	Genotype	Source
AN01	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 hkr1::natMX4 ste11-Q301P</i>	42
AN09	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 ahk1::hphMX4</i>	This study
AN10	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 ahk1::hphMX4</i>	This study
AN18	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 ahk1::hphMX4 opy2::natMX4</i>	This study
AN25	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 ste11-Q301P ahk1::hphMX4</i>	This study
AN33	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 ahk1::hphMX4 hog1::natMX4</i>	This study
FP20	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 hog1::TRP1</i>	31
KT018	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 ste11-Q301P</i>	70
KT034	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6</i>	33
KT037	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 pbs2::HIS3</i>	This study
KT063	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 hkr1::natMX4</i>	33
KT071	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 hkr1::natMX4 pbs2::HIS3</i>	This study
KT074	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 hkr1::natMX4 pbs2::HIS3</i>	This study

KT207	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 pbs2::hphMX4</i>	This study
TA124	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2 msb2::kanMX6 hog1::hphMX4</i>	This study
TH075	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::hisG ssk22::hisG ste11::kanMX6</i>	30
TM257	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his3 ssk2::LEU2 ssk22::LEU2</i>	24

## 5.2 培地、バッファー

YPD 培地は 1% Yeast Extract (Becton Dickinson), 2% トリプトン (Becton Dickinson) と 2% グルコースからなる。CAD (もしくは CARaf) 培地は 0.67% Yeast nitrogen base (Sigma), 2% グルコース (もしくはラフィノース), 0.5% casamino acid (Sigma) と必要に応じた栄養素 (20  $\mu$ g/ml ウラシルや 40  $\mu$ g/ml トリプトファン)。SRaf 培地は 0.67% Yeast nitrogen base, 2% ラフィノースと必要に応じた yeast synthetic drop-out medium supplement を加えた。

共免疫沈降で用いた Buffer A は、50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin, 50 mM NaF, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100 からなる。SDS loading buffer (1x) は 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0.01% Bromophenol Blue, 10% グリセロール, 700 mM 2-mercaptoethanol (2-ME) を含む。TBS buffer は 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl からなる。Buffer Z は 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> を合わせ pH 7.0 に調整した。

## 5.3 プラスミド

欠失変異やミスセンス変異はオリゴヌクレオチドを用いた PCR によって導入し、その配列をシーケンスにかけて確認した。

ベクタープラスミド pRS414, pRS416, p414GAL1, p416GAL1, pRS426GAL1, p426GAL1-GST, YCpIF16, pYES2, and YCplac22I' は先行研究で用いたベクター [30,53,54,71]。GAL1 プロモーターのもとで FLAG タグを発現するプラスミド pRS426GAL1-Flag は、5'-ATGGACTACAAGGATGACGATGACAAG-3' のオリゴヌクレオチドを pRS426GAL1 プラスミドの GAL1 プロモーター下流に挿入して作成した。



Ahk1 プラスミド pRS414-Ahk1 (=  $P_{AHK1}$ -*AHK1*, *TRP1*, *CEN6*) とその変異体は *AHK1* プロモーターのもとで *AHK1* を発現するゲノム DNA クローン。p426GST-Ahk1 (=  $P_{GALI}$ -*GST-AHK1*, *URA3*,  $2\mu$ ) は N 末端に GST タグを付加した Ahk1。pHA-Ahk1 (=  $P_{GALI}$ -*HA-AHK1*, *TRP1*, *CEN4*) は YCpIF16 ベクターをもととし、N 末端に HA タグを付加した Ahk1。

Hkr1 プラスミド pRS416-Hkr1 (=  $P_{HKR1}$ -*HKR1*, *URA3*, *CEN6*) とその変異体は *HKR1* プロモーターのもとで *HKR1* を発現するゲノム DNA クローン。pRS414GAL1-Hkr1 $\Delta$ STR-2xHA (=  $P_{GALI}$ -*Hkr1* $\Delta$ (41-1200)-*HA*, *TRP1*, *CEN6*) は欠失部位中と C 末端の二カ所に HA タグを挿入している。pRS426GAL1-Flag-Hkr1cyto (=  $P_{GALI}$ -*Flag-Hkr1*, *URA3*,  $2\mu$ ) は N 末端に Flag タグを付加した Hkr1 細胞内領域 (1527-1802 残基)。p416-Hkr1-Msb2C と p416-Msb2-Hkr1C は Msb2 と Hkr1 の細胞内領域を置換している。

Msb2 プラスミド pRS416GAL1-Msb2 $\Delta$ STR-2xHA (=  $P_{GALI}$ -*Msb2* $\Delta$ (49-950)-*HA*, *URA3*, *CEN6*) は欠失部位中と C 末端の二カ所に HA タグを挿入している。

Opy2 プラスミド p416GAL1-Opy2-F96I A104V (=  $P_{GALI}$ -*OPY2-F96I A104V*, *URA3*, *CEN6*) は *GAL1* プロモーターのもとで *Opy2* を発現するプラスミド。

Pbs2 プラスミド pHA-Pbs2(1-240) (=  $P_{GALI}$ -*HA-Pbs2*, *TRP1*, *CEN4*) は YCpIF16 ベクターをもととし、N 末端に HA タグを付加した Pbs2。p426GST-Pbs2 (=  $P_{GALI}$ -*GST-PBS2*, *URA3*,  $2\mu$ ) は N 末端に GST タグを付加した Pbs2。

Sho1 プラスミド pHA-Sho1 (=  $P_{GALI}$ -*HA-SHO1*, *TRP1*, *CEN4*) は YCpIF16 ベクターをもととし、N 末端に HA タグを付加した Sho1。

Ssk2 プラスミド pYES2-Ssk2 $\Delta$ N (=  $P_{GALI}$ -*SSK2*(1173-1579), *URA3*,  $2\mu$ ) は pYES2 ベクターをもととし、*GAL1* プロモーターのもとで *Ssk2* の 1173-1579 残基を発現するプラスミド。

Ste11 プラスミド pHA-Ste11 (=  $P_{GALI}$ -*HA-Ste11*, *TRP1*, *CEN4*) は YCpIF16 ベクターをもととし、N 末端に HA タグを付加した Ste11。YCplac22I'-Ste11 (=  $P_{STE11}$ -*STE11*, *TRP1*, *CEN4*) は YCplac22I' ベクターをもとに作成した、*STE11* プロモーターをもつ

*STE11* のゲノム DNA クローン。

Ste50 プラスミド pHA-Ste50-D146F (=  $P_{GALI}$ -HA-*STE50-D146F*, *TRP1*, *CEN4*) は YCpIF16 ベクターをもととし、N 末端に HA タグを付加した Ste50。

#### 5.4 レポーターアッセイ

3 つ以上の形質転換細胞をそれぞれ対数増殖期まで培養し、下記のように HOG 経路活性化刺激を加えた。HOG 経路特異的レポーター遺伝子  $8\times CRE$ -*lacZ* を用いて活性を定量した。高浸透圧刺激実験の場合には、CAD 培地で細胞を培養し、4M NaCl 溶液を最終濃度 0.4M になるように添加して 30 分間震盪培養した。恒常的活性型変異体 *Opy2*, *Ste50*, *Ssk2* の過剰発現実験の場合には、CARaf 培地で細胞を培養し、20%ガラクトース溶液を最終濃度 2%になるように添加した。ガラクトース添加後 2 時間震盪培養してそれぞれの実験に用いた恒常的活性型変異体 ( $P_{GALI}$ -*opy2-F96I A104V*,  $P_{GALI}$ -*ste50-D146F*,  $P_{GALI}$ -*ssk2ΔN*) の発現を誘導した。発現した  $\beta$ -galactosidase の活性を定量的に計測するため、対数増殖期の細胞を回収し、Buffer Z で 3 回細胞を洗った後 0.1ml の Buffer Z に懸濁し、凍結融解を二回繰り返して抽出液を得た。この細胞抽出液に、Buffer Z を 0.7 ml と、4 mg/ml o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)を加え、37°Cで反応させた。0.4 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加えて反応を停止させた後、遠心して得られた上清の OD<sub>420</sub> 値を測定した。 $\beta$ -galactosidase 活性 (Miller units) は下記の計算式により算出した。

$$\beta - gal. units = \frac{1000 \times OD_{420}}{\text{反応時間(分)} \times \text{培養液量(ml)} \times OD_{600}}$$

#### 5.5 *in vivo* 結合実験

CARaf 培地で培養している対数増殖期の細胞にガラクトースを濃度が 2%になるように加えさらに 2 時間培養した。4 M NaCl 溶液を最終濃度が 1 M になるように加えた後 (実験により加えたものと加えていないものがある)、すぐに 3,000g で 3 分遠心して細胞を回収し、Buffer A で洗って液体窒素で凍結させた。融解した細胞に 0.4 ml Buffer A とガラスビーズを加え、4°Cで 10 分間ボルテックスして 3 分間静置することを 2 回繰り返した後、4°Cで 15 分間 21,000 x g 遠心した。得られた上清を回収し、1000  $\mu$ g のライセートに 50  $\mu$ l の glutathione-Sepharose ビーズを加えて 4°Cで 2 時間反応させた。ビーズを Buffer A で 3 回洗い、1 x SDS-loading buffer に懸濁して 98°Cで 5 分

間反応させた後、SDS-PAGEにより分離した。免疫ブロットにはHA抗体 F-7 (Santa Cruz), 12CA5 (Roche), GST抗体 B-14 (Santa Cruz), FLAG抗体 M2 (Sigma), Hog1抗体 yC-20(Santa Cruz), Kss1抗体 yC-19(Santa Cruz)を用いた。リン酸化Hog1の検出には抗 p-p38 MAPK (T180/Y182) 抗体#9211 (Cell Signaling)、リン酸化Kss1の検出には抗 p-p44/42 MAPK (T202/Y204) 抗体#9106 (Cell Signaling) を用いた。Enhanced chemiluminescence イメージは CCD カメラを搭載した ChemDoc (BioRad) を用いて撮影した。バンド濃度の定量はBioRadの Image Labプログラム (version 4.1) を使って行った。

## 5.6 ショットガンプロテオミクス解析法

TM257 (*ssk2/22Δ*)株に、*GAL1* プロモーターのもとで FLAG-Hkr1cyto を発現する pRS426GAL1-FLAG-Hkr1cyto プラスミド、またはコントロールとなる p426GAL1-FLAG プラスミドを導入した。100 ml の CARaf 培地で対数増殖期まで培養し、最終濃度 2% のガラクトースを添加してさらに 2 時間培養した。細胞を回収し、*in vivo* 結合実験と同じ要領で細胞抽出液を精製した。得られた溶液に 30  $\mu$ l の抗 FLAG 抗体 M2 ビーズ(Sigma)を加え、4°C で 2 時間反応させた。Buffer A でビーズを 4 回洗い、TBS でさらに 4 回洗った。FLAG ビーズに結合したタンパク質は 0.25 mg/ml の FLAG ペプチド(Sigma, catalog No. F3290)を含む TBS 100  $\mu$ l に氷上で 1 時間つけて溶出し、18,000 x g で 1 分遠心して FLAG ビーズを分離した。溶液の一部を SDS-PAGE にかけて分離し SilverQuest™ 銀染色キット(Invitrogen)を用いてタンパクを溶出していることを確認した。

残りの溶液はトリプシン消化し、ZipTip C18 (Millipore)を用いて脱塩させた。ショットガンプロテオミクス解析はナノフローLC システム (Dina-2A, KYA Technologies) とリニアイオントラップ・orbitrap 質量分析計 (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific)を用いて行った[72]。ペプチドをナノエレクトロスプレー(KYA Technologies)を用いてイオン化し、衝突誘起乖離(collision-induced dissociation : CID)によって分析した。Mascot ver. 2.4.1 (Matrix Science)により、NCBI (National Center for Biotechnology Information)の *S. cerevisiae* データベースからタンパク質の同定を行った。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、多くの方にご助力頂きましたことを、心より感謝申し上げます。なかでも、実験計画から研究倫理に至るまで、終始熱心に様々なご指導を頂きました斎藤春雄教授、舘林和夫准教授には大変お世話になりました。本当にありがとうございました。

本研究は東京大学ライフイノベーション・リーディング大学院(GPLLI)のサポートを頂いております。

研究室メンバーの皆様のご指導にも感謝いたします。また私を支え続けてくれた両親にもこの場を借りて感謝を伝えたいと思います。

## 参考文献

1. Wood J.M., (1999), Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Reviews* **63**: 230-262.
2. Hohmann S., (2002), Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Reviews* **66**: 300-372.
3. Aiba H., Nakasai F., Mizushima S. and Mizuno T., (1989), Evidence for the physiological importance of the phosphotransfer between the two regulatory components, EnvZ and OmpR, in osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Bio Chem*, 264, 14090-14094.
4. Egger LA, Park H, Inouye M., (1997), Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes to Cells* **2**: 167-184.
5. Posas F., Wurgler-Murphy SM., Maeda T., Witten E.A., Thai T.C., Saito H., (1996), Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor., *Cell*. **86**:865-75.
6. Uhlik MT., Abell A.N., Johnson N.L., Sun W., Cuevas B.D., Lobel-Rice K.E., Horne E.A., Dell'Acqua M.L., Johnson G.L., (2003), Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock., *Nat Cell Biol*. **5**:1104-10. Epub 2003 Nov 23.
7. Chang L. and Karin M., (2001), Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**: 37-40.
8. Chen Z., Gibson T.B., Robinson F., Silvestro L., Pearson G., Xu B., Wright A., Vanderbilt C. and Cobb M.H., (2001), MAP kinases. *Chemical Reviews* **101**: 2449-2476.
9. Kyriakis J.M. and Avruch J., (2001), Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* **81**: 807-869.
10. Gustin M.C., Albert J., Alexander M. and Davenport K., (1998), MAP kinase pathways in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Reviews* **62**: 1264-1300.
11. Saito H. and Tatebayashi K., (2004), Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* **136**: 267-272.
12. Philip B. and Levin D.E., (2001), Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**: 271-280.
13. Levin D.E., (2005), Cell Wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Reviews* **69**: 262-291.
14. Krisak L., Strich R., Winters R.S., Hall J.P., Mallory M.J., Kreitzer D., Tuan R.S. and

- Winter E., (1994), SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**: 2151-2161.
15. Cullen P.J., Walid Sabbagh J., Graham E., Irick M.M., Olden E.K.v , Neal C., Delrow J., Bardwell L. and George F. Sprague J., (2004), A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**: 1695-1708.
  16. Mosch H.U., Roberts R.L. and Fink G.R., (1996), Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* **93**: 5352-5356.
  17. Chou S., Huang L. and Liu H., (2004), Fus3-regulated Tec1 degradation through SCF<sup>cdc4</sup> determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell* **119**: 981-900.
  18. Bao M.Z., Schwartz M.A., Cartin G.T., Yates III J.R. and Madhani H.D., (2004), Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**: 991-1000.
  19. Elion E.A., (2000), Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**: 573-581.
  20. Bradwell L., (2005), A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**: 339-350.
  21. Remenyi A., Good M.C., Bhattacharyya R.P. and Lim W.A., (2005), The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**: 951-962.
  22. Bardwell L., Cook J.G., Zhu-Shimoni J.X., Voora D. and Thorner J., (1998), Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *PNAS* **95**: 15400-15405.
  23. Chou S., Lane S. and Liu H., (2006), Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**:4794-4805.
  24. Maeda T, Takekawa M, Saito H., (1995), Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**:554-558.
  25. Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC., (1993), An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760-1763.
  26. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H., (1994), A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242-245.
  27. Egger LA1, Park H, Inouye M., (1997), Signal transduction via the histidyl-aspartyl

- phosphorelay. *Genes to Cells* **2**: 167-184.
28. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H., (1996), Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.
  29. Reiser V, Raitt DC, Saito H., (2003), Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* **161**:1035-1040.
  30. Horie T, Tatebayashi K, Yamada R, Saito H., (2008), Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 MAP kinase kinase kinase in the yeast HOG osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol* **28**:5172-5183.
  31. Posas F, Saito H., (1998), Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* **17**:1385-1394.
  32. Tatebayashi K, Yamamoto K, Nagoya M, Takayama T, Nishimura A, Sakurai M, Momma T, Saito H., (2015), Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nat Commun* **6**:6975.
  33. Tatebayashi K, Tanaka K, Yang H-Y, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, Saito H., (2007), Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**:3521-3533.
  34. Posas F, Witten EA, Saito H., (1998), Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **18**:5788-5796.
  35. van Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M., (2000), Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling *in vivo*. *Curr Biol* **10**:630-639.
  36. Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H., (2006), Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J* **25**:3033-3044.
  37. Lamson RE, Takahashi S, Winters MJ, Pryciak PM., (2006), Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity. *Curr Biol* **16**:618-623.
  38. Posas F, Saito H., (1997), Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-1705.
  39. Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA., (1998), Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO*

- J 19: 5606-5614.
40. Proft M., Struhl K., (2004), MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**:351-61.
  41. Escoté X., Zapater M, Clotet J, Posas F., (2004), Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* **6**: 997-1002.
  42. Tanaka K, Tatebayashi K, Nishimura A, Yamamoto K, Yang H-Y, Saito H., (2014), Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci Signal* **7**:ra21.
  43. K.Y. Choi., B. Satterberg, D.M. and Lyons, E.A. Elion., (1994), Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**: 499-512.
  44. M.S. Whiteway, C. Wu., T. Leeuw, K., Clark, A. Fourest-Lieuvin, D.Y. Thomas and E. Leberer, (1995), Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**: 1572-1575.
  45. Strickfaden SC., Winters MJ, Ben-Ari G, Lamson RE, Tyers M and Pryciak PM., (2007), A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell* **128**:519-31.
  46. Matthew Good., Grace Tang., Julie Singleton., Attila Reményi. and Wendell A. Lim., (2009), The Ste5 Scaffold Directs Mating Signaling by Catalytically Unlocking the Fus3 MAP Kinase for Activation. *Cell* **136**: 994-996.
  47. Sean M. O'Rourke and Ira Herskowitz, (1998), The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**: 2874-2886.
  48. O'Rourke SM, Herskowitz I., (2002), A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* **22**: 4739-4749.
  49. Teresa R. Shock, James Thompson, John R. Yates, III and Hiten D. Madhani, (2009), Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryot Cell* **8**: 606–616.
  50. Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, Hirozane-Kishikawa T, Gebreab F, Li N, Simonis N, Hao T, Rual J-F, Dricot A, Vazquez A, Murray RR, Simon C, Tardivo L, Tam S, Svrikapa N, Fan C, de Smet A-S, Motyl A, Hudson ME, Park J, Xin X,



- Cusick ME, Moore T, Boone C, Snyder M, Roth FP, Barabási A-L, Tavernier J, Hill DE, Vidal M., (2008), High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* **322**:104-110.
51. Kurtzman CP, Robnett CJ., (2003) Phylogenetic relationships among yeast of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res* **3**:417-432.
  52. Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL., (1994), Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interaction. *Science* **266**:1241-1247.
  53. Tatebayashi K, Takekawa M, Saito H., (2003), A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J* **22**:3624-3634.
  54. Murakami Y, Tatebayashi K, Saito H., (2008), Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 Mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **28**:2481-2494.
  55. Mapes J, Ota IM., (2004), Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *EMBO J* **23**:302-311.
  56. Wu C, Leberer E, Thomas DY, Whiteway M., (1999), Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**:2425-2440.
  57. Ramezani Rad M, Jansen G, Bühring F, Hollenberg CP., (1998), Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol Gen Genet* **259**:29-38.
  58. Yerko V, Sulea T, Ekiel I, Harcus D, Baardsnes J, Cygler M, Whiteway M, Wu C., (2013), Structurally unique interaction of RBD-like and PH domain is crucial for yeast pheromone signaling. *Mol Biol Cell* **24**:409-420.
  59. Good MC, Zalatan JG, Lim WA., (2011), Scaffold proteins: Hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**:680-686.
  60. Langeberg LK, Scott JD., (2015), Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**:232-244.
  61. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH., (2001), MAP kinases. *Chem Rev* **101**:2449-2476.
  62. Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K., (1998), MAP kinase pathways in the

- yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1264-1300.
63. Printen JA, Sprague GF., (1994), Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**:609-619.
  64. Marcus S, Polverino A, Barr M, Wigler M., (1994), Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:7762-7766.
  65. Choi KY, Satterberg B, Lyons DM, Elion EA., (1994), Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**:499-512.
  66. Elion EA., (2001), The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**:3967-3978.
  67. Cullen PJ, Sabbagh Jr. W, Graham E, Irick MM, van Olden EK, Neal C, Delrow J, Bardwell L, Sprague Jr. GF., (2004), A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**:1695-1708.
  68. Andersson J, Simpson DM, Qi M, Wang Y, Elion EA., (2004), Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *EMBO J* **23**:2564-2576.
  69. Good M, Tang G, Singleton J, Reményi A, Lim WA., (2009), The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell* **136**:1085-1097.
  70. Yamamoto K, Tatebayashi K, Tanaka K, Saito H., (2010), Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol Cell* **40**:87-98.
  71. Mumberg D, Müller R, Funk M., (1994), Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucl Acids Res* **22**:5767-5768.
  72. Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakomsiripan D, Nakayama KI, Fukada Y., (2013), FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**:1106-1118.
  73. Proft M., Pascual-Ahuir A., de Nadal E., Ariño J., Serrano R., Posas F., (2001), Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**:1123-1133
  74. Baltanás R., Bush A., Couto A., Durrieu L., Hohmann S., Colman-Lerner A., (2013),

Pheromone-induced morphogenesis improves osmoadaptation capacity by activating the HOG MAPK pathway. *Sci. Signal.* **6**:ra26