

## シグナル伝達経路の人工改変

古川健太郎

細胞は外界の刺激に応答するためのシグナル伝達経路を有しており、長年にわたる研究によって、構成因子や分子機構の詳細が解明されてきた。近年は合成生物学と呼ばれる研究分野の発展に伴い、シグナル伝達因子と人工制御システムを組み合わせることで、シグナル伝達経路の挙動を任意に改変する研究が盛んに行われている<sup>1)</sup>。シグナル伝達経路の中でも mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は、基本骨格が酵母からヒトまで保存されており、遺伝子発現・代謝・分泌・増殖・細胞死などさまざまな応答を仲介している。MAPK経路の改変は、腫瘍増殖の抑制や細胞死の誘導などの応用につながるかと期待されている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の MAPK 経路は、非常にシンプルであるが、他の生物種のものとは共通した基本原理を有しているため、異種生物由来のシステムを用いて容易に改変することが可能である<sup>2)</sup>。本稿では、異種システムを用いて *S. cerevisiae* の高浸透圧応答 Hog1 MAPK 経路を改変した研究例について紹介する。

細菌由来のエフェクタータンパク質は、細菌が宿主に感染した際に宿主内のシグナル伝達経路を攪乱することで免疫応答を回避するのに役立っている。Weiらは、赤痢菌由来のエフェクタータンパク質 OspF を Hog1 経路の挙動を改変するためのツールとして応用した<sup>3)</sup>。酵母内で野生型の OspF を過剰発現させると、複数の MAPK が一度に不活性化されるため生育阻害が起こる。そこで、MAPK 結合サイトを欠失させた OspF を Pbs2 (Hog1 をリン酸化するキナーゼ) に結合するように改変した結果、Hog1 経路が特異的に阻害されるようになった。さらに、Hog1 シグナル依存的に活性化されるプロモーター制御下において改変 OspF を発現させたところ、ネガティブフィードバックの効果によって、浸透圧刺激の頻度に応じて Hog1 シグナルの挙動を変化させる事にも成功している。以上の結果から、本来は有害なエフェクタータンパク質が、シグナル伝達経路を操作するための有益なツールとして利用可能であることが示された。

Hog1 MAPK 経路の上流には、ヒスチジンキナーゼ-リン酸基伸介因子-レスポンスレギュレーターという3種のタンパク質からなる二成分性情報伝達系と呼ばれる浸透圧センサーシステムが存在する。このシステムの基本原理は、原核生物から高等生物を除く真核生物において保存されており、リン酸基伸介因子は多様なヒスチジ

ンキナーゼからのシグナルを仲介している。実際、植物ホルモン的一种であるサイトカイニン (CK) の受容体であるヒスチジンキナーゼ Cre1 を酵母内で発現させると、酵母は二成分性情報伝達系を介して CK に応答ようになる。この性質を利用し、Chenらは細胞密度に依存した遺伝子発現系を構築した<sup>4)</sup>。酵母において CK 合成酵素と Cre1 を共発現させると、細胞の増殖初期段階においては培地中に分泌された CK 濃度が低いため、Cre1 は不活性化状態にある。細胞増殖とともに培地中の CK 濃度が一定量を超えると、Cre1 が活性化され、二成分性情報伝達系の下流に導入したレポーター遺伝子が活性化するという仕組みである。これらの結果から、異種刺激とその受容体を用いて、細胞密度に依存した遺伝子発現系を構築可能であることが示された。

Furukawaらは、抗真菌剤フルジオキシニル (Flu) の標的であるグループ III ヒスチジンキナーゼ (耐塩性酵母 *Debaryomyces hansenii* 由来の DhNik1) とその耐性変異体を用いて活用し、Hog1 経路の Flu 依存的な改変を行った<sup>5)</sup>。具体的には、(i) 合成ネガティブフィードバックループによる Hog1 シグナル動態の改変、(ii) Flu を含む異種刺激によって2入力1出力系のパターンで活性化または不活性化される Hog1 経路への改変、(iii) 特定の標的細胞を道連れにして Flu 存在下で「自爆」する改変細胞の構築を行った。既存の抗真菌剤とその標的タンパク質を活用したシグナル伝達経路の挙動の改変は、本来は薬剤標的を持たない細胞に対する遺伝子治療や細胞治療などへ応用することが可能であると考えられる。

このように、異種システムを酵母の内在性のシステムに機能的に融合させることによって、シグナル伝達経路が本来示す挙動を内在性の刺激もしくは異種刺激に応じて大きく改変することが可能である。さらに、酵母を生きた試験管としての異種システムの性質決定や MAPK 依存的なレポーター活性を指標としたハイスループットな薬剤スクリーニングも可能であり、今後もシグナル伝達経路の研究に酵母が欠かせない存在であると言える。

- 1) Lim, W. A.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 393 (2010).
- 2) Furukawa, K. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **88**, 5 (2013).
- 3) Wei, P. *et al.*: *Nature*, **488**, 384 (2012).
- 4) Chen, M. T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1551 (2005).
- 5) Furukawa, K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **43**, 7162 (2015).