

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07347

研究課題名(和文)PI3P代謝によるサブセル空間レベルでのTORC1制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of TORC1 regulation via PI3P turnover at sub-cellular level

研究代表者

野田 健司 (NODA, Takeshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00290908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TORC1は細胞成長やオートファジーを制御する中心的な因子であり、がん細胞の増殖や寿命延長などの観点から多くの関心が寄せられているが、その制御機構は多くの解明すべき課題が残されている。本研究により1)哺乳細胞において、TORC1活性化因子Rhebがゴルジ体に局在し、リソソームに局在するTORC1を、リソソーム-ゴルジ体間のコンタクトサイトを介して、活性化するという新規なモデルを提唱した。2)酵母Pib2タンパク質を含む複合体がグルタミンと直接結合することで、TORC1の活性化を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TORC1は細胞成長の中心的な制御因子であり、がんや免疫をはじめ、多くの疾病に深く関与することより、多くの関心が寄せられている。今回、主に2つのTORC1の制御機構を明らかにすることに成功した。本研究に基づき、TORC1の制御機構についての理解が進展したと同時に、将来的にTORC1関連疾病を克服することを目指した、創薬等の研究においての分子標的因子を新たに提案することができた。

研究成果の概要(英文)：TORC1 is a master regulator of cell growth and autophagy, and attracts much attention from the view of cancer progression and longevity. However its regulatory mechanism remain to be elucidated. In this study, 1)we have uncovered that Rheb is localized at Golgi body and activates TORC1 localized at the lysosome via newly identified Golgi lysosome contact site. 2)A complex containing yeast Pib2 protein can directly binds to glutamine, by which TORC1 is activated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：TORC1 グルタミン Rheb Pib2 mTOR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TORC1 は細胞成長やオートファジーの制御を担う中心的な制御因子であり、TOR プロテインキナーゼを中心としたタンパク質複合体である。TORC1 はアミノ酸をはじめとする様々な栄養素や増殖因子等に応答して、活性化し下流の基質をリン酸化する。その阻害剤はラパマイシンは寿命延長効果があることや、抗腫瘍効果があることなどから、その作用機序の解明は、基礎のみならず臨床面からも多くの注目を集めている。しかしながら、それらの TORC1 活性化因子が具体的にどのような機構で活性化に結びつくのか、不明な点が多く残されている。われわれは哺乳類細胞において、フォスファチジルイノシトール 3-ホスファターゼである MTMR3 が TORC1 と結合し不活性化することを見出してきた。また酵母細胞において、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合タンパク質 Pib2 が TORC1 活性と関与することも見出してきた。

2. 研究の目的

1 哺乳類細胞において、フォスファチジルイノシトール 3-ホスファターゼである MTMR3 はゴルジ体に局在するが、TORC1 は主にリソソームに局在する。さらに TORC1 を活性化する因子である低分子量 G タンパク質 Rheb の細胞内局在は、いくつかの説が混在しており、定説がなく、我々の観察ではゴルジ体に局在する。そこでこれらの因子がサブセルレベルでどのように、TORC1 を活性化するかに関して解析を行う。

2 酵母細胞において、Pib2 欠損は TORC1 の活性に影響を及ぼすが、これまで知られていた GTR/EGO の経路との関係は不明である。またそのホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合能の生理学的意義も不明である。そこで Pib2 がどのように TORC1 を活性化するかに関しての解析を行う。

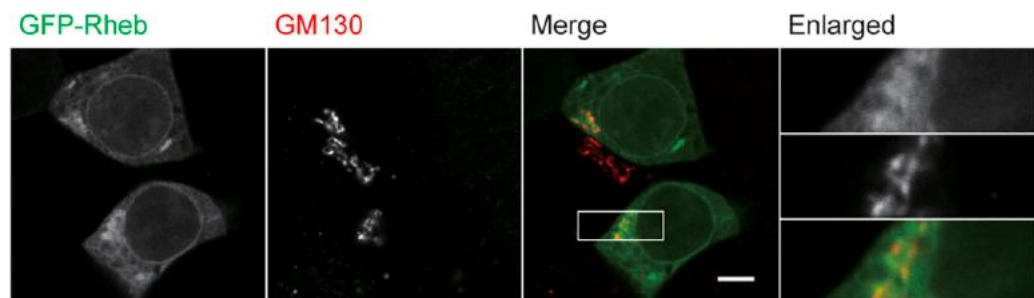
3. 研究の方法

1. GFP タグをした Rheb および内在性 Rheb の細胞内の局在を光学顕微鏡により観察し、決定する。GFP に対する一本鎖抗体ナノボディを様々な既存のオルガネラ局在タンパク質に結合させ、GFP-Rheb を強制的に各種オルガネラに局在させることでその TORC1 活性への影響を解析する。

2. Pib2 の条件誘導的欠損酵母株を作成し、TORC1 活性への影響を解析する。ホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合部位の変異 Pib2 を作成し、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合能の機能を解析する。ラジオアイソトープラベルしたアミノ酸と Pib2 の結合性を解析する。

4. 研究成果

1. GFP-Rheb はゴルジ体に主に局在した。内在性 Rheb はゴルジ体に主に局在したが、その他の局在も認められた。



2 Rheb を強制的にリソソーム、ゴルジ体、小胞体に局在させたところ、リソソームやゴルジ体に局在化させても、TORC1 活性化能を保持していることを明らかにした。また、TORC1 を同様の手法でリソソーム、ゴルジ体、小胞体に局在させたところ、やはりリソソームやゴルジ体に局在化させても、TORC1 活性化能を保持していることを明らかにした。

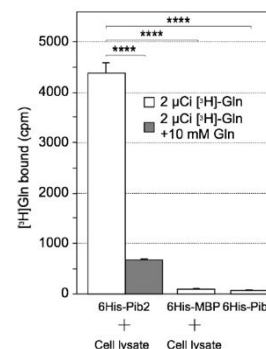
3 実際にゴルジ体とリソソームが 30 nm 以内に近接して存在することを示し、リソソームとゴルジ体のコンタクトサイトが存在することを示した。栄養有無に伴いリソソームとゴルジ体のコンタクトサイトが増減することから、TORC1 の制

御機構の一端に関わる可能性を提唱した。

4 GTR1 欠損酵母株に、PIB2 を条件特異的に消失する変異遺伝子を導入したところ、TORC1の活性が消失し、細胞増殖が停止したことから、GTR1とPib2が並行して、TORC1を活性化する経路であることを示した。

5 GTR1 および Pib2 の二重変異株は TORC1 の液胞膜への局在化を解消したことより、これら 2 つの因子によって TORC1 は液胞膜へ係留されていることが明らかとなった。Pib2 のホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合の変異体は、液胞膜へ局在化しなかった。しかしながらホスファチジルイノシトール 3 リン酸結合部位非依存的に液胞膜へ結合するように改変した Pib2 は、その機能をほぼ回復したことより、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸の TORC1 活性調節機能は、Pib2 の局在化効みに要求されることが明らかとなった。

6 大腸菌で発現した Pib2 タンパク質を酵母破砕液と反応させ精製したものが、放射性同位元素でラベルしたグルタミンを特異的に結合することを証明した。さらに Pib2 と TORC1 は結合するが、その結合はグルタミンを添加することにより増強し、その活性を上昇させる。これらのことから Pib2 タンパク質を含む複合体がグルタミン存在下に TORC1 活性を調節するセンサーとして機能する可能性を提唱した。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 1 . Takeda, E., N. Jin, E. Itakura, S. Kira, Y. Kamada, L.S. Weisman, T. Noda, and A. Matsuura. 2018. Vacuole-mediated selective regulation of TORC1-Sch9 signaling following oxidative stress. *Mol Biol Cell*. 29:510–522. doi:10.1091/mbc.E17-09-0553. 査読有
- 2 . Ukai, H., Y. Araki, S. Kira, Y. Oikawa, A.I. May, and T. Noda. 2018. Gtr/Ego-independent TORC1 activation is achieved through a glutamine-sensitive interaction with Pib2 on the vacuolar membrane. *PLoS Genet*. 14:e1007334–25. doi:10.1371/journal.pgen.1007334. 査読有
- 3 . Hao, F., K. Kondo, T. Itoh, S. Ikari, S. Nada, M. Okada, and T. Noda. 2018. Rheb localized on the Golgi membrane activates lysosome localized mTORC1 at the Golgi-lysosome contact site. *J Cell Sci*. 131:jcs.208017. doi:10.1242/jcs.208017. 査読有
- 4 . Araki, Y., S. Kira, and T. Noda. 2017. Quantitative Assay of Macroautophagy Using Pho8 60 Assay and GFP-Cleavage Assay in Yeast. *Meth. Enzymol*. 588:307–321. doi:10.1016/bs.mie.2016.10.027. 査読有
- 5 . Noda, T. 2017. Regulation of autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules*. 7. doi:10.3390/biom7030052. 査読有
- 6 . Hao, F., T. Itoh, E. Morita, K. ShirahamaNoda, T. Yoshimori, and T. Noda. 2016. The PtdIns3-phosphatase MTMR3 interacts with mTORC1 and suppresses its activity. *FEBS Lett*. 590:161–173. doi:10.1002/1873-3468.12048. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1 . Ukai H, Araki Y, Kira S, Noda T: Amino acids activate TORC1 via Pib2 and Gtr dependent pathways to regulate autophagy, The 8th International Symposium on Autophagy. May 29-June 1, 2017, Nara.

2 . Hao F, Kondo K, Itoh T, Nada S, Okada M, and Noda T: Rheb is localized on Golgi and activates mTORC1 at the Golgi lysosome contact site, The 2nd Japan-China-Korea young investigators' seminar on selective autophagy June 2, 2017, Osaka.

3 . 野田健司：出芽酵母から探る TORC1 制御の仕組み 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 6 日、神戸

4 . Takeshi NODA How do cells eat themselves?Regulation of autophagy by TORC1 10th International Symposium of Food Science 2018/8/2 Hefei (China)

〔図書〕(計 2 件)

1 . オートファジーの誘導と抑制をつかさどる 2 つのキナーゼ Atg1/ULK1 と TORC1
荒木保弘 野田健司 オートファジー 南山堂 ISBN 978-4-525-13481-5

2 . 酵母が切り開いたオートファジー研究の曙
野田健司 オートファジー 南山堂 ISBN 978-4-525-13481-5

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者
無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：荒木 保弘

ローマ字氏名：Yasuhiro Araki

研究協力者氏名：ハオ フェイケ

ローマ字氏名：Hao Feike

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。