

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02168

研究課題名(和文)細胞膜脂質成分と低分子量Gタンパク質によるTORC2の活性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the activation mechanism of TORC2 by cell membrane lipid component and low molecular weight G protein

研究代表者

井上 善晴 (Inoue, Yoshiharu)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70203263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：酵母のTORC2はMCT(membrane compartment containing TORC2)と呼ばれるエルゴステロールに富む細胞膜脂質マイクロドメインに局在する。そこで、エルゴステロール合成系の欠損株、あるいは脂質マイクロドメインの構造を不安定化する薬剤であるエデルフォシンがTORC2シグナルの活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、erg2株やerg3株ではTORC2シグナルの活性化が抑制され、エデルフォシンはTORC2シグナルの活性化を阻害した。一方、低分子量Gタンパク質であるCdc42の欠損株ではTORC2シグナルの活性化が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TORは真核生物において広く保存されたSer/Thrキナーゼであり、細胞の成長や代謝などを司るシグナル伝達経路を構成する。TORは機能的に異なる2種類のTOR複合体(TORC1とTORC2)を形成する。TORC1の活性化機構については詳細な研究が進んでいるのに対し、TORC2の活性化機構の詳細については未解明の部分が多い。本研究は、細胞膜脂質成分であるエルゴステロールやホスファチジルセリン、ならびに低分子量Gタンパク質Cdc42が、酵母TORC2シグナルの活性化において重要な役割を果たしていることを明らかにした。このことは、TORC2の活性化機構の解明に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Yeast TORC2 localizes to the sterol-rich plasma membrane lipid microdomains (MCT, membrane compartment containing TORC2). We investigated the effect of edelfosine, a drug that disrupts or destabilizes lipid microdomain's structure, on the activation of TORC2-Ypk1/2 signaling. We found that edelfosine inhibited the activation of TORC2 signaling. On the other hand, edelfosine induced phosphorylation of Mpk1. We examined the effect of Cdc42 deficiency on the activation of TORC2 signaling, and found that activation of TORC2-Ypk1/2 signaling is suppressed in Cdc42-deficient strains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵母 TORC2 メチルグリオキサール エデルフォシン エルゴステロール Pkc1

1. 研究開始当初の背景

TOR (Target Of Rapamycin) は真核生物において広く保存された Ser/Thr キナーゼであり、細胞の成長や代謝などを司るシグナル伝達経路を構成する。TOR は機能的に異なる 2 種類の TOR 複合体 (TORC1 と TORC2) を形成する。TORC1 の活性化のイニシエーターとしては、アミノ酸などの栄養源が知られている。一方、TORC2 の活性化のイニシエーターとして、動物細胞ではインスリンが知られているが、その活性化のメカニズムの詳細についてはまだよく分かっておらず、また下等真核生物である酵母には、インスリンのような成長因子による生育制御系は存在しない。これに対し我々は、解糖系から派生する 2-オキソアルデヒドであるメチルグリリオキサール (MG) が生物種を超えて TORC2 シグナルを活性化することを見いだした (*Mol. Cell. Biol.* 35:1269-1280, 2015)。

MG は TORC2 シグナルを活性化させる。一方、TORC2 の機能欠損は致死となる。従って、MG 感受性を示すような変異株の中には、MG による TORC2 シグナルの活性化に関与する因子も含まれるのではないかと考えられる。そこで、酵母を使って MG に対する応答性を指標とした遺伝学的なスクリーニングを行った結果、細胞膜脂質成分であるホスファチジルセリン (PS) の合成酵素 (Cho1) の欠損株や、酵母のコレステロールに当たるエルゴステロールの合成系の欠損株が MG 感受性を示すことを見いだした (*Cell. Signal.* 31:146-153, 2017; *J. Biol. Chem.* 292:15039-15048, 2017)。実際、Cho1 の欠損株では TORC2 シグナルの活性化が起こらなくなった (*Cell. Signal.* 31:146-153, 2017)。

酵母においても動物細胞においても TORC1 の活性化に低分子量 G タンパク質が重要な役割を果たすことが明らかになっている。酵母の TORC1 は、低分子量 G タンパク質 Rag GTPase である Gtr1/Gtr2 を介して液胞膜に局在する。一方、動物細胞における mTORC1 は RagA/B と RagC/D を介してリソソーム膜に局在し、mTORC1 のリソソーム膜局在は、その機能発現と相関する。これに対し、酵母でも動物細胞でも TORC2 の活性化に低分子量 G タンパク質が関与するかどうかについてはわかっていない。

2. 研究の目的

酵母の TORC2 は、細胞膜のうち MCT (Membrane Compartment containing TORC2) と呼ばれるマイクロドメインに局在するが、TORC2 の MCT 局在が機能と相関しているかどうかについては分かっていない。低分子量 G タンパク質のうち Rho GTPase である Cdc42 は細胞膜に局在するが、PS 合成酵素の欠損株 (*cho1*) ではその局在が消失することが報告されている (*Nat. Cell Biol.* 13:1424-1430, 2011)。我々は、PS 合成酵素である Cho1 の欠損株では TORC2 シグナルの活性化が起こらなくなることを明らかにしている (*Cell. Signal.* 31:146-153, 2017) ことから、Cdc42 が TORC2 シグナルの活性化に関与している可能性が期待される。そこで本研究では、TORC2 シグナル活性化における膜脂質成分である PS やエルゴステロール、ならびに細胞膜局在する Cdc42 の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3.1 TORC2 の活性化

TORC2 シグナルの活性化には、MG やオーレオバシジン A (AbA) を用いた。TORC2-Pkc1 シグナルの活性化については下流の Mpk1 のリン酸化状態を、TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化については Ypk1/2 のリン酸化状態を、それぞれに対するリン酸化抗体を用いたウェスタンブロットティングにより評価した。

3.2 薬剤に対する感受性の検討

対数期まで培養した酵母を MG や AbA を含む SD 培地 (2%グルコース、0.67% YNB) にスポットし、28°C で培養を行った。

4. 研究成果

4.1 エルゴステロールの合成欠損が MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化に及ぼす影響

これまでに我々は、MG に感受性を示す酵母変異株の網羅的スクリーニングにより、エルゴステロール (Erg) 合成系酵素の変異株 (*erg2Δ*、*erg3Δ*) を取得している (*J. Biol. Chem.* 292:15039-15048, 2017)。そこで、他の Erg 変異株についても精査した結果、多くの Erg 変異株が MG 感受性を示した (図 1B)。また、*erg2Δ* 株ならびに *erg3Δ* 株の MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化を検討したところ、これらの変異株では活性化が認められなかった (図 1B)。これらのことから、MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化には細胞膜成分の一つであるエ

ルゴステロールが必要であると考えられた。

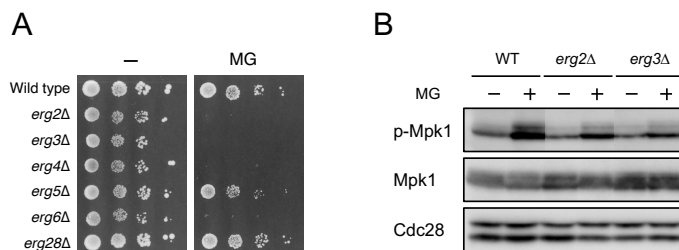


図1 エルゴステロール合成の欠損がMGによるTORC2-Pkc1シグナルの活性化に及ぼす影響
A: MGを含む培地に各変異株をスポットし、28°Cで培養した。B: MG処理後のMpk1のリン酸化状態を抗リン酸化Mpk1抗体を用いて検討した。

4.2 MGによるTORC2-Ypk1/2シグナルの活性化

MGがTORC2-Pkc1シグナルを活性化したことから、TORC2による別のシグナルブランチであるTORC2-Ypk1/2シグナルが活性化されるかどうかを抗リン酸化Ypk1/2抗体を用いて検討を行った。オーレオバシジンA (AbA)はTORC2-Ypk1/2シグナルを活性化させることが明らかになっている。そこで、MGならびにAbAで処理した細胞におけるYpk1/2のリン酸化を検討した結果、MGはTORC2-Ypk1/2シグナルを活性化することが明らかになった(図2A)。また、Ypk1の欠損株やTORC2の必須コンポーネントの一つであるAvo3の変異株(*avo3-30*)のMG感受性をスポットアッセイにより検討した結果、これらの変異株はMG感受性を示した(図2B)。これらのことから、MGはTORC2-Pkc1シグナルのみならずTORC2-Ypk1/2シグナルも活性化し、MGによるTORC2-Ypk1/2シグナルの活性化は何らかの生理的意義を持つと考えられた。

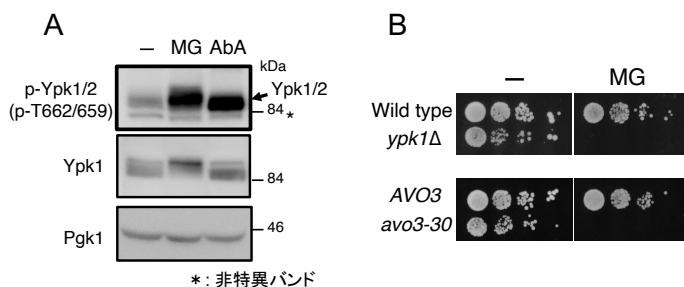


図2 MGによるTORC2-Ypk1/2シグナルの活性化
A: MGならびにAbA処理後のYpk1/2のリン酸化状態を抗リン酸化Ypk1/2抗体を用いて検討した。B: MGを含む培地に各変異株をスポットし、28°Cで培養した。

4.3 ステロール阻害剤によるTORC2-Ypk1/2シグナル活性化の阻害

TORC2シグナルの活性化にエルゴステロールが重要な役割を果たすことが強く示唆されたことから、ステロール阻害剤がAbAによるTORC2-Ypk1/2シグナルの活性化に及ぼす影響について検討した。その結果、Nystatin、Amphotericin B、ならびにFilipinで処理した細胞ではTORC2-Ypk1/2シグナルが活性化されないことを見いだした(図3A、3B)。

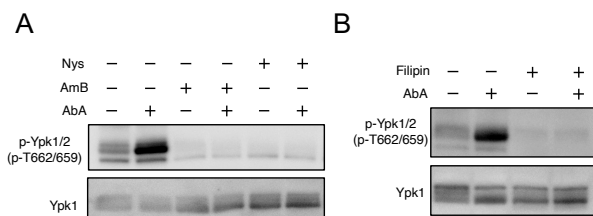


図3 ステロール阻害剤がTORC2-Ypk1/2シグナルの活性化に及ぼす影響
A: Nystatin (Nys)、Amphotericin B (AmB)で処理した細胞におけるAbAによるYpk1/2のリン酸化状態を抗リン酸化Ypk1/2抗体を用いて検討した。B: Filipinで処理した細胞におけるAbAによるYpk1/2のリン酸化状態を抗リン酸化Ypk1/2抗体を用いて検討した。

4.4 エデルフォシニンによるTORC2-Ypk1/2シグナル活性化の阻害

これまでの実験結果から、エルゴステロールがTORC2シグナルの活性化に重要であることが強く示唆された。エルゴステロールは細胞膜の脂質マイクロドメインの構成成分である。また、

TORC2 は MCT と呼ばれる細胞膜の領域に局在する。Edelfosine (Edel) はリゾホスファチジルコリンアナログで、ステロールに親和性を持ち、脂質マイクロドメインに影響を与えることが報告されている (*J. Biol. Chem.* 277:39541-39547, 2002; *J. Biol. Chem.* 280:38047-38058, 2005; *Chem. Phys. Lipids* 191:153-162, 2015; *J. Phys. Chem. B.* 117:7929-7940, 2013)。そこで、Edel で処理した細胞における TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化を検討した。その結果、AbA、Myriocin (Myr)、ならびに MG による TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化が阻害された (図 4A、4B)。また、Edel で処理した細胞を AbA を含む培地にスポットしたところ、Edel 処理細胞は AbA 感受性を示した (図 4C)。これらの結果から、脂質マイクロドメインは TORC2 シグナルの活性化に重要であると考えられた。しかしながら、TORC2 の局在性を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、Edel 処理によって TORC2 の MCT 局在が失われることはなかった (data not shown)。

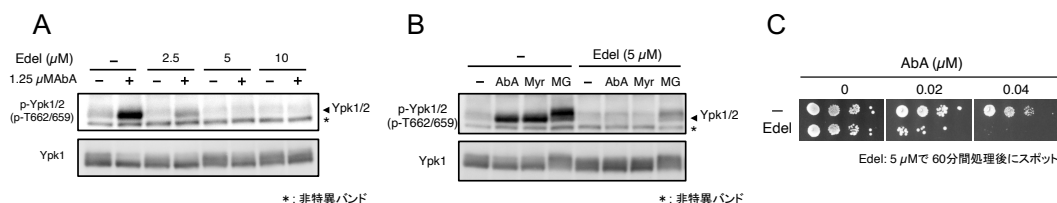


図 4 Edelfosine による TORC2 活性化の阻害

A: Edel で処理した細胞における AbA による Ypk1/2 のリン酸化状態を抗リン酸化 Ypk1/2 抗体を用いて検討した。B: Edel で処理した細胞における AbA、Myr、あるいは MG による Ypk1/2 のリン酸化状態を抗リン酸化 Ypk1/2 抗体を用いて検討した。C: 5 μM Edel で 60 分処理した細胞を図中の濃度の AbA を含む培地にスポットし、28°C で培養した。

4.5 エデルフォシンによる Mpk1 のリン酸化

Edel が TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化を阻害することが明らかになったことから、Edel が TORC2-Pkc1 シグナルの活性化に及ぼす影響を、Mpk1 のリン酸化を指標に検討した。その結果、意外なことに Edel は Mpk1 のリン酸化を誘導した (図 5)。Mpk1 のリン酸化は、我々が発見した TORC2-Pkc1 シグナル (*Mol. Cell. Biol.* 35:1269-1280, 2015) の他に、Cell Wall Integrity (CWI) 経路によっても誘導される。今後の検討課題として、Edel による Mpk1 のリン酸化が TORC2-Pkc1 経路によるものなのか、あるいは CWI 経路によるものかを明らかにしていく必要がある。また、Edel による TORC2-Ypk1/2 シグナルへの負の作用について、TORC2-Pkc1 シグナル、あるいは CWI 経路が何らかの影響を与えているかどうかについても検討していく必要がある。

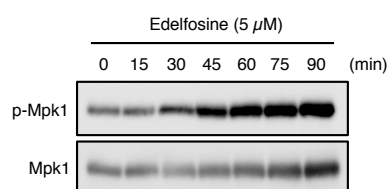


図 5 Edelfosine による Mpk1 のリン酸化

Edel による Mpk1 のリン酸化状態を抗リン酸化 Mpk1 抗体を用いて検討した。

4.6 TORC2 シグナルの活性化における Cdc42 の関与

TORC2-Pkc1 シグナルの活性化には細胞膜脂質成分であるホスファチジルセリン (PS) が重要であることを我々はこれまでに明らかにしている (*Cell. Signal.* 31:146-153, 2017)。低分子量 G タンパク質の一つである Cdc42 は PS の細胞膜局在との相関性が報告されている (*Nat. Cell Biol.* 13:1424-1430, 2011) ことから、Cdc42 欠損が TORC2 シグナルの活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、Cdc42 の温度感受性変異株 (*cdc42-1*, *cdc42-13*) では、制限温度下における AbA による TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化が観察されなくなった (図 6A、6B)。このことは、TORC2 シグナルの活性化に Cdc42 が関与する可能性を示唆している。ところが、興味深いことに、MG による TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化は *cdc42-1* 株の制限温度下でも起こった (図 6C)。TORC2 シグナル活性化における Cdc42 の関与の詳細についても今後の検討課題である。

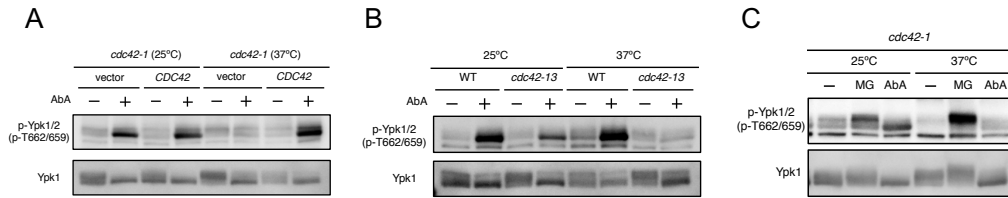


図6 TORC2 シグナルの活性化における Cdc42 の関与

A : *cdc42-1* 株にベクター、あるいは野生型 *CDC42* 遺伝子を導入した株の許容温度と制限温度における AbA による Ypk1/2 のリン酸化状態を抗リン酸化 Ypk1/2 抗体を用いて検討した。B : *cdc42-13* 株の許容温度と制限温度における AbA による Ypk1/2 のリン酸化状態を抗リン酸化 Ypk1/2 抗体を用いて検討した。C : *cdc42-1* 株の許容温度と制限温度における MG ならびに AbA による Ypk1/2 のリン酸化状態を抗リン酸化 Ypk1/2 抗体を用いて検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura, W. and Inoue, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Contribution of phosphatidylserine to Rho1- and Pkc1-related repolarization of the actin cytoskeleton under stressed conditions in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Small GTPase	6. 最初と最後の頁 449-455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nomura, W., Aoki, M. and Inoue, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Methylglyoxal inhibits nuclear division through alterations in vacuolar morphology and accumulation of Atg18 on the vacuolar membrane in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 13887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70802-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nomura, W., Futamata, R. and Inoue, Y.	4. 巻 1865
2. 論文標題 Role of RhoGAP Rgd1 in Pkc1 signaling-related actin repolarization under heat shock stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta (General Subjects)	6. 最初と最後の頁 129853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2021.129853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 CWI経路が関わるTORC2 シグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村 亘、青木美穂、後藤 剛、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 メチルグリオキサールの生成を介したジヒドロキシアセトンによる出芽酵母の細胞増殖阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、井上善晴
2. 発表標題 Edelfosineを用いたTOR複合体2シグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 出芽酵母cell wall integrity経路が関わるTOR複合体2シグナル制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名波谷政希、野村 亘、池田佳代、井上善晴
2. 発表標題 出芽酵母のTORC2-Pkc1シグナルにおけるPog1の機能解析
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田佳代、野村 亘、青木美穂、井上善晴
2. 発表標題 メチルグリオキサール生成を介したジヒドロキシアセトンによる細胞増速と核分配阻害
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村 亘、今井杏理紗、後藤 剛、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 Pkc1安定性とリン酸化状態との関連性
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村 亘、今井杏理紗、後藤 剛、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 出芽酵母PKCのリン酸化状態が安定化に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------