

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19770112

研究課題名（和文） 酵母遺伝学を用いた TORC2 キナーゼ複合体下流シグナルの解析

研究課題名（英文） Analysis of TORC2 signaling pathway using yeast genetic system

研究代表者

田淵 光昭 (MITSUAKI TABUCHI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00294637

研究成果の概要：スフィンゴ脂質は、生体膜を構成する必須の脂質であり、それ自身がセカンドメッセンジャーとなって細胞内の様々なシグナル伝達経路を制御することが知られている。私は、TORC2 と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素がその下流の Slm1/Slm2 という分子を通して、スフィンゴ脂質代謝経路を制御することを見出している。本研究では、Slm1/Slm2 がどのようにしてスフィンゴ脂質代謝経路を制御しているかを、酵母細胞を用いて遺伝学的、細胞生物学的に解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：スフィンゴ脂質

## 1. 研究開始当初の背景

TOR キナーゼは、真核生物全般に保存されたセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞内では、TORC1 と TORC2 という2つの複合体を形成し、それぞれの複合体に特異的な下流因子を制御することで様々な細胞機能を制御することが知られている。TORC1 複合体は、免疫抑制剤ラパマイシンに感受性で、ラパマイシン処理で見られる酵母表現型（エンドサイトーシス亢進、リボゾーム合成異常、翻訳開始調節異常、転写制御異常、オートファジー誘導など）は、ラパマイシンによる TORC1 複合体の機能阻害に起因していることが明らかになっている。一方、TORC2 複合体は、ラパマイシン非感受性であり、TORC1 複合体に比べて、その機能は、不明な点が多い。TORC2 複合体でのみ機能する Tor2 キナーゼの温度感受性変異株を用いた解析から、TORC2 の異常は、アクチン細胞骨格に異常を来すことが明らかにされており、これより TORC2 複合体の下流には、Rho1/Pkc1 経路からなるアクチン細胞骨格制御シグナル伝達系が存在することが知られていた。しかし、TORC2 複合体がどのようにして Rho1/Pkc1 経路を制御するかはほとんど明らかにされておらず、TORC2 複合体が最終的にどのようにしてアクチン細胞骨格を制御するかについては不明である。私は、TORC2 複合体の新たな下流因子として Slm1/Slm2 という細胞膜に豊富に存在するフォスホイノシチドである PI4,5P<sub>2</sub> に特異的に結合する PH ドメインを有する機能未知分子を同定し、これらの分子が Isc1 という酵母スフィンゴ脂質の一つイノシトールリン酸セラミド (IPC) を分解するリパーゼを負に制御することにより最終的にアクチン細胞骨格を制御することを明らかにした (Tabuchi *et al.*, *Mol Cell Biol*, 2006)。スフィンゴ脂質合成欠損変異株である *lcb1* 温度感受性変異株では、アクチン細胞骨格制御に異常が生じるため、エンドサイトーシス欠損を示すことが知られている。また、TORC2 複合体のコンポーネントである TOR2 と AVO3 は、酵母スフィンゴ脂質の一種であるマンノース-イノシトールリン酸セラミド (MIPC) の合成欠損変異株である *csg2* 変異株のカルシウム感受性を戻す変異に見出されており、TORC2 複合体とスフィンゴ脂質代謝との関連性は遺伝学的に示唆されていた。このような背景から、Slm1/Slm2 は、アクチン細胞骨格制御シグナル伝達経路、TORC2 複合体シグナル伝達経路、スフィンゴ脂質代謝の3つの異なる経路を結ぶ鍵因子であると考えられ、その下流に存在することが示唆される Isc1 と Slm1/Slm2 のシグナル経路を明らかにすることは上記の3つの異なる経路を結ぶミッシングリンクを解き明かす重要な発見となり得ると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、TORC2 複合体の下流で機能する Slm1/Slm2 がどのようにして Isc1 の活性を制御するのかを明らかにし、Isc1 により産生されたスフィンゴ脂質がどのようにして最終的にアクチン細胞骨格を制御しているのかを明らかにすることを目的とする。これらの結果から、TORC2 複合体シグナル伝達経路、アクチン細胞骨格制御シグナル伝達経路、スフィンゴ脂質代謝の3つの異なる経路がどのように相互作用しているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究材料としては、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、酵母各種変異株を用い、これらについて細胞生物学的、生化学的および遺伝学的に手法を用いて Slm1 と Isc1 を鍵因子として TORC2 の下流因子を同定することを試みた。

## 4. 研究成果

### 1) Isc1 の機能解析

Slm1 と Isc1 との関係性を細胞生物学的に解析するため、まずは、Isc1 の細胞内局在の解析と Isc1 と同様に *slm1<sup>ts</sup>/slm2 $\Delta$*  株の温度感受性を抑圧するカルシニューリンとの遺伝的な解析を行った。

Isc1 は、これまでの報告で *GAL1* プロモーターを用いた発現で、ミトコンドリアに局在することが報告されているが、内在性のプロモーターを用いてその細胞内局在が解析されたという報告はない。そこで、Isc1 の N 末端、C 末端のそれぞれに GFP を融合したプラスミドを作製し、Isc1 の細胞内局在を GFP の蛍光を指標として解析した。その結果、N 末端に GFP を融合した場合においては、ER のマーカーである HDEL-DsRed と局在が一致したが、C 末端に GFP を融合した場合においては、ER とは局在が異なり、細胞膜に主に局在することが示唆された (図1)。

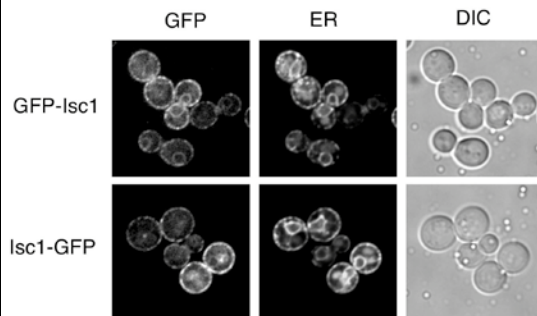


図1 Isc1は細胞膜に局在する Isc1にGFPをそれぞれN末端側、C末端側に融合し、局在を解析した。GFPをN末端に融合した場合、Isc1は主にERマーカーであるHDEL-DsRedと一致したが、C末端に融合した場合は、ほとんど一致が見られず、細胞膜に局在することが示唆された。

これより Isc1 は、細胞膜に局在し、そこで機

能していることが示唆された。しかし、この局在は、Slm1 で見られるような細胞膜上のドットとして見えず、Slm1 とは局在が異なることが示唆されたが、赤色蛍光タンパク質 mCherry と Slm1 との融合タンパク質は蛍光顕微鏡下でシグナルが弱いために検出することが困難であるために Isc1-GFP と共局在を解析することは出来なかった (data not shown)。今後、蛍光免疫染色などの手法を用いてさらに、Slm1 と Isc1 との局在を解析する必要があると考えられる。

Isc1 の欠損 (*isc1Δ*) は、*slm1<sup>ts</sup>/slm2Δ* 株の温度感受性を抑圧し、また、カルシニューリンの欠損 (*cnb1Δ*) も同様に *slm1<sup>ts</sup>/slm2Δ* 株の温度感受性を相補する (Tabuchi, et al., *Mol Cell Biol*, 2006)。そこで、これら 2 つの遺伝子が遺伝学的に同じ経路に存在するか否かを調べた。*cnb1Δ* は、NaCl やリチウム塩などの塩に対して高い感受性を示すことが知られている。そこで、*isc1Δ* 変異株において、NaCl と LiCl の感受性を調べたところ、*cnb1Δ* とは異なり、全く感受性を示さなかった (図 2)。これより、Isc1 はカルシニューリンとは全く異なる経路で *slm1<sup>ts</sup>/slm2Δ* 株の温度感受性を抑圧していることが示唆された。

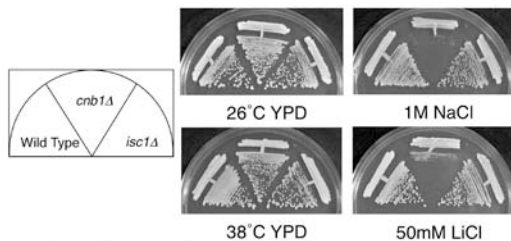


図2 *isc1Δ* 変異株と *cnb1Δ* 変異株の表現型の違い  
カルシニューリン欠損 (*cnb1Δ*) は、各種のイオンストレスに感受性となるが、*isc1Δ* 変異株は、これらのイオンストレスには全く感受性を示さない。これより、Isc1 は、カルシニューリンとは別の経路で機能していることが示唆された。

## 2) スフィンゴ脂質による Slm1 リン酸化制御と Rho1/Pkc1 経路との相互解析

以前の研究で、私は、Slm1 がスフィンゴ脂質の一種である PHS 処理により一時的に脱リン酸化され、そして、その後徐々に再リン酸化されることを見出していた (未発表データ、図 3 A)。また、スフィンゴ脂質の *de novo* 合成をスフィンゴ脂質合成酵素の特異的な阻害剤で阻害することによって、Slm1 のリン酸化は、阻害された (未発表データ、図 3 A)。

熱ショックでは一時的にスフィンゴ脂質合成系が活性化し、それにより細胞内の PHS の濃度が一次的に上昇することが知られている。これは、熱ショックにおけるストレス応答シグナルであると考えられており、このストレス応答シグナルの欠損は高温ストレスに感受性となることが知られている。おもしろいことに Slm1 は、熱ショックにより一時的に脱リン酸化され、そして徐々に再リン酸化される (Audhya et al., *EMBO J*, 2004)。これより、PHS 処理によるこの Slm1 の脱リン酸化

とそれに伴う再リン酸化は、熱ショック応答をミミックしていると考えられる。熱ショックにより活性化されるストレスシグナルとしては、Rho1/Pkc1 経路が知られている。そこで、PHS が Rho1/Pkc1 経路に対しても Slm1 で見られるように熱ショック応答をミミックするか否かを調べた。Rho1/Pkc1 経路の活性化は下流の Slt2/Mpk1 のリン酸化を特異的な抗リン酸化抗体で検出することにより調べた。その結果、PHS の添加により Slt2 の特異的なリン酸化の上昇が見られた。しかし、熱ショックによる Slt2 のリン酸化が熱ストレス後比較的早い時間 (10 分) で始まり、速やかに脱リン酸化されていく (20 分) のに対し、PHS による Slt2 のリン酸化は、PHS 添加後の 20 分間後に始まり、30 分後にピークに達し、その後徐々に減少していった (図 3 B)。これは、Slm1 が脱リン酸化後、再リン酸化されるキネティクスと類似していた。これより、Slm1 と Rho1/Pkc1 経路は、互いに同一の経路かもしくは平衡したシグナル経路として熱ショックストレス応答シグナルで機能していることが示唆された。そして、それぞれのシグナルの上流には、スフィンゴ脂質代謝及びその下流シグナル経路が存在することが示唆された。

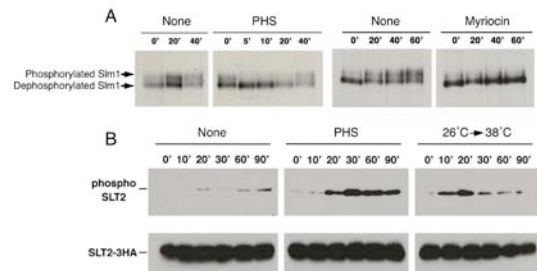


図3 スフィンゴシン (PHS) による Slm1 と Slt2 のリン酸化状態の変化  
A) PHS は、Slm1 の脱リン酸化-再リン酸化を引き起こす。また、スフィンゴ脂質の合成阻害剤である Myriocin 処理により、Slm1 のリン酸化は、阻害される。  
B) 熱ショック依存的に活性化される MAPK である Slt2 は、熱ショックと同様に PHS によりリン酸化される。しかし、このリン酸化は、熱ショックと比較してしばらく遅れてから始まり、その後、リン酸化状態がより長く持続した。

## 3) スフィンゴ脂質シグナル経路による Slm1 との遺伝学的解析

Riezman らは、スフィンゴ脂質代謝の下流に PHS により特異的に活性化される Pk1/Pkh2-Ypk1/Ypk2 シグナル経路が存在することを明らかにしている (Zanolari et al., *EMBO J*, 2000; Fraiant et al., *EMBO J*, 2000, 2001)。また、私は、以前の研究で Slm1 のリン酸化が Pkh1 と Ypk1 依存的に行われていることを明らかにしている (未発表データ)。酵母のスフィンゴ脂質の一種であるマンノースイノシトールリン酸化セラミド (MIPC) の合成に機能する Csg2 の欠損した *csg2Δ* 変異株は、野生株に比べ、カルシウムに対して感受性を示すようになる。そして、この *csg2Δ* 変異株におけるカルシウム感受性は、TORC2 複合体シグナル伝達経路の多くの遺伝子変異により抑圧されるという興味深い遺伝学



的な相互作用が知られている。そこで、次に Pkh1/Pkh2 及び Ypk1/Ypk2 が同様にこのような遺伝的な相互作用があるか否かを解析した。その結果、興味深いことに *tor2<sup>Δ</sup>* 変異で見られるのと同様に *pkh1<sup>Δ</sup>/pkh2<sup>Δ</sup>* 及び *ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異においても *csg2<sup>Δ</sup>* におけるカルシウム感受性は抑圧された (図4)。

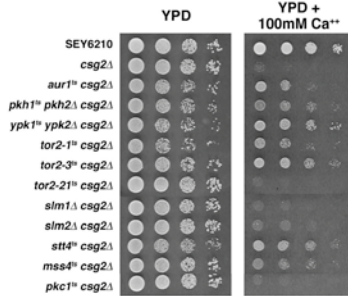


図4 スフィンゴ脂質代謝異常と各種シグナル伝達経路との遺伝学的相互作用  
*csg2<sup>Δ</sup>*で見られるカルシウム感受性は、*pkh1<sup>Δ</sup>/pkh2<sup>Δ</sup>*または、*ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>*の変異を更に加えることにより抑圧される。この抑圧は、一部の *tor2<sup>Δ</sup>* 変異、PI4キナーゼである *stt4<sup>Δ</sup>*、PI4P-5キナーゼである *mss4<sup>Δ</sup>* 変異でも抑圧される。しかし、Rho1-Pkc1-MAPKカスケードの一つ *pkc1<sup>Δ</sup>* 変異では抑圧されなかった。また、*slm<sup>Δ</sup>* 変異では、*csg2<sup>Δ</sup>* とは合成致死を示す。

また、既に報告したように (Tabuchi, et al., *Mol Cell Biol*, 2006) Slm1 の上流に位置するフォスホイノシチドシグナル経路 (PI4,5P<sub>2</sub> 産生経路) の変異 (*stt4<sup>Δ</sup>*, *mss4<sup>Δ</sup>*) においても *tor2<sup>Δ</sup>* 変異同様に *csg2<sup>Δ</sup>* のカルシウム感受性は抑圧されたにも関わらず、Rho1/Pkc1 経路の *pkc1<sup>Δ</sup>* 変異では、カルシウム感受性は抑圧されなかった。*csg2<sup>Δ</sup>* におけるカルシウム感受性は MIPC 合成欠損に伴うイノシトールリン酸化セラミド (IPC-C) の一種 (IPC-C) の異常蓄積に起因しており、IPC-C を減少させるようなスフィンゴ脂質代謝経路の異常などにおいてカルシウム感受性の抑圧が見られる。そして、私は、以前、これらのスフィンゴ脂質合成系で機能する代謝酵素以外に TORC2 複合体の下流シグナルにおいて直接的な IPC-C の減少により *csg2<sup>Δ</sup>* のカルシウム感受性を低下させることを既に報告している (Tabuchi, et al., *Mol Cell Biol*, 2006)。これより、*pkh1<sup>Δ</sup>/pkh2<sup>Δ</sup>* と *ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異による *csg2<sup>Δ</sup>* のカルシウム感受性の抑圧も同様に IPC-C の低下をもたらしていることが予測された。私は、以前の研究で既に *pkh1<sup>Δ</sup>/pkh2<sup>Δ</sup>* 及び *ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異株において高温ストレス依存的な IPC-C の上昇が見られないことを見出している (未発表データ)。これらの結果をまとめると、PKh1/Pkh2-Ypk1/Ypk2 は TORC2 複合体シグナル伝達経路の下流で機能することが予測された。

### 3) PKh1/Pkh2-Ypk1/Ypk2 シグナル経路は Slm1-Isc1 シグナル経路とは平衡したシグナルとして機能する

Kamada らは、Ypk2 が TORC2 複合体と Pkh1/Pkh2 により協調的に活性化されることを示している (Kamada et al., *Mol Cell Biol*, 2005)。そこで、Slm1/Slm2 と Ypk1/Ypk2 が TORC2 複合体下流シグナルでどのような関係にあるのかを明らかにするため、

*slm1<sup>Δ</sup>/slm2<sup>Δ</sup>* 変異株で見られるカルシニューリン欠損による温度感受性の抑圧が *ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異株でも同様に見られるかどうかを調べた。もし、カルシニューリン欠損により *ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異株の温度感受性が *slm1<sup>Δ</sup>/slm2<sup>Δ</sup>* 変異株同様に抑圧されるのであれば、これら2つの経路は同一の経路で働いていることが予測される。しかし、予想に反して、カルシニューリンの欠損 (*cnb1<sup>Δ</sup>*) は、*ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異株の温度感受性を全く相補しなかったどころか、合成致死性を示した (図5)。

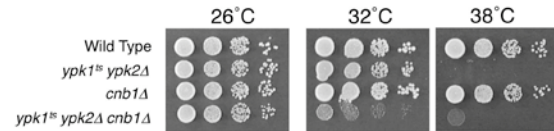


図5 YPK1/YPK2とカルシニューリンの遺伝学的相互作用

*slm1<sup>Δ</sup>/slm2<sup>Δ</sup>* 変異株の温度感受性は、カルシニューリンの欠損 (*cnb1<sup>Δ</sup>*) によって、部分的に相補されるが、*ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* 変異株の温度感受性は、カルシニューリン欠損により相補されず、逆に合成的に温度感受性が強くなる。これより、SlmとYpkは TORC2複合体の下流で共に機能するにも関わらず、それらは、全く異なるシグナル経路を制御していることが考えられた。

つまり、それぞれの単独変異株は、32°C で生育可能であるにも関わらず、*ypk1<sup>Δ</sup>/ypk2<sup>Δ</sup>* と *cnb1<sup>Δ</sup>* の両方の変異を持つ変異株は、32°C ではほとんど生育することが出来ず、致死性を示した。これは、*slm1<sup>Δ</sup>/slm2<sup>Δ</sup>* における *cnb1<sup>Δ</sup>* 変異による温度感受性の抑圧とは全く逆の表現型であり、この結果から、Slm1/Slm2 と Ypk1/Ypk2 は共に TORC2 複合体の下流で機能しているにもかかわらず、全く異なる経路へと分岐していることが予測された。最近、Aronova らは、Pkh1/Pkh2-Ypk1/Ypk2 が TORC2 複合体の下流でセラミド合成酵素の活性を制御していることを示した (Aronova et al., *Cell Metab* 2008)。

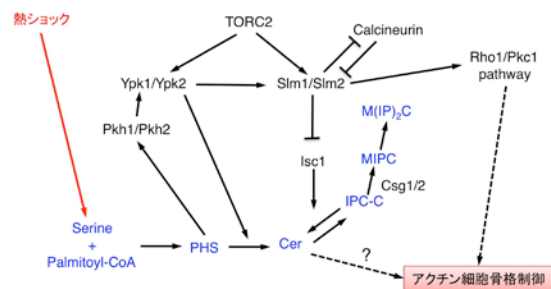


図6 TORC2複合体下流シグナルによるスフィンゴ脂質代謝制御とアクチン細胞骨格制御

これらの結果をまとめると、TORC2 複合体の下流で、Slm1/Slm2-Isc1 経路と Pkh1/Pkh2-Ypk1/Ypk2 経路はそれぞれ平行したシグナル経路として機能している。そして、Slm1/Slm2 が Isc1 の活性を負に制御することにより IPC-C の分解に伴うセラミドの産生を制御しているのと同時に、Ypk1/Ypk2 はセラミド合成酵素の活性化を制御することでセラミドの産生を制御していることが予測さ

れた。そして、これら2つの経路とは全く独立して、Rho1/Pkc1 経路が存在し、この経路は未だ不明のメカニズムによりTORC2-Slm1/Slm2 により制御されていることが予測された。このシグナルの中で、スフィンゴ脂質代謝経路は、分解・合成により熱ショックストレスシグナルを時間的・空間的に制御していることが考えられた。そして、スフィンゴ脂質代謝経路の異常は、これらのシグナルの時間的・空間的制御を乱し、結果としてアクチン細胞骨格制御異常を示すことが予測された。当初、Slm1/Slm2 から Isc1 までのシグナル伝達経路の解明を目的に研究を開始したが、本研究期間内では、これについて解明するには至らなかった。今後更に、Slm1/Slm2 がどのようにして Isc1 を制御しているのかを分子レベルで明らかにすることにより熱ショックにより伴う細胞内のストレスシグナル経路の解明がなされるものと確信している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Miyashita N., Ouchi K., Kishi F., Tabuchi M., Tsumura N., Bannai H., Iwata S., Tanaka T. and Oka M.: Rapid and simple diagnosis of *Chlamydomydia pneumoniae* by an immunochromatographic test for detection of immunoglobulin M antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 15(7):1128-31, 2008
2. Kawai Y., Miyashita N., Kishi F., Tabuchi M., Oda K., Yamaguchi T., Kawasaki K., Yamazaki T. and Ouchi K.: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Chlamydomydia pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* In press.

[学会発表] (計8件)

1. Analysis of the structural requirement for recycling endosome-targeting of DMT1 isoform II. M. Tabuchi, I. Yanatori and F. Kishi., Bioiron 2007: The Second Congress of the International Bioiron Society, Kyoto, Japan 2007 4/6
2. 鉄輸送体 DMT1 のリサイクリングエンドソーム標的化シグナル配列の解析、田淵 光昭、築取 いずみ、三棹 聡美、岸文雄、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜 2007 12/11-15
3. レトロマーによる鉄輸送体のリサイク

リングエンドソームへの輸送調節、田淵光昭、築取 いずみ、岸 文雄、第49回 日本生化学会中国・四国支部例会、高松市 2008 5/16

4. Retoromer is required for the efficient targeting of the iron transporter to recycling endosomes, 田淵光昭、築取 いずみ、岸 文雄、第60回日本細胞生物学会大会、横浜 2008 7/1
5. 赤血球成熟過程における鉄取り込み促進機構の解明、田淵 光昭、築取 いずみ、岸 文雄、第32回 日本鉄バイオサイエンス学会学術集会、青森市 2008 9/14
6. レトロマーによる鉄トランスポーターDMT1のエンドソームにおけるトラフィック制御、田淵 光昭、池袋 美雪、築取 いずみ、岸 文雄、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸市 2008 12/12
7. Retromer-dependent endosomal sorting of mammalian iron transporter, DMT1, Mitsuaki Tabuchi, Izumi Yanatori, Miyuki Ikebukuro and Fumio Kishi, 48<sup>th</sup> The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 米国サンフランシスコ (Moscone Center) 2008 12/15
8. 酵母発現系を用いた病原菌エフェクター網羅的スクリーニングシステムの開発、田淵 光昭、河合 泰宏、泉 輝実、池袋 美雪、築取 いずみ、尾内 一信、岸 文雄、日本農芸化学会 2009 年度大会、(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)、2009 3/28

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 光昭 (MITSUAKI TABUCHI)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00294637