

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06564

研究課題名(和文) 進化的に保存されたmTORC1キナーゼ複合体を介したシグナル経路の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular basis of substrate phosphorylation by mTORC1

研究代表者

両角 佑一 (Morozumi, Yuichi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80571439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物間で保存されたmTORタンパク質キナーゼは、mTORC1と呼ばれる複合体を形成し、様々な基質をリン酸化することで細胞成長や代謝を制御する。本研究では、mTORC1経路がヒトに非常に近い分裂酵母をモデルとして、mTORC1がどのように基質を認識しリン酸化するのか、また、リン酸化による基質の機能制御を明らかにすることで、mTORC1シグナル経路伝達機構の理解を目指した。本研究を通じて、分裂酵母とヒトの間で保存されたmTORC1の基質認識機構が備わっていることが明らかとなった。また、mTORC1のサブユニットの変異体が、mTORC1の基質探索の有用なツールになりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORC1は、周辺環境の栄養源などに応答し、細胞成長や増殖を制御しているため、その活性異常はがんをはじめ、糖尿病や神経疾患など様々な疾病を原因となることがわかっている。また、近年mTORC1は老化や寿命と密接に関わることもわかってきており、医薬品開発における分子標的としてmTORC1が非常に注目されている。本研究は、mTORC1がどのようにして基質を認識するのかそのメカニズムを探るものであり、mTORC1シグナル経路の分子機構の理解のみならず、その臨床応用への足がかりとなる基盤情報の提供へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Evolutionarily conserved mTOR complex 1 (TORC1) is a multi-subunit protein kinase complex that controls cellular growth and metabolisms in response to environmental cues. In mammals, the regulatory subunits of mTORC1 include Raptor, which recruits mTORC1 substrates by interacting with their TOR signaling (TOS) motif. Despite the evolutionary conservation of mTORC1, no TOS motif has been described in lower eukaryotes. In addition, no apparent TOS motif is present in many of the known mTORC1 substrates, and very little is known about how mTORC1 recognizes substrates with no discernible TOS motif. Findings of this study have revealed that the mechanism of the TOS motif-mediated recruitment of the TORC1 substrates is conserved between fission yeast and humans.

研究分野：細胞生物学

キーワード：mTORC1 分裂酵母 ラパマイシン

1. 研究開始当初の背景

mTOR (mechanistic Target of Rapamycin)は、免疫抑制剤であるラパマイシンの標的因子として発見されたタンパク質キナーゼであり、栄養状態や増殖因子などの情報を統合し、成長や代謝を制御するシグナル伝達ネットワークにおいて中心的な役割を果たす。mTOR は真核生物に保存されており、複数のサブユニットと 2 種類の複合体 mTOR complex 1 (mTORC1)および mTORC2 を形成する。このうち mTORC1 は、その特異的阻害剤であるラパマイシンを用いた研究から、タンパク質などの高分子合成、細胞成長、オートファジー、免疫系といった広汎な生命現象に関わることが明らかになっており、mTORC1 経路の異常は、がん、糖尿病、神経疾患など様々な疾病を引き起こす。加えて、ラパマイシンによって酵母、線虫、ハエ、マウスなど様々なモデル生物の寿命が顕著に延長されることも示され、医薬品開発における分子標的として mTORC1 が非常に注目されている。

様々な生理現象に mTORC1 が関わることが明らかになるにつれ、その基質も次第にわかってきた。ほ乳類において mTORC1 および mTORC2 は、mTOR を触媒サブユニットとして共有しているため、それぞれの複合体に特異的な制御サブユニットが基質認識を担っていると考えられている。実際、ヒト mTORC1 の基質である S6K や 4EBP などは、TOS (TOR Signaling) と呼ばれる 5 アミノ酸のモチーフを介して、mTORC1 のサブユニットである RAPTOR と相互作用する。しかし、TOS モチーフのない基質も多数存在するため、TOS モチーフだけでは mTORC1 の基質認識メカニズムを説明しきれない。また、TOS モチーフを介した mTORC1 の基質認識機構が真核生物種間で保存されているのかも不明であった。さらには、mTORC1 依存的なリン酸化サイトや、そのリン酸化による機能制御がわかっている基質も多くない。mTORC1 の基質認識機構や、mTORC1 によるリン酸化を介した基質の機能制御メカニズムの解明は、mTORC1 シグナル経路の分子機構の理解のみならず、その臨床応用のためにも必要不可欠である。

2. 研究の目的

mTORC1 活性の異常亢進が、様々な疾患の原因となることが判明すると、mTORC1 の活性化機構に関する研究が盛んに行われるようになり、mTORC1 の活性化因子やその機能が急速に明らかになってきている。しかし一方で、その活性化された mTORC1 がどのように基質を認識しリン酸化するのは依然として不明瞭であり、そのリン酸化を介した基質の機能制御も不明な点が多い。本研究では、mTORC1 が酵母からヒトに至る真核生物で高度に保存されていることに着目し、mTORC1 経路が出芽酵母と比べてよりヒトに近い分裂酵母をモデル系として、

(i) mTORC1 が下流の基質をどのように認識してリン酸化するのか

(ii) mTORC1 による基質のリン酸化部位とリン酸化による基質の機能制御

の 2 つを分子レベルで明らかにすることで、生物種間に普遍的な mTORC1 シグナル経路伝達機構のさらなる理解を目指す。

3. 研究の方法

mTORC1 は真核生物種間で保存されていることから、分裂酵母ではほ乳類 RAPTOR の相同因子である Mip1 が mTORC1 の基質認識を担っていることが考えられる。そこで、分裂酵母 mTORC1 の既知に基質と Mip1 の相互作用を検証し、その相互作用部位を同定する。また、その相互作用が mTORC1 による基質にリン酸化に重要なのかを、相互作用部位に変異を導入することで検証した。加えて、基質のリン酸化部位を同定し、その部位にアミノ酸置換を導入した変異体を用いて、リン酸化が基質の性質や機能に及ぼす影響を調べた。本研究は、分裂酵母をモデルとして、遺伝学、細胞生物、および生化学的手法を駆使してこれらを検証することで、mTORC1 の基質認識機構や、mTORC1 依存的なリン酸化を介した基質の機能制御の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) Mip1 と Psk1 の相互作用部位決定と Psk1 リン酸化におけるその相互作用の重要性

ほ乳類において、mTORC1 特異的サブユニットである RAPTOR は、S6K1 や 4EBP1 などの基質との相互作用を担うことが知られている。そこでまず、RAPTOR の分裂酵母相同因子である Mip1 と S6K1 相同因子である Psk1 との相互作用を、酵母ツーハイブリッド法により調べた。その結果、両者の相互作用が検出されたので、次に様々な Psk1 部分断片を用いて、Mip1 との相互作用に重要な Psk1 の領域を調べた結果、Psk1 の N 末端領域の 10 アミノ酸が Mip1 との相互作用に必要な十分であることが明らかになった。ほ乳類 RAPTOR は、S6K1 に含まれる 5 アミノ酸の TOS モチーフと相互作用することが知られているが、興味深いことに、Psk1 の N 末端領域には TOS モチーフに類似したアミノ酸配列が含まれていた。実際に、それらのアミノ酸残基を 1 つずつアラニンに置換した Psk1 変異体は、Mip1 との相互作用能が低下したことから、Psk1 の N 末端領域は TOS モチーフとして機能することが示唆された。また、分裂酵母細胞で野生型 Psk1 は高レベルにリン酸化されている一方で、TOS モチーフに変異を導入した Psk1 のリン酸化は完全に消失していた(図 1A)ことから、TOS モチーフを介した相互作用は mTORC1

による Psk1 のリン酸化に必須であることが明らかになった。

RAPTOR の 475 番目のチロシンが、TOS モチーフとの結合に重要なアミノ酸残基であり、Mip1 にも保存されている。そこで、この保存された 533 番目のチロシンをアラニンに置換した Mip1 変異体を発現する分裂酵母株 (*mip1-Y533A*) を作製し、その表現型を解析した。Mip1 は必須遺伝子あり遺伝子欠損は致死となるが、*mip1-Y533A* の成育能は野生型と同程度であった。一方で、*mip1-Y533A* 株は野生型株に比べて、mTORC1 阻害剤であるラパマイシンに対して感受性を示したことから、Mip1 変異によって mTORC1 活性が低下していることが示唆された。また、この *mip1-Y533A* 株において、Psk1 のリン酸化レベルは顕著に低下しており (図 1B)、Psk1 との相互作用能も Y533A 変異により低下していたことから、細胞内において Mip1 の 533 番目のチロシンは TOS モチーフとの相互作用を担っていることが明らかになった。これらの結果から、TOS モチーフを介した mTORC1 の基質認識機構は分裂酵母にも保存されており、Psk1 は TOS モチーフを有する基質であることが示唆された。

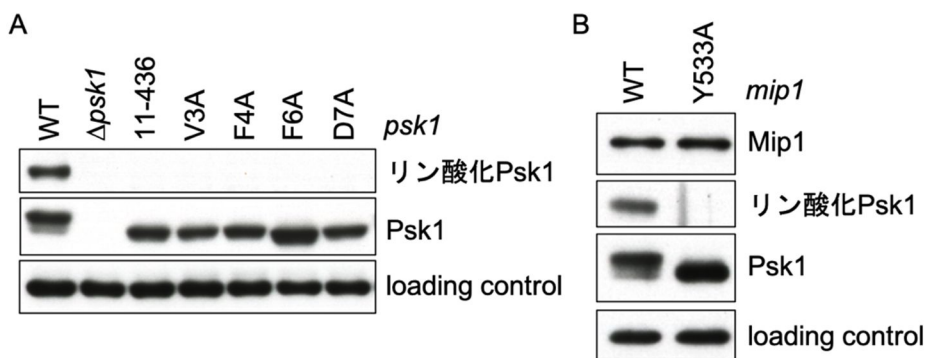


図 1 *psk1* および *mip1* 各変異株における Psk1 リン酸化レベルの解析
(A) *psk1*, (B) *mip1* の各変異株から得られた細胞中出液を用いて、Psk1 のリン酸化レベルの免疫プロットにより解析した。

(2) Mip1-Y533A 変異を利用した TOS モチーフ依存的に mTORC1 に認識される基質の探索

mip1-Y533A 株における Psk1 以外の mTORC1 基質 (Sck1, Sck2, Maf1, Atg13) のリン酸化を調べた結果、Sck1, Sck2, Maf1 は野生型株との間でリン酸化レベルに大きな違いは見られなかったものの、Atg13 は *mip1-Y533A* 株でそのリン酸化レベルが低下していた。興味深いことに、Atg13 のアミノ酸配列に TOS モチーフ様の配列 (538–542 番目:FDIDT) が存在した。そこで、この TOS 様モチーフの 538 番目のフェニルアラニンをアラニンに置換した Atg13 を発現する分裂酵母株 (*atg13-F538A*) を作製し、そのリン酸化を調べた。その結果、Atg13-F538A のリン酸化レベルは、*mip1-Y533A* 株における Atg13 のそれと同程度まで減少していたことから、分裂酵母 Atg13 は TOS モチーフを介して mTORC1 にリン酸化される基質であることが示唆された。また、Mip1 相同因子において Mip1 の 533 番目に相当する保存されたチロシン残基にアミノ酸置換を導入した変異体は、TOS モチーフ依存的にリン酸化される mTORC1 の基質を探索するうえで有用なツールとなり得ることが期待された。

(3) Maf1 のリン酸化サイト同定およびそのリン酸化の役割の解析

Maf1 は真核生物に保存された、RNA pol III の抑制因子であり、mTORC1 の基質であると考えられている。*mip1-Y533A* 株における Maf1 のリン酸化レベルは、野生型株と同程度であった一方で、ラパマイシン処理によって著しく減少した。また、分裂酵母抽出液から精製した mTORC1 と組換えタンパク質として大腸菌から精製した Maf1 を用いた試験管内リン酸化アッセイの結果、Maf1 のリン酸化が観察された。これらの結果から、分裂酵母 Maf1 は mTORC1 の基質であることが確認されたため、次に Maf1 のリン酸化部位の同定を試みた。質量分析を用いたタンパク質の網羅的なリン酸化解析により、Maf1 の 61 および 74 番目のセリン残基がリン酸化されるという報告があったため、その周辺に存在する、59、60、61、63、74 番目の 5 つのセリンをアラニンに置換した Maf1 変異体を発現する分裂酵母株を作製し、細胞名における Maf1 のリン酸化を解析した。その結果、63 および 74 番目のセリンがリン酸化される主要な残基であることが明らかになった。

出芽酵母 Maf1 はリン酸化された状態では細胞質に局在し、脱リン酸化されると核内に移行することが分かっている。分裂酵母 Maf1 の細胞内局在は不明であったので、まず Maf1 の C 末端に GFP を付加した融合タンパク質 (Maf1-GFP) が発現する分裂酵母株を構築し、Maf1 の細胞内局在を観察した。その結果、Maf1 は主に核内に局在していることが確認できたが、興味深いことに、核内のシグナルのなかでもひとときわ明るい点が存在することがわかった (図 2)。Maf1 は RNA Pol 複合体に結合して転写を抑制する機能を持つことから、核内の Maf1-GFP の輝点は Pol と結合している Maf1 画分ではないかと推定した。そこで、Maf1-GFP と Pol III の

大サブユニットである Rpc1 の C 末端に mCherry を付加した融合タンパク質(Rpc1-mCherry) が共発現する酵母株を用いて局在を調べた結果、Maf1-GFP の輝点は Rpc1 の局在と一致していることから、Maf1 と RNA Pol III は共局在することが明らかになった (図 2)。次に、Maf1 のリン酸化とその局在の関連を明らかにするために、ラパマイシン処理が Maf1 の局在に及ぼす影響を調べたが、Maf1 の局在に大きな変化は見られなかった。また、Maf1 のリン酸化部位 (63 番目および 74 番目のセリン) をアラニンに置換した Maf1 変異体も野生型 Maf1 と同様の局在を示したことから、出芽酵母とは異なり Maf1 のリン酸化は局在制御に機能しないことが示唆された。今後のさらなる解析により、Maf1 のリン酸化の生物学的重要性が明らかになることが期待される。

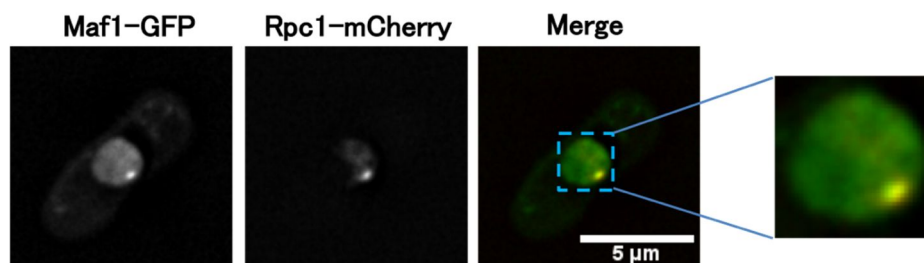


図 2 Maf1 の局在解析

Maf1-GFP, Rpc1-mCherry の発現を蛍光顕微鏡にて観察した。

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 3件）

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Morozumi Yuichi, Hishinuma Ai, Furusawa Suguru, Sofyantoro Fajar, Tatebe Hisashi, Shiozaki Kazuhiro | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 Fission yeast TOR complex 1 phosphorylates Psk1 through an evolutionarily conserved interaction mediated by the TOS motif | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cell Science | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258865 | 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 Fukuda Tomoyuki, Sofyantoro Fajar, Tai Yen Teng, Chia Kim Hou, Matsuda Takato, Murase Takaaki, Morozumi Yuichi, Tatebe Hisashi, Kanki Tomotake, Shiozaki Kazuhiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Tripartite suppression of fission yeast TORC1 signaling by the GATOR1-Sea3 complex, the TSC complex, and Gcn2 kinase | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e60969 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.60969 | 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 Morozumi Yuichi, Shiozaki Kazuhiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Conserved and Divergent Mechanisms That Control TORC1 in Yeasts and Mammals | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Genes | 6. 最初と最後の頁 88 ~ 88 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12010088 | 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 両角 佑一, 塩崎 一裕 |
| 2. 発表標題 TOSモチーフを介したTORC1の基質認識機構は分裂酵母においても保存されている |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yaoting Du, 中瀬 由起子, 両角 佑一, 高木 博史, 塩崎 一裕 |
| 2. 発表標題 S.pombeにおける疑似プロリントランスポーターPut4の同定 |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 趙 鶴翔, Yuichi Morozumi, Hiroshi Takagi, Kazuhiro Shiozaki |
| 2. 発表標題 分裂酵母TOR複合体2 (TORC2) の制御サブユニットBit2の機能解析 |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Cuong Chu, Yuichi Morozumi, Hiroshi Takagi, Kazuhiro Shiozaki |
| 2. 発表標題 Isolation and characterization of novel fission yeast mutants with a decrease in TOR complex 1 activity |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shet Lee Ng, Kazuhiro Shiozaki, Hiroshi Takagi, Yuichi Morozumi, Yukiko Nakase |
| 2. 発表標題 Identification of the key proteins and pathway that regulate the ammonium transporter in fission yeast |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊計 舞、両角 佑一、塩崎 一裕 |
| 2. 発表標題 分裂酵母mTORC1によるPol III転写抑制因子Maf1のリン酸化制御 |
| 3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第52回研究報告会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 両角 佑一、伊計 舞、塩崎 一裕 |
| 2. 発表標題 分裂酵母TORC1によるRNAポリメラーゼIII抑制因子Maf1の機能制御 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今端 佑樹、両角 佑一、中瀬 由起子、高木 博史、塩崎 一裕 |
| 2. 発表標題 分裂酵母の高温耐性を制御する因子の遺伝学的探索 |
| 3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 両角 佑一、林 佑美、Chu Minh Cuong、Sofyantoro Fajar、高木 博史、塩崎 一裕 |
| 2. 発表標題 分裂酵母Pib2はTORC1の活性化因子として機能する |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|