

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380202

研究課題名(和文)メタボリックシグナリング：解糖系代謝物によるTORC2活性化の分子機序とその意義

研究課題名(英文)Metabolic signaling: molecular mechanism and its physiological significance of TORC2 activation by glycolytic metabolite

研究代表者

井上 善晴 (INOUE, Yoshiharu)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70203263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物において、細胞を取り巻く環境変化に応じて活性化されるシグナル伝達経路にTOR(target of rapamycin)経路がある。TORはタンパク質リン酸化酵素で、TORC1とTORC2という2種類の複合体を形成する。TORC1シグナルはアミノ酸により活性化されるが、TORC2シグナルの活性化イニシエーターはよくわかっていない。本研究では、細胞内でのエネルギー代謝プロセスで生成するメチルグリオキサールが、酵母ならびに哺乳類細胞において、TORC2シグナル経路を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The TOR (target of rapamycin) signaling pathway is evolutionally conserved in eukaryotes, and responds to the changes in environmental conditions. TOR is a protein kinase, and constitutes two distinct complexes, TORC1 and TORC2. TORC1 signaling is enhanced by amino acids. Meanwhile, it is obscure whether there is a common initiator for TORC2 signaling among eukaryotes. In this study, I found that methylglyoxal, a metabolite derived from energy producing process, functioned as a signal initiator of TORC2 in both yeast and mammalian cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：TORC2 メチルグリオキサール 酵母 Pkc1 Akt インスリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、細胞を取り巻く環境変化に応じて活性化されるシグナル伝達経路に TOR (target of rapamycin) 経路がある。TOR タンパクの実体は、真核生物に広く保存された Ser/Thr タンパク質リン酸化酵素である。出芽酵母 (*S. cerevisiae*) は Tor1 と Tor2 という 2 つの TOR タンパクを持つ。一方、哺乳類細胞は一種類の TOR タンパク (mTOR) を持つ。TOR は 2 つの異なる TOR 複合体、TORC1 (TOR complex 1) と TORC2 (TOR complex 2) を形成する。*S. cerevisiae* では、TORC1 には Tor1 もしくは Tor2 が含まれ、TORC2 には Tor2 のみが含まれる。一方、哺乳類の場合、いずれの TOR 複合体の場合でも、含まれる TOR タンパク質は mTOR だけであるが、TOR 複合体を構成するその他のサブユニットが TORC1 と TORC2 では異なっている。酵母でもヒトでも、それぞれの TOR 複合体を構成するサブユニットは、共通した成分が知られている。

TORC1 と TORC2 は、細胞内ではそれぞれ異なった機能を担っている。TORC1 はタンパク質合成や細胞の増殖、老化などに関与している。一方、TORC2 はアクチンの組織化に関与する。TORC1 へのシグナルのインプットは栄養源、とくにアミノ酸である。タンパク質合成を始めとする細胞増殖に必要なマシナリーが機能を発揮するためには、環境中に栄養が豊富に存在することが担保されていなくてはならない。従って、栄養が存在する条件では TORC1 は活性化されており、栄養が枯渇した条件では TORC1 は不活性化される。また、TORC1 はラパマイシンにより阻害を受けることから、TORC1 の活性化機構についての研究は盛んに行われている。これに対し、TORC2 経路を活性化するメカニズムは、TORC2 へのシグナルの直接のインプットが何であるかがよく分かっていないため不明な点が多い。これまでに唯一、TORC2 へのシグナルのインプットとして、哺乳類細胞においてインスリン (ならびにインスリン様増殖因子) が知られている。一方、酵母のような下等真核生物にはインスリンのような増殖ホルモンは存在しない。しかしながら、TOR シグナル伝達系は酵母からヒトに至るまで進化的によく保存されていることから、生物種を超えた普遍的な TORC2 活性化のシグナルイニシエーターが存在することが予想されるものの、本当にそのような因子が存在するかどうかについてはよく分かっていない。

2. 研究の目的

TOR 複合体は AGC キナーゼと呼ばれる一群のタンパク質リン酸化酵素を基質とすることが知られている。例えば、哺乳類の mTORC1 は、アミノ酸が存在する条件では AGC キナーゼファミリーのタンパク質である S6K をリン酸化する。S6K の *S. cerevisiae* におけるオルソログは Sch9 であるが、*S.*

cerevisiae の TORC1 は Sch9 をリン酸化する。一方、mTORC2 は AGC キナーゼである PKC α や Akt をリン酸化する。*S. cerevisiae* の TORC2 が標的とする AGC キナーゼとして Ypk1 が知られている。

私はこれまでに酵母を用いた研究から、解糖系で生じる代謝物メチルグリオキサール (MG) が、シグナルイニシエーターとして細胞内シグナル伝達系を活性化することを発見し、メタボリックシグナリングという概念を提唱している。その研究の過程で、MG が Mpk1-MAP キナーゼ経路を活性化することを見いだした。Mpk1-MAP キナーゼ経路は *S. cerevisiae* の唯一の C キナーゼである Pkc1 の機能的下流に位置するシグナル伝達経路である。Pkc1 も構造的には AGC キナーゼファミリーに属するが、Pkc1 が TORC2 の基質になるかどうかについての生化学的証明はなされてはいない。MG が Mpk1-MAP キナーゼ経路を活性化することは、MG は TORC2 の活性化を介して Pkc1 を活性化し、その下流へシグナルを流している可能性が考えられる。

そこで本研究では、*S. cerevisiae* を用いる遺伝学的な解析を通して、MG が TORC2 シグナル経路を活性化しているかどうかを検証することを第一の目的とした。さらに、哺乳類においても MG は mTORC2 シグナル経路の活性化イニシエーターとして機能しているかどうかを明らかにすることも目的とした。これらの解析を通して、メタボリックシグナリングの概念の更なる確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 酵母 TORC2 の免疫沈降法による精製

酵母 TORC2 は TOR タンパクとして Tor2 の他に、Avo1、Avo2、Avo3、Lst8、Bit61 のコンポーネントから成る。このうち、必須コンポーネントの一つである Avo3 に Myc タグを付加した株を用い、抗 Myc 抗体を用いた免疫沈降実験を行い、TORC2 の精製を行った。

(2) *In vitro* キナーゼアッセイ

Pkc1 の TORC2 による推定リン酸化部位 (Thr1125 ならびに Ser1143) を含む領域の 29 アミノ酸から成る Pkc1 ペプチドを合成した。また、それらのアミノ酸残基を Ala に置換した変異型 Pkc1 ペプチドも合成した。これらを基質とし、精製した TORC2、ならびに [γ -³²P]ATP をミックスして 30°C で 30 分間インキュベートしてリン酸化反応を行った。その後、SDS-PAGE サンプルバッファーを添加し、65°C で 5 分間処理することで反応を停止させた。次いで、サンプルを Tricine-SDS-PAGE を行い、リン酸化バンドの検出はオートラジオグラフィにより行った。

(3) リン酸化抗体の作成

Pkc1 の Thr1125、ならびに Ser1143 をリン酸化したリン酸化ペプチド (Thr1125: リン酸化部位を含む 19 アミノ酸、Ser1143: リン酸化部位を含む 10 アミノ酸) を合成し、ウサギに免疫してリン酸化抗体を作成した。

(4) 脂肪細胞の培養

前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化は、常法に従って行った (J. Lipid. Res. 52:873-884, 2011)。すなわち、3T3-L1 細胞を insulin、dexamethasone、isobutylmethylxanthine を用いて脂肪細胞に分化誘導 (8~10 日間) させ、その後、血清スターブさせた。これにインスリン、あるいは MG を添加した後、Akt のリン酸化状態を、Akt-Thr450 ならびに Akt-Ser473 特異的リン酸化抗体を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) 酵母 TORC2 による Pkc1 のリン酸化

免疫沈降法により精製した TORC2 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。実験に先立ち、精製した TORC2 が正常に機能しているかどうかを確認するため、TORC2 の既知の基質である Ypk1 を大腸菌で発現・精製し、これを基質とした *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、精製 TORC2 は *in vitro* で Ypk1 をリン酸化することを確認した。

TORC は AGC キナーゼをリン酸化するが、そのリン酸化部位は AGC キナーゼファミリー間で保存されており、turn motif (TM) と hydrophobic motif (HM) 内の Ser/Thr 残基である。Pkc1 にも、TM 内に Thr1125、HM 内に Ser1143 が存在し、これらが TORC2 による推定リン酸化サイトと考えられる。そこで、これらのアミノ酸残基を含む野生型 Pkc1 ペプチド (WT) と、それらを Ala に置換した変異型 Pkc1 ペプチド (T1125A/S1143A) を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、図 1A に示すように、野生型 Pkc1 ペプチドは TORC2 によりリン酸化された。これに対し、推定リン酸化サイトを Ala に置換した変異体では、リン酸化が認められなかった。

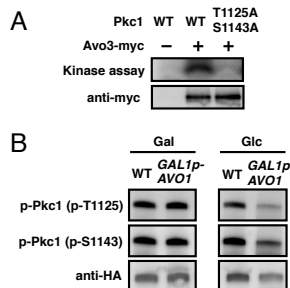


図 1 TORC2 による Pkc1 のリン酸化

次に、酵母の細胞内においても TORC2 が Pkc1 をリン酸化しているかどうかを検証するため、Thr1125 ならびに Ser1143 に対するリン酸化抗体を作成した。HA タグを付加した Pkc1 を抗 HA 抗体で免疫沈降し、作成した

リン酸化抗体 (p-T1125 ならびに p-S1143) を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、それぞれの抗体は各アミノ酸残基のリン酸化状態を特異的に検出できることを確認した (図 1B)。そこで、それらのアミノ酸残基のリン酸化が TORC2 に依存しているかどうかを確認するため、TORC2 の機能を欠損させた。TORC2 は生育に必須であるので、TORC2 の必須コンポーネントの一つである Avo1 の発現をノックダウンする系を構築した。すなわち、AVO1 遺伝子を GAL プロモーター下流に連結し、ガラクトース (Gal) 培地からグルコース (Glc) 培地に移すことで AVO1 遺伝子の発現を減弱させた。その結果、グルコース培地では Thr1125 ならびに Ser1143 のリン酸化レベルが減少した。とくに、Thr1125 のリン酸化レベルの減少が顕著であった (図 1B)。これらのことから、TORC2 は Pkc1 を実際にリン酸化していることが明らかとなった。

(2) MG 処理による TORC2 依存的 Pkc1 のリン酸化

MG 処理により Mpk1-MAP キナーゼ経路の活性化が起こることから、MG 処理が Mpk1 経路の機能的上流に位置する Pkc1 のリン酸化レベルに及ぼす影響について検討を行った。その結果、Pkc1 の TM 内の Thr1125 のリン酸化レベルには変化は見られなかったが (図 2A)、HM 内の Ser1143 のリン酸化レベルが上昇した (図 2B)。

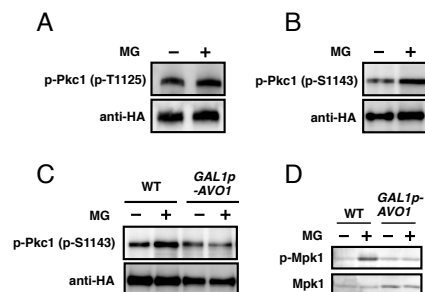


図 2 酵母における MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化

そこで、Pkc1 の HM 内の Ser1143 の MG 処理によるリン酸化レベルの上昇が TORC2 によるものであるかどうかを検証するため、Avo1 のノックダウン実験を行った。その結果、Avo1 をノックダウン (すなわち、TORC2 の機能を減弱) した条件では、MG による Pkc1-Ser1143 のリン酸化レベルの上昇は観察されなかった (図 2C)。また、Avo1 ノックダウン条件下では、MG による Mpk1 のリン酸化も起こらなかった (図 2D)。これらのことから、MG は TORC2-Pkc1 シグナル経路を活性化するイニシエーターであると考えられた。

(3) 哺乳類細胞における MG による mTORC2 の活性化

ここまでの解析で、MG は酵母において TORC2 シグナルの活性化イニシエーターとして機能していることが明らかとなった。そこで、MG が生物種を超えて TORC2 シグナルを活性化しているかどうかについて、マウスの脂肪細胞を用いて検討を行った。その結果、図 3A に示すように、MG で処理すると Akt の HM 内の Ser473 のリン酸化レベルが上昇した。これに対し、TM 内の Thr450 のリン酸化レベルに変化は見られなかった。酵母 TORC2 による Pkc1 のリン酸化に関しても、MG 処理により HM 内の Ser1143 のリン酸化レベルのみが上昇したことから、酵母でも哺乳類でも、MG による TORC2 シグナルの活性化は、AGC キナーゼの HM のリン酸化レベルの上昇を引き起こすと考えられた。

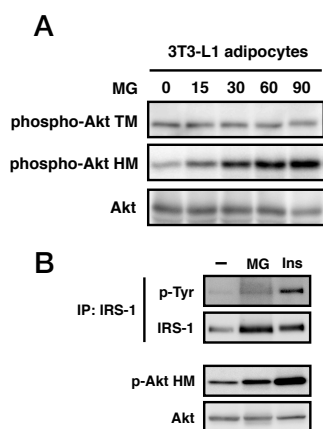


図 3 脂肪細胞における MG による mTORC2-Akt シグナルの活性化

インスリンシグナル伝達系は、インスリン受容体から IRS-1 (インスリン受容体基質)、PI3K (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ)、PDK1 (ホスホイノシチド依存性キナーゼ) とシグナルが伝達され、Akt の activation loop のリン酸化が起こる。一方、インスリン刺激に応答して、mTORC2 は Akt の HM 内の Ser473 のリン酸化レベルを上昇させるのに対し、TM 内の Thr450 のリン酸化はインスリン刺激には応答しない。この mTORC2 のインスリン応答は、MG による Akt のリン酸化の応答とよく似ている。また、インスリンによる Akt-Ser473 のリン酸化には PI3K が関与することも報告されている。そこで、MG はインスリン受容体に対して、インスリンのアゴニスト様に作用しているかどうかを検討した。すなわち、インスリン受容体はインスリンを受容するとチロシンキナーゼ活性を持ち、自己リン酸化とともにその基質である IRS-1 のチロシンリン酸化を誘導する。そこで、MG 処理によっても IRS-1 のチロシンリン酸化が誘導されるかどうかを検討した。その結果、インスリン刺激の場合は IRS-1 のチロシンリン酸化が起こったのに対し、MG で

は ITS-1 のチロシンリン酸化は起こらなかった (図 3B)。しかし、いずれの場合でも Akt-Ser473 のリン酸化は起こっていた。これらのことから、MG はインスリン受容体を介して mTORC2-Akt シグナル経路を活性化しているわけではないと考えられた。

以上のことから、MG は生物種を超えて TORC2 シグナル経路を活性化するイニシエーターとして機能している可能性が示唆された。また、哺乳類細胞においては、インスリンとは異なる機構で mTORC2 シグナルを活性化させている可能性が考えられた。今後は、どのような機構で MG が TORC2 シグナルを流しているのか、また TORC2 が AGC キナーゼの HM のリン酸化のみを上昇させる生理的な意義などについて検討を加えて行く必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yoshida, A., Wei, D., Nomura, W., Izawa, S. and Inoue, Y. Reduction of glucose uptake through inhibition of hexose transporters and enhancement of their endocytosis by methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 287, No. 1, 2012, pp.701-711 DOI:10.1074/jbc.M111.322222
- ② Kamo, K., Takabatake, A., Inoue, Y. and Izawa, S. Temperature dependent N-glycosylation of plasma membrane heat shock protein Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 420, No. 1, 2012, pp. 119-123 DOI:10.1016/j.bbrc.2012.02.126
- ③ Ohdate, T. and Inoue, Y. Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in *Saccharomyces cerevisiae* in oleic acid medium. *Biochim. Biophys. Acta (Molecular and Cell Biology of Lipids)*, 査読有, Vol. 1821, No. 9, 2012, pp.1295-1305 DOI:10.1016/j.bbalip.2012.05.004

[学会発表] (計 8 件)

- ① 井上善晴、メチルグリオキサールによる新しいインスリン抵抗性モデル、日本農芸化学会、2014 年度大会シンポジウム (アルデヒドのバイオサイエンス —生物の多様なアルデヒド代謝系とその戦略的活用)、2014 年 3 月 30 日、明治大学生田キャンパス (川崎市)
- ② 野村 亘、河田照雄、井上善晴、解糖系代謝物による TORC2 シグナルの活性化、第 36 回日本分子生物学会ワークショップ (TOR ROAD-TOR への道、TOR からの道)、2013 年 12 月 5 日、神戸国際会議場 (神戸市)

- ③ 野村 亘、河田照雄、井上善晴、Pkc1のC1領域がTORC2-Pkc1シグナルに及ぼす影響、第46回酵母遺伝学フォーラム、2013年9月8日、東北学院大学(仙台市)
- ④ 井上善晴、酵母を利用した健康科学への挑戦、平成24年度置賜マイクロ・ナノバイオフィォーラム(微生物反応を利用した産業創出～生命・化学・産業～)、2013年3月29日、伝統の杜・置賜文化ホール(米沢市)
- ⑤ 野村 亘、河田照雄、井上善晴、解糖系代謝物メチルグリオキサールによるIRS-1のリン酸化を介したインスリン抵抗性の可能性、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月26日、東北大学(仙台市)
- ⑥ 野村 亘、河田照雄、井上善晴、TORC2シグナリングの解析:糖尿病病態解析モデルとしての酵母、第45回酵母遺伝学フォーラム、2012年9月4日、京都大学きはだホール(宇治市)
- ⑦ 野村 亘、河田照雄、井上善晴、解糖系代謝物メチルグリオキサールはTORC2の活性化因子である、第59回日本生化学会近畿支部例会、2012年5月19日、京都大学宇治キャンパス(宇治市)
- ⑧ 野村 亘、井上善晴、解糖系代謝物によるTORC2活性化機構～酵母を用いる糖尿病研究の可能性～、日本農芸化学会2012年度大会シンポジウム(メタボリックシグナルと健康科学)2012年3月25日、京都女子大学(京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 善晴 (INOUE, Yoshiharu)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 70203263

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

河田 照雄 (KAWADA, Teruo)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 10177701