

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770229

研究課題名（和文）分裂酵母TORC1を介した栄養感知・細胞制御シグナルの分子メカニズムの構築

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the signaling involved in nutrient sensing and cell regulation that mediated by TORC1 in fission yeast

研究代表者

中嶋 昭雄 (NAKASHIMA AKIO)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・バイオシグナル研究センター

研究者番号：70397818

研究成果の概要（和文）：TORC1シグナリングは、栄養シグナルを受けて多くの細胞機能を制御する。本研究では、モデル生物である分裂酵母を用いてその分子メカニズムの検討を行い、TORC1の基質として新たに3種類のプロテインキナーゼを同定し、そのうちPsk1の詳細な活性制御を明らかにした。今回の知見は、モデル生物を用いたTORC1シグナリングによる普遍的な細胞制御機構の構築に向け、重要な足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The TORC1 signaling plays a crucial role in a large number of cellular processes in response to nutrient signals. In this study, we investigated molecular mechanism of the nutrient-dependent TORC1 signaling in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and demonstrated three protein kinases as its substrates. Of these, it was especially revealed how Psk1 is regulated by TORC1 responding to nutrient availability. The findings obtained from this study indicate a milestone to elucidate the universal mechanism of cellular regulation by TORC1 signaling among eukaryotes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達、TOR、栄養応答、細胞機能制御、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

近年、アミノ酸およびグルコースといった栄養素はタンパク質やエネルギーの原材料となるだけでなく、その量的変動によりシグナル分子として感知され、多くの細胞機能制御に重要な役割を果たすことが明らかとなり、栄養シグナルのセンシングから細胞応答に至る経路では、タンパク質リン酸化・脱リン酸化反応は重要な役割を果たすことが示されている。真核生物に広く保存されたプロテインキナーゼTOR (Target of Rapamycin) は、この栄養シグナルによる細胞制御において中心的なシグナル伝達経路を形成しており、タンパク質および脂質の合成をはじめとする代謝制御、

さらに細胞の増殖やアポトーシスといった主要な生命活動に深く関与する。また、TORは細胞内において2種類のタンパク質複合体

(TORC1とTORC2)を形成し、それぞれの構成タンパク質および機能が異なることが知られている。免疫抑制作用が知られる有機化合物ラパマイシンは、特にTORC1に結合してその機能を抑制するが、免疫抑制剤のほか、抗がん剤やステント治療における再狭窄抑制剤として臨床応用されている。

TORは様々な細胞機能制御に関わることから、多くの基質タンパク質のリン酸化を制御すると推測されるが、特に栄養シグナルに関わる

TORC1では、哺乳類においてタンパク合成に関わる4E-BP1とS6Kが知られているが、他の多くの機能ではエフェクター分子の存在が十分に明らかとなっていなかった。一方、栄養シグナルによるTORC1の制御において、哺乳類細胞を用いた知見から低分子量GTP結合タンパク質のRagがリソソーム膜上で複合体を形成して栄養シグナルを仲介すること、増殖因子シグナルからの制御を受けるTSC1-TSC2複合体と低分子量GTP結合タンパク質RhebがTORC1の活性を直接的に制御することが示されているが、栄養シグナルを感知するメカニズムは明らかになっていなかった。

代表者は、モデル生物の一つである分裂酵母を用いて、SpTORC1 (*S. pombe* TORC1) が栄養源である培地中のアンモニウムに依存して活性化され、リボソームタンパク質 S6 のリン酸化を制御することを明らかにした。また、SpTORC1 は哺乳動物と同様に TSC1-TSC2 複合体と Rheb のオーソログによって活性制御を一部受けることも見いだした。さらに、SpTORC1 も、細胞増殖をはじめ主要な細胞機能に関与することが分子遺伝学的解析から明らかとなっており、SpTORC1 シグナリングには基質タンパク質を含む多くの制御分子の関与が予想されるが、知られている関連分子はわずかであった。

2. 研究の目的

アミノ酸をはじめとする栄養素の量的変動により惹起される栄養シグナルは、生物種間を超えて細胞および個体レベルの機能制御に密接に関わるが、その分子メカニズムは十分に明らかになっていない。本研究では、モデル生物である分裂酵母の栄養シグナルによるSpTORC1の活性調節、さらにSpTORC1シグナルによる細胞機能制御のメカニズムをシグナルの上流及び下流の両面において新規構成分子の同定と機能解析により明らかにし、生物種間で保存されたTORC1シグナルのモデルケースの構築を目指すことを目的とした。また、長時間の栄養枯渇が、SpTORC1の再活性化を促す知見が得られたため、合わせて検討を行った。

3. 研究の方法

研究方法の概要は以下のとおりである。

- (1) データベースを利用して、哺乳類TORC1の基質であるS6 kinase 1 (S6K1)の分裂酵母オーソログを探索し、それらの栄養依存的なリン酸化レベルの変化を調べる。特に富栄養条件下で高いリン酸化を示すオーソログについて、リボソームタンパク質S6のリン酸化への作用を試験管内および細胞内で調べる。
- (2) S6K1オーソログの栄養依存的なリン酸化制御について、SpTORC1の関与をTor2の活

性化型変異体および温度感受性変異体、ラパマイシン耐性変異体、さらにTOR複合体構成因子の欠失株を用いて検討する。また、試験管内でリン酸化反応を行い、TORC1が直接作用しうるかを検討する。

- (3) Psk1の構造的に保存されてリン酸化制御が予想されるドメインについてアミノ酸置換による点変異を挿入するなどして、リン酸化の有無およびPsk1機能における影響を検討する。
- (4) 基質のリン酸化を評価することにより、様々な栄養シグナルによるSpTORC1の活性制御について検討を行う。
- (5) 長時間の栄養飢餓におけるSpTORC1の活性変化について、Psk1のリン酸化レベルを調べることにより検討を行う。

4. 研究成果

先行研究によりSpTORC1はTor2をキナーゼサブユニットとして含み、富栄養状態で高い活性を有し、リボソームタンパク質S6のリン酸化を間接的に制御することが明らかとなっている。

(1) 分裂酵母のS6K1オーソログ

ヒトのS6キナーゼであるS6K1のアミノ酸配列をもとに分裂酵母のデータベースよりBLASTプログラムを用いてS6K1オーソログの探索を行い、類似性の高かった上位4分子に着目した。それらはキナーゼドメインを有しており、これまでの研究ではPsk1、Sck1、Sck2およびGad8として報告されていた。Sck1とSck2はcyclic-AMP dependent kinaseであるPKAと、Gad8はSpTORC2との機能的相関性が知られるが、SpTORC1との関係は知られていなかった。さらにこれら分子の栄養依存的なリン酸化を調べたところ、Psk1とSck1およびSck2は、SpTORC1活性の高い富栄養培地で高度なリン酸化が認められ、窒素源枯渇により著しく減少した。一方、Gad8はリン酸化が認められたが、栄養による変動は見られなかった。次にこれら分子の遺伝子欠失株を作製し、リボソームタンパク質S6のSpTORC1依存的なリン酸化制御に関わるキナーゼの同定を試みた。sck1、sck2およびgad8の遺伝子欠失株でのS6のリン酸化は野生型株のものとは大きな違いは見られなかったが、一方、psk1欠失株では富栄養下においてもリン酸化は検出されなかった。さらにS6の恒常的なリン酸化が見られるtsc2欠失株やtor2活性化型株においても、psk1遺伝子欠損ではS6のリン酸化は見られず、Psk1を介したSpTORC1シグナリングによるリン酸化制御が示唆された。また、Psk1は試験管内でS6

をリン酸化し、Psk1が分裂酵母のS6キナーゼであることが示された。

(2) SpTORC1シグナリングによるS6K1オーソログのリン酸化制御

次に、Psk1とSck1およびSck2の栄養依存的なリン酸化について、SpTORC1シグナリングの関与を検討した。TORC1特異的阻害剤であるラパマイシンは、Psk1とSck1およびSck2の少なくとも一部のリン酸化を阻害し、*tor2*ラパマイシン耐性変異株では、阻害効果が抑圧された。*Tor2*の恒常的活性化変異体は窒素源の枯渇後においても活性が維持されるが、Psk1とSck1およびSck2の一部のリン酸化は、*tor2*活性化型変異株において窒素源枯渇後も維持された。また、SpTORC1はこれら分子の組み換えタンパク質を試験管内で有意にリン酸化した。さらに、Psk1は*tor2*温度感受性株において、制限温度によるリン酸化の顕著な低下が認められ、これらの結果から、S6K1オーソログであるPsk1とSck1およびSck2では少なくとも一部のリン酸化が栄養シグナル依存的にSpTORC1を介した制御を受けることが明らかとなった(図1)。

一方、SpTORC1はTor2の他、複数のタンパク質によって構成される。そのうちMip1は、これまでの知見からTORC1機能に必須な分子であることが示唆されているが、他の分子の機能は明らかでなかった。*Tor2*とMip1以外のSpTORC1構成分子である*pop3*、*toc1*および*tco89*遺伝子の欠失株を作製して、Psk1とその基質であるS6のリン酸化レベルを測定し、欠失株でのSpTORC1活性を評価した。まず、これらの欠失株の生育はいずれも野生型株と大きな違いは認められず、*tor2*や*mip1*遺伝子のように必須遺伝子ではなかった。出芽酵母の*Tco89*オーソログはTORC1活性に関与するが、分裂酵母では*tco89*をはじめ、*pop3*および*toc1*欠損株においても、Psk1とS6のリン酸化は検出され、窒素源枯渇への応答も確認され、SpTORC1の少なくともPsk1とS6の制御にはこれらの分子は作用しないことが明らかとなった。しかし、*pop3*欠損株では若干のSpTORC1活性の低下が認められた。

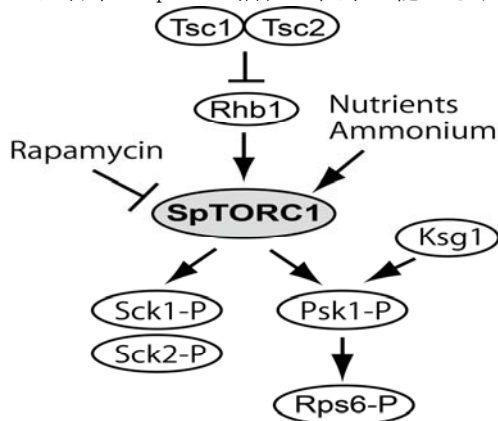


図1 分裂酵母のTORC1シグナリング

(3) Psk1のリン酸化部位と機能の検討

ヒトS6K1ではキナーゼドメイン近傍の活性化ループをはじめ、ターンモチーフおよび疎水性モチーフが異なるキナーゼによるリン酸化を受け、活性化に寄与する。すなわち、活性化ループはPDK1に、ターンモチーフと疎水性モチーフはmTORC1によってリン酸化される。Psk1にもこれらの領域は保存されており、リン酸化制御および活性への作用が予想されたため、各領域のリン酸化が予想されるセリンまたはトレオニンアラニンに置換した非リン酸化型変異体を作製した。それぞれの変異体では、リン酸化の有意な減少が認められ、特にターンモチーフ変異体では顕著であった。また、S6のリン酸化はどの変異体でも著しい減少がみられ、これらの結果より、Psk1はS6K1と同様に保存された領域においてリン酸化され、活性制御を受けることが示唆された。

さらにS6K1の疎水性モチーフのリン酸化を認識できる抗体を用いて、Psk1の疎水性モチーフのリン酸化が、栄養依存的にSpTORC1によって制御されることが明らかとなった。また、SpTORC1は試験管内で精製Psk1のターンモチーフと疎水性モチーフをリン酸化した。

一方、分裂酵母のPDK1オーソログはKsg1として知られるが、*ksg1*温度感受性変異株を用いた解析や試験管内でのキナーゼアッセイから、Ksg1はPsk1の活性化ループのリン酸化と活性に寄与することが明らかとなった。これらの結果から、Psk1とS6K1におけるリン酸化と活性制御のメカニズムは進化的に保存されていることが示唆された(図2)。

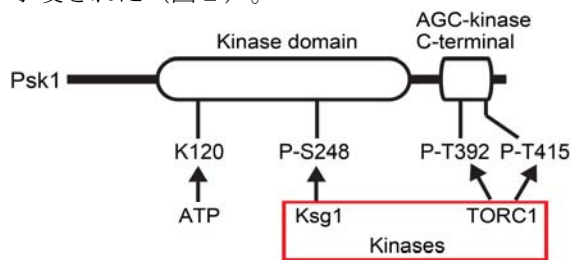


図2 Psk1におけるリン酸化制御

(4) 様々な栄養シグナルによるSpTORC1の活性制御

次に、窒素源であるアンモニウム以外の栄養素について、SpTORC1活性への作用を検討した。はじめにグルコースの枯渇は、SpTORC1活性を著しく低下させた。一方、アミノ酸のグルタミン酸およびプロリンはSpTORC1活性に作用せず、哺乳類ではmTORC1を活性化させることで知られるロイシンも寄与しなかった。一方、グルタミンは培養液への添加によりSpTORC1を活性化させただけでなく、グルタミン合成阻害剤を用

いて細胞内のグルタミンを枯渇させたところ、SpTORC1活性の低下が認められた。細胞に取り込まれるアンモニウム量と生合成されるグルタミン量には密接な相関性がある。そのことから分裂酵母では細胞内のグルタミン濃度が、SpTORC1活性を制御する可能性が示された。

(5) 長時間の栄養枯渇時に見られるSpTORC1の活性上昇

多くの生物種においてTORC1シグナリングは富栄養状態で活性が高く、その枯渇により活性を失うと信じられてきた。しかし分裂酵母において、Psk1のリン酸化は窒素源枯渇後、3時間以降に弱いながらも再上昇が認められ、SpTORC1の再活性化が示された。このことは、哺乳類培養細胞および出芽酵母において最近報告された、栄養枯渇時のTORC1活性の再上昇と一致する。今後は、その活性化メカニズムと栄養枯渇時のTORC1機能の解明が課題となる。

他の生物種と同様に分裂酵母においてもTORC1は、少なくとも3種のプロテインキナーゼを基質とすることが明らかとなった。キナーゼは多くの基質をリン酸化して機能を制御することにより、情報伝達の幅を広げることが可能である。このことは多くの細胞機能を制御するTORC1シグナリングの役割を支持するが、Psk1をはじめ、基質となるキナーゼは細胞の生育には必要ではなく、SpTORC1シグナリングによる細胞制御機構の解明には、新たな基質の探索を含めた更なる研究が必要である。

これまで分裂酵母では細胞内のSpTORC1活性の変動をより直接的に測定することは難しかったが、Psk1とS6のリン酸化を調べることでより簡便化することができた。実際に、これらのリン酸化を測定することで、分裂酵母では哺乳類とは異なり、ロイシンはSpTORC1の活性化には必要ではなく、グルタミンを要求することを見だし、さらに、長時間の栄養枯渇がSpTORC1活性を再上昇させることを示せた。今後は栄養シグナルだけでなく、ストレスなど多くのSpTORC1の制御シグナルが明らかとなることが期待される。

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5件)

- ① Nakashima A*, Kawanishi I*, Eguchi S, Yu EH, Eguchi S, Oshiro N, Yoshino K, Kikkawa U, Yonezawa K. Association of CAD, a multifunctional protein involved in pyrimidine synthesis, with mLST8, a component of the mTOR complexes. *Journal*

of Biomedical Science, 20, 24 (2013), *; Equal contribution. DOI:

10.1186/1423-0127-20-24. 査読有

- ② Nakashima A*, Otsubo Y*, Yamashita A, Sato T, Yamamoto M, and Tamanoi F. Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 as S6 kinase. *Journal of Cell Science*, 125, 5840-5849 (2012), *; Equal contribution. DOI: 10.1242/jcs.111146. 査読有

- ③ Hashimoto T, Juso K, Nakano M, Nagano T, Kambayashi S, Nakashima A, Kikkawa U, and Kamada S. Preferential Fas-mediated apoptotic execution at G(1) phase: the resistance of mitotic cells to the cell death. *Cell Death & Disease*. 3, e313 (2012), DOI: 10.1038/cddis.2012.52. 査読有

- ④ Nagano T, Hashimoto T, Nakashima A, Kikkawa U, and Kamada S. X-linked inhibitor of apoptosis protein mediates neddylation by itself but does not function as a NEDD8-E3 ligase for caspase-7. *FEBS Letters*, 586, 1612-1616 (2012), DOI: 10.1016/j.febslet.2012.04.056. 査読有

- ⑤ 原賢太、中嶋昭雄、吉川潮 アミノ酸センシングシステムとしてのmTOR複合体1の機序 実験医学 Vol. 29, 865-870 (2011), 羊土社 査読無

[学会発表] (計13件)

- ① 中嶋昭雄、吉川潮 分裂酵母TORC1とオートファジーの相互関係 第二回TOR研究会、2013年03月14日、神戸大学
- ② 中嶋昭雄、玉野井冬彦、吉川潮 分裂酵母アレスチン様タンパク質Arn1とそのユビキチン化を介したアミノ酸の細胞内取り込みの制御 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ③ 中嶋昭雄、玉野井冬彦、吉川潮 アミノ酸トランスポーターCat1のアレスチン様タンパク質による機能制御 第45回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2012年09月05日、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ
- ④ Akio Nakashima, Ayaka Momonami, Noriko Oshiro, Ushio Kikkawa Mammalian TIP41-like protein, mTIP41, as a positive regulator of the amino

acid-stimulated mTORC1 signaling. 第34
回日本分子生物学会年会、2011年12月16
日、パシフィコ横浜

- ⑤ 中嶋 昭雄、吉川 潮、玉野井 冬彦 アレス
チン様タンパク質Art1によるアミノ酸トラ
ンスポーターCat1の機能制御 第44回酵
母遺伝学フォーラム研究報告会、2011年9
月5日、九州大学医学部百年講堂

[その他]

ホームページ等

<http://www.biosig.kobe-u.ac.jp/>

[http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-kikk
awa/publication.html](http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-kikkawa/publication.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 昭雄 (NAKASHIMA AKIO)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・

バイオシグナル研究センター

研究者番号：70397818

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし