

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 4 月 18 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770230

研究課題名（和文）TOR シグナル経路のグルコース応答制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of TOR signaling in response to glucose

研究代表者

建部 恒（TATEBE HISASHI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00596819

研究成果の概要（和文）： 酵母からヒトまで進化上保存されている TORC2 (TOR complex 2)-Akt 経路は、多細胞生物であるヒトではインシュリン刺激を通じて細胞外環境のグルコースに反応し、単細胞生物である分裂酵母では細胞外環境のグルコースを直接認識し反応するが、その分子機構は未だ明らかではない。本研究では分裂酵母を用いて TORC2-Gad8（分裂酵母 Akt 相同タンパク質）経路がグルコースに応答する分子機構の解明を試み、TORC2 活性化因子 Ryh1 の活性がグルコースに応答していることを見出した。

研究成果の概要（英文）： The TORC2 – Akt pathway is evolutionarily conserved from yeast to human. Whereas the human TORC2 pathway responds to glucose via insulin stimuli, the TORC2 pathway in a unicellular organism fission yeast directly recognizes glucose in the extracellular environment, although precise molecular mechanism how the TORC2 pathway is activated upon insulin stimuli or glucose in those organisms has remained elusive. In this study, we utilized fission yeast as a model organism and revealed that activity of Ryh1, a known activator of TORC2, is regulated in response to glucose.

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 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：分裂酵母 TORC2 Akt Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

【分裂酵母 Ryh1 は TORC2 (Tor complex 2) を活性化する】

Tor (target of rapamycin) は酵母からヒトまで広く保存されているセリンスレオニンキナーゼである。Tor が形成する複合体の一つ Tor complex 2（以下 TORC2 と表記）はヒトでは Akt（PKB とも呼ばれる。以下 Akt で統一）の、分裂酵母では Gad8（分裂

酵母 Akt 相同タンパク質）の、カルボキシル末端に存在する疎水性領域をリン酸化することで Akt および Gad8 を活性化する。ヒトでは TORC2 はインシュリンや成長因子により活性化され Akt をリン酸化により活性化し、活性化された Akt はさらに下流の因子をリン酸化することでインシュリン刺激への応答に重要な役割を果たす。ヒト TORC2 のインシュリン刺激による活性化の分子機構は研究開始当初には不明な点が多

く残されていた。

本研究開始以前に申請者等は分裂酵母をモデル生物として用いて、RAB 低分子量Gタンパク質の1つ Ryh1 が TORC2 の活性化因子であることを見出していた[Tatebe *et al.*, 2010]。Ryh1 低分子量Gタンパク質は結合するグアニンヌクレオチドの種類によりスイッチ様の挙動を示し、GTP (グアノシン3リン酸) と結合した Ryh1 は活性型、GDP (グアノシン2リン酸) と結合した Ryh1 は不活性型である。ryh1 機能欠損変異株では Gad8 疎水性領域のリン酸化レベルおよび活性が野生型と比較し有意に低下していた。また、GTP 結合型 Ryh1 は TORC2 を高度に活性化し、GDP 結合型 Ryh1 の大量発現は TORC2 の活性を阻害した。さらに、Ryh1 は GTP に依存的な TORC2 への結合能増加を示し、GTP 依存的な結合を阻害する変異を導入した Ryh1 は TORC2 活性化能を完全に失った。

研究開始当初までに Ryh1 は全生物種を通じて報告されている唯一の TORC2 活性化因子であった。Ryh1 の活性が生理的条件下で変動するかどうかはこれまでに調べられていなかった。

【TORC2 - Gad8 経路は培地中のグルコースに応答する】

研究開始以前に申請者等は、対数増殖期に培地からグルコースを除去すると Gad8 が速やかに脱リン酸化、不活性化されることを見出した。さらに、その後グルコースを再添加すると Gad8 は速やかにリン酸化、活性化された。これらの結果は分裂酵母 TORC2 - Gad8 経路が培地中のグルコースに速やかに応答することを示している。

【解糖系酵素が TORC2 と物理的相互作用を示す】

解糖は生体内においてグルコースをピルビン酸に変換すると同時に ATP を生産する一連の代謝反応であり、十種類の酵素が反応に関与する。本研究開始以前に申請者等は TORC2 の各構成因子と相互作用を示す分裂酵母タンパク質の探索を酵母 2-hybrid 法により行い、TORC2 の複数のサブユニットが解糖系の酵素と相互作用することを見出した。

【分裂酵母 Cyr1 は Akt を脱リン酸化するヒト PHLPP に類似した PP2C 様タンパク質である】

ヒトでは 2C 型セリンスレオニンフォスファターゼ (以下 PP2C と表記) の一つ PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) が Akt を脱リン酸化制御する。ヒト PHLPP の PP2C 活性はイ

ンシュリン刺激により低下することが報告されている。ショウジョウバエ PHLPP は PH ドメインを欠くがやはり Akt のリン酸化を抑制している。分裂酵母アデニル酸シクラーゼ Cyr1 は複数の leucine-rich repeat と PP2C ドメインを持ち PHLPP とドメイン構成の類似性が高い。又、分裂酵母他の PP2C は leucine-rich repeat を一切持たない。グルコース存在下では3量体Gタンパク質αサブユニットがβγサブユニットと乖離、活性化し Cyr1 に結合して cAMP 合成を誘導する。グルコース飢餓時には Cyr1 のアデニル酸シクラーゼ活性が低下すると同時に PP2C 活性が上昇し Gad8 を脱リン酸化する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

酵母からヒトまで真核生物全般に渡って進化上保存されている TORC2 (TOR complex 2) - Akt 経路は、多細胞生物であるヒトではインシュリン刺激を通じて細胞外環境のグルコースに反応し、単細胞生物である分裂酵母では細胞外環境のグルコースを直接認識し反応する。しかしながらインシュリンホルモンやグルコースが TORC2 - Akt 経路をどのように活性化するかその分子機構は未だ明らかではない。本研究では分裂酵母を用いて、TORC2 - Gad8 (分裂酵母 Akt 相同タンパク質) 経路が細胞外環境のグルコースに応答する分子機構として次の可能性を検討することを試みた。

(1) Ryh1 活性がグルコースに応答する

(2) 解糖系酵素との物理的相互作用を通じて TORC2 活性がグルコースに応答する

(3) Cyr1 がグルコース飢餓に反応して Gad8 を脱リン酸化する

3. 研究の方法

【グルコースによる Ryh1 活性の制御】

Ryh1 活性の変動が生じない ryh1 遺伝子破壊株および恒常的活性型 ryh1 変異株において、培地からのグルコース除去および再添加による Gad8 リン酸化の変動を検討する。これらの変異株でグルコース除去、再添加時に Gad8 のリン酸化が一定のままであれば、Ryh1 活性がグルコースに反応して変動することで TORC2 活性が制御されることが示唆される。逆にこれらの変異株が野生株と同様の Gad8 リン酸化レベルの変動を示す場合は Ryh1 非依存的なグルコース応答が示唆される。野生株程では無いが Gad8 のリン酸化に変動が見られた場合は Ryh1 依存的な制御と非依存的な制御が協調して

働いていることが示唆される。

低分子量Gタンパク質は、GTP（グアノシン3リン酸）と結合した活性型のみがエフェクタータンパク質に結合する。細胞抽出液からエフェクタータンパク質と結合する低分子量Gタンパク質を回収し、イムノブロットにより回収量を定量することで細胞内に存在する活性型の低分子量Gタンパク質量を検討可能である。Ryh1 依存的なグルコース応答機構が示唆された場合は、この手法を用いて Ryh1 活性がグルコース除去時に低下、再添加後に上昇することを確認する。Ryh1 のエフェクタータンパク質として申請者は分裂酵母 Sec21 を既に同定しており（未発表結果）、上述の実験では Sec21 タンパク質中の Ryh1 結合ドメインを使用する予定である。

【Ryh1 GEF および GAP 活性のグルコースによる制御】

Ryh1 の活性化には GEF（グアニンヌクレオチド交換因子）が、不活性化には GAP（GTPase 活性化タンパク質）が必要である。Ryh1 活性のグルコース応答は、Ryh1 GEF 又は Ryh1 GAP 活性のグルコース応答による可能性が考えられる。そこで、Ryh1 GEF である Sat1/4 タンパク質複合体をグルコース除去前、除去後、再添加後の細胞から免疫沈降法により精製して *in vitro* GEF アッセイを行い Ryh1 GEF 活性のグルコース応答を検討する。Ryh1 GAP は現在不明であるため同定を試みる。分裂酵母には全部で 12 個の RAB GAP が存在する。出芽酵母では Ypt6（Ryh1 出芽酵母ホモログ）GAP として Gyp6 が同定されているが、分裂酵母の 12 個の RAB GAP のうち出芽酵母 Gyp6 に対して明らかな相同性を示すものはない。従って、各々の RAB GAP 遺伝子破壊株で活性型 Ryh1 の定量を上述の方法で行い増量を示す株を探索する。又、個々の RAB GAP タンパク質の Ryh1 に対する GAP 活性を *in vitro* で検討する。同定後、グルコース除去前、除去後、再添加後の細胞から Ryh1 GAP を精製し *in vitro* GAP アッセイにより Ryh1 GAP 活性のグルコース応答を検討する。

分裂酵母から Sat1/4 複合体を精製する手法および *in vitro* での GEF、GAP アッセイの基質に用いる組み替え Ryh1 タンパク質を大腸菌で発現精製する実験系（未発表結果）は既に確立している。分裂酵母の RAB GAP 遺伝子破壊株は全て販売されており購入が可能である。

Ryh1 GEF 又は GAP 活性がグルコース除去時に変動していた場合、リン酸化を始めとする翻訳後修飾により活性が制御される可能性が考えられる。実際 Sat4 は高度な翻訳後修飾を受けている。グルコースに応答して

Sat1/4 や Ryh1 GAP が翻訳後修飾に変化を示すようであれば、翻訳後修飾を質量分析により特定し各々の修飾の活性への影響を検討することでグルコースによる Ryh1 活性の制御機構をさらに明らかにすることを試みる。

【解糖系の酵素による TORC2 活性の制御】

申請者等が見出した TORC2 構成因子と解糖系酵素との相互作用を免疫沈降法で確認すると共にグルコース除去や再添加により相互作用が変動を示すかどうか検討する。グルコース応答性の相互作用を示す TORC2 構成因子と解糖系酵素の組み合わせは TORC2 活性のグルコース応答に関与している可能性が高いと考えそれらを優先的に解析する。

TORC2 と解糖系酵素との相互作用の TORC2 活性制御への関与を遺伝学的に解析するためには相互作用を特異的に阻害する変異が必要になる。変異は相互作用のみを特異的に阻害し TORC2 や解糖系の酵素活性には影響を与えないことが求められるため、非触媒サブユニット上のアミノ酸置換変異であることが望ましい。Sin1、Bit61 はいずれも TORC2 の非触媒サブユニットであるためこれらを対象に相互作用を特異的に阻害する変異の探索を行う。Wat1/Pop3 は TORC2 以外にも複数のタンパク質複合体に含まれ、解糖系酵素との相互作用のみを特異的に阻害する変異の取得には困難が予想されるため探索に含めない。変異を取得するために *sin1*、*bit61* ORF に PCR を用いて無作為に変異を導入し、酵母 2-hybrid 法で相互作用を失う変異を探索する[4]。申請者はこの方法で他のタンパク質間相互作用についての欠損変異の同定に成功した経験が既にある（未発表結果）。取得したアミノ酸置換変異を分裂酵母ゲノム上の *sin1*、*bit61* 遺伝子に導入し、Sin1、Bit61 の細胞内タンパク質量および Sin1、Bit61 の TORC2 への取り込みに影響が無いことを確認する。確認済みの変異について、TORC2 と解糖系酵素との相互作用および TORC2 - Gad8 経路のグルコース応答を検討する。

解糖系酵素との相互作用により TORC2 活性が制御されていることが遺伝学的に示された場合、*in vitro* TORC2 キナーゼアッセイ系を構築して解糖系酵素が TORC2 活性に与える影響を生化学的に検討すると共にその制御機構のさらなる解明を目指す。

【Cyr1 による Gad8 脱リン酸化制御】

本研究計画ではヒト Akt 脱リン酸化酵素 PHLPP とドメイン構成の高い類似性を示す分裂酵母アデニル酸シクラーゼ Cyr1 が Gad8 を脱リン酸化する可能性を検討する。

Cyr1 が Gad8 を脱リン酸化しているという結果が得られなかった場合は分裂酵母の他の6個の PP2C が Gad8 を脱リン酸化するかどうかを検討する。

Cyr1 はアデニル酸シクラーゼとしての機能を有するため、単純な遺伝子破壊株や全長タンパク質の大量発現は cAMP 濃度の変化を通じて様々な影響を及ぼすことが予想される。そこで、Cyr1 PP2C ドメインのみを分裂酵母で大量発現し Gad8 のリン酸化への影響を調べる。又、Cyr1 PP2C ドメインを大腸菌で発現精製し、分裂酵母から調製したリン酸化 Gad8 を *in vitro* で脱リン酸化するかどうかを検討する。Cyr1 PP2C ドメインが Gad8 脱リン酸化活性を示した場合、PP2C の活性中心にアミノ酸置換変異を導入し脱リン酸化活性を失うことを確認する。さらに、同様の置換変異を分裂酵母ゲノム上の *cyr1* 遺伝子に導入し Gad8 リン酸化への影響を調べる。

Cyr1 PP2C ドメインが Gad8 を脱リン酸化した場合、Cyr1 全長タンパク質をグルコース除去前、除去後、再添加後の細胞から精製して *in vitro* Gad8 脱リン酸化アッセイを行い Cyr1 PP2C 活性のグルコース応答を検討する。又、Cyr1 のアデニル酸シクラーゼ活性は3量体Gタンパク質 α サブユニット Gpa2 との結合を通じてグルコース応答性を示すことから、Cyr1 の PP2C 活性も同様に Gpa2 の結合により制御されている可能性がある。そこで、Cyr1 全長タンパク質を用いた *in vitro* Gad8 脱リン酸化アッセイに GDP および GTP 結合型 Gpa2 を加えてその影響を調べる。

4. 研究成果

研究開始当初からグルコース依存的な TORC2-Gad8 経路活性化機構として、

1) TORC2 活性化因子 Ryh1 の活性化がグルコースに応答する

2) グルコース応答に関与する Cyr1 の PP2C 様ドメインが Gad8 を脱リン酸化する

という2つの仮説を始めに検討した。その結果 Ryh1 活性が培地中のグルコースを除去することで低下することを見出した。一方 Cyr1 の PP2C 様ドメインは Gad8 を脱リン酸化しなかった。以上の結果から分裂酵母では Ryh1 がグルコース依存的に TORC2 活性を制御していることが明らかになった。以上の結果から当初の目標の一つであったグルコースに応答し TORC2-Gad8 経路を直接制御する因子の絞り込みに成功した。

これらの結果を踏まえ当初の計画通り、次のステップとして Ryh1 活性を直接制御する因子の同定に移った。Ryh1 不活性化因子の探索を目的として分裂酵母の11個の Rab GAP を解析し、そのうちの3つが Ryh1 を直接不

活性化している可能性を示唆する結果を得た。また、出芽酵母では Ypt6 (Ryh1 出芽酵母ホモログ) GAP として Gyp6 が同定されているが、分裂酵母の12個の RAB GAP のうち出芽酵母 Gyp6 に対して blast プログラムで明らかな相同性を示すものはなかったが、分裂酵母および出芽酵母の全 Rab GAP を対象とした HMMer、ssearch、clustal omega、Tcoffee プログラム等による解析から、3つの候補の中に出芽酵母 Gyp6 の相同タンパク質が含まれていることを明らかにした。

また、Ryh1 活性化因子 Sat1/4 複合体および同定済みの不活性化因子の活性がグルコースに応答するかどうかの検討を行う目的で、リン酸化等による翻訳後修飾による SDS-PAGE 電気泳動での泳動度の変化を検討した。

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)

Komeda, C., Ikeda, A., Kikuchi, J., Ishida-Kitagawa, N., Tatebe, H., Shiozaki, K., and Akiyama, M. (2013). A photo-triggerable drug carrier based on cleavage of PEG lipids by photosensitizer-generated reactive singlet oxygen. *Org Biomol Chem* 11, 2567-570. PMID: 23307046; DOI: 10.1039/c2ob27199k. 査読有

Morigasaki, S., Ikner, A., Tatebe, H., and Shiozaki, K. (2013). Response regulator-mediated MAPKKK heteromer promotes stress signaling to the Spc1 MAPK in fission yeast. *Mol Biol Cell* 24, 1083-092. PMID: 23389634; DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0727. 査読有

[学会発表] (計1件)

“Recognition of AGC kinase by TOR complex 2” 第34回日本分子生物学会年会ワークショップ (4W8-I TOR) 招待講演 パシフィコ横浜 2011年12月16日

[図書] (計1件)

Tatebe, H., and Shiozaki, K. (2012). PP2C. In *Encyclopedia of Signaling Molecules*, S. Choi, eds. (New York: Springer). DOI: 10.1007/978-1-4419-0461-4_249.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

建部 恒 (TATEBE HISASHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：23770230