

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870019

研究課題名（和文）Rab G タンパク質による TOR キナーゼ複合体 TORC2 の制御

研究課題名（英文）Regulation of TOR complex 2 by Rab-family G proteins

研究代表者

塩崎 一裕 (SHIOZAKI KAZUHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00610015

研究成果の概要（和文）：タンパク質リン酸化酵素複合体 TOR complex 2 (TORC2)はガン遺伝子産物 Akt の活性化因子として、哺乳類の初期発生やガンなどの細胞増殖、またインスリンが筋肉・脂肪細胞を刺激してグルコースの取り込みを誘導する過程において重要な役割を担う。TORC2 が保存されている分裂酵母をモデルとして解析を行い、低分子量 GTP 結合蛋白質が TORC2 の活性化に関わる結果を得たのに加え、遺伝学的スクリーニングによって、TORC2 の新奇活性化因子の候補を同定した。

研究成果の概要（英文）：TOR protein kinase forms two different complexes, one of which is TOR complex 2 (TORC2) that phosphorylates and activates the oncogene product Akt. Akt is known to play key roles in cell proliferation of mammalian early development as well as that of cancerous cells. In addition, the TORC2-Akt pathway mediates insulin signaling to induce glucose uptake in muscle and fat cells. Because TORC2 is highly conserved between human and the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, this study utilized fission yeast as a model system to examine the regulatory mechanisms of TORC2 activity. Our results strongly suggest that small GTPases are involved in activation of TORC2. In addition, candidates of novel TORC2 activators have been identified through genetic screens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：TOR、TORC2、Rab タンパク質、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

TOR (Target Of Rapamycin)は酵母からヒトまで広く保存されているタンパク質リン酸化酵素で、複数の制御サブユニットと共に TOR complex 1 (TORC1)、TOR complex 2 (TORC2)と呼ばれる 2 種類のタンパク質複

合体を形成する。この内、TORC2 はインスリンや成長因子刺激によって Akt (Protein Kinase B/PKB と呼ばれる)をリン酸化・活性化する。タンパク質リン酸化酵素 Akt はガン遺伝子産物として同定され、その活性化は細胞死(アポトーシス)を抑制、細胞増殖を促

進する。また、Akt はインスリンシグナル経路の下流に位置し、その活性化はインスリン刺激に応答した細胞のグルコース取り込みに必須である。従ってガンと糖尿病の両方に関わる Akt 活性化の分子機構は長年研究されてきたが、活性化に重要な Akt の 2 カ所のリン酸化の内、カルボキシ末端の疎水性領域をリン酸化する酵素として TORC2 が同定されたのは 2005 年になってからである。

免疫抑制剤 Rapamycin で阻害される TORC1 の制御機構と細胞機能の理解は比較的急速に進み、その活性化因子として Rheb と呼ばれる G タンパク質とそれを制御する TSC 複合体が同定された。一方、特異的な阻害剤のない TORC2 については研究の進展は遅く、上流で TORC2 を制御する因子の手がかりはほとんど皆無であった。

申請者は分裂酵母において、高等生物 TORC2 に酷似したタンパク質複合体が、Gad8 と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素をその疎水性領域(Ser-546)のリン酸化によって活性化することを示し、ヒト TORC2-Akt 経路と相同な TORC2-Gad8 経路を同定した。この結果、分裂酵母 TORC2 が高等生物 TORC2 の制御メカニズムを解明するための優れたモデル系となることが明らかになった。

2. 研究の目的

TORC2 上流の活性化因子の発見を目指して、申請者は分裂酵母 TORC2-Gad8 シグナル経路に欠損を示す変異体の探索に着手し、その結果 TORC2 の活性化に重要である 3 つの遺伝子を同定した。一つは Ryh1 と呼ばれるヒト Rab6 に相同な G タンパク質で、その GTP 結合型が TORC2-Gad8 シグナル経路を活性化する。残り 2 つの遺伝子でコードされる Sat1 と Sat4 はタンパク質複合体を形成し、Ryh1 の活性化因子(GEF, Guanine nucleotide Exchange Factor)として働く。TORC2 の上流につながる制御経路が同定されたのは全ての生物種を通して初めてであり、Rheb で活性化される TORC1 と同様に TORC2 も低分子量 G タンパク質で活性化されるという発見はきわめて興味深い。

(目標 1) G タンパク質 Ryh1 による TORC2 制御のメカニズムを調べる。

Ryh1 タンパク質は TORC2 と共沈するので、Ryh1 は TORC2 に結合してこれを活性化すると考えられる。TORC2 サブユニット Bit61 の遺伝子破壊株は Ryh1 破壊株とよく似た TORC2 経路の欠損を示すので、Ryh1 が Bit61 を介して TORC2 を活性化するという作業仮説を検証する。

(目標 2) 未発見の TORC2 活性化因子を同定す

る。

Ryh1 遺伝子破壊株では TORC2 の弱い活性が検出されるので、Ryh1 以外にも TORC2 活性化因子が存在する可能性がある。Ryh1 以外の Rab ファミリーの G タンパク質が TORC2 を制御する可能性を検討するのに加え、分裂酵母遺伝子破壊株ライブラリーのスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

(目標 1) G タンパク質 Ryh1 による TORC2 制御のメカニズムを解明する。

第一に、Ryh1 が TORC2 サブユニット Bit61 を介して働くという仮説を検証する。分裂酵母 Bit61 は哺乳類細胞の Protor (PRR5 と呼ばれる) と相同な、進化上保存された TORC2 サブユニットであるが、その分子機能は未だ不明である。我々の最近の研究から以下のような結果が得られた：□ *bit61* 遺伝子破壊 (*Δbit61*) 株では *ryh1* 遺伝子破壊 (*Δryh1*) 株と同程度の TORC2 シグナルの減衰が見られる；□ *Δbit61 Δryh1* 二重変異株でもそれぞれの単変異株と同程度の TORC2 シグナルの減衰しか起きない (epistatic)；□ 恒常的に GTP 結合型の Ryh1 (Ryh1Q70L) を発現させると野生型株では TORC2 経路が活性化するが、*Δbit61* 株では活性化が起きない。これらの結果は Ryh1 G タンパク質が Bit61 を通して TORC2 を制御している可能性を示唆している。

分裂酵母細胞破砕液を使った共沈実験によると、Ryh1、特に GTP 結合型の Ryh1Q70L と TORC2 は物理的相互作用を示す。同様の共沈実験を *Δbit61* 株破砕液で行い、Bit61 が Ryh1 と TORC2 の結合に重要であるかを検討する。また、Bit61 は TORC2 の Ste20 サブユニット (哺乳類細胞の Rictor に相当) に結合しているので、Ryh1 と Bit61 の共沈実験を *Δste20* 株破砕液でも行うことによって、TORC2 に結合していない Bit61 が Ryh1 と結合できるかどうかを調べる。GTP 結合型、GDP 結合型の Ryh1 を大腸菌で発現・精製した組み換えタンパク質の調製に成功しており、それらと Bit61 との試験管内での相互作用もさらに詳細に検討する。

第二に、GTP 結合型 Ryh1 と相互作用するタンパク質として我々が最近単離した Sec21 が TORC2 制御に関わっている可能性を調べる。Bit61 が Ryh1 G タンパク質の直接のエフェクター分子でない可能性も想定し、酵母 two-hybrid 法によって恒常的 GTP 結合型の Ryh1Q70L と相互作用するタンパク質の探索を行ったところ、分裂酵母 Sec21 が単離された。Sec21 はゴルジ表面での小胞形成に関わる coatomer 複合体のサブユニットに相同性のあるタンパク質で、Ryh1 が GTP 結合型の時のみ結合することから、Ryh1 G タンパク質の典型的なエフェクター分子であると考え

られる。しかしながら、Sec21あるいはその相同分子がRyh1/Rab6のエフェクターとして同定されたのはこれが初めてである。Ryh1がSec21を通してTORC2を制御する可能性を検討するため、分裂酵母の*sec21*変異株を作成してTORC2-Gad8シグナル伝達に影響が出るかを調べる。*sec21*遺伝子破壊は致死であるため、PCRによるランダムな突然変異誘発とそのゲノムへの組み込みで温度感受性の*sec21*変異(*sec21ts*)株を単離し、それらの株でGad8(Ser-546)のTORC2依存的リン酸化レベルを測る。また、Sec21タンパク質にエピトープタグを付けて分裂酵母で発現させ、TORC2との物理的相互作用を共沈実験によって検討する。

(目標2) 未発見のTORC2活性化因子を同定するため、まず第一に、Ryh1以外のRabファミリーGタンパク質がTORC2制御に関わるかどうかを調べる。分裂酵母に存在するRyh1以外の7つのRabファミリーGタンパク質(Ypt1, 2, 3, 4, 5, 7, 71)の内、Ypt3はRyh1の細胞内局在を制御するので、その変異は間接的にTORC2シグナル伝達に影響を与えることが分かっている。残るYpt1, 2, 4, 5, 7, 71がRyh1のようにTORC2経路の活性化因子として働く可能性を検討するために、それぞれの恒常的GTP結合型を発現する変異遺伝子を分裂酵母に導入し、TORC2によるGad8(Ser-546)のリン酸化が増加するかどうかを測定する。同時に、それら活性型Yptの発現が*dryh1*変異株の表現型を相補するかを検討する。また、Ryh1のようにTORC2と物理的相互作用があるかどうかを調べるために、エピトープ・タグの付いたYptタンパク質を分裂酵母で発現し、TORC2との共沈を試みる。その方法は既に確立されたRyh1の場合と同様に行う。

第二のアプローチとして、分裂酵母遺伝子破壊株セットを使ったゲノムワイドスクリーニングにより新たなTORC2活性化因子の同定を目指す。我々が行った第一次のTORC2制御因子スクリーニングでは、Bioneer社の分裂酵母 Haploid Deletion Mutant Set Version-1 (約2,800株)をスクリーンし、Ryh1とSat1を同定した。その後、1,095株の一倍体遺伝子破壊株がBioneer社によって新たに作成され (Version-2+Version-3)、生育に必須でない、つまり一倍体で破壊可能な遺伝子のほぼ全てがカバーされた。この1,095株について第一次スクリーニングと同様の方法でTORC2活性化因子の探索を行う。すなわち、まずTORC2やGad8欠損株と同様の表現型(ストレス超感受性、不稔性)を示す変異株を選び出し、それらの細胞破碎液でGad8(Ser-546)のTORC2依存的リン酸化レベルを測る。TORC2活性化因子の遺伝子が破壊

されていれば、*dryh1*株のようにGad8のリン酸化が減少していると予想される。

この方法では分裂酵母の生育に必須の遺伝子は網羅されないが、TORC2-Gad8経路と同様にその活性化因子は生育に必須でない可能性が高く、その場合Ryh1やSat1のように一倍体遺伝子破壊株の網羅的スクリーニングで単離できる。同定された遺伝子のさらなる解析方法はコードされるタンパク質の種類によって大きく違ってくるが、まず、Sat1・Sat4-Ryh1経路との関係をエピスタシス解析等の遺伝学的実験で明らかにする。また、それら遺伝子産物によるTORC2制御のメカニズムを理解するため、Ryh1について行ったような解析を行う (TORC2との物理相互作用、TORC2の細胞内局在の制御、TORC2とGad8キナーゼとの物理相互作用の制御など)。また、ヒトの相同遺伝子を検索し、それらがTORC2制御に関わる可能性を検討する。

4. 研究成果

本研究課題の目標1では、Gタンパク質であるRyh1がTOR complex 2 (TORC2)を活性化する分子機構の解明を試みた。予備実験からTORC2サブユニットの一つであるBit61とRyh1の新規エフェクター分子であるSec21の関与が示唆されていた。Bit61の遺伝子を破壊した分裂酵母株でRyh1とTORC2との結合を検討したところ、Ryh1はBit61に非依存的にTORC2に含まれるTor1キナーゼと相互作用できることが明らかになった。また、GTP結合型のRyh1の組み替えタンパク質と分裂酵母破碎液中のBit61の間には強い結合が検出されなかった。これらの結果から、Bit61はRyh1のいわゆるエフェクター分子とは異なるが、Ryh1はBit61を含む複数のTORC2サブユニットと相互作用している可能性が考えられた。一方、Sec21がTORC2制御に関わっている可能性を検討するために、*sec21*の温度感受性変異株の作成に取り組んだ。PCRによるランダムな突然変異誘発とゲノムへの組み込みによって、4つの変異株が単離でき、その内の二つ (*sec21-3*、*sec21-4*)は36°Cではっきりした生育阻害を示した。*sec21-3*および*sec21-4*変異株でTORC2依存的なGad8キナーゼのリン酸化を測定したところ、顕著な低下は見られず、Ryh1がSec21と独立にTORC2を活性化していることが示された。

目標2では、Ryh1以外のRabファミリータンパク質がTORC2の活性化に働く可能性を検討した。Rabファミリーに属するYpt1、Ypt2、Ypt4、Ypt5、Ypt7、Ypt71について、恒常的にGTPを結合した活性型変異を導入し、分裂酵母での発現したところ、活性型Ypt4によってTORC2依存的なGad8のリン酸化の上昇が見られた。また、発現したYpt4を分裂酵母からアフィニティー精製したところ、Tor1

キナーゼの共沈が観察され、Ypt4 と TORC2 が物理的に相互作用することが示唆された。*ypt4* 遺伝子破壊株を作成して、TORC2 依存的な Gad8 キナーゼのリン酸化を測定したところ、野生株と顕著な差は見られなかった。しかしながら、*ryh1* と *ypt4* の二重遺伝子破壊株を作成したところ、Gad8 のリン酸化が *ryh1* 一重変異株よりもさらに低下しており、Ypt4 が Ryh1 と共に TORC2 の活性化に貢献していることが明らかになった。加えて、分裂酵母遺伝子破壊株ライブラリー(Bioneer社)の新規スクリーニングにより、TORC2 欠損株と同様のストレス超感受性・不稔性を示す株を複数同定することができ、TORC2 活性化に関わる遺伝子候補と考えられる。これらの株で TORC2 依存的な Gad8 のリン酸化の減少が確認できれば、TORC2 活性化におけるそれら遺伝子の役割が確認できる。

TORC2 は Akt キナーゼの主要な活性化因子として、インスリンが筋肉・脂肪細胞を刺激してグルコースの取り込みを誘導する過程、あるいは哺乳類の初期発生やガンなどの細胞増殖において重要な役割を担うと考えられるが、TORC2 の制御メカニズムはこれまでほとんど知られておらず、“it will be a major breakthrough to identify upstream regulators of the TORC2 signaling branch” と言われていた。本研究が明らかにしつつある Rab G タンパク質による TORC2 制御のメカニズムと TORC2 上流で機能する新たな因子の同定は、直ちにヒト TORC2 制御機構解明につながる有力な知見になると予想され、糖尿病やガン等の研究を加速させるという点で医学の分野での貢献も期待できる。

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 3 件)

①森ヶ崎進、Aminah Ikner, 建部恒、塩崎一裕、Response regulator-mediated MAPKKK heteromer promotes stress signaling to the Spc1 MAPK in fission yeast、Molecular Biology of the Cell、査読有、vol.23、2013、1083-1092
DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0727

②米田知可子、池田篤志、菊池純一、北川教弘、建部恒、塩崎一裕、秋山元英、A photo-triggerable drug carrier based on cleavage of PEG lipids by photosensitizer-generated reactive singlet oxygen、Organic & Biomolecular Chemistry、査読有、vol.11、2013、2567-2570
DOI: 10.1039/c2ob27199k

③森ヶ崎進、塩崎一裕、Phosphorelay-dependent and -independent regulation of MAPKKK by the Mcs4 response regulator in fission yeast、Communicative & Integrative Biology、査読有、vol.6、e25020
<http://www.landesbioscience.com/journals/cib/article/25020/>

[学会発表] (計 7 件)

①塩崎一裕、TOR キナーゼの基質特異性を決定する分子メカニズム、日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡国際会議場(福岡県)

②塩崎一裕、細胞増殖とインスリンシグナル伝達伝達を担う TOR キナーゼ複合体 TORC2 の機能構築、第 29 回染色体ワークショップ、2012年1月26日、ホテルニュー水戸屋(宮城県)

③塩崎一裕、Fission yeast as a model system to study TOR complex 2 signaling、7th International Workshop on Cell Regulation in Division and Arrest、2011年10月25日、沖縄科学技術大学院大学(沖縄県)

④塩崎一裕、Fission yeast as a model system to study TOR complex 2 signaling、日本生化学会第 84 回大会、2011年9月23日、国立京都国際会館(京都府)

⑤塩崎一裕、分裂酵母の環境ストレス耐性に必須な TOR キナーゼ複合体 (TORC2) の制御機構、日本遺伝学会第 83 回大会、2011年9月20日、京都大学農学部(京都府)

⑥塩崎一裕、Sin1 - an essential TOR complex 2 (TORC2) subunit conserved from yeast to man、Pombe 2011、2011年6月28日、Harvard Medical School (米国 Boston)

⑦塩崎一裕、Sin1 - an essential TOR complex 2 (TORC2) subunit conserved from yeast to man、6th UK-Japan Cell Cycle Workshop、2011年4月12日、Low Wood Hotel (英国 Windermere)

[図書] (計 1 件)

①建部恒、塩崎一裕、Springer Science 社、PP2C、2012、1450-1453。
DOI: 10.1007/978-1-4419-0461-4_249

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/shiozaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩崎 一裕 (SHIOZAKI KAZUHIRO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授

研究者番号：00610015

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし