

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440053

研究課題名(和文)モデル生物を用いた減数分裂期におけるTORC1の活性化と生理機能の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of TORC1 activity and function in meiosis using a model organism.

研究代表者

中嶋 昭雄(Nakashima, Akio)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：70397818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：TORC1 (Target of rapamycin complex 1) キナーゼは栄養シグナルを感知して細胞の成長や増殖を制御する。本研究ではモデル生物の分裂酵母 (*S. pombe*) を用いて、窒素源飢餓で起こる減数分裂期におけるTORC1の活性制御機構およびその機能の検討を行った。減数分裂特異的にTORC1の活性化が起こることを明らかにし、それに関わる2つの分子を同定した。またTORC1が遺伝子発現調節を介して適切な減数分裂進行に関わることを明らかにした。本成果は減数分裂期におけるTORC1機能制御の新しい分子モデルとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Target of rapamycin complex 1 (TORC1) protein kinase plays a critical role of several cellular controls in response to environmental inputs, including nutrients. In this study, we examined the mechanism of TORC1 regulation and its functions during meiosis even under nitrogen starvation using a model organism, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We showed that TORC1 activity is substantially increased when cells enter meiotic phase under nitrogen starvation and two molecules involving meiotic progression are important for the TORC1 regulation in meiosis. TORC1 was required for meiotic progression through the regulation of gene transcription. The findings obtained in this study propose a novel molecular model of the regulation and function of TORC1 in meiosis in a wide range of eukaryotic organisms.

研究分野：細胞内シグナル伝達, 分子遺伝学

キーワード：TORC1 減数分裂 シグナル伝達 モデル生物 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

TOR (Target Of Rapamycin) は真核生物に高度に保存されたプロテインキナーゼであり、機能の異なる2つのタンパク質複合体 TORC1 (TOR complex 1) と TORC2 の触媒サブユニットとして主要な細胞機能を調節し、細胞の成長や増殖を制御する。特に TORC1 は生育環境中の栄養が豊富な状態で高い活性を有して同化作用を促進するが、オートファジーなどの異化作用を抑制する。栄養飢餓状態では、TORC1 の活性低下によりタンパク合成は抑制され、オートファジーが亢進されることで細胞内のホメオスタシス制御に寄与することが知られている。一方、TORC1 の制御異常はガンや2型糖尿病、神経変性疾患を引き起こす。TORC1 の活性化機構の理解はこれまで進んでいなかったが、培養細胞を用いた研究を中心に徐々に明らかになりつつあり、リソソーム膜上に存在する Small GTPase, Rag を中心とした分子マシンが、栄養シグナルを TORC1 に伝達するモデルが提唱されている。

これまで貧栄養下では TORC1 の不活性化が続くと考えられてきたが、長期間の栄養飢餓では TORC1 が再活性化されることが近年報告されはじめています。これらの知見から、飢餓環境にも関わらず TORC1 が生理機能を有する可能性が示唆され、飢餓時の TORC1 システムの再構築が必要となった。この再活性化はオートファジーによる栄養の細胞内リサイクルに依存したが、長期栄養飢餓における TORC1 の調節機構および生理機能は明らかになっていなかった。

申請者はモデル生物である分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の TORC1 シグナリングの構成分子の探索を行い、窒素源依存的にリン酸化制御をうける2種の直接的基質 (Psk1 と Sck1) を初めて明らかにし、TORC1 活性の変動をそれらのリン酸化を解析することで簡便に評価できる実験系を確立した。この方法を用いて、様々な生理的条件下での TORC1 機能制御を検討する予備実験を行い、窒素源飢餓で誘導される減数分裂期において TORC1 活性が著しく上昇する現象を見出した。

分裂酵母では一倍体細胞が窒素源飢餓を引き金として細胞同士で接合した後、減数分裂を経て配偶子の胞子が形成される。すなわち減数分裂過程の間は細胞外に長時間窒素源のない状態が続く。さらにこれまで、TORC1 は減数分裂期への移行を負に制御する、すなわち飢餓による TORC1 の不活性化が減数分裂期への移行の引き金と考えられてきた。そのため、減数分裂期の TORC1 の活性化は予想されておらず、その役割も明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

TORC1 キナーゼは生育環境中の栄養シグナルを受けて調節されるため、飢餓条件下での

生理機能は十分に明らかとなっていない。しかし近年、長時間飢餓で TORC1 活性の再上昇が認められ、栄養飢餓下での新たな機能が着目されはじめた。

分裂酵母 (*S. pombe*) は窒素源飢餓下で細胞同士が接合して減数分裂を経て胞子を作る。減数分裂期には、染色体の複製や凝縮、相同組換え、第一および第二減数分裂などのプロセスが連続的に観察され、それらを制御する多くの分子の存在が明らかになりつつある。本研究ではまず、TORC1 の活性化が減数分裂のどのプロセスで起きるのかを突き止め、そのプロセスに関わる分子がどのように関与するのか、その制御を分子レベルで検討することを目的とした。さらに、活性化した TORC1 が減数分裂のプロセスにどのように関わるのかを現象レベルと分子レベルの両方で検討し、減数分裂過程における TORC1 の制御機構および生理機能を明らかにし、生殖細胞における TORC1 の分子機能モデルの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 減数分裂過程での TORC1 制御メカニズムの検討

細胞内の TORC1 活性の評価は、基質である Psk1 キナーゼの疎水性モチーフ (Thr415) のリン酸化と Sck1 のリン酸化を解析することでおこなった。Pat1 キナーゼは減数分裂開始を抑制する調節分子であり、温度感受性変異株では生育温度制御により同調的な減数分裂進行が可能となるため、本研究でもその変異株を適所に用いた。

1 長期窒素源飢餓における TORC1 制御

窒素源を除いた後 12 時間までの長時間の飢餓状態での TORC1 活性変動について解析を行い、またその制御におけるオートファジーの関与について、オートファジー欠失株を用いて検討した。

2 減数分裂の各プロセスにおける TORC1 制御

減数分裂期には減数分裂前染色体複製、染色体の凝縮や相同組換え、第一・第二減数分裂のプロセスが連続的に起きる。各プロセスに関わり遺伝子変異によりその過程が停止する遺伝子変異株を用いて、TORC1 の活性化がどのプロセスで起こるのかを検証した。

3 減数分裂関連分子による TORC1 制御

TORC1 活性に異常が見られた減数分裂プロセスについて、それに関わる制御分子を対象を広げて、各遺伝子変異株での TORC1 への影響を検証した。

4 TORC1 構成分子の減数分裂過程での制御

減数分裂期の TORC1 の細胞内局在をその構成分子である Tor2 (触媒サブユニット) または Mip1 に蛍光タンパク質 GFP を連結させて蛍光顕微鏡により観察を行った。さらに Tor2 と Mip1 の減数分裂時の発現量などの変化を生化学的手法により検証した。

5 栄養増殖期で TORC1 制御に関わる分子の

減数分裂期での機能

栄養増殖期で TORC1 シグナリングに関わる低分子量 GTPase 複合体の Gtr1 および Gtr2 の遺伝子欠損株を作製し、減数分裂における TORC1 制御への影響を検証した。

(2) 減数分裂過程における TORC1 の生理機能の検討

1 TORC1 機能阻害の減数分裂への影響

ラパマイシンは TORC1 特異的阻害剤として知られるが、分裂酵母では TORC1 活性を完全には阻害できない。ラパマイシンによる検証には、TORC1 の野生型株 (一部の機能阻害)、ラパマイシン高感受性変異株 (ほぼ完全な機能阻害)、ラパマイシン耐性変異株の 3 株を用いて減数分裂における TORC1 機能阻害の影響を検証した。また、TORC1 触媒サブユニットである *tor2* 温度感受性変異体を用いて、減数分裂への影響を合わせて検討した。

2 TORC1 による減数分裂制御の分子メカニズム

TORC1 により制御される減数分裂におけるタンパク質や遺伝子の発現について、RNA-seq 法などにより解析を行った。

(3) 減数分裂過程における TORC1 の新たな基質タンパク質の探索

減数分裂における TORC1 の基質の探索をホスホ proteオミクス技術により検討した。

4. 研究成果

(1) 減数分裂過程での TORC1 制御メカニズム

1 長期窒素源飢餓における TORC1 制御

窒素源飢餓後 12 時間までにおいて、Psk1 のリン酸化は飢餓後 4 時間から再度上昇しはじめた。この活性上昇は他の TORC1 基質である Sck1 のリン酸化でも確認され、またそれらのリン酸化がラパマイシンによって阻害されたことから、TORC1 によるものであることが確認された。この TORC1 活性の上昇はオートファジーの活性化と同時期に起きており、オートファジー関連遺伝子の欠失株では起きなかったことからオートファジー依存性であった。このことから分裂酵母においても長期間の飢餓環境下で TORC1 がオートファジーによる内因的な栄養リサイクルをうけ機能制御されることが示唆された。

2 減数分裂における TORC1 の活性化

pat1 温度感受性遺伝子変異株を用いた同調的な減数分裂誘導において Psk1 または Sck1 のリン酸化を指標にした TORC1 活性は減数分裂の進行とともに顕著な上昇が確認された。この活性は長期飢餓時のオートファジー依存性制御と比較してはるかに強く、減数分裂特異的な調節シグナルの存在が示唆された。しかし、オートファジー欠損株では認められなかったことから、細胞内の栄養素プールは基盤として必要であることが推測された。また、*pat1* 変異体に依らない生理的な減数分裂においても TORC1 の強い活性上昇は認められた。

さらに減数分裂の各プロセスに関わる遺伝子の変異体で TORC1 活性を検証したところ、RNA 結合タンパク質とサイクリン依存性キナーゼをコードする遺伝子変異体で著しい活性の低下が確認された。

3 TORC1 活性に関する減数分裂関連分子による TORC1 制御

サイクリン依存性キナーゼは減数分裂の複数の時期に関わることが知られている。複数の温度感受性変異株を用いて解析した結果、特に減数分裂初期 G1 期から S 期への移行に関わるキナーゼ機能が TORC1 制御に関わることが明らかとなった。しかし、そのパートナーと考えられる複数のサイクリンの遺伝子変異体では影響が見られなかった。

もう一方の RNA 結合タンパク質は栄養増殖期にはリン酸化されて機能が抑制されているが、脱リン酸化されて non-coding RNA と結合すると減数分裂を開始させる。その欠損細胞では減数分裂特異的 TORC1 の活性化は見られず、逆に活性型である非リン酸化変異型の過剰発現で著しい活性上昇が認められた。また、その分子と結合が明らかとなっている non-coding RNA をコードする遺伝子欠損株では TORC1 活性に影響はなかったが、RNA 結合能力を欠失した変異株では TORC1 の十分な活性化は起きなかったことから、現在までに同定されていない non-coding RNA 分子と RNA 結合タンパクの複合体が TORC1 制御に重要であることが示唆された。

4 TORC1 構成分子の減数分裂過程での制御

減数分裂期全般にわたって TORC1 構成分子の Tor2 と Mip1 のタンパク質量及び分子量に大きな変化はなかったことから、少なくとも TORC1 の発現量の増加が活性上昇の原因ではないことが示唆された。一方、TORC1 の細胞内局在は体細胞期では既報と同様に栄養条件によらず液胞膜状に見られたが、減数分裂初期から中期にかけて TORC1 の一部がスピンドル極体に局在した。この結果は大変興味深く、生理的役割は今後詳細な解析を行う予定である。

5 栄養増殖期で TORC1 制御に関わる分子の減数分裂期での機能

作製した *gtr1* および *gtr2* 遺伝子欠損株では減数分裂特異的 TORC1 活性は有意に抑制されており、栄養増殖期と同様に減数分裂期の TORC1 制御に Gtr1/Gtr2 GTPase 複合体が関わることが示唆された。

(2) 減数分裂過程における TORC1 の生理機能の検討

1 TORC1 阻害の減数分裂への影響

TORC1 の触媒サブユニットである *tor2* 温度感受性変異株では、窒素源飢餓環境で減数分裂に進んだ細胞の割合は制限温度において大きく減少した。TORC1 の野生型株 (一部の機能阻害)、ラパマイシン高感受性変異株 (ほぼ完全な機能阻害)、ラパマイシン耐性変異株を用いたラパマイシンによる TORC1 機能阻害の減数分裂への影響は、高感受性変異株で

顕著な減数分裂進行の遅延が見られ、逆に耐性変異株は野生型株と比較してラパマイシンによる減数分裂遅延効果の減弱が確認された。この TORC1 阻害は減数分裂前 DNA 合成開始のタイミングを遅延させ、DNA 合成期の延長を引き起こした。また、ラパマイシンによる TORC1 阻害は、胞子の発芽率の著しい低下を引き起こした。これらのことから減数分裂において上昇する TORC1 活性は、栄養飢餓環境における減数分裂の適切な進行に重要であることが示唆された。

2 TORC1 による減数分裂制御の分子メカニズム

減数分裂期でのラパマイシンによる TORC1 機能阻害は、DNA 合成関連遺伝子の発現遅延やサイクリンタンパクの発現調節異常を引き起こすことがみとめられた。このことは、TORC1 阻害が減数分裂進行の遅延を引き起こすことと一致する。加えて、RNA-seq 法による網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、TORC1 は減数分裂において多くの non-coding RNA の発現に関わることが示唆された。この結果は、大変興味深く今後詳細な解析を進める予定である。

(3) 減数分裂過程における TORC1 の新たな基質タンパク質の探索

飢餓環境でおこる減数分裂過程では種々のプロテアーゼ活性が増加しているため、タンパク質の分解を防ぎながら細胞抽出液を調整する条件の検討を行った。今後はこの条件を用いて、減数分裂期に TORC1 と相互作用する分子や基質タンパクについてプロテオミクスを活用しながら探索を進める予定である。

<まとめ>

本研究により分裂酵母をモデル生物とした減数分裂周期における TORC1 の活性調節および生理機能の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。TORC1 は栄養枯渇が長期間続いた状態でもオートファジーによる内因的な栄養素リサイクルをベースに、RNA 結合タンパクであり減数分裂のレギュレータータンパクやサイクリン依存性キナーゼが関わる減数分裂開始シグナルをうけ、飢餓環境にもかかわらず高度に上昇制御を受けることが示された。また、その制御を受け TORC1 は DNA 合成関連遺伝子の発現やサイクリンのタンパクレベルの調節を通じて、減数分裂の適切な進行に関わることが新たに明らかとなった。しかし、RNA 結合タンパクやサイクリン依存性キナーゼと TORC1 との具体的な作用機序および TORC1 がどのように DNA 合成関連遺伝子の発現やサイクリンの調節にかかわるのかはまだ十分に明らかとなっておらず、今後詳細な解析を進めメカニズムの全貌を明らかにする必要がある。

近年では、動物の生殖細胞からの精子形成や卵子成熟における TORC1 の関与が報告されつつあるが、本研究の成果はそれらへの分子モデルの基礎的知見を提唱することになる

と期待される。(以上は、未発表データである。)

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 9件)

Otsubo Y, Nakashima A, Yamamoto M, Yamashita A. TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast. *Biomolecules* 査読有, Vol. 7. pii: E50. (2017), DOI:10.3390/biom7030050

Nagano T, Nakashima A, Onishi K, Kawai K, Awai Y, Kinugasa M, Iwasaki T, Kikkawa U, Kamada S. Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species. *J. Cell Sci.* 査読有, vol. 130, 1413-1420 (2017), DOI:10.1242/jcs.196469

Kozel C, Thompson B, Hustak S, Moore C, Nakashima A, Singh CR, Reid M, Cox C, Papadopoulos E, Luna RE, Anderson A, Tagami H, Hiraishi H, Slone EA, Yoshino KI, Asano M, Gillaspie S, Nietfeld J, Perchellet JP, Rothenburg S, Masai H, Wagner G, Beeser A, Kikkawa U, Fleming SD, and Asano K. Overexpression of eIF5 or its protein mimic 5MP perturbs eIF2 function and induces ATF4 translation through delayed re-initiation. *Nucleic Acids Res.* 査読有, pii: gkw559 (2016), DOI:10.1093/nar/gkw559

Ma N, Ma Y, Nakashima A, Kikkawa U, and Furuyashiki T. The Loss of Lam2 and Npr2-Npr3 Diminishes the Vacuolar Localization of Gtr1-Gtr2 and Disinhibits TORC1 Activity in Fission Yeast. *PLoS One* 査読有, vol 11, e0156239 (2016), DOI:10.1371/journal.pone.0156239

Kawai M, Nakashima A, Kamada S, and Kikkawa U. Midostaurin preferentially attenuates proliferation of triple-negative breast cancer cell lines through inhibition of Aurora kinase family. *J. Biomed. Sci.* 査読有, vol. 22, 48 (2015), DOI:10.1186/s12929-015-0150-2

Nakashima A§, Kamada S, Tamanai F, and Kikkawa U. Fission yeast arrestin-related trafficking adaptor, Arn1/Any1, is ubiquitinated by Pub1 E3 ligase and regulates endocytosis of Cat1 amino acid transporter. *Biol. Open*, 査読有, vol. 3, 542-552 (2014),

§Corresponding author, DOI: 10.1242/bio.20148367

Santiago Lima AJ,
Hoogveen-Westerveld M, Nakashima A,
Maat-Kievit A, van den Ouweland A,
Halley D, Kikkawa U, and Nellist M.
Identification of Regions Critical for the
Integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7
Complex. *PLoS One*, 査読有, vol. 9,
e93940 (2014), DOI:
10.1371/journal.pone.0093940

〔学会発表〕(計 10件)

中嶋昭雄、山下 朗、大坪瑤子、松田真弥、
鎌田真司、瓜谷眞裕、山本正幸、吉川 潮、
減数分裂における分裂酵母 TORC1 の制
御, ConBio2017 (生命科学系学会合同年
次大会) ワークショップ, 2017 年
Akio Nakashima Akira Yamashita, Yoko
Otsubo, Shinji Kamada, Masahiro
Uritani, Masayuki, Yamamoto, Ushio
Kikkawa, Regulation of TORC1
signaling in meiosis under nitrogen
starvation., The eighth international
fission yeast meeting, 2015 年
中嶋昭雄、山下 朗、大坪瑤子、鎌田真司、
瓜谷眞裕、山本正幸、吉川 潮、減数分裂
における分裂酵母 TORC1 の制御と機能,
BMB2015 (日本生化学会・日本分子生物
学会合同大会) ワークショップ, 2015 年
中嶋昭雄、多機能性 TORC1 キナーゼの
液胞依存性栄養シグナルによる活性制御
システムの解明, 第 186 回酵母細胞研究
会例会, 2014 年
中嶋昭雄、吉川潮、分裂酵母 TORC1 の室
素源飢餓時の再活性化と生理機能, 第 47
回酵母遺伝学フォーラム年会, 2014 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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-kikkawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 昭雄 (NAKASHIMA AKIO)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センタ
ー・准教授

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

(4) 研究協力者

該当なし