

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19570126
研究課題名 (和文) 分裂酵母を材料とした TOR シグナル経路の制御機構と細胞機能の遺伝学的研究
研究課題名 (英文) Genetic analysis of the regulation and the cell function of TOR signaling pathway in fission yeast
研究代表者 瓜谷 真裕 (URITANI MASAHIRO) 静岡大学・理学部・教授 研究者番号：40193974

研究成果の概要：

TORは免疫抑制剤ラパマイシンの標的タンパク質 (TORはTarget Of Rapamycin) で、ヒトを含め生物に広く存在し、栄養状況に応じて細胞の増殖と成長を制御する。モデル生物、分裂酵母のTORにはTor1とTor2がある。今回、Tor2の遺伝子に変異を導入し、ラパマイシン感受性変異株を作った。この株はラパマイシンで増殖が止まり、窒素源飢餓と同様の挙動を示したことから、Tor2は窒素源を感知し、細胞の増殖を制御することが示唆された。また、Tor2の下で働くと思われる転写因子、およびアミノ酸トランスポーターを特定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：(分科) 生物科学 (細目) 機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構、ラパマイシン、TORシグナル経路、プロテインキナーゼ、分裂酵母、栄養、タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

TORは、免疫抑制剤ラパマイシンの標的タンパク質で、PI3キナーゼ様プロテインキナ

ーゼである (TORはTarget Of Rapamycinに由来)。ヒトから酵母まで、真核生物に普遍的に存在し、構造も良く保存されている。TOR

は免疫細胞や出芽酵母の増殖に必須のプロテインキナーゼとして研究されたが、その後の研究で、栄養状況に応じて細胞の増殖と成長を制御する新たなシグナル経路の中心に位置することがわかってきた。また、ラパマイシンが抗癌作用を示すことや腫瘍 (Tuberous sclerosis) の抑制遺伝子の産物 (Tsc1、Tsc2) が TOR を負に制御することから、癌治療の点からも重要視されている。近年、寿命や肥満にも関わることも報告され、医学・健康科学の面でも注目されている。

TOR の機能は、初期の頃は、主に翻訳の制御にあると考えられたが、その後、転写調節、タンパク質の細胞内局在、オートファジー、アクチン細胞骨格の構成など多岐にわたる *in vivo* が示された。一方、TOR は二種類の複合体 (TORC1 と TORC2) を取り、そのうち、TORC1 は栄養をセンスして細胞の増殖と成長を制御することが示された。ラパマイシンは TORC1 を阻害することで、飢餓 (主に窒素源飢餓) に対する応答と同様な挙動を引き起こす。これに対し、ラパマイシンで阻害を受けない TORC2 は、栄養には関係せずアクチン細胞骨格の構成に働く。また、新規 GTP 結合タンパク質である Rheb が、物理的に相互作用することで TOR を活性化すること、Tsc1/Tsc2 ヘテロ二量体が Rheb の GAP として Rheb を負に制御することがわかった。

TOR 研究のさらなる発展には、今まで以上に、ユニークな視点とともに、短時間で確実にアプローチできる手法が要求されるが、遺伝解析は強力で有効な手法である。出芽酵母は、遺伝解析が使える上に過去の蓄積も大きい、ヒトに存在する Tsc1 と Tsc2 を持っておらず、Rheb の遺伝子は持っているものの生育に必須ではないという弱点があり、その観点から見れば、出芽酵母はヒトのモデルとして適しているとは言えない。そこで、遺伝解

析が使える新たなモデルシステムが必要になる。分裂酵母は遺伝解析が自由に使える上に、出芽酵母とは進化的に離れていて、むしろヒトに近いとされる。実際に、分裂酵母には、TOR 自身はもちろん (Tor1 と Tor2)、Tsc1、Tsc2、Rheb の他に、TOR 複合体のコンポーネントである Raptor、Rictor も存在する。以上より、分裂酵母は TOR の制御機構を研究する上で、遺伝解析が使える上に、ヒトに近い仕組みを備えているので、たいへん優秀なモデルシステムである。

2. 研究の目的

遺伝学的手法で分裂酵母の TOR の制御機構と TOR の細胞機能を明らかにする目的で、主に下記の項目について研究し、明らかにする。これにより、TOR の機能および制御機構について新たな知見を得ることで、哺乳類を含めた TOR の研究の発展に寄与すると共に、癌研究や健康科学においても重要な貢献をすると期待される。

(1) Tor2 経路の下流因子の検索と同定

未知の Tor2 の下流因子を見つけ解析する。そのため、*tor2* の温度感受性変異株の温度感受性をマルチコピーでサプレス (抑圧) する遺伝子をスクリーニングし、それを解析・同定する。

(2) ラパマイシン感受性の Tor2 の変異株の取得と解析

ラパマイシン感受性の Tor2 変異株の解析を行う。この変異箇所を同定することで、ラパマイシンによる阻害の仕組みや Tor2 の活性発現に必要なドメインを明らかにする。

(3) Tor2 の細胞機能の解析

Tor2 はアミノ酸取り込みに関わることを見つけているので、それを分子レベルで理解するために、アミノ酸トランスポーターの発

現、局在、および分解について、Tor2 との関係性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Tor2経路の下流因子の検索と同定

*tor2*の温度感受性変異株の温度感受性をマルチコピーでサプレス（抑圧）する遺伝子をスクリーニングし、これがTor2のシグナルを受けるかどうかを明らかにする。

(2) ラパマイシン感受性のTor2の変異株の取得と解析

ラパマイシン感受性のTor2変異株について、その変異箇所を同定する。つぎに、この変異株の表現型を明らかにし、特にTor2温度感受性株との比較を行うことで、ラパマイシンによるTor2の阻害の影響を明らかにする。

(3) Tor2の細胞機能の解析

Tor2はアミノ酸取り込みに関わることを見つけている。そこで、アミノ酸トランスポーターの発現、局在、および分解について、Tor2との関係を明らかにする。データベース上には、23のアミノ酸トランスポーターが存在するが、解析されたものはほとんどない。そこで、これらにGFPタグのついたものを使い、細胞内局在がTor2に依存するものを見つけ、Tor2による局在の制御の機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Tor2経路の下流因子の検索と同定

まず、温度感受性の *tor2^{ts}-13* にゲノムDNAライブラリーを導入し、制限温度（36℃）で生育したものを選抜し、そこから回収したプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列をもとに、データベースから遺伝子を特定する方法を採ったが、満足なものが得られなかった。この一因は、温度感受性株のトランスフォーメーション効率が著しく低かったことと関

係すると思われた。

そこで、温度感受性株の代わりにラパマイシン感受性株（*tor2^{ts}-2131*）を用いて同様のスクリーニングを行った。その結果、一つの候補について解析した。これは新規の遺伝子（SPAC16.05c）で、Znフィンガーモチーフを持つ転写因子をコードしていた。GFPタグを付けたもので局在を調べたところ、増殖期の細胞では核に存在していた。しかし、栄養枯渇でも、ラパマイシン添加でも、局在は細胞全体にわたった。このことから、この転写因子はTor2により局在の制御を受けることが示唆された。SPAC16.05cは生育に必須ではなかったが、高濃度の塩化カリウム、ヒドロキシウレア、シクロヘキシミドなどに感受性を示した。SPAC16.05c細胞機能およびTor2による局在制御の機構については引き続き研究中である。

(2) ラパマイシン感受性のTor2変異株の取得と解析

*tor2*にPCRで変異を導入し、ラパマイシン添加培地で生育するものを取得した。この株（*tor2^{ts}-2131*）は、ラパマイシン無添加では正常に増殖したが、ラパマイシン存在下では増殖しなかった。ラパマイシンによる阻害にはFKBP12というタンパク質が必要だが、このラパマイシン感受性株もFKBP12（*fkhl1*）が存在しないとラパマイシンによる阻害が起きなかった。次に、ラパマイシン添加による細胞の挙動を詳しく調べた。ラパマイシン添加により細胞は約2回の細胞分裂をの後G1にアレストし、性的分化に進むことが分かった。これらは窒素源飢餓で見られる現象である。さらに、窒素源飢餓で誘導される遺伝子（*isp6*, *ste11*）発現もラパマイシン添加で起きることが分かった。以上のことは、取得したラパマイシン感受性変異株がラパ

マイシン添加で窒素源飢餓応答に似た挙動をとることを示す。このことは、Tor2 が窒素源を感知し、それによって細胞の増殖と窒素源飢餓応答を制御することを示唆し、またこのラパマイシン感受性変異株が、その制御の分子機構を明らかにするための優れた道具として使えることを示す。変異箇所を調べたところ、変異はキナーゼドメインとその前後のドメインに発見された。特にキナーゼドメイン以外の部位 (FKBP12 の結合部位とは別の部位) に見つかったことは、そこがラパマイシンによる阻害に関する重要な働きを示唆した。

また、(1) で示したように、このラパマイシン感受性変異株のラパマイシン感受性を抑圧するマルチコピーサプレッサー遺伝子が取得できた。このことは、ラパマイシン感受性変異株が Tor2 の経路を明らかにするための大変すぐれた道具として使えることを示している。

(3) Tor2の細胞機能の解析

Tor2 の温度感受性株 (*tor2^{ts}-13*) に、アミノ酸トランスポーターに GFP タグを付けたものを発現させ、その局在が制限温度 (36°C) と許容温度 (25°C) で変化するものを探したところ、新規のアミノ酸トランスポーター (SPBC359.03) が見つかった。これは、許容温度では細胞内にパッチ上に存在したが、制限温度に置くと液胞と思われるところに局在が変化した。これの生理的な意味は不明だが、このアミノ酸トランスポーターの局在は Tor2 のシグナル経路の下流にあることが示唆された。

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 1 件)

Daicho K, Maruyama H, Suzuki A, Ueno M, Uritani M, Ushimaru T The ergosterol biosynthesis inhibitor zaragozic acid promotes vacuolar degradation of the tryptophan permease Tat2p in yeast *Biochimica et Biophysica Acta* **176** 1681-1690 (2007) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 瓜谷真裕、一杉篤、磯村寿郎、登田隆 分裂酵母のラパマイシン感受性変異株の解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 シンポジウム (2008年12月9日、神戸市)

② 磯村寿郎、小澤紗弥加、堀田ゆかり、丑丸敬史、登田隆、瓜谷真裕 分裂酵母のtor2変異株の解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (2008年12月9日、神戸市)

③ 堀田ゆかり、磯村寿郎、大吉崇文、丑丸敬史、瓜谷真裕 ラパマイシンの標的タンパク質 TOR のアンモニアとアミノ酸取り込みへの関与 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会 合同大会 (2007年12月12日、横浜市)

④ 磯村寿郎、小澤沙弥香、大吉崇文、丑丸敬史、登田隆、瓜谷真裕 分裂酵母のラパマイシン感受性について 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会 合同大会 ワークショップ (2007年12月12日、横浜市)

⑤ 小澤沙弥香、磯村寿郎、大吉崇文、丑丸敬史、瓜谷真裕 分裂酵母 TOR のラパマイシン感受性について 第51回放射化学討論会

(2007年9月24日、静岡市)

⑥ 堀田ゆかり, 磯村寿郎, 大吉崇文, 丑丸敬史, 瓜谷真裕 ラパマイシンの標的タンパク質 TOR のアンモニアとアミノ酸取り込みへの関与 第 51 回放射化学討論会 (2007年9月24日、静岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瓜谷 真裕 (URITANI MASAHIRO)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 40193974

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし