

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24年 5月 10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570007

研究課題名（和文） TOR情報伝達系におけるRagA, B/C, Dの機能解析

研究課題名（英文） Analysis of RagA, B/C, D in mTOR signal transduction system

研究代表者

関口 猛 (SEKIGUCHI TAKESHI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60187846

研究成果の概要（和文）：

Gタンパク質(RagA, B/RagC, D)がいつ、どこで、どのようにしてmTOR情報伝達系を調節しているかを明らかにするのが本研究の目的である。さらに、このGタンパク質と相互作用するタンパク質のmTOR情報伝達系における役割を明らかにすることも目的とした。

Gtr1, Gtr2が働くのに複合体を形成することが必須であることを示した。また、Gtr1とEgo3, Gtr2とEgo1とが、特異的に結合していることを明らかにした。

Gtr1, Gtr2とがTor1複合体の機能をどのように調節しているか明らかにした。その結果、Tor1複合体の2つのタンパク質(Kog1, Tco89)と結合することを新たに見出し、特に、Tco89との相互作用が重要であることを明らかにした。

ヒトRagA, CがmTORの機能を制御することを明らかにしてきたが、AMPKの機能も制御している可能性があることを示した。すでにAMPKは、mTORの機能を制御していることがわかっている。本研究で、その両者をRagA, Cが仲立ちすることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this research was to find when, where, and how the G proteins (RagA, B/C, D) regulate mTOR signal transduction pathway. Moreover, we tried to identify roles of interacting proteins of the G proteins in mTOR pathway.

We elucidated significance of Gtr1p and Gtr2p complex formation and interaction to other proteins(Ego3 and Ego1) by using G protein mutant proteins.

We found that Gtr1p interacted to Tor1 complex proteins Kog1 and Tco89 in a specific manner. Interaction between Gtr1p and Tco89p was important.

We showed that human RagA, C regulate mTOR and AMPK. It was shown that AMPK regulates mTOR. Here we found that RagA, C could be bridge proteins for mTOR and AMPK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝ゲノム動態

キーワード：分子遺伝

1. 研究開始当初の背景

さまざまな環境変化の中で生物が生きていくためには、さまざまなストレスや栄養状況の変化に対応しなければならない。生物は、細胞レベルでそれらの刺激や変化に対応するための仕組みを持っている。その仕組みのひとつであるmTOR情報伝達系は、細胞外の栄養状態（糖やアミノ酸）、増殖因子（インシュリン）、そして細胞内のエネルギー（ATP）の3つの情報を集約して対応する役割を持っている。この情報伝達系では、受け取った情報をもとに、タンパク質合成、細胞増殖や代謝系を調節している。がんや糖尿病では、mTOR情報伝達系の調節が乱れている（Cell, 2006）。mTOR情報伝達系の働きを阻害する物質は、がん細胞の増殖を抑制できるためがんの治療薬となる。そこで、この情報伝達系の研究は、これらの疾病の原因を解明すると同時にこれらの疾病の治療薬の開発に役立つことが期待される。さらに、この情報伝達系は、老化や心筋肥大に関わることも報告されている。

2. mTOR情報伝達系の中心はmTORリン酸化酵素の複合体である。我々が細胞増殖を制御するタンパク質として研究してきたGタンパク質（RagA,B/RagC,D）が、この複合体と直接結合し、mTOR情報伝達系を制御していることが報告された（Sabatini, et al. Science 2008）。我々はこのGタンパク質と相互作用するタンパク質をいくつか同定しているが、これらのタンパク質もmTOR情報伝達系で働いていることが予想される。

3. 我々は、RagAを用いてRagC,Dを発見し（Sekiguchi et al. JBC 2001）、それに結合するリボソーム生合成に関わる新規核タンパク質を同定するなど（Sekiguchi et al. JBC 2004, Sekiguchi et al. NAR 2006）、このGタンパク質の研究を10年以上

世界に先駆けて行なって来た。そのため、このGタンパク質に関する論文には我々の論文が引用されている。また、酵母の相同遺伝子（Gtr1/2）の研究も同時平行して行ない、核外輸送やリボソーム生合成を調節していることを明らかにしてきた（Wang et al. BBRC 2004, Todaka et al. Genetics 2005）。酵母相同タンパク質の変異株を用いた研究で、遺伝子発現やクロマチンの凝縮を調節していることを見い出したが、その表現型を調べてみると、酵母のmTOR相同タンパク質の変異株の表現型とほとんど同じであった（Sekiguchi et al. BBRC 2008）。そこで、このGタンパク質（GTR1）がmTORリン酸化酵素となんらかの関係があると考えた。我々はGTR1がmTORリン酸化酵素複合体の構成タンパク質（Raptor）の酵母相同タンパク質（KOG1）と直接結合することを見い出した。（未発表、）。

2. 研究の目的

研究開始時点で、Gタンパク質（RagA,B/RagC,D）がいつ、どこで、どのようにしてmTOR情報伝達系を調節しているかが明らかになっていなかった。また、このGタンパク質は、mTORリン酸化酵素複合体と結合するが、その役割はわかっていなかった。つまり、Gタンパク質がmTORリン酸化酵素の働きを調節しているのか、逆にmTORリン酸化酵素により調節を受けているのかが分かっていなかった。これらの点を解明するのが本研究の目的であった。人の培養細胞に比べて、酵母は増殖速度が10倍近く早くかつ安価で実験できるので、酵母での実験を行なった。遺伝子のノックアウトや突然変異の導入といった分子遺伝学の手法をとれるのも酵母の利点である。我々は、このGタンパク質と相互作用するタンパク質を単離し解析してきたが、これらの相互作用するタンパク質のmTOR情報伝達系における

役割はわかっていなかった。それら相互作用するタンパク質が、既知のmTOR情報伝達系のタンパク質とどのような相互作用をするかも明らかにする。特に、がん抑制遺伝子p53と結合するタンパク質 (NOP132) は、mTOR情報伝達系を抑制するタンパク質 (AMPK) とも相互作用をしていることがわかっていて。そこで、NOP132が、mTOR情報伝達系においてどのような役割を果たしているか明らかにすることで発がん機構の解明に繋がる可能性がある。これらの研究で、我々が研究してきたGタンパク質のネットワークをmTOR情報伝達系の図の中に入れ込む作業をすることが目的であった。

3. 研究の方法 平成20年度

Gタンパク質 (RagA,B/C,D) の酵母相同タンパク質を用いて解析する。我々の研究から、酵母でもこのGタンパク質がTOR情報伝達系に働いていることがわかっていて。そこで以下の方法で研究を行った。

I. Gタンパク質(Gtr1)が、TOR情報伝達系のどの部分を制御しているのかを明らかにする。

- a. Gtr1の常時活性化タイプ (GTP結合型) の変異遺伝子が、Kog1の温度感受性変異株や、Tor1,Tor2,Rhb1などの変異株を相補できるか調べる。もし、相補できればGtr1がTor1などから調節を受けており、TOR情報伝達系の下流にあることがわかる。
- b. aで否定的な結果が出た場合、Tor1,Tor2,Rhb1などの常時活性化タイプの変異遺伝子が、Gtr1の変異株を相補できるか調べる。もし、相補できるものがあれば、Gtr1が、それより上流で働くことがわかる。
- c. 次にGtr1がTor1リン酸化酵素の働きを直接調節しているか調べる。そのために試験管内でGtr1の常時活性化タイプや不活性化タイプの変異タ

ンパク質をTor1リン酸化酵素に加えてその活性に及ぼす影響を調べる。

- d. 逆に、Tor1リン酸化酵素がGtr1の働きを調節しているか調べる。試験管内でTor1がGtr1をリン酸化し、機能を調節しているか調べる。Gtr1がリン酸化された場合は、リン酸化の部位を同定する。その部分に変異 (アラニンもしくはグルタミン酸) を入れた遺伝子を作成しGtr1の生物活性を測定し、Tor1のGtr1の活性に及ぼす影響を明らかにする。

II. Gタンパク質(Gtr1)とTor 1 の相互作用の意義を調べる。

- a. まず、Gtr1と結合するKog1の最小領域を同定する。このために、Kog1を短く断片化しGtr1と結合するか酵母のtwo hybridの系で調べる。
- b. Kog1の最小結合領域に変異導入PCR法により点突然変異を導入し、Gtr1と結合しなくなる点突然アミノ酸部位を同定する。
- c. その突然変異を完全長のkog1に導入し、Gtr1と結合できない変異kog1をもつ酵母株を構築する。その変異株の増殖速度や、ラパマイシンに対する抵抗性を調べ、Gtr1と相互作用する意味を明らかにする。
- d. Gtr1と結合できないkog1変異株でのTor1の酵素活性 (リン酸化酵素活性) を測定し、Gtr1とKog1が相互作用することでTor1の活性に影響を及ぼすか明らかにする。
- e. さらに、それらのkog1変異株をもちいて、変異Kog1とTor1の複合体形成、窒素代謝抑制遺伝子の発現やテロメアのサイレンシング等のTor 1 の機能に変化が生じたか調べる。

III. Gタンパク質と相互作用するタンパク質のTOR情報伝達系における役割を解明する。

酵母相同Gタンパク質は、液胞膜にあるEgo1、Ego3、核のRpc19、Nop8、Rvb1、Rvb2等に結合していることが

明らかになっている。そこで、これらがTOR情報伝達系でどんな役割を荷っているか明らかにする。

- a. それらの遺伝子の変異株が、ラパマイシンなどの薬剤に対する感受性や特異的な遺伝子発現の異常などTOR情報伝達系のタンパク質の変異で観察された表現系を示すか調べる。

それらのタンパク質がTOR情報伝達系の既知のタンパク質の中で相互作用するものを探す。また、TOR情報伝達系の遺伝子の変異株を抑制できるか調べる。

平成21年度以降。

平成20年度の酵母の研究で終了していなかった項目を継続し残り2年間で以下の研究を行なった。

IV. mTOR情報伝達系における人Gタンパク質 (RagA,B/C,D) の役割を調べる。

前年度の酵母の研究で得られた結果のもとに、同様の結果が人の細胞でも得られるか以下の項目について調べる。

- a. RagAが、mTORを調節しているのか、mTORがRagAの機能を調節しているのか明らかにする。mTORをノックダウンしRagAの常時活性化型変異遺伝子を導入しS6Kのリン酸化を調べる。さらに、RagAをノックダウンしmTORの常時活性化型変異遺伝子を導入し、S6Kのリン酸化を調べる。
- b. RagAと結合できないRaptorの変異タンパク質を作成し、RagAとRaptorの相互作用の意義を調べる。

V. Gタンパク質(RagA)に結合する核タンパク質 (NOP132) のmTOR情報伝達系における役割を解明する。発がんとの関連も調べる。

NOP132は、がん抑制タンパク質 (p53) とmTOR抑制タンパク質 (AMPK) と結合する (未発表)。また、がん細胞でNOP132が過剰発現しており、NOP132のノックダウンでアポトーシスが誘導される (Cancer Science, 2004)。

- a. NOP132のノックダウンで、mTORの下流にあるS6Kのリン酸化が抑制

されるか調べる。

- b. がん細胞でNOP132のノックダウンした時に、p53の活性が上昇するか？ p53依存性の転写活性化がみられるか？ p53がリン酸化を受けて活性化しているか？等を調べる。
- c. AMPKがNOP132の活性を制御しているか？を調べる。

VI. Gタンパク質(RagA)に結合する新規細胞質タンパク質 (RagBPC) のmTOR情報伝達系における役割を解明する。

- a. 培養細胞で、新規細胞質タンパク質をノックダウンしたときにmTORの下流にあるS6Kのリン酸化が抑制されるか調べる。その際、ラパマイシン感受性を示すか調べる。
- b. 新規タンパク質は、WD40構造を持ち他のタンパク質と相互作用することが予想される。まず、mTOR複合体と結合するか調べる。結合しない場合は、mTOR情報伝達系の他のタンパク質と相互作用するか調べる。それでも見つからない場合は、新規タンパク質のWD40領域を用いて、結合する人タンパク質をtwo hybrid法等で探索する。

VII. Gタンパク質と相互作用するその他のタンパク質のTOR情報伝達系における役割を調べる。

- a. 培養細胞で、我々が単離してきたGタンパク質相互作用タンパク質をノックダウンしたときにmTORの下流にあるS6Kのリン酸化が抑制されるか調べて、TOR情報伝達系へ影響を及ぼすか確認する。
- b. Gタンパク質相互作用タンパク質とmTOR系のタンパク質との相互作用を解明する。

VIII. Gタンパク質に結合するカエルのタンパク質を単離する。 (国際共同研究、NIH王先生)

- a. カエル卵の抽出液をもちいて、Gタンパク質と相互作用するタンパク質を単離する。
- b. 単離したタンパク質が何であるか、同定し、酵母と人の相同遺伝子を

分離する。

酵母や人の相同タンパク質が、mTOR 情報伝達系に関わっているか調べる。

4. 研究成果

Gタンパク質 (RagA, B/RagC, D) がいつ、どこで、どのようにしてmTOR情報伝達系を調節しているかがを明らかにするのが本研究の目的であった。さらに、このGタンパク質と相互作用するタンパク質を単離し解析してきたが、これらの相互作用するタンパク質のmTOR情報伝達系における役割を明らかにすることを目的とした。本研究で以下のことを明らかにした。

Gtr1pが、Gtr2pとEgo1pと異なる様式で結合していることを明らかにした。

Gtr1, Gtr2が働くのに複合体を形成することが必須であることを示した。また、結合しない変異タンパク質は、プロテアソームによって分解されることを明らかにした。

Tor1複合体の機能にGtr1, Gtr2がどのように働いているかを明らかにした。その結果、Tor1複合体の2つのタンパク質

(Kog1, Tco89) と特異的に結合することを見出し、特に、Tco89との結合が重要であることを明らかにした。

ヒト RagA, Cが mTOR の機能を制御することを明らかにしてきたが、AMPK の機能も制御している可能性があることを示した。すでにAMPK は、mTOR の機能を制御していることがわかっている。本研究で、その両者を仲立ちするものとして RagA, C があることがわかった。

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 4 件)

1. Sekiguchi, T., Sasaki, T., Funakoshi, M., Ishii, T., Saitoh, Y., Kaneko, S., Kobayashi, H. 2011 Ubiquitin chains in the DSK2 UBL domain mediate DSK2 stability and protein degradation in Yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, 411,555-561
2. Sekiguchi T., Sasaki H, Kurihara Y, Watanabe S, Moriyama D, Kurose N, Matsuki R, Yamazaki K, Saeki M. 2010 New methods for species and sex determination in three sympatric Mustelids, *Mustela itatsi*, *Mustela sibirica*, and *Martes melampus*. *Mol.Eco.Res.* 10, 1089-1091
3. Wang, YG., Kurihara, Y., Sato, T., Toh, H., Kobayashi, H.

and Sekiguchi, T. 2009 The Gtr1p associated with Gtr2p and with Ego1p differently. *Gene* 437, 32-38

4. Horiike, Y, Kobayashi, H., Sekiguchi, T. 2009 Ran GTPase guanine nucleotide exchange factor RCC1 is phosphorylated on serine 11 by cdc2 kinase in vitro *Mol.Biol.Rep.* 36, 717-723

[学会発表] (計 8 件)

1. 関口 猛, 鎌田 芳彰, 古野 伸明, 小林 英紀, ヘテロ 2 量体G タンパク質の Gtr1、Gtr2 とTor 複合体 1 との相互作用, 日本遺伝学会第 83 回大会, 2011.09.20.
2. 関口猛, 舟越稔, 古野伸明, 小林英紀, Torシグナル伝達系のヘテロ 2 量体Gtr1ーGtr2 のGtr1 とGtr2 の働きの違いの解析, 第 3 3 回日本分子生物学会年会, 2010.12.10.
- 3 Takeshi Sekiguchi, Interaction of AMPK gamma to Nop132, a nucleolar protein. FASEB summer research meeting, 2010, 10.04
4. 関口猛, 舟越稔, 古野伸明, 小林英紀, ヘテロ 2 量体Gタンパク質のGtr1, Gtr2 は単独で相互作用タンパク質Ego1, Ego3 に結合する。 , 日本 遺 伝 学 会 第 8 2 回 大 会, 2010.09.21.
5. Takeshi Sekiguchi, Yoshiaki Kamada, Yoshinori Ohsumi, Yonggang Wang, Hideki Kobayashi, Role of Gtr1-Gtr2 complex formation on their biologic function., The 24th annual symposium of the protein society, 2010.08.03.
6. 関口猛, 鎌田 芳彰, 大隅 良典, 王永剛, 小林英紀, Gtr1-Gtr 2 複合体のTORシグナル経路における機能解析。 , 第 3 2 回日本分子生物学会, 2009.12.11.
7. 関口猛, 王永剛, 小林英紀, Gtr1ーGtr 2 複合体形成にロイシンジッパーモチーフが必須である。 , 日本 遺 伝 学 会 第 8 1 回 大 会, 2009.09.16.

8. Takeshi Sekiguchi, Yonggang Wang, Naoyuki Hayashi, Hiroyuki Toh, Hideki Kobayashi ,Characterization of Gtr1/2 small G proteins.,The 23rd annual symposium of The Protein Society,2009.07.27.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○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://gtr1gtr2.blog.ocn.ne.jp/blog/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口 猛 (SEKIGUCHI TAKESHI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：60187846

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：