

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07330

研究課題名(和文) TOR複合体が刺激に応答して細胞増殖を制御する仕組みの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of growth control via TOR complex in response to inputs.

研究代表者

福田 智行 (Fukuda, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90415282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物間で高度に保存されたTOR複合体(TORC1とTORC2)は、刺激に応じて細胞の増殖や代謝を制御する。分裂酵母をモデルに、TORC1による細胞増殖制御に関与する因子を同定し、各因子の機能を検証することで、増殖制御の機序を明らかにすることを目指した。その結果、栄養に応じたTORC1の活性制御には、3つのシグナル伝達経路がそれぞれ独立に作用することを見いだした。また、TORC1は、タンパク質合成に関わる遺伝子群の発現を調節する転写因子を安定化することで、細胞増殖を促進することが分かった。以上から、「栄養に応答して増殖する」という基本的な細胞現象について、その分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は分裂酵母をモデルに、TOR複合体の活性調節に関わる複数の経路と、TOR複合体の下流で増殖を促進する因子とを同定し、それぞれの特徴付けを行った。これらの経路や因子は高度に保存されているため、哺乳類の細胞増殖においてもTOR複合体が同様に制御されていると予想される。TOR複合体経路は多種の癌細胞で過度に活性化しており、癌の進行を促進することが知られている。また、TOR複合体は代謝や老化にも関与する。したがって、本研究で明らかになったTOR複合体の活性制御機構や下流の因子を標的に、抗腫瘍、アンチエイジング、糖尿病、肥満に関連する創薬や治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Target of rapamycin complex 1 (TORC1) is an evolutionarily conserved protein kinase complex that controls cell growth and metabolism. To understand the molecular mechanism of TORC1-mediated cell growth control, factors involved in TORC1 signaling have been screened for, identified and characterized using fission yeast as a model. This study has revealed that TORC1 is negatively regulated by three signaling pathways in response to nutrient availability. Moreover, a transcription factor, which regulates genes involved in protein synthesis, has been found to be stabilized by TORC1, suggesting that TORC1 promotes cell growth through the activation of protein synthesis via this transcription factor. Thus, this study provides insights into understanding of the mechanisms by which cells grow in response to nutrients.

研究分野：分子生物学

キーワード：TOR TORC1 シグナル伝達 細胞増殖

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物間で高度に保存されている TOR (Target of Rapamycin) キナーゼは、免疫抑制剤ラパマイシンの標的として同定された。多様な生物種における遺伝学的・薬理学的研究から、TOR は栄養・増殖因子・ストレスなどの刺激に応答し、増殖・代謝・形態・分化といった様々な細胞機能を制御するシグナル伝達分子であることが明らかにされた。TOR は、TOR 複合体 1 および 2 (TORC1 および TORC2) と称する 2 種の複合体を形成する。両複合体がリン酸化を介して異なる複数の基質を制御することで、多様な細胞機能をコントロールする。

TORC1 は主に細胞の成長や代謝を制御する。多くの腫瘍細胞では、過度に活性化した TORC1 が増殖を促進することが知られている。TORC1 の阻害が増殖抑制や細胞死を誘導することが見出され、ラパマイシンが抗癌剤として使用されるようになった。さらに、TORC1 の阻害が、マウスをはじめ様々な生物種の寿命を延長するという報告が相次ぎ、注目を集めた。寿命や老化に加え、代謝も制御するため、TORC1 は抗癌剤・アンチエイジング・糖尿病・抗肥満の標的になっている。しかし、TORC1 が制御する細胞機能は多岐に渡るため、例えば癌細胞の増殖抑制を目的に TORC1 を阻害しても、増殖以外の様々な機能に影響を与えてしまう。

近年、TORC1 の局在制御を介して活性を正に調節する Rag 二量体とその関連因子群が同定され、癌抑制因子を含むことから注目されている。しかし、既知の調節だけでは多様な刺激に応答する TORC1 の活性変動を説明できない。また、TORC1 の下流の理解も乏しい。複数の基質が同定されているものの、TORC1 がどの基質や経路を介して個々の細胞機能を制御しているかについては不明な点が多い。例えば、TORC1 は全ての生物で細胞増殖に必須であるが、既知の基質を機能欠損させた細胞は増殖が可能である。こうした未解明の「刺激に応じた TORC1 の活性調節機構」と「TORC1 による細胞増殖制御の機序」が明らかになれば、「細胞は栄養があると増殖する」という根本的な生命現象の原理が分子レベルで理解できるだけでなく、創薬においても、活性調節機構を利用した TORC1 活性の人為的コントロール、副作用やフィードバックによる薬理効果の減衰の阻害、TORC1 下流の多様な細胞機能の中から特に増殖だけを阻害する抗癌剤の開発、などが可能になる。

## 2. 研究の目的

本研究は、「TORC1 がインプットに応じてどのように活性化されているのか」、「TORC1 がどのようにして細胞増殖を制御するのか」について、分子レベルで解明することを目的とした。これまでに、分裂酵母をモデルに因子探索を行い、TORC1 経路の上流から TORC1 活性を調節する因子と、TORC1 の下流で増殖制御を担う因子の候補とを、複数同定してきた。そこで本研究では、これら因子の TORC1 経路における機能と制御を明らかにし、TORC1 のインプットに応じた活性調節機構と、細胞増殖制御の機序についての理解を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Rag 二量体を介した TORC1 活性制御機構

哺乳類細胞において、TORC1 はアミノ酸によって活性化される。この制御の中樞を担うのが低分子量 GTPase の RagA/B と RagC/D からなる Rag 二量体である。アミノ酸が存在すると、RagA/B は GTP 結合型となり、TORC1 と直接結合することで TORC1 をリソソームにリクルートして活性化する。一方、アミノ酸飢餓時には、GAP 活性を有する GATOR1 複合体が加水分解を促すため、RagA/B は GDP 結合型となる。その結果、Rag 二量体と TORC1 の結合が解消し、リソソームから放出された TORC1 は不活化される。

これまでに、分裂酵母の Rag 二量体に相当する Gtr1-Gtr2 複合体と結合するタンパク質を探索し、4 つのタンパク質を同定した。そこで、これらのタンパク質の特徴付けと、遺伝子破壊株の表現型解析を行い、Rag 二量体を介した TORC1 の制御を明らかにした。

### (2) 分裂酵母 GATOR 複合体による TORC1 活性制御機構

GATOR1 複合体は RagA/B の加水分解を促進することで、RagA/B を GDP 結合型にし、TORC1 活性を抑制する。アミノ酸が存在すると、GATOR2 複合体が GATOR1 複合体を阻害するため、GTP 結合型の RagA/B が増加し、TORC1 は活性化される。分裂酵母の GATOR1 構成因子である Npr2 と結合するタンパク質として、GATOR1 構成因子である Iml1 と Npr3 を同定した。そこで、これら GATOR1 構成因子に関して、その特徴付けと、遺伝子破壊株の表現型解析を行い、GATOR 複合体を介した TORC1 の制御を明らかにした。

### (3) 栄養への応答を担う複数の TORC1 上流経路

窒素源飢餓時には、TORC1 活性が低下し、オートファジーが誘導される。GATOR1 の破壊株、もうひとつの TORC1 抑制因子である TSC 複合体の破壊株、これらの二重破壊株では、いずれも窒素源飢餓による TORC1 活性の低下が遅延するものの、TORC1 は不活化し、オートファジーが生じる。したがって、GATOR1 と TSC の他に、TORC1 を負に制御する因子が存在すると予想された。そこで、オートファジーを指標とした遺伝学的探索を行い、Gen2 キナーゼを TORC1 抑制因子の候補として同定した。Gen2 とその関連因子の遺伝子破壊株の表現型解析から、飢餓に応じた TORC1 の活性制御を明らかにした。

#### (4) 転写因子を介した増殖制御機構

TORC1 の下流で増殖制御を担う因子を探索するため、TORC1 欠損株の増殖不全を相補する多コピー抑圧因子を取得した。候補因子の中には、転写因子をコードする遺伝子が含まれていた。そこで、この転写因子を Sot1 (Suppressor of TORC1 deficiency) と名付け、その特徴付けと、遺伝子破壊株の表現型解析を行い、TORC1 による増殖制御の機構に関する知見を得た。

### 4. 研究成果

#### (1) Rag 二量体を介した TORC1 活性制御機構

分裂酵母 Rag 二量体 (Gtr1-Gtr2) と結合する 4 つのタンパク質の 1 つが、哺乳類の Rag 二量体の制御因子である Ragulator 複合体の構成因子 Lamtor2 と、配列上の相同性を示した。そこで、このタンパク質を Lam2 と名付け、他を Lam1、Lam3、Lam4 とした。

まず、免疫沈降実験により、Lam タンパク質同士が結合することを確認したため、Lam タンパク質は複合体を形成することが分かった。Lam タンパク質の細胞内局在を GFP 付加により解析したところ、いずれも液胞 (哺乳類細胞のリソソームに相当する) に局在した。次に、各 Lam タンパク質の遺伝子破壊株において、他の Lam タンパク質の局在を観察した。その結果、Lam タンパク質の液胞局在は Lam1 に依存しており、Lam1 に Lam2 が結合し、そこに Lam3-Lam4 複合体が結合するというモデルを立てた。これを支持するように、Lam1 の N 末端には脂質結合配列が存在し、この配列に変異を導入すると液胞局在が欠損した。したがって、Lam1 は脂質修飾に依存して液胞膜に結合し、Lam 複合体の液胞局在を担うことが示唆された。

Lam タンパク質の遺伝子破壊株ではいずれも、Rag 二量体の液胞局在が欠損していることを見出した。また、Lam1 に核局在化配列を付加することで強制的に核内に局在させると、Rag 二量体も核内に局在した。以上から、Lam 複合体は、哺乳類の Ragulator と同様に、Rag 二量体との結合を介して Rag 二量体を液胞にアンカーすることが明らかになった。したがって、Lam タンパク質は分裂酵母における Ragulator として機能することが示唆された。

Lam タンパク質の遺伝子破壊株はいずれも増殖が著しく遅延していた。遺伝学的解析から、この表現型は、Rag 二量体の遺伝子破壊株が示す増殖欠損と同一であることを確認した。また、Lam タンパク質と Rag 二量体の欠損株では、TORC1 活性が過度に上昇していた。以上から、哺乳類とは異なり、分裂酵母の Rag 二量体と Ragulator は TORC1 を負に制御していることが示唆された。さらに、分裂酵母の TORC1 は、Rag 二量体や Lam タンパク質の遺伝子破壊株においても、液胞に局在できることを確認した。したがって、分裂酵母 TORC1 は Rag 二量体を介さずに液胞に局在して高い活性をもつこと、この活性はそのままでは高すぎて細胞の増殖を妨げるほどであること、Ragulator によって液胞にアンカーされた Rag 二量体は何らかの機構によって TORC1 活性を増殖に適切なレベルまで低下させていること、が示唆された。

#### (2) 分裂酵母 GATOR 複合体による TORC1 活性制御機構

Iml1、Npr2、Npr3 の遺伝子破壊株はいずれも増殖が著しく遅延していた。遺伝学的解析から、この表現型は、Rag 二量体の遺伝子破壊株が示す増殖欠損と同一であることを確認した。また、Iml1、Npr2、Npr3 の遺伝子破壊株では、TORC1 活性が過度に上昇していた。次に、Gtr1 の GDP 結合型固定変異を Iml1、Npr2、Npr3 の遺伝子破壊株に導入したところ、増殖が回復した。以上から、分裂酵母 GATOR1 は GDP 結合型の Gtr1 を産出することで TORC1 活性を負に制御し、増殖に適切なレベルに維持していると考えられる。TORC1 は GATOR1 の有無や、Gtr1 の GTP・GDP 結合に関わらず液胞に局在していたことから、分裂酵母では、TORC1 の局在を介さない形で、GDP 結合型の Gtr1 が TORC1 を抑制する機構が存在するといえる。

次に、GATOR1 複合体に作用する因子の同定を試みた。免疫沈降により GATOR1 複合体を精製して結合因子を解析し、Seh1、Sea2、Sea3、Sea4、Sec13 を同定した。これらは、哺乳類 GATOR2 複合体の構成因子に相当する。したがって、分裂酵母にも GATOR2 が保存されていることが明らかになった。分裂酵母の Seh1、Sea2、Sea4 の遺伝子破壊株を作製して表現型を解析したところ、野生株と同程度の増殖を示した。これは、分裂酵母の増殖には Rag 二量体による TORC1 の活性化は必要なく、むしろ GATOR1 と Rag 二量体が TORC1 を抑制することで活性を増殖に適切なレベルに保つ、というモデルを支持する。一方で、Sea3 の遺伝子破壊株は増殖遅延を示した。遺伝学的解析から、Sea3 は GATOR1 構成因子と同経路で、Rag 二量体を介して TORC1 を負に制御することが見出された。

GATOR 複合体の細胞内局在を GFP 付加により解析し、いずれも液胞に局在することを見出した。GATOR1 の構成因子である Iml1 は、他の構成因子である Npr2 と Npr3 や、GATOR2 構成因子が無くても液胞に局在していた。一方で、Iml1 は他の因子の液胞局在に必要であった。したがって、Iml1 に依存して GATOR 複合体が液胞に形成されるといえる。次に、GATOR2 の構成因子である Sea3 の液胞局在は、他の GATOR2 構成因子を必要としなかった。一方、他の GATOR2 構成因子の液胞局在は Sea3 に依存していた。それ故、Sea3 は GATOR1 と GATOR2 を橋渡しする役割を果たすと考えられる。以上から、分裂酵母では GATOR2 と GATOR1 を連結する Sea3 が、GATOR1 側に組み込まれてその機能を補助している可能性が示された。

### (3) 栄養への応答制御を担う複数の TORC1 上流経路

Gcn2 キナーゼは細胞内のアミノ酸をモニターしており、アミノ酸飢餓に応じて活性化すると、eIF2 $\alpha$  のリン酸化を介して翻訳を抑制するとともに、転写因子 Fil1 の活性化を介して飢餓応答や代謝に関わる遺伝子の発現を調節する。まず、飢餓条件における Gcn2 の活性変動を評価したところ、窒素源飢餓やグルコース飢餓では若干上昇するだけであったが、アミノ酸飢餓において顕著な活性の上昇を認めた。また、アミノ酸飢餓によって TORC1 活性は低下するが、Gcn2 の破壊株ではこの活性低下が見られなかった。さらに、アミノ酸飢餓による TORC1 の不活化には eIF2 $\alpha$  のリン酸化や Fil1 が必要であった。以上から、分裂酵母では Gcn2 経路がアミノ酸飢餓を感知して活性化し、TORC1 を不活化することが明らかになった。

Gcn2 の遺伝子破壊株では、窒素源飢餓に応答した TORC1 の不活化は正常に見られた。一方、TORC1 の負の制御因子である TSC 複合体や GATOR1 と同時に Gcn2 を遺伝子破壊すると、窒素源飢餓に応答した TORC1 の活性低下はほとんど見られなくなった。これは、TSC 複合体や GATOR1 が Gcn2 より早く応答し、TORC1 を抑制するからと考えられる。これを支持する様に、TSC 複合体や GATOR1 の遺伝子破壊株に窒素源飢餓を誘導すると、Gcn2 の活性が上昇することを確認した。以上から、窒素源飢餓は TSC 複合体や GATOR1 によって感知され、TORC1 活性が抑圧されるが、これらの経路が正常に機能しない場合には Gcn2 が活性化され、TORC1 を抑制すると考えられる。したがって、分裂酵母の TORC1 は、TSC 複合体、GATOR1、Gcn2 という 3 つの主要な経路によって活性が制御されていることが示唆された。これらの上流経路は真核生物間で高度に保存されていることから、哺乳類の TORC1 も同様に制御されている可能性がある。

### (4) 転写因子を介した増殖制御機構

遺伝学的探索から、TORC1 の下流で増殖制御を担う因子の候補として同定された転写因子 Sot1 について、さらなる解析を行った。まず、Sot1 をコードする遺伝子をクローニングして過剰発現すると、TORC1 の欠損株の増殖遅延を回復することができた。その際の TORC1 活性を評価したところ、活性自体には影響を与えないことを見出した。したがって、Sot1 は TORC1 の上流から活性化を担う因子ではないといえる。次に、この Sot1 タンパク質の発現変動を調べたところ、Sot1 は飢餓時にプロテアソームによって分解されることが明らかになった。この分解は TORC1 の不活性化によって生じていることも確認した。次に GFP を付加して細胞内局在を観察したところ、Sot1 は栄養増殖時には核内に局在するが、飢餓時には消失することを見出した。以上から、富栄養条件下において、Sot1 は TORC1 によって安定化され、核内で転写に寄与することが示唆された。Sot1 の遺伝子破壊株では増殖に遅延が見られた。また、転写解析を行ったところ、Sot1 の遺伝子破壊株では、タンパク質合成に関わる因子の発現が変動していた。以上から、TORC1 はこの転写因子の安定化によりタンパク質合成を促進し、細胞増殖を正に制御することが示唆された。

本研究を通じて、分裂酵母の TORC1 は、3 つの主要な経路によって活性が制御され、転写因子を介したタンパク質合成の制御により増殖を促進することを明らかにした。研究対象の因子群はいずれも真核生物間で高度に保存されている。そのため、得られた知見を哺乳類細胞で検証することで、TORC1 関連因子を標的とした創薬に結びつく可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukuda Tomoyuki、Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 The Rag GTPase-Ragulator complex attenuates TOR complex 1 signaling in fission yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2018.1444313	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Tomoyuki、Kanki Tomotake	4. 巻 30
2. 論文標題 Molecular mechanism and physiological functions of mitophagy in yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 31 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5685/plmorphol.30.31	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 福田智行	4. 巻 132
2. 論文標題 TORC1シグナル伝達経路を介した細胞の栄養応答機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 新潟医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 77 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda T, Kanki T	4. 巻 41
2. 論文標題 Mechanisms and Physiological Roles of Mitophagy in Yeast	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cells	6. 最初と最後の頁 35-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chia Kim Hou, Fukuda Tomoyuki, Sofyantoro Fajar, Matsuda Takato, Amai Takamitsu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Regulator and GATOR1 complexes promote fission yeast growth by attenuating TOR complex 1 through Rag GTPases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e30880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.30880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福田智行、神吉智丈、塩崎一裕
2. 発表標題 分裂酵母Rag二量体は富栄養条件下でもTOR複合体1を抑制して増殖を促す
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田智行
2. 発表標題 分裂酵母の TORC1 を負に制御する複数の経路
3. 学会等名 第8回TOR研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田智行、塩崎一裕
2. 発表標題 分裂酵母のRag GTPase二量体はTOR複合体1を抑制することで増殖を促進する
3. 学会等名 第58回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田智行
2. 発表標題 TORC1シグナル経路を介した細胞の栄養応答機構
3. 学会等名 第728回新潟医学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田智行
2. 発表標題 分裂酵母のTSC、GATOR1、Gcn2経路は、それぞれ独立にTORC1の窒素源応答を制御する
3. 学会等名 第9回TOR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田智行、神吉智丈、塩崎一裕
2. 発表標題 分裂酵母のTOR複合体1を制御する複数の経路
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	神吉 智丈  (Kanki Tomotake)  (50398088)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	塩崎 一裕 (Shiozaki Kazuhiro) (00610015)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授  (14603)	