

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15414

研究課題名(和文)ホスファチジルセリンによるTOR複合体2シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the regulation of TORC2 signaling by phosphatidylserine

研究代表者

野村 亘(Nomura, Wataru)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：60724292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TOR複合体2(TORC2)は進化的に保存されたタンパク質リン酸化酵素複合体であり、細胞の成長や増殖に必須なシグナル伝達経路を構成する。出芽酵母のTORC2-Pkc1シグナルはTORC2が関与するシグナル伝達経路の一つである。また、TORC2-Pkc1シグナルの活性化には低分子量Gタンパク質Rho1が必要である。本研究では、TORC2-Pkc1シグナルの活性化にホスファチジルセリン(PS)が関与することを見出した。Pkc1のC1領域はRho1との物理的な相互作用に重要であるが、C1領域がPSと親和性を示すことを見出した。また、PSはPkc1とRho1との物理的な相互作用に重要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞増殖に必須なシグナル伝達経路であるTORC2シグナルは、酵母から哺乳動物に至るまで高度に保存されており、がんや老化・寿命などとの関連も指摘されている。しかしながら、TORC2シグナルの活性制御機構については不明な部分が多く、よく分かっていない。本研究では、出芽酵母をモデル生物として利用した解析で、TORC2シグナルの制御機構に主要な細胞膜脂質の一つであるホスファチジルセリンが関与することを見出した。本研究結果は、TORC2シグナルの制御機構の解明のみならず、TORC2とがんや老化・寿命との因果関係に関する新しい知見の提供にも繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：TOR complex 2 (TORC2) is an evolutionarily conserved protein kinase complex that constitutes the signaling pathways required for cell growth. TORC2-Pkc1 signaling is one of the TORC2-involved signaling pathways in budding yeast, and the small GTPase Rho1 is necessary for the activation of TORC2-Pkc1 signaling. In this study, we found that the phosphatidylserine (PS) contributed to the activation of TORC2-Pkc1 signaling. We also showed that the C1 domain of Pkc1 that is important for the physical interaction with Rho1 bound to PS, and PS was necessary for the physical interaction between Pkc1 and Rho1.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：TORC2 Pkc1 Rho1 ホスファチジルセリン 酵母 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

TOR (Target Of Rapamycin) は真核生物に保存されたタンパク質リン酸化酵素であり、細胞の成長や代謝に必須なシグナル伝達経路を構成する。TOR は機能的に異なる2つの複合体 (TOR 複合体1 : TORC1、TOR 複合体2 : TORC2) を形成することで機能を発揮する。

これまでに TORC1 シグナルに関する研究は比較的進んでおり、TORC1 シグナルが翻訳の制御やオートファジーの抑制などに機能することが分かっている。また、酵母-哺乳動物間で共通して、TORC1 シグナルがアミノ酸により活性化することや、その活性化機構に複数の低分子量 G タンパク質が関与することが分かっている。一方、TORC2 シグナルは細胞骨格形成や脂質合成に寄与することや、がん細胞の代謝制御および老化・寿命に関与することが指摘されている。しかしながら、TORC1 シグナルに比べて、TORC2 シグナルの制御機構については不明な部分が多い。

出芽酵母では、細胞膜の伸長のような機械的な膜ストレスが TORC2 シグナルの活性化に関与する。また、顕微鏡観察において TORC2 の細胞内での局在は、細胞膜直下にドット状に観察される。これらのことは、細胞膜と TORC2 との間に機能的な関連があることを示唆している。そこで本研究では、細胞膜を構成する主要なリン脂質の一つであるホスファチジルセリン (PS) に着目して、TORC2 シグナル制御機構における PS の関与について検討するに至った。

## 2. 研究の目的

私はこれまでに、解糖系から派生する代謝物であるメチルグリオキサール (MG、 $\text{CH}_3\text{COCHO}$ ) が酵母-哺乳動物間で共通した TORC2 シグナルの活性化因子として機能する可能性を見出しており、出芽酵母において MG は、TORC2-Pkc1 シグナル伝達経路を活性化する。また、TORC2-Pkc1 シグナルに関与する因子の欠損株は MG に対して高い感受性を示すが、出芽酵母の PS 合成酵素である Cho1 の欠損株が MG に感受性を示した。そこで、MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化に及ぼす PS の影響を検討することで、TORC2 シグナルの制御機構に関する新規な知見の獲得を目的として出芽酵母を用いて解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) TORC2 局在観察

酵母 TORC2 は TOR タンパク質として Tor2 の他に、Avo1、Avo2、Avo3、Lst8、Bit61 の構成成分から形成される。このうち、必須な構成成分の一つである Avo1 に GFP を付加した融合タンパク質 Avo1-GFP を用いて、傾向顕微鏡での観察により TORC2 局在の指標とした。

### (2) Pkc1 の C1 領域の細胞膜脂質への親和性の解析

C1 領域の GST 融合タンパク質 (GST-C1 領域) を大腸菌で発現・精製したリコンビナント GST-C1 領域について、PS を含むリン脂質がスポットされたニトロセルロース膜を用いた lipid overlay assay を行い、C1 領域の細胞膜脂質への親和性を評価した。脂質に結合した GST-C1 領域は、抗 GST 抗体を用いて検出した。

### (3) Rho1 および Pkc1 の物理的相互作用の解析

Rho1 と Pkc1 の物理的な相互作用について、HA タグを付加した Rho1 を利用して、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降実験により評価した。Pkc1 の検出には抗 Pkc1 抗体を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) TORC2-Pkc1 シグナル伝達経路の活性化に及ぼす PS の影響

TORC2-Pkc1 シグナルに及ぼす PS の影響を検討するため、PS 合成不全株である Cho1 欠損株を利用して、Pkc1 の下流因子である Mpk1 MAP キナーゼのリン酸化を指標にして検討を行った。野生株において MG は TORC2-Pkc1

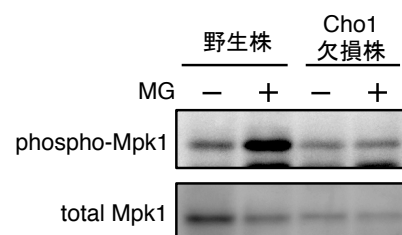


図1. MGによるTORC2-Pkc1シグナルの活性化に及ぼすPSの影響

シグナルを活性化することで Mpk1 のリン酸化を亢進するが、Cho1 欠損株においては、MG による Mpk1 のリン酸化の亢進が著しく抑制された (図 1)。このことは、PS が TORC2-Pkc1 シグナルに関与する可能性を示唆した。Lact-C2 は PS と特異的に結合するタンパク質である。そこで次に、PS の TORC2-Pkc1 シグナルへの関与を検証するため、細胞膜上の PS をマスクする目的で、野生株に Lact-C2 を過剰発現させた。その結果、Lact-C2 過剰発現株においても、MG による Mpk1 のリン酸化が抑制されることを見出した。また、Cho1 の欠損株は MG に対して感受性を示すが、Lact-C2 過剰発現も野生株の MG に対する感受性を高めることを確認した。これらのことから、MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化機構において PS の寄与が考えられた。一方で、酵母を高温条件化に曝す熱ショックストレスもまた、Pkc1 を介して Mpk1 をリン酸化するが、Cho1 欠損株において熱ショックストレスによる Mpk1 のリン酸化は抑制され、Lact-C2 過剰発現は野生株の高温感受性を高めた。

## (2) PS による TORC2-Pkc1 シグナル制御機構

PS が TORC2-Pkc1 シグナルに関与する分子機構を明らかにすることを目的として、PS が TORC2 の局在性に及ぼす影響について検討した。TORC2 は細胞膜直下にドット状に局在することが知られているが、TORC2 構成因子である Avo1 の GFP 融合タンパク質を用いて Cho1 欠損株における TORC2 局在の観察を行ったところ、野生株と Cho1 欠損株との間で TORC2 局在の大きな変化は認められなかった。

Pkc1 が TORC2 による制御を受けるためには、Pkc1 の上流因子である低分子量 G タンパク質 Rho1 との物理的な相互作用が重要である。また、Pkc1 と Rho1 との相互作用には Pkc1 の C1 領域が重要であることが知られているが、in vitro での GST-C1 領域を用いた lipid overlay assay 解析より、C1 領域が PS と物理的に相互作用することを見出した。そこで、PS が Rho1 と Pkc1 との相互作用に関与する可能性について検討した。Rho1 の活性化型 (GTP 結合型) 変異体である Rho1<sup>Q68L</sup> と Pkc1 との結合を共免疫沈降法により解析した結果、Cho1 欠損株において Rho1 と Pkc1 の物理的相互作用が低下することを見出した (図 2)。また、Lact-C2 過剰発現によっても Cho1 の欠損と同様に、Rho1 と Pkc1 の物理的相互作用が低下することを確認した。

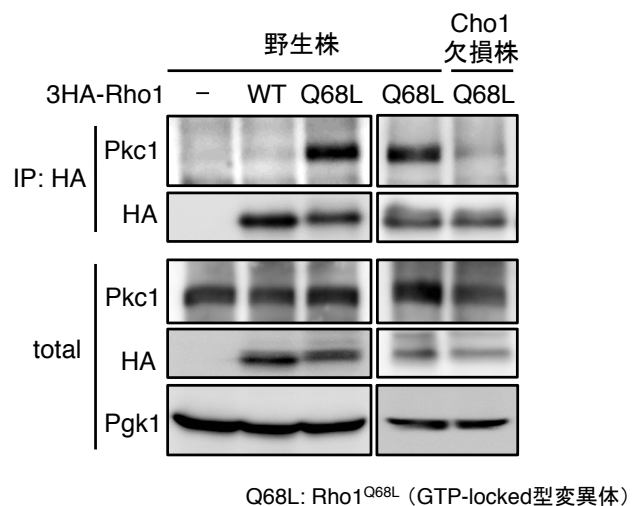


図2. Rho1-Pkc1の物理的相互作用におけるPSの影響

また、Rho1 および Pkc1 はストレス適応時におけるアクチン細胞骨格の組織化に関与するが、PS 合成不全株においてストレス適応時におけるアクチンの組織化 (アクチン再極性化) に不全が観察された。

以上のことは、MG による TORC2-Pkc1 シグナルの活性化機構における PS の作用機序の一つとして、PS が Pkc1 の C1 領域を介した Rho1 と Pkc1 の物理的な相互作用に寄与する機構の存在を示唆しており、TORC2 シグナルの制御機構に PS が関与する可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① [Nomura, W., Maeta, K., and Inoue, Y. \(2017\) Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate is involved in methylglyoxal-induced activation of the Mpk1 mitogen-activated protein kinase cascade in \*Saccharomyces cerevisiae\*. \*J. Biol. Chem.\* 292, 15039-15048 \(査読あり\) doi: 10.1074/jbc.M117.791590.](#)

② [Nomura, W., and Inoue, Y. \(2017\) Contribution of phosphatidylserine to Rho1- and](#)

Pkc1-related repolarization of the actin cytoskeleton under stressed conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Small GTPases* in press (査読あり) doi: 10.1080/21541248.2017.1339766.

- ③ Nomura, W., Aoki, M., and Inoue, Y. (2018) Toxicity of dihydroxyacetone is exerted through formation of methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on actin polarity and nuclear division. *Biochem. J.* 475, 2637-2652 (査読あり) doi: 10.1042/BCJ20180234.

[学会発表] (計 6件)

- ① 野村 亘、河田照雄、井上善晴 「ホスファチジルセリンが関与する酵母 C キナーゼの制御機構」第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会、2017 年 5 月 27 日、大阪大学豊中キャンパス
- ② Wataru Nomura, Teruo Kawada, Yoshiharu Inoue 「Contribution of Phosphatidylserine to Protein Kinase C Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*.」28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)、2017 年 8 月 27 日～9 月 1 日、プラハ、チェコ共和国
- ③ 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、河田照雄、井上善晴 「Cdc42 が関与する出芽酵母 TOR 複合体 2 シグナルの解析」酵母遺伝学フォーラム 第 50 回研究報告会、2017 年 9 月 11 日～13 日、東京大学・弥生講堂
- ④ 野村 亘 「出芽酵母のストレス応答における PKC シグナルの制御機構」第 85 回 酵母研究会講演会、2018 年 7 月 27 日、神戸、キリンビール株式会社神戸工場
- ⑤ 野村 亘、今井杏里沙、後藤 剛、河田照雄、井上善晴 「Pkc1 安定性とリン酸化状態との関連性」酵母遺伝学フォーラム 第 51 回研究報告会、2018 年 9 月 10 日～12 日、九州大学・医学部百年講堂
- ⑥ 野村 亘、今井杏里沙、後藤 剛、河田照雄、井上善晴 「出芽酵母 PKC のリン酸化状態が安定性に及ぼす影響」第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 28 日～30 日、横浜

[図書] (計 1件)

- ① Inoue, Y., and Nomura, W., InTechOpen, The Yeast Role in Medical Applications (Chapter 4: TOR signaling in budding yeast.）、2018

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。