

平成22年 5月1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370082
 研究課題名（和文）プロテインキナーゼ TOR による細胞周期関連タンパク質の分解制御の網羅的解析
 研究課題名（英文）Proteomics analysis of TOR regulation of degradation of proteins involved in cell cycle progression
 研究代表者
 丑丸 敬史（USHIMARU TAKASHI）
 静岡大学・理学部・教授
 研究者番号：50262788

研究成果の概要（和文）：プロテインキナーゼ TOR は栄養源や成長因子に応答して細胞の増殖を制御する。しかし、TOR が各細胞周期の進行をどのように制御しているかはほとんど理解されていない。本研究は、プロテオミクス解析により各細胞周期に関与するタンパク質がラパマイシンによる TOR 不活性化後にどのような変化するかを網羅的に調べた。その結果、TOR が、G1/S, S, metaphase/anaphase, anaphase/telophase 進行を制御していること、DNA ダメージチェックポイント、紡錘体チェックポイントを制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The protein kinase TOR regulates cell proliferation in response to nutrition and growth factors from yeast to human cells. However, little is known how TOR regulates each cell cycle progression. We herein analyzed whether more than 300 proteins involved in cell cycle progression are regulated by TOR at protein levels using proteomics analysis. As a results, it was found that TOR regulates G1/S, intra-S, metaphase/anaphase and anaphase/telophase progressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：TOR、細胞周期、

1. 研究開始当初の背景

(1) プロテインキナーゼ TOR は栄養源や成長因子に応答して細胞の増殖を制御する重要なタンパク質である。しかし、TOR が各細胞周期の進行をどのように制御しているかはほとんど理解されていない。

(2) TOR が転写・翻訳をどのように制御しているかに関しては比較的研究が進んでいるが、TOR がタンパク質分解をどのように制御しているのかに関してはほとんど理解されていない。

(3) 細胞周期制御に関係するタンパク質で

通常の細胞周期では分解が顕著ではないものであっても、栄養源飢餓のようなストレスが加わると最終的な細胞周期停止の過程で分解が促進されるものがあると予想されるが、そのような解析はなされていない。

2. 研究の目的

(1) プロテオミクス解析により、各細胞周期に関与する 300 以上のタンパク質がラパマイシンによる TOR 不活性化後にどのような量的変化を示すかを網羅的に調べる。

(2) プロテオミクス解析により、各細胞周期に関与する 300 以上のタンパク質がラパマイシンによる TOR 不活性化後にどのような分解を示すかを網羅的に調べる。

(3) プロテオミクス解析により、各細胞周期に関与する 300 以上のタンパク質がラパマイシンによる TOR 不活性化後にどのような局在変化を示すかを網羅的に調べる。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の量的変化は TAP タグを各タンパク質に融合させた酵母株ライブラリーを用いて、ラパマイシン処理後の変化をウエスタンブロットにより調べる。

(2) タンパク質の分解は、GAL プロモーターに連結したタンパク質-H6HAZZ 酵母株ライブラリーを用いて、ラパマイシン処理後の変化をウエスタンブロットにより調べる。

(3) 分解への影響が認められたタンパク質に関しては、どのような分解経路が関与しているか明らかにする目的で、ユビキチン化酵素、APC/C および SCF の遺伝子変異株を用いて分解を検証した。

(4) ラパマイシン処理で認められた現象に関しては、それが TOR の下流のどの経路を介しているのか明らかにする目的で、TOR 下流のプロテインキナーゼ、およびプロテインフォスファターゼの変異株を用いてその現象が消失するかどうかを検証した。

(5) 局在変化は GFP タグを各タンパク質に融合させた酵母株ライブラリーを用いて、ラパマイシン処理後の変化を蛍光顕微鏡で調べる。

(6) 細胞周期進行をセルアナライザーおよび細胞形態、核の形状、微小管の形状で調べた。

4. 研究成果

(1) G1/S 進行に関与しているタンパク質の中に、ラパマイシン処理で量が減少するものが多数発見された。これらのことから、TOR の活性がこれらの制御に必要であることが示唆された。その中には、分解がラパマイシン処理で促進されるものが存在した。その分解は、ユビキチン化酵素 SCF に依存していた。さらに、その分解に必要なタンパク

質の配列を同定し、その部分のリン酸化の変化が分解制御に関与することを示唆する結果を、アラニン変異株を用いて得た。

(2) S 期におこる出芽に関与しているタンパク質の中に、ラパマイシン処理で量が減少するものが多数発見された。これらのことから、TOR の活性がこれらの制御に必要であることが示唆された。その中には、分解がラパマイシン処理で促進されるものが存在した。これと呼応して、事実、TOR を不活性化すると出芽、およびセブチンリングの形成が阻害された。

(3) S 期におこる DNA 複製に関与しているタンパク質の中に、ラパマイシン処理で量が減少するものが多数発見された。これらのことから、TOR の活性がこれらの制御に必要であることが示唆された。その中には、分解がラパマイシン処理で促進されるものが存在した。事実、TOR の不活性化により DNA 不活性化により DNA 複製が阻害された。

(4) anaphase/telophase 進行に関与しているタンパク質の中に、ラパマイシン処理で量が減少するものが多数発見された。これらのことから、TOR の活性がこれらの制御に必要であることが示唆された。その中には、分解がラパマイシン処理で促進されるものが存在した。この分解はユビキチン化酵素である APC/C によって阻害されるものもあり、これに関しては APC/C 依存的な分解が TOR 不活性化で促進することが示された。これと一致して、ラパマイシンで TOR を不活性化すると anaphase/telophase の進行が促進されることが明らかとなった。

(5) DNA ダメージチェックポイントを制御しているタンパク質の中に、ラパマイシン処理で量が減少するものが多数発見された。これらのことから、TOR の活性がこれらの制御に必要であることが示唆された。その中には、分解がラパマイシン処理で促進されるものが存在した。その分解は、ユビキチン化酵素 SCF に依存していた。さらに、その分解に必要なタンパク質の配列を同定した。これと呼応して、ラパマイシン処理で、細胞は DNA ダメージ感受性になり、DNA の修復が遅延し、Rad53 の活性化が阻害された。

(6) 紡錘体チェックポイントを制御しているタンパク質の中に、ラパマイシン処理で量が減少するものが多数発見された。これらのことから、TOR の活性がこれらの制御に必要であることが示唆された。その中には、分解がラパマイシン処理で促進されるものが存在した。その分解は、ユビキチン化酵素 APC/C に依存していた。事実、ノコダゾール処理し SAC 活性化により metaphase 停止している細胞にラパマイシン処理を行うと、SAC が不活性化し、anaphase に進行してしまう現象が観察された。その SAC 不活性化は

TOR 下流の脱リン酸化酵素の活性に依存していた。つまり、TOR が不活性化することにより脱リン酸化酵素が活性化し、それが SAC を不活性化す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 20 件)

1. Katsue Daicho, Nishiho Makino, Toshiki Hiraki, Masaru Ueno, Masahiro Uritani, Fumiyo Abe, and Takashi Ushimaru (2009) Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. *FEMS Microbiol Lett.* 298(2):218-27. 査読有
2. 丑丸敬史, 牧野仁志穂, 山田ちひろ (2008) TOR による栄養源に応答したリボソーム合成制御。化学と生物 46(6), 386-391. 査読有
3. 丑丸敬史, 塩田良 (2007) 栄養源に応答した TOR キナーゼによるリボソーム合成制御。蛋白質核酸酵素 52(4), 342-347. 査読有
4. Katsue Daicho, Hironori Maruyama, Asuka Suzuki, Masaru Ueno, Masahiro Uritani and Takashi Ushimaru (2007) The ergosterol biosynthesis inhibitor zaragozic acid promotes vacuolar degradation of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1768(7):1681-1690. 査読有

[学会発表] (計 30 件)

1. G1/S 期進行に必要な SBF/MBF の TOR による量的制御の解析 宮里和実, 柴田典, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史 第32回日本分子生物学会年会(横浜2009. 12. 9-12) (以下同様)
2. TOR は Cdc42 と出芽を制御する 杉野史朗, 水口万裕美, 田澤里沙, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
3. TOR による Nog1 を介した Mcm3 安定性の制御 牧野仁志穂, 本間良美, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 荒木弘之, 丑丸敬史
4. TOR は DNA damage checkpoint の維持に必要である 山口和幸, 宮本郁子, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
5. 出芽酵母における染色体凝集におけるコヒーシンの阻害的関 市原靖子, 岡田朋子, 清水善仁, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
6. 出芽酵母における分裂後期セキュリンによるセパラゼ阻害の解析 端野裕樹, 鈴木あす香, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史

7. 新たな分裂期進行制御キナーゼ TOR : TOR は spindle assembly checkpoint に必要である 山田ちひろ, 丑丸敬史
8. TOR による細胞周期チェックポイント制御 丑丸敬史, 宮本郁子, 山口和幸, 山田ちひろ
9. 分裂酵母 *tor1* 温度感受性変異株の解析 盛山啓史, 石川 優, 南千明, 丑丸敬史, 瓜谷眞裕
10. 分裂酵母 *tor2* ラパマイシン感受性株の解析 石川 優, 一杉篤, 伊藤健悟, 磯村寿朗, 丑丸敬史, 登田隆, 瓜谷眞裕
11. TOR によるリボソーム合成制御 丑丸敬史 (日本農芸化学会 2010. 3. 30 東京)
12. TOR による G1/S 期進行制御機構の解析 柴田典, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史 (第 31 回日本分子生物学会年会 (BMB2008) (神戸 2008. 12. 9-12) 以下同様)
13. TOR による DNA 複製の制御 牧野仁志穂, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
14. TOR による Cdc42 を介した出芽制御 水口万裕美, 田澤里沙, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
15. TOR による spindle assembly checkpoint 制御機構の解明 山田ちひろ, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
16. 分裂後期におけるセキュリンとセパラゼの機能の解析 端野裕樹, 鈴木あす香, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
17. DNA ダメージチェックポイントに TOR は必要である 宮本郁子, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
18. 分裂酵母の *tor2* 変異株の解析 磯村寿郎, 小澤紗弥香, 堀田ゆかり, 丑丸敬史, 登田隆, 瓜谷眞裕
19. TOR による MCM 複合体の維持機構の解析 丑丸敬史, 牧野仁志穂, 本間良美 (2008)
20. 分裂酵母 Tor2 の窒素源取り込みへの関与 堀田ゆかり, 磯村寿郎, 小澤紗弥香, 丑丸敬史, 大吉崇文, 登田隆, 瓜谷眞裕 (第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007) (横浜 2007. 12. 11-15) 以下同様)
21. M 期中期までの姉妹染色体間の接着は Aurora B の機能に必須である 一瀬豊司, 松本健太, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
22. Anaphase における rDNA 部位の染色体凝集機構の解析 岡田朋子, 清水善仁, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
23. 分裂後期におけるセキュリタンパク質の役 鈴木あす香, 大吉崇文, 瓜谷眞裕, 山本歩, 丑丸敬史
24. TOR による CDC タンパク質制御の網羅的解析 (1) 田澤里沙, 柴田典, 宮本郁子, 山田ちひろ, 大吉崇文, 山本歩, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史

25. TOR によるCDC タンパク質制御の網羅的解析 (2) 宮本郁子, 田澤里沙, 柴田典, 山田ちひろ, 大吉崇文, 山本歩, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
26. TOR によるCDC タンパク質制御の網羅的解析 (3) 柴田典, 宮本郁子, 田澤理沙, 山田ちひろ, 大吉崇文, 山本歩, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
27. TOR によるCDC タンパク質制御の網羅的解析 (4) 山田ちひろ, 柴田典, 宮本郁子, 田澤里沙, 大吉崇文, 山本歩, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
28. TOR によるDNA 複製開始制御機構の解析 牧野仁志穂, 丸山裕徳, 本間良美, 大吉崇文, 山本歩, 瓜谷眞裕, 丑丸敬史
29. TOR による DNA 複製制御機構の解析 丑丸敬史, 本間良美, 牧野仁志穂
30. 栄養源に応答した TOR キナーゼによるリボソーム合成 丑丸敬史 酵母細胞研究会 2007.7.13 (つくば)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/%7esbtushi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丑丸 敬史 (USHIMARU TAKASHI)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：50262788

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし