

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03224

研究課題名(和文) 栄養レベルに応答して寿命を調節する細胞内情報ネットワークの研究

研究課題名(英文) Intracellular signaling network that controls lifespan in response to nutrient availability.

研究代表者

塩崎 一裕 (Shiozaki, Kazuhiro)

奈良先端科学技術大学院大学・事務局・学長

研究者番号：00610015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：栄養の摂取制限は、多様な生物種で寿命を延伸するが、栄養に応答して細胞内代謝を制御するタンパク質キナーゼ mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)が、寿命をコントロールする主要因子の1つであると考えられている。我々は、分裂酵母をモデル生物とした解析によって、mTORが細胞内で形成する高分子量複合体 mTOR complex 1 (mTORC1)が、転写抑制因子Maf1をとおりて分裂酵母の継時寿命を制御していることを明らかにするとともに、mTORC1の活性制御機構や基質認識機構についても、新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国を含む先進国の多くで高齢化が進む中、寿命を左右する要因に対する関心はこれまでにないほど高い。食餌制限に寿命延長効果があることは、酵母から哺乳類に至る多様な生物種で報告されており、本研究では遺伝学的操作の容易な分裂酵母をモデルとして、栄養に応答する細胞内因子 mTORC1が寿命を制御する分子メカニズムの一端を明らかにした。本研究で得られた知見を基盤に、ヒトを含む高等生物における栄養と寿命の関係の理解が進むものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Limited nutrient uptake extends lifespan in diverse organisms. The mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR), a nutrient-responsive protein kinase that controls cellular metabolism, is believed to be one of the major regulators of longevity. Using fission yeast as a model system, we have demonstrated that mTOR regulates chronological lifespan through the transcriptional regulator Maf1. Our study has also identified novel mechanisms that control the activity substrate recognition of mTORC1.

研究分野：分子細胞生物学、酵母遺伝学

キーワード：mTORC1 栄養 分裂酵母

### 1. 研究開始当初の背景

放線菌が産生するマクロライド化合物ラパマイシンは、長らく免疫抑制剤として使用されているが、この薬剤には寿命延長効果もあることが、酵母、線虫、ハエ、マウスなど多様なモデル生物で報告されている (Kaeberlein et al. 2005 Science; Harrison et al. 2009 Nature 他)。しかも、ラパマイシンの細胞内標的因子である mTOR キナーゼは、真核生物間で保存されているので、モデル生物を用いた研究によって、ヒトを含む多くの生物種で進化的に保存された寿命制御機構が明らかになることが期待できる。

mTOR は、複数の制御サブユニットと会合して mTOR Complex 1 (mTORC1) と呼ばれる複合体を形成する (Loewith et al. 2002 Mol Cell)。mTORC1 は、アミノ酸などの窒素源やグルコースなどの栄養に応答し、活性化されて細胞内代謝を制御する栄養シグナル伝達経路の中心因子として機能しており、食餌制限やラパマイシンは mTORC1 の活性を抑制することによって寿命の延伸を引き起こすと考えられている (図 1)。

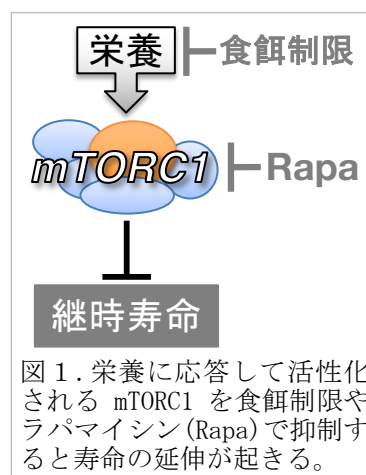


図 1. 栄養に応答して活性化される mTORC1 を食餌制限やラパマイシン (Rapa) で抑制すると寿命の延伸が起きる。

### 2. 研究の目的

本研究では、優れたモデル生物として様々な細胞機構を分子レベルで解明する研究に用いられてきた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を使って、mTORC1 が継時寿命を制御するメカニズムを明らかにすると共に、mTORC1 の活性制御機構の詳細を検討することを目的とする。哺乳類細胞を用いた実験では、G タンパク質 RagA-RagC ヘテロ 2 量体は、栄養にに応答した mTORC1 の活性化を誘導するとされているが (Sancak et al. 2010 Cell)、分裂酵母での遺伝学的解析により、ヒト RagA-RagC に相当する Gtr1-Gtr2 ヘテロ 2 量体 (表 1) は mTORC1 の活性化に必須ではなく、むしろ抑制に重要なことが示された (Chia, Shiozaki et al. 2017 eLife)。これまでさまざまな mTORC1 活性の制御因子が報告されているが、遺伝学的操作の容易な分裂酵母で詳細な解析を行うことで、それぞれの制御因子の役割を再検討するとともに、新規 mTORC1 制御因子の発見を目指す。

表 1. ヒトと分裂酵母の間で保存された mTORC1 制御因子

|                  | <i>H. sapiens</i> | <i>S. pombe</i> |
|------------------|-------------------|-----------------|
| RAG/Gtr GTPases  | RAGA              | Gtr1            |
|                  | RAGB              |                 |
|                  | RAGC              | Gtr2            |
|                  | RAGD              |                 |
| Ragulator/Ego-TC | p18/LAMTOR1       | Lam1            |
|                  | p14/LAMTOR2       | Lam2            |
|                  | MP1/LAMTOR3       | Lam3            |
|                  | HBXIP/LAMTOR4     | Lam4            |
|                  | C7orf59/LAMTOR5   |                 |
| GATOR1/SEACIT    | DEPDC5            | Iml1            |
|                  | NPRL2             | Npr2            |
|                  | NPRL3             | Npr3            |
| GATOR2/SEACAT    | WDR24             | Sea2            |
|                  | WDR59             | Sea3            |
|                  | MIOS              | Sea4            |
|                  | SEH1L             | Seh1            |
|                  | SEC13             | Sec13           |

### 3. 研究の方法

表 1 に示したように、ヒト (*H. sapiens*) で報告されている mTORC1 の制御因子は、分裂酵母でも保存されている。これら分裂酵母相同因子の遺伝子に変異を導入し、表現型や mTORC1 の活性を評価することで、それぞれの因子の機能を検討した。また、分裂酵母ゲノム上のこれら遺伝子にエピトープ配列や Green Fluorescent Protein (GFP) 等の蛍光タンパク質をコードする配列を付加することで、遺伝子産物の検出を行い、因子間の物理的相互作用や細胞内局在を解析した。

分裂酵母細胞内における mTORC1 の活性は、細胞内基質として確立されている Psk1 のリン酸化状態を免疫ブロット法によって検出することで評価した (Chia, Shiozaki et al. 2017 eLife)。

### 4. 研究成果

#### (1) mTORC1 は Maf1 のリン酸化をとおして分裂酵母の継時寿命を負に制御する

Maf1 は、RNA ポリメラーゼ III による tRNA や 5S RNA 遺伝子の転写を抑制する転写因子で、酵母からヒトまで進化的に保存されている。分裂酵母 Maf1 欠損株が、継時寿命が短くなる表現型を示すことから、Maf1 が寿命を伸長させる機能を持つことが示唆された。また Maf1 タンパク質は、細胞内で mTORC1 依存的なリン酸化を受けており、さらに試験管内で mTORC1 キナーゼが Maf1 をリン酸化できたため、Maf1 は mTORC1 の直接の基質である可能性が高い。

GFPを融合したMaf1を発現する分裂酵母株を作成し、富栄養および飢餓条件下で観察したが、mTORC1の活性化状態に関わらず、Maf1は核に局在することが示された。さらに、Maf1とRNAポリメラーゼIIIの核内での相互作用を検出するため、Maf1をGFP、RNAポリメラーゼIIIサブユニットのRpc1をmCherry蛍光タンパク質で二重標識したところ、Maf1とRpc1の核内共局在が顕微鏡下で観察できた。これらの結果は、一部を既に論文として公表している：Shetty *et al.* (2020) Maf1-dependent transcriptional regulation of tRNAs prevents genomic instability and is associated with extended lifespan. *Aging Cell* 19:e13068.

## (2) 分裂酵母 GATOR2 複合体の解析

哺乳類細胞 mTORC1 の活性は、GATOR 複合体によって制御され、GATOR 複合体は GATOR1 と GATOR2 という 2 つのサブ複合体から構成されている。GATOR1 は G タンパク質 RagA の GTPase-Activating Protein (GAP) として mTORC1 活性を抑制し、GATOR2 は GATOR1 の機能を負に制御することによって mTORC1 を活性化するというモデルが提唱されている。分裂酵母 GATOR2 複合体は、Sea2、Sea3、Sea4、Sec13、Seh1 から構成されているが (表 1)、遺伝子破壊実験を行ったところ、Sea3 の遺伝子破壊のみが特徴的な表現型を示した。すなわち、野生株に比べて生育が損なわれるが、mTOR キナーゼの阻害剤であるラパマイシンを培地に添加することでこの生育阻害が相補された。この表現型は、GATOR1 欠損表現型と酷似しており、Sea3 が mTORC1 経路の抑制制御に関わっていることを示唆した。生化学的解析によると、Sea3 は GATOR1 に直接結合しており、また、恒常的に GDP 結合型の Gtr1 変異体を発現することで Sea3 欠損表現型が相補されたことから、Sea3 は GATOR1 複合体の一部として G タンパク質 Gtr1 の GAP として機能していることが強く示唆された (図 2)。これは、Sea3 のヒト相同因子 WDR59 (表 1) が、GATOR1 の機能抑制に働く GATOR2 複合体を構成しているというモデルとは相反する結果であり、極めて興味深い。

この GATOR1-Sea3 複合体は、窒素源飢餓にตอบสนองした mTORC1 の不活性化に重要な役割を果たす。一方、アミノ酸飢餓にตอบสนองして mTORC1 を不活化するのに必要な因子を探索したところ、Gcn2 キナーゼが同定された。Gcn2 は酵母からヒトに至る真核生物に保存されており、アミノ酸飢餓状態の細胞内でアミノアシル化されていない tRNA が生じることによって活性化され、細胞の飢餓応答を誘導する。さらに、Gcn2 の基質である eIF2 $\alpha$ 、さらに下流の転写因子 Fil1 もアミノ酸飢餓にตอบสนองした mTORC1 の抑制に必要なことを示すことができた (図 2)。これらの結果は、一部を既に論文として公表している：Fukuda *et al.* (2021) Tripartite suppression of fission yeast TORC1 signaling by the GATOR1-Sea3 complex, the TSC complex, and Gcn2 kinase. *eLife* 10:e60969.

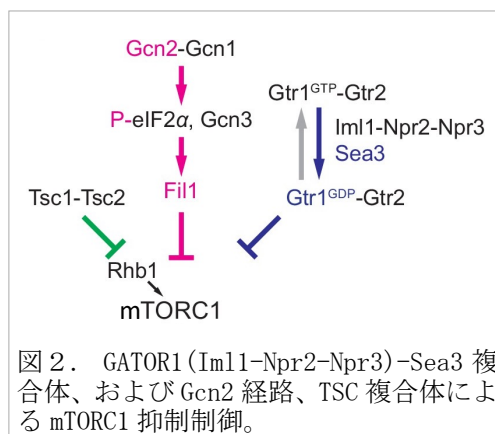


図 2. GATOR1 (Im11-Npr2-Npr3)-Sea3 複合体、および Gcn2 経路、TSC 複合体による mTORC1 抑制制御。

## (3) 進化的に保存された mTORC1 の基質認識機構

哺乳類 mTORC1 の主な基質には、TOR Signaling (TOS) モチーフと呼ばれる短いアミノ酸配列があり、mTORC1 の制御サブユニット RAPTOR がこれに結合することで、特異的な基質認識が行われる。しかしながら、酵母など下等真核生物では、TOS モチーフの存在は報告されていなかった。われわれは、分裂酵母 mTORC1 の基質である Psk1 キナーゼのアミノ末端領域に、哺乳類の TOS モチーフに類似の配列を同定し、この配列が分裂酵母の RAPTOR 相同因子である Mip1 との相互作用、および mTORC1 による Psk1 のリン酸化に必須であることを示した。高等生物 RAPTOR と TOS モチーフの共結晶の構造解析によって、TOS モチーフの認識に関わる RAPTOR 中の残基が既に報告されているが、これに相当する残基を分裂酵母 Mip1 で変異させたところ (*mip1-Y533A*)、TOS モチーフを認識できなくなり、mTORC1 による Psk1 のリン酸化が損なわれた。したがって、TOS モチーフを介した mTORC1 の基質認識機構は、酵母から哺乳類に至る真核生物で保存されていることが示唆された。mTORC1 は、広く真核生物においてオートファジーを制御しており、Atg13 はこの制御機構に関わる mTORC1 の基質の一つである。われわれは分裂酵母 *mip1-Y533A* 変異株中で、Atg13 タンパク質のリン酸化が損なわれることを発見した。Atg13 のアミノ酸配列を調べたところ、TOS モチーフ様配列が一箇所みつき、ここに置換変異を導入すると Atg13 のリン酸化が損なわれることが確認できた。これらの実験から、*mip1-Y533A* 変異を用いることによって、TOS モチーフをもった mTORC1 基質を同定できることが示された。

これらの結果は、既に論文として公表している：

Morozumi *et al.* (2021) Fission yeast TOR complex 1 phosphorylates Psk1 through an evolutionarily conserved interaction mediated by the TOS motif. *J. Cell Sci.* 134:jcs258865.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Fukuda T, Sofyantoro F, Tai YT, Chia KH, Matsuda T, Murase T, Morozumi Y, Tatebe H, Kanki T, Shiozaki K.                           | 4. 巻<br>10              |
| 2. 論文標題<br>Tripartite suppression of fission yeast TORC1 signaling by the GATOR1-Sea3 complex, the TSC complex, and Gcn2 kinase              | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>eLife  | 6. 最初と最後の頁<br>e60969    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.7554/eLife.60969   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Morozumi Y, Shiozaki K   | 4. 巻<br>12              |
| 2. 論文標題<br>Conserved and divergent mechanisms that control TORC1 in yeasts and mammals   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes  | 6. 最初と最後の頁<br>-         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/genes12010088   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Shetty Mihir, Noguchi Chiaki, Wilson Sydney, Martinez Esteban, Shiozaki Kazuhiro, Sell Christian, Mell Joshua Chang, Noguchi Eishi | 4. 巻<br>19              |
| 2. 論文標題<br>Maf1 dependent transcriptional regulation of tRNAs prevents genomic instability and is associated with extended lifespan          | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Aging Cell   | 6. 最初と最後の頁<br>e13068    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/accel.13068   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Morigasaki Susumu, Chin Lit Chein, Hatano Tomoyuki, Emori Midori, Iwamoto Mika, Tatebe Hisashi, Shiozaki Kazuhiro                  | 4. 巻<br>132             |
| 2. 論文標題<br>Modulation of TOR complex 2 signaling by the stress-activated MAPK pathway in fission yeast                                       | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science  | 6. 最初と最後の頁<br>jcs236133 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1242/jcs.236133  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Candiracci Julie, Migeot Valerie, Chionh Yok-Hian, Bauer Fanelie, Brochier Thomas, Russell Brandon, Shiozaki Kazuhiro, Dedon Peter, Hermand Damien | 4. 巻<br>5              |
| 2. 論文標題<br>Reciprocal regulation of TORC signaling and tRNA modifications by Elongator enforces nutrient-dependent cell fate                                 | 5. 発行年<br>2019年        |
| 3. 雑誌名<br>Science Advances   | 6. 最初と最後の頁<br>eaav0184 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1126/sciadv.aav0184   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Morozumi Yuichi, Hishinuma Ai, Furusawa Suguru, Sofyantoro Fajar, Tatebe Hisashi, Shiozaki Kazuhiro                        | 4. 巻<br>134             |
| 2. 論文標題<br>Fission yeast TOR complex 1 phosphorylates Psk1 through an evolutionarily conserved interaction mediated by the TOS motif | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science  | 6. 最初と最後の頁<br>jcs258865 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1242/jcs.258865   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Fukuda Tomoyuki, Shiozaki Kazuhiro  | 4. 巻<br>17                |
| 2. 論文標題<br>Multiplexed suppression of TOR complex 1 induces autophagy during starvation | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Autophagy   | 6. 最初と最後の頁<br>1794 ~ 1795 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/15548627.2021.1938915                               | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>両角佑一、建部恒、塩崎一裕                 |
| 2. 発表標題<br>分裂酵母TORC1構成因子Mip1による基質認識機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第9回TOR研究会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hisashi Tatebe, Keita Oka, Yue Keong Choon, Kazuma Sera, Kazuhiro Shiozaki   |
| 2. 発表標題<br>Identification of the interaction interface between TOR complex 2 and its substrate by in-vitro and in-vivo crosslinking |
| 3. 学会等名<br>The 10th International Fission Yeast Meeting (招待講演) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊計舞、両角佑一、塩崎一裕                         |
| 2. 発表標題<br>分裂酵母mTORC1によるPoI III転写抑制因子Maf1のリン酸化制御 |
| 3. 学会等名<br>酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hisashi Tatebe, Keita Oka, Keong Choon Yue, Kazuma Sera, Kazuhiro Shiozaki |
| 2. 発表標題<br>Roles of the Sin1 subunit of TOR Complex 2 (TORC2)                         |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>塩崎一裕                         |
| 2. 発表標題<br>TORC2複合体のSin1サブユニットによる基質認識機構 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)        |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>両角佑一、伊計舞、塩崎一裕                         |
| 2. 発表標題<br>分裂酵母TORC1によるRNAポリメラーゼIII抑制因子Maf1の機能制御 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会                        |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木原諒也、両角佑一、高木博史、塩崎一裕                  |
| 2. 発表標題<br>mip1変異株を用いた分裂酵母TORC1シグナル経路の新規関連因子の探索 |
| 3. 学会等名<br>酵母遺伝学フォーラム 第54回研究報告会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 細胞シグナル研究室<br><a href="https://bsw3.naist.jp/shiozaki/">https://bsw3.naist.jp/shiozaki/</a> |
|--|

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織                   |                       |    |
| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                 |                                    |  |  |
|---------|-------------------------|------------------------------------|--|--|
| 米国      | Drexel University       | University of California,<br>Davis |  |  |
| インドネシア  | Universitas Gadjah Mada |                                    |  |  |
| ベルギー    | The University of Namur |                                    |  |  |
| 英国      | University of Edinburgh | University of Warwick              |  |  |