

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05949

研究課題名(和文) TORC2シグナルの活性化に寄与する細胞膜脂質の作用機序の解析

研究課題名(英文) Study on the mechanism of action of plasma membrane lipids that contribute to the activation of TORC2 signaling

研究代表者

野村 亘 (NOMURA, Wataru)

京都大学・農学研究科・研究員

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)：TORC2(TOR複合体2)シグナル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重要な役割を担っている。本研究では、ステロールとの親和性を有する合成脂質エデルホシンが酵母のTORC2-Ypk1/2シグナルの活性化を阻害することを見出した。また、エデルホシンによるTORC2-Ypk1/2シグナルの阻害機構に、細胞壁健全性の維持に関わるシグナル伝達経路(CWI経路)が関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜動態とTORC2シグナルの間には機能的な関連が指摘されているが、TORC2シグナルの制御における細胞膜脂質の関与については、未だ不明な部分が多い。一方、哺乳類TORC2シグナルはがんや代謝性疾患などと関連することから、TORC2は創薬ターゲットとしても期待されている。本研究成果は、TORC2シグナルにおいてエルゴステロール動態が関与する新しい制御機構の存在を示唆しており、TORC2シグナル制御機構の理解はTORC2を標的とする創薬にも繋がる知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：TORC2 (TOR complex 2) is an evolutionarily conserved protein kinase complex that is important for cell growth and proliferation. In this study, we found that edelfosine, a compound that has affinity for sterols, inhibited the activation of TORC2-Ypk1/2 signaling in yeast. We also found that the CWI signaling pathway was involved in the mechanism by which edelfosine inhibits the TORC2-Ypk1/2 signaling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：TORC2 シグナル伝達 細胞膜 エデルホシン Ypk1/2 Pkc1 yeast

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TOR (Target Of Rapamycin) は、真核生物に高度に保存されたタンパク質リン酸化酵素である。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し、細胞成長や代謝などの細胞増殖の根幹に関わるシグナル伝達経路を構成する。

これまでに、TORC1 シグナルはアミノ酸等により活性化し、タンパク質合成やオートファジーの制御に関与することが明らかとなっている。また、TORC1 シグナルの活性化機構に複数の低分子量 G タンパク質などが関与することが分かっている。それに対して、TORC2 シグナルは細胞骨格の形成やその極性制御、ならびにスフィンゴ脂質生合成などの代謝調節への関与が明らかとなっているが、TORC2 シグナルの制御機構についてはよく分かっていない。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、TORC2 は AGC キナーゼファミリーに属する Ypk1/2 および Pkc1 を基質とする。また、細胞生物学的解析により、TORC2 は主として細胞膜直下に局在することも明らかとなっている。TORC2-Ypk1/2 シグナルは、細胞膜ストレスなどによって活性化することから、細胞膜と TORC2 との間に機能的な関連があることが示唆されるが、細胞膜動態や細胞膜脂質が TORC2 シグナルの制御機構においてどのようなメカニズムで関与しているのかについては、未だ不明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究者はこれまでに、解糖系より派生的に産生されるメチルグリオキサールが酵母および動物細胞において TORC2 シグナルの活性化因子としての機能を発揮することを見出した。さらに、出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いた遺伝学的解析により、主要な細胞膜脂質であるエルゴステロールの生合成が不全となる遺伝子欠損株がメチルグリオキサールに対して高い感受性を示すことを見出した。これらのことは、エルゴステロールが TORC2 シグナルに関与することを示唆していると考えられた。そこで本研究では、細胞膜と TORC2 シグナルとの関連性において、特にエルゴステロール動態に着目し、TORC2 シグナルの新規な制御機構を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TORC2 シグナル活性の評価

TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性は、TORC2 による Ypk1/2 の hydrophobic motif 内のリン酸化 (Thr662/Thr659) レベルを指標とした。Ypk1/2 のリン酸化は、Thr662/Thr659 のリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化抗体を用いるウエスタンブロットにより検出した。

TORC2-Pkc1 シグナルの活性は、TORC2 による Pkc1 の hydrophobic motif 内のリン酸化 (Ser1143) レベルを指標とした。Pkc1 のリン酸化は、Ser1143 のリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化抗体を用いるウエスタンブロットにより検出した。

(2) Aureobasidin A (AbA) に対する感受性評価

AbA に対する感受性は、AbA を含む寒天培地を用いるスポットアッセイを実施することで評価した。

(3) 遺伝子過剰発現

WSC1/MID2 や *RHO1^{Q68L}* および *PKC1^{R398P}* の過剰発現は、ガラクトース誘導性のプロモーターである *GAL1* プロモーターを利用し、ラフィノースを炭素源とする培地で細胞を対数増殖期まで培養し、ガラクトースを添加することで遺伝子発現を誘導した。

4. 研究成果

(1) エルゴステロール動態が TORC2-Ypk1/2 シグナルに及ぼす影響

エルゴステロールの生合成不全が TORC2-Ypk1/2 シグナルに及ぼす影響を検討するため、メチルグリオキサールに対して高い感受性を示したエルゴステロール生合成不全株 (*erg2Δ*、*erg3Δ*、*erg6Δ*) を用いて TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化を評価した。TORC2-Ypk1/2 シグナルは、AbA などのスフィンゴ脂質生合成の阻害剤などにより活性化されるが、エルゴステロール生合成不全株における AbA による TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化に、野生株との顕著な差異は認めなかった。また、メチルグリオキサールも TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化を引き起こしたが、AbA と同じく、メチルグリオキサールによる TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化にエルゴステロールの生合成不全の影響は認められなかった。

次に、細胞膜におけるエルゴステロール動態が TORC2-Ypk1/2 シグナルに影響を及ぼす可能性について解析するため、エルゴステロールを標的とする、あるいはエルゴステロールに親和性を示す薬剤であるアムフォテリシン B、ナイスタチン、ならびにエデルホシンの影響について検討した。その結果、アムフォテリシン B、ナイスタチン、ならびにエデルホシンは AbA や MG

による TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化を抑制した。しかしながら、アムフォテリシン B およびナイスタチンは、TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害活性とともに強い細胞毒性を示した。一方、合成リゾリン脂質であるエデルホシンの場合、TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害する濃度域において強い細胞毒性は認められなかったことから、今後の解析にはエデルホシンを用いることとした。

Ypk1/2 の変異株などの TORC2-Ypk1/2 シグナルが不全となる変異株は、AbA に対して高い感受性を示す。エデルホシンが AbA 感受性に及ぼす影響について検討した結果、野生株をエデルホシンで前処理することで AbA への感受性が亢進することを見出した。

これらのことから、エルゴステロール動態に影響を及ぼすエデルホシンに TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害作用があることが示唆された。

(2) エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナル阻害機構の解析

エデルホシンの細胞膜への取り込み能と TORC2-Ypk1/2 シグナル阻害作用との関連

エデルホシンは、細胞膜フリッパーゼ活性依存的に細胞膜に取り込まれると考えられている。エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害作用において、エデルホシンが細胞膜に取り込まれることで阻害作用が発揮されることを検証するため、細胞膜フリッパーゼの調節サブユニットである Lem3 の欠損株を用いて検討した。その結果、エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害作用は Lem3 欠損株において著しく減少したことから、エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害作用はエデルホシンが細胞膜に取り込まれることで発揮されると考えられた。

エデルホシンによる CWI (Cell Wall Integrity) 経路の活性化

酵母 C キナーゼである Pkc1 は、TORC2 により制御される (TORC2-Pkc1 シグナル) 以外に、細胞壁健全性の維持に関わるシグナル伝達経路である CWI 経路の構成因子として機能し、細胞壁損傷ストレスなどに曝されると下流の Mpk1 MAP キナーゼを活性化することでストレス応答に関与する。

エデルホシンが TORC2-Ypk1/2 シグナル以外に、TORC2-Pkc1 シグナルも阻害する可能性について検討したところ、TORC2 による Pkc1 のリン酸化レベルはエデルホシンの有無による大きな影響は受けなかった。従って、TORC2-Pkc1 シグナルはエデルホシンによる阻害作用を受けないと考えられた。しかしながらその一方で、Pkc1 の下流因子である Mpk1 MAP キナーゼのリン酸化レベルがエデルホシンにより亢進することを見出した。エデルホシンによる Mpk1 のリン酸化は、CWI 経路のセンサー分子である Wsc1/Mid2 の欠損株や Pkc1 の変異株において著しく減少した。これらのことから、エデルホシンは CWI 経路の活性化を引き起こしていると考えられた。

エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナルの阻害作用における CWI 経路の関与

エデルホシンが CWI 経路の活性化を引き起こしたことから、エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナル阻害機構における CWI 経路の関与について検討した。CWI 経路のセンサー分子 Wsc1/Mid2 の欠損株では、エデルホシンによる CWI 経路の活性化を抑制されたが、TORC2-Ypk1/2 シグナル阻害作用もまた抑制された。一方、Mpk1 ならびにその上流の MAPKKK にあたる Bck1 の欠損は、エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナル阻害作用に影響を及ぼさなかった。これらのことは、エデルホシンによる TORC2-Ypk1/2 シグナル阻害作用は CWI 経路の活性化を介して発揮されるが、CWI 経路の下流に位置する Mpk1 MAP キナーゼカスケードには依存しないことを示唆していると考えられた。

また、Wsc1 や Mid2 の過剰発現、ならびに CWI 経路を構成する低分子量 G タンパク質 Rho1 や Pkc1 の構成的活性化型変異体 (Rho1^{Q68L} および Pkc1^{R398P}) の過剰発現によっても TORC2-Ypk1/2 シグナルの活性化が阻害されることを見出した。

以上の研究成果は、エルゴステロール動態が TORC2-Ypk1/2 シグナルの制御に寄与する可能性を示すとともに、CWI 経路による TORC2-Ypk1/2 シグナルの負の制御機構の存在を示唆していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ng Su-Ping, Nomura Wataru, Takahashi Haruya, Inoue Kazuo, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Methylglyoxal attenuates isoproterenol-induced increase in uncoupling protein 1 expression through activation of JNK signaling pathway in beige adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101127 ~ 101127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101127	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 Nomura Wataru, Aoki Miho, Inoue Yoshiharu	4. 巻 10
2. 論文標題 Methylglyoxal inhibits nuclear division through alterations in vacuolar morphology and accumulation of Atg18 on the vacuolar membrane in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70802-8	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 Nomura Wataru, Futamata Ryota, Inoue Yoshiharu	4. 巻 1865
2. 論文標題 Role of RhoGAP Rgd1 in Pkc1 signaling-related actin repolarization under heat shock stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129853 ~ 129853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2021.129853	査読の有無 有
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 Ng Su-Ping, Nomura Wataru, Mohri Shinsuke, Takahashi Haruya, Jheng Huei-Fen, Ara Takeshi, Nagai Hiroyuki, Ito Tetsuro, Kawada Teruo, Goto Tsuyoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Soy hydrolysate enhances the isoproterenol-stimulated lipolytic pathway through an increase in α -adrenergic receptor expression in adipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1782 ~ 1789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1611413	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇田竜成、向山佳歩、野村 亘、井上善晴
2. 発表標題 出芽酵母ピルビン酸デカルボキシラーゼIの機能と細胞内局在性の関連
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Su-Ping Ng, Wataru Nomura, Haruya Takahashi, Kazuo Inoue, Teruo Kawada, Tsuyoshi Goto
2. 発表標題 Methylglyoxal inhibits isoproterenol-induced Ucp1 expression in beige adipocytes
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田竜成、向山佳歩、井上善晴、野村 亘
2. 発表標題 Saccharomyces cerevisiaeにおけるピルビン酸デカルボキシラーゼI欠損は2-デオキシグルコース感受性を高める
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 CWI経路が関わるTORC2シグナル制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 造田みな美、野村 亘、高橋春弥、井上和生、後藤 剛
2. 発表標題 酢酸由来アセチルCoA産生経路が脂肪細胞の分化と機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第514回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Su-Ping Ng, Wataru Nomura, Haruya Takahashi, Kazuo Inoue, Tsuyoshi Goto, Teruo Kawada, Yoshiharu Inoue
2. 発表標題 Methylglyoxal is Involved in Insulin Resistance via Activation of mTORC1/S6K Pathway in Adipocytes
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、井上善晴
2. 発表標題 Edelfosineを用いたTOR複合体2シグナル制御機構の解析
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

1. 発表者名 野村 亘、後藤 剛、高原照直、前田達哉、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 出芽酵母cell wall integrity経路が関わるTOR複合体2シグナル制御機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 亘、青木美穂、後藤 剛、河田照雄、井上善晴
2. 発表標題 メチルグリオキサールによる出芽酵母の核分裂阻害機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------