

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06630

研究課題名(和文) 真核細胞が低濃度グルコース環境に適応するために必要な2つのTOR複合体の役割

研究課題名(英文) The role of two TOR complexes in adaptation of eukaryotic cells to the low-glucose environment

研究代表者

豊田 雄介 (Toyoda, Yusuke)

久留米大学・分子生命科学研究所・講師

研究者番号：10587653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母は幅広いグルコース濃度で活発に増殖するが、低濃度では糖輸送体Ght5がTORC2経路により細胞表面に局在する必要がある。本研究はその仕組みを解明した。TORC2経路を欠損するgad8変異体の増殖欠損を抑制する変異として新規アレスチンAly3を見出した。一般にアレスチンは膜タンパク質のコピキチン化を促進する。そこでgad8やaly3変異細胞におけるGht5のコピキチン化を検出した結果、TORC2経路はAly3依存的なGht5のコピキチン化を抑制することでGht5の表面局在を保障することを見出した。また、グルコースではなく窒素源(アミノ酸)がGht5の表面局在に必要であることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は今まで不明だった、TORC2経路が糖輸送体Ght5の細胞表面局在を保障する分子メカニズムを明らかにした。分裂酵母の4種類のアレスチンのうちAly3だけがGht5のコピキチン化とそれに伴い起こる液胞輸送を促進し、そしてAly3のこれらの機能はTORC2経路により抑制されることが解明された。さらに、窒素源枯渇環境下でGht5がAly3依存的に液胞輸送されることは、栄養環境によるTORC2経路の調節を示唆する。また、本研究は細胞がグルコースと窒素源(アミノ酸)という異なる栄養素をバランス良く取り込むしくみの一端を解明したと言え、この知見は新しいがん治療法開発の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Fission yeast cells vigorously proliferate in the presence of a wide range of glucose concentrations, whereas at concentrations equivalent to human blood glucose (0.08%), the hexose transporter Ght5 has to be retained at the cell surface by the Target of Rapamycin Complex 2 (TORC2) pathway that includes Tor1 and Akt-like Gad8 kinases. In this research, we studied the mechanism of this process. We found an uncharacterized arrestin, Aly3, mutations of which suppressed the defects in proliferation and Ght5 localization caused by gad8 mutation. Arrestins promote ubiquitination of membrane proteins including transporters. We thus detected ubiquitination of Ght5 in gad8 and aly3 mutant cells, and found that the TORC2 signaling pathway ensures the cell surface localization of Ght5 by attenuating Aly3-dependent ubiquitination of Ght5. In addition, we have found that it is nitrogen sources (amino acids) but not glucose that determines the cell-surface localization of Ght5.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アレスチンAly3 グルコース欠乏環境 TORC2 Akt様キナーゼGad8 Ght5 コピキチン化 液胞輸送 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

栄養環境の変化に対する細胞応答において、TORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) および TORC2 が関わるシグナル伝達経路は重要な役割を果たす。TORC1 はアミノ酸や成長因子により活性化して蛋白質合成や細胞成長を促進する一方、オートファジーを抑制する。TORC2 はグルコースやインスリン等により活性化して糖代謝、細胞増殖やエンドサイトーシス等を制御することが知られている。

我々は、低濃度グルコース環境での分裂酵母細胞の増殖に必要な遺伝子を探索してきており、その過程で、六炭糖輸送体 Ght5 と TORC2 経路が必要であることを示してきた。分裂酵母は研究室では 2 - 3% グルコース存在下で培養するが、そのような高グルコース環境では Ght5 の発現は抑制されている。分裂酵母をヒト血糖値(0.08-0.1%)程度の低グルコース環境で培養すると、*ght5* 遺伝子の転写が誘導されるだけでなく、Ght5 の細胞表面局在が促進される。TORC1 の構成因子をコードする *tor2⁺* や *mip1⁺* 遺伝子の変異体は低グルコース環境で正常に増殖した。一方、TORC2 の構成因子である Tor1 キナーゼやその下流で機能する Akt 様キナーゼ Gad8 は、低グルコース環境での Ght5 の細胞表面局在に必要であるために、これらの欠損変異体では Ght5 は細胞質に局在し、低グルコース環境での増殖に欠損を示すことを我々は報告した(Saitoh et al, 2015, Mol Biol Cell)。しかし、TORC2 経路が Ght5 の細胞表面局在を保障する仕組みは不明であった。

2. 研究の目的

TORC2 経路が Ght5 の細胞表面局在を保障する仕組みを理解するために、低頻度で生じる、低グルコース環境で増殖する *gad8* 変異細胞が持つ遺伝子変異を全ゲノムシーケンスにより決定した。見出された遺伝子変異には、(1) TORC1 を抑制する遺伝子群と、(2) 膜タンパク質の液胞輸送に必要な遺伝子群の二つに大別された。低グルコース環境では TORC1 活性は低下していることが報告されているため(Nakashima, 2010, J Cell Sci)、(1) の遺伝子変異は TORC1 を異時に活性化して Ght5 の液胞輸送を抑制しているものと考えた。そこでグループ(2)のうち、アレスチンドメインを持つ機能未解析タンパク質をコードする SPCC584.15c に着目して研究を行った。本研究は、この SPCC584.15c が TORC2 経路を介して Ght5 の細胞表面局在を調節する分子メカニズムを理解することを目的とした。また、この分子メカニズムの進化上の普遍性を検討した。

3. 研究の方法

- ・低濃度グルコース環境での細胞増殖における TORC2 経路や SPCC584.15c の役割を検討するために、分裂酵母細胞を異なるグルコース濃度の固形培地にスポットしてその増殖を観察した(スポットテスト)。
- ・Ght5-GFP の表面局在における TORC2 および SPCC584.15c の効果を、Ght5-GFP を発現する分裂酵母細胞の蛍光顕微鏡を用いた観察によって、解析した。
- ・Ght5-GFP の表面局在における培養液のグルコース濃度や窒素源(アミノ酸)濃度の効果を、蛍光顕微鏡観察によって解析した。
- ・定量的 PCR 法によって、SPCC584.15c の mRNA 量を測定した。
- ・Ght5-GFP を免疫沈降法により精製し、ウエスタンブロット法によって、Ght5-GFP のコピキチン化を検出した。

4. 研究成果

(4-1) SPCC584.15c/*aly3* の欠損変異は、*gad8* 変異体が示す増殖欠損と Ght5 の局在異常をレスキューした。

SPCC584.15c はアレスチン様ドメインおよび一部の E3 コピキチンリガーゼと相互作用する PY モチーフを持ち、それらドメインの配置パターンがヒト アレスチンと同等であったため、Aly3 (Arrestin-like protein in yeast 3) と命名した。

aly3 の欠損変異または遺伝子破壊変異を持つ *gad8* 変異体は、0.02 ~ 0.08% の低濃度グルコース環境でも野生型細胞と同等の増殖能を示した。一方、*gad8* 変異体は低濃度グルコース環境でほとんどコロニーを形成しなかった(図1)。

低濃度グルコース環境における Ght5 の細胞内局在を観察したところ、*gad8* 変異細胞では Ght5 は液胞に観察された。一方で *gad8 aly3* 変異細胞では Ght5 は表面にのみ観察された。

また、上記のグループ(2)の遺伝子群には、ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) 経路の構成因子が 5 つ(*Sst4*, *Hse1*, *Sst6*, *Vps25*, *Bro1*) 含まれていた。これらの遺伝子を欠損した *gad8* 変異体はいずれも低濃度グルコース環境での細胞増殖が改善し、なおかつ、Ght5 の細胞表面局在は部分的にレスキューされた。

以上の結果から、Gad8 は Ght5 の液胞輸送を抑制する一方で Aly3 は促進することが分かり、Gad8(TORC2 経路) と Aly3 は相反する機能を持つと考えられる。

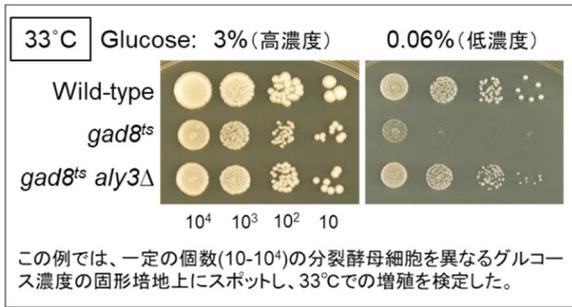


図 1
gad8 変異株の低濃度グルコース環境における増殖欠損は、*aly3* 欠損によりレスキューされる。

(4-2) 分裂酵母の他の アレスチンである Aly1, Aly2, Rod1 の欠損は、*gad8* 変異体が表示する低グルコース環境での増殖欠損や Ght5 の局在異常をレスキューしなかった。

分裂酵母には Aly3 と同様のドメイン配置を持つタンパク質が他に Aly1, Aly2, Rod1 の 3 つ存在するため、これらを欠失した *gad8* 変異体を作製し、その低濃度グルコース環境での増殖や Ght5 の細胞表面局在を検討した。その結果、*gad8 aly3* 変異細胞では Ght5 は細胞表面にのみ観察された一方で、*gad8 aly1*, *gad8 aly2*, *gad8 rod1* 変異細胞のいずれでも *gad8* 変異細胞と同様に Ght5 は液胞に観察された。そして、*gad8 aly1*, *gad8 aly2*, *gad8 rod1* 変異株は *gad8* 変異株と同様に低グルコース環境での増殖に欠損を示した。この結果は、Ght5 の液胞輸送を担うアレスチンは Aly3 であり、その役割は他の アレスチンとは共有されていないことを示唆する。

(4-3) TORC2 経路は、Aly3 依存的な Ght5 のユビキチン化と液胞輸送を抑制することによって Ght5 の表面局在を保障する。

一般に アレスチンは PY モチーフとアレスチン様ドメインを介して、E3 ユビキチンリガーゼを膜タンパク質ヘリクルートするアダプターとして振る舞うと考えられている。ユビキチン化された膜タンパク質は ESCRT 複合体により認識され、液胞(またはリソソーム)へ選別輸送される。そこで私は Ght5 が Aly3 を介してユビキチン化されると考え、また、このユビキチン化における TORC2 経路の役割を検討した。

免疫沈降法(IP)で精製した Ght5-GFP を抗ユビキチン抗体で検出すると、約 110 kDa のバンドが確認され、これはユビキチン化型 Ght5-GFP であると考えられる。このバンドは、野生株では微量観察された一方で、*gad8* 変異株や *tor1Δ* 変異株ではそのバンドは 2-4 倍程度強く観察された。そして、*gad8 aly3* 変異株ではこのバンドは失われた(図 2)。

この結果と以上の結果から、TORC2 経路は Aly3 依存的な Ght5 のユビキチン化を抑制することによって、Ght5 の表面局在を保障すると結論した。

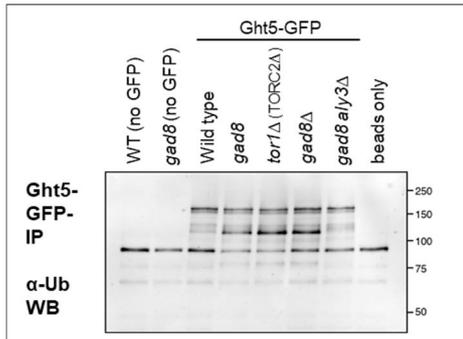


図 2
TORC2 経路は、Aly3 依存的な Ght5 のユビキチン化を抑制する。

低濃度グルコース環境で培養した各細胞株から Ght5-GFP を免疫沈降法(IP)で精製し、ユビキチン化 Ght5 を抗ユビキチン抗体で検出した。

(4-4) アミノ酸(窒素源)枯渇環境において Ght5 は Aly3 依存的に液胞へ輸送される。

次に、Ght5 の細胞内局在が調節を受ける栄養条件を探索した。分裂酵母を培養するアミノ酸を含まない合成培地には、塩化アンモニウムが唯一の窒素源として用いられる。培養液中のグルコース濃度を低下させても、あるいは増加させても、Ght5 の液胞局在は観察されなかった。対照的に、野生型細胞を窒素源枯渇環境で培養すると、2-4 時間で Ght5 は液胞に観察された。この液胞局在は *aly3* 変異細胞では観察されなかったことから、窒素源枯渇環境での Ght5 の液胞輸送は Aly3 依存的であると考えられる。また、ロイシン合成に必要な *leu1+* 遺伝子の欠損変異細胞を用いて、塩化アンモニウムではなくアミノ酸(ロイシン)を枯渇する細胞を作製したところ、ロイシン枯渇環境で Ght5 は液胞に観察された。

窒素源枯渇環境で Ght5 が液胞局在を示す生理的な意義を検討するために、野生株と *aly3* 変異株を低グルコースおよび窒素源枯渇環境で培養し、生存率をコロニー形成能で測定した。野生株は 7 日間のあいだ高い生存率(60~70%)を維持していた一方で、*aly3* 変異株は 7 日間のあいだに生存率が実験開始時(60~65%)から約 30%にまで低下した。また、定量的 PCR 法を行ったところ、*aly3* の mRNA 量はグルコース濃度や塩化アンモニウム濃度にほとんど影響されなかった。これらの結果から Aly3 は、低グルコースおよび窒素源枯渇環境での分裂酵母細胞の生存率の維持に重要であることが明らかとなった。窒素源(アミノ酸)枯渇環境では、細胞が生存するためには窒素源を確保するために Ght5 を始めとするタンパク質を液胞で分解する必要があると考えら

れ、その過程に Aly3 が重要な役割を果たすものと考えられる。以上の知見、特に TORC2 経路や栄養素による Ght5 局在調節における知見をまとめたモデルを図 3 に示す。

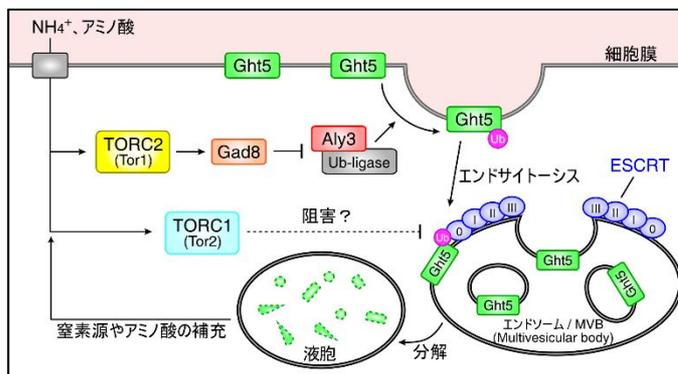


図 3
TORC2 経路および窒素源が Ght5 の細胞表面局在を調節する仕組みについてのモデル。

(4 - 5) アミノ酸欠乏環境にあるヒト培養細胞では、糖輸送体 GLUT1 は細胞表面から アレスチン TXNIP 依存的に失われる。

分裂酵母で得た、上記のような知見がヒトでも保存されている可能性を検討した。アミノ酸の欠乏による糖輸送体の局在の変化におけるアレスチンの役割はほとんど理解されていない。Aly3 と Ght5 のヒトホモログはそれぞれ TXNIP と GLUT1 である。アミノ酸を含まない培地と、限外ろ過により作製したインスリンを含むがアミノ酸を含まない血清を用いて、アミノ酸欠乏培地を調製した。アミノ酸欠乏環境では、コントロール RNAi 細胞では培養液に接する細胞表面から GLUT1-EGFP の局在が失われた。一方で、TXNIP RNAi ノックダウン細胞では GLUT1-EGFP の表面局在は維持された。この結果からヒトでもアミノ酸に反応してアレスチンが抑制されるしくみが存在するものと考えられる。このアレスチンを抑制する因子が分裂酵母と同様に TORC2 や Akt キナーゼであるか現状では不明であり、今後の課題の一つである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toyoda Y, Soejima S, Masuda F, Saitoh S.	4. 巻 134
2. 論文標題 TORC2 inhibition of -arrestin Aly3 mediates cell surface persistence of S. pombe Ght5 glucose transporter in low glucose	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.257485	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 Toyoda Y, Saitoh S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Fission yeast TORC2 signaling pathway ensures cell proliferation under glucose-limited, nitrogen-replete conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom11101465	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 Uehara Lisa, Saitoh Shigeaki, Mori Ayaka, Sajiki Kenichi, Toyoda Yusuke, Masuda Fumie, Soejima Saeko, Tahara Yuria, Yanagida Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiple nutritional phenotypes of fission yeast mutants defective in genes encoding essential mitochondrial proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 200369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.200369	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 豊田雄介	4. 巻 40
2. 論文標題 グルコース飢餓への適応におけるTORC2経路の役割 - アミノ酸が糖代謝を制御するしくみ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1124-1130
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yusuke Toyoda
2. 発表標題 Nitrogen-dependent persistence of <i>S. pombe</i> Ght5 glucose transporter on the cell surface is mediated by TORC2 inhibition of -arrestin Aly3
3. 学会等名 pombeTalks S02 E08 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田雄介
2. 発表標題 TORC2 inhibits -arrestin Aly3-dependent vacuolar transport of the <i>S. pombe</i> hexose transporter Ght5
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田雄介
2. 発表標題 分裂酵母六炭糖輸送体Ght5の細胞内局在を制御するアレスチンAly3のTORC2経路によるリン酸化機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	齋藤 成昭 (Saitoh Shigeaki)	久留米大学・分子生命科学研究所・教授 (37104)	

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