

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570225

研究課題名(和文) 定量的リン酸化プロテオミクスによるTORシグナルリン酸化ネットワークの解析

研究課題名(英文) Quantitative phosphoproteomics analysis of the TORC1 signaling

研究代表者

丑丸 敬史 (Ushimaru, Takashi)

静岡大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50262788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は栄養が十分にある時には増殖するが、そうでない時には増殖を停止し、細胞内成分を分解して栄養分を生み出さなければならない。TORC1タンパク質リン酸化酵素はその栄養をモニターする重要なタンパク質である。しかし、TORC1がどのような細胞内イベントを制御しているのか、その全貌は不明である。我々は以前、TORC1が特異的阻害剤により不活性化すると、大規模にタンパク質の分解が引き起こされることを明らかにした。本研究はそれに引き続き、その機構を調べる目的でTORC1を不活性化させた際に、細胞内で引き起こされるタンパク質のリン酸化状態の変化を大規模に解析し、多くのTORC1のターゲットを同定した。

研究成果の概要(英文)：Cells control cell growth and proliferation in response to nutrients. The target of rapamycin complex 1 (TORC1) protein kinase is the center of this nutrition-responsible system and regulates various cellular events in response to nutrition. However, the full view of downstream events is largely unknown. We have previously shown that when cells were treated with the specific TORC1 inhibitor rapamycin, a huge number of proteins were degraded, suggesting that TORC1 mediates protein degradation via phosphorylation. It is very important to disclose of which proteins phosphorylation is changed by TORC1 inactivation. Here we performed quantitative phosphoproteomics analysis to dissect this issue. We found that phosphorylation of a lot of proteins were increased or decreased after rapamycin treatment.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：TOR TORC1 *Saccharomyces cerevisiae* リン酸化プロテオミクス ラパマイシン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化はタンパク質の機能(構造変換、活性、局在、タンパク質間の相互作用)に大きな影響を与える。それを制御しているタンパク質リン酸化酵素は細胞の機能制御に極めて重要な働きを担っている。

当研究室はそのタンパク質リン酸化酵素の中でも、現在非常に注目されている TORC1 キナーゼを研究している。TORC1 は、酵母からヒトまで広く存在し栄養源に反応して細胞成長を制御している。細胞は外部の栄養に応じて行う活動の取捨選択をしている。それはあたかも収入によって支出をコントロールする我々の営みに似ている。TORC1 はその中心にいて、栄養源の多寡、質に応じて、細胞が何をすべきなのかを決定しているとても重要なタンパク質である。TORC1 が制御しているイベントとして知られているものとしては、遺伝子の転写、タンパク質の翻訳、オートファジー、細胞成長、細胞老化、がん、肥満が挙げられる(図1)。TORC1 の特異阻害剤であるラパマイシンで細胞を処理すると細胞老化、がんが抑制されることが明らかになっている。また免疫細胞の増殖も阻害されるため、ラパマイシンは有用な免疫抑制剤ともなっている。このように、TORC1 シグナル伝達系を明らかにすることは、基礎生物学の分野にとどまらず、医学への応用においても極めて重要である。

栄養はすべての細胞活動にとって重要であり、TORC1 がそのすべてを何らかの形で制御しているであろうと想像される。そのため、TORC1 が制御する、そのあまりにも多いイベントの全体像はいまだに不明である。その全体像が把握されていないと、ラパマイシンを使用した際の予期せぬ深刻な副作用が起こることは十分に考えられる。例えば、上記の免疫抑制効果は臓器移植患者にとっては重要であるが、通常生活を送っている人間にとっては致命的である。

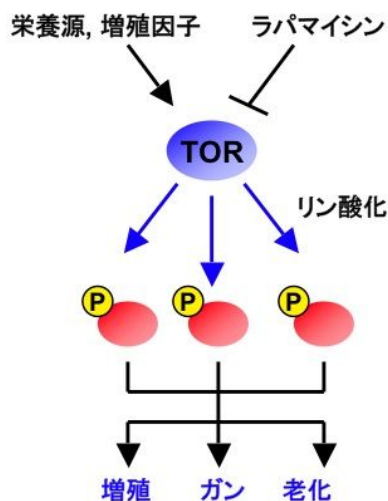


図1 TORC1 シグナル

加えて、その膨大なイベントに比べて TORC1 がリン酸化しているターゲット因子は数えるほどしか見つかっていないのが実情である。さらに、TORC1 の直接のターゲットとして、SCH9、ATG1 のようなリン酸化酵素や、PP2A、SIT4 といった脱リン酸化酵素も含まれているため、これらの酵素を介して、間接的に更に膨大な数のタンパク質のリン酸化が TORC1 によって制御されていると考えられる。

当研究室では、これまでに TORC1 が細胞周期制御に深く関わることを明らかにしてきた。細胞をラパマイシン処理し TORC1 を不活性化すると細胞は最終的に G1 期で停止するため、TORC1 は G1 期の進行を制御していると考えられてきた。しかし、我々は最近、TOR が S 期および M 期進行をも制御することを相次いで発見した。

さらに、我々は TORC1 の下流でリボソーム合成に制御する GTP 結合タンパク質 Nog1 を発見した(本間ら、EMBO Journal 2006)。非常に興味深い事に、Nog1 は DNA 複製に必要な DNA ヘリカーゼ Mcm3 の分解抑制にも必要であり、「TORC1 Nog1 Mcm3 DNA 複製」というシグナル伝達系を介して、TORC1 が S 期進行に重要であることを見出した。このように TORC1 が、タンパク質分解を制御することで細胞周期の様々なイベントを制御していることが徐々に明らかになってきた(図2)。

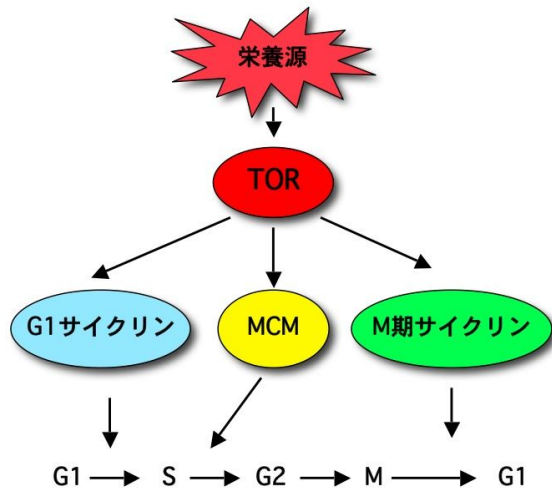


図2 予備的知見

本研究のきっかけは、ラパマイシンで出芽酵母を処理すると、M 期終期微小管が崩壊することを見出したことによる。その後、ラパマイシン処理で M 期サイクリン C1b2 の分解が促進されることが判明した。更に、G1 サイクリン C1n2 もラパマイシンにより分解が促進されることも見出した。このように、TORC1 はサイクリン量を制御していることが明らかになった。

TORC1 シグナル伝達系を明らかにするためには、細胞内のタンパク質のリン酸化状態の変化を「オミクス解析」により網羅的に解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リン酸化プロテオミクス解析により、TORC1 によってリン酸化制御を受けるタンパク質を網羅的に同定することである。同定されたタンパク質から興味深いものをピックアップして、さらに詳細な解析を進めることで、そのタンパク質のリン酸化の生物学的意義を明らかにする。特に、当研究室では TORC1 による細胞周期制御に興味を持ち研究を進めてきたため、特に細胞周期制御に関係するタンパク質の解析に研究を集中することを計画した。

3. 研究の方法

質量分析法の専門家である松本雅記先生（九州大学生体防御医学研究所）の協力を得て、最新の質量分析装置 QTRAP/iTRAQ システム（AB 社、図 3、4）を用いて、非常に感度良い定量的 phospho-proteomics（網羅的リン酸化解析）を行った。

具体的には、ラパマイシンで処理した酵母細胞と、対照としての無処理細胞からタンパク質抽出液を調整し iTRAQ 法にてタンパク質をラベルした。

それを LC-MS/MS 解析を行うことでラパマイシン処理によるタンパク質リン酸化の動態を評価した。



図 3 QTRAPシステム

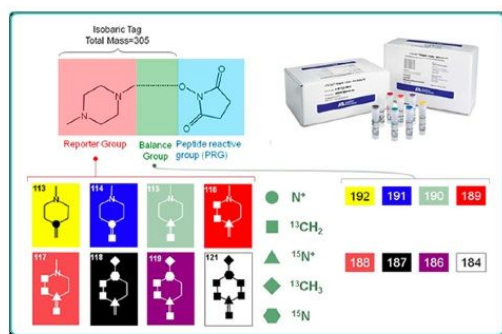


図 4 iTRAQ

その後、得られた結果を解析し、同定されたタンパク質の中から興味深いものをピックアップし、そのリン酸化アミノ酸をリン酸化されないアラニンに変えた変異体（SA 変異）および擬似的リン酸化アミノ酸であるアスパラギン酸もしくはグルタミン酸に変えた変異体（SD 変異）を作成して、その表現型を調べることで、そのタンパク質のリン酸化

の生物学的意義を評価した。

4. 研究成果

QTRAP/iTRAQ システムを用いて定量的 phospho-proteomics を行った。比較したサンプルは、ラパマイシン無処理の野生株（対照）、ラパマイシン処理の野生株、ラパマイシン無処理の *sit4Δ* 欠損株、ラパマイシン処理の *sit4Δ* 欠損株の 4 つを用いた。PP4（タイプ 4 タンパク質脱リン酸化酵素）である Sit4 は TORC1 の不活性化により活性化するが、どのようなタンパク質を脱リン酸化しているのかは分かっていなかったが、最近、当研究室で分裂期進行に Sit4 が関与していることを見出していたために、特に Sit4 に着目して研究を行った。

これらのサンプルの比較により、ラパマイシン処理による TORC1 不活性化が引き起こす、増加、および減少するタンパク質のリン酸化部位が同定できるとともに、それらのリン酸化の変動が Sit4 を介しているのかも明らかになると期待した。

（1）これを行った結果、TORC1 によってリン酸化が制御されていることが既に報告されている Atg13、Npr1、Par32 のようなタンパク質が、本研究においても、リン酸化が大きく変動したタンパク質として同定された。このことは、本解析が正しく行われたことを示している。

さらに、これまでに報告されていなかった未知の TOR の下流因子が数多く同定できた。それらは、1）既知の TORC1 シグナル系因子、2）リン酸化酵素、脱リン酸化酵素を含むシグナル伝達系タンパク質、3）リボソームおよびリボソーム合成に関与する因子、4）タンパク質の品質管理、および分解に関与する因子、5）細胞周期制御因子、6）代謝系酵素、に分類された。

TORC1 がリボソーム合成を制御していることは既に知られていたが、それはリボソームタンパク質と rRNA の転写のレベル、およびリボソーム組み立てにおいてであった。リボソームタンパク質のリン酸化状態が変動するという事実は、これがリボソームの組み立て、リボソームの機能、リボソームの分解のいずれかの段階に影響する可能性を示唆する。

また、これまでは限られた数のタンパク質リン酸化酵素とタンパク質脱リン酸化酵素が TORC1 下流因子として発見されてきていたが、それ以上の数のリン酸化酵素および脱リン酸化酵素が TORC1 によって制御されていることを示唆する。

さらに、TORC1 によって、個別のタンパク質の安定性が変化することはすでに当研究室で見出していたが、タンパク質の品質管理因子のリン酸化が TORC1 により制御されるということが判明したことで、TORC1 がこのリン酸化を介してその機能を制御することで、

多くのタンパク質の安定性をコントロールするのではないかと、という仮説がもたらされた。

最後に、TORC1 は栄養に応じて代謝を大規模に変動させることが知られているが、その分子機構はほとんど分かっていない。今回の研究で、その作用点が明らかになるものと期待される。

(2) それとは逆に、TORC1 の阻害によりリン酸化が増加したタンパク質も多数同定された。それらは、1) 既知の TORC1 シグナル系因子、2) リン酸化酵素、脱リン酸化酵素を含むシグナル伝達系タンパク質、3) リボソーム合成に関与する因子、4) タンパク質の品質管理、および分解に関与する因子、5) 細胞周期制御因子、6) DNA 複製関連因子、7) トランスポーター、8) 膜輸送系因子、に分類された。

これらの中には細胞のがん化に深く関連する RAS/PKA シグナル系の因子のように、以前から TORC1 シグナル系との関連が指摘されていた因子も含まれていた。これらのことから、TORC1 の不活性化によって活性化するタンパク質リン酸化酵素を介して、多くのタンパク質のリン酸化が TORC1 の不活性化時に増加することが新たに判明した。

特にストレス応答系のリン酸化酵素が TORC1 によって制御されていることが本研究から明らかになり、栄養源飢餓時に TORC1 の不活性化を介して、これらのストレス応答系のリン酸化酵素が活性化し、細胞がストレスに強くなることが予想される。細胞が栄養源飢餓になると細胞老化が遅延するが、このメカニズムはまだよく理解されていない。恐らくは、TORC1 不活性化が様々なストレス応答を惹起することが、細胞老化の抑制につながっているのではないかと考えられる。

(3) *sit4Δ* 欠損株でリン酸化状態が上昇したものは Sit4 によって脱リン酸化されている可能性が考えられるが、そのようなタンパク質が、上記の因子の中に見出された。特に、タンパク質の品質管理に関係するタンパク質が Sit4 により脱リン酸化されることが示唆された。

(4) それらを個別に SA 変異株、SD 変異株を作成し解析を進めている。具体的には、RAS/cAMP 系のタンパク質、およびタンパク質品質管理因子について研究を進めている。当初は、タンパク質分解との絡みでリン酸化を考えていたが、それらの変異体でも顕著な変化は認められず、タンパク質の安定性以外の働き、例えばタンパク質の機能、タンパク質の局在、他のタンパク質の結合等にリン酸化が関与することが疑っており、それらへの影響を調べている。

(5) TORC1 が M 期進行制御、特に紡錘体形

成チェックポイント (SAC) を制御することを見出したため、SAC に関わるタンパク質が TORC1 によってそのリン酸化が制御されているかどうかの解明を目指した。そのためにまず、SAC 因子を酵母細胞から精製しそのリン酸化部位を質量分析により同定した。そのうちの一つ、Mps1 に関しては、リン酸化特異的抗体を作成し、SA 変異、SD 変異を作成した。しかしながら、どちらの変異に関しても顕著な表現系は観察されなかった。現在、他の SAC 因子に関しても SA 変異、SD 変異を作成して、現在その表現型の解析を行っている。

(6) TORC1 が細胞老化に関与することから、リン酸化プロテオミクス解析から細胞老化機構の全体像の解明を試みている。まず初めに、簡便な細胞寿命測定のアッセイ法がなかったため、その確立を行った。それを用いて、キノコ由来の新規なアンチエイジング活性物質を 2 つ同定した。現在、その物質の作用機序の解明を、リン酸化プロテオミクス解析を用いて検討している。

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](査読付き)(計 2 件)

1. Shigeru Nakaya, Hajime Kobori, Atsushi Sekiya, Hirokazu Kawagishi, and Takashi Ushimaru (2014) Anti-aging and anti-microbial effects of mellicolide on different types of yeast. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** (In press) 査読付き
2. Shigeru Nakaya, Saki Mizuno, Hiroki Ishigami, Yasuhiro Yamakawa, Hirokazu Kawagishi and Takashi Ushimaru (2012) A new rapid screening system for anti-aging compounds using budding yeast and identification of beauveriolide I as a potent active compound. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 76(6):1226-1228 査読付き

[学会発表](計 9 件)

1. 近藤 明宏、山本 歩、瓜谷 眞裕、丑丸 敬史 出芽酵母 Cdc14 フォスファターゼは Atg13 のリン酸化とオートファジーを制御する 1P-0403 第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12.3-6)
2. 今野 拓哉、瓜谷 眞裕、山本 歩、丑丸 敬史 M 期移行における sirtuin の関与 2P-0422 第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12.3-6)
3. 丑丸 敬史、山田 ちひろ、TORC1 不活性化は APC/C-Cdh1 依存的な時期尚早な分裂期進行を引き起こす 3W4111-1 第 35 回日

本分子生物学会年会 (BMSJ2012) (福岡、
2012.12.13)

4. 近藤 明宏、山本 歩、瓜谷 眞裕、丑丸 敬史 Cdc14フォスファターゼは出芽酵母Atgタンパク質を制御する 2P-0332 第35回日本分子生物学会年会 (福岡、2012.12.11-14)
5. 今野 拓哉、山本 歩、瓜谷 眞裕、丑丸 敬史 紡錘体形成チェックポイントにおける脱アセチル化酵素の関与 第35回日本分子生物学会年会 (福岡、2012.12.11-14)
6. 丑丸 敬史、本間 良美、山本 馨、牧野 仁志穂、永井 正義、瓜谷 眞裕 CDKとTORC1はMCMの機能を制御する 第34回日本分子生物学会年会 (横浜、2011.12.13-16)
7. 内藤 佳世子、柴田 典、宮里 和実、瓜谷 眞裕、丑丸 敬史 TORC1 は G1/S 進行と転写因子 Mbp1 を制御する第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、2011.12.13-16)
8. 諸岡 礼、山田 ちひろ、宮崎 聖良、山本 歩、瓜谷 眞裕、丑丸 敬史 TORC1 不活性化は PP6 を介してスピンドルチェックポイントを解除する第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、2011.12.13-16)
9. 山本 馨、牧野 仁志穂、永井 正義、丑丸 敬史 TORC1 と CDK による Mcm3 の分解制御機構の解析 酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究報告会 (福岡、2011.9.5-7)

6. 研究組織

(1)研究代表者

丑丸敬史 (USHIMARU, Takashi)
静岡大学・理学研究科・教授
研究者番号：50262788

(2)研究分担者

松本雅記 (MATSUMOTO, Masaki)
九州大学・生体防御医学研究所・
准教授
研究者番号：60380531