

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570241

研究課題名(和文)オートファジー誘導系を用いたオートファジー分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Study of induction mechanism of autophagy using autophagy induction system

研究代表者

鎌田 芳彰(KAMADA, Yoshiaki)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：20291891

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)：栄養環境を正確に感知し、それに対して迅速に応答することは、細胞にとって重要な生命反応の1つである。プロテインキナーゼTor(トア Target of rapamycin)タンパク質複合体は栄養環境システムを担う重要な因子であるが、栄養環境情報がどのようにしてTor活性を制御しているのか、不明な点が多く残されている。

私はTorの活性化状態をモニターする手法の確立に成功し、このモニター法を用いて、どのような栄養環境の変動の情報がTor複合体へ伝達され、また、そこにどのような細胞内因子が関与するか、その同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：Nutrients are indispensable for life. Thus, perception of the nutrient environment is also essential for cells. To recognize cellular nutrient conditions, eukaryotic cells employ Tor (target of rapamycin) protein kinase. However, it is not clear the mechanism how Tor perceives nutrient signals.

Our research group established a method to monitor Tor activity in vivo. The aim of our research group is to reveal the molecular mechanisms of how Tor receives nutrient signals.

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：栄養環境 シグナル伝達 出芽酵母 生化学 細胞生物学 ラパマイシン TOR

1. 研究開始当初の背景

栄養環境を正確に感知し、それに対して迅速に応答することは、細胞にとって重要な生命反応の1つである。栄養環境(栄養源情報)は、炭素源(糖類)、窒素源(アミノ酸)、硫黄源、リン酸など多岐にわたっていて、しかもそのどれもが細胞の成長・増殖に必須である。逆に、栄養源が枯渇した際には、細胞は飢餓情報を感知し、栄養飢餓ストレス応答を行う。飢餓ストレス応答の代表的なものとしてタンパク合成の抑制、細胞増殖の停止、オートファジーの誘導などが挙げられるが、栄養源が多岐にわたるのに対し、飢餓ストレス応答は比較的画一的である。これは、多様な栄養源受容システムが1つあるいは少数の栄養環境応答システムに収斂していることを示唆している。

プロテインキナーゼ Tor (Target of rapamycin) は2種類のタンパク質複合体 Tor 複合体 1, 2 (Tor complex 1, 2, TORC1, 2) を形成し、そのうち TORC1 は栄養環境システムを担う重要な因子である。TORC1 活性を阻害すると、細胞は培地の栄養環境にかかわらず栄養飢餓ストレス応答を行う。したがって、TORC1 がさまざまな栄養シグナル伝達系の中核として機能していると考えられている。また、TORC1 の主要コンポーネントは、真核細胞に広く保存されており、また必須遺伝子にコードされているので、TORC1 が真核細胞にとって必須の機能を有しており、それは真核細胞に広く保存されたメカニズムで制御されていることが示唆される。しかしながら、多様な栄養環境情報がどのようにして TORC1 活性を制御しているのか、不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

申請者は最近、出芽酵母 TORC1 複合体のキナーゼ基質として Atg13 タンパク質を同定した (Kamada et al. MCB 2010)。すなわち、Atg13 のリン酸化状態を指標にして、TORC1 の活性化状態をモニターする手法の確立に成功した。本研究の目的は、このモニター法を用いて、どのような栄養環境の変動の情報が Tor 複合体へ伝達され、また、そこにどのような細胞内因子が関与するか、その同定である。

特に、哺乳細胞などで発見された TORC1 の制御因子候補の多くは出芽酵母にも保存されているが、それらは非必須遺伝子にコードされており、TORC1 と違って細胞に必須の機能を持っていない。本研究は、それらの制御

因子候補の再検討も重ねて行われた。

3. 研究の方法

様々な条件で培養した出芽酵母からタンパク質画分を調製し、ウエスタンブロット(抗 Atg13 抗体を使用)にて Atg13 リン酸化状態を検出し、*in vivo* TORC1 活性をモニターした。

TORC1 が栄養を感知し活性化されているとき、Atg13 はリン酸化され、ウエスタンブロットでのバンドは高分子量側にシフトする。一方、TORC1 が不活性化されると Atg13 は脱リン酸化されて、低分子量側にシフトする。

このようにして、TORC1 活性に影響を与える栄養環境の変動や細胞内因子(変異体)のスクリーニングを行ない、さまざまな栄養源受容システムが統合されて1つの TORC1 栄養環境応答システムを制御する分子メカニズムを明らかにした。

4. 研究成果

その結果、少なくとも出芽酵母では、

- (1) TORC1 は窒素源、炭素源、硫黄源を認識していることが解った。特に窒素源としては、培地に含まれるアンモニウムイオンではなく、細胞に取り込まれてから変換されるアミノ酸を窒素源として認識していることが示唆されるデータが得られた。
- (2) 哺乳細胞などで発見された TORC1 の制御因子候補の酵母ホモログをコードする遺伝子欠損株は、Atg13 のリン酸化状態に影響が見られず、これらは TORC1 の制御のメインストリームではないことが示唆された。前述の通り、これらの因子は細胞に必須の機能を持っていないことから、細胞の生育に必須な、未知の TORC1 制御因子が存在すると結論づけた。
- (3) さらに、アミノ酸(窒素源)栄養シグナル伝達に関しては、アミノアシル-tRNA 転移酵素(ARS)が TORC1 活性制御に大きな影響を及ぼすことが解った。これは TORC1 がアミノ酸自身ではなく、アミノアシル-tRNA を窒素源として認識することを強く示唆する。ARS はペプチド合成に関与する生育必須因子であるが、それだけでなく、栄養(アミノ酸)研究シグナル伝達にも必須の役割を果たしている事が示唆された。
- (4) 一方、ペプチド合成に関与する必須因子(translational factor)の多くは TORC1 制御には関与しないため、タンパク質翻訳自身が TORC1 の制御を行

う可能性は否定された。さらに、必須遺伝子の1つがTORC1制御に関与している結果が得られ、引き続き検討を行っていく予定である。

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](計 3 件)

- (1) Sekiguchi T, Kamada Y, Furuno N, Funakoshi M, Kobayashi H. Amino acid residues required for Gtr1-Gtr2p complex formation and its interactions with the Ego1p-Ego3p complex and TORC1 components in yeast. *Genes and Cells* (査読有り) 19, 2014: in press (on line publication) (doi: 10.1111/gtc.12145)
- (2) Matsui A, Kamada Y, Matsuura A. The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLoS Genetics* (査読有り) 9(1), 2013: e1003245(doi:10.1371/journal.pgen.1003245)
- (3) (3) Klionsky DJ, Kamada Y, et al. (他 1243 名、476 番目) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* (査読有り) 8, 2012: 445-544 (doi: 10.4161/auto.19496)

[学会発表](計 9 件)

鎌田芳彰 栄養センサーTor複合体1はどのようにして栄養環境を把握するか? 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ(2013年12月5日)神戸ポートアイランド

鎌田芳彰 トア複合体1の栄養感知メカニズム解明の挑戦 第3回TOR研究会(2013年10月1日)基礎生物学研究所

松井愛子、鎌田芳彰、松浦彰 窒素源飢餓条件下でのオートファジーによる細胞周期進行の二段階制御機構 酵母遺伝フォーラム第46回研究報告会(2013年9月8日)東北学院大学

鎌田芳彰 栄養センサーTor複合体はどのようにして栄養環境を把握するか? 第

2回TOR研究会(2013年3月14日)神戸大学

松井愛子、鎌田芳彰、松浦彰 栄養飢餓条件下でのオートファジー依存的な細胞周期進行におけるTORC1の役割 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ(2012年12月11日)福岡国際会議場

松井愛子、鎌田芳彰、松浦彰 オートファジー依存的な細胞周期進行機構とそのゲノム安定性への関与 酵母遺伝フォーラム第45回研究報告会(2012年9月4日)京都大学

Kamada Y Monitoring of Tor complex1 activity by immunoblot of Atg13. 第34回日本分子生物学会年会ワークショップ(2011年12月16日)パシフィコ横浜

松井愛子、鎌田芳彰、松浦彰 栄養飢餓条件下での細胞周期進行におけるオートファジーの役割 酵母遺伝フォーラム第44回研究報告会(2011年9月5日)九州大学

Kamada Y Yeast Tor complex1 regulates autophagy by direct phosphorylation of Atg13 *Yeast Cell Biology* (2011年8月18日) Cold Spring Harbor Laboratory (アメリカ)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/diversity/AssisProf/kamada.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 芳彰 (KAMADA Yoshiaki)
基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・
助教
研究者番号：20291891

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：