

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291042

研究課題名(和文) ストレスとアミノ酸栄養に応答したTORC1制御機構の解明

研究課題名(英文) Stress and amino acid-responsive mechanisms of TORC1 regulation

研究代表者

前田 達哉 (Maeda, Tatsuya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：90280627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：膜構造を損なわない方法でTORC1サンプルを調製することにより、アミノ酸応答性TORC1活性化をin vitroキナーゼアッセイにおいて再現することに世界で初めて成功した。この系の示すアミノ酸応答性が、栄養応答に関わることが知られているGtr二量体依存的経路とは独立の機構によることを示し、その機構の構成因子としてPI3キナーゼであるVps34と、PI(3)リン酸に結合するFYVEドメインをもつPib2タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a TORC1 kinase assay, by using a membrane-preserved TORC1 preparation, that reproduces for the first time, to the best of our knowledge, the amino acid-responsive TORC1 activation in vitro. The amino acid-responsiveness of the assay system was shown to be independent of the well-known Gtr-dependent nutrient-responsive mechanism and to involve the Vps34 PI3 kinase and the Pib2 protein containing a PI(3)P-binding FYVE domain.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：TOR TORC1 ラパマイシン アミノ酸 ストレス顆粒 グルタミン

## 1. 研究開始当初の背景

生育環境に応じて成長と代謝とを適切に調節することは、生物にとって最も基本的な適応応答である。この制御に枢要な役割を果たしているのが、免疫抑制剤/抗がん剤ラパマイシンの標的分子 TOR (ほ乳類では mTOR) を触媒サブユニットとする TORC1 (TOR complex 1) キナーゼ複合体である。TORC1 は構造、機能とも真核生物を通じて保存されており、酵母では TOR-Kog1-Lst8 (ほ乳類では mTOR-raptor-mLst8) というサブユニットからなっている。

TORC1 の活性は、アミノ酸栄養、エネルギー、ストレス、ほ乳類の場合にはさらに増殖因子に反応して制御されている。活性化された TORC1 は、種々の標的基質のリン酸化を介して、高分子生合成や、栄養の取り込み、自食作用などを制御しており、これらの諸過程を介して、同化的か異化的かという代謝パターンの大きな切り替えの根本を担っていると考えられている。さらに、ほ乳類においては、発生・分化・神経機能・癌・免疫・生活習慣病・老化への決定的な関与が示されて、多くの分野にわたる関心を集めるようになっている。

TORC1 の制御下にある諸過程については、直接の標的基質の同定をはじめとした制御機構が次第に明らかにされつつあるのに対して、TORC1 自身の活性制御機構については研究が立ち後れている。特に、アミノ酸栄養やストレスによって TORC1 の活性が制御される機構については不明な点が多い。最近、アミノ酸栄養が豊富な条件下では TORC1 が液胞 (ほ乳類ではリソソーム) 膜上に局在化し、そのことが活性化に必要であることが報告された。これは、液胞膜上にアンカーされている低分子量 G タンパク質 Gtr 二量体 (ほ乳類では Rag 二量体) がアミノ酸栄養依存的に活性化され、TORC1 をリクルートすることによる。さらに最近、ロイシンを tRNA<sup>Leu</sup> に転移する反応を触媒するロイシル tRNA シンターゼ (LeuRS) がアミノ酸を検知するセンサーとして機能することが酵母とほ乳類において報告された (Mol Cell 46: 105-110 (2012)、Cell 149: 410-424 (2012))。しかし、これに反する証拠も報告されており、アミノ酸センサーの実体に関しては未だ結論を見えていない。

我々はこれまで、TORC1 活性化機構に焦点を当て、酵母とほ乳類培養細胞の二つの実験系を用いて研究を進めてきた。その過程で、熱ストレスにさらされた細胞において、細胞質中に形成されるストレス顆粒と呼ばれる mRNP 構造体に、TORC1 が一過的に隔離されて不活性化され、このことがストレスからの回復期に TORC1 再活性化のタイミングを調節していることを酵母において明らかにした (Mol. Cell 47: 242-252 (2012))。

## 2. 研究の目的

本研究は、ストレス応答性 TORC1 活性制御機構の解析を進めるとともに、残された最大の問題である栄養応答性 TORC1 活性化機構の解明を目指すものである。

### (1) 熱ストレスによるストレス顆粒への TORC1 隔離機構の解明

上述のように、熱ストレスに反応して TORC1 がストレス顆粒へと一過的に隔離され、不活性化されることを見出している。この新規な制御機構の詳細とその生理的意義を明らかにするとともに、同様な隔離がほ乳類細胞でも保存されているか否かを検討する。

### (2) 新規 TORC1 制御因子の探索と TORC1 活性制御機構の解明

網羅的な遺伝学的スクリーニングを酵母において行い、TORC1 の新しい活性制御因子を包括的に同定したい。特に、Gtr 二量体を介した既知の活性化機構では説明のつかない、栄養応答性 TORC1 活性化機構の存在を示す証拠を得ており、その実態を明らかにしたい。また、そのための強力な研究ツールとして、栄養応答性 TORC1 活性化を再現できる *in vitro* アッセイ法を確立したい。

成長と代謝を適切に調節することは生物の最も基本的な適応反応であって、TORC1 の関与する生理/病理現象は広汎である。本研究の目指す TORC1 活性制御の解明は、それら全ての生命現象の根本的理解に欠くことができない知見を提供するばかりでなく、医学・栄養学・生物生産など多岐にわたる応用のための基盤技術を提供するものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱ストレスによるストレス顆粒への TORC1 隔離機構の解明

酵母細胞を熱ストレスにさらすと、TORC1 が一過的にストレス顆粒へと隔離され不活性化されることを明らかにしてきた (Mol. Cell 47: 242-252 (2012))。この隔離において、TORC1 との直接の結合にあずかるストレス顆粒構成因子を同定するため、既知の構成因子のうち遺伝子破壊が致死にならないもの全てについて検討したが、ストレス顆粒形成と TORC1 隔離のいずれについても、起こらなくなる破壊株は無かった。そこで、遺伝子破壊が致死になる構成因子について検討を加えた。これらの因子の温度感受性変異株を用いるか、または、遺伝子のプロモーターを、発現の ON/OFF が可能な GAL プロモーターに置換した株を作製し、グルコース培地に移してこれらの因子の発現を抑えた場合に、ストレス顆粒形成と TORC1 隔離が起こらなくなるものを探索した。構成因子のうち、翻訳開始因子 eIF3 は TORC1 による基質リン酸化の足場ともなっていることがほ乳類細胞

において報告されており、求める結合因子の有力な候補であった。

#### (2) LeuRS-Gtr 二量体を介した栄養応答性 TORC1 活性化の再検討

LeuRS の特異的阻害剤である DHBB で処理した細胞と Gtr 破壊株において、栄養にตอบสนองした TORC1 活性化を、基質である Sch9 のリン酸化を指標に検討した。評価はリン酸化特異抗体を用いたウエスタン法によった。

#### (3) 栄養応答性 TORC1 活性の *in vitro* アッセイ系の開発

膜構造をなるべく損なわないように透過性化した細胞、または精製液胞画分を調製し、これを TORC1 サンプルとしてアッセイに供した。基質としてほ乳類 4E-BP1 を用い、リン酸化特異抗体を用いたウエスタン法でリン酸化を定量した。

#### (4) 新規 TORC1 制御因子の探索

Gtr 二量体に依存しない TORC1 活性化機構の重要性が確認されたので、以下の 2 つの方法で Gtr 二量体非依存的活性化機構の構成因子をスクリーニングした。

TORC1 活性が低下した Gtr 二量体破壊株にマルチコピーベクターに作製したゲノムライブラリーを形質転換して、高発現することにより TORC1 活性を回復させる遺伝子を、カフェインとラパマイシンに対する耐性を指標にスクリーニングした。

液胞に局在し、かつ TORC1 経路との遺伝学的相互作用を示す因子を、酵母の網羅的解析の結果をまとめたデータベースからリストアップした。遺伝子破壊株が TORC1 活性の低下を示すことを指標に候補遺伝子を絞り込んだ。

#### (5) 酵母 TORC1 の活性制御機構の解明

(4) で得られた候補について遺伝子破壊株を得て、(3) で開発した *in vitro* アッセイ法を用いてアミノ酸依存的 TORC1 活性化能の有無を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 熱ストレスによって誘導される TORC1 のストレス顆粒への隔離機構の解明

隔離に際して直接に相互作用するストレス顆粒側の構成因子を同定するため、構成因子のうち遺伝子破壊が致死になる eIF4E (*cdc33-1*) と eIF3A (*rpg1-1*) の温度感受性変異株、および eIF3A (*RPG1*) と eIF3B (*PRT1*) のプロモーターシャットオフ株を検討したが、ストレス顆粒形成と TORC1 隔離のいずれにおいても欠損を示すものはなかった。このことから、ストレス顆粒の高度な構造冗長性が明らかになるとともに、TORC1 隔離がストレス顆粒形成と分かちがたく結びついた現象であることが示された。

また、我々が見出したのと同様なストレス顆粒への TORC1 隔離がほ乳類細胞において

も起こることが、本研究を開始する直前に報告されたことを付け加えておく (Cell 152: 791-805 (2013)、Cell 154: 859-74 (2013))。

#### (2) LeuRS-Gtr 二量体を介した栄養応答性 TORC1 活性化の再検討

LeuRS と Gtr 二量体のそれぞれについて、それらの機能を欠損させた細胞の栄養応答性 TORC1 活性化能を検討した。いずれの場合も、種々の窒素源にตอบสนองした TORC1 活性化能は失われていなかった。このことは、栄養応答性 TORC1 活性化に Gtr 二量体を介する機構が果たす役割は、あくまで限定的なものであることを示している。

#### (3) 栄養応答性 TORC1 活性の *in vitro* アッセイ系の開発

TORC1 活性の栄養応答能を評価するためには、*in vivo* 活性評価系を用いる限りは、細胞内への栄養取り込みの効率の影響を排除することができない。さらに、TORC1 活性自体が栄養取り込み能を制御する働きを持つため、栄養状態と TORC1 活性の関係は *in vivo* においていっそう複雑になる。そのため、*in vitro* の TORC1 活性評価系の開発が強く望まれていたが、これまでのところ TORC1 活性のアミノ酸応答性を再現できる系は、材料とする生物種を問わず成功例がない。

そこで、本研究ではアミノ酸応答性 TORC1 活性の *in vitro* アッセイ系の開発に取り組んだ。膜構造をなるべく損なわないように TORC1 サンプルを調製し、キナーゼアッセイに供したところ、アッセイにアミノ酸を加えることでキナーゼ活性の亢進を認められた。これは、TORC1 活性の栄養応答性を *in vitro* で再現したこれまでで唯一の例である。

この系を用いて、20 種類のアミノ酸について TORC1 活性化能を評価したところ、グルタミンとシステインにのみ活性化能が認められた。さらに、活性化能を示すのは L-体のアミノ酸に限られることから、この活性化は生理的なアミノ酸検知機構を介したものであると考えられる。また、この活性化は単離した液胞を TORC1 標品として用いた場合にも観察されることから、活性化機構の構成因子は液胞に局在していることがわかった。膜電位を損なう処理や、膜を透過性にする処理をしても活性化には影響しないことから、この系で検出される活性化機構は、液胞膜外のアミノ酸を検知していると考えられる。

この系で検出される活性化機構と、既知の活性化機構である Gtr 二量体依存的経路との関連を検討するため、Gtr1 破壊株や Ego3 破壊株を用いて同様の評価を行ったところ、アミノ酸依存的 TORC1 活性化に欠損は見られなかった。したがって、この系で検出しているのは Gtr 二量体非依存的な TORC1 活性化機構であると考えられる。

#### (4) 新規 TORC1 制御因子の探索

Gtr 二量体に依存しない TORC1 活性化機構の重要性が確認されたので、3. に示した

2つの方法で Gtr 二量体非依存的活性化機構の構成因子をスクリーニングした。いずれの方法によっても多数の候補遺伝子が同定された。同定された遺伝子は、リボソーム生合成因子、栄養源トランスポーターとその制御因子、ユビキチン・プロテアソーム系、シグナル伝達因子などに分類された。

(5) TORC1 *in vitro* アッセイ系を用いた新規 TORC1 制御因子の解析

(4)で得られた候補について遺伝子破壊株を得て、*in vitro* アッセイ法を用いてアミノ酸依存的 TORC1 活性化能の有無を調べたところ、PI3 キナーゼである Vps34 と、PI(3)リン酸に結合する FYVE ドメインをもつ Pib2 タンパク質の破壊株がいずれも活性化能を失っていることが明らかになった。そのため、Vps34 によって液胞膜上に産生された PI(3)リン酸を介して Pib2 が液胞膜へとリクルートされることが、Gtr 二量体非依存的な TORC1 活性化に必須であると考えられる。この経路におけるアミノ酸センサーの同定が急務である。

(6) TORC1 を介した細胞形態と細胞成長の調整機構の解明

アクチン骨格は、細胞形態を規定するとともに、TORC1 活性制御を介して細胞成長を調節することで、これら二つの過程の調整が果たされていることを国際共同研究により明らかにした。

(7) 細胞内膜輸送系が TORC1 活性化に及ぼす影響の検討

細胞内膜輸送系の種々の機能複合体が、細胞内アミノ酸ホメオスタシスの維持等を介して TORC1 活性に必須の役割を果たしていることを国際共同研究により明らかにした。

(8) TORC1 活性が細胞内グルタチオン濃度に及ぼす影響の検討

TORC1 活性化により、細胞内のグルタチオン濃度が低下し、ストレスに対する感受性が亢進することを共同研究により明らかにした。

(9) ほ乳類における mTORC1 の生理機能の解明

酵母 TOR の活性化型変異体に関する知見をもとに独自に開発していた活性化型 mTOR 変異体を、脳でコンディショナルに発現する遺伝子導入マウスを共同研究により作出し、mTORC1 活性化により発達時期に応じて異なった神経疾患の症状を再現することに成功した。

また、免疫制御に関与する転写因子 Bach2 が mTORC1 によりリン酸化されることを共同研究により明らかにした。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計10件)

Motohashi H, Taguchi K, Yamamoto M, Nio M, Maeda T, Ochiai K, Muto A, Igarashi K, The Transcription Factor Bach2 Is Phosphorylated at Multiple Sites in Murine B Cells but a Single Site Prevents Its Nuclear Localization, *J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 291, 2016, pp. 1826-1840  
DOI: 10.1074/jbc.M115.661702

Klionsky DJ et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), *Autophagy*, 査読無, Vol. 2, 2016, pp. 1-222  
DOI: 10.4161/auto.19496

Kimura Y, Tanigawa M, Kawawaki J, Takagi K, Mizushima T, Maeda T, Tanaka K, Conserved mode of yeast Bro1 family V domains for interaction with YP(X)nL motif-containing target proteins, *Eukaryot. Cell*, 査読有, Vol. 14, 2015, pp. 976-982  
DOI: 10.1128/EC.00091-15

Kassai H, Sugaya Y, Noda S, Nakao K, Maeda T, Kano M, Aiba A, Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis and neurodegenerative diseases, *Cell Reports*, 査読有, Vol. 7, 2014, pp. 1626-1639  
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.04.04

Kingsbury JM, Sen ND, Maeda T, Heitman J, Cardenas ME, Endolysosomal membrane trafficking complexes drive nutrient-dependent TORC1 signaling to control cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 査読有, Vol. 196, 2014, pp. 1077-1089  
DOI: 10.1534/genetics.114.161646

Héricourt F, Cheddor F, Bertheau L, Tanigawa M, Maeda T, Guirimand G, Courdavault V, Larcher M, Depierreux C, Bénédicti H, Morabito D, Brignolas F, Carpin S, Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay, *Physiol. Plant.*, 査読有, Vol. 149, 2013, pp. 188-199  
DOI: 10.1111/ppl.12024

Oku M, Ichiki Y, Shiraishi A, Takahara T, Maeda T, Sakai Y, Hyper-activation of the target of rapamycin (Tor) kinase 1 decreases Intracellular glutathione

content in *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by LC-MS/MS analysis, Biosci., Biotechnol. Biochem., 査読有, Vol. 77, 2013, pp. 1608-1611  
DOI: 10.1271/bbb.130314

Goranov AI, Gulati A, Dephoure N, Takahara T, Maeda T, Gygi SP, Manalis S, Amon A, Changes in cell morphology are coordinated with cell growth through the TORC1 pathway, Curr. Biol., 査読有, Vol. 23, 2013, pp. 1269-1279  
DOI: 10.1016/j.cub.2013.05.035

Takahara T, Maeda T, Evolutionarily conserved regulation of TOR signalling, J. Biochem., 査読無, Vol. 154, 2013, pp. 1-10  
DOI: 10.1093/jb/mvt047

高原照直, 前田達哉, ストレス刺激に応答した TOR 複合体 1 (TORC1) の活性制御機構, 生化学, 査読無, Vol. 85, 2013, pp. 205-213  
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/06/85-03-11.pdf>

[学会発表] (計 14 件)

谷川美頼, Rag/Gtr 複合体非依存的 TORC1 活性化機構の解析, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 29 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

木村洋子, 酵母 Bro1 V ドメインと YP(X)nL モチーフを持つターゲットタンパク質との相互作用の解析, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 3 日~4 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

渡辺大輔, 清酒酵母における TORC1 シグナリングとアルコール発酵の関連に関する研究, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

谷川美頼, TORC1 の *in vitro* 活性評価法の開発, 酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会, 2015 年 9 月 1 日, 広島大学東広島キャンパス (広島県・東広島市)

渡辺大輔, 清酒酵母における TORC1 シグナリングとアルコール発酵の関連に関する研究, 酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会, 2015 年 8 月 31 日, 広島大学東広島キャンパス (広島県・東広島市)

谷川美頼, 酵母 TORC1 の *in vitro* での活性評価法の開発, 2015 年 3 月 27 日, 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市)

陳佳文, The role of glutamine in the activation of TORC1 in yeast, 酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会, 2014 年 9 月 1 日, 東京大学弥生講堂 (東京都・文京区)

谷川美頼, HOG 経路による cytokinesis の制御, 酵母遺伝学フォーラム第 47 回研究報告会, 2014 年 9 月 1 日, 東京大学弥生講堂 (東京都・文京区)

前田達哉, ストレスと栄養に応答した TORC1 活性制御, 逢坂大学タンパク質研究所セミナー「キナーゼシグナリング研究の進展」(招待講演), 2014 年 3 月 14 日, 大阪大学蛋白質研究所 (大阪府・吹田市)

前田達哉, ストレスに応答した TOR 複合体 1 (TORC1) 制御機構, 第 7 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム (招待講演), 2014 年 3 月 6 日, 東京大学中島董一郎記念ホール (東京都・文京区)

豊水理恵, ロイシル tRNA 合成酵素を介した TORC1 活性制御の検証, 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会, 2013 年 9 月 10 日, 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)

渡辺大輔, 出芽酵母のアルコール発酵調節における TOR シグナリングの意義, 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会, 2013 年 9 月 10 日, 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)

谷川美頼, 細胞質分裂における HOG 経路の機能, 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会, 2013 年 9 月 9 日, 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)

陳佳文, The regulatory effect of glutamine on TORC1 activity in yeast, 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会, 2013 年 9 月 9 日, 東北学院大学土樋キャンパス (宮城県・仙台市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/1KEN/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 達哉 (MAEDA, Tatsuya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号: 90280627