

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440099

研究課題名(和文) ターゲットオブラパマイシン複合体2のストレス応答機構の解析

研究課題名(英文) Studies on stress response mechanism of target of rapamycin complex 2

研究代表者

森ヶ崎 進 (MORIGASAKI, Susumu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・博士研究員

研究者番号：90242487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラパマイシンの標的因子であるターゲットオブラパマイシン(TOR)が形成するTOR複合体2(TORC2)は栄養、ストレスなどの情報を統合し、代謝や生存・増殖を制御する細胞内情報伝達因子である。研究代表者らは既に分裂酵母TORC2制御因子の候補を得ていたことから、本研究では、これら候補タンパク質によるTORC2経路のストレス応答の制御機構を解析した。その結果、これらが異なる刺激に応答し、異なる機構でTORC2を制御することが示され、それらのうちTORC2のグルコース飢餓応答に関する成果を論文として発表した。今後、これらの制御機構の詳細な解析およびヒトのTORC2への応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Target of rapamycin (TOR) is a kinase that regulates metabolism, proliferation and growth in response to nutrients, stresses etc. TOR forms two different protein complexes, TORC1 and TORC2. On the contrary to TORC1, little was known about the regulation mechanism of TORC2 in any organisms. Since my colleagues and I already had isolated some candidates of the TORC2 regulators in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, this research project has focused on the regulation mechanism of TORC2 by the candidates. The results obtained in this project indicate that the candidates mediate different stimuli to TORC2 and regulate TORC2 in the different manners. A part of the results showing that a small GTPase Ryh1 mediates glucose signal to TORC2 was disclosed by publishing a research article. The results highlight stress response mechanism of TORC2 and will facilitate investigation of human TORC2.

研究分野：生物学

キーワード：ターゲットオブラパマイシン 分裂酵母 シグナル伝達 ストレス応答 低分子量型Gタンパク質 MAPキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

Ha11らのグループにより1991年にラパマイシンの標的因子として出芽酵母で見出されたTORは広く真核生物において保存されているセリン/スレオニンキナーゼである(文献①)。TORは栄養、増殖因子、ストレスなど細胞外要因に反応し、代謝の調節や細胞の基本的な機能である生存・増殖を制御するという重要な役割を担う。また、2002年にはTORがラパマイシンに感受性および非感受性の二つの複合体(TORC1およびTORC2)を形成することを報告しており(文献②)、それまでにラパマイシンを用いて得られた知見の殆どはTORC1に関するものであることが判明した。すなわち、TORC2はTORC1とは異なる情報伝達因子と考えられ、この年がTORC2研究の始まりの年である。それ以降、TORC2が糖や脂質等の代謝、アクチンの重合、細胞や個体の成長、寿命を制御することが報告されたが、TORC2制御機構の解析、特に上流の制御因子に関しては殆ど報告がなかった。こうした状況の中、申請者らはTORC2の制御機構に関して以下に示す重要な成果を上げていた。

### (1) TORC2 制御因子として Ryh1 を同定

研究代表者らは、TORC2が細胞周期を制御すること、哺乳類の低分子量型GTPase, Rab6のホモログであるRyh1をTORC2経路関連因子として単離し、遺伝学および生化学的解析により、Ryh1がTORC2経路の制御因子であることを報告した(文献③④)。

### (2) グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(Tdh1)によるTORC2制御

研究代表者らは、分裂酵母Tdh1が酸化ストレスのセンサーであり、哺乳類JNKやp38MAPKのホモログであるSpc1経路を制御することを既に報告していた。それに加えて、Tdh1によるTORC2の酸化ストレス応答の制御を示唆する結果を得ていた(未発表)。また、*ryh1*<sup>-</sup>遺伝子破壊株( $\Delta$ *ryh1*)においてもTORC2経路の酸化ストレス応答の異常が観察された(未発表)。

## 2. 研究の目的

Ryh1とTdh1にTORC2の構成因子であるSin1との結合が示されていたSpc1を加え、これらのタンパク質によるTORC2制御のメカニズムをTORC2経路のストレス応答を指標に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

目的タンパク質であるRyh1, Tdh1, Spc1, TORC2構成因子およびTORC2基質Gad8をコードする遺伝子の破壊、点変異導入、エピトープタグ付けを施した分裂酵母株を作製し、遺伝学的、生化学的解析を行った。

### (1) 遺伝学的解析

目的の遺伝子を破壊および点変異導入し

た分裂酵母株におけるTORC2の細胞内活性をGad8の疎水性領域のセリン残基のリン酸化レベルを指標に解析した。また、グルコース飢餓、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加、および高浸透圧処理におけるTORC2活性の経時変化をモニターすることでTORC2のストレス応答を評価した。加えて、変異株のストレス感受性をスポットテスト法により評価した。

### (2) 生化学的解析

Sin1とSpc1の結合領域を酵母ツーハイブリッド(Y2H)法により決定した。また、TORC2の構成因子間および目的タンパク質とTORC2間の物理的相互作用をエピトープタグによる共沈殿法により検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

① Ryh1はTORC2経路のグルコース応答を制御する(発表論文 Hatano *et al.*)

対数増殖期における分裂酵母をグルコース不含培地に移し飢餓条件下でのTORC2活性を測定した。TORC2活性は5分以内に3割程度に低下したことから、TORC2経路がグルコースに反応することが判明した。TORC2構成因子間の物理的相互作用には影響がなかった為、このグルコース応答はTORC2の複合体解離によるものではないと考えられた。

また、 $\Delta$ *ryh1*株においてグルコース飢餓によるTORC2活性の低下が観察されなかったことより、この応答にRyh1が必要であることが明らかとなった。さらに、グルコース飢餓を長時間継続するとTORC2活性が徐々に回復し、この現象は $\Delta$ *ryh1*株においても観察された。さらに、*spc1*<sup>-</sup>および*tdh1*<sup>-</sup>の遺伝子破壊( $\Delta$ *spc1*および $\Delta$ *tdh1*)はTORC2のグルコース応答に影響しなかったことから、未知のTORC2制御因子の存在が示唆された。

② Tdh1はRyh1とは異なる機構でTORC2経路の酸化ストレス応答を制御する

研究代表者は $\Delta$ *tdh1*株、 $\Delta$ *ryh1*株に加え、Tdh1における酸化ストレスセンサーであるシステイン残基をセリンに置換(Tdh1CS)、活性化型Ryh1(Ryh1QL)、不活性化型Ryh1(Ryh1TN)等の点変異を導入したタンパク質を発現する分裂酵母変異株を取得していた。そこでまず、*tdh1*<sup>-</sup>と*ryh1*<sup>-</sup>遺伝子の両方に変異を持つ様々な二重変異株を作製した。取得した二重変異株におけるTORC2活性を測定した結果、*tdh1*<sup>-</sup>変異と*ryh1*<sup>-</sup>変異の間に付加的な効果が観察された。従って、Tdh1とRyh1は異なる機構でTORC2経路の酸化ストレス応答を制御すると考えられた。また、*tdh1*<sup>-</sup>の遺伝子破壊はTORC2とGad8間の物理的相互作用に影響しなかった。これらの結果は、Ryh1がTORC2とGad8間の結合に関与するという先行研究の結果と矛盾しない(文献④)。

③ Spc1-Sin1の結合とTORC2の活性制御

Y2Hによる結合領域の決定：全長Spc1と

結合可能な Sin1 のペプチド断片を Y2H 法により解析したところ、カルボキシ末端 (C 末端) 近傍に存在する塩基性アミノ酸に富む領域が Spc1 と Sin1 の結合に必須であることが判明した。また、Sin1 のこの塩基性領域を含み C 末端までの約 150 アミノ酸からなる領域が Spc1 との結合に十分であった。

Spc1 が直接的 TORC2 を制御する証拠は得られなかった: Spc1 結合領域を改変した変異型 Sin1 を発現する分裂酵母株を作製し、TORC2 活性を解析した。予想に反し、この変異導入はこの活性に影響しなかった。さらに、Sin1 中の Spc1 によりリン酸化される可能性のあるアミノ酸残基への変異でも TORC2 活性には影響しなかった。

#### ④ Spc1 は Atf1, Gpd1 を介して TORC2 経路の高浸透圧応答を制御する

野生型分裂酵母を高浸透圧ストレスに曝し TORC2 活性の経時変化を追跡したところ、一過的に低下した後、振幅することが判明した (図 1)。この変動は  $\Delta tdh1$  株や  $\Delta ryh1$  株でも同様であった。一方、 $\Delta spc1$  株では低下後の回復に遅延が見られた。この、TORC2 活性の回復の遅延を指標にスクリーニングを行い、同様の表現型を示す遺伝子として *atf1* および *gpd1* を単離した。さらなる遺伝学的解析により、Spc1, Atf1, Gpd1 が同一経路で TORC2 を制御することが判明した。Spc1 が Atf1 を介して Gpd1 の発現を制御することはすでに報告があり (文献⑤)、今後 Gpd1 による TORC2 経路の制御機構の解析が必要である。

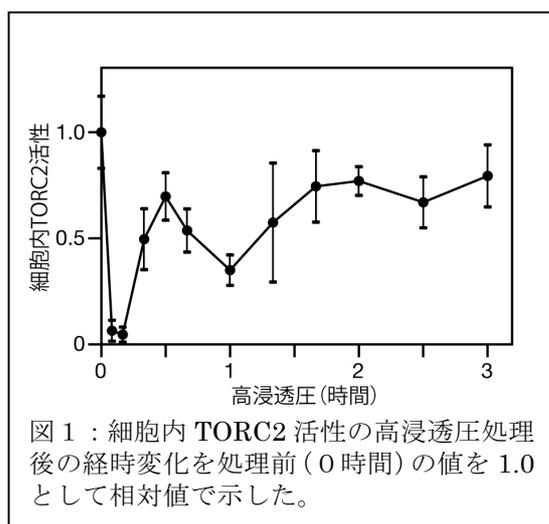


図 1 : 細胞内 TORC2 活性の高浸透圧処理後の経時変化を処理前 (0 時間) の値を 1.0 として相対値で示した。

#### ⑤ 非ストレス条件下での TORC2 制御

上記 TORC2 経路の高浸透圧応答の解析過程で、非ストレス条件下における TORC2 活性に関する知見が得られた。Spc1 による TORC2 経路の高浸透圧応答には Atf1 および Gpd1 が必要である一方、 $\Delta spc1$  株が示す非ストレス条件下での TORC2 活性の低下には Gpd1 は関与しなかった。この結果は Gpd1 非依存的な制御機構を示唆する。本研究課題ではストレス応答の解析が目的のため、詳細な解析は行

わなかったが、今後の研究に新たな展開をもたらす重要な知見である。

#### (2) 成果の位置づけとインパクト

どの生物種においても未だ未解明である TORC2 の制御機構の解明を目指したところが本研究の重要なポイントである。Ryh1 および Tdh1 は研究代表者のグループが独自に見出した制御因子であり、これらによる TORC2 経路の制御機構に関する知見を蓄積できたことは独創性という観点から評価できる。発表論文 (Hatano *et al.*) は酵母研究の論文に限らず、ヒトなど哺乳類の TORC2 に関する総説などでも紹介されており (文献⑥⑦)、その重要性・インパクトは高い。

#### (3) 今後の展望など

Spc1 が直接 TORC2 を制御しないであろうことから、Spc1 の下流因子の単離およびそれらの解析を行った。それにより、計画の若干の遅れが生じ、この件に関する論文の発表が期間内に行われなかった点は反省すべき点である。しかし、結果として新規 TORC2 制御因子として Gpd1 が得られ、今後新たな展開が期待できる重要な知見が得られたことは評価できる。

また、非ストレス条件下で Spc1 が Gpd1 非依存的に TORC2 経路を制御するという知見は新規 TORC2 制御因子の存在を示唆しており、TORC2 経路の制御の研究のさらなる広がりが期待できる。さらに、今後、今回の研究成果がヒト TORC2 において検討・検証されることで、今後 TORC2 研究に新たな展開をもたらす。最終的には、癌や生活習慣病など TORC2 が関与すると考えられている疾病の予防や治療に繋がっていくことが期待される。

#### <引用文献>

- ① Heitman *et al. Science*, **253**, 905 (1991)
- ② Loewith *et al. Mol. Cell*, **10**, 457 (2002)
- ③ Ikeda *et al. Cell Cycle*, **7**, 358 (2008)
- ④ Tatebe *et al. Curr. Biol.*, **20**, 1975 (2010)
- ⑤ Ohmiya *et al. J. Biochem.*, **125**, 1061 (1999)
- ⑥ Gaubitz *et al. Trends Biochem. Sci.*, **41**, 532 (2016)
- ⑦ Lee *et al. Trends Endocrinol. Metab.*, **28**, 319 (2017)

#### 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 1 件)

Tomoyuki Hatano\*, Susumu Morigasaki\*, Hisashi Tatebe\*, Kyoko Ikeda, and Kazuhiro Shiozaki: Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle*, **14**, 848-856 (2015)

\*第一著者 (査読有)

DOI: 10.1080/15384101.2014.1000215

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森ヶ崎 進 (MORIGASAKI, Susumu)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ

エンス研究科・博士研究員

研究者番号: 90242487

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )