

細胞増殖を制御するタンパク質キナーゼ複合体
mTORC2 制御サブユニット Sin1 の機能解析

米倉 敏哉

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞シグナル研究室

(塩崎 一裕 教授)

平成29年 2月14日提出

【目次】

序論.....	4
細胞内シグナル伝達とタンパク質のリン酸化	4
PI3K-Akt シグナル伝達経路による細胞増殖制御	5
mTOR によるシグナル伝達	6
mTORC1	8
mTORC2	12
mTORC2 とがん	15
mTORC2 制御サブユニット Sin1	16
本研究の目的と概要	17
材料と方法	18
1. 試薬	18
2. 培地	18
3. プラスミド	19
4. DNA を用いた実験の基本操作.....	20
5. 培養細胞を用いた実験の基本操作.....	22
6. ウェスタンブロッティング解析.....	23
7. 免疫沈降法 (IP)	24
8. プルダウンアッセイ	24
9. 酵母ツーハイブリッドアッセイ	25
10. CX-MS 解析.....	25
11. Sin1 の局在解析.....	26
12. CRISPR/Cas9 法を用いた Sin1 Δ PH 細胞の作成.....	26
13. 培養細胞からの DNA 抽出.....	26
14. シークエンス解析.....	27
結果.....	28
1. Sin1 は mTORC2 基質と相互作用する	28
2. Sin1 CRIM ドメインの酸性ループは基質結合において重要な役割を担う	33

3. CX-MS 法を用いた Sin1-Akt 相互作用インターフェースの同定.....	38
4. Sin1 における mTORC2 結合領域の同定.....	40
5. Sin1 の C 末端領域は mTORC2 活性に必要である.....	45
6. Sin1 PH ドメインは PIP3 との結合を介して mTORC2 活性に関与する	48
7. Sin1 PH ドメイン欠損細胞の樹立.....	52
8. Sin1 PH ドメイン欠損細胞は mTORC2 活性の低下と細胞増殖遅延を示す.....	55
考察.....	57
1. Sin1 は mTORC2 の基質認識サブユニットとして機能する	58
2. Sin1 は N 末端と N-CRIM を介して mTORC2 に組み込まれる	60
3. Sin1 の PH ドメインは mTORC2 の活性制御に関与している	63
4. 結論	67
謝辞.....	68
参考文献	70
補遺.....	83

【序論】

細胞内シグナル伝達とタンパク質のリン酸化

全ての生物は周囲の環境を感知し、それに応じて適切な応答を行わなければならない。これを可能にしているのが細胞内シグナル伝達である。細胞内に存在する多種多様な因子は外部から受け取った情報を正確に次の因子へと伝え、細胞が環境に適応するための反応を引き起こす。200種類以上もの細胞から構成されている私たちヒトのように複雑な生物は、より複雑・精巧なシグナル伝達装置のネットワークを備えることで生命を維持している。例えば、細胞増殖因子や細胞外の栄養状態などのシグナルを統合し厳密に細胞増殖を制御することで、適切なタイミングで細胞増殖を引き起こし必要以上に細胞が増殖を続けないうコントロールしている。ところが、このような細胞増殖の制御機構が破綻してしまうと細胞増殖が異常に亢進し、がんなどの疾患を引き起こす。このことから、細胞内シグナル伝達研究は生命現象の理解だけでなく、病態の解明や新たな治療法の開発においても重要である。

細胞内シグナル伝達には cAMP やカルシウムイオンなどのセカンドメッセンジャーによるもの、G タンパク質共役受容体 (GPCR) に結合して働く G タンパク質や、Ras に代表される低分子量 GTPase のように GTP/GDP との結合状態によってオン・オフ状態を変えるもの、タンパク質間の特異的な結合によるものなど、様々な様式が存在する。その中でも本研究で焦点を当てているのがタンパク質のリン酸化によるシグナル伝達である。タンパク質のリン酸化は翻訳後修飾の一種であり、真核生物においてタンパク質中のセリン、スレオニンおよびチロシン残基に起こる。タンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) はヒトゲノムにおいては少なくとも 518 種類存在するとされており、細胞内の多くのタンパク質がリン酸化を受けている。標的タンパク質がプロテインキナーゼによってリン酸化されると、リン酸基の負の電荷の影響により立体構造変化などを引き起こし、タンパク質の性質を大きく変える。その結果、活性化や不活性化、他のタンパク質との結合や解離など様々な現象が起こり、次の因子へとシグナルが伝達される。またリン酸化はタンパク質脱リン酸化酵素 (プロテインホスファターゼ) によって可逆的に脱リン酸化され、元の状態に戻ることができる。この可逆性はシグナル伝達において重要かつ理想的な性質であり、これにより細胞は様々な刺激に対して瞬時に適切に応答することができる。近年、がん治療に多く使われている分子標的薬はリン酸化によるシグナル伝達を標的としたものが多く開発されており、今後もリン酸化を介したシグナル伝達研究の発展はより有用な分子標的薬の開発に結びつくと期待できる。

PI3K-Akt シグナル伝達経路による細胞増殖制御

細胞増殖制御に関わるシグナル伝達経路において PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) が重要な働きをしている。PI3K は細胞膜上でイノシトールリン脂質のイノシトール環 3 位のヒドロキシル基をリン酸化する。PI3K ファミリーには 3 種類のタイプが存在し、キナーゼドメインの構造に基づいてクラス I、クラス II、クラス III に分類され、それぞれ基質特異性が異なっている (Vanhaesebroeck et al., 2010)。これらのうち、増殖因子シグナルにおいて重要なホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PIP3) を産生するのはクラス I PI3K である。クラス I PI3K はヘテロ二量体として存在しており、調節サブユニットである p85 と触媒サブユニットである p110 からなる。PI3K は受容体チロシンキナーゼ (RTK) が PDGF (Platelet-derived Growth Factor : 血小板由来増殖因子) などの増殖因子と結合すると起こる RTK の二量体化と自己リン酸化を引き金に活性化される (図 1)。自己リン酸化された RTK のチロシン残基に p85 制御サブユニットの Src-homology 2 (SH2) ドメインが結合することで p110 触媒サブユニットが活性化する。また p110 触媒サブユニットは Ras-binding domain (RBD) を有しており、RTK のリン酸化チロシンへの p85 の結合の他に、Ras による活性化も報告されている (Gupta et al., 2007)。活性化した PI3K によって産生された PIP3 は Pleckstrin homology (PH) ドメインを持つタンパク質を細胞膜に局在化させる。がん原遺伝子であり細胞増殖制御に関わるセリン/スレオニンキナーゼ Akt (PKB とも呼ばれる) はその N 末端に存在する PH ドメインを介して PIP3 に結合し、細胞膜へと局在することで立体構造変化を起こす (Calleja et al., 2007)。この膜局在によって生じる Akt の構造変化により、Akt と同じく PH ドメインを有する PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) が Akt の活性化ループにアクセスしやすくなり、PDK1 が Akt の活性化ループ (Thr-308) をリン酸化することで Akt を活性化する。活性化した Akt は BAD、p27、FOXO などのリン酸化を介して細胞増殖の亢進やアポトーシスの抑制に寄与している (Manning and Cantley, 2007)。このように細胞増殖や生存に関わる PI3K-Akt 経路の異常は非常に多くのがん細胞において知られている。PI3K の活性化変異や、がん抑制遺伝子であり PIP3 を脱リン酸化する PTEN の変異や失活により、細胞内の PIP3 量の上昇と Akt の活性化が見られる (Cully et al., 2006)。特に PI3K に関しては、複数存在するアイソフォームのうち p110 α をコードする PI3KCA のみが発がんに関連していることが知られており、遺伝子増幅や活性獲得型変異が見られる。PI3KCA の変異の多くは helical domain (E545K, E542K) とキナーゼドメイン (H1047R) に集中しており、ホットスポットとして報告されている (Samuels et al. 2004)。このように PI3K を介したシグナル伝達経路は細胞増殖や発がんと深く関連しており、本研究で着目する

mTOR も PI3K 経路によって制御されている。

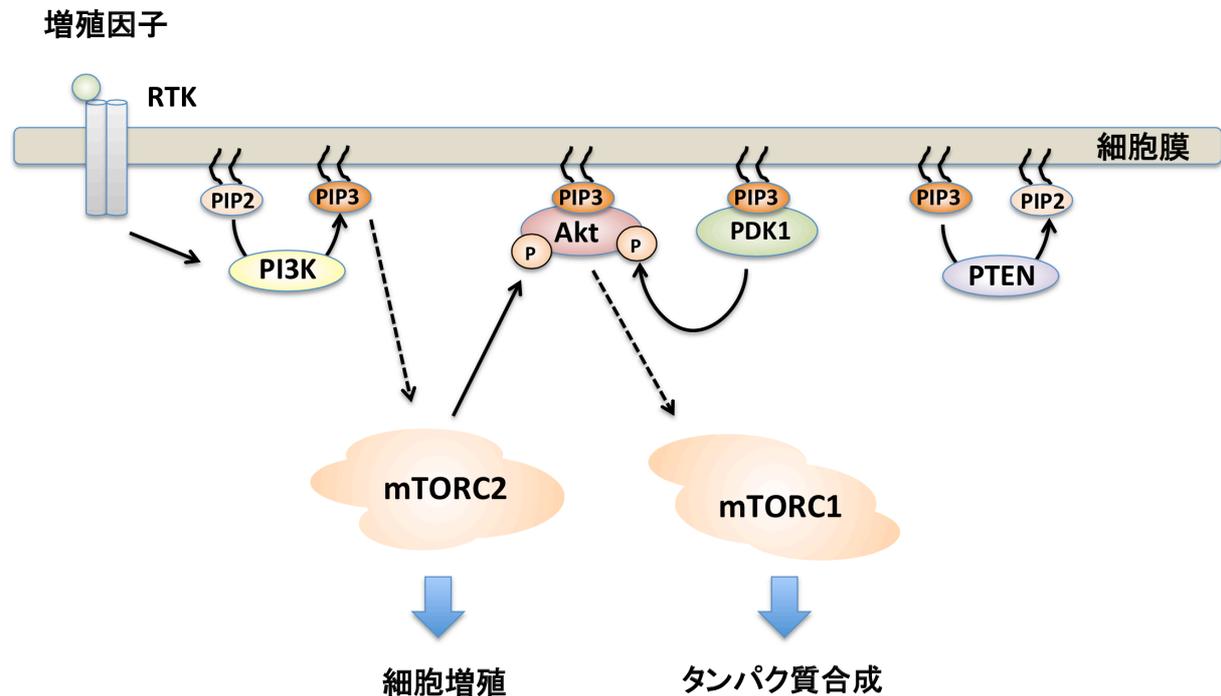


図1. PI3K/Akt および mTOR シグナル経路 による細胞増殖の制御

増殖因子を受け取った受容体チロシンキナーゼ (RTK) によって PI3K が活性化される。活性化した PI3K は細胞膜上で Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) を基質として Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) を産生する。PIP3 は Akt や PDK1 を細胞膜上に局在させることで、Akt の活性化ループが PDK1 によってリン酸化される。また mTORC2 は PIP3 によって活性化し、Akt の疎水性モチーフをリン酸化する。しかし、PIP3 による mTORC2 の活性化メカニズムは未だに明らかになっていない。mTORC2 は Akt などの AGC キナーゼを活性化し、細胞増殖を亢進する。一方、mTORC1 は Akt の下流で活性化され、タンパク質合成を制御する。がん抑制遺伝子である PTEN は PIP3 を脱リン酸化することで PI3K 経路を抑制する。

mTOR によるシグナル伝達

mammalian Target Of Rapamycin (mTOR、最近では mechanistic TOR とも呼ばれる) は酵母からヒトまでの真核生物に保存されたセリン/スレオニンタンパク質キナーゼである。mTOR は分子量 300kDa に迫る巨大なタンパク質で PI3K のキナーゼドメインと類似性が高く、PI3K-related kinase (PIKK) ファミリーに分類される。PIKK には他に DNA 損傷チェックポイントや DNA 修復に関わる ATM、ATR や DNA-PKs が知られており、これらは脂質をリン酸化する PI3K と異なり標的タンパク質中のセリン/スレオニン残基をリン酸化する。PIKK に共通の構造として N 末端

に存在する HEAT リピートと呼ばれる領域、キナーゼドメインの N 末端側に FAT (FRAP, ATM and TRRAP) ドメイン D、キナーゼドメインの C 末端側に FATC ドメインを有している (図 2)。mTOR においてはこれらに加え、FKBP12-rapamycin binding (FRB)ドメインがキナーゼドメインの N 末端側に位置しており、FKBP12—ラパマイシン複合体がこの FRB ドメインに結合することで mTOR 活性が阻害される。mTOR はインスリンや増殖因子シグナル伝達経路で制御されていることに加え、アミノ酸などの栄養やストレスにも応答する。このように、mTOR は様々なシグナルを感知・統合し細胞の成長や増殖、代謝など多様な細胞機能を制御するシグナル伝達における「ハブ」のような役割を持つ。

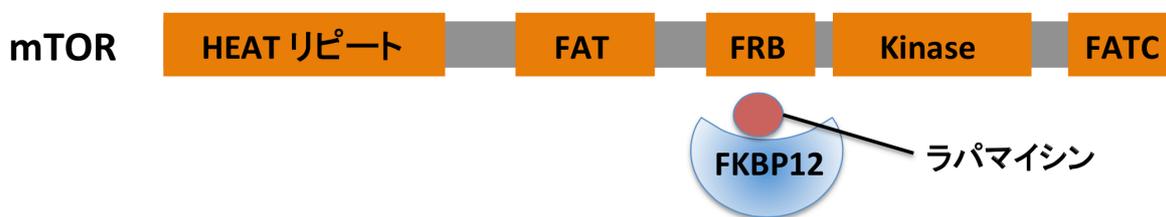


図 2. mTOR のドメイン構造

mTOR のドメイン構造の模式図を示す。N 末端に存在する HEAT リピートはタンパク質間相互作用に関与すると考えられている (Gingras et al., 2001)。FKBP12-ラパマイシン複合体は mTOR のキナーゼドメインの N 末端側に位置する FRB ドメインに結合することで mTOR の活性を阻害する。

1990 年代初期に遺伝学的手法により出芽高酵母 TOR1/2 遺伝子がラパマイシンの標的として発見されたことから TOR 研究がスタートした (Heitman et al., 1991; Kunz et al., 1993)。その後 1994 年に生化学的手法により哺乳類で mTOR が同定された (Sabatini et al., 1994)。当初ラパマイシンは抗真菌作用を示す抗生物質として開発されていた。しかし、免疫抑制作用や細胞増殖抑制作用を示すことから、現在ではラパマイシンやその誘導体が免疫抑制剤やがん治療薬として開発されている (Benjamin et al., 2011)。このようなラパマイシンの医療における魅力的な効果から mTOR への興味は高まり、ラパマイシンを用いた mTOR 研究が盛んに行われた。ところが、TOR の発見から約 10 年後の 2002 年に mTOR が細胞内において構成因子の異なる 2 種類の複合体を形成することが明らかとなり、これら 2 つの複合体は mTOR complex 1 (mTORC1)、mTORC2 と名付けられた (Loewith et al., 2002; 図 3)。驚くことに、これら 2 つの複合体のうちラパマイシンによって阻害されるのは mTORC1 のみで mTORC2 はラパマイシンに非感受性であることが明らかとなった。つまり、それまでにラパマイシンによる阻害実験で得られていた知見は mTORC1 に

関するものであった。このような背景から、その後も mTORC1 に関する報告が次々となされる一方で、mTORC2 に関する研究は遅れを取る事となる。

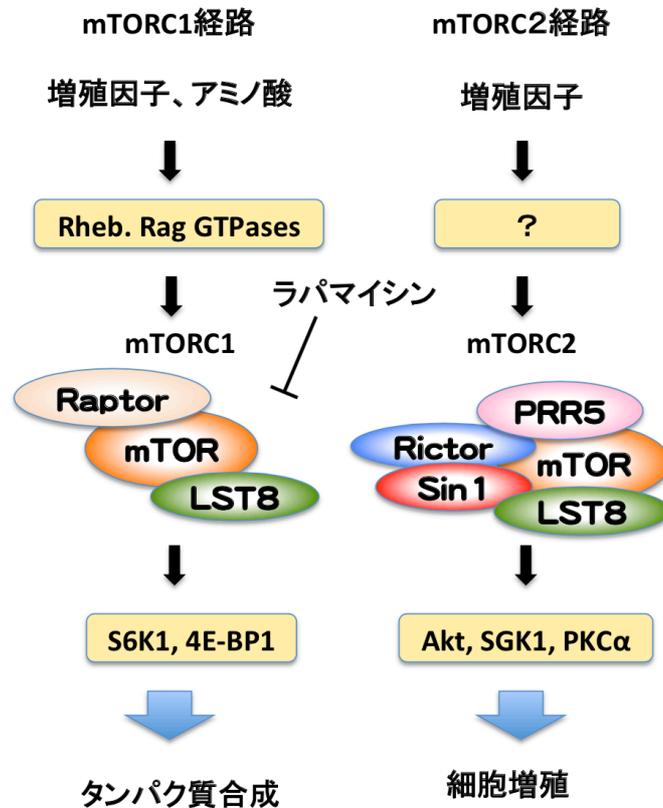


図 3. mTOR1 経路と mTORC2 経路

mTOR は制御サブユニットの異なる 2 つの複合体 mTORC1、mTORC2 を形成する。mTORC1 は増殖因子やアミノ酸によって活性化し S6K1 や 4E-BP1 をリン酸化することでタンパク質合成を制御する。一方で、mTORC2 は増殖因子によって活性化し、Akt、SGK1、PKC α をリン酸化することで細胞増殖を制御する。mTORC1 の活性化因子として Rheb や Rag GTPases が知られている。これに対し、mTORC2 の活性化メカニズムは未だ多くの謎が残されている。mTORC1 はラパマイシンによって阻害されるが、mTORC2 はラパマイシンに非感受性である。この他に mTORC1 を抑制する制御サブユニットとして PRAS40 が、mTORC1、mTORC2 両方を抑制する制御サブユニットとして DEPTOR が報告されている。

mTORC1

mTORC1 は mTOR、mLST8 (Jacinto et al, 2004; Kim et al. 2003)、Raptor (regulatory associated protein of mTOR) (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002) を基本的な構成因子として含んでいる。mTORC1 は 1 MDa もの大きさの巨大なタンパク質複合体であるが、近年、電子顕微鏡を用いた解析により mTORC1 の立体構造

が報告され、mTORC1 が二量体として存在していることが明らかとなっている (Yip et al., 2010)。この他に mTORC1 に結合しキナーゼ活性を阻害する制御サブユニットとして DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) や PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) (Haar et al., 2007; Sancak et al., 2007) が報告されている。PRAS40 は Akt によるリン酸化を受けることで mTORC1 から解離する。

mTORC1 の代表的な基質として S6K1 (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002) や 4E-BP1 (Brunn et al., 1997; Hara et al., 1997) が知られており、これらのリン酸化により mTORC1 はタンパク質合成を促進する (Ma and Blenis, 2009)。これらの基質タンパク質はその配列中に存在する TOS (TOR Signaling) モチーフを Raptor が認識し結合することで mTORC1 によるリン酸化を受ける (Schalm and Blenis, 2002; Nojima et al., 2003)。TOS モチーフはわずか5 アミノ酸からなる短いアミノ酸配列で、生物種間でも保存されている。また酵母において TOR がオートファジーを抑制していることが 1998 年に報告され (Noda and Ohsumi, 1998)、その後約 10 年経って ULK1 (出芽酵母 Atg1) および Atg13 が mTORC1 によって直接リン酸化されることでオートファジーが抑制されていることが明らかとなった (Chang et al., 2009; Hosokawa et al., 2009)。つまり mTORC1 が活性化するとタンパク質合成を促進し、オートファジーを抑制する。逆に、mTORC1 の活性が低下すると、タンパク質合成は低下しオートファジーの亢進が起こる。

mTORC1 は増殖因子や、エネルギー状態やアミノ酸などの栄養、ストレスなど様々なシグナルによって制御されている (Laplante and Sabatini, 2012)。mTORC1 の活性制御機構については多くの研究が行われているが、特に増殖因子とアミノ酸による制御に関して進展が大きい (図 4)。

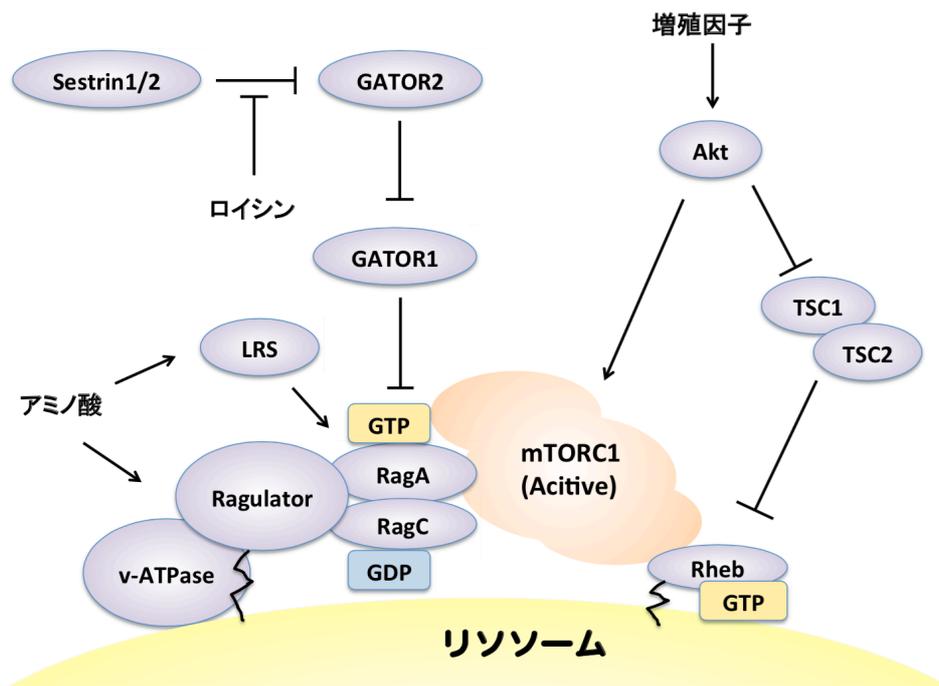


図4. アミノ酸および増殖因子による mTORC1 の活性制御機構

増殖因子シグナルにおいては、活性化した Akt による TSC1/2 のリン酸化によって Rheb に対する GAP 活性が阻害され、Rheb が GTP 結合型の活性化型となる。また Akt は mTORC1 の抑制的な制御サブユニットである PRAS40 をリン酸化することで mTORC1 から解離させる。アミノ酸シグナルにおいては Rag 二量体が mTORC1 のリソソームへの局在に関与しており、GTP 結合型 RagA (RagB) と GDP 結合型 RagC (RagD) のヘテロ二量体が mTORC1 に強く結合し、リソソーム膜上へと局在させる。Rag を介した活性化因子として、LRS、Ragulator、v-ATPase が報告されている。一方で、Rag を介した抑制因子として GATOR1 が報告されている。GATOR2 は GATOR1 を抑制することで Rag を活性化にする。Sestrin1/2 はロイシン非存在下において、GATOR2 に結合し阻害することで mTORC1 を負に制御する。活性化型 Rag 二量体によって mTORC1 がリソソーム膜上に局在し、活性化型 Rheb と作用することで mTORC1 は活性化する。

増殖因子やインスリンによる mTORC1 の活性化機構においては TSC1/TSC2 複合体と低分子量 GTPase である Rheb (Ras homolog enriched in Brain) が中心的な役割を担っている。GTP 結合型 Rheb (活性化型) は mTOR に結合することで mTORC1 のキナーゼ活性を高める (Long et al., 2005)。低分子量 GTPase である Rheb は GTP/GDP との結合によって活性が制御されるが、TSC1/2 は Rheb の GAP (GTPase activating protein) として働くことで Rheb を不活性化にし、結果的に mTORC1 活性を抑制する (Inoki et al., 2003; Tee et al., 2003)。インスリンや増殖因子によって活性化した Akt は TSC2 を直接リン酸化することでその GAP 活性を低

下させ、mTORC1の活性化を引き起こす(Li et al. 2004)。Rhebはリソソームに局在しており、mTORC1のリソソームへの局在化はmTORC1の活性制御機構において重要なステップであることが知られている(Bar-Peled and Sabatini, 2014)。mTORC1はアミノ酸に応答してリソソームに局在するようになるが、これは低分子量GTPaseであるRag GTPasesによって制御されている(Sancak et al., 2008)。Rag GTPaseにはRagA, RagB, RagC, RagDの4種類が存在しており、これらのRag GTPaseはヘテロ二量体として機能する。Rag GTPaseが形成するヘテロ二量体は“RagAまたはRagB”と“RagCまたはRagD”の組み合わせと決まっている(Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008)。さらに、このRag二量体はRagA (RagB)がGTP結合型、RagC (RagD)がGDP結合型の組み合わせで最も活性が高い。つまり、RagA (B) ^{GTP}-RagC (D) ^{GDP}が活性化型Rag二量体であり、mTORC1を強く結合することでリソソームに局在させる。Rag二量体は、リソソーム膜に局在するタンパク質複合体Ragulatorを介してリソソーム膜上に局在している(Bar-Peled et al., 2012)。RagulatorはRagA (RagB)に対するGEFとして働くことでRag二量体の活性化に寄与する。同様にRag二量体の活性化因子としてロイシル tRNA 合成酵素(LRS)が同定された(Han et al., 2012)。LRSはロイシンをtRNAにチャージする酵素であり、細胞内のロイシンセンサーとして働く。アミノ酸を感知したLRSはRagDのGAPとして働くことでRagDのGTP-GDPへの加水分解を促進してmTORC1を活性化する。LRSと同様にロイシンセンサーとして働く因子として、Sestrin1/2が報告されている(Wolfson et al., 2016)。ロイシン飢餓状態において、Sestrin1/2は後述するGATOR2に結合し阻害することでmTORC1を負に制御しており、ロイシンを添加するとSestrin1/2がGATOR2から離れることで、mTORC1が活性化する。さらに同じグループは同時にSestrin2-ロイシン複合体の構造についても明らかにしており、Sestrin2にロイシンが結合することで構造変化が起こりGATOR2から解離することが報告されている(Saxton et al., 2016)。このことから、Sestrin1/2はロイシンの直接的なセンサーであると考えられている。またmTORC1の活性化にはリソソームに局在するv-ATPaseの関与も報告されており、リソソーム内のアミノ酸プールの変化をv-ATPaseが感知しRagulatorを介してmTORC1を活性化すると考えられている(Zoncu et al., 2011)。一方で、RagA (RagB)のGAPとして働き、mTORC1を負に制御する因子としてGATOR1が報告されている(Bar-Peled et al., 2013)。また同時に同定されたGATOR2はGATOR1を抑制することでmTORC1を活性化する。このように、mTORC1は複雑な制御を受けることでアミノ酸や増殖因子を感知し、タンパク質合成のような同化作用と、オートファジーのような異化作用を適切に制御することで細胞成長をコントロールしている。

mTORC2

mTORC2 には mTORC1 と共通のサブユニットとして mTOR と mLST8 が含まれており、mTORC2 特異的サブユニットとしては Rictor (Jacint et al., 2004; Sarbassov et al. 2004)、Sin1 (Frias et al., 2006; Jacint et al., 2006)、Protor1/2 (PRR5/5L としても知られる) (Pearce et al., 2007; Thedieck et al., 2007; Woo et al., 2007) が報告されている。これらの mTORC2 サブユニットは酵母においても保存されている。また出芽酵母において Avo2 が TORC2 サブユニットとして同定されているが、Avo2 は出芽酵母特異的なサブユニットであり、他の生物種では保存されていない (Loewith et al., 2002)。生化学的な解析により、mTORC2 は mTORC1 と同様に二量体を形成することが示唆されていた (Wullschleger et al., 2005; Jain et al., 2014)。つい最近、電子顕微鏡を用いた解析によって出芽酵母 TORC2 のおおまかな立体構造を解析した研究が報告され、実際に mTORC2 は二量体で存在することが示された (Gaubitz et al., 2015; 図 5A)。さらに、この研究では Crosslinking-Mass Spectrometry 法による解析も行っており、AVO3 (Rictor の出芽酵母ホモログ) は Tor2 (mTOR の出芽酵母ホモログ) に巻きつくように結合していることが示されている (図 5B)。Avo3 の C 末端が Tor2 の FRB ドメインの近傍に存在していることから、AVO3 によって Tor2 の FRB ドメインが隠れることで FKBP12-ラパマイシン複合体が結合できず、TORC2 がラパマイシンに抵抗性を示す、というモデルが提唱されている。実際、AVO3 の C 末端 157 アミノ酸を欠損させると TORC2 は正常に機能するもののラパマイシンに感受性になることも報告されており、このモデルを支持している。またクロスリンク実験の結果から、LST8 は AVO1 (Sin1 の出芽酵母ホモログ) と Tor2 に挟まれるように位置していることが示されている (図 5C)。

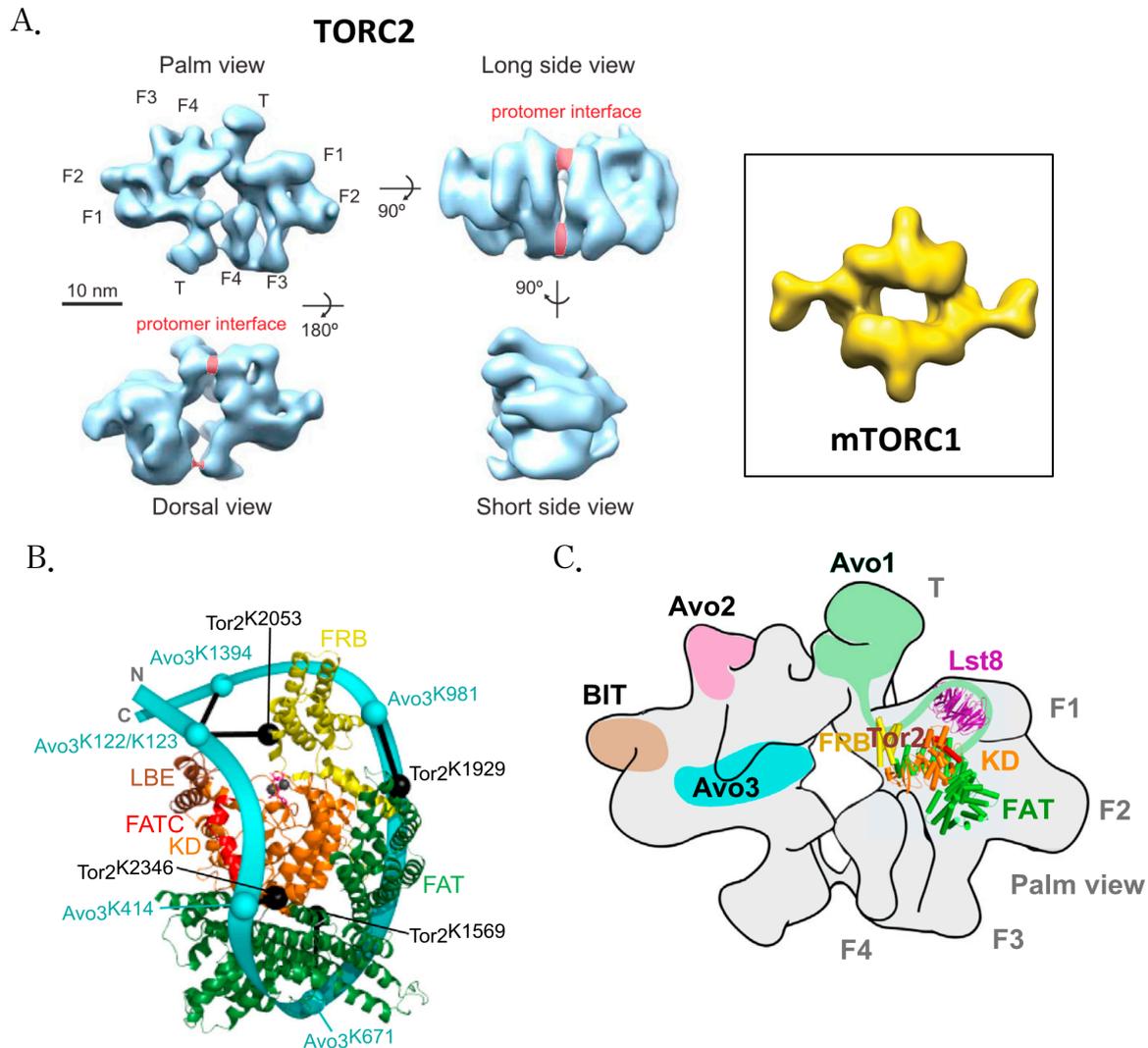


図5. Gaubitz et al. (2015)で報告された TORC2 の立体構造

- (A) 左側の青い図は TORC2 の EM (電子顕微鏡) 構造であり、4 方向から見た構造を示してある。右側に黄色で示した図は mTORC1 の EM 構造 (EMDB 5197; Yip et al., 2010) であり、比較のために示した。どちらの構造も中央部に空洞が存在する。TORC2 は二量体として存在する。赤い部分はプロトマー間の相互作用部位を示している。TORC2 の構造が手のひらに似ていることから、著者らはこの構造の各領域を Palm、Thumb (T) と 4 つの Fingers (F1~F4) として分類した。
- (B) Avo3 と Tor2 の結合様式モデル図。Tor2 の立体構造をリボンモデルで、それに結合する Avo3 を水色のリボンで表している。Tor2 の FAT ドメインは緑で、FRB ドメインは黄色で、触媒ドメインは橙で、LST8-binding element (LBE) は茶色で、FATC ドメインは赤で示している。クロスリンクが見られたリジン残基を Tor2 においては黒で、Avo3 においてはシアンで示している。
- (C) TORC2 構造における各サブユニットの配置のモデル図。左のプロトマーにおいて BIT、Avo2、Avo3 を、右のプロトマーにおいて Tor2-LST8 複合体と Avo1 の位置を示している。Tor2 の各ドメインは以下のように示されている。FAT (緑)、FRB (黄)、キナーゼドメイン (KD: 橙)、FATC (赤)。また LST8 を紫で示している。

mTORC2の存在が明らかになってからしばらくの間、その基質や細胞機能は不明であった。Aktの活性化には活性化ループ(T-loopとも呼ばれる;Thr-308)と疎水性モチーフ(Hydrophobic motif; Ser-473)のリン酸化が必要であり、それぞれPDK1(Alessi et al., 1997)とPDK2によってリン酸化される。PDK2に関しては、その役割を担うキナーゼがなかなか同定されず、長い間議論が続けられてきた。しかし、2005年にmTORC2がAktをリン酸化するPDK2であることが報告されmTORC2はAktの制御因子として注目を集めるようになった(Sarbassov et al., 2005)。この他にmTORC2はSGK1の疎水性モチーフ(Ser-422)(Garcia-Martinez and Alessi, 2008)やPKC α の疎水性モチーフ(Ser-657)(Jacinto et al., 2004, Sarbassov et al., 2004)をリン酸化することが報告されている。SGK1は細胞膜上に存在するNa⁺などの輸送に関わるイオントランスポーターの局在や発現を制御することで細胞内へのイオンの取り込みや、個体レベルでは腎機能に関与している(Wulff et al., 2002; Lang et al., 2009)。またSGK1はAktと同様にFOXO1/3aをリン酸化することで細胞の生存にも関与しており、その標的基質や細胞機能はAktと一部重複すると考えられている(Brunet et al., 2000)。mTORC2によるPKC α のリン酸化は細胞骨格の制御に関与していることが示唆されている(Sarbassov et al., 2004)。

いくつかのAGCキナーゼは活性化ループと疎水性モチーフに加えてターンモチーフもリン酸化されており、ターンモチーフのリン酸化はタンパク質の成熟や安定性に寄与していることが知られている。mTORC2はAktおよびPKC α の疎水性モチーフに加えて、ターンモチーフ(Akt Thr-450, PKC α Thr-638)もリン酸化しており、それぞれのタンパク質の安定性に寄与していることが報告されている(Facchinetti et al., 2008; Ikenoue et al., 2008)。血清飢餓や増殖因子・インスリン刺激などに応答する活性化ループや疎水性モチーフのリン酸化とは異なり、ターンモチーフのリン酸化は非常に安定であり血清飢餓条件下でも低下しない。さらに興味深いことに、mTORC2は翻訳途中のAktおよびPKC α のターンモチーフをin vitroでリン酸化することが報告された(Oh et al. 2010)。このことから、疎水性モチーフとターンモチーフのmTORC2によるリン酸化メカニズムはそれぞれ異なっている可能性が考えられる。

mTORC2の局在や活性制御機構については議論の余地が多く残されている。出芽酵母においてTORC2は細胞膜にAVO1(哺乳類Sin1の出芽酵母ホモログ)のPHドメインを介して局在し細胞膜の伸張によって活性が制御されることが報告されている(Berchtold et al., 2012)。哺乳類細胞においてもSin1はPHドメインを有していることからmTORC2は細胞膜に局在していることが考えられる。しかし、哺乳類細胞においてmTORC2は、細胞膜以外にもミトコンドリアや小胞体、ミトコンドリ

ア-小胞体 ジャンクション、リソソームなど様々な場所への局在が報告されており、正確な細胞内局在と活性制御の関わりは明らかとなっていない (Betz and Hall, 2013)。近年、リボソームとの結合が mTORC2 の活性化に関与していることが報告されている (Zinzalla et al., 2011)。しかしながら、どのようなメカニズムでリボソームが mTORC2 を活性化しているのかは謎である。また以前から知られているように mTORC2 は PI3K の下流で制御されており、PIP3 によって活性化する (Gan et al., 2011) がそのメカニズムは明らかとなっていない。このように、mTORC2 は細胞増殖制御において重要な役割を持つことが明らかとなってきた一方で、その制御メカニズムや機能メカニズムについては未だ多くの謎が残されている。

mTORC2 とがん

mTORC2 ががん原遺伝子 Akt を含む AGC キナーゼをリン酸化することで細胞の増殖を制御していることが明らかになったことから、mTORC2 とがん細胞増殖との関連が注目されるようになった。事実、前立腺がん発症マウスにおいて前立腺特異的に mTORC2 構成因子である Rictor を欠損させると正常細胞に影響を与えずに腫瘍の発生が抑制される (Guertin et al. 2009)。このことから、mTORC2 を阻害する薬剤は有効ながん治療薬になり得ると考えられるが、mTORC2 を特異的に阻害する薬剤は今のところ開発されていない。現在報告されている薬剤で mTORC2 を阻害可能なのは Torin1 (Thoreen et al., 2009) や PP242 (Apsel et al., 2008) といった mTOR の ATP 競合性阻害剤である。しかし、これらの薬剤は mTORC1、mTORC2 の両方を阻害することで大きな副作用が出るのが予想されがん治療薬としては期待できない。なぜなら、mTORC1、mTORC2 の欠損は共に胎生致死となるが、細胞レベルでは Rictor 欠損細胞が生育可能であるのに対し、mTOR や Raptor を欠損する細胞は細胞レベルでも生育できない (Guertin et al., 2006)。また mTORC1 による S6K の活性化は IRS1 (Insulin receptor substrate 1) のリン酸化を介したネガティブフィードバックにより PI3K シグナルを不活性化する (Harrington et al., 2004; Shah et al., 2004; Tzatsos and Kandror, 2006)。つまり、mTORC1 を阻害するとネガティブフィードバックが解除され、PI3K-Akt 経路の活性化が引き起こされてしまう。このことから、mTORC2 特異的阻害剤は副作用の少ない抗がん剤の候補として期待される。しかし、mTORC2 の機能メカニズムや制御機構に関しては未解明な点も多く、開発のための手がかりも少ないのが現状である。

mTORC2 制御サブユニット Sin1

mTORC2 サブユニットである Sin1 (SAPK-interacting protein 1) は、分裂酵母において MAP キナーゼである Spc1/Sty1 の相互作用因子として同定された (Wilkinson et al., 1999)。ヒトにおいても生化学的手法を用いたスクリーニングによって、MAP3K である MEKK2 との相互作用因子として Sin1 (この報告においては Mip1 : MEKK2-interacting protein1 と呼ばれている) が同定されている (Cheng et al., 2005)。このことから、Sin1 は MAPK 経路に関与していると考えられていたが、その後の分裂酵母における研究で、Sin1 を欠損させても MAPK 経路に影響が見られないことが報告された (Ikeda et al., 2008)。一方で、Sin1 は mTORC2 の構成因子であることが報告され (Loewith et al., 2002; Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006; Yang et al., 2006)、以後 Sin1 は mTORC2 サブユニットとして注目されるようになった。Sin1 を欠損させると mTORC2 基質である Akt のリン酸化が消失することに加え、mTORC2 が形成されなくなることから Sin1 は mTORC2 の形成や安定性に寄与していると考えられた (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006; Yang et al., 2006)。さらに、Sin1 を免疫沈降すると Akt が共沈してくることから、Sin1 が Akt を mTORC2 にリクルートするための足場として機能する可能性が示唆された (Jacinto et al., 2006)。しかし、Sin1 がどのような分子機能によって mTORC2 機能に貢献しているのかは不明であった。

Sin1 は、その中央部に生物種間で保存性が高い領域、CRIM (Conserved Region In the Middle) を持つことが Sin1 のアミノ酸配列のアラインメント解析によって報告された (Schroder et al., 2004)。これに加え、Sin1 は C 末端側の領域に RBD (Ras binding domain) と PH (Pleckstrin homology) ドメインを持つ (Schroder et al., 2007)。出芽酵母においては、Avo1 (出芽酵母 Sin1 ホモログ) の PH ドメインは TORC2 の細胞膜への局在に必須であることが示されている (Berchtold and Walther, 2009)。しかし、これらのドメインが哺乳類 mTORC2 の機能においてどのような役割を持つのかは不明であった。

当研究室では、分裂酵母をモデル生物として用いて TORC2 研究を進めてきた。それにより、分裂酵母においても mTORC2-Akt/SGK1 経路が TORC2-Gad8 経路として保存されていることを明らかにしている (Ikeda et al., 2008)。さらに、長い間不明であった TORC2 の活性化因子として Rab ファミリー低分子量 GTPase Ryh1 を同定している (Tatebe et al., 2010)。当研究室で行った、酵母ツーハイブリッド法を用いた分裂酵母 TORC2 基質 Gad8 相互作用タンパク質のスクリーニングにおいて、Sin1 が同定された。その後の解析により、Sin1 は CRIM を介して Gad8 に結合することが明らかとなった (未発表)。CRIM は進化的に高度に保存された領域であるこ

とから、哺乳類細胞においても Sin1 CRIM が mTORC2 基質と結合する機能を持つことが考えられた。本研究は、このような分裂酵母で得られた知見を手がかりとして、哺乳類細胞で Sin1 の機能解析を行うことからスタートした。

本研究の目的と概要

本研究では、mTORC2 の特徴を規定する制御サブユニットタンパク質、特に Sin1 の機能解明を試みた。これにより mTORC2 の機能メカニズムを解明・理解し、mTORC2 制御機構解明および mTORC2 を標的とした分子標的薬の開発に結びつくような知見を得ることが目的である。本研究ではまず、mTOR 複合体の基質特異性に着目した。mTORC1 と mTORC2 における触媒サブユニットはどちらも mTOR である。それにも関わらず、2つの複合体はそれぞれに特異的な基質をリン酸化することができる。このことから、それぞれの複合体に特異的な制御サブユニットが各複合体の基質特異性を決定していると考えられる。mTORC1 の基質認識機構としては、上述の通り Raptor が mTORC1 基質中に存在する TOS モチーフを認識することが知られている。一方で、mTORC2 の基質認識機構は不明であったが、本研究において、mTORC2 特異的サブユニットである Sin1 が mTORC2 基質と特異的に結合する基質認識サブユニットとして働くことを明らかにした。Sin1 は、その中央に存在する CRIM を介して基質と結合する。またこれに加えて、本研究では Sin1 CRIM の立体構造情報を基に解析を行い、Sin1-mTORC2 基質間相互作用の構造生物学的知見を得ることに成功している。

さらに、本研究では Sin1 が mTORC2 に組み込まれるために必要な領域の同定を試みた。その結果、Sin1 の CRIM より N 末端側に mTOR や Rictor と結合するために必要な領域が存在することを明らかにしている。これに加え、Sin1 の C 末端に存在する PH ドメインの機能解析を行い、哺乳類細胞において Sin1 PH ドメインは mTORC2 の活性化に関与することを見出した。これらの結果から、Sin1 は mTORC2 の基質認識だけでなく、PH ドメインを介して mTORC2 の活性制御にも関与していることが明らかとなった。

【材料と方法】

1. 試薬

試薬に関しては特に記載がない限り、一般的な試薬はナカライテクス社または和光純薬社の製品を使用した。また、実験に用いる一般的な試薬の組成は特に記載がない限り Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory) を参考にした。

2. 培地

2-1. 培養細胞用培地

D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red に 200mmol/l L-Alanyl-L-Glutamine Solution (×100), Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (100×)を適量加え、Fetal Bovine Serum (SIGMA)を 10%となるように加えたものを用いた。

2-2. 大腸菌用培地

- ・ TB 培地(Terrific Broth)

参考:Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory)

- ・ LB 培地

参考:Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory)

※Ampicillin は 50 mg/L の濃度で使用。

2-3. 出芽酵母用培地

最少培地 (SD) プレート

0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose, 2% Drop out mix, 2% agar
必要に応じて 0.005% adenine, 0.01% histidine を加えた。

Drop out mix

以下の粉末を等量混ぜ合わせ、乳鉢と乳棒ですり潰したものを用いた

Alanine, Arginine, Aspartic acid, Cysteine, Glutamine, Glutamic acid, Inositol (myo), Isolucins, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tyrosine, Uracil, Valine

3. プラスミド

plasmid ID	plasmid NAME
120	pGBT8
133	pGADGH
698	pMAL-c2X*
986	pGBT8-Hs Akt2
987	pGBT8-Hs Akt2 1-428 aa
988	pGBT8-Hs Akt2 1-151 aa
989	pGBT8-Hs Akt2 109-428 aa
1000	pGBT8-Hs Akt2 109-481 aa
1111	pCold-GST
1271	pGBT8-Sgk1
1272	pGBT8-RPS6KB1
1317	p3xFLAG-CMV-7.1
1378	pGBT8-Hs PKC alpha
1380	pGBT8-Hs PKC alpha 290-672 aa
1394	pcDNA3-12myc
1395	pcDNA3-Hs Sin1:12myc
1396	p3xFLAG-CMV7.1-Hs Akt2
1400	p3xFLAG-CMV7.1-Hs Akt2 109-481 aa
1406	p3xFLAG-CMV7.1-Hs S6K
1407	p3xFLAG-CMV7.1-Hs Sgk1
1408	p3xFLAG-CMV7.1-Hs PKC alpha
1410	p3xFLAG-CMV7.1-Hs PKC alpha 290-672 aa
1466	p3xFLAG-CMV7.1-Hs SGK1 62-431 aa
1468	p3xFLAG-CMV7.1-Hs RPS6KB1 1-401 aa
1470	p3xFLAG-CMV7.1-Hs RPS6KB1 31-502 aa
1471	p3xFLAG-CMV7.1-Hs RPS6KB1 31-401 aa
1519	pCold-GST-QhSin1 106-314aa
1576	pMAL-c2X*-Hs Sin1 106-314aa
1680	pMAL-c2X*-Hs Sin1 106-314aa acidic QNNGQVNTNF
1705	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc acidic2 QN
1707	p3xFLAG-CMV7.1-Hs Akt2 S474A

plasmid ID	plasmid NAME
1708	p3xFLAG-CMV7.1-Hs SGK1 S422A
2098	pcDNA3-sin1:12myc d106-314aa
2136	pSIREN-RetroQ-Rab6A'cDNAQL
2313	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc shSin1-1 resistance_dBamHI_dPH(377-522aa cut)
2542	pcDNA3-Hs Sin1_1-60aa:12myc
2647	px330-sin1 PH deletion-1
2648	px330-sin1 PH deletion-2
2655	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 11-486aa
2656	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 21-486aa
2657	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 31-486aa
2658	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 1-50aa
2659	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 1-40aa
2660	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 1-30aa
2680	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc K392, 428A
2722	pEGFP-Hs Sin1i2
2723	pEGFP-Hs Sin1i2 dPH
2724	pEGFP-Hs Sin1i2 K392, 428A
2725	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc d156-314
2726	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc d236-245
2727	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 1-314aa
2728	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 1-155aa
2729	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc 1-130aa
2730	pcDNA3-Hs Sin1i2:12myc d106-155

4. DNA を用いた実験の基本操作

4-1. 大腸菌からのプラスミド抽出

形質転換された大腸菌 (DH5 α) を、アンピシリンを含む TB 液体培地に植菌し、37°C で振盪培養した。翌日、13,500rpm で 1 分間遠心分離し、菌体を回収した。その後、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を使い、ファストプロトコールに従ってプラスミド抽出を行った。

4-2. アガロースゲル電気泳動

0.8%の TAE アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、DNA を分離した。

4-3. アガロースゲルからの DNA 抽出

電気泳動後のアガロースゲルを Midori Green 溶液に浸けて染色した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) を用い、プロトコルに従って DNA を抽出した。

4-4. 制限酵素処理

制限酵素はタカラバイオ、NEB (New England Biolabs Japan) もしくはプロメガの製品を用いた。

4-5. ライゲーション反応

目的の DNA 断片とベクターを適当な濃度で調整し、それと同量の Ligation high ver.2 (東洋紡) を混合して、16°C で 30 分間反応させた。

4-6. PCR 反応

遺伝子の全長のクローニングもしくは N 末端、C 末端欠損など部分断片変異体の作製などの遺伝子クローニングを行う際には PrimeSTAR HS (タカラバイオ) を、アミノ酸置換変異や内部欠損変異体を作製する際には PrimeSTAR Max (タカラバイオ) を用いて PCR 反応を行った。それぞれ各製品のプロトコルに従って操作を行った。

4-7. 大腸菌の形質転換

-80°C 保存してある大腸菌 DH5 α 30 μ l を氷上で溶解した後、ライゲーション反応後の溶液を 1 μ l 加え、氷上で 30 分間静置した。その後、42°C で 40 秒間ヒートショック反応を行い、アンピシリン含有の LB 寒天培地に全量を塗り広げ、37°C で一晩静置培養した。

4-8. 出芽酵母の形質転換

-80°C で冷凍保存してある出芽酵母を SD 最少寒天培地に起こし、30°C で静置培養した。生育したものを、1M Lithium acetate (pH7.5) : 10x TE (pH8.0) : 50% PEG=1:1:8 の割合で混合した溶液 50 μ l に懸濁し、1 μ l のプラスミド抽出液を加えてよく攪拌した。30°C で 2 時間~一晩静置した後、50 μ l の滅菌水を加えて再度よく攪拌し、SD 最少寒天培地に播種したものを 30°C で静置培養した。

5. 培養細胞を用いた実験の基本操作

5-1. 培養細胞の継代

培地を取り除いたディッシュに PBS (-) を加え、細胞表面を洗浄した後、PBS (-) を取り除き Trypsin {0.05% Trypsin (Gibco™), 0.02% EDTA in PBS (-)} をディッシュ全体に行き渡らせた。その後直ちに液を捨て、HEK293T は 2 分間、MCF-7 は 5 分間 37°C で静置した。細胞がはがれている事を確認し、培地で懸濁し、HEK293T は 20 倍希釈に、MCF-7 は 5 倍希釈になるように新しいディッシュに移し、37°C で静置培養した。

5-2. 細胞の凍結保存

細胞を PBS (-) で洗浄後、Trypsin を用いて細胞を剥がしたディッシュに培地を加え、全量をコーニングチューブに回収し、1,000rpm で 5 分間遠心した。その後、培地を取り除き、CultureSure® Freezing Medium 1ml で懸濁し、-80°C で保存した。

5-3. 細胞の計数と播種

細胞を PBS (-) で洗浄後、Trypsin を用いて細胞を剥がしたディッシュに培地を加え、全量をコーニングチューブに回収した。その後、回収した細胞溶液を 4 倍希釈し、血球計測盤 (Burker-Turk) を用いて計数した。計数した細胞は、HEK293T は 20×10^4 /ml、MCF-7 は 10×10^4 /ml となるように希釈し、新しいディッシュに撒いた。

5-4. トランスフェクション

PEI MAX (コスモバイオ) をプロトコルに従って使用した。

5-5. 血清除去とインスリン (過酸化水素) 刺激

培地を取り除き、PBS (-) で洗浄した後、D-MEM (FBS-) の培地をディッシュに加え、37°C で 18 時間静置培養した。18 時間の血清飢餓条件下での培養の後、最終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ となるようにインスリン {Insulin, Human Recombinant zinc solution, (Gibco™)} を加えた D-MEM (FBS-) の培地を加えた。その後、37°C で 10 分間静置した。過酸化水素刺激を行う場合は、血清飢餓の後、最終濃度 1 mM となるように過酸化水素を加えた D-MEM (FBS-) の培地を加え、37°C で静置した。

5-6. タンパク質の抽出

以下の操作は、特筆しない限り全て氷上もしくは4°Cで行った。

細胞の入ったディッシュから培地を取り除き、PBS (-)で細胞表面を洗浄した。その後、PBS (-)を完全に除去し、protease inhibitor cocktail (シグマ アルドリッチ)を1/200量に加えた1×SDS サンプルバッファーを細胞に添加し、セルスクレイパーでかき集め1.5ml チューブに回収した。回収した細胞はソニケーターで破碎し、100°Cのヒートブロックで5分間インキュベートした後、4°C、13,500rpmで10分間遠心分離し、その上清を回収した。その後、バイオ・ラッドプロテインアッセイ濃縮色素試薬 (BIO-RAD) を用いた Bradford 法によってタンパク質濃度を測定し、サンプル濃度を調整し SDS-PAGE に用いた。

6. ウェスタンブロッティング解析

以下、SDS-PAGE 及び免疫ブロットは、特筆しない限り BIO-RAD の製品を用い、プロトコルおよび試薬の組成もそれに従った。

ポリアクリルアミドゲルは、アクリルアミドの終濃度が10%、もしくは7%となるように作製した。SDS-PAGE (200V, 45分)によりタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜 (日本ポール)へとタンパク質を転写 (100V, 60分)した。転写が完了したニトロセルロース膜をスキムミルク (3% skim milk, 0.05% sodium azide in TBST)もしくはBSA (3% BSA in TBST)でブロッキング (1時間～一晚)し、一次抗体および二次抗体 (使用した抗体及び希釈条件は後述) 処理を行った。その後、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)により、目的タンパク質を検出した。

一次抗体	希釈条件	Source
抗 phospho Akt Ser473 抗体 (CST)	1/2000 in 3% BSA	Rabbit
抗 phospho Akt Thr450 抗体 (CST)	1/1000 in Can Get Signal	Rabbit
抗 phospho Akt Thr308 抗体 (CST)	1/1000 in 3% BSA	Rabbit
抗 Akt 抗体(CST)	1/2000 in 3% BSA	Rabbit
抗 phospho PKC α Ser657 抗体(millipore)	1/1000 in Can Get Signal	Rabbit
抗 phospho SGK1 Ser422 抗体 (Santa Cruz)	1/1000 in Can Get Signal	Rabbit
抗 Sin1 抗体 (Bethyl)	1/1000 in Can Get Signal	Rabbit
抗 Rictor 抗体(CST)	1/1000 in Can Get Signal	Rabbit
抗 mTOR 抗体(CST)	1/2000 in 3% skim milk	Mouse

抗 phospho mTOR Ser2481 抗体(CST)	1/1000 in Can Get Signal	Rabbit
抗 FLAG 抗体 (SIGMA)	1/4000 in 3% skim milk	Mouse
抗 myc 抗体	1/2000 in 3% skim milk	Mouse
抗 HA 抗体 (Roche)	1/2000 in 3% skim milk	Mouse
抗 actin 抗体	1/5000 in 3% skim milk	Rabbit
抗 GAPDH 抗体	1/10000 in 3% skim milk	Rabbit

二次抗体	希釈条件
抗 Rabbit IgG 抗体 (PROMEGA)	1/2000 in 3% BSA
抗 MouseIgG 抗体 (PROMEGA)	1/2000 in 3% BSA

7. 免疫沈降法 (IP)

以下の操作は、特筆しない限り全て氷上もしくは 4°Cで行った。

インスリンで刺激した細胞の入ったディッシュから培地を取り除き、PBS (-)で細胞表面を洗浄した。その後、PBS (-)を完全に取り除き、protease inhibitor cocktail (シグマ アルドリッチ)を 1/200 の濃度となるように加えた Binding Buffer {20mM HPES-KOH[pH 7.5], 150mM sodium glutamate, 10% glycerol (w/v), 0.25% Tween20}を細胞に添加し、1.5ml チューブに回収した。ソニケーターで細胞を破碎し、4°C、2,700rpm で 10 分間遠心分離し回収した上清を、バイオ・ラッドプロテインアッセイ濃縮色素試薬(バイオ・ラッド)を用いた Bradford 法によってタンパク質濃度を測定した。その後、サンプルのタンパク量を揃え、Binding Buffer により全量を 500 μ l に調整した。そこに、平衡化した EZview™ Red Anti-c-Myc Affinity Gel (SIGMA)または Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) を各サンプルにつき 10 μ l 加え、60 分間インキュベートした。60 分後上清を取り除き、1ml Binding Buffer を加えて反転混和、上清廃棄を計 4 回繰り返して抗体を洗浄した。洗浄後、40 μ l の 1 \times SDS サンプルバッファーを抗体ビーズに加え、65°Cで 15 分間加熱処理した。その後、SDS-PAGE 及び免疫ブロットを行い、タンパク質の相互作用を検出した。

8. プルダウンアッセイ

以下の操作は、特記しない限り全て氷上もしくは 4°Cで行なった。

大腸菌 (BL21) は、1 mM PMSF を添加した TBS (pH7.5) を 1ml 用いて超音波

破碎した後、終濃度 1%になるよう TritonX-100 を加えて反転混和し、13,500rpm 15 分間遠心分離した。総容量 30 μ l のグルタチオンビーズ (GE) またはアミロースレジン (NEB) を 1% Triton 添加 TBS (pH7.5) で平衡化し、遠心分離後の上清を加えて 2 時間回転混和した。

培養細胞は、プルダウンバッファー (20mM HEPES-KOH[pH7.5], 150mM sodium glutamate, 10% glycerol, 0.25% Tween20) に 1mM PMSF と protease inhibitor cocktail (シグマ アルドリッチ) を添加し、1.5ml チューブに回収した。ソニケーターで細胞を破碎し、4°C、2,700rpm で 10 分間遠心分離し、回収した上清をバイオ・ラッドプロテインアッセイ濃縮色素試薬(バイオ・ラッド)を用いた Bradford 法によってタンパク質濃度を測定した。その後、サンプル間のタンパク質量を揃え、上記の大腸菌から精製した組み替えタンパク質を結合したグルタチオンビーズもしくはアミロースレジンと合わせ、さらに 60 分間回転混和した。

60 分後上清を取り除き、1ml プルダウンバッファーを加えて反転混和、上清廃棄を計 4 回繰り返して抗体を洗浄した。洗浄後、40 μ l の 1×SDS サンプルバッファーを抗体ビーズに加え、65°C で 15 分間加熱処理した。その後 SDS-PAGE 及び免疫ブロットを行い、タンパク質の相互作用を検出した。

9. 酵母ツーハイブリッドアッセイ

出芽酵母 HF7c 株 (クロンテック) に Baird プラスミドおよび Prey プラスミドを形質転換した。形質転換体はロイシンおよびトリプトファンを含まない SD 培地プレートで選択した。形質転換体をロイシン、トリプトファンおよびヒスチジンを含まない SD 培地プレートに最終濃度 3 mM または 8 mM 3-AT (ヒスチジシン合成酵素阻害剤) を添加しプレート上での生育を観察した。目的のタンパク質間で相互作用が起こるとその強度に応じて HIS3 遺伝子が発現し、ヒスチジシン非存在下もしくは 3-AT 存在下でも生育可能となる。

10. CX-MS 解析

以下の操作は、特記しない限り全て氷上もしくは 4°C で行なった。

まず 8 の方法でプルダウンアッセイを行った。2 回目の回転混和、洗浄を行った後、100 μ l のプルダウンバッファーと化学架橋剤 BS³ (Thermo Fisher Scientific) を目的の濃度になるように加え、氷上で 2 時間静置した。2 時間後、1 ml TBS で 2 回洗浄することで反応を停止させた。その後、40 μ l の 1×SDS サンプルバッファーをビーズに加え、65°C で 15 分間加熱処理した。その後 SDS-PAGE 及び免疫ブロットを行い溶出した。このサンプルを SDS-PAGE で分離し、CBB 染色、免疫ブロットによ

ってタンパク質を検出し、架橋反応の確認を行った。架橋が確認できたサンプルをプレキャストゲル（バイオラッド）を用いて分離し CBB 染色したものを植物科学研究教育推進ユニットタンパク質質量解析グループの支援により質量分析を行った。質量分析で得られた結果を、xQUEST を用いて解析を行い、分子間で架橋されたアミノ酸残基を同定した。

11. Sin1 の局在解析

細胞を播種し、翌日 GFP タグを付加した各種 Sin1 を発現するプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションの翌日に血清飢餓操作を行い、18 時間血清飢餓条件下で培養した。18 時間の血清飢餓の後、インスリン刺激を 10 分間行い蛍光顕微鏡（DELTA VISION LITE imaging Systems / CORNES Technologies）にて観察した。

12. CRISPR/Cas9 法を用いた Sin1 Δ PH 細胞の作製

HEK293T 細胞を計数後、6well ディッシュに播種した。約 24 時間後に、Cas9 と標的配列に対する sgRNA を発現する px330 プラスミドと Puromycin 耐性遺伝子断片をコトランスフェクションした。翌日、再び細胞を計数し、 0.5×10^4 /ml となるように希釈して、10cm ディッシュに再び播種し直した。細胞がディッシュに張り付いている事を確認し、Puromycin Dihydrochloride を $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた培地に交換した。同様の操作を三日おきに行い、薬剤耐性を持つコロニーを形成させた。形成したコロニーを Trypsin で懸濁後、新しいディッシュに移して培養し、再度薬剤処理を行った。各候補細胞株を 6 cm ディッシュでサブコンフルエントになるまで培養した後、Trypsin 処理により細胞を回収し、半分量を凍結保存、残り半分を DNA 抽出に用いた。

13. 培養細胞からの DNA 抽出

12 で回収した細胞のペレットに Lysis Buffer (TE /1% SDS : 0.1M Tris-HCl [pH 8.0], 0.01M EDTA, 1% SDS) $400 \mu\text{l}$ と Proteinase K Solution $5 \mu\text{l}$ を加え、ボルテックスミキサーにてよく混合し、 65°C に一晩置いた。 $13,500\text{rpm}$ で 10 分間遠心後、上清を $400 \mu\text{l}$ 回収した。回収した上清に Phenol/chloroform/isoamyl alcohol $200 \mu\text{l}$ を加え、ボルテックスミキサーにてよく混合し、 $13,500\text{rpm}$ で 10 分間遠心した。遠心後の上清に、再び Phenol/chloroform/isoamyl alcohol を $200 \mu\text{l}$ 加え、ボルテックスミキサーにてよく混合し、 $13,500\text{rpm}$ で 10 分間遠心した。同一の操作を複数回行った後、Lysis Buffer を $500 \mu\text{l}$ 加え、Phenol/chloroform/isoamyl alcohol $200 \mu\text{l}$

とボルテックスミキサーにてよく混合し、13,500rpm で 10 分間遠心した。遠心後の上清 600 μ l に、60 μ l の 3M sodium acetate、500 μ l の 100% 2-propanol を加え、ボルテックスミキサーにてよく混合し、13,500rpm で 1 分間遠心した。その後、沈殿を吸わないように液を捨て、70% エタノールを 500 μ l 加え、13,500rpm で 1 秒間遠心した。エタノールを完全に除去し、沈殿を乾燥させた後、1 \times TE を 100 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C で保存した。

14. シークエンス解析

以下の操作は、ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)を用いて行った。

培養細胞から抽出した DNA を template に、以下に示す oligo DNA を primer に用いて PCR 反応を行い、標的配列を含む領域約 600bp を増幅し PCR 産物精製 kit (日本ジェネティクス)を用いて精製した。その後、精製した PCR 産物 1 μ l (100 ng DNA) に dH₂O 12.9 μ l、2 μ M Primer (最初の PCR 反応と同じもの)を 1.6 μ l、5 \times Sequencing Buffer 3.5 μ l、BigDye[®] Terminator v3.1 1 μ l を加え、PCR 反応を行った {プログラム : 96 $^{\circ}$ C 3min \rightarrow (96 $^{\circ}$ C 10sec \rightarrow 50 $^{\circ}$ C 5sec \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 4min) \times 35cycle \rightarrow 4 $^{\circ}$ C}。PCR 産物に 125mM EDTA を 5 μ l と 100%エタノールを 60 μ l 加え、室温で数分置いた後、4 $^{\circ}$ C、15,000rpm で 25 分間遠心した。沈殿を吸わないように液を捨て、70% エタノールを 250 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C、15,000rpm で 5 分間遠心した。エタノールを完全に除去し、沈殿を乾燥させた後、20 μ l の Hi-Di[™] Formamide を加え、95 $^{\circ}$ C で 2 分間ヒートショックをした。2 分後、氷上で数分静置し、96well プレートに全量を移して、シークエンス解析を行った。

Oligo ID	Oligo name	sequence (5' \rightarrow 3')
6300	Hind3_Sin1dPH_seq_F	GGGAAGCTTCTGAGCTTCCTGCCAAGAGC
6301	NotI_Sin1dPH_seq_R	CCCGCGCCGCAAGTTAGTTCTATTTCTAATCTTCTGC

【結果】

1. Sin1 は mTORC2 基質と相互作用する

mTORC2 サブユニットである Sin1 の中央部には、Conserved Region in the Middle (CRIM) と呼ばれる生物種間で保存性の高い領域が存在する。当研究室の先行研究により、分裂酵母において Sin1 の CRIM が TORC2 基質である Gad8 (Akt/SGK1 ホモログ) と相互作用することを見出している。このことから、Sin1 が mTORC2 の基質認識サブユニットとして働くという仮説を立てた。そこでまず、哺乳類においても Sin1 が CRIM を介して基質と相互作用するか検証するところから研究に着手した。mTORC2 基質である Akt、SGK1 及び PKC α を Bait とし、Sin1 CRIM を Prey とし酵母ツーハイブリット法により相互作用解析を行ったところ、Sin1 CRIM と Akt、SGK1 間で相互作用が見られた (表 1)。全長 PKC α と Sin1 CRIM の間に相互作用は見られなかったが、PKC α の N 末端に存在する脂質結合ドメインを欠失させた変異体との間には相互作用が見られた。一方で、mTORC2 基質と同じく AGC キナーゼファミリーに属し、mTORC1 基質として知られる S6K1 との間には相互作用は見られなかった。

AGC kinase	Y2H with : Sin1 CRIM
Akt	++
SGK1	+
PKC α	-
PKC α ki	++
S6K1	-

表 1. Sin1 CRIM は mTORC2 基質と特異的に相互作用を示す

出芽酵母 HF7c 株に Bait プラスミド pGBT8 (AGC キナーゼ) および Prey プラスミド pGADGH (Sin1 CRIM) を形質転換した。形質転換体の 3-AT を添加した SD 最小培地プレート上での生育により相互作用の判定を行った。2 mM 3-AT 添加培地で生育したものを + で、8 mM 3-AT 添加培地で生育したものを ++ で示した。PKC α ki : PKC α キナーゼドメイン。

さらに、Sin1 CRIM と mTORC2 基質の相互作用を生化学的に解析するために、大

腸菌で発現させた組み替え Sin1 CRIM を用いたプルダウンアッセイを行った。その結果、酵母ツーハイブリット法での結果と一致して、全ての mTORC2 基質と Sin1 CRIM の間に相互作用が確認された (図 6)。

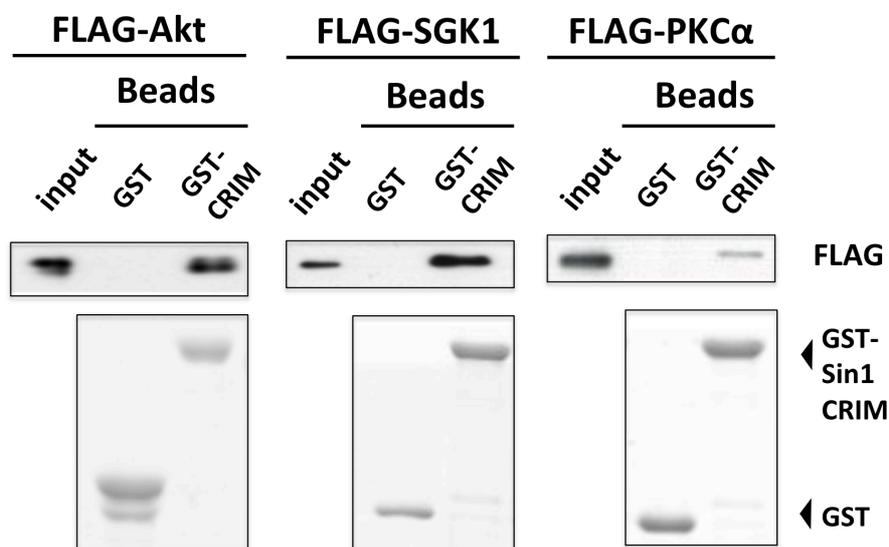
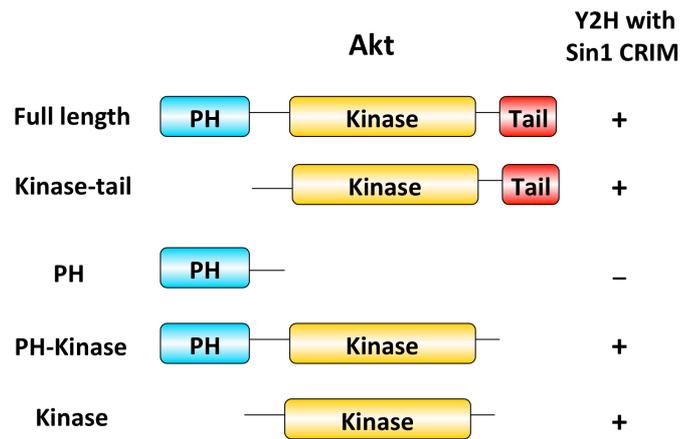


図 6. Sin1 CRIM は mTORC2 基質と物理的相互作用を示す

FLAG タグを N 末端に付加した mTORC2 基質を HEK293T 細胞で発現させた。その培養細胞破砕液と大腸菌破砕液からグルタチオンビーズで精製した GST 融合 Sin1 CRIM を用いてプルダウンアッセイを行った。mTORC2 基質は抗 FLAG 抗体を用いた免疫ブロットで、GST および GST-Sin1 CRIM を CBB 染色によって検出した。

mTORC2 基質 Akt、SGK1、PKC α は全て AGC キナーゼファミリーに属し、そのキナーゼドメインは類似性が高い。酵母ツーハイブリット法による解析において、PKC α のキナーゼドメインと Sin1 CRIM の相互作用が確認されたことから、他の mTORC2 基質との相互作用もキナーゼドメインを介していることが考えられる。そこで Akt の部分断片を発現する Bait プラスミド、および哺乳類細胞発現プラスミドを作製し、酵母ツーハイブリット法およびプルダウンアッセイによる Sin1 CRIM との相互作用解析を行った。その結果、Sin1 CRIM は Akt のキナーゼドメインと相互作用を示すことが酵母ツーハイブリット法で明らかとなった (図 7A)。またプルダウンアッセイにおいても同様に Akt、PKC α それぞれのキナーゼドメインと Sin1 CRIM が物理的に相互作用することが示された (図 7B)。

A.



B.

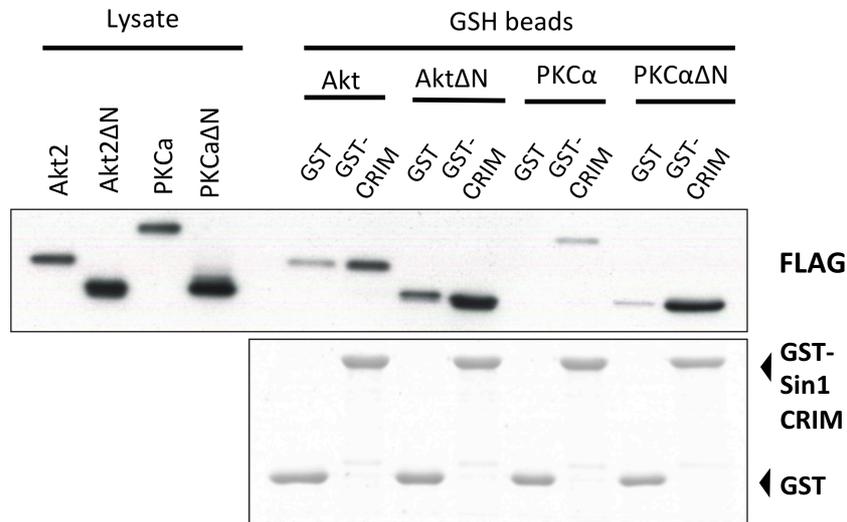


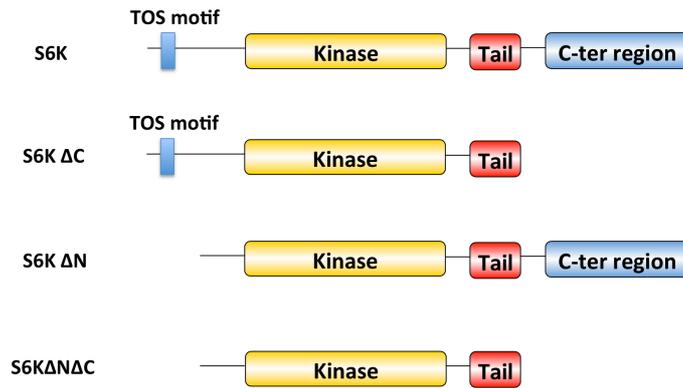
図7. Sin1 CRIM は mTORC2 基質のキナーゼドメインと相互作用する

- (A) Akt の部分断片を Bait、Sin1 CRIM を Prey とした酵母ツーハイブリット法を行った。Akt を N 末端から PH ドメイン、キナーゼドメイン、Tail 領域に分けそれぞれを欠いた部分断片を作製した。3-AT 添加培地で生育したものを相互作用有として判定し+で示した。
- (B) Akt および PKC α の全長または N 末端欠損変異体を発現する HEK293T 細胞破碎液と GST 融合 Sin1 CRIM を用いてプルダウンアッセイを行った。Akt2 Δ N は Akt の PH ドメインを、PKC α Δ N は C1、C2 ドメインをそれぞれ欠損している。Akt および PKC は抗 FLAG 抗体を用いた免疫ブロットで、GST および GST-Sin1 CRIM を CBB 染色によって検出した。

Sin1 CRIM が mTORC2 基質である AGC キナーゼのキナーゼドメインに結合することが明らかとなったが、Sin1 は全ての AGC キナーゼに結合するのだろうか。mTORC1 基質である S6K は mTORC2 基質と同じく AGC キナーゼファミリーに属

し、そのキナーゼドメインは Akt や SGK1 と高い類似性を示す。S6K の構造的な特徴として他の AGC キナーゼと比較して長く伸びた C 末端領域があげられる (図 8A)。この C 末端領域を欠いた S6K 変異体は mTORC2 によってリン酸化されることが報告されている (Ali and Sabatini, 2005)。このことから S6K の C 末端領域を欠損させれば Sin1 と S6K キナーゼドメインは相互作用を示すのではないかと考え、S6K の部分断片変異体を作製し、Sin1 との相互作用解析を行った (図 8B)。しかしながら予想に反し、どの S6K 変異体も Sin1 との相互作用を示さなかった。これらの結果から、Sin1 と mTORC2 基質間の相互作用は特異性が非常に高く、これにより mTORC2 の基質特異性を決定していることが示唆された。

A.



B.

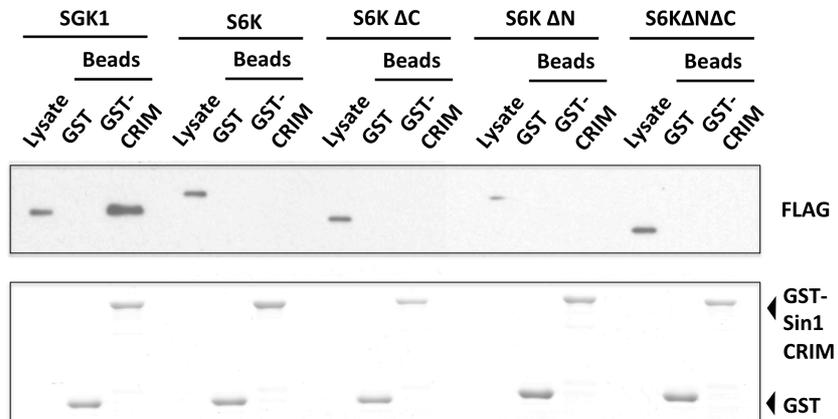


図 8. Sin1 は mTORC2 基質と特異的に結合する

- (A) S6K のドメイン構造の模式図と (B) で使用した変異体を示す。N 末端には mTORC1 による基質認識に必要な TOS motif が存在する。続いてキナーゼドメイン、tail 領域、C 末端領域が存在する。
- (B) SGK1 と S6K の部分断片変異体を発現させた培養細胞破碎液と GST 融合 Sin1 CRIM を用いてプルダウンアッセイを行った。SGK1 および S6K は抗 FLAG 抗体を用いた免疫ブロットで、GST および GST-Sin1 CRIM を CBB 染色で検出した。

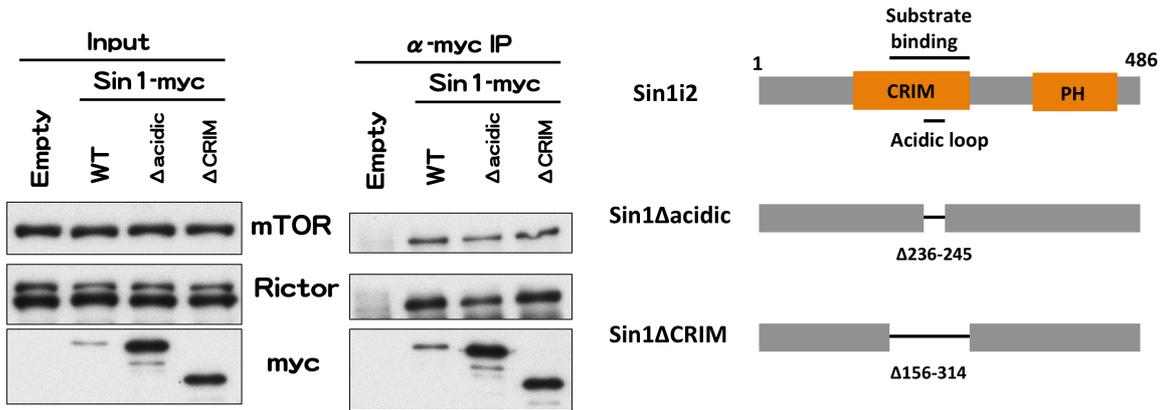
2. Sin1 CRIM ドメインの酸性ループは基質結合において重要な役割を担う

Sin1 CRIM は元々生物種間で保存性の高い領域の呼称であり、その機能や構造は不明であったが、我々は共同研究によって分裂酵母 Sin1 CRIM の立体構造情報を得ることに成功した (Kataoka et al., 2015; Furuita et al., 2015; 図 9A)。これにより、Sin1 の CRIM は 3 つの α ヘリックスと 4 つの β ストランドから構成されており、ubiquitin superfold family (Kiel and Serrano, 2006) に属する構造を取ることが明らかとなった。CRIM はループに富んだ構造を有しているが、その中の 1 つに酸性アミノ酸が集中したループ (酸性ループ) が存在する (図 9A, B)。この酸性ループ中の酸性アミノ酸は生物種間で特に保存性が高いことから、進化的に重要な機能を有していると考え解析を行った。酸性ループの負の電荷が失われるようなアミノ酸置換変異を導入し、mTORC2 基質との相互作用解析を行ったところ、Akt および SGK1 との相互作用に減弱が見られた (図 10A, B) ことから、酸性ループの負の電荷が基質結合に重要であることが示された。一方で PKC α との相互作用には大きな変化は見られなかった。増殖因子に応答してリン酸化される Akt、SGK1 とは異なり、PKC α は細胞内において恒常的にリン酸化されている。このことから細胞破碎液中の PKC α はほとんどがリン酸化状態であると考えられ、プルダウンアッセイにおいて酸性ループの変異による相互作用への影響が見られない原因であると推察される。

果、野生型 Sin1 を発現した場合は Akt Ser-473 のリン酸化が回復したのに対し、CRIM または酸性ループを欠く変異体 Sin1 を発現した細胞ではリン酸化の回復が見られなかった。また、酸性ループのアミノ酸置換変異体を発現した細胞においては Akt のリン酸化は検出されるものの、野生型を発現した場合と比較してそのリン酸化レベルは低かった。Akt は Thr-450 (Turn motif)、Ser-473 (Hydrophobic motif) の二箇所が mTORC2 によってリン酸化されるが、Ser-473 のリン酸化がインスリンや増殖因子に応答するのに対して、Thr-450 のリン酸化は Akt がリボソームによる翻訳されると同時に行われ外部刺激によって変動しないことが知られている (Oh et al., 2010)。興味深いことに、Sin1 Δ CRIM、Sin1 Δ acidic、Sin1polyNQ を発現する細胞においては Ser-473 のリン酸化だけでなく、Thr-450 のリン酸化の回復も見られない、もしくは低かった。これらの結果は、Sin1 が CRIM を介して基質を認識することで mTORC2 が適切な標的タンパク質をリン酸化することを可能にしていることを示していると同時に、翻訳途中に起こる Akt Thr-450 のリン酸化、増殖刺激に応答した Akt Ser-473 のリン酸化という、異なる状況下においても mTORC2 は Sin1 CRIM によって基質を認識している可能性を示唆している。

また他の mTORC2 基質のリン酸化にも CRIM および酸性ループが関与しているか Akt と同様に検証を行った。その結果、CRIM および酸性ループの変異体を発現する細胞では PKC α および SGK1 両方のリン酸化の回復が見られなかった (図 11C、D)。mTORC2 による PKC α のリン酸化は、PKC α の安定性に関与することが知られており (Ikenoue et al., 2008)、変異体 Sin1 を発現する細胞において PKC α の発現量が低いことと一致している。これらの結果から、Sin1 CRIM による基質結合は mTORC2 基質に共通した基質認識メカニズムであることが示された。

A.



B.

C.

D.

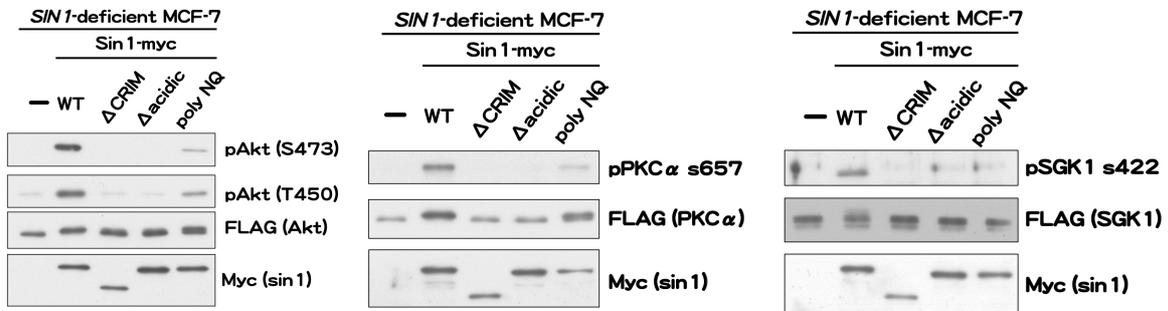


図 11. Sin1 CRIM および酸性ループは mTORC2 による基質リン酸化に重要な役割を持つ

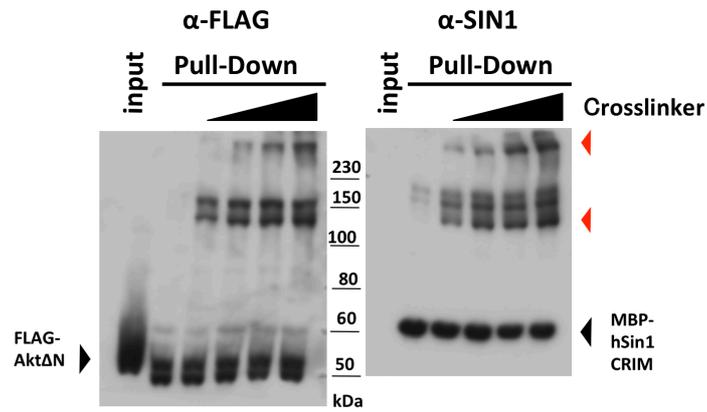
(A) Sin1 欠損 MCF-7 細胞に myc タグを付加した野生型、酸性ループ欠損 (Δ acidic)、CRIM 欠損 (Δ CRIM) 変異体 Sin1 を発現させ抗 myc 抗体で免疫沈降を行った。各タンパク質は抗 mTOR 抗体、抗 Rictor 抗体、抗 myc 抗体を用いた免疫ブロットで検出した。用いた Sin1 変異体の模式図を図右に示す。

(B~D) Sin1 欠損 MCF-7 細胞に FLAG-Akt (B)、FLAG-PKC α (C)、FLAG-SGK1 (D) と野生型、CRIM 欠損 (Δ CRIM)、酸性ループ欠損 (Δ acidic) および酸性ループアミノ酸置換変異 (poly NQ) Sin1-myc を共発現させた。各 mTORC2 基質は抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降により精製し、各抗リン酸化抗体を用いた免疫ブロットによってリン酸化を検出した。

3. CX-MS 法を用いた Sin1-Akt 相互作用インターフェースの同定

Sin1 CRIM に関しては、酸性ループが mTORC2 基質との結合に関与していることを示す結果が得られたものの、その結合様式の全体像や基質側の結合部位に関する情報は得られていない。そこで Chemical Cross-linking combined with Mass Spectrometry (CXMS) 法を用いて相互作用部位の同定を試みた。大腸菌で発現させた組換え Sin1 CRIM を用いて Akt をプルダウンした後、架橋剤を添加しクロスリンクを行った。その結果、Akt および Sin1 を免疫ブロットで検出した際、それぞれに共通するアップシフトしたバンドが検出され 2 つのタンパク質が架橋していることが確認された (図 12A)。このアップシフトしたバンドを切り出し、トリプシン処理を行い、質量分析装置によって解析を行った。その結果、Sin1 と Akt 間で架橋されたペプチドが検出された。これにより同定した架橋されたアミノ酸残基は、Akt の N ロープ側の活性部位とは逆の面に多く見られた (図 12B)。Sin1 に関しては CRIM ドメインの N 端側および C 端側に架橋されたアミノ酸残基が同定された。これらの結果は、Sin1 が Akt のキナーゼドメインに結合するという結果を支持しているのに加え、キナーゼドメインの N 末端ローブ側に相互作用インターフェースが存在していることを示唆している。

A.



B.

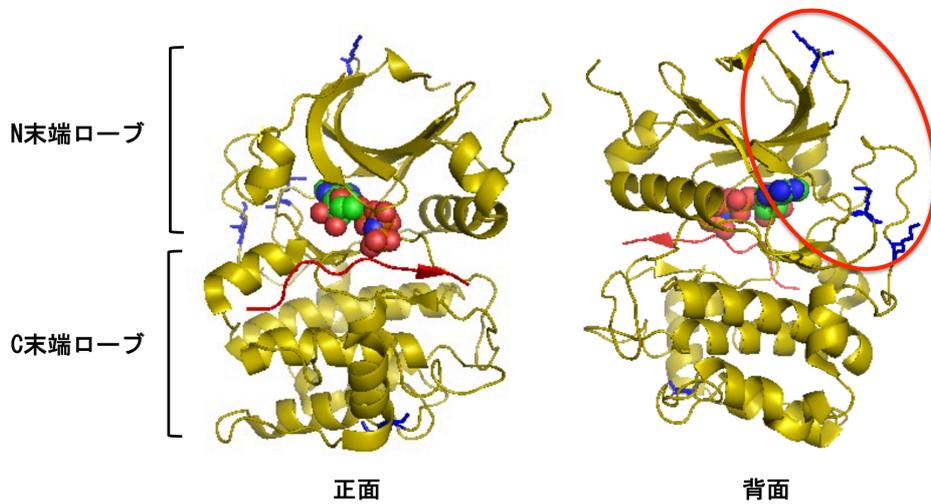


図 12. Sin1 は Akt キナーゼドメインの N 末端ローブと結合する

- (A) 架橋剤による Sin1 と Akt のクロスリンク。組み替え Sin1 CRIM で Akt をプルダウンした後、架橋剤 BS3 によってクロスリンクを行った。架橋剤の濃度は右から 1、0.5、0.25、0.1 mM で反応を行った。架橋反応を行ったサンプル中の Sin1 および Akt をそれぞれ抗 Sin1 抗体、抗 FLAG 抗体を用いた免疫ブロットによって検出した。架橋されたタンパク質を赤矢印で示している。
- (B) Akt キナーゼドメインの立体構造 (PDB ID : 1O6K)。CX-MS によって同定された Sin1 と架橋されたアミノ酸残基を青いスティックモデルで示し、相互作用インターフェースと予想される領域を赤丸で示している。基質ペプチドが結合している活性部位側を正面とした。赤い矢印で表示された分子は基質ペプチドを、空間充填モデルで表示された分子は AMP-PNP を表している。

4. Sin1 における mTORC2 結合領域の同定

Sin1 が mTORC2 における基質認識サブユニットとして働くことが明らかとなったが、Sin1 の mTORC2 機能における役割は基質との結合だけなのだろうか。分裂酵母においては、Sin1 欠損株に CRIM を融合した Ste20 (Rictor ホモログ) を発現させると TORC2 基質のリン酸化が回復する (村山, 2012)。しかし、哺乳類細胞においては Sin1 欠損細胞に CRIM を融合した Rictor を発現しても mTORC2 基質のリン酸化は回復しない (古谷, 2016)。これは、哺乳類細胞においては mTOR-Rictor の結合に Sin1 が必要であり (Frias et al., 2006)、CRIM 融合 Rictor が mTOR と結合していないことが原因であると考えられる。そこで Sin1 が基質認識サブユニットとして機能する最小領域を明らかにするために、まず Sin1 が mTORC2 に組み込まれるために必要な領域の同定を試みた。Sin1 欠損細胞に myc タグを付加した Sin1 の部分断片を発現させ、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降によって mTOR、Rictor との相互作用解析を行った。その結果、Sin1 の N 末端 130 アミノ酸で mTOR、Rictor の両方を共沈してこることができた (図 13)。一方、さらに短い N 末端 60 アミノ酸では mTOR の共沈は見られなかったものの、Rictor は共沈してきたことから、この領域に Rictor 結合部位が存在すると考えられる。これらの結果より、Sin1 が mTORC2 に組み込まれるために必要な領域は CRIM よりも N 末端側に存在していることが示唆された。

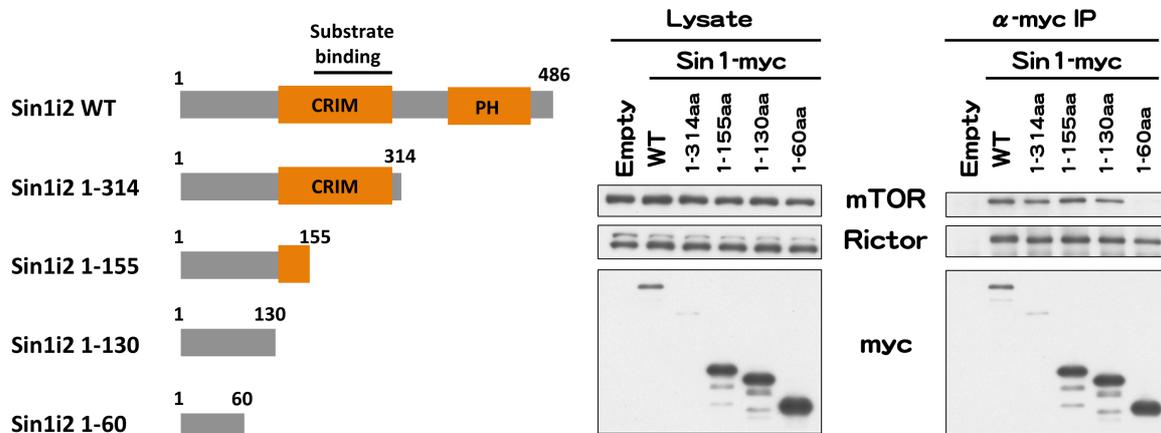


図 13. Sin1 の CRIM より N 末端に mTORC2 結合領域が存在する

実験に用いた Sin1 (isoform2) の部分断片変異体の模式図を示す。Sin1 欠損 MCF-7 細胞に myc タグを付加した野生型および部分断片変異体 Sin1 を発現させ、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降を行った。細胞破碎液中および沈降物中における mTOR、Rictor および Sin1-myc を抗 mTOR 抗体、抗 Rictor 抗体、抗 myc 抗体を用いた免疫ブロットによって検出した。

本研究で Sin1 CRIM として実験に使用している部分断片は Sin1 のアミノ酸残基 106-314 である。しかしながら、この領域全てを欠損する Sin1 (Sin1 Δ 106-314)

は mTOR との結合を示さない (古谷, 2016)。Sin1 CRIM のうち基質との結合に必要なのは C 末端側 159 残基(156-314)であることに加え、図 13 の結果で Sin1 の N 末端側 155 アミノ酸で mTOR が共沈してくることから CRIM の N 末端側 50 残基は mTOR との結合に重要な役割を持っていると考えられる。そこで CRIM のうち N 末端領域 50 残基(106-155)を N-CRIM、基質結合に必要な C 末端 159 残基(156-314)を C-CRIM とし、それぞれの部分欠損変異体を作製し mTORC2 構成因子と相互作用解析を行った (図 14)。その結果、予想した通り Sin1 Δ C-CRIM は mTOR、Rictor と相互作用を示した。Sin1 Δ C-CRIM は正常に mTORC2 を形成していると考えられるが、基質結合領域を欠くため Sin1 欠損細胞における Akt のリン酸化の回復は見られない。一方、Sin1 Δ N-CRIM は Rictor とは相互作用が見られるものの、mTOR との相互作用は見られなかった。これらの結果は、Sin1 N-CRIM は Sin1 と mTOR との結合に重要な役割を果たしていることを示唆している。

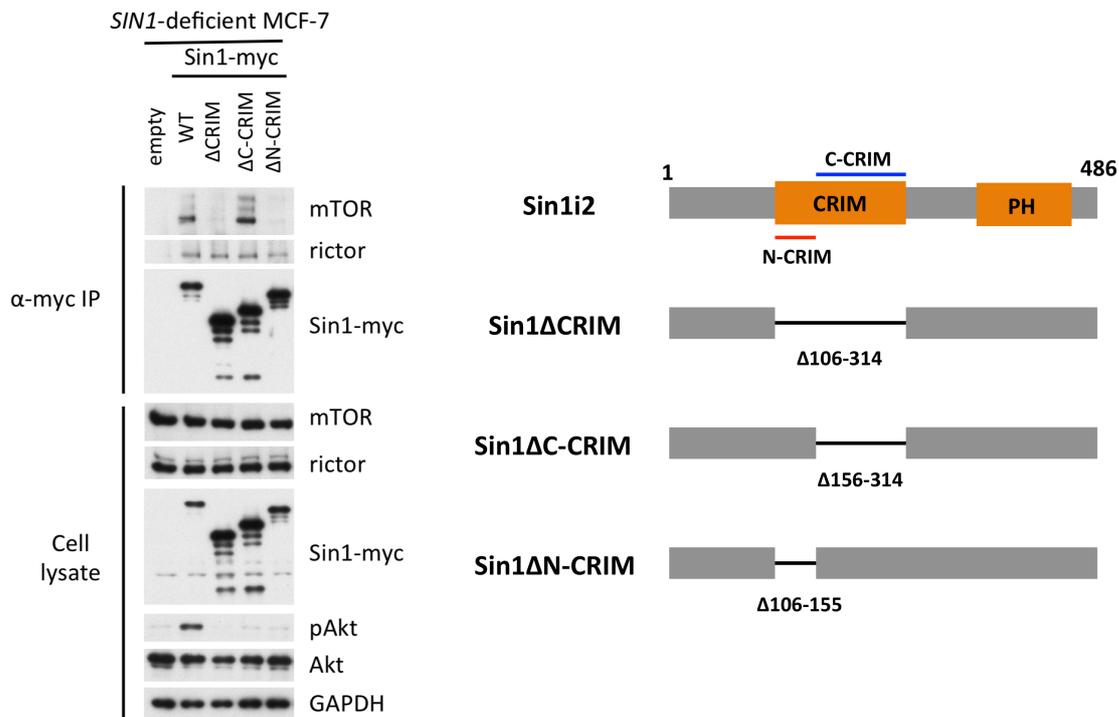


図 14. Sin1 N-CRIM は mTOR との結合に重要な役割を果たす

myc タグを付加した野生型 Sin1、 Δ CRIM、 Δ C-CRIM、 Δ N-CRIM を発現させた Sin1 欠損 MCF-7 細胞破砕液と抗 myc 抗体を用いた免疫沈降を行った。沈降物中、細胞破砕液中における mTOR、Rictor、Sin1-myc をそれぞれ抗 mTOR 抗体、抗 Rictor 抗体、抗 myc 抗体を用いた免疫ブロットで検出した。また細胞破砕液中における Akt のリン酸化を抗リン酸化 Akt (Ser473)抗体、抗 Akt 抗体、抗 GAPDH 抗体 (ローディングコントロール) を用いた免疫ブロットによって評価した。

図 13 で示したように、Sin1 における Rictor 結合領域は N 末端 60 アミノ酸に存

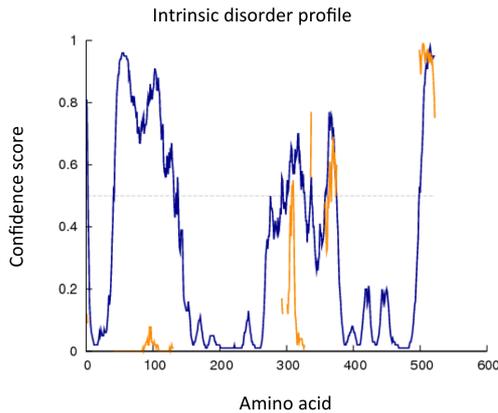
在する。この領域はハエからヒトまで高度に保存されていることから、進化的に重要な機能を有していることが予想される (図 15A)。そこで Sin1 の二次構造予測および disorder 領域予測を行ったところ、Sin1 の N 末端 30 アミノ酸は立体構造、特に α ヘリックスをとると予測された (図 15B, C)。そこで 60 アミノ酸よりさらに短い Sin1 部分断片変異体を用いて、より詳細な Rictor 結合部位の同定を試みた。その結果、Sin1 の部分断片 1-40 で Rictor との共沈が見られた (図 16)。一方で、N 末端側については 10 アミノ酸を欠いただけで、Sin1 は Rictor との結合能を失った。これらの結果から、 α ヘリックスをとると予測される Sin1 の N 末端 40 アミノ酸が Rictor との結合に重要であることが明らかとなった。

(A)

```

1                                                                 60
H. sapiens  MAFLDNPTIILAHIRQSHVTSDDTGMCEMVLIDHDVDLEKIHPPSMPGDSGSEIQG----
M. muscus   MAFLDNPTIILAHIRQSHVTSDDTGMCEMVLIDHDVDLEKTHPPSVPGDSGSEVQG----
X. laevis   MAFLDNPLIILAHIRQSHVTSDDTGMCEMVLIDHDIDLEKLYQSSVPGENSTQMQS----
D. melanogaster MATYSNQHLLSHIRNSFISTDDTGMCETVMLSDDMPKHYLRKFGNSGAGGDHYHWRRAH
**  .*    :*:***:*.:::***** *:...*: . . . * . . . :
```

(B)



(C)

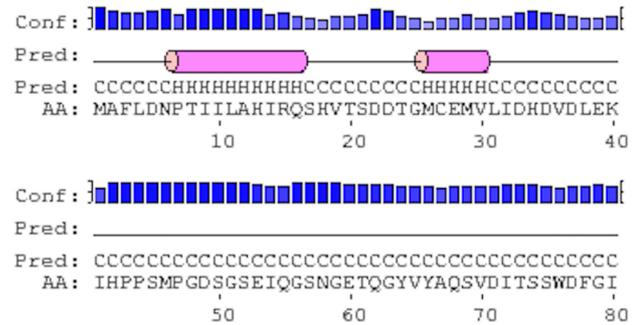


図 15. Sin1 の N 末端は Rictor と結合する

- (A) ClustalW を用いてヒト Sin1 (*H. sapiens*: NP_001006618.1)、マウス Sin1 (*M. muscus*: NP_001277554.1)、アフリカツメガエル Sin1 (*X. laevis*: NP_001080466.1)、キイロショウジョウバエ Sin1 (*D. melanogaster*: NP_610963.1) のアミノ酸配列のアラインメントを作成した。図には N 末端 60 アミノ酸のアラインメントを示す。
- (B) Disopred で disorder 領域予測を行った。青い線は disordered state (構造をとっていない) を示しており、score が低い部分は構造をとっていると予測される。橙の線は disordered 領域におけるタンパク質結合に関与すると予測される領域を示している。
- (C) PSIPRED を用いてヒト Sin1 の二次構造予測を行った。図には N 末端 80 アミノ酸の結果を示す。ピンクの円柱で示された領域は α ヘリックス構造をとると予想される。

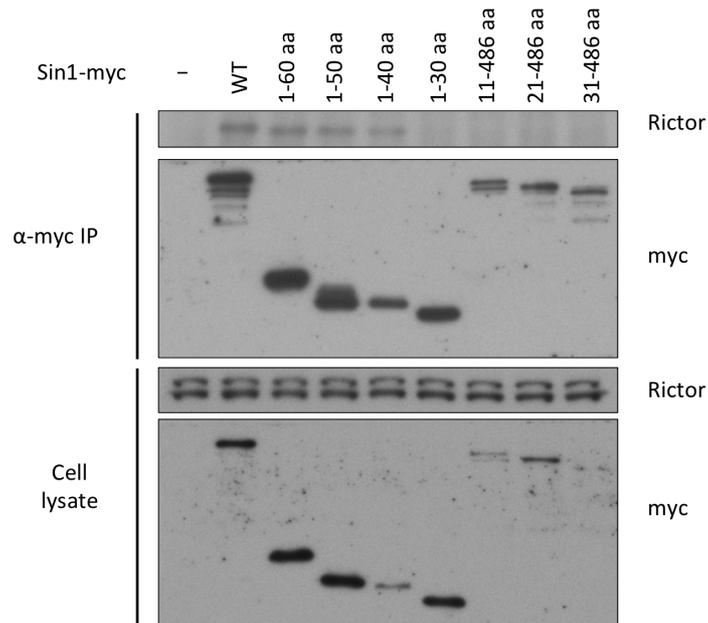


図 16. Sin1 の N 末端 40 アミノ酸に Rictor 結合領域が存在する

Sin1 欠損 MCF-7 細胞に myc タグを付加した野生型および部分断片変異体 Sin1 を発現させ、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降を行った。細胞破碎液中および沈降物中における Rictor および Sin1-myc を抗 Rictor 抗体、抗 myc 抗体を用いた免疫ブロットによって検出した。

5. Sin1 の C 末端領域は mTORC2 活性化に必要である

ここまでの研究により、Sin1 の N 末端領域が Rictor と、それに続く N-CRIM が mTOR と結合することで Sin1 が mTORC2 に組み込まれること、C-CRIM が mTORC2 基質結合ドメインとして働くことが明らかとなった (図 17)。

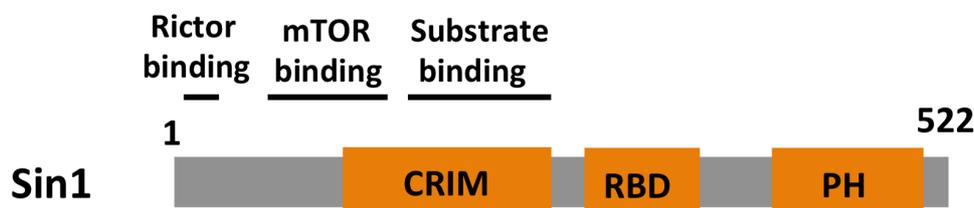


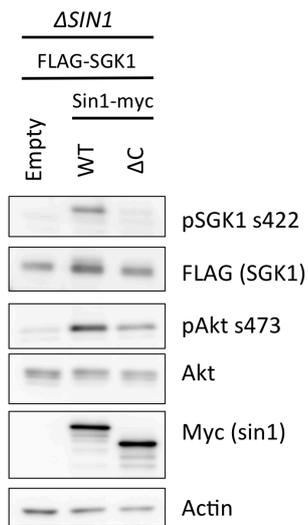
図 17. Sin1 は N 末端領域を介して mTORC2 と結合する

ここまでに明らかになった Sin1 の各領域の機能を Sin1 のドメイン構造の模式図上に示す。

このことから、Sin1 の N 末端から CRIM までを含む領域が、Sin1 が基質認識サブユニットとして機能するための最小領域であると考えられる。そこで次に、Sin1 欠損細胞に野生型および N 末端から CRIM までを含みそれ以降の C 末端領域を欠損した Sin1 変異体 (Sin1 Δ C) を発現させ、mTORC2 基質のリン酸化を解析した (図 18A, B)。その結果、Sin1 Δ C の発現により Akt のリン酸化の回復は見られるものの、そのリン酸化レベルは野生型 Sin1 を発現したものに比べ低かった。また SGK1 のリン酸化に関してはほとんどリン酸化の回復が見られなかった。さらに C 末端を欠損する Sin1 を Sin1 欠損細胞に発現させインスリン刺激 (19A, B) および過酸化水素刺激 (図 19C, D) した際の Akt のリン酸化の経時変化を観察した。その結果、どちらの刺激においても PDK1 によってリン酸化される Akt Thr-308 (T-loop : TL) のリン酸化には変化が見られないのに対し、mTORC2 によるリン酸化部位 Akt Ser-473

(Hydrophobic motif : HM) のリン酸化レベルは野生型を発現した場合と比較して低かった。これらの結果から、Sin1 CRIM までを含む mTORC2 はタンパク質リン酸化複合体としては機能しているものの、その活性は全長 Sin1 を含むものに比べ低いことが明らかとなった。このことから Sin1 の C 末端領域には mTORC2 の活性化レベルに関与する領域が存在することが示唆された。

(A)



(B)

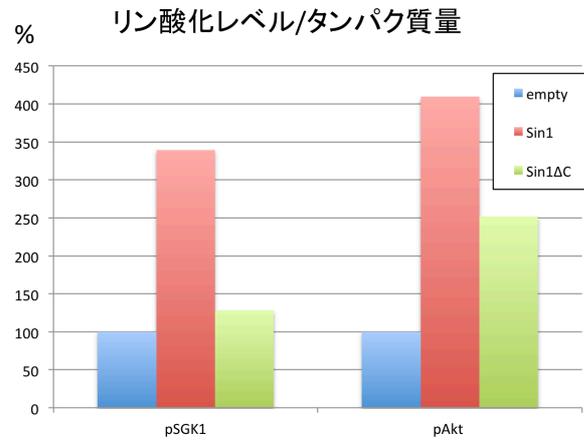
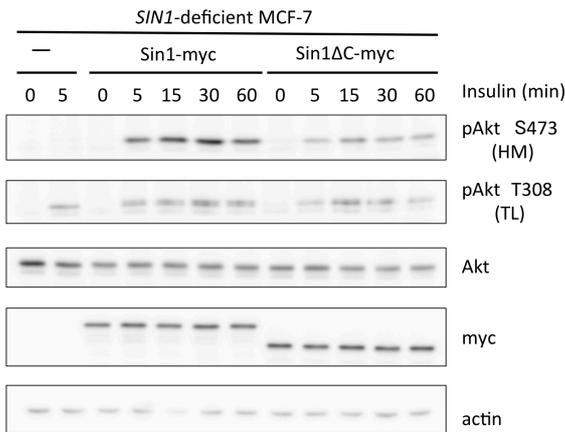


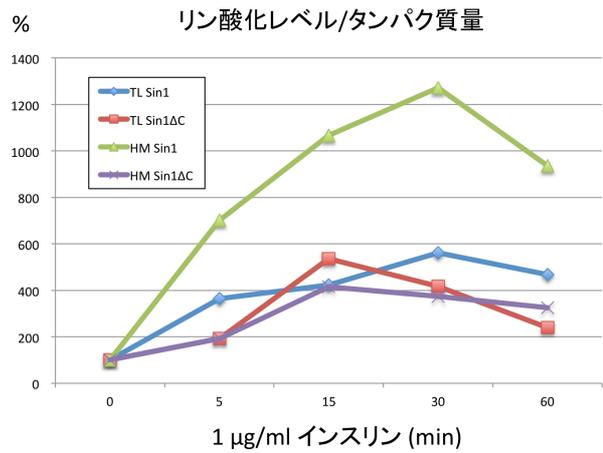
図 18. Sin1 の C 末端領域は mTORC2 活性に関与する

- (A) Sin1 欠損 MCF-7 細胞に野生型 Sin1-myc および C 末端領域欠損 Sin1-myc を発現させ Akt、SGK1 のリン酸化レベルを免疫ブロットによって解析した。SGK1 は FLAG タグを付加したものを共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降によって精製したものをを用いてリン酸化レベルの解析を行った。
- (B) (A) における免疫ブロットの結果を imageJ を用いて定量した。リン酸化 SGK1 およびリン酸化 Akt のシグナル強度を total SGK1 (FLAG) および total Akt で補正し、empty ベクターを発現した細胞におけるリン酸化レベルを 100%とした際の比を示した。

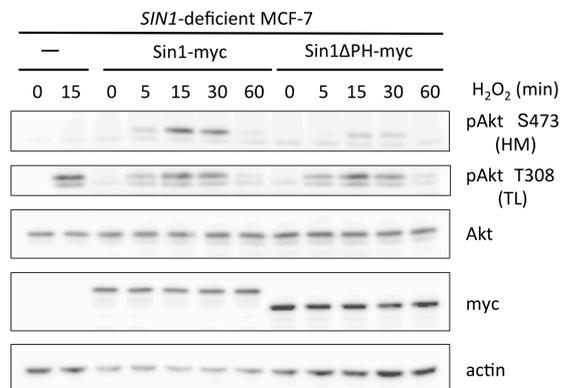
(A)



(B)



(C)



(D)

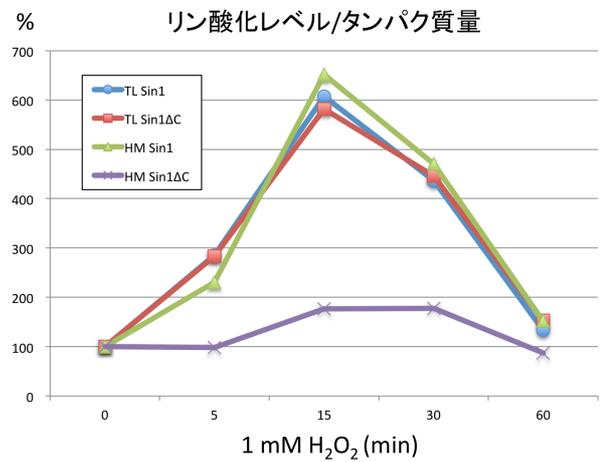


図 19. Sin1 Δ PH 発現細胞における Akt Ser-473 のリン酸化のインスリンおよび過酸化水素応答

Sin1 欠損 MCF-7 細胞に野生型 Sin1-myc および C 末端領域欠損 Sin1-myc を発現させた。18 時間の血清飢餓の後、1 μ g/ml insulin (A, B) または 1 mM H_2O_2 (C, D) を添加し、0、5、15、30、60 分にそれぞれタンパク質を抽出した。空ベクターをトランスフェクションしたコントロールは 0、15 分のみサンプル回収を行った。各時間における Akt のリン酸化を免疫ブロットによって検出した。それにより得られた結果を図 18B と同様に imageJ を用いて定量した。各実験における 0 分時のリン酸化レベルを 100%とした際の比をグラフで示した。

6. Sin1 PH ドメインは PIP3 との結合を介して mTORC2 活性に関与する

Sin1 の C 末端には Ras-binding domain (RBD) と pleckstrin homology (PH) domain が存在する。Sin1 isoform 2 は RBD の約半分を欠失しており機能的な RBD は有していないが、Sin1 Knockout MEF 細胞に Sin1 isoform 2 を発現させると Sin1 isoform 1 (RBD を有する) を発現させた場合と同程度に Akt のリン酸化を回復する (Frias et al. 2006, Yuan et al., 2015)。本研究でも Sin1 isoform 2 の発現で Sin1 欠損細胞における SGK1 のリン酸化の回復が見られる。このことから、Sin1 C 末端欠損による mTORC2 活性の低下には PH ドメインが関与していると考えられる。PH ドメインは Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate (PIP3) に結合することが知られる。PIP3 は mTORC2 の活性化因子として報告されているものの、その活性化メカニズムは不明であった。今回得られた結果は、Sin1 PH ドメインが PIP3 を感知し mTORC2 を活性化する可能性を示唆するものである。そこで以後 Sin1 PH ドメインの PIP3 結合能に着目し研究を進めた。この検証を行うために、Sin1 PH ドメインの立体構造情報 (Pan and Matsuura, 2012; PDB ID:3VOQ) を基に PIP3 との結合能を失うようなアミノ酸置換変異 (K392, 428A) を Sin1 PH ドメインに導入した。このアミノ酸置換変異体を Sin1 欠損細胞に発現させ SGK1 のリン酸化レベルを解析したところ、PH ドメイン欠損変異と同様に SGK1 のリン酸化レベルは野生型 Sin1 を発現した場合と比較して低かった (図 20)。このことから、Sin1 PH ドメインの PIP3 結合能が mTORC2 活性に必要であることが示唆された。

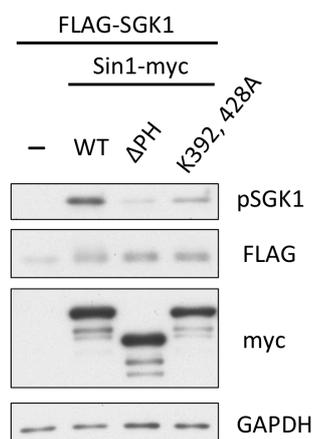


図 20. Sin1 PH ドメインの PIP3 結合能は mTORC2 活性に必要である

Sin1 欠損細胞に FLAG-SGK1 と野生型、PH ドメイン欠損変異体 (ΔPH)、PH ドメインアミノ酸置換変異体 (K392, 428A) の Sin1-myc を共発現した。18 時間の血清飢餓後、10 分間インスリンで刺激しタンパク質抽出を行った。SGK1 は抗 FLAG 抗体を用いて精製し抗 FLAG 抗体、抗 pSGK1 抗体を用いた免疫ブロットで検出した。細胞破碎液中の Sin1-myc および GAPDH を抗 myc 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いた免疫ブロットで検出した。

PH ドメインは細胞膜上に存在するイノシトールリン脂質に結合することでタンパク質の局在制御に関わる。そこで次に、Sin1 PH ドメインが Sin1 の局在に関与しているか検証するために Sin1 に GFP タグを付加し、野生型、PH ドメイン欠損変異体 (Δ PH)、PH ドメインアミノ酸置換変異体 (KA) の局在解析を行った。その結果、野生型 GFP-Sin1 は細胞内部断面では細胞膜上への局在を示した (図 21)。また、細胞表面に近い断面ではドット状の局在が観察された。一方で、 Δ PH、KA 変異体 Sin1 ではこのような局在は見られず細胞全体に拡散していた。これらの結果から、Sin1 は PH ドメインの PIP3 結合能に依存して細胞膜上に局在していることが示された。

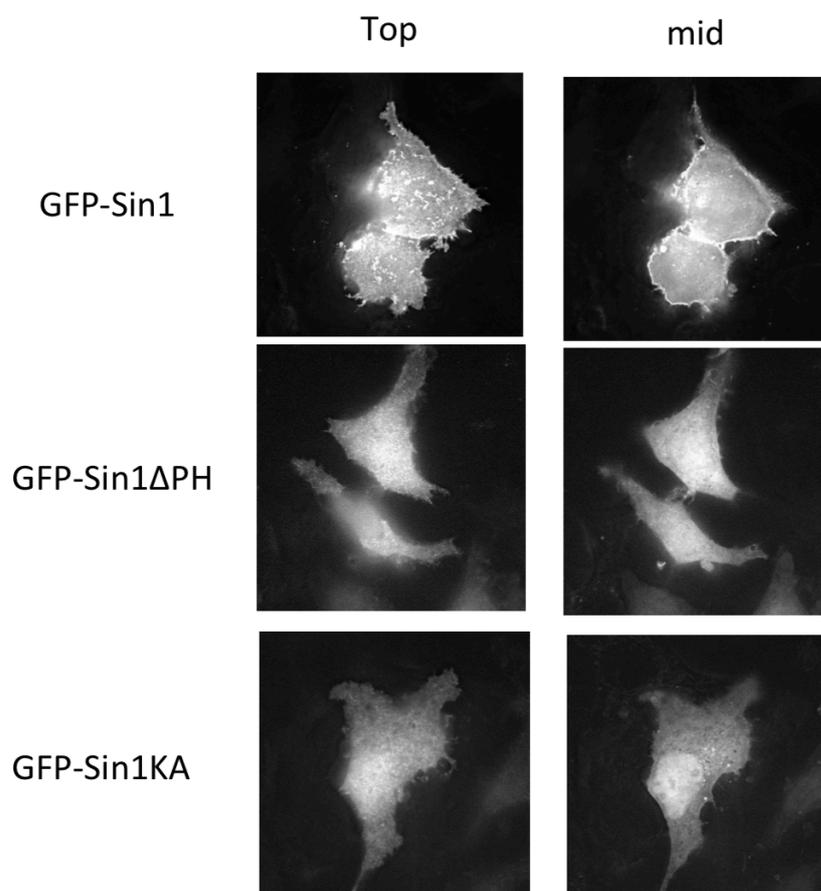


図 21. Sin1 は PH ドメインの PIP3 結合を介して細胞膜に局在する

Sin1 欠損 MCF-7 細胞に GFP タグを付加した野生型、PH ドメイン欠損変異体 (Δ PH)、K392, 428A 変異体 (KA) Sin1 を発現させ蛍光観察を行った。Top は細胞表面に近い断面を示し、mid は細胞内部断面を示している。

これらの結果から、Sin1 は PH ドメインを介して PIP3 と結合することで mTORC2 の細胞内局在および活性制御に寄与していると考えられる。しかしながら mTORC2 の活性制御に関しては手がかりが少ないのが現状である。そこでまずは mTOR のキ

ナーゼ活性および mTORC2 の基質結合能に変化が見られるか検証を行った。mTOR の Ser-2481 の自己リン酸化は各 mTOR 複合体における触媒活性を反映することが報告されている (Soliman et al., 2010)。そこで野生型および PH ドメイン欠損変異体 Sin1 で免疫沈降を行い、共沈してきた mTOR の Ser-2481 のリン酸化を調べることで PH ドメインの有無によって複合体の触媒活性に違いが見られるか検証した。その結果、回収してきた mTORC2 に含まれる mTOR の Ser-2481 のリン酸化レベルは、野生型 Sin1、PH 欠損変異体 Sin1 間で差は見られなかった (図 22)。またそれぞれと共沈してくる mTOR、Rictor の量にも違いは見られなかった。さらに、同時に mTORC2 基質 Akt、SGK1 との相互作用も検証したところ、基質結合能にも変化は見られなかった。これらの結果から、Sin1 PH ドメインの欠失による mTORC2 活性の変化は、mTOR の触媒活性の変化、および Sin1 の基質結合能の変化によるものではないことが示唆された。

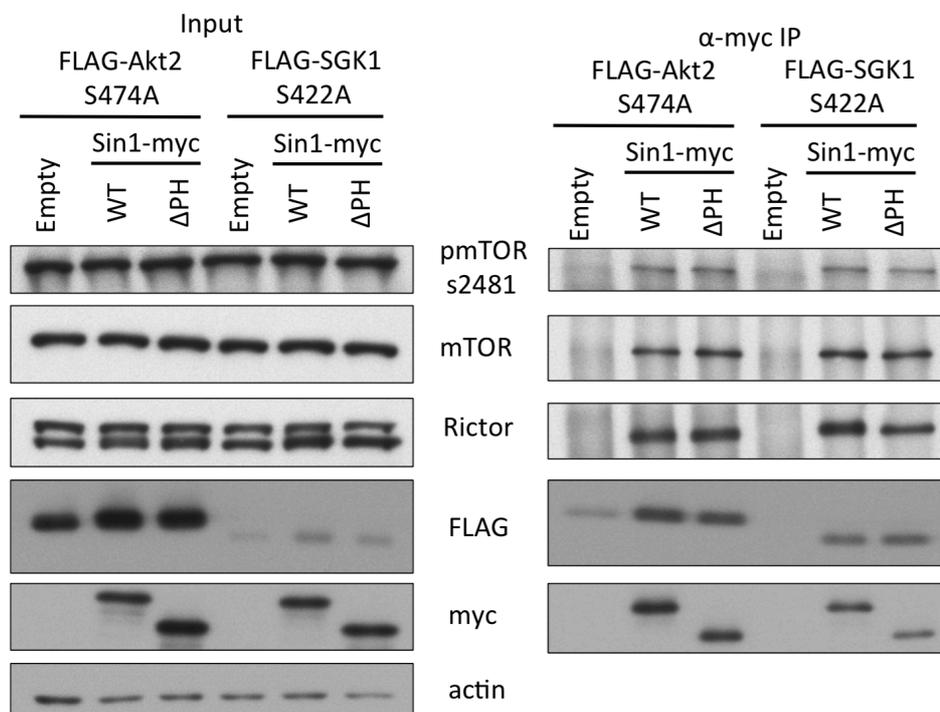


図 22. Sin1 PH ドメインの欠失は mTORC2 の触媒活性と基質結合能には影響しない

Sin1 欠損 MCF-7 細胞に野生型および PH ドメイン欠損 Sin1-myc と FLAG-Akt または FLAG-SGK1 を共発現した。Akt および SGK1 はリン酸化状態の違いによる影響を排除するため mTORC2 によるリン酸化部位をアラニンに置換した変異体を使用した。細胞破碎液と抗 myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、細胞破碎液中および沈降物中における各タンパク質の量およびリン酸化レベルを免疫ブロットによって検出した。

mTORC2 基質である Akt は Sin1 と同じく PH ドメインを N 末端に有しており、Sin1 と同じく細胞膜に局在する (Bellacosa et al., 1998)。また SGK1 も同様に N 末端を介して細胞膜に局在することが報告されている (Brickley et al. 2002)。このことから、Sin1 PH ドメインを介した細胞膜への局在は細胞膜上での基質へのアクセスに参与している可能性に着目した。これを検証するために、SGK1 の N 末端 60 アミノ酸を欠いた変異体 (SGK1 Δ N) を用いて実験を行った。SGK1 Δ N と野生型および PH ドメイン欠損変異体 Sin1 を共発現し、SGK1 のリン酸化を解析したところ全長 SGK1 の場合と同様に PH ドメインの欠失により SGK1 のリン酸化レベル低下が見られた (図 23A)。また PH ドメインのアミノ酸置換変異体でも同様の結果が得られた (図 23B)。このことから、Sin1 PH ドメインを介した細胞膜への局在は基質との共局在とは別のメカニズムで mTORC2 活性に参与していることが示唆された。

(A)

(B)

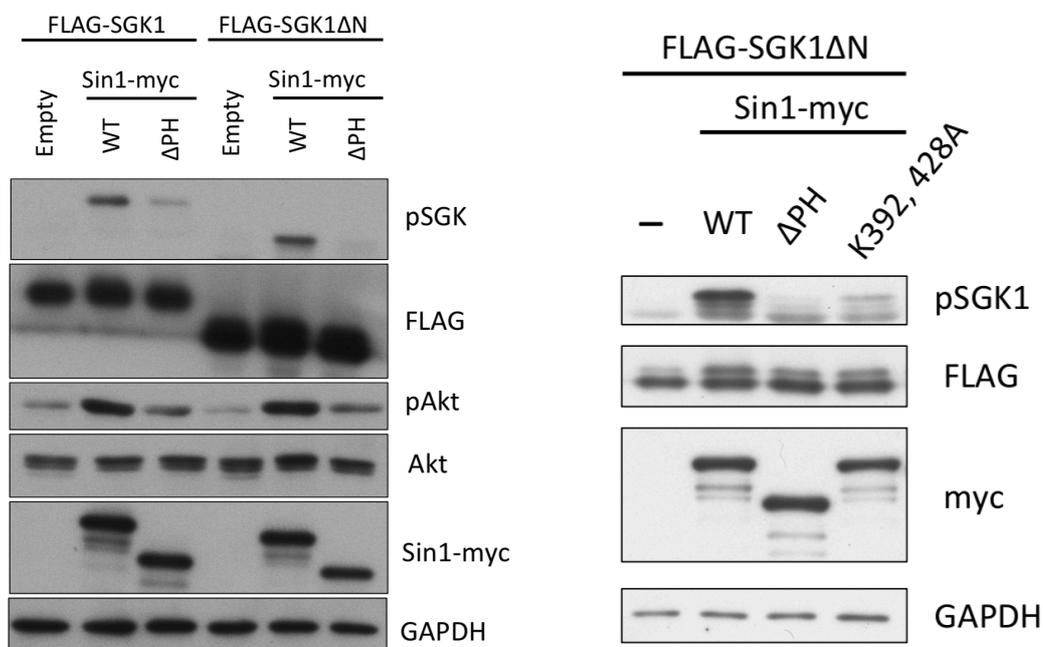


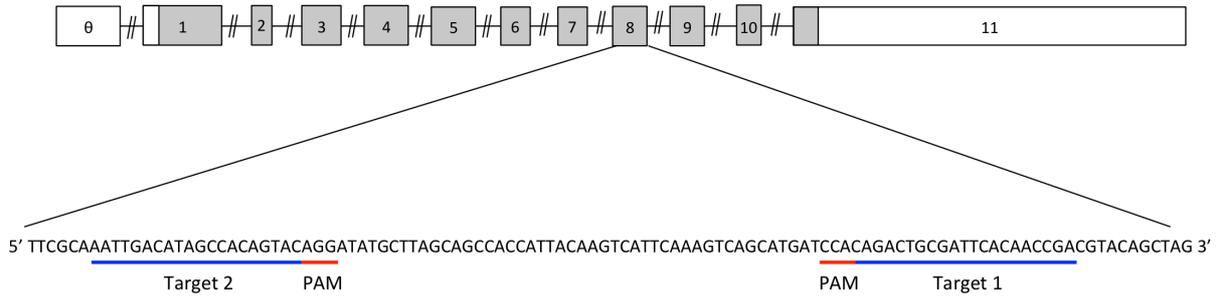
図 23. Sin1 PH ドメインの欠失は基質の局在に関係なくリン酸化レベルの低下を引き起こす

- (A) Sin1 欠損 MCF-7 細胞に myc タグを付加した野生型 Sin1 および PH ドメイン欠損 Sin1 変異体 (Sin1 Δ PH) と FLAG タグを付加した野生型 SGK1 または N 末端欠損変異体 SGK1 (SGK1 Δ N) を共発現させた。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降によって SGK1 を精製し、抗リン酸化 SGK1 抗体を用いた免疫プロットによってリン酸化 SGK1 を検出した。細胞破碎液中における Akt、リン酸化 Akt、Sin1-myc、GAPDH を抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt Ser-473 抗体、抗 myc 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いた免疫プロットによって検出した。
- (B) (A) と同様の実験を Sin1 のアミノ酸置換変異体 (K392, 428A) を加えて行った。

7. Sin1 PH ドメイン欠損細胞の樹立

これまでの研究により、Sin1 の PH ドメインが mTORC2 活性に重要な役割を持つことを明らかにしてきたが、これまでの実験では Sin1 欠損細胞に野生型もしくは変異体 Sin1 を過剰発現させた際の mTORC2 基質のリン酸化レベルを解析してきた。そこで内在性レベルの発現量でも検証を行うべく、CRISPR/Cas9 を用いて染色体上の Sin1 を改変することで内在性 Sin1 の PH ドメインのみを欠損させた細胞を作製した。Sin1 の PH ドメインをコードする領域は Sin1 の 8 番目のエクソンに存在することから、8 番目のエクソン中に CRISPR/Cas9 の標的配列を 2 種類デザインした (図 24A)。これらの標的配列をターゲットとした sgRNA と Cas9 を発現する px330 プラスミドと Puromycin 耐性遺伝子をもつプラスミドを HEK293T 細胞に共導入し、Puromycin による薬剤選択を行った。Puromycin に耐性を示す細胞には px330 ベクターも同時に導入されていると考えられる。薬剤耐性を示した細胞を単離し、各候補クローンからゲノム DNA を抽出しダイレクトシーケンスで標的配列周辺の塩基配列を確認した。その結果、target 1 由来クローン 3 種類 (1-1、1-5、1-6)、target 2 由来クローン 2 種類 (2-2、2-8) において単一な変異が確認された (図 24B)。target 1 由来クローンでは全て 1 塩基挿入変異が起こっており、フレームシフトにより PH ドメインの 10 番目のアルギニン以降でアミノ酸配列が変化し 28 アミノ酸が続いた後、終止コドンが現れる。target 2 由来クローンでは全て 5 塩基欠損が起こっており、フレームシフトによって PH ドメインの手前で終止コドンが現れる。フレームシフトが確認された 5 つのクローンからタンパク質を抽出し、抗 Sin1 抗体を用いた免疫ブロットによってタンパク質の発現を確認した。ここで用いた Sin1 抗体は Sin1 の PH ドメインより C 末端側を認識することから、PH ドメインより手前で終止コドンが現れた場合 Sin1 のバンドが消失する。免疫ブロットでの発現確認の結果、全てのクローンで Sin1 のバンドの消失が確認された (図 25)。一方で、mTOR、Rictor の発現には変化が見られないことも確認された。これらのクローンのうち 1-5 のみが他の 4 つのクローンに比べ明らかに増殖速度が速かったことから、予想外の変異が起こった可能性を考慮し以降の解析から除外した。

(A)



(B)

Sin1 WT coding sequence

Target 2 PH domain Target 1

TCGCAAATTGACATAGCCACAGTACAGGATATGCTTAGCAGCCACCATTACAAGTCATTCAAAGTCAGCATGATCCACAGACTGCGATTCCACAACCGACGTACAGCTAGGATATCTCTGGAGACAAAGTAGAGATAGACCCTGTTACGAATCAGAAAAGCCAGCACTAAGTTTTGGATTAAG

S Q I D I A T V Q D M L S S H H Y K S F K V S M I H R L R F

ACAACCGACGTACAGCTAGGATATCTCTGGAGACAAAGTAGAGATAGACCCTGTTACGAATCAGAAAAGCCAGCACTAAGTTTTGGATTAAG

T T D V Q L G I S G D K V E I D P V T N Q K A S T K F W I K

Sin1ΔPH 1-1, 1-5, 1-6 (target 1) coding sequence

Insertion (1bp)

TCGCAAATTGACATAGCCACAGTACAGGATATGCTTAGCAGCCACCATTACAAGTCATTCAAAGTCAGCATGATCCACAGAACTGCGATTCCACAACCGACGTACAGCTAGGATATCTCTGGAGACAAAGTAGAGATAGACCCTGTTACGAATCAGAAAAGCCAGCACTAAGTTTTGGATTAAG

S Q I D I A T V Q D M L S S H H Y K S F K V S M I H R T A I

CACAACCGACGTACAGCTAGGATATCTCTGGAGACAAAGTAGAGATAGACCCTGTTACGAATCAGAAAAGCCAGCACTAAGTTTTGGATTAAG

H N R R T A R Y L W R Q S R D R P C Y E S E S Q H *

Sin1ΔPH 2-2, 2-8 (target 2) coding sequence

Deletion (5bp)

TCGCAAATTGACATAGCC-----ACAGGATATGCTTAG

S Q I D I A T G Y A *

図 24. Sin1 PH ドメイン欠損細胞の樹立

- (A) Sin1 のエキソン構造の模式図と CRISPR/Cas9 の標的配列。Exon8 に存在する 20 塩基（青色下線）を標的配列とした。PAM 配列を赤色下線で示す。エキソンのうちグレーの部分はコーディング領域を示す。
- (B) 野生型 HEK293T 細胞および Sin1 PH ドメイン欠損 HEK293T 細胞 (Sin1 ΔPH) の標的配列周辺のダイレクトシーケンスの結果とそれに対応するアミノ酸配列を示す。target 1、target 2 はそれぞれ標的配列を示しており、PAM 配列と変異領域を赤色で示す。PH ドメインの開始点を図中に示し、PH ドメインのアミノ酸配列を緑で示した。

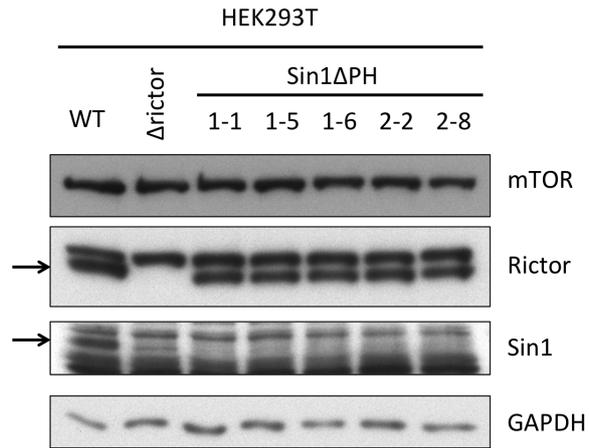


図 25. Sin1 PH ドメイン欠損細胞における mTORC2 構成因子の発現

HEK293T 細胞の野生型株、Rictor 欠損株、Sin1 Δ PH 候補株からタンパク質を抽出し、免疫ブロットにより mTOR、Rictor、Sin1、GAPDH の発現を確認した。Rictor および Sin1 に相当するバンドを矢印で示す。

8. Sin1 PH ドメイン欠損細胞は mTORC2 活性の低下と細胞増殖遅延を示す

樹立した Sin1 Δ PH 細胞における mTORC2 活性を調べるために、各細胞における mTORC2 基質のリン酸化レベルを解析した (図 26)。その結果、Akt および SGK1 両方の mTORC2 基質でリン酸化レベルの低下が見られ、Sin1 PH ドメインの欠失によって mTORC2 活性が低下していることが示された。先に述べたように、Akt は Ser-473 の他に Thr-450 も mTORC2 によってリン酸化される。リン酸化レベルの低下が見られた Akt Ser-473 と異なり、Akt Thr-450 のリン酸化レベルは低下が見られなかった。インスリン刺激に応答する SGK1 Ser-422 や Akt Ser-473 とは異なり、Akt Thr-450 はタンパク質合成と共役してリン酸化が起こり外部刺激には応答しない。このことから、Sin1 PH ドメインは外部刺激に応答した mTORC2 の活性化にのみ必要であり、タンパク質合成と共役した基質のリン酸化には必要ないことが考えられる。

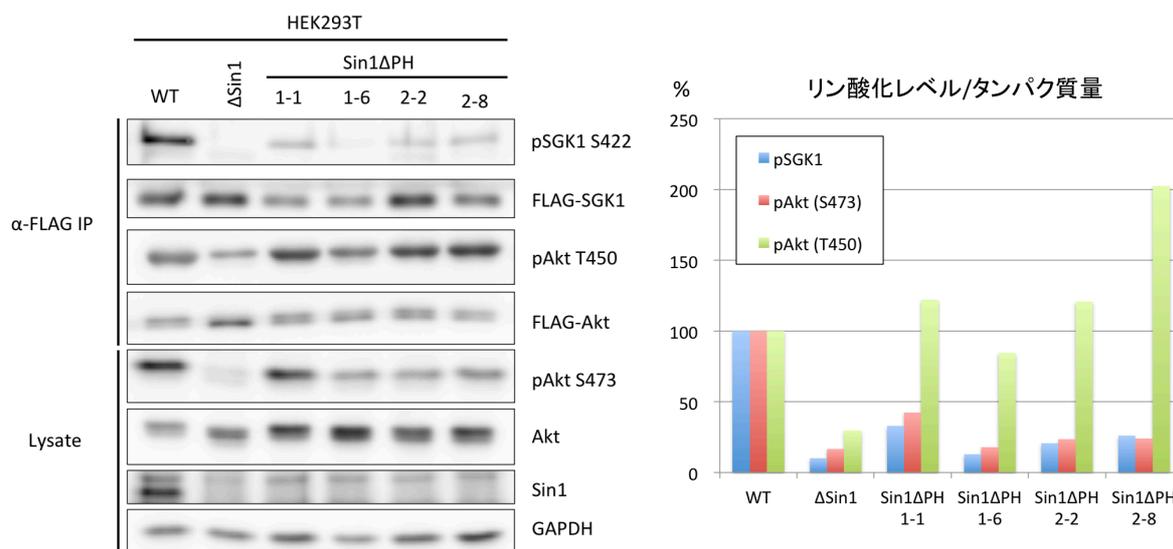


図 26. Sin1 Δ PH 細胞は mTORC2 活性の低下を示す

HEK293T 細胞の野生型株、Sin1 欠損株 (Δ Sin1) および 4 種類の Sin1 PH ドメイン欠損株 (Sin1 Δ PH) における mTORC2 基質のリン酸化を解析した。各細胞に FLAG-SGK1 および FLAG-Akt を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降により精製した。沈降物中における SGK1 Ser-422、Akt Thr-450 のリン酸化、および、細胞破碎液中における Akt Ser-473 のリン酸化を免疫ブロットにより検出した。得られた結果を imageJ により定量化し、野生型株におけるリン酸化レベルを 100%とした際の各欠損細胞におけるリン酸化レベルの比をグラフで示した。各リン酸化レベルは各タンパク質の発現量で補正した。

最後に、Sin1 PH ドメインの欠損による mTORC2 活性の低下が生理的に影響を及ぼすのか検証するために、野生型細胞株および Sin1 Δ PH 細胞株の細胞増殖速度を解

析した。その結果、どの Sin1 Δ PH 細胞株においても細胞増殖の遅延が見られた (図 27)。この結果から、Sin1 PH ドメインは mTORC2 の活性を制御することで細胞の増殖に影響していることが示された。

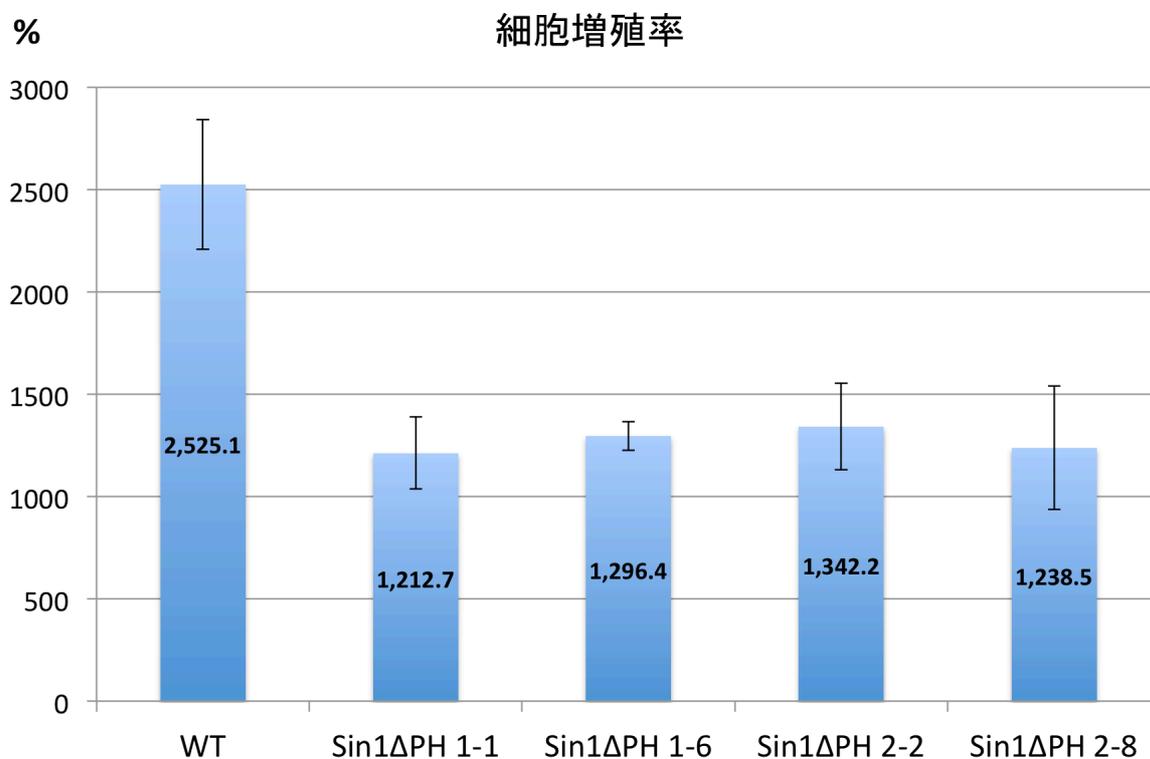


図 27. Sin1 PH ドメインの欠失は細胞増殖の遅延を引き起こす

HEK293T 細胞の野生型株および 4 種類の Sin1 Δ PH 株を播種し、細胞数をカウントした。細胞播種後 1 日目を 100%とし、4 日目における相対的細胞数を求めた。実験は 3 回行い、各実験の平均値を棒グラフで示し、グラフ中に値を記載している。また 3 回の実験の標準偏差をエラーバーで示した。

【考察】

mTOR が形成する 2 種類の複合体、mTORC1、mTORC2 はどちらも mTOR を中心としたタンパク質リン酸化酵素複合体であるが、その制御機構や細胞機能は大きく異なっている。mTORC1 はラパマイシンに対する感受性からその研究が先行し、制御メカニズムや細胞機能など多くのことが明らかになってきている。これに対し、mTORC2 はラパマイシンに対して非感受性であり、特異的阻害剤も存在しないことからその研究は遅れ、今もなお未解明な問題が多く残されている。しかしながら、mTORC2 は有望な創薬ターゲットとしても注目されており、医療の発展のためにも mTORC2 研究の進展が待たれる。本研究では、mTORC2 制御サブユニット Sin1 の機能を明らかにし、mTORC2 の機能メカニズム・制御メカニズムを解明することを目的に研究を行った。その結果、mTORC2 制御サブユニット Sin1 について以下のことを明らかにした (図 28)。

- ① : Sin1 は mTORC2 の基質認識サブユニットとして機能する。
- ② : Sin1 は N 末端と N-CRIM を介して mTORC2 に組み込まれる。
- ③ : Sin1 の PH ドメインは mTORC2 の活性制御に関与している。

これらの知見は、mTORC2 の機能メカニズムの理解に結びつくだけでなく、それぞれが mTORC2 標的薬のターゲットとしても期待できる。

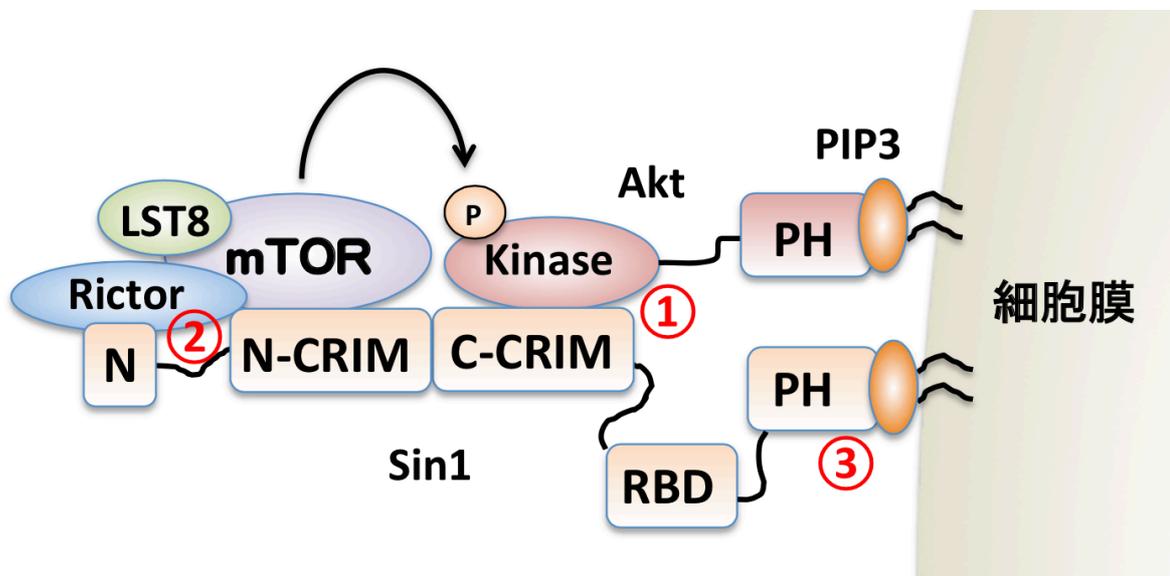


図 28. 本研究で明らかとなった Sin1 の機能

図中に赤丸で示した番号は本研究で明らかにした Sin1 の機能を示しており、上記の番号と対応している。

1. Sin1 は mTORC2 の基質認識サブユニットとして機能する

酵素が持つ基質特異性は、その酵素の機能を決定する重要なファクターである。タンパク質リン酸化酵素である mTORC2 は特定の基質タンパク質をリン酸化することでシグナルを伝達する。興味深いことに、mTOR は異なるタンパク質と結合し、2種類の巨大な複合体を形成することでその基質特異性を変化させる。それぞれの複合体は応答する刺激や制御メカニズムも異なっており、これにより mTOR は特定の刺激に応じて特定の標的因子を制御することで、複雑な細胞外環境に適切に応答することを可能としている。mTOR は2つの複合体に共通した触媒サブユニットであることから、それぞれの複合体の基質特異性を決定しているのは各複合体に特異的な制御サブユニットであると考えられる。実際、mTORC1 においてはその特異的サブユニット Raptor が基質認識機能を担っている (Schalm and Blenis, 2002; Nojima et al., 2003)。一方、mTORC2 の基質認識機構は不明であったが、本研究において、Sin1 が mTORC2 基質と結合する基質認識サブユニットとして機能することが明らかとなった。以前から Sin1 を免疫沈降すると Akt が共沈してくることから基質結合への関与が示唆されていた (Jacinto et al., 2006; Cameron et al., 2011) が、本研究では *in vitro* プルダウンアッセイによって、Sin1 の中央に存在する CRIM ドメインが mTORC2 基質である Akt、SGK1、PKC α といった mTORC2 基質のキナーゼドメインと物理的に相互作用することを示した (図 7)。これと一致して、CX-MS による解析においても Sin1 CRIM と Akt のキナーゼドメインの間で架橋が見られた (図 12)。AGC キナーゼファミリーに属するタンパク質のキナーゼドメインは互いに非常によく似ており、Akt のキナーゼドメインと mTORC1 基質 S6K のキナーゼドメインは 60%以上の類似度を示す。さらに、S6K の C 末端領域を欠失させると mTORC2 依存的なリン酸化を受けるようになることが報告されている (Ali and Sabatini, 2005)。しかし、興味深いことに、C 末端領域を欠失させても S6K は Sin1 と相互作用を示さなかった (図 8)。この結果は、Sin1 と mTORC2 基質との結合は特異性が高く、これが mTORC2 の基質特異性を決定していることを示唆している。このことから、C 末端領域を欠失した S6K が mTORC2 によってリン酸化される際には CRIM とは別の基質認識機構が働いている可能性が考えられる。近年報告された mTOR の立体構造に関する研究において、mTOR の FRB ドメインが基質認識部位として機能することが示唆されており (Yang et al., 2013; 後述)、C 末端を欠損した S6K のリン酸化に寄与しているのかもしれない。

もともと CRIM は Sin1 における進化的に保存性の高い領域として名付けられた (Schroder et al., 2004)。Sin1 CRIM は酵母においても高度に保存されており、当研究室は分裂酵母においても Sin1 CRIM が TORC2 の基質認識サブユニットとして

働くことを明らかにしている（村山、2012；秦野、2015）。このことから、Sin1 による基質認識機構は酵母からヒトまで進化的に保存されていると考えられる。また我々は分裂酵母 Sin1 CRIM の立体構造を明らかにしている（Kataoka et al., 2015; Furuita et al., 2015; 図 9A）。CRIM の立体構造情報をもとに解析を行った結果、CRIM に存在する酸性ループが基質との結合に重要であることを見出した（図 10）。酸性ループの酸性アミノ酸を中性アミノ酸に置換すると mTORC2 基質と CRIM の相互作用が減弱する。このことから、酸性ループの負の電荷が基質結合に重要であることが明らかになった。

ではどのようにして Sin1 CRIM は Akt のキナーゼドメインに結合するのだろうか。CX-MS による解析の結果、Sin1 は Akt キナーゼドメインの N ロープに結合することが示唆された（図 12）。残念ながら Sin1 CRIM の酸性ループを含むペプチドと Akt の間に架橋は見られず、酸性ループがどのようにして基質結合に関与しているかは明らかにならなかった。しかし、Akt の N ロープにはタンパク質表面の正の電荷が強い領域、塩基性パッチ（Akt2 において K165、R184、R224 が寄与）が存在しており、この部位に Sin1 CRIM の酸性ループが結合する可能性が考えられる。Akt を含む AGC キナーゼはキナーゼドメインに続く C 末端テール領域にターンモチーフと疎水性モチーフを有している。ターンモチーフと疎水性モチーフの 2 箇所がリン酸化されると C 末端テール領域はキナーゼドメインに巻きつくように構造変化する（Yang et al., 2002; Hauge et al., 2007; Facchinetti et al., 2008）。この構造変化によって、N ロープの塩基性パッチにリン酸化されたターンモチーフのリン酸基が結合する。つまり、Sin1 CRIM の酸性ループが Akt の塩基性パッチに結合するのであれば、Akt のターンモチーフ、疎水性モチーフの 2 箇所がリン酸化されると C 末端テール領域によって Sin1 CRIM との相互作用が阻害されることが考えられる。実際、分裂酵母においては Sin1 CRIM はリン酸化されていない Gad8（Akt の酵母ホモログ）と選択的に結合することが当研究室にて明らかになっている（秦野、2015）。哺乳類細胞においても、Sin1 との結合が Akt のリン酸化状態によって変化するのかは明らかでないが、mTORC2 がターンモチーフ、疎水性モチーフ両方のリン酸化を担っていることから、リン酸化された C 末端テール領域と CRIM の酸性ループが Akt のキナーゼドメインに存在する塩基性パッチと競合的に結合することで Sin1 が mTORC2 基質のリン酸化状態を見分けている可能性は興味深い。

CRIM や酸性ループを欠失した Sin1 を発現する細胞では Akt の疎水性モチーフ（Ser-473）のリン酸化だけでなく、ターンモチーフ（Thr-450）のリン酸化も見られなかった（図 11B）。増殖因子に応答してリン酸化される疎水性モチーフのリン酸化とは異なり、Akt のターンモチーフのリン酸化は、リボソームによる Akt の翻訳途

中で起こり、非常に安定で増殖因子による刺激に応答しないことが報告されている (Facchinetti et al., 2008; Ikenoue et al., 2008; Oh et al., 2010)。このことから、ターンモチーフと疎水性モチーフのリン酸化メカニズムは異なっている可能性が考えられる。しかし、本研究で示された結果は、どちらのリン酸化においても Sin1 CRIM による基質結合が必要であることを示している。mTORC2 によってリン酸化される C 末端テール領域は、Akt の翻訳のほぼ終盤に登場し、C 末端領域が翻訳される時には CRIM が結合すると予想されるキナーゼドメインのフォールディングは終了していると推察される。このことから、翻訳途中であっても CRIM が Akt と結合することは可能であると考えられる。以上のことより、CRIM による結合はターンモチーフと疎水性モチーフ両方のリン酸化に共通の基質認識メカニズムであることが明らかとなった。

本研究において、Sin1 は mTORC2 基質として知られる AGC キナーゼ全てと結合したが、近年、ユビキチンリガーゼサブユニットである Fbw8 (Kim et al., 2012) や RNA 結合タンパク質である IMP1 (IGF mRNA-binding protein 1) (Dai et al., 2013) が mTORC2 によってリン酸化されることが報告されている。このような AGC キナーゼ以外の基質の認識にも Sin1 CRIM が関わっているのだろうか。もし、そうだとしたら基質に共通する特徴が存在するのだろうか。このような点について解明することができれば、mTORC2 基質認識機構のさらなる理解や新規 mTORC2 基質の探索に役立つと考えられる。

2. Sin1 は N 末端と N-CRIM を介して mTORC2 に組み込まれる

mTORC2は複数の制御サブユニットタンパク質から形成される巨大な複合体であるが、どのようにして複合体が形成されるのかは長年謎であった。mTORC2が二量体として存在するというモデルが提唱され (Wullschleger et al., 2005)、構造生物学的に実際に二量体で存在することが示されたのはごく最近のことである

(Gaubitz et al., 2015)。しかし、各サブユニットがmTORC2に組み込まれるメカニズムについては、RictorとSin1がお互いにmTORC2に組み込まれるために必要であることが知られている程度で詳細な結合メカニズムは不明であった (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006)。またN末端にエピトープタグを付加したSin1はmTORとの結合能を失うことから、Sin1のN末端にmTORC2サブユニットとの結合に重要な領域が存在することが示唆されていたものの、実際にSin1 N末端がmTORC2への結合に寄与しているのかは不明であった (Loewith et al., 2002)。本研究において、Sin1はそのN末端を介してRictorと結合し、Sin1 CRIMのN末端側領域 (N-CRIM) を介してmTORと結合することを見出した (図14、16)。

Sin1のN末端領域はハエからヒトに至る高等真核生物において高度に保存されている。線虫においては、類似性は下がるもののアミノ酸配列の保存性は確認でき、また二次構造予測を行うとヒトSin1と同様に α ヘリックスをとると予測される。しかし、分裂酵母Sin1のN末端にはヒトSin1のN末端に相同な領域は見られなかった。上述の通り、哺乳類細胞においてSin1を欠損させるとmTORとRictorの結合も失われ、逆にRictorを欠損させるとSin1とmTORの結合が損なわれる (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006)。さらに、mTOR/mLST8のヘテロ二量体とRictor/Sin1のヘテロ二量体が最初に形成され、それぞれのヘテロ二量体が結合することでmTORC2が形成されることが報告されている (Chen and Sarbassov, 2011)。ところが、分裂酵母においては1つのTORC2サブユニットを欠いても他のTORC2サブユニット間の相互作用には影響が見られない (村山, 2012)。このように、分裂酵母におけるmTORC2の構築様式は哺乳類細胞と相違点があると考えられ、Sin1とSte20 (Rictorの分裂酵母ホモログ) の相互作用様式も分裂酵母とヒトで異なっている可能性がある。実際、分裂酵母においてSin1 N-CRIMを欠失させるとTor1との相互作用が見られなくなるだけでなく、同時にSte20との相互作用も減弱するのに対し、ヒトSin1のRictorとの相互作用はN-CRIMを欠失しても影響を受けない (秦野, 2015; 図14)。これらの結果は、哺乳類におけるSin1-Rictorの相互作用はmTORに非依存的であるのに対し、分裂酵母Sin1-Ste20の相互作用にはTor1依存的なメカニズムが存在している可能性を示唆している。一方で、分裂酵母においてもSin1 N-CRIMの欠失はSin1とTor1間の相互作用を低下させることから、Sin1 N-CRIMとTORキナーゼの結合は分裂酵母からヒトまで保存されている可能性が高い。また分裂酵母においてSin1とTor1 (mTORの分裂酵母ホモログ) 間の相互作用にはWat1 (mLST8の分裂酵母ホモログ) が関与していることが示されている (秦野, 2015)。さらに、最近報告された出芽酵母TORC2の構造に関する研究において、LST8はTor2 (mTORの出芽酵母ホモログ) とAvo1 (Sin1の出芽酵母ホモログ) に挟まれるように位置していることが示唆されている (Gaubitz et al., 2015)。このことから、哺乳類細胞においてもSin1とmTORの結合にmLST8が関与している可能性が考えられる。しかし、分裂酵母においてSte20、Wat1の二重欠損株においてTor1とSin1の相互作用は弱いながらも検出されることから (秦野, 2015)、mLST8に依存しないmTOR-Sin1間の相互作用メカニズムの存在も否定できない。

mTOR-mLST8-Sin1の結合様式はmTORC2の活性制御においても興味深い。近年、mTORとmLST8の複合体の立体構造が報告された (Yang et al., 2013、図29)。

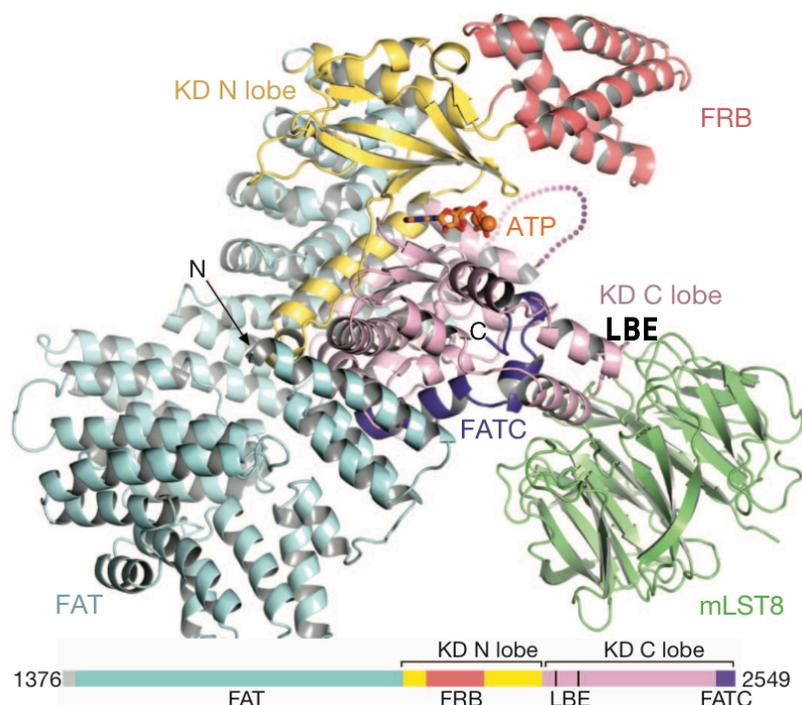


図 29. mTOR-mLST8 複合体の立体構造

Yang et al. (2013) に報告されている mTOR-mLST8 複合体の立体構造。mTOR の各ドメインの構造は下部に示してある通りに色分けされている。mLST8 は緑で、ATP はスティックモデルで示されている。ピンクのドット状のループは disordered region を表している。

mTORのキナーゼドメインはAktなど他のキナーゼと同じく、NローブとCローブで構成されており、それら2つの間のクレフトにATP結合部位が存在する。この構造において特徴的なのは、Nローブから突き出たFRB (FKBP12 -Rapamycin binding) ドメインとCローブから突き出たLBE (mLST8結合部位) である。Aktなど多くのキナーゼの活性化には、キナーゼドメイン中に存在する活性化ループのリン酸化が必須である。活性化ループのリン酸化は、活性化ループのコンフォメーション変化を引き起こし、ディスオーダー状態にあった活性化ループが立体構造を取ることで活性化する (Nolen et al., 2004)。しかし、mTORの活性化ループは最初から構造をとっており、“intrinsically active”な状態であることが示されている (Yang et al., 2013)。このことからmTORの触媒活性そのものではなく、mTORの活性部位への基質のアクセスがmTOR複合体の活性制御に重要であることが提唱されている。mTORの活性部位はFRBと触媒クレフトから飛び出たヘリックスによってかなり奥まった部分に隠されている。これまでに報告されているTORの活性型変異体 (Reinke et al., 2006; Urano et al., 2007; Ohne et al., 2008) における変異部位は、活性部位へのアクセスを制限するこれらの構造上に位置しており、これら活性型変異体TORキナーゼは基

質が活性化部位にアクセスしやすくなっている可能性が示唆されている (Yang et al., 2013)。さらに、mTORC1基質であるS6KはそのN末端に存在するTOSモチーフをRaptorが認識することでmTORC1にS6Kがリクルートされることが知られている (Schalm and Blenis, 2002; Nojima et al., 2003) が、mTORの活性部位の近くにはFRBドメインが第二の基質認識部位として機能することでS6Kが活性部位へとリクルートされることが示されている (Yang et al., 2013)。一方、mTORC2基質であるAktやSGK1が同じようなメカニズムで活性部位にアクセスするのかは定かではない。そこでmTORC2においてはSin1のC-CRIMがmTORC2基質をmTORの活性部位へと導いている、という仮説を提唱したい。mTORC2とその基質であるAktはどちらもPHドメインを持つことから、PI3Kの活性化に応じて同じ膜上に局在することで空間的に出会うことができると考えられる。しかし、mTORC2によるAktのリン酸化にはCRIMが必須である (図11B)。このことから、膜への共局在だけではAktはmTORC2の活性部位にアクセスできないと考えられる。上述のように、本研究は、Sin1のC-CRIMがmTORC2基質と結合することに加え、C-CRIMの近傍に位置するN-CRIMがmTORと相互作用することを明らかにしている。また分裂酵母での知見 (秦野、2015) と出芽酵母TORC2サブユニット間におけるクロスリンクの結果 (Gaubitz et al., 2015) から、Sin1 N-CRIMはmLST8を介してmTORと相互作用している可能性が考えられる。これらの知見とmTOR-mLST8複合体の立体構造情報を統合して考察すると、①Sin1がN-CRIMおよびmLST8を介してmTORのキナーゼドメインに結合する、②これによりmTORの触媒部位への入り口付近に位置したC-CRIMが、mTORC2基質をmTORの活性部位へと導くことでmTORC2基質がリン酸化される、というモデルが考えられるのではないか。このような仮説が事実であれば、Sin1における基質結合部位 (C-CRIM) とmTOR結合部位 (N-CRIM) が近接して存在し、かつ進化的に保存されていることの意義も見えてくるのではないか。

3. Sin1 の PH ドメインは mTORC2 の活性制御に関与している

PH ドメインは、PI3K によって産生された PIP3 に結合することで、タンパク質の膜への局在化に寄与する。mTORC2 は PI3K の下流で活性化されることが知られており、in vitro の実験系で PIP3 が直接 mTORC2 を活性化することが報告されている (Gan et al., 2011)。しかし、どのようなメカニズムで PIP3 が mTORC2 を制御しているのかは不明であった。本研究は、Sin1 の PH ドメインが PIP3 との結合を介して mTORC2 の活性化に寄与していることを明らかにした。最近になって、本研究と同様に Sin1 の PH ドメインと mTORC2 の活性制御に関する研究が報告された (Liu et al., 2015)。この論文において、Sin1 knockout MEF 細胞に PIP3 結合能を失うよ

うな変異を導入した Sin1 変異体を発現させても mTORC2 活性の回復が見られないことが示されている。この結果は、本研究で得られた結果と一致するものである。しかし、この論文の著者らは本研究とは異なり、次のようなモデルを提唱している。“血清飢餓状態において、Sin1 PH ドメインが mTOR のキナーゼドメインに結合し、活性部位に「蓋」をすることで mTORC2 を不活性化している。インスリンによって PI3K が活性化し PIP3 が産生されると PH ドメインが PIP3 に結合することで、PH ドメインが mTOR のキナーゼドメインから解離し、基質が活性部位にアクセスできるようになる。” Liu らはこのようなメカニズムによって Sin1 PH ドメインは mTORC2 活性を制御していると述べている。もし、このモデルが正しければ PH ドメインを欠失した Sin1 を発現する細胞では mTORC2 は恒常的に活性化するはずである。実際、過去の論文で PH ドメインを含まない Sin1 isoform 5 を含む mTORC2 はインスリン刺激の有無に関わらず活性化していることが報告されている (Frias et al., 2006)。しかし、これはあくまでも *in vitro* においてのみ見られる現象であり、細胞破碎液中における Akt のリン酸化は、Sin1 isoform 5 を発現しても血清飢餓条件下において正常に脱リン酸化されている (Frias et al., 2006)。本研究を遂行する際にも、この Sin1 isoform 5 を含む mTORC2 の恒常的活性化には注目していたが、予想に反し、Sin1 欠損細胞に野生型 Sin1 または PH ドメイン欠損変異体 Sin1 を発現した際の血清飢餓条件下における Akt のリン酸化には差が見られなかった (図 19A, C における 0 min 参照)。さらに、CRISPR/Cas9 を用いて作成した Sin1 PH ドメイン欠損細胞において、内在性 Sin1 の PH ドメインの欠失によって mTORC2 活性の低下が見られたことから、Sin1 PH ドメインは mTORC2 を抑制しているのではなく、活性化に寄与していると考えられる。これに加えて、PH ドメインが mTOR のキナーゼドメインに結合しているという点についても疑問が残る。本研究において N-CRIM を欠失する Sin1 は mTOR との相互作用を示さないが、この Sin1 変異体は PH ドメインを含んでいる。つまり、Sin1 PH ドメインと mTOR との間に相互作用は確認できない。さらに、Liu et al. (2015) で示されている Sin1 断片と mTOR キナーゼドメインの相互作用を解析した実験はコントロールが含まれていない。これらのことを総合して鑑みると、Liu らが提唱しているモデルは実際の PH ドメインによる mTORC2 の活性制御機構を反映していないと考えられる。

ではどのようにして Sin1 PH ドメインは mTORC2 の活性を制御しているのだろうか。1つの可能性として PIP3 との結合による mTORC2 の立体構造変化が考えられる。PIP3 との結合による立体構造の変化は Akt において報告されている (Alessi et al., 1997; Milburn et al., 2003; Calleja et al., 2007)。Akt は PIP3 と結合すると構造変化を起こし、PDK1 によるリン酸化を受けやすくなる。上記で述べたように、PIP3

が *in vitro* において mTORC2 を活性化していることが報告されており (Gao et al., 2011)、Akt と同様に PIP3 が mTORC2 に直接作用することで活性化フォームへと構造変化させた可能性が考えられる。

次の可能性として mTORC2 の局在の関与が考えられる。PH ドメイン欠損もしくは PH ドメインのアミノ酸置換変異 Sin1 は野生型 Sin1 で見られた膜局在が消失していた (図 21)。このことから、Sin1 PH ドメインは mTORC2 の局在に影響を及ぼしている可能性が高い。mTORC1 の活性制御においては、アミノ酸に応答した mTORC1 のリソソームへの局在化が重要なステップである (Bar-Peled and Sabatini, 2014)。リソソームに局在する mTORC1 は、同じくリソソームに局在する mTORC1 活性化因子 Rheb によって活性化される。mTORC2 の活性制御機構においても、膜局在が活性化因子による活性化に必要である可能性が考えられる。しかし、mTORC2 の活性化因子については報告が少ないのが現状である。当研究室において、低分子量 GTPase であり、Rab ファミリーに属する Ryh1 が分裂酵母 TORC2 の活性化因子であることを明らかにしている (Tatebe et al., 2010; Hatano et al., 2015)。Ryh1 のヒトホモログである Rab6 の mTORC2 活性への影響は明らかになっていないが、Rab ファミリーもまた膜に局在するタンパク質であり、PH ドメインによって膜に局在した mTORC2 の活性化因子である可能性が考えられる。その他の mTORC2 活性化因子として、近年リボソームが報告された (Zinzalla et al., 2011)。この報告によると、mTORC2 はリボソームと相互作用することで活性化する。この相互作用は PI3K 依存的であることから、mTORC2 とリボソームの相互作用に Sin1 PH ドメインが影響している可能性が考えられる。しかし、本研究において Sin1 PH ドメインは Akt の疎水性モチーフのリン酸化に関与する一方で、ターンモチーフのリン酸化には影響が見られなかった。Akt のターンモチーフのリン酸化はリボソームによって Akt が翻訳されている途中で起こることが報告されている (Oh et al., 2010)。このことから、PH ドメインはリボソームとの結合に影響しない可能性も否定できない。しかし、ターンモチーフのリン酸化は疎水性モチーフのリン酸化と異なり、PI3K に依存しない (Ikenoue et al., 2008)。このため、疎水性モチーフとターンモチーフのリン酸化におけるリボソームとの結合メカニズムは異なっている可能性も考えられる。そこで、野生型 Sin1、PH ドメイン欠損 Sin1 変異体それぞれを含む mTORC2 とリボソームの結合を解析することで、これらの疑問に回答を与えるような興味深い知見が得られるのではと期待している。

3つめの可能性として、PH ドメインによって mTORC2 が膜に局在することで、mTORC2 サブユニットの翻訳後修飾に変化が起き、活性が制御されることが挙げられる。これまでの mTORC2 に関する研究で mTORC2 サブユニット、特に mTOR、

Rictor、Sin1 のリン酸化が数多く報告されている (Gaubitz et al., 2016)。Rictor に関しては 20 箇所以上がリン酸化されていることが報告されている (Dibble et al., 2009)。その中でも 1135 番目のスレオニン残基は S6K によってリン酸化され、mTORC1 からのネガティブフィードバックの 1 つとされている (Julien et al., 2010; Treins et al., 2010)。また Rictor はリン酸化以外にもアセチル化されることが報告されており、このアセチル化は mTORC2 を活性化する (Glidden et al., 2012; Masui et al., 2013)。アセチル化は細胞内の代謝状態と関連していると考えられている (Choudhary et al., 2014)。このことから、mTORC2 は増殖因子だけでなく、Rictor のアセチル化を介して細胞内の代謝状態にも応答していると考えられる。このような mTORC2 制御サブユニットの翻訳後修飾が、Sin1 PH ドメイン欠損細胞においてどのように変化しているか解析することで、新たな mTORC2 の制御メカニズムを解明できるかもしれない。

このように mTORC2 の活性制御における Sin1 PH ドメインによる mTORC2 の局在制御の関与は非常に興味深いですが、結局のところ mTORC2 は細胞内のどこに存在しているのだろうか。これまでに様々な場所に mTORC2 が局在することが報告されており、今の所 mTORC2 の局在に関して明確な答えは出ていない (Betz and Hall, 2013)。そこで、PH ドメインを欠失した Sin1 変異体に様々な局在化配列を付加し、細胞内の各細胞内コンパートメントに強制的に mTORC2 を局在させた際の mTORC2 の活性状態を観察することで mTORC2 の活性制御機構や細胞機能解明につながる手がかりを得ることができるのではないかと考えている。

一方で、Sin1 PH ドメインに依存しないメカニズムによって PIP3 が mTORC2 の活性に影響を与えている可能性がある。PTEN は PIP3 を脱リン酸化することで PI3K に拮抗するガン抑制遺伝子だが、最近になって PTEN がホモ二量体で存在することが報告された (Papa et al., 2014)。さらにこの論文では、PTEN のドミナントネガティブ (DN) 変異体についても明らかにしており、PTEN の DN 変異体を発現すると PTEN ホモ二量体の活性が低下し、結果的に細胞内の PIP3 量が上昇することが報告された。そこで Sin1 欠損細胞に、PH ドメイン欠損 Sin1 変異体と PTEN のドミナントネガティブ変異体を発現したところ、SGK1 のリン酸化上昇が見られた (補遺、図 30)。この結果は、mTORC2 は Sin1 PH ドメイン非依存的なメカニズムによっても PIP3 を介した調節を受けている可能性を示唆している。今回樹立した Sin1 PH ドメイン欠損細胞を用いて mTORC2 の活性化メカニズムを解析すれば、このような PH ドメイン非依存的な制御機構についても明らかにすることができると考えられる。

4. 結論

mTOR は異なる制御因子と結合することで機能の異なる 2 種類の複合体を形成し、より複雑なシグナル伝達を可能にしている。これらの複合体の特徴を規定しているのは、間違いなくそれぞれに特異的な制御サブユニットタンパク質である。本研究は、Sin1 が mTORC2 の基質認識サブユニットとして働くことで、mTORC2 の基質特異性を決定していることを明らかにした。また、Sin1 はその N 末端領域を介して Rictor、mTOR と結合することで複合体に組み込まれる。ここ数年で明らかになった mTOR や mTOR 複合体の構造に関する知見は、mTOR 研究をさらに推し進めることが予想される。本研究で基質認識における役割が明らかとなった Sin1 だが、ただ基質を結合するだけでなく、その基質結合能を介して mTORC2 の活性制御にも関わっているかもしれない。また Sin1 はその C 末端に存在する PH ドメインを介して PIP3 と結合することで mTORC2 の活性化にも寄与していることが明らかとなり、mTORC2 の活性制御においても Sin1 は注目すべき存在である。このように Sin1 は mTORC2 の機能において複数の重要な役割を有しており、今回得られた知見は今後 Sin1 を中心とした mTORC2 の機能メカニズム、制御メカニズムの解明、そして mTORC2 を標的とした薬剤の開発に結びつくと期待している。

【謝辞】

本研究を行う機会を与えてくださり、そして最後までご指導頂きました細胞シグナル研究室 塩崎一裕教授には心より御礼申し上げます。塩崎先生には、研究を行う上で大事な考え方、そして自分の研究を相手に伝えるプレゼン力など研究者として大事な多くのことを教えて頂きました。また研究テーマを与えて頂くだけでなく、自ら考え提案し、研究を進める機会、後輩を指導する機会など多くのチャンスを頂いたことで、研究者として大きく成長することができました。また入学当初、突然ラボステイ先をこの研究室に変更したいと押しかけたにもかかわらず、快く受け入れてくださったこと、進路を決める際にも温かく見守ってくださったこと、多くのわがままを受け入れてくださったことにも大変感謝しております。塩崎先生のおかげで自分の納得する将来へと踏み出すことができました。6年間本当にありがとうございました。

本研究のアドバイザー・審査員である、構造生物学研究室の箱嶋敏雄教授、機能ゲノム医学研究室内の石田靖雅准教授には、研究を開始したころから現在まで多くのご助言を頂き、心より感謝しております。適確な指摘・アドバイス、また時にはユーモアを交えた激励の言葉や温かい励ましの言葉をかけて頂き、最後まで研究を進める勇気を頂きました。これまでお忙しい中、ご指導、審査をして頂いたこと、この場を借りて深く御礼申し上げます。

大阪大学 児嶋長次郎准教授には、Sin1 CRIM の構造解析において大変お世話になりました。この知見は本研究において非常に重要なものであり、ご協力がなければこの研究の発展はなかったと思います。この場を借りて深く御礼申し上げます。

同研究室の建部亘助教、福田智行助教（現 新潟大学 准教授）、森ヶ崎進研究員には、実験手技・手法や多くの科学的知識を教えて頂くだけでなく、研究における考え方、研究者としての在り方、研究室の運営など、近い距離で多くのことを学ばせて頂きました。研究や書類で行き詰まった時も、親身になって相談に乗ってくださったおかげで、本博士論文を完成させることができました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

細胞増殖学研究室の北川教弘助教、小川拓哉助教（現 国際医療福祉大学 講師）には、当研究室開設初期に培養細胞の扱いについてご助言頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

研究室の先輩である、村山真一さん、秦野智行さんには多くのアドバイスや実験指導をして頂き、心より感謝致します。入学当時、当研究室は本学にできたばかりであ

り、配属になった時には多くの不安がありましたが、お二人に様々な場面で助けて頂いたおかげで研究に没頭することができました。村山さんにはテーマが近かったこともあり、様々なご意見を頂きました。また秦野さんには、4年間と長い間お世話になりました。多くの時間を割いてディスカッションして頂き、考え方や知識、研究にかける熱い思いなど、学ばせて頂いた多くのことは本研究を進める際にも非常に大きな力となりました。心より御礼申し上げます。

研究室の同輩、後輩の皆さんにも大変お世話になりました。特に、松田崇斗君、世良和磨君は、この研究室での最初の後輩であり、5年間ともに過ごしてきた仲間でもあります。歳の近い博士課程の学生として後輩ながらに研究生生活の支えとなってくれました。また実験だけでなく、研究室見学など様々なイベントに一から関わることが多かったですが、2人の協力のおかげでうまく進めることができました。また先輩が少なかったこともあり、後輩の皆さんを指導させて頂くことも多く経験させて頂きました。特に、中佐昌紀君、古谷知美さん、本田葵さんは、酵母を主に扱う研究室で共に培養細胞を扱ってきた数少ない仲間です。周りに培養細胞について相談できる人が少なく、心が折れかけた時もありましたが、一人じゃないと思えたことは大きな心の支えでした。手探りで立ち上げた培養細胞の実験を教えるのは不安であり、また私の未熟さから頼りない部分も多々あったと思いますが、しっかりついてきてくれ、逆に助けてもらうことも多かったです。中でも古谷さんは CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト細胞作製の際に、大きな力となってくれました。この他の全ての後輩の皆さんにも、多くの時間を共に過ごし、研究面だけでなく、人としても成長させて頂き、また日々の生活を豊かで楽しいものにして頂いたことに深く感謝致します。

そして学部時代の恩師であり、研究の道に導いてくださった長崎県立大学 四童子好廣教授にも深く感謝致します。まだ配属されていないにも関わらず、好きなだけ実験をさせて頂き、また様々な技術・知識を教えて頂いたこと、非常に多くの時間を私とのディスカッションに費やして頂いたこと、海外で研究発表する機会を頂いたことなど大変多くを授けて頂きました。また、それにも関わらず本学への進学を決めた私を心よく送り出して頂きました。四童子研での経験がなければ、本研究を遂行することは非常に難しかったと思います。多くの経験をさせて頂いたこと、やりたいこともなかった私に夢を与えて頂いたこと、この場を借りて深く御礼申し上げます。

そして最後に、修士・博士課程まで進むことや、本学への進学を独断で決めたにも関わらず、最後まで温かく見守り、支えてくれた家族ならびに心の支えになってくれた友人達に深く感謝致します。

米倉 敏哉

【参考文献】

Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., et al. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776–789.

Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J. Biol. Chem.* 280, 19445–19448.

Apsel, B., Blair, J.A., Gonzalez, B., Nazif, T.M., Feldman, M.E., Aizenstein, B., Hoffman, R., Williams, R.L., Shokat, K.M., and Knight, Z.A. (2008). Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat. Chem. Biol.* 4, 691–699.

Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 24, 400–406.

Bar-Peled, L., Schweitzer, L.D., Zoncu, R., and Sabatini, D.M. (2012). Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150, 1196–1208.

Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M., and Sabatini, D.M. (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 340, 1100–1106.

Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313–325.

Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes

the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 868–880.

Berchtold, D., Piccolis, M., Chiaruttini, N., Riezman, I., Riezman, H., Roux, A., Walther, T.C., and Loewith, R. (2012). Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat. Cell Biol.* 14, 542–547.

Betz, C., and Hall, M.N. (2013). Where is mTOR and what is it doing there? *J. Cell Biol.* 203, 563–574.

Brickley, D.R., Mikosz, C.A., Hagan, C.R., and Conzen, S.D. (2002). Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J. Biol. Chem.* 277, 43064–43070.

Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A., and Greenberg, M.E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol. Cell. Biol.* 21, 952–965.

Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Jr., and Abraham, R.T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, 99–101.

Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J., and Larijani, B. (2007). Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol.* 5, 780–791.

Cameron, A.J.M., Linch, M.D., Saurin, A.T., Escribano, C., and Parker, P.J. (2011). mTORC2 targets AGC kinases through Sin1-dependent recruitment. *Biochem. J.* 439, 287–297.

Chen, C.H., and Sarbassov, D.D. (2011). The mTOR (mammalian target of

rapamycin) kinase maintains integrity of mTOR complex 2. *J. Biol. Chem.* 286, 40386–40394.

Cheng, J., Zhang, D., Kim, K., Zhao, Y., Zhao, Y., and Su, B. (2005). Mip1, an MEKK2-interacting protein, controls MEKK2 dimerization and activation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5955–5964.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6, 184–192.

Dai, N., Christiansen, J., Nielsen, F.C., and Avruch, J. (2013). mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes Dev.* 27, 301–312.

Dibble, C.C., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5657–5670.

Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., et al. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 27, 1932–1943.

Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2006). mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Curr. Biol.* 16, 1865–1870.

Furuita, K., Kataoka, S., Sugiki, T., Hattori, Y., Kobayashi, N., Ikegami, T., Shiozaki, K., Fujiwara, T., and Kojima, C. (2015). Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. *J. Biomol. NMR* 61, 55–64.

Gan, X., Wang, J., Su, B., and Wu, D. (2011). Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 286, 10998–11002.

Gaubitz, C., Oliveira, T.M., Prouteau, M., Leitner, A., Karuppasamy, M., Konstantinidou, G., Rispal, D., Eltschinger, S., Robinson, G.C., Thore, S., et al. (2015). Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Mol. Cell* 58, 977–988.

Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., and Loewith, R. (2016). TORC2 Structure and Function. *Trends Biochem. Sci.* 41, 532–545.

Gingras, A., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP / mTOR. *Genes Dev.* 15, 807–826.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Saitoh, M., Kinkel, S., Crosby, K., Sheen, J.H., Mullholland, D.J., Magnuson, M.A., Wu, H., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR Complex 2 Is Required for the Development of Prostate Cancer Induced by Pten Loss in Mice. *Cancer Cell* 15, 148–159.

Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J. (2007). Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110 α Is Required for Ras- Driven Tumorigenesis in Mice. *Cell* 129, 957–968.

Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I., and Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J. Biol. Chem.* 272, 26457–26463.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K. ichi, Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177–189.

Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., et al. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213–223.

Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K., and Shiozaki, K. (2015). Fission yeast *ryh1* gtpase activates tor complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle* 14, 848–856.

Hauge, C., Antal, T.L., Hirschberg, D., Doehn, U., Thorup, K., Idrissova, L., Hansen, K., Jensen, O.N., Jørgensen, T.J., Biondi, R.M., et al. (2007). Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J.* 26, 2251–2261.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–909.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.

Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., and Shiozaki, K. (2008). Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle* 7, 358–364.

Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K.-L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 27, 1919–1931.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling service Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17 1829–1834.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128.

Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 127, 125–137.

Jain, A., Arauz, E., Aggarwal, V., Ikon, N., Chen, J., and Ha, T. (2014). Stoichiometry and assembly of mTOR complexes revealed by single-molecule pulldown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 17833–17838.

Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P.P. (2010). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 30, 908–921.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003.

Kataoka, S., Furuita, K., Hattori, Y., Kobayashi, N., Ikegami, T., Shiozaki, K., Fujiwara, T., Kojima, C. (2014). ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of *S. pombe* Sin1 protein. *Biomol NMR Assign* 9, 89-92

Kiel, C., and Serrano, L. (2006). The ubiquitin domain superfold: Structure-based sequence alignments and characterization of binding epitopes. *J. Mol. Biol.* 355, 821–844.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V.P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2003). GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11, 895–904.

Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10, 935–945.

Kim, S.J., DeStefano, M.A., Oh, W.J., Wu, C. chih, Vega-Cotto, N.M., Finlan, M., Liu, D., Su, B., and Jacinto, E. (2012). MTOR Complex 2 Regulates Proper Turnover of Insulin Receptor Substrate-1 via the Ubiquitin Ligase Subunit Fbw8. *Mol. Cell* 48, 875–887.

Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585–596.

Lang, F., Artunc, F., and Vallon, V. (2009). The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 439–448.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). MTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.

Li, Y., Corradetti, M.N., Inoki, K., and Guan, K.-L. (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* 29, 32–38.

Liu, P., Gan, W., Chin, Y.R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J., Wang, B., Blenis, J., Cantley, L.C., Toker, A., et al. (2015). PtdIns(3,4,5)P₃-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov.* 5, 1194–1209.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* 10, 457–468.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol.* 15, 702–713.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.

Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R., and Van Aalten, D.M.F. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem. J.* 375, 531–538.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963–3966.

Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K.I., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J. Biol. Chem.* 278, 15461–15464.

Oh, W.J., Wu, C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.-A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., and Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J.* 29, 3939–3951.

Ohne, Y., Takahara, T., Hatakeyama, R., Matsuzaki, T., Noda, M., Mizushima, N., and Maeda, T. (2008). Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J. Biol. Chem.* 283, 31861–31870.

Pan, D., and Matsuura, Y. (2012). Structures of the pleckstrin homology domain of *Saccharomyces cerevisiae* Avo1 and its human orthologue Sin1, an essential subunit of TOR complex 2. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 386–392.

Papa, A., Wan, L., Bonora, M., Salmena, L., Song, M.S., Hobbs, R.M., Lunardi, A., Webster, K., Ng, C., Newton, R.H., et al. (2014). Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell* 157, 595–610.

Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F.M., Gurlay, R., Magnuson, M.A., and Alessi, D.R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J.* 405, 513–522.

Reinke, A., Chen, J.C.Y., Aronova, S., and Powers, T. (2006). Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J. Biol. Chem.* 281, 31616–31626.

Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35–43.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powel, S., Riggins, G., et al. (2004). High frequency of mutations of the PIK3Ca gene in human cancers. *Science* 304, 554.

Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol. Cell* 25, 903–915.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14, 1296–1302.

Sarbassov, D.D., Guertin, D. a, Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.

Schalm, S.S., and Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.* 12, 632–639.

Schroder, W., Cloonan, N., Bushell, G., and Sculley, T. (2004). Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. *Gene* 339, 17–23.

Shah, O.J., Wang, Z., and Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* 14, 1650–1656.

Soliman, G.A., Acosta-Jaquez, H.A., Dunlop, E.A., Ekim, B., Maj, N.E., Tee, A.R., and Fingar, D.C. (2010). mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 285, 7866–7879.

Tatebe, H., Morigasaki, S., Murayama, S., Zeng, C.T., and Shiozaki, K. (2010). Rab-Family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Curr. Biol.* 20, 1975–1982.

Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., and Blenis, J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* 13, 1259–1268.

Thedieck, K., Polak, P., Kim, M.L., Molle, K.D., Cohen, A., Jenö, P., Arriemerlou, C., and Hall, M.N. (2007). PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One* 2.

Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284, 8023–8032.

Treins, C., Warne, P.H., Magnuson, M. a, Pende, M., and Downward, J. (2010). Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene* 29, 1003–1016.

Tzatsos, A., and Kandrór, K.V. (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 63–76.

Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., and Tamanoi, F. (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3514–3519.

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 329–341.

Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9, 316–323.

Wilkinson, M.G., Soto Pino, T., Tournier, S., Buck, V., Martin, H., Christiansen, J., Wilkinson, D.G., and Millar, J.B.A. (1999). Sin1: An evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J.* 18, 4210–4221.

Woo, S.-Y., Kim, D.-H., Jun, C.-B., Kim, Y.-M., Haar, E. Vander, Lee, S., Hegg, J.W., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 25604–25612.

Wulff, P., Vallon, V., Huang, D.Y., Völkl, H., Yu, F., Richter, K., Jansen, M., Schlünz, M., Klingel, K., Loffing, J., et al. (2002). Impaired renal Na⁺ retention in the sgk1-knockout mouse. *J. Clin. Invest.* 110, 1263–1268.

Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J. Biol. Chem.* 280, 30697–30704.

Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., and Pavletich, N.P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497, 217–223.

Yang, J., Cron, P., Good, V.M., Thompson, V., Hemmings, B. a, and Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.* 9, 940–944.

Yip, C.K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D.M., and Kang, S.A. (2010). Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. *Mol. Cell* 38, 768–774.

Yuan, Y., Pan, B., Sun, H., Chen, G., Su, B., and Huang, Y. (2015). Characterization of Sin1 isoforms reveals an mTOR-dependent and independent function of sin1 γ . *PLoS One* 10, 1–16.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757–768.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678–683.

秦野 智行 (2015). Molecular mechanisms of substrate recognition and regulation of TOR complex 2. 奈良先端科学技術大学院大学博士論文

古谷 知美 (2016). CRISPR/Cas9を用いた遺伝子破壊によるヒトTORキナーゼ制御サブユニットの機能解析. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文

村山 真一 (2012). The molecular functions of the TOR complex 2 subunit, Sin1 that plays an essential role in substrate recognition. 奈良先端科学技術大学院大学博士論文

【補遺 I : Sin1 PH ドメイン非依存的な mTORC2 の活性化】

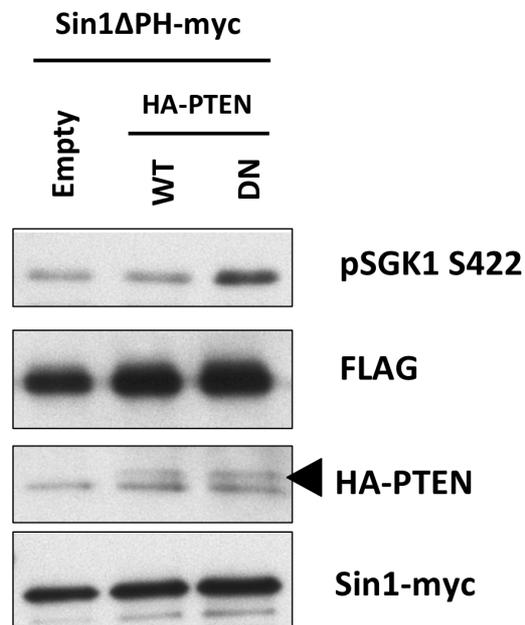


図 30. ドミナントネガティブ PTEN は Sin1 PH ドメイン非依存的に SGK1 のリン酸化を上昇させる
 Sin1 欠損細胞において Sin1 Δ PH-myc と、空ベクター (Empty)、野生型(WT)HA-PTEN、ドミナントネガティブ変異体 (C124S) を共発現させた。18 時間の血清飢餓の後、1 μ g/ml insulin を添加し、10 分後に細胞を回収し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物中における SGK1 のリン酸化および FLAG-SGK1 を抗リン酸化 SGK1 Ser422 抗体および抗 FLAG 抗体を用いた免疫ブロットによって検出した。また細胞破碎液中における HA-PTEN および、Sin1-myc をそれぞれ抗 HA 抗体、抗 myc 抗体を用いて検出した。

【補遺II：mTORC2 サブユニット PRR5 による SGK1 の安定化】

mTORC2 サブユニットとして見つかった PRR5 (Protor1 と呼ばれる) は、発現抑制による Akt のリン酸化への影響が見られず、mTORC2 活性における役割は不明だった。ところが近年、PRR5 ノックアウトマウスにおいて、Akt のリン酸化レベルは以前の報告と同様に変化が見られないものの、腎臓における SGK1 のリン酸化が低下していることが報告された (Pearce et al., 2011)。これは PRR5 が mTORC2 基質特異的に影響を及ぼすことを示唆している。そこで PRR5 の分子機能を解析するため、PRR5 の高発現が mTOR に与える影響を検証した。その結果、PRR5 は SGK1 の発現量を増加させた。SGK1 はユビキチン-プロテアソーム系によって絶えず分解されている (Brickley et al. 2002)。本研究は、PRR5 が SGK1 の分解を抑制し安定化させている可能性を見出した。

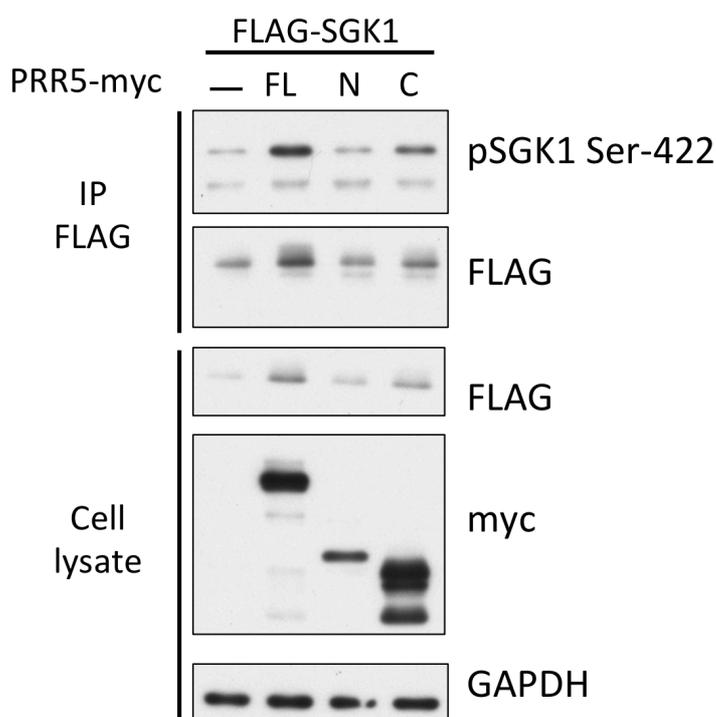


図 31. PRR5 の発現は SGK1 の発現量およびリン酸化バンドを上昇させる

MCF-7 細胞に FLAG タグを付加した SGK1 と空ベクターもしくは myc タグを付加した PRR5 の全長 (FL)、N 末端領域 (1-255 アミノ酸 : N)、C 末端領域 (226-388 アミノ酸 : C) のいずれかをコトランスフェクションした。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降によって FLAG-SGK1 を精製した。沈降物中および細胞破碎液中における SGK1 Ser-422 のリン酸化および SGK1 の発現量を免疫プロットにより解析した。その結果、PRR5 の発現により SGK1 の発現量およびリン酸化 SGK1 の増加が見られた。

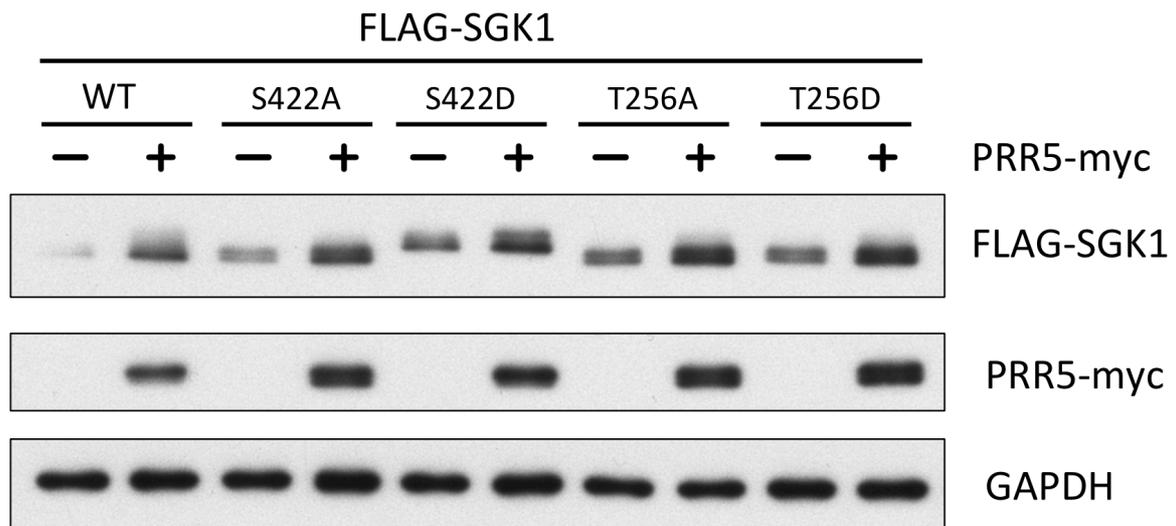


図 32. PRR5 は SGK1 のリン酸化ではなく、発現量を増加させる

FLAG-SGK1 の野生型および、活性化ループ (T256) または疎水性モチーフ (S422) をアラニンまたはアスパラギン酸に置換した変異体を空ベクター (-) または PRR5-myc (+) とコトランスフェクションし、免疫ブロットにより FLAG-SGK1 の発現を検出した。その結果、どの変異体 SGK1 も PRR5 の発現により、発現量の増加が見られた。この結果は、PRR5 は SGK1 のリン酸化ではなく発現レベルの制御に関わることを示唆している。

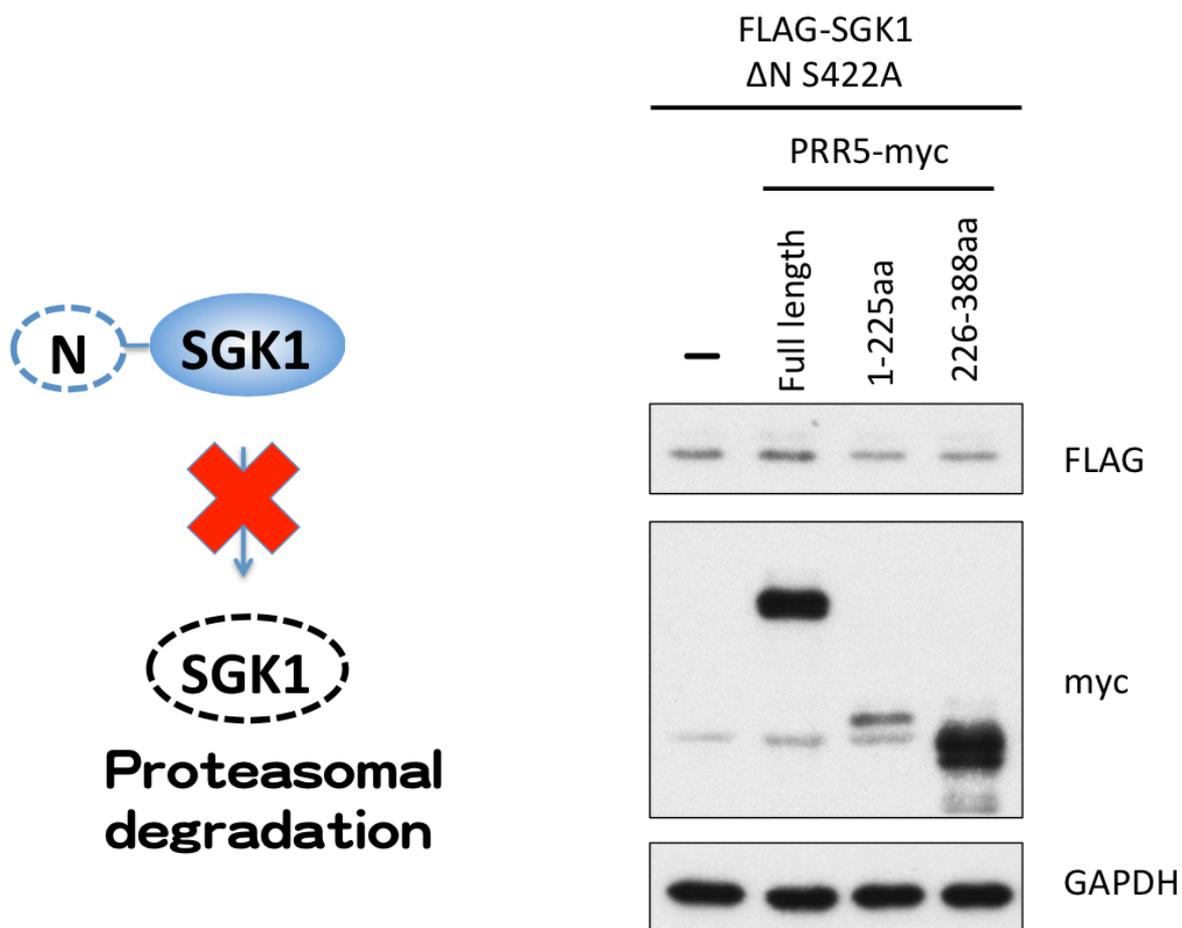


図 33. PRR5 は SGK1 のプロテアソームによる分解に関与する

SGK1 のユビキチン-プロテアソーム系による分解には、SGK1 の N 末端が関与している。N 末端を欠いた SGK1 はユビキチン化を受けなくなり、発現レベルが上昇・安定化する (Arteaga et al., 2006)。N 末端を欠いた FLAG-SGK1 と PRR5 の全長、1-255 アミノ酸、225-388 アミノ酸のいずれかをコトランスフェクションし、SGK1 の発現への影響を解析した。その結果、PRR5 の発現による SGK1 の発現増加はみられなかった。このことから、PRR5 は SGK1 のプロテアソームによる分解を抑制することで SGK1 の発現レベルを増加させていることが示唆された。

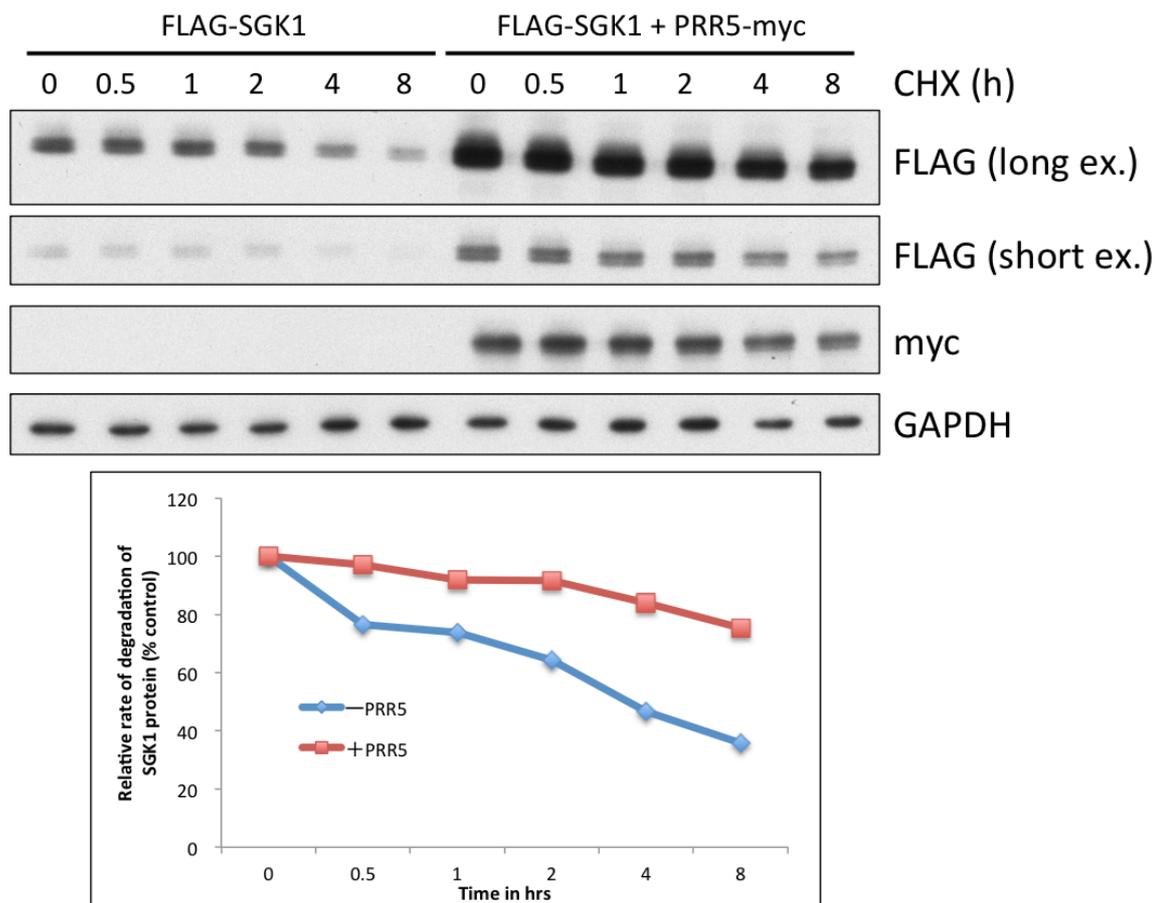


図 34. PRR5 は SGK1 の分解を抑制する

HEK293T 細胞に FLAG-SGK1 と空ベクターもしくは PRR5-myc をコトランスフェクションした。その後、100 μ g/ml のシクロヘキシミドを含む培地に交換し、図中に示した時間に細胞を回収した。各細胞からタンパク質を抽出し、FLAG-SGK1 の発現量を免疫ブロットにより解析した。その結果、PRR5 を発現した細胞において、SGK1 の分解の抑制が見られた。下のグラフは SGK1 の発現量を定量したものであり、青が FLAG-SGK1+空ベクター、赤が FLAG-SGK1+PRR5-myc を示す。各細胞の 0 時間における発現量を 100%とした際の各時間における SGK1 発現レベルの割合を示した。

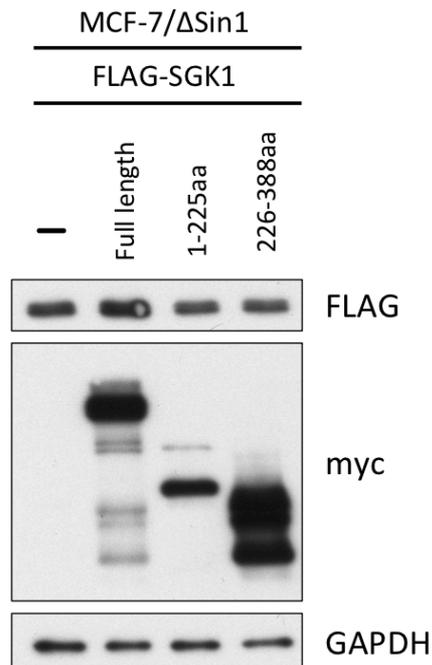


図 35. PRR5 は mTORC2 を介して SGK1 の発現レベルを制御する

Sin1 欠損 MCF-7 細胞に FLAG-SGK1 と PRR5 の全長、1-255 アミノ酸、225-388 アミノ酸のいずれかをコトランスフェクションし、SGK1 の発現への影響を解析した。その結果、PRR5 の発現による SGK1 の発現レベルの増加は見られなかった。この結果から、PRR5 は mTORC2 を介して SGK1 の発現レベルを制御していることが示唆された。

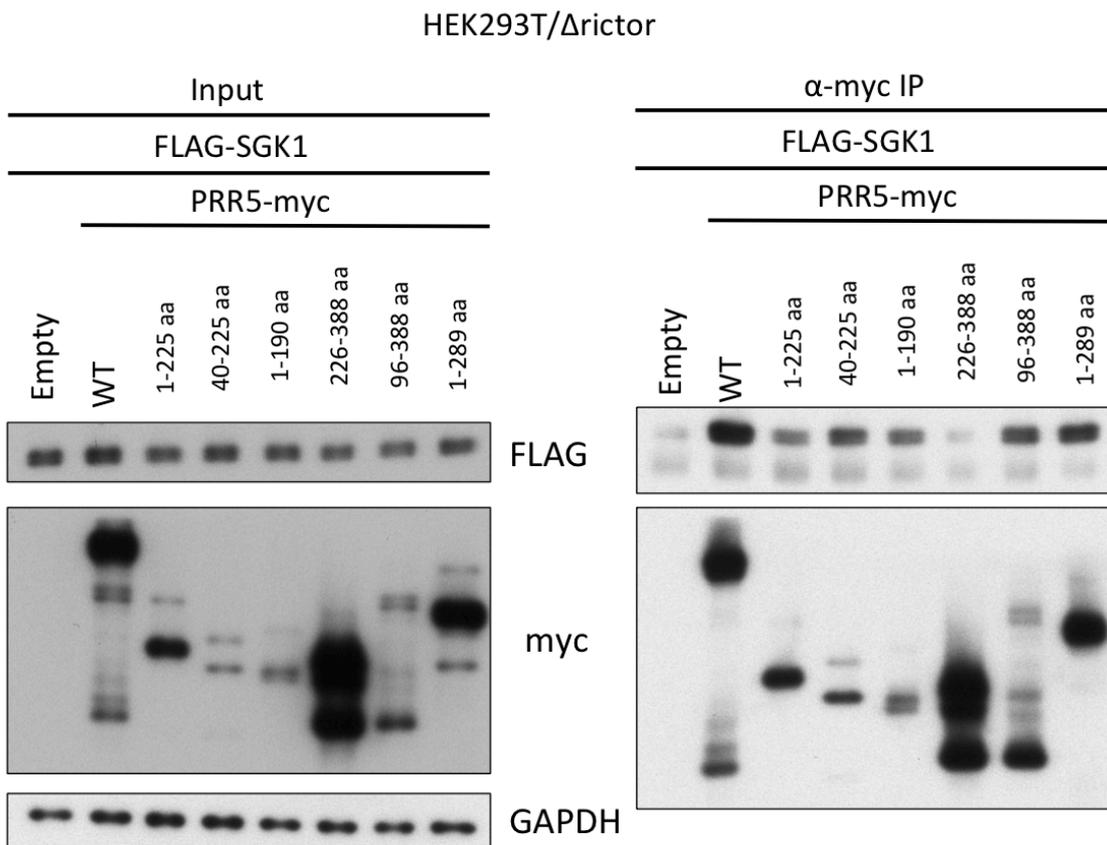


図 36. PRR5 は SGK1 と mTORC2 非依存的に結合する

Rictor 欠損 HEK293T 細胞に FLAG-SGK1 と PRR5-myc の野生型および各部分断片変異体ヲコトランスフェクションした。抗 myc 抗体による免疫沈降を行い、沈降物中における FLAG-SGK1 の量を解析した。その結果、PRR5 226-388aa を除く各部分断片で SGK1 の共沈が見られた。この結果から、SGK1 は mTORC2 非依存的に PRR5 の N 末端側領域と結合していることが示唆された。

【補遺Ⅲ：分裂酵母 TORC2 シグナル関連因子の遺伝学的スクリーニング】

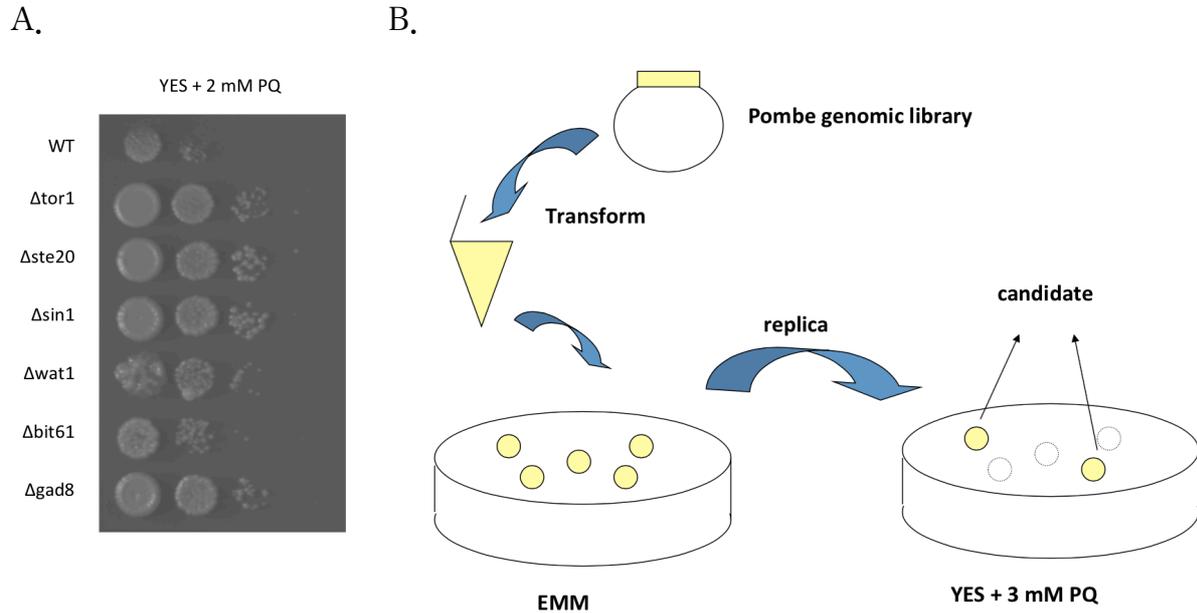
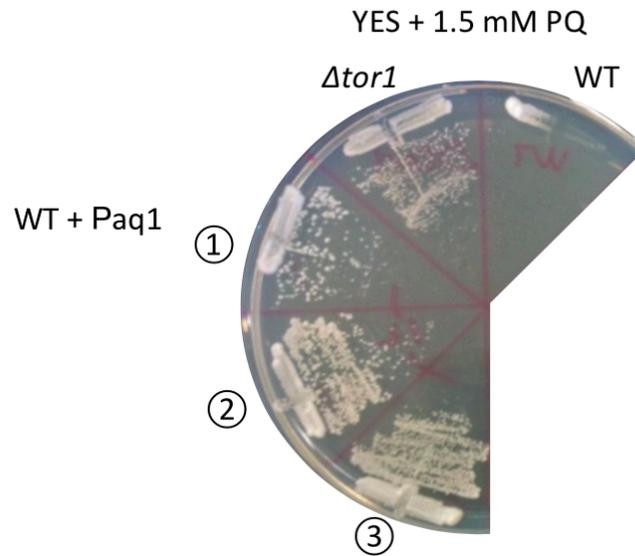


図 37. パラコートを用いた TORC2 関連因子の探索

- (A) 分裂酵母 TORC2-Gad8 欠損株は、酸化的ストレス誘導剤パラコートに耐性を示す。2 mM パラコートを添加した YES 培地に野生型および TORC2 サブユニット欠損株 ($\Delta tor1$, $\Delta ste20$, $\Delta sin1$, $\Delta wat1$, $\Delta bit61$)、分裂酵母 TORC2 基質 Gad8 欠損株をスポットし、生育を観察した。その結果、TORC2 サブユニットまたは Gad8 を欠損する分裂酵母はパラコートに耐性を示すことが明らかとなった。
- (B) パラコートを用いた TORC2 経路関連因子のスクリーニングの概要。TORC2 活性が低下するとパラコートに耐性を示すことから、過剰発現によってパラコート耐性を示す遺伝子は、TORC2 の抑制因子である可能性が期待される。また TORC2 の活性に影響がない場合も、TORC2 の下流で制御され、パラコート耐性に寄与している因子である可能性が考えられる。分裂酵母野生株にゲノムライブラリーを形質転換し、形質転換体を取得した。これらの形質転換体を野生株が生育できない濃度のパラコートを含む培地に複製 (レプリカ) し、30°C で生育させた。生育してきたコロニーを単離し、プラスミドを回収した。シーケンス解析により、得られたゲノムライブラリーに含まれる遺伝子を同定した。

A.



B.

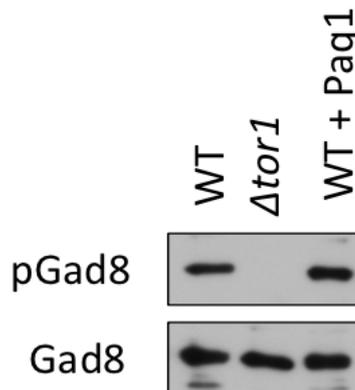
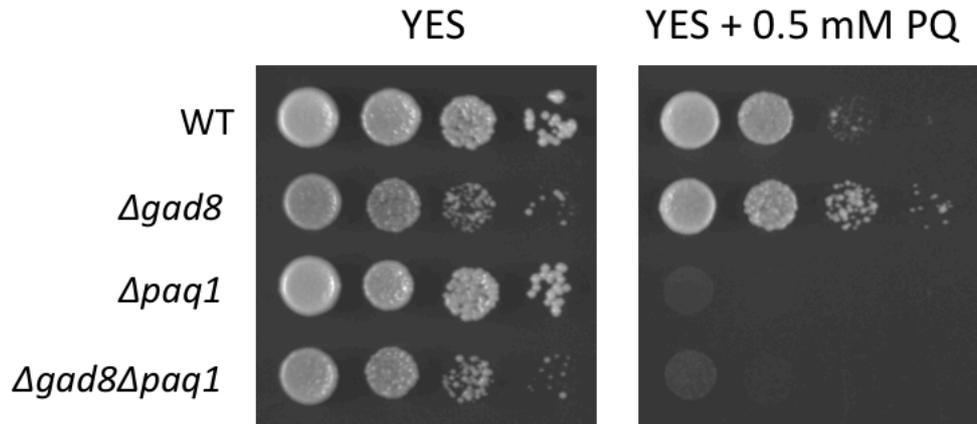


図 38. 膜輸送タンパク質 Paq1 の発現はパラコート耐性を示す。

図 37 で行ったスクリーニングの結果、SPCC18.02 遺伝子が単離された。SPCC18.02 は機能不明な遺伝子であるが、7回膜貫通型の膜輸送タンパク質をコードしていると予想される。そこで SPCC18.02 遺伝子を Paq1 (Paraquat resistant 1) と名付けさらに解析を行った。

- (A) Paq1 の発現はパラコート耐性を示す。野生株、 $\Delta tor1$ 、および野生株の Paq1 遺伝子形質転換体を、パラコートを含む培地にストリークした。その結果、コントロールの野生株の増殖が見られないのに対し、Paq1 を発現する株および $\Delta tor1$ は生育が見られた。
- (B) 野生株、 $\Delta tor1$ 株および野生株の Paq1 遺伝子形質転換体を YES 培地で液体培養し、対数増殖期の細胞を回収した。各細胞からタンパク質を抽出し、細胞破碎液中における Gad8 のリン酸化レベルを免疫ブロットによって解析し、各細胞における TORC2 活性を評価した。その結果、Paq1 の発現は TORC2 活性に影響しないことが明らかとなった。

A.



B.

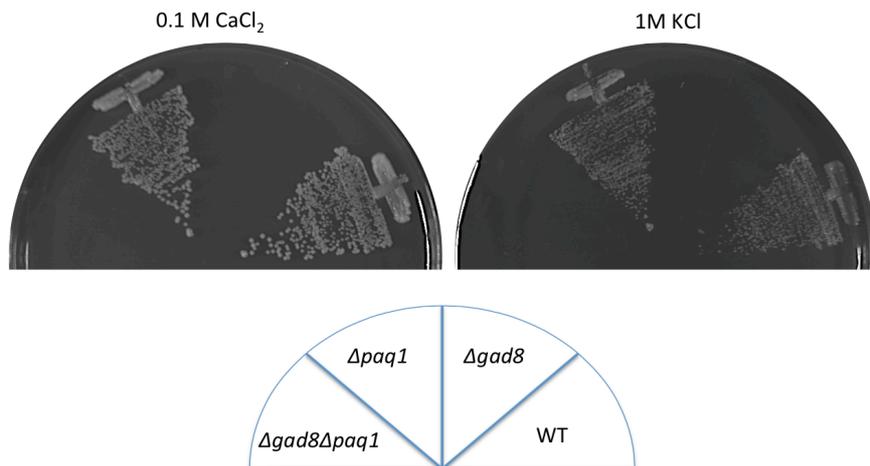


図 39. Paq1 欠損株はパラコート感受性を示す

- (A) 野生株、Gad8 欠損株、Paq1 欠損株、および Gad8、Paq1 二重欠損株を 0.5 mM パラコートを含む YES 培地にスポットし、生育を観察した。Gad8 欠損株が野生型よりもパラコートに対して耐性を示したのに対して、Paq1 欠損株、および Gad8、Paq1 二重欠損株は感受性を示した。また Paq1 欠損株と Gad8、Paq1 二重欠損株の感受性は同程度であったことから、Paq1 は Gad8 の下流でパラコート耐性に寄与している可能性が示唆された。
- (B) Paq1 は Gad8 欠損によるカルシウムおよび高浸透圧ストレス感受性には関与しない。野生株、Gad8 欠損株、Paq1 欠損株、および Gad8、Paq1 二重欠損株をカルシウムストレスプレートおよび高浸透圧ストレスプレート (1 M KCl) にストリークし、生育を観察した。その結果、Gad8 欠損株と Gad8、Paq1 二重欠損株は感受性を示した。この結果から、Paq1 はパラコート耐性に特異的に関与していることが示唆された。

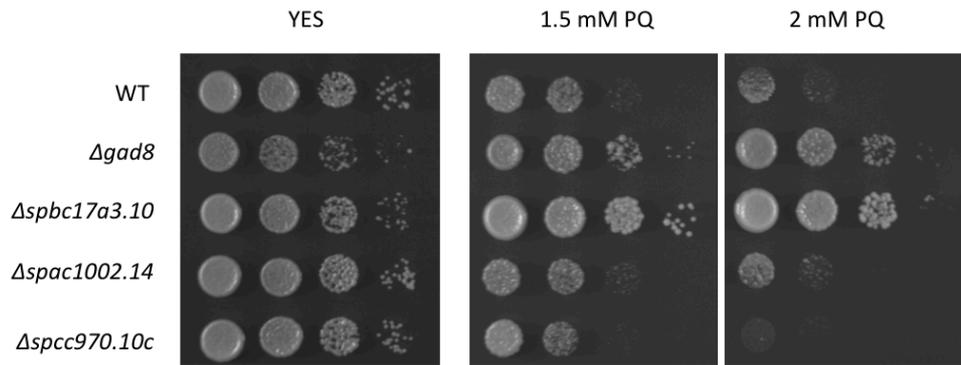
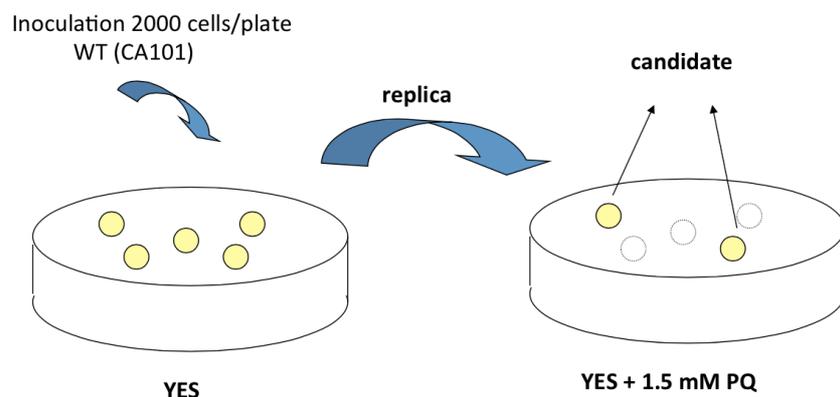


図 40. SPBC17a3.10 欠損株はパラコート耐性を示す

Paq1 が膜輸送タンパク質であり、液胞に局在する（未発表）。Gad8 のヒトホモログである SGK1 はユビキチンリガーゼをリン酸化し、制御することでナトリウムイオン輸送隊の制御に関わっている（Debonneville et al., 2001; Snyder et al., 2002）。そこで分裂酵母遺伝子欠損株ライブラリー（Bioneer）の中から、欠損が致死でないユビキチンリガーゼをコードする遺伝子を欠損する株を選び、野生株、 $\Delta gad8$ 株と共にパラコート培地にスポットした。その結果、 $\Delta spbc17a3.10$ 株がパラコート耐性を示すことが明らかとなった。今後、TORC2-Gad8 経路と SPBC17a3.10 および Paq1 の関連を解析することで、TORC2 欠損によるパラコート耐性のメカニズムが明らかになると共に、TORC2 によって制御される新たな経路の解明に結びつくのではないかと期待している。

A.



B.



図 41. パラコート耐性変異株の取得による TORC2 制御因子のスクリーニング

- A. スクリーニングの概要を図で示した。パラコートを含まない YES 培地に野生株を 1 プレートあたり 2000 個播種し、野生株が生育できない濃度のパラコートを含む YES 培地にレプリカした。その後、突然変異によってパラコートプレート上で生育可能となった変異体を単離した。
- B. 単離した変異体を YES 培地で液体培養し、対数増殖期の細胞を回収した。回収した細胞からタンパク質を抽出し、Gad8 のリン酸化レベルを免疫ブロットによって解析した。その結果、図中に示した 7 つの変異体のうち、3 つで Gad8 のリン酸化レベルの低下が見られた。この細胞では TORC2 サブユニット、もしくは TORC2 活性化因子に変異が入っていると予想される。この他にもパラコート耐性変異体を単離し、計 32 株のパラコート耐性変異体のうち 14 株で Gad8 のリン酸化の低下もしくは消失が見られた。今後これらの変異体における変異遺伝子を同定することで新たな TORC2 の活性化因子を同定することができると期待している。

【補遺：参考文献】

Arteaga, M.F., Wang, L., Ravid, T., Hochstrasser, M., and Canessa, C.M. (2006). An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated ubiquitin-conjugation machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11178–11183.

Brickley, D.R., Mikosz, C.A., Hagan, C.R., and Conzen, S.D. (2002). Ubiquitin modification of serum and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK-1). *J. Biol. Chem.* *277*, 43064–43070.

Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Münster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J., et al. (2001). Phosphorylation of Ned4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *EMBO J.* *20*, 7052–7059.

Pearce, L.R., Sommer, E.M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., and Alessi, D.R. (2011). Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem. J.* *436*, 169–179.

Snyder, P.M., Olson, D.R., and Thomas, B.C. (2002). Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J. Biol. Chem.* *277*, 5–8.