

博士論文番号：1481019

進化的に保存された GATOR1 複合体による TOR シグナル経路制御の
メカニズムと細胞機能の遺伝学的解析

松田 崇斗

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 15 日 提出

目次

1 序論.....	5
1-1. Target of rapamycin (TOR) の発見	5
1-2. TOR は細胞内で 2 種類の複合体 TOR complex1 (TORC1), TORC2 を形成する.....	5
1-3. TOR 複合体による基質認識機構	6
1-4. TORC2 シグナル伝達機構	7
1-5. TORC1 シグナル伝達機構.....	8
1-6. インスリンによる TORC1 活性化機構 (Fig .2).....	8
1-7. アミノ酸による哺乳類細胞 TORC1 シグナル伝達経路	10
1-8. 出芽酵母 TORC1 のアミノ酸応答機構.....	12
1-9. 分裂酵母 TOR シグナル伝達経路.....	13
1-10. 本研究の目的.....	13
2. 材料と方法	15
2-1. 試薬.....	15
2-2. 抗生物質.....	15
2-3. 培地およびサプリメント	15
2-3-1. 大腸菌.....	15
2-3-2. 分裂酵母.....	15
2-4. 菌株	17
2-4-1. 大腸菌.....	17
2-4-2. 分裂酵母.....	17
2-5. PCR 反応.....	20
2-6. プラスミドおよびゲノム抽出.....	20
2-6-1. 大腸菌からのプラスミド抽出および精製.....	21
2-6-2. 酵母からのゲノム抽出.....	21

2-7. 形質転換.....	21
2-7-1. コンピテントセル (DH5 α) の作製.....	21
2-7-2. 大腸菌の形質転換.....	22
2-7-3. 分裂酵母の形質転換.....	22
2-8. 分裂酵母株の作成および確認.....	22
2-8-1. 分裂酵母遺伝子の 3' 末端へのタグ付け (Figure .5).....	22
2-8-2. 部位変異株 (<i>iml1R854A</i>) の作製 (Figure .6)	24
2-8-3. シークエンス解析.....	25
2-8-4. 四分子解析.....	26
2-8-5. 窒素源飢餓.....	26
2-8-6. スポットテスト.....	26
2-9. タンパク質の調製および検出.....	26
2-9-1. TCA 沈殿によるタンパク質抽出 (変性条件でのタンパク質抽出方法)	26
2-9-2. 免疫沈降用タンパク質抽出 (非変性条件タンパク質抽出法).....	27
2-9-3. タンパク質濃度測定.....	28
2-9-4. Western blotting	28
2-10. 蛍光顕微鏡	29
2-10-1. 観察用試料の調製.....	29
2-10-2. SynaptoRed™ C2 による液胞膜の染色.....	29
3. 結果.....	30
3-1. GATOR1 複合体は分裂酵母に高度に保存されている.....	30
3-2. <i>Iml1</i> と <i>Npr3</i> は <i>Npr2</i> を介して相互作用することで GATOR1 複合体を形成する.....	32
3-3. GATOR1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子である.....	35
3-4. <i>Gtr1</i> は TORC1 の活性を抑制する負の制御因子である.....	38
3-5. GATOR1 は <i>Gtr1</i> を介して TORC1 活性を抑制する.....	41

3-6. GATOR1 は Iml1 の GAP 活性依存的に TORC1 活性を抑制する.....	43
3-7. GATOR1-Gtr1 変異による TORC1 の活性化は、生育阻害を引き起こす.....	45
3-8. GATOR1-Gtr1 の機能欠失株はアミノ酸を窒素源として利用できない.....	46
3-9. GATOR1-Gtr1 は塩基性アミノ酸トランスポーターCat1 の細胞膜への局在を.....	47
促進する.....	47
3-10. GATOR1-Gtr1 は、TORC1 の抑制によるアミノ酸の取り込み促進および細胞の生育維持に必須である.....	50
3-11. 窒素源に応じた TORC1 活性の制御は局在以外の機構によって担われている.....	54
3-12. GATOR-Gtr1 経路は液胞の形態を制御する.....	56
4. 考察.....	58
4-1. 本研究の結論.....	58
4-2. GATOR1 による TORC1 抑制機構.....	60
4-3. Gtr1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子である.....	61
4-4. Gtr1 の GDP 結合を保つことが、TORC1 活性抑制および生育の維持に重要である.....	62
4-5. GATOR1-Gtr1 経路はアミノ酸トランスポーターの局在を制御することで、アミノ酸の取り込みを促進し、細胞の生育を促進する。.....	63
4-6. GATOR1-Gtr1 経路は液胞の形態を制御する.....	64
謝辞.....	65
参考文献.....	67

1 序論

生物の生存戦略において、自身をとりまく環境の変化に適応していく能力は非常に重要である。例えば、栄養源が豊富な環境下では増殖を促進し、栄養枯渇の際には直ちにこれを抑制する必要がある。そのために、細胞は栄養源やその他の環境シグナルを感知し、それに応じて遺伝子の発現パターンをダイナミックに調節する。細胞外の環境情報を分子間あるいはタンパク質間の相互作用によって変換・伝達して細胞核に伝える細胞内シグナル伝達経路は、生物種を越えて広く保存されているものが多く見られる。

1-1. Target of rapamycin (TOR) の発見

Target of rapamycin (TOR) は、免疫抑制剤であるラパマイシンの細胞内標的タンパク質として同定された、PIKKs (PI3-kinase related kinase) ファミリーに属するセリン/スレオニン特異的タンパク質キナーゼである。ラパマイシンは、抗真菌作用を示すため、1991年に Hall らは、ラパマイシン耐性を示す変異株を出芽酵母から単離することで、その標的分子の同定を試みた (Heitman et al., 1991)。その結果、単離された変異の多くは、FKBP12 (12 KDa FK506 binding protein) タンパク質をコードする FRP1 遺伝子の機能欠失型変異であった。しかし、FRP1 の遺伝子破壊は酵母の生育に影響を与えなかったことから、FRP1 は標的分子の候補から除外された。残りの候補は *tor1* あるいは *tor2* そのものに機能獲得型変異を持っており、この 2 つの遺伝子が、ラパマイシンの標的分子であることが明らかになった。1994年には、哺乳類細胞において、生化学的手法によりラパマイシン-FKBP12 に結合するタンパク質として RAFT1 が同定され、シーケンス解析の結果、RAFT1 は出芽酵母 *tor1* および *tor2* の相同タンパク質であることが明らかになり、mTOR (mammalia TOR : 哺乳類の TOR) と名付けられた (Sabatini et al., 1994; Chiu et al., 1994)。TOR は酵母からヒトに至る真核生物において、高度に保存されていることが明らかとなり、多くの生物種で TOR の研究が盛んに行われた。TOR は栄養、増殖シグナル、ストレスなどの刺激に応じて細胞の成長、増殖、生存、老化、形態、移動などをコントロールする細胞内情報伝達ネットワークにおける中心的なシグナル分子であることが明らかになってきた (Wullschleger et al., 2006)。

1-2. TOR は細胞内で 2 種類の複合体 TOR complex1 (TORC1), TORC2 を形成する

2002年には、TOR が細胞内で複数の制御サブユニットと共に、2 種類の複合体 TOR complex (TORC) 1、TORC2 を形成し、それぞれが異なる AGC ファミリーキナーゼを

制御することが、出芽酵母と哺乳類細胞においてそれぞれ報告された (Loewith et al., 2002; Hara et al., 2002)。mTORC1 は触媒サブユニットである mTOR に加えて、raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8, PRAS40 (protein-rich Akt substrate 40kDa), DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) をサブユニットとして構成されている。一方、mTORC2 は mTOR に加えて、riCTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1, mLst8, protor1/2 (protein observed with rictor1 and 2), DEPTOR で構成される。これらの TOR 複合体構成因子は、分裂酵母からヒトに至る真核生物間で高度に保存されている (表. 1) ラパマイシンは FKBP12 (12 KDa FK506 binding protein) と結合し、このラパマイシン-FKBP12 複合体が、TOR に結合することで TOR のキナーゼ活性を阻害する。興味深いことに、ラパマイシン-FKBP12 は TORC1 のみと結合し、TORC2 はラパマイシンに対して非感受性である。

表 1. TOR 複合体構成因子は真核生物間で高度に保存されている

	<i>S. pombe</i>	Mammals
TORC1	Tor2	mTOR
	Mip1	Raptor
	Wat1/Pop3	mLST8
	Tco89	-
	Toc1	-
	-	PRAS40
TORC2	Tor1	mTOR
	Sin1	SIN1
	Ste20	Rictor
	Wat1/Pop3	mLST8
	Bit61	PRR5

1-3. TOR 複合体による基質認識機構

TORC1 と TORC2 は、同一の TOR キナーゼ触媒サブユニットを含んでいるにもかかわらず、TORC2 は基質である Akt, SGK を選択的にリン酸化し、TORC1 の基質である S6K をリン酸化することはない。TORC2 同様、TORC1 は S6K を選択的にリン酸化するが、TORC2 基質のリン酸化には影響を与えない。つまり、TOR 複合体は、リン酸化の標的となるタンパク質を認識する機構を有していることが考えられた。哺乳類 mTORC1 についてはこれまでに、制御サブユニットである Raptor が、mTORC1 の基質である S6K1 や 4E-BP1 と直接結合することが報告されている (Hara et al., 2002;

Kim *et al.*, 2002; Schalm *et al.*, 2002; 2003)。S6K1 や 4E-BP1 には、TOS (TOR Signaling) モチーフと呼ばれる 5 アミノ酸モチーフ「FDIDL」、「FEMDI」が存在し、Raptor が TOS モチーフを認識し、直接結合することで、S6K1 および 4E-BP1 が mTORC1 によりリン酸化される (Schalm *et al.*, 2002; 2003)。一方、TORC2 の基質認識サブユニットとして Sin1 が知られている。Sin1 は中央部に進化的に保存された、約 120 アミノ酸残基からなる領域 CRIM (Conserved Region In the Middle) を保持している。この CRIM ドメインが基質認識機構に関わる領域であること、また、その中でも酸性アミノ酸が集まる酸性領域が、基質認識に重要な領域であることが、本研究室の解析から示されている (Tatebe *et al.*, 投稿中)。

1-4. TORC2 シグナル伝達機構

mTORC2 は成長因子やストレス刺激などのインプットにより活性化し、癌原遺伝子産物である Akt (Sarbasov *et al.*, 2005; Guertin *et al.*, 2006) と Akt 同様に AGC ファミリーキナーゼである SGK や PKC (Sarbasov *et al.*, 2005; Guertin *et al.*, 2006) をリン酸化することで、細胞増殖や細胞骨格形成、Na⁺イオンチャネルを制御している (won *et al.*, 2011)。また、ガン抑制因子である PTEN をノックアウトしたマウスにおける TORC2 の機能欠失が、ガンの進展を遅らせることが報告されており (Guertin *et al.*, 2009)、TORC2 シグナル伝達経路の解明は、有効なガン治療薬の開発に繋がるのが期待されている。しかし、様々な生物種における研究結果から、TOR シグナル経路に関する知見が蓄積しつつあるが、TORC2 の理解は TORC1 に比べて遅れているのが現状である。これは、まず、多くの生物種で TORC1 と TORC2 はともに生存に不可欠で遺伝子ノックアウトによる解析が困難であるものの、TORC1 は、特異的な阻害剤であるラパマイシンを用いた遺伝学的手法による解析が可能であったことが挙げられる。これに対し、TORC2 のみを特異的に阻害する化合物は、未だに同定されていない。また、TORC1 研究が大きく進展した理由としては、出芽酵母 TORC1 が、触媒サブユニットとして Tor1 と Tor2 の 2 種類持ち、そのうちの 1 種類と、TORC1 経路の活性制御因子の多くが、生存に必須でないことため、遺伝学的解析が比較的容易であったことが挙げられる。しかし、当研究室では、分裂酵母 TORC2 シグナル伝達経路の解明につながる糸口をつかんでいる。2010 年には、低分子量 G タンパク質である Ryh1 (哺乳類細胞 Rab6 に相同) が TORC2 の活性化因子であることを世界に先駆けて報告した (Tatebe *et al.*, 2010)。また 2015 年には、グルコースに応答した Ryh1 が活性化型 (GTP 結合) となることで、TORC2 を活性化することを、立て続けに報告しており (Hatano *et al.*, 2015)、今後、TORC2 シグナル伝達経路の解明が飛躍的に進むことが期待される。

1-5. TORC1 シグナル伝達機構

TORC1 はアミノ酸などの栄養源や増殖因子、インスリンに応答して活性化する (Laplante and Sabatini, 2012)。活性化した TORC1 は、タンパク質翻訳を抑制する 4E-BP をリン酸化してその機能を抑制する (Brown et al., 1995)。また、リボソームの生合成を促進することが知られる S6K をリン酸化して活性化する (Brunn et al., 1997)。これらの作用を介して TORC1 は、細胞内のタンパク質合成を促進することで、細胞の増殖や物質代謝を制御している。さらに、TORC1 は Atg13 をリン酸化することで、細胞内小器官の消化・再利用に重要なオートファジーを抑制する作用 (Kamada et al., 2000; Kamada et al., 2010) や、低酸素誘導因子-1 (HIF-1) を活性化して解糖系を亢進する作用、脂質合成を亢進する作用などを持つ (Cam et al., 2010)。このように、TORC1 は栄養素の供給状況、増殖刺激や細胞内のエネルギーの状況などに対するセンサーとして作用し、細胞内の物質代謝やエネルギー産生を調節する中心的な役割を担っている (Fig. 1)。それゆえ、TORC1 経路の破綻は、生物にとって重篤な影響を及ぼすことが知られている。ヒトでは TORC1 の制御異常が、ガンや神経変性疾患といった疾患の原因となることから (Cam et al., 2011)、TORC1 がこれらの疾患の予防や治療の有効な標的となり得ることが示されている。実際、TORC1 特異的な阻害剤であるラパマイシンは、ガンの進行を遅らせることが報告されており (Guba et al., 2002)、TORC1 シグナル伝達経路のより詳細な理解が望まれている。

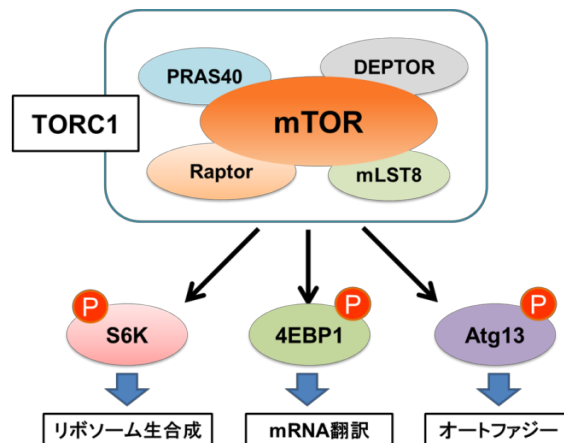


Figure .1 TORC1 シグナル伝達経路は多くの細胞内機能を制御する

アミノ酸、成長因子に応じて活性化した TORC1 は、種々の標的基質のリン酸化を介して主要な細胞機能を制御している。

1-6. インスリンによる TORC1 活性化機構 (Fig. 2)

インスリンによる mTORC1 活性化機構については、詳細な分子機構が明らかになっている。この経路の主要な因子は、TSC1-Tsc2 複合体と Rheb が知られている。Rheb

は、Ras タンパク質と 30-40%の相同性を持つ、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質で、痙攣後や LTP (Long term potentiation) 刺激後に、ラット海馬で発現が増加する因子として 1994 年に発見された (Yamagata et al., 1994)。Rheb は mTORC1 の活性化因子であり、活性化型 (GTP 結合型) の Rheb が、mTOR のキナーゼドメインに直接結合することで、mTOR のキナーゼ活性を増加させる (Saucedo et al., 2003; Long et al., 2005)。他の低分子量 G タンパク質同様、Rheb は GTP 結合時に活性型、GDP 結合時に不活性型となる (Im et al., 2002)。低分子量 G タンパク質は、一般的に、結合した GDP を GTP に交換する反応を促進する GEF (Guanine nucleotide exchange factor)、および内在性の GTPase 活性を促進させ、GTP から GDP への加水分解を促進する GAP (GTPase-activating protein) によって活性が制御されている。Rheb の GAP としては、結節硬化症の原因遺伝子産物である Tsc1 (Tuberous sclerosis complex 1) が知られており、Tsc2 (Tuberous sclerosis complex 2) と複合体を形成し、Rheb に結合する GTP の GDP への加水分解を促進することで、TORC1 活性を抑制する (Inoki et al., 2003)。Tsc1-Tsc2 複合体は、TORC1 上流において、様々なシグナルを統合する中枢的役割を果たし、TORC2 制御下にある Akt など複数のタンパク質キナーゼによるリン酸化制御を受けている (Inoki et al., 2002) (Fig. 2)。栄養豊富な環境下では、Tsc1-Tsc2 複合体の GAP 活性が抑制され、その結果、活性の上昇した Rheb が TORC1 を活性化する。一方、栄養枯渇時には活性化された Tsc1-Tsc2 複合体が、TORC1 活性を抑制する。かつて、Rheb に結合するヌクレオチドを GTP 型へと交換する GEF の候補として、TCTP がショウジョウバエにおいて報告されたが (Hsu et al., 2007)、哺乳類細胞では、TCTP が *in vivo* および *in vitro* の生化学的解析において、Rheb の GEF 活性及び TORC1 活性に影響を与えないことが報告される (Wang et al., 2008) など、否定的な論文もあり、Rheb の GEF は未だ明らかではない。

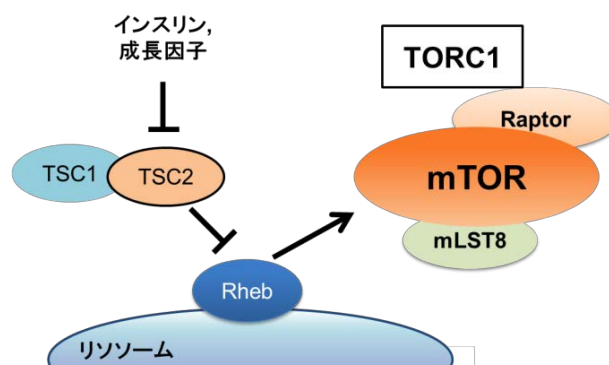


Figure. 2 インスリンによる TORC1 活性制御機構

インスリンに応答して活性化した Akt が Tsc2 をリン酸化し、TSC2 の GAP 活性を抑制することで、Rheb の GTP 型への交換が促進され、TORC1 が活性化する。

1-7. アミノ酸による哺乳類細胞 TORC1 シグナル伝達経路

TORC1 の活性が、どのような分子機構でアミノ酸によって制御されているかは、長きに渡り不明であった。しかし、Sabatini のグループが Raptor に結合するタンパク質として、低分子量 GTPase である Rag GTPase を発見したことをきっかけとして、アミノ酸による TORC1 活性化機構の理解は、大きく進展した (Sancak et al., 2008; Kim et al., 2008)。Rag GTPase は、RagA または RagB と、RagC または RagD がヘテロ 2 量体を形成しており、アミノ酸に応答して、GTP 結合型になった Rag GTPase は、mTORC1 と相互作用することで、mTORC1 をリソソーム膜上へとリクルートする。そして、リソソーム膜上へとリクルートされた TORC1 は、リソソーム膜上に恒常的に局在している Rheb によって活性化されることを報告した (Fig. 3)。この発見に留まらず、Sabatini らは、質量分析法を用いた解析から Rag GTPase に相互作用するタンパク質として Ragulator と呼ばれるタンパク質複合体を、同定した (Sancak et al., 2010)。Ragulator 複合体は、p18, p14, MP1, HBXIP, C7orf59 の 5 つの因子で構成されており、リソソーム膜上に局在する。Rag 二量体は、リソソーム膜上にアンカーされている Ragulator 複合体を介して、リソソーム膜上に恒常的に局在する。アミノ酸依存的な mTORC1 活性は、Rag 二量体のヌクレオチドの結合状態に依存するため、Rag GTPase の GAP、および GEF の同定が積極的に行われた。そして、2012 年に、Rag GTPase がリソソーム膜上に局在するための足場タンパク質である Ragulator 自身が、アミノ酸依存的に、RagA の GTP 結合型への交換を促進する GEF として働くことが明らかになった (Bar-Peled et al., 2012)。

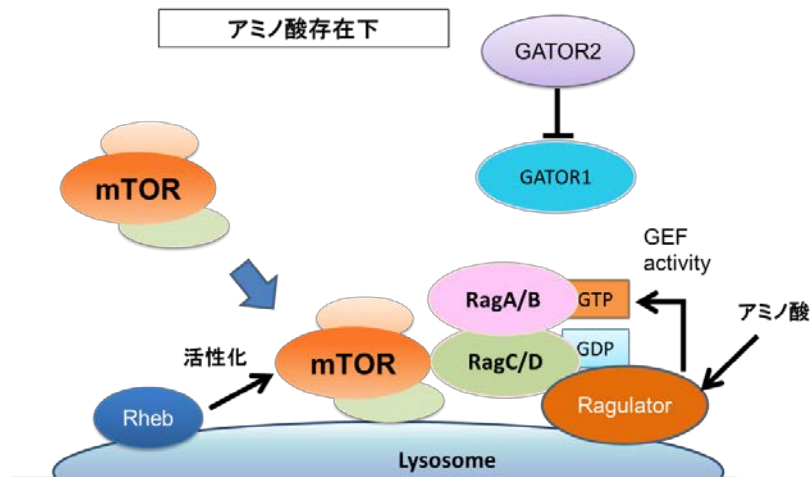


Figure .3 アミノ酸による TORC1 活性化機構モデル

アミノ酸に応答して、RagA/RagB に結合するヌクレオチドが GTP へと交換される。GTP 結合型の RagA/RagB は、mTORC1 と相互作用することで、mTORC1 をリソソーム膜上へとリクルートする。リソソーム膜上へとリクルートされた mTORC1 は、リソソーム膜上に局在する GTP 結合型 Rheb によって活性化される。

2013年には、GATOR1と呼ばれるタンパク質複合体が、RagA/RagBのGAPであることが報告された (Bar-peled et al., 2013) ことで、アミノ酸飢餓に対するmTORC1の不活性化機構の理解が深まった。GATOR1複合体はDEPDC5, Npr12, Npr13の3つの因子によって構成されており、DEPDC5がGAPドメインを持つことから、GATOR1のGAP活性はDEPDC5が担っていると考えられている。アミノ酸飢餓条件では、GATOR1複合体がRagA/RagBに結合したGTPのGDPへの加水分解を促進することで、mTORC1がリソソーム膜上から細胞質へとリリースされ、Rhebによる活性化を受けることができず、mTORC1は不活性化される (Fig. 4)。また、アミノ酸存在下では、GATOR2と呼ばれるタンパク質複合体 (WDR59, WDR24, SEH1L, MIOS, SEC13の5つの因子から構成される) が、GATOR1の活性を阻害し、RagulatorによるRagA/RagBのGTPへの交換が促進されることで、TORC1が活性化することが報告されている。

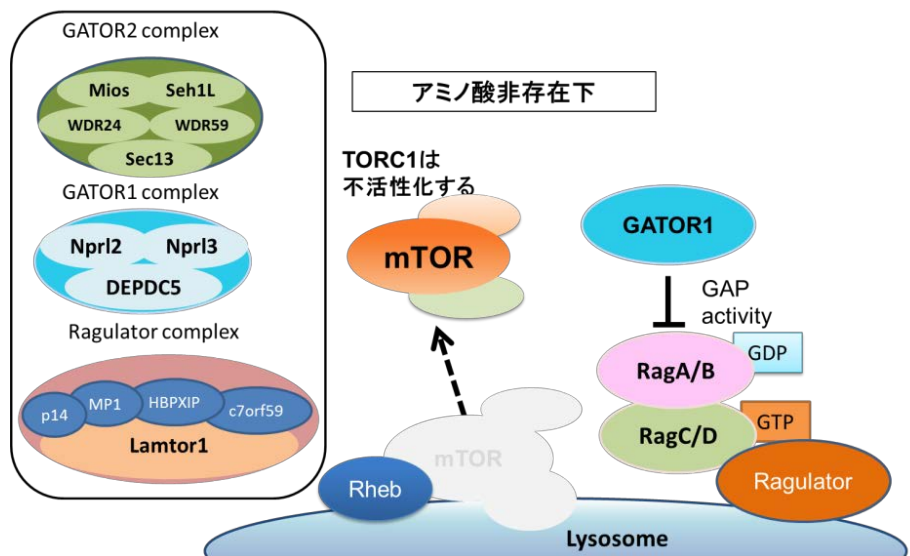


Figure .4 アミノ酸飢餓によるTORC1活性抑制機構

アミノ酸飢餓にตอบสนองして、GATOR1がRagA/RagBに結合したGTPのGDPへの加水分解を促進することで、TORC1がリソソーム膜上からリリースされ、Rhebによる活性化を受けられず、TORC1は不活性化される。図中左の枠内には、GATOR1複合体、GATOR2複合体、Ragulator複合体のそれぞれの構成因子を示す。

これらのTORC1制御機構は、Sabatiniらの一連の論文で報告されたものであり、多くのTOR研究者は、Sabatiniらが提唱するモデルに当てはめる形で解釈してきた。しかしながら、近年、RagA/RagBのヌクレオチド結合状態が、アミノ酸刺激にตอบสนองしないこと (Oshiro et al., 2014) や、RagAのノックアウトマウスではTORC1が活性化する (Efeyan et al., 2014) など、Sabatiniらが築いてきたモデルに矛盾するデータが複数報告されており、Rag GTPaseによるTORC1制御機構は不明な点が多い。

1-8. 出芽酵母 TORC1 のアミノ酸応答機構

出芽酵母においても、Rag GTPase は Gtr1-Gtr2 ヘテロ 2 量体として保存されている (Binda et al., 2009)。Gtr1-Gtr2 は哺乳類細胞 Ragulator 複合体に相同である、Ego1, Ego2, Ego3 と EGO 複合体を形成し (表 .2)、液胞膜上 (哺乳類細胞ではリソソームに相当する) に局在している (Dubouloz et al., 2005; Gao and Kaiser, 2006)。活性型 Gtr1-Gtr2 が TORC1 と結合することで、TORC1 を活性化する (Sekiguchi et al., 2014)。一方、アミノ酸非存在下では、哺乳類細胞 GATOR1 複合体に相同な、SEACIT と呼ばれる Sea1, Npr2 および Npr3 で構成されている複合体 (表 .2) が、Gtr1 に結合する GTP の GDP への加水分解を促進する。Gtr1 が GDP 結合型になることで、TORC1 が液胞膜から細胞質にリリースされ、TORC1 が不活性化される (Panchaud et al., 2013)。なお、GAP ドメインを持つ、Sea1 が Gtr1 の GAP として機能することが明らかになっている (Panchaud et al., 2013a)。また、アミノ酸存在条件では、哺乳類細胞 GATOR2 と相同なタンパク質である、SEACAT (Sea2, Sea3, Sea4, Seh1, Sec13 で構成される) が SEACIT の活性を抑制し、Gtr1 に結合するヌクレオチドを GTP に交換することで、TORC1 を活性化する (Algret et al., 2014)。つまり、TORC1 は哺乳類細胞同様に、Gtr1 のヌクレオチドの結合状態依存的に液胞膜上に局在している。しかし、出芽酵母 TORC1 の細胞内局在は、アミノ酸の有無に影響を受けず、常に液胞膜上に局在することから (Binda et al. 2009)、Gtr1 のヌクレオチドの結合状態はアミノ酸に応答しない可能性がある。また、分裂酵母は TORC1 の負の制御因子である Tsc1/Tsc2 を持たず、Rheb は TORC1 活性を制御しない (Urano et al., 2000) など、哺乳類細胞において報告されている TORC1 上流経路と異なる点が存在する。また、出芽酵母では、Gtr1 の GEF として Vam6 が同定されているが (Binda et al., 2009)、哺乳類やショウジョウバエにおいて Vam6 は TORC1 の活性化に必要ではないことが示されており (Bar-Peled et al., 2012)、その機能は明らかではない。

表 2. 哺乳類 GATOR 複合体と出芽酵母 SEA 複合体の構成因子

哺乳類	出芽酵母
GATOR1複合体	SEACIT複合体
DEPDC5	Sea1
Npr12	Npr2
Npr13	Npr3
GATOR2複合体	SEACAT複合体
Wdr24	Sea2
Wdr59	Sea3
Mios	Sea4
Seh1L	Seh1
Sec13	Sec13

1-9. 分裂酵母 TOR シグナル伝達経路

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) には、mTOR にあたるセリン/スレオニンキナーゼとして Tor1 と Tor2 が保存されている (Kawai et al., 2001; Weisman and Choder)。Tor1 と Tor2 は、それぞれ TORC2 と TORC1 の触媒サブユニットとして機能している (Matsuo et al., 2007; Otsubo et al., 2008)。分裂酵母 TORC1 には制御サブユニットとして Mip1 と Wat1 が含まれており、それぞれヒト Raptor および mLST8 に相同である。また、TORC1 シグナル伝達経路に関わる RagA/RagB-RagC/RagD、Rheb、Tsc1/Tsc2 は、Gtr1-Gtr2, Rhb1, Tsc1/Tsc2 (Uritani et al., 2006; Urano et al., 2007) として高度に保存されている。加えて、分裂酵母における TORC1 活性は、TORC1 依存的なリン酸化によって活性化される哺乳類細胞 S6 キナーゼに相同な、Psk1 キナーゼのリン酸化を測定することで、容易に定量できる (Nakashima et al., 2009, 2012)。出芽酵母は、遺伝解析が使えるうえに、過去の蓄積も大きいですが、ヒトに存在する Tsc1/Tsc2 を持たず、Rheb は TORC1 活性を制御しない。つまり、TORC1 の上流は出芽酵母とヒトとは仕組みが異なっており、その点ではヒトのモデルとして適当でない。一方、TORC1 シグナル伝達経路の上流および下流が高度に保存され、遺伝学的手法が容易である分裂酵母は、TORC1 シグナル伝達経路の研究において、非常に有用なモデル生物だといえる。

1-10. 本研究の目的

現在、広く流布している TORC1 制御モデルでは、リソソーム膜上に局在する低分子量 G タンパク質 RagA/RagB が、アミノ酸に応答して GTP 結合型に交換される。その結果、TORC1 がリソソーム膜上へリクルートされ、活性化される。一方、アミノ酸飢餓時には、GATOR1 タンパク質複合体 (DEPDC5, Npr12, Npr13) が GTPase-activating protein (GAP) として、RagA/RagB に結合した GTP の GDP への加水分解を促進し、TORC1 がリソソーム膜から細胞質へと移行することで不活化すると考えられている。しかしながら、近年、RagA/RagB のヌクレオチド結合状態が、アミノ酸刺激に応答しないことが報告されるなど、上記のモデルに矛盾するデータも報告されており、Rag GTPase による TORC1 制御機構は、未だ不明な点が多い。興味深いことに、当研究室において、哺乳類 GATOR1 構成因子に相同な Iml1, Npr2, Npr3 の遺伝子欠損株では、細胞の生育が阻害されることが明らかになっていった (Fajar 修士論文, 2016)。また、この表現型は、TORC1 特異的な阻害剤であるラパマイシンによって抑圧されたことから、TORC1 活性に依存した表現型であることが示唆されていた。哺乳類細胞において、mTORC1 の活性は細胞の生育に必須であり、GATOR1 の機能が変異等により失われると、RagA/RagB に結合するヌクレオチドが GTP 結合型に交換され、

mTORC1 の恒常的な活性化を引き起こす。この mTORC1 の活性化は、細胞の異常な増殖（ガン）に繋がることが報告されている。一方で、分裂酵母の GATOR1 に相同な Iml1, Npr2, Npr3 の遺伝子欠損株は、細胞の生育が促進されるどころか、むしろ細胞の生育が阻害されることから、この表現型は哺乳類細胞における mTORC1 の制御機構では説明することができない。つまり、この分裂酵母 Iml1, Npr2, Npr3 の解析を行うことは、新たな TORC1 活性制御機構の理解につながることを期待される。そこで、本研究は GATOR1 による TORC1 活性制御機構および、細胞機能の遺伝学的解析を目的として、研究をスタートした。

本研究において、Iml1, Npr2, Npr3 が GATOR1 複合体を形成することを示し、GATOR1 複合体の構成因子である Iml1 の GAP 活性は、TORC1 活性の抑制に必須であることを明らかにした。さらなる遺伝学的解析から、GATOR1 が哺乳類細胞 RagA/RagB に相同な Gtr1 の GAP として機能することを示唆する結果を得て、GDP 結合型の Gtr1 が TORC1 活性を抑制する負の制御因子であることを示した。つまり、これまで単なる不活性化型とされてきた GDP 結合型の RagA/RagB の新たな生理機能が明らかになった。さらに、GATOR1-Gtr1 は、塩基性アミノ酸トランスポーター-Cat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、GATOR1-Gtr1 経路は、細胞の生育に最適な TORC1 活性を維持する役割をもつことが考えられる。

これらの結果から、Rag ファミリーG タンパク質が TORC1 の抑制に働くという、新規機能を発見し、Sabatini らが提唱した TORC1 活性化モデルとは異なる、TORC1 抑制制御モデルを提案した (Figure .19)

2. 材料と方法

2-1. 試薬

本研究で用いた試薬については、特に記載がない限り、一般的な試薬はナカライテスク社と和光純薬社の製品を使用した。酵素類については、タカラバイオ社と New England Biolabs (NEB) 社の製品を使用した。

2-2. 抗生物質

本研究で用いた抗生物質については、アンピシリン (ナカライテスク社)、Geneticin (G418) sulfate (Santa Cruz Biotechnology)、ラパマイシン (フナコシ株式会社/LC Laboratories)、ハイグロマイシン B をそれぞれ最終濃度 50 mg/L、100 mg/L、100 ng/mL、100 mg/L になるように調製して使用した。

2-3. 培地およびサプリメント

2-3-1. 大腸菌

大腸菌の培地調製法は Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL SECOND EDITION (J. Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press に従った。

2-3-2. 分裂酵母

分裂酵母の培地調製法は Molecular Genetic Analysis of Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno, *et al.*, 1991). に従った。必要に応じてラパマイシン、ハイグロマイシン B をそれぞれ最終濃度が 100 ng/mL、100 mg/L になるよう YES 培地に添加して使用した。

・ YES 培地 (YES-Yeast Extract and Supplements)

3 % glucose, 0.5 % yeast extract, 0.02 % adenine hemisulfate, 0.02 % L-arginine, 0.02 % L-histidine, 0.02 % L-leucine, 0.01 % uracil

※寒天培地として用いる場合には agar を最終濃度 3.0 % なるように加えて使用した。

・ YES 培地 + NH₄Cl

3 % glucose, 0.5 % yeast extract, 0.5 % ammonium chloride, 0.02 % adenine hemisulfate, 0.02 % L-arginine, 0.02 % L-histidine, 0.02 % L-leucine, 0.01 % uracil

※寒天培地として用いる場合には agar を最終濃度 3.0% なるように加えて使用した。

・ 最少培地 (EMM- Edinburgh Minimal Medium)

2 % glucose, 0.3 % potassium hydrogen phthalate, 0.22 % sodium phosphate dibasic, 0.5 % ammonium chloride, 2 % 50x salts, 0.1 % 1000x minerals, 0.1 % 1000x vitamins

※寒天培地として用いる場合には agar を最終濃度 2.0% なるように加えて使用した。

・ アンモニウムイオン飢餓培地 (EMM-N)

0.3 % potassium hydrogen phthalate, 0.22 % sodium phosphate, dibasic, 2 % 50x salts, 0.1 % 1000x minerals, 0.1 % 1000x vitamins, 2 % glucose
(glucose は 40 % glucose 溶液を別瓶で調製し、使用直前に終濃度 2% になるように加えた)

・ 50x salts

5.3 % magnesium chloride hexahydrate, 0.1 % calcium chloride anhydrous, 5 % potassium chloride, 0.2 % sodium sulfate

・ 1000x minerals

0.05 % boric acid, 0.04 % manganese sulfate, 0.02 % ferric chloride hexahydrate, 0.04 % zinc sulfate heptahydrate, 0.02 % sodium molybdate dihydrate, 0.01 % potassium iodine, 0.004 % copper sulfate pentahydrate, 0.1 % citric acid anhydrate

・ 1000x vitamins

0.1 % nicotinic acid, 0.1 % myo-inositol, 0.0001 % biotin, 0.011 % calcium D-pantothenate

2-4. 菌株

2-4-1. 大腸菌

表 1 . 本研究で使用した大腸菌株

Strain	Genotype	Source or Reference
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan 1983

2-4-2. 分裂酵母

表 3 . 本研究で使用した分裂酵母株

Strain	Genotype	Source or Reference
CA1	<i>h-</i>	lab stock
CA8561	<i>h- im11::myc::hph</i>	This study
CA8594	<i>h- kan::p3nmt1:FLAG:npr2</i>	This study
CA8596	<i>h- kan::P3nmt1:FLAG:npr3</i>	This study
CA8602	<i>h- kan::P3nmt1:FLAG:npr2 im11::myc::hph</i>	This study
CA8604	<i>h- kan::P3nmt1:FLAG:npr3 im11::myc::hph</i>	This study
CA8606	<i>h- kan::P3nmt1:FLAG:npr3 npr2::myc::hph</i>	This study
CA8617	<i>h- npr2::myc::hph</i>	This study
CA8916	<i>h- Tsc2::kanmx6</i>	lab stock
CA9388	<i>h- gtr1::kanmx6</i>	lab stock
CA9400	<i>h- im11::kanmx6</i>	lab stock
CA9402	<i>h- npr2::kanmx6</i>	lab stock
CA9404	<i>h- npr3::kanmx6</i>	lab stock
CA9470	<i>h- gtr1QL::kanmx6</i>	lab stock
CA9473	<i>h- gtr1SN::kanmx6</i>	lab stock
CA9556	<i>h- tsc1::kanmx6</i>	lab stock
CA9560	<i>h- gtr1SN::kanmx6 im11::hph</i>	lab stock
CA9562	<i>h- gtr1SN::kanmx6 npr2::hph</i>	lab stock
CA9564	<i>h- gtr1SN::kanmx6 npr3::hph</i>	lab stock
CA9574	<i>h- gtr1QL::kanMX6 im11::hph</i>	This study

CA9576	<i>h- gtr1::kanMX6 im11::hph</i>	This study
CA9648	<i>h- im11::myc::hph npr2::FLAG::kanMX6</i>	This study
CA9650	<i>h- gtr1SN::kanMX6 im11::hph</i>	This study
CA9720	<i>h- im11::nat npr2::hph npr3::kanMX6</i>	lab stock
CA9724	<i>h- tsc1::kanMX6 im11::hph</i>	lab stock
CA9848	<i>h- tsc2::kanMX6 im11::hph</i>	lab stock
CA10361	<i>h- pub1::hph</i>	lab stock
CA10531	<i>h- kan::P3nmt1::FLAG:npr2 npr3-myc::hph</i>	This study
CA11027	<i>h- kan::P3nmt1::FLAG:npr2 npr3-myc::hph</i>	This study
CA11244	<i>h- im11::kanMX6 pub1::hph</i>	This study
CA11246	<i>h- npr2::kanMX6 pub1::hph</i>	This study
CA11248	<i>h- npr3::kanMX6 pub1::hph</i>	This study
CA11250	<i>h- gtr1::kanMX6 cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11254	<i>h- gtr1SN::kanMX6 cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11256	<i>h- gtr1QL::kanMX6 cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11258	<i>h- im11::kanMX6 cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11260	<i>h- npr2::kanMX6 cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11262	<i>h- npr3::kanMX6 cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11268	<i>h- cat1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11491	<i>h- any1::hph</i>	lab stock
CA11497	<i>h- any1::hph im11::kanMX6</i>	lab stock
CA11617	<i>h- pub1::ura4⁺ cat1-mNeonGreen ura4-D18</i>	This study
CA11619	<i>h- pub1::ura4⁺ gtr1::hph cat1-mNeonGreen</i>	This study
CA11621	<i>h- pub1::ura4⁺ im11::hph cat1-mNeonGreen</i>	This study
CA11665	<i>h-cat1-mNeonGreen::hph krp1-mcherry::kanMX6</i>	This study
CA11689	<i>h- gtr1::kanMX6 mip1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA11759	<i>h- gtr1::nat cat1-mNeonGreen::hph krp1-mcherry::kan</i>	This study
CA11761	<i>h- im11::nat cat1-mNeonGreen::hph krp1-mcherry::kan</i>	This study
CA12152	<i>h- cat1-mNeonGreen::hph any1::nat</i>	This study
CA12154	<i>h- cat1-mNeonGreen::hph any1::nat gtr1::kanMX6</i>	This study

CA12158	<i>h- cat1-mNeonGreen::hph any1::nat im11::kanMX6</i>	This study
CA12162	<i>h- npr2::kanMX6 any1::hph</i>	This study
CA12164	<i>h- npr3::kanMX6 any1::hph</i>	This study
CA12335	<i>h- npr3::nat im11:myc::hph kan::P3nmt1:FLAG:npr2</i>	This study
CA12337	<i>h- npr2::nat im11:myc::hph kan::P3nmt1:FLAG:npr3</i>	This study
CA12339	<i>h- im11::nat npr2:myc::hph kan::P3nmt1:FLAG:npr3</i>	This study
CA13452	<i>h- im11R854A:myc::hph</i>	This study
CA13453	<i>h- mip1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA13454	<i>h- gtr1SN::kanMX6 mip1-mNeonGreen::hph</i>	This study
CA13455	<i>h- gtr1QL::kanMX6 mip1-mNeonGreen::hph</i>	This study

2-5. PCR 反応

PCR 反応は、用途がクローニングおよび株の作成の場合は **2x Prime STAR HS Premix** (タカラバイオ社製) を反応液全量を **20 μ L** として使用した。用途がタグ付けを行った株等の確認の場合は、**2x Premix Ex Taq** (タカラバイオ社製) を反応液全量 **20 μ L** として使用した。下記の通り反応液を調整し、PCR 反応を行った。

【1 反応あたり】

試薬	使用量	最終濃度
2x Prime STAR HS Premix (2x Premix Ex Taq)	10 μ L	1 \times
PCR Forward Primer	0.4 μ L	0.2 μ M
PCR Reverse Primer	0.4 μ L	0.2 μ M
Template (1/1000)	0.2 μ L	< 100 ng
滅菌精製水	9.0 μ L	
Total	20.0 μ L	

【反応プロトコル】

初期変性	変性反応	アニーリング反応	伸長反応		
98 $^{\circ}$ C 3 min	98 $^{\circ}$ C 10sec	60 $^{\circ}$ C 10sec	72 $^{\circ}$ C 1 min/ 1 Kbp	72 $^{\circ}$ C 10min	4 $^{\circ}$ C ∞
35 Cycle					

2-6. プラスミドおよびゲノム抽出

2-6-1. 大腸菌からのプラスミド抽出および精製

形質転換された大腸菌を 50 µg/mL のアンピシリンを含む 5 mL の LB 液体培地で 37 °C にて一晩振盪培養した。培養液を 5000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て、沈殿を 200 µL の Solution I (10 % glucose, 250 mM EDTA, 0.5 M Tris-HCl [pH 7.8]) に懸濁した。その後、400 µL の Solution II (0.2 N NaOH, 0.1 % SDS) を加え、転倒混和により大腸菌を溶菌した。300 µL の Solution III (0.3 M Potassium acetate, 0.14 % 氷酢酸) を加え、転倒混和を行い攪拌した。13500 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに回収し、450 µL の Isopropyl Alcohol を加えてボルテックスミキサーでよく攪拌した。その後、13500 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した後、1 mL の 70 % エタノールを加えた。13500 rpm で 5 分間遠心後、上清を除去した。5~10 分程 37°C のインキュベーター内で乾燥させた後、滅菌水 50 µL を加え、プラスミド抽出液とした。

シーケンス解析など高純度に精製されたプラスミド抽出液を必要とする場合は、50 µL のアンピシリンを含む 1.5 mL の Terrific Broth 液体培地 (1.2 % bacto-tryptone, 2.4 % bacto-yeast extract, 0.4% glycerol) で大腸菌の形質転換体を 37 °C にて一晩培養後、FastGene™ プラスミドミニキット (Nippon Genetics) を用いて Standard プロトコルに従い溶出した。

2-6-2. 酵母からのゲノム抽出

液体培地 (YES/EMM) 5 mL で培養した細胞を 1.5 mL チューブに集菌し、200 µL の溶菌バッファー (0.1 M Tris-HCl, [pH 8.0], 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 1 % SDS) に懸濁した。液面までガラスビーズ (Sigma) を加え、200 µL のフェノールクロロホルムを添加した後、4 °C にてボルテックスミキサーの最大出力で 5 分間酵母の細胞を破碎した。細胞破碎液に 600 µL の溶菌バッファーを加えて転倒混和した後、13500 rpm で 5 分間遠心した上清を再度 200 µL のフェノールクロロホルムを加えてボルテックスミキサーでよく攪拌し、13500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、回収した上清に 10 分の 1 量の 3 M 酢酸ナトリウムおよび 2 倍量の 100 % エタノールを加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌し、13500 rpm で 5 分間遠心した。遠心後の上清に 1 mL の 70 % エタノールを加え、転倒混和した後、再度 13500 rpm で 3 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、37°C のインキュベーター内で 10 分間乾燥させた。最後に、沈殿物に 100 µL の滅菌水を加え、ボルテックスミキサーでよく懸濁したものをゲノム抽出液として使用した。

2-7. 形質転換

2-7-1. コンピテントセル (DH5 α) の作製

-80°C で凍結保存している大腸菌 DH5 α を 1 mL の LB 液体培地に起こし、37 °C で一晩振盪培養した。2 L フラスコを用い 150 mL の SOB で翌日に対数増殖期 (OD₆₀₀=0.6) となるよう 18 °C で振盪培養した。翌日、対数増殖期 (OD₆₀₀=0.6) の細

胞懸濁液を氷上で 10 分間静置し、3000 rpm で 15 分間、4 °C にて遠心した。上清を捨て、50 mL のあらかじめ冷やしておいた Transformation buffer (0.3 % PIPES, 0.22 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.86 % KCl, 1.1 % $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) に懸濁した。この細胞懸濁液を再度、3000 rpm で 15 分間、4 °C にて遠心し、上清を捨てた後、12 mL の冷えた Transformation buffer に再懸濁した。0.9 mL の DMSO を加え、氷上にて転倒混和し、10 分間静置した。0.4 mL ずつを 1.5 mL チューブに分注し、液体窒素で瞬間冷却後、コンピテントセルとして -80 °C で凍結保存した。

2-7-2. 大腸菌の形質転換

コンピテントセルを 10 μL 氷上融解させ、1 μL のプラスミド抽出液を加え、30 分間氷上で静置した。その後、プラスミドを含む形質転換受容細胞液 1.5 mL の LB 液体培地が入った試験管に加え、37 °C で一晩 (16 時間) 振盪培養を行った。

2-7-3. 分裂酵母の形質転換

-80 °C で凍結保存していた細胞を EMM 寒天 上に塗り広げ、30 °C にて一晩静置培養した。その後、EMM 培地 20 mL に植菌し、30 °C で一晩振盪培養した。翌日、集菌した細胞に 10 OD_{cell}/1 mL の 0.1 M 酢酸リチウム[pH4.9] で懸濁し、室温にて 1 時間静置した。静置後の細胞懸濁液に、プラスミド溶液を 10 μL 加え、攪拌した後、0.1 M 酢酸リチウム[pH4.9] の 2.5 倍量の 50 % PEG3350 を加え、最大出力のボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌した。その後 30 °C で 4 時間静置培養し、EMM 液体培地を 1 mL 加えてボルテックスミキサーでよく攪拌した。5000 rpm で 5 分間遠心後、上清を捨て、100 μL の滅菌水を加え選択培地上にまき 30 °C にて静置培養を行った。なお、選択培地が G418 およびハイグロマイシン B の場合は非選択培地 (YES, EMM) 上で 30 °C にて一晩静置培養を行った。翌日、100 mg/L の G418 もしくはハイグロマイシン B を含む選択寒天培地 (YES) にレプリカを行い、形質転換体のコロニーが得られるまで 30 °C にて静置培養した。

2-8. 分裂酵母株の作成および確認

2-8-1. 分裂酵母遺伝子の 3' 末端へのタグ付け (Figure .5)

精製した分裂酵母野生株 (CA1) のゲノム DNA を鋳型とし、PCR により 500 塩基対の遺伝子 3' 末端および 500 bp の終止コドン直後の配列を増幅させた (第一 PCR)。使用するプライマーには、pFA6a-kanMX プラスミド上のカナマイシン耐性遺伝子 kanMX6 および pFa6a-hph プラスミド上の hph にアニールする TTAATTAACCCGGGATCCG および CAGATCCACTAGTGGCCTAT 配列を加えた (表 4)。次に第一 PCR で増幅した断片及び pFA6a-13myc/5Flag-kanMX6/プラスミドもしくは、pFa6a-13myc/5Flag-hph プラスミドを鋳型として、PCR を行った (第二 PCR)。第二 PCR で増幅した 2 つの断片を 5 μL ずつ使用して分裂酵母野生株に形質転換した。30 °C の非選択寒天培地 (YES) 上で 16 時間静置培養した後、G418 を含む YES 寒天培地 (YES) にレプリカし、得られたコロニーについて、PCR 法、サザンブロッテ

イング法、ウェスタンブロッティング法を用い、確認を行った。

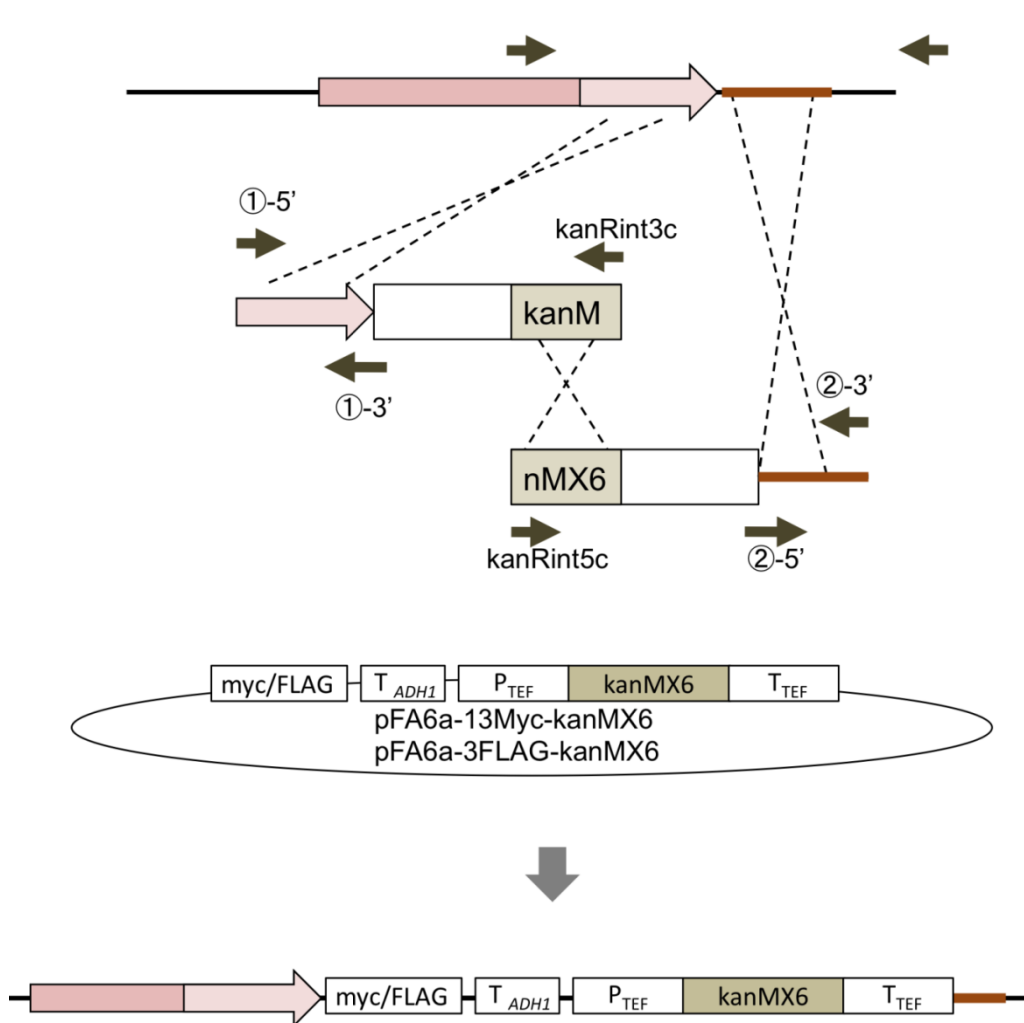


Figure .5 *Schizosaccharomyces pombe* での PCR を基にした遺伝子タギング法

分裂酵母のゲノムからPCRにより遺伝子断片を増幅し、組換え機構を利用して遺伝子にタギングを行った。まず①-5'と①-3'および②-5'と②-3'の組み合わせで遺伝子断片を増幅させた(第一PCR)。次に第一PCRで増幅した断片とpFA6a-13Myc-kanMX6、またはpFA61-3FLAG-kanMX6プラスミドを鋳型として、プライマー①-5'とkanRint3cおよび②-3'とkanRint5cの組み合わせで断片を増幅させた(第二PCR)。第二PCRで増幅された2つの断片を同時に分裂酵母に形質転換させ、kanMX6によるG418耐性を選択マーカーとして目的の遺伝子にタギングされた細胞株を得た。タギングされた株はPCRとサザンハイブリダイゼーション法で確認し、分裂酵母四分子解析法後、実験に使用した。

2-8-2. 部位変異株 (*iml1*R854A) の作製 (Figure .6)

精製した分裂酵母野生株 (CA1) のゲノム DNA を鋳型とし、PCR により *iml1* の 854 番目のアルギニンをアラニンに置換した①、②の2つのフラグメントを作製した。次にこの①、②の PCR 断片を鋳型として 500 bp の開始コドン直前の配列 500 bp と全長の *iml1* 遺伝子配列を含む断片を作製した。同時に、*iml1* の終止コドン直後の配列 500bp を PCR により④の断片を作製した。なお、④の断片作製に使用したプライマーには、pFA6a-hph プラスミド上のハイグロマイシン耐性遺伝子 (hph) とアニールする配列を加えた。次に PCR で増幅した③、④の断片及び pFA6a-13myc-hph プラスミドを鋳型として、それぞれ PCR を行った。PCR で増幅した2つの断片を 10 μ L ずつ使用し、*iml1* の遺伝子座に kanMX6 を導入して欠損させた $\Delta iml1$ 株 (CA9400) に形質転換し、相同組み換えにより R854A 変異を含む *iml1* を導入した。ラパマイシンを添加した YES 寒天培地 上で 24 時間静置培養した後、hph とラパマイシンを含む YES 培地 にレプリカし、得られたコロニーについて、PCR 法により候補を選別し、シーケンス解析により、変異を確認した。

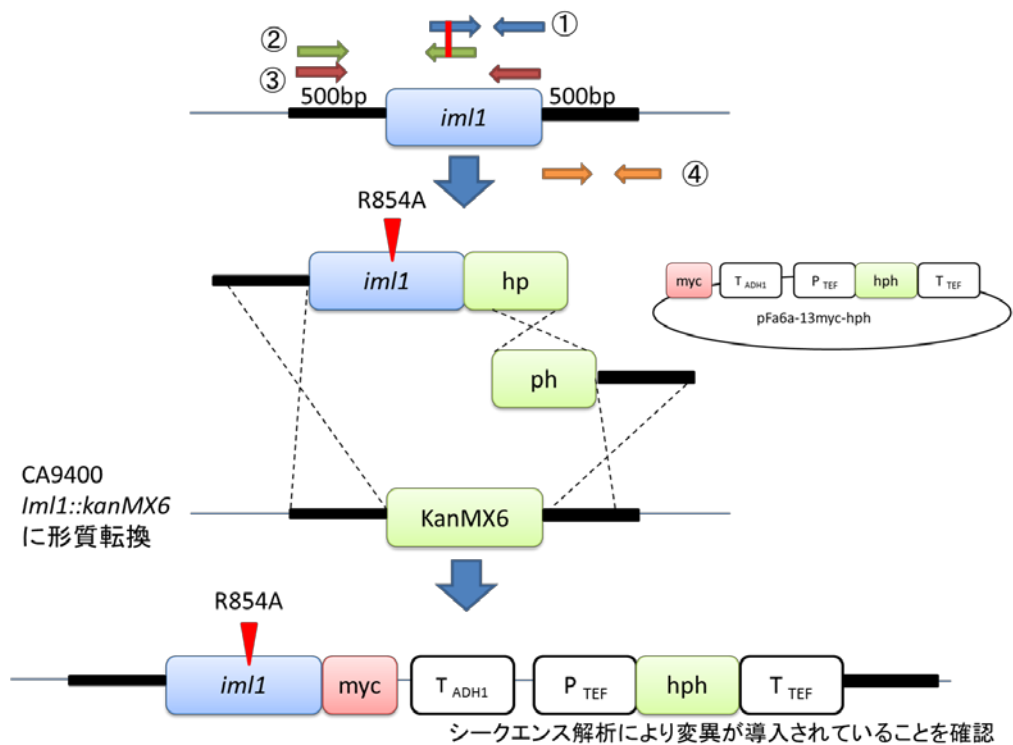


Figure .6 *iml1*R854A 変異株の作製方法

PCR により *iml1* の 854 番目のアルギニンをアラニンに置換した①、②の断片を作製した。次に①、②の PCR 断片を鋳型として 500 bp の開始コドン直前の配列 500 bp と全長の *iml1* 遺伝子配列を含む断片を作製した。同時に、*iml1* の終止コドン直後の配列 500bp を PCR により④の断片を作製した。次に PCR で増幅した③、④の断片及び pFA6a-13myc-hph プラスミドを鋳型として、それぞれ PCR を行った。

2-8-3. シークエンス解析

作製した 1 塩基変異株からゲノムを回収し、このゲノムを鋳型として配列を確認したい領域を含む DNA 断片を PCR 反応により作製した。その後、ナノドロップを用いて PCR 断片の量を測定した。PCR 断片が 100 ng になるように滅菌水で希釈し、以下の PCR 反応を行った。

【1 反応あたり】

試薬	使用量
Premix (Big Dye)	1 μ L
PCR Primer (2 μ M)	1.6 μ L
Template(<100 ng/ μ L)	1.0 μ L
滅菌精製水	12.9 μ L
5 \times Sequencing buffer	3.5 μ L
Total	20.0 μ L

【反応プロトコル】

初期変性	変性反応	アニーリング反応	伸長反応	
96 $^{\circ}$ C 1 min	96 $^{\circ}$ C 10 sec	50 $^{\circ}$ C 5 sec	60 $^{\circ}$ C 4 min	60 $^{\circ}$ C 4min
35 Cycle				

PCR 反応後、PCR 産物を新しい 1.5 mL チューブに移し、5 μ L の 125 mM EDTA および 60 μ L の 100% エタノールを加え、ボルテックスミキサーでよく懸濁した。常温で 3 分間静置した後、13500 rpm で 30 分間遠心した (4 $^{\circ}$ C)。遠心した後、上清を除去し、250 μ L の 70% エタノールを加え、再び遠心した (13500 rpm, 4 min, 4 $^{\circ}$ C)。上清を除去した後、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 5~10 分間乾燥させた。その後、20 μ L の Hi-Di を加えてボルテックスミキサーで懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 2 分間の熱処理を行い、すぐに氷上で冷却した。冷却したサンプルを解析用の 96 Well Plate に滴下し、シーケンサーで解析した。
※操作は明記がある場合を除いて、全て氷上 (4 $^{\circ}$ C) で行った。

2-8-4. 四分子解析

-80°C で凍結保存していた細胞を YES 寒天培地に起こし、30°C で一晩静置培養を行った。100 µL の滅菌水をいれた 1.5 mL チューブに *h*- および *h*+ の株を同量加え、ボルテックスミキサーでよく懸濁した。その後、Synthetic Sporulation 寒天培地 (1% glucose, 0.05 % L-aspartic acid, 0.2 % KH₂PO₄, 0.05 % Na₂HPO₄, 0.05 % MgSO₄·7H₂O, 0.01 % CaCl₂, 0.1 % 1000x vitamins, 0.1 % 1000x minerals, 2 % agar) 上に 30 µL の酵母懸濁液を滴下し、28°C で 2 日～3 日間静置培養した。細胞懸濁塊の一部を爪楊枝でかきとり、顕微鏡を用いて四分子が形成されていることを確認した後、100 µL の 0.5 % グルスレース液 (SIGMA) に適量懸濁し、12.5 mL の tetrad 用寒天培地 (0.5 % yeast extract, 3 % glucose, 3 % agar, 0.019 % Adenine, 0.019 % Arginine, 0.019 % Histidine, 0.01 % Leucine, 0.019 % Uracil) にのばした。37°C で 60 分間静置培養し、グルスレースによる細胞壁の分解を促進させた後、四分子解析機械 (SINGER) を用いて、胞子を分離した。30°C で 4～7 日間静置培養した後、適当な選択寒天培地にレプリカし、目的の遺伝子型の株を取得した。

2-8-5. 窒素源飢餓

EMM 液体培地で培養した対数増殖期 (OD₆₀₀=0.2) の細胞をニトロセルロース膜フィルター (ADVANTEC) 上に吸引濾過により集め、20 mL/100 Dcell の窒素源飢餓培地 (EMM-塩化アンモニウム) で細胞を洗浄した。窒素源飢餓培地を添加した瞬間を 0 分とし、飢餓状態の時間測定を開始した。フィルター上の細胞は窒素源飢餓培地に再懸濁し、30°C で振盪培養を行い、各時間経過に従って集菌した。

2-8-6. スポットテスト

細胞を EMM 液体培地で対数増殖後期 (OD₆₀₀=1) になるまで振盪培養し、10 分の 1 ずつ四段階に希釈した細胞懸濁液 (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) を YES 培地、EMM 寒天培地、終濃度 100 ng/mL のラパマイシン含有 YES 寒天培地 (YES+ラパマイシン)、および終濃度 0.5% の塩化アンモニウムを含む YES 寒天培地 (YES+塩化アンモニウム) 上にそれぞれ 3 µL ずつ滴下し、30°C で 3 日間静置培養した。なお、写真は共通機器の RAS4000 を使用し、静置培養開始から 48 時間後および 72 時間後に撮影した。

2-9. タンパク質の調製および検出

2-9-1. TCA 沈殿によるタンパク質抽出 (変性条件でのタンパク質抽出方法)

細胞培養液に最終濃度 10 % になるようトリクロロ酢酸 (TCA) を加え、50 mL のファルコンチューブに移し、5000 rpm で 2 分間遠心した。上清除去後、集菌した細胞に 200 µL の 10 % TCA を加えたのち、新しい 1.5 mL チューブに移した。液面まで細胞破碎用のジルコニアビーズ (YTZ) を加え、4°C にてボルテックスミキサ

ー (TAITEC)で 10 分間破碎を行った。細胞破碎液に 200 μL の 10 % TCA を加え、チューブの底に 23 ゲージの針で穴をあけ、新しいチューブ上に差し込み、5000 rpm で 10 分遠心した。上清を完全に取り除いた後、沈殿物に、1x サンプルバッファ (0.5 M Tris-HCl [pH 8.0], 2 % SDS, 4.5 % グリセロール, 0.01 % BPB, 0.7 M メルカプトエタノール) を加えて中和し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した。65°C に設定したヒートブロックにて 15 分間熱変性させた。その後、13500 rpm で 15 分間遠心し、上清をタンパク質抽出液として回収した。

2-9-2. 免疫沈降用タンパク質抽出 (非変性条件タンパク質抽出法)

特に明記がない限り作業はすべて氷上および 4°C 環境下で行った。EMM 液体培地で振盪培養した対数増殖期 (OD600=0.4) にある細胞を集めたフィルターを、1 mL の滅菌精製水を入れた 1.5 mL チューブに懸濁し、フィルターを取り除いた後に遠心により集菌した (4°C, 5000 rpm, 30sec)。上清除去後、溶菌バッファ (20 mM HPES-KOH [pH 7.5], 150 mM sodium glutamate, 10% グリセロール、0.25 % Tween-20, 10 mM NaF, 0.1 mM Na orthovanadate, 10 mM disodium glycerophosphate 5,5-phosphate, 10 mM sodium diphosphate decahydrate (NaPPi), 10 mM p-nitrophenyl phosphate) にプロテアーゼによるタンパク質の分解を抑える 1 mM PMSF, 1/200 量の Protease inhibitor cocktail (SIGMA P8849) を加えた。細胞破碎用バッファを 200 μL 加えた。さらに液面までジルコニアビーズ (YTZ) を注いだ後、ボルテックスミキサー (TAITEC) の最大出力で 5 分間破碎を行った。この細胞破碎液に、200 μL の溶菌バッファを加え、チューブの底に 23 ゲージの針で穴をあけ、新しいチューブ上に差し込み、遠心を行うことでジルコニアビーズと細胞破碎液を分離した (4°C, 5000rpm, 5min)。差し込んだチューブを取り除き、再び 13500 rpm で 15 分間遠心を行った後、上清を細胞粗抽出液として回収した。この 15 分の遠心を行っている間に、免疫沈降で使用する EZ viewTM Red Anti-c-Myc Affinity Gel (SIGMA) および Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) に 1 mL の溶菌バッファを加えて反転混和した後、遠心 (4°C, 2000rpm, 10sec) または磁石で磁気ビーズを集めた。この操作を 4 回繰り返すことでビーズの平衡化を行った。後述する Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate を用いたタンパク質濃度測定法により各サンプルのタンパク質濃度を求めた。免疫沈降実験にはタンパク質濃度が最も低い細胞粗抽出液を 300 μL 使用し、タンパク質濃度が高いものは溶菌バッファで希釈を行い、全てのサンプルのタンパク質濃度が等しくなるよう調節した。調節して得た細胞粗抽出液上清のうち 300 μL を後述の免疫沈降法に用い、30 μL は細胞内在性タンパク質量の検出のために細胞粗抽出液として用いた。細胞粗抽出液は 30 μL の細胞粗抽出液上清に 10 μL 4x サンプルバッファ (0.2 M Tris-HCl [pH6.8], 8 % SDS, 18 % グリセロール, 0.04 % BPB) 及び 1 μL のメルカプトエタノールを加え、65°C で 10 分間加熱した。300 μL の細胞ライセートタンパク質抽出液を 200 μL の溶菌バッファに懸濁した EZ viewTM Red Anti-c-Myc Affinity Gel (SIGMA) または Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) と混合した後、2 時間ロー

ター (TAITEC) を用いて 4°C 室にて転倒混和した。溶菌バッファーを用いた洗浄を 4 回行い、40 μ L の 1x サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2 % SDS, 4.5 % グリセロール、0.01 % BPB) を加え、65 °C に設定したヒートブロック上で 10 分間の熱処理を加えた。13500 rpm で 1 分間遠心した後、回収した上清に 1 mL のメルカプトエタノールを加え再度 65°C のヒートブロック上で加熱した。これをタンパク質抽出液とし、ウェスタンブロットティングに用いた。

2-9-3. タンパク質濃度測定

200 μ L の Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate に 790 μ L の滅菌精製水を加えた溶液に 20 分の 1 に希釈したタンパク質粗抽出液を 10 μ L 加えたのち、ボルテックスミキサー (TAITEC) で攪拌し、5 分間常温で静置反応させた。吸光係数 OD₅₉₅ を測定し、この数値を元にタンパク質濃度を算出した。

2-9-4. Western blotting

基本的な操作、試薬類の調製は Mini-PROTEAN 3 Cell Instruction Manual (BIO RAD) および Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual (BIO RAD) に従った。

TCA 沈殿タンパク質抽出法により得た細胞抽出液はタンパク質濃度が 5 μ g/ μ L になるよう 1x サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2 % SDS, 4.5 % グリセロール、0.01 % BPB) で希釈した。この希釈した細胞抽出液を 20 μ g/ lane になりようにロードし、8% および 10 % の SDS ポリアクリルアミドゲル (Acrylamide : bis-acrylamide = 29.2 : 0.8) 電気泳動法でタンパク質を分離した。電気泳動終了後、ポリアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜 (Bio Trace™ Poll Corporation) にウェット式で転写し、転写したニトロセルロース膜を 5 % スキムミルク (和光純薬) 中で 1 時間ブロッキングした (室温)。その後、1 次抗体反応は (3% スキムミルクを加えた 1x TBS-T バッファーで 1/5,000 倍希釈した抗-S6K 抗体、1/5,000 倍希釈した #9206 Phospho-p70 S6 Kinase (thr389) (Cell Signaling Technology)、1/1,000 倍希釈した抗 Spc1 抗体 (Tatebe *et al.*, 2003、1/4,000 倍希釈した Monoclonal Anti-Flag antibody (Sigma)、1/4,000 倍希釈した抗 *myc* 抗体) 各抗体を含む 3% スキムミルク中にて常温で 1 時間反応を行った。抗体反応後、1x TBS-T バッファーによる洗浄を室温で 8 回行った (5 分×4 回、10 分×4 回)。2 次抗体反応は 3% BSA を加えた 1x TBS-T バッファーで 1/2,000 倍希釈した Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate (PROMBEGA) および Anti-Mouse IgG HRP Conjugate (PROMEGA) 中で室温にて 1 時間の反応を行った。2 次抗体反応終了後、1x TBS-T バッファーによる洗浄を室温で 8 回行った (5 分×4 回、10 分×4 回) 後、1x TBS で再度洗浄し、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo SCIENTIFIC) でシグナルを検出した。

2-10. 蛍光顕微鏡

2-10-1. 観察用試料の調製

EMM 液体培地 (EMM) で培養した対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) の細胞培養液を 1.5 mL チューブに 1 mL 回収し遠心を行った (RT, 5000rpm, 1min)。上清を完全に除去した後、50 μ L の EMM 液体培地を加え、ボルテックスミキサー (TAITEC) でよく攪拌し、これを観察用細胞試料とした。スライドガラス上に細胞を固定するため、1.5% のアガロースを含む EMM 寒天培地を 10 μ L 滴下し、カバーガラスで寒天培地を均等に薄く広げた。寒天培地が固まった後、カバーガラスを外し、3 μ L の細胞懸濁液を寒天培地上に滴下し、再びスライドガラスを乗せ、Deltavision で蛍光を観察した。

2-10-2. SynaptoRed™ C2 による液胞膜の染色

EMM 液体培地で培養した対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) の細胞培養液を 1.5 mL チューブに 1 mL 回収し、16 mM の SynaptoRed™ C2 (Biotium) を 0.5 μ L 加え、ボルテックスミキサー (TAITEC) でよく攪拌した。SynaptoRed™ C2 (Biotium) を加えた細胞培養液を新しい 1.5 mL チューブに移し、遮光した 30 度のインキュベーター内で 30 分間静置した。新しい 1.5 mL チューブへと細胞培養液を移し、遠心を行った (RT, 13500rpm, 5sec)。上清を除去した後、EMM 培地を 1mL 加え、新しい 1.5 mL チューブへと移した。遮光した 30 度のインキュベーター内で 90 分間静置した。静置後、前述の顕微鏡用の試料調製方法に従って調製し蛍光を観察した。

3. 結果

3-1. GATOR1 複合体は分裂酵母に高度に保存されている

哺乳類細胞において、アミノ酸飢餓に応答した GATOR1 複合体は、RagA/RagB の GTPase-activating protein (GAP) として、RagA/RagB に結合した GTP の GDP への加水分解を促進することで TORC1 活性を抑制する (Bar-peled et al., 2013)。哺乳類細胞 GATOR1 複合体の構成因子である DEPDC5, Npr12, Npr13 は、分裂酵母細胞内に Iml1, Npr2, Npr3 として存在する。そこで、Iml1, Npr2, Npr3 が GATOR1 複合体を形成するかを確認するため、染色体上の *iml1*⁺, *npr2*⁺ および *Npr3* 遺伝子の 5' 末端と 3' 末端に、それぞれ FLAG と *myc* エピトープをコードする DNA 配列を挿入した株を、DNA 相同組換えを利用して作製した。作製したこれらの株を用いた共免疫沈降実験を行い、Iml1, Npr2 および Npr3 の相互作用を検討した。まず、Npr2 および Npr3 に Iml1 が相互作用を示すかを確認した (Fig. 7A)。方法として、*FLAG-npr2*, *FLAG-npr3*, *iml1-myc* 株から調製した細胞破碎液を用いて、抗 FLAG 抗体結合ビーズによる Npr2 および Npr3 の精製を行い、抗 Myc 抗体および抗 FLAG 抗体を用いた免疫ブロッティングを行うことで、Iml1 が相互作用を示すかを解析した。その結果、Iml1 は Npr2 と Npr3 の両方と相互作用することが明らかになった。次に、同様の共免疫沈降実験により、Myc-IP による Iml1 と Npr3 の精製を行い、これに対して Npr2 が相互作用することを示した (Fig. 7B)。最後に、MycIP により精製した Iml1 と Npr2 に対して、Npr3 が相互作用することが確認できた (Fig. 7C)。したがって、これらの結果から、Iml1, Npr2, Npr3 は分裂酵母においても GATOR 複合体を形成していることが示された。

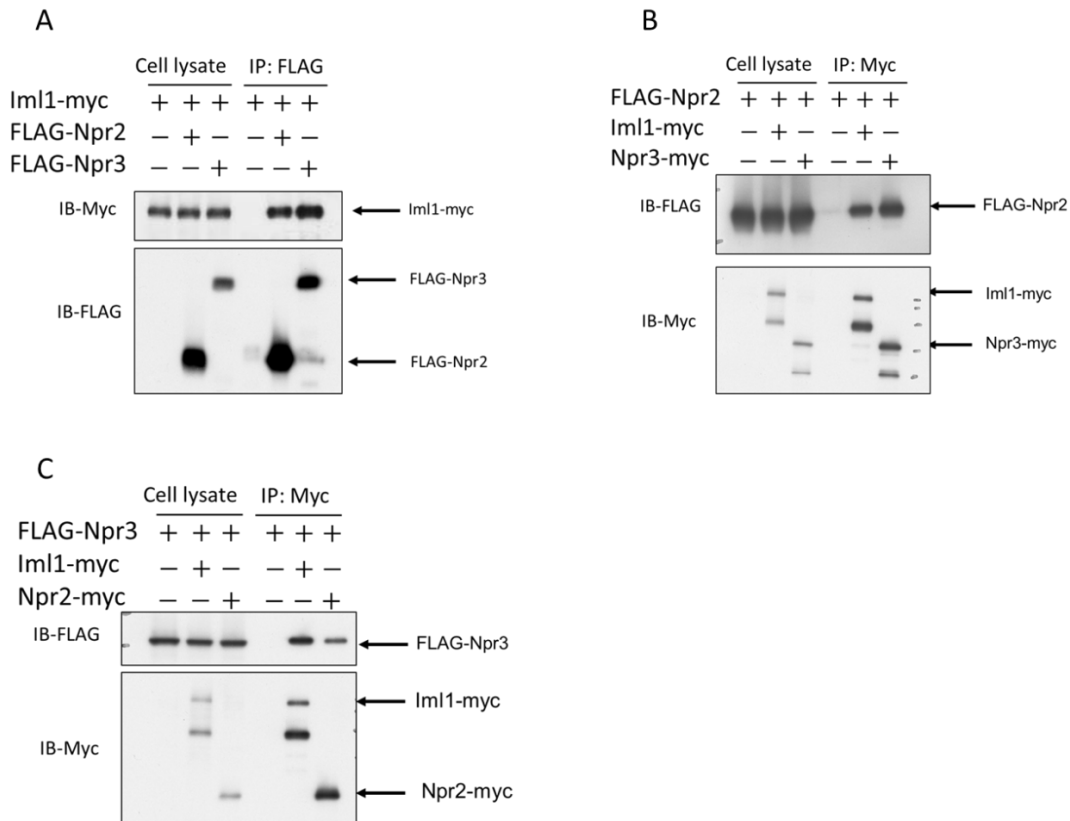


Figure . 7 GATOR1 複合体は分裂酵母においても高度に保存されている

(A). Iml1 は Npr2 と Npr3 の両方と相互作用する

iml1-myc (CA8561), *iml1-myc FLAG-npr2* (CA8602), *iml1-myc FLAG-npr3* (CA8604) を対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) になるまで 30 度の EMM 培地で培養し、その細胞破砕液を用いて抗 FLAG 抗体結合ビーズによる免疫沈降を行った。沈殿物を溶出し、抗 Myc 抗体および抗 FLAG 抗体で免疫ブロッティングを行った。

(B). Npr2 は Npr3 と Iml1 の両方と相互作用する

FLAG-npr2 (CA8594), *FLAG-npr2 iml1-myc* (CA8602), *FLAG-npr2 npr3-myc* (CA11027) を用いた (A) と同様の手法で、共免疫沈降および免疫ブロッティングを行った。

(C). Npr3 は Npr2 と Iml1 の両方と相互作用する

FLAG-npr3 (CA8596), *FLAG-npr3 iml1-myc* (CA8604), *FLAG-npr3 npr2-myc* (CA8606) を用いて (A) と同様の手法で、共免疫沈降および免疫ブロッティングを行った。

3-2. Iml1 と Npr3 は Npr2 を介して相互作用することで GATOR1 複合体を形成する

GATOR1 複合体を構成する Iml1, Npr2, Npr3 が、どのような結合様式で GATOR1 複合体を形成しているかを明らかにするために、① Iml1 遺伝子欠損が Npr2 と Npr3 間の相互作用に与える影響 ② Npr2 の遺伝子欠損が Iml1 と Npr3 間の相互作用に与える影響 ③ Npr3 の遺伝子欠損が Iml1 と Npr2 間の相互作用に与える影響を、それぞれ抗 Myc 抗体結合ビーズ、および抗 FLAG ビーズを用いた共免疫沈降実験により検討した (Fig .8A-F)。まず、Npr2 と Npr3 間の相互作用に、Iml1 の遺伝子欠損が影響を与えるかを検討した。その結果、Iml1 の欠損株においても、Npr2 と Npr3 間の相互作用は検出されたことから、Npr2-Npr3 間の相互作用は Iml1 に依存しないことがわかった (Fig .8A, B)。同様に、Iml1 と Npr2 間の相互作用は、Npr3 の遺伝子欠損による影響を受けなかったことから、Iml1-Npr2 間の相互作用は Npr3 に依存しないことが示された (Fig .8C, D)。一方、Iml1 と Npr3 間の相互作用は、Npr2 の遺伝子を破壊することで、著しく減少したことから、Npr2 は Iml1-Npr3 間の相互作用に必要であることを示した (Fig .8E, F)。これらの結果から、Npr2 が Iml1-Npr3 間の相互作用を仲介することで、GATOR1 複合体を形成していることが明らかになった (Fig .8G)。

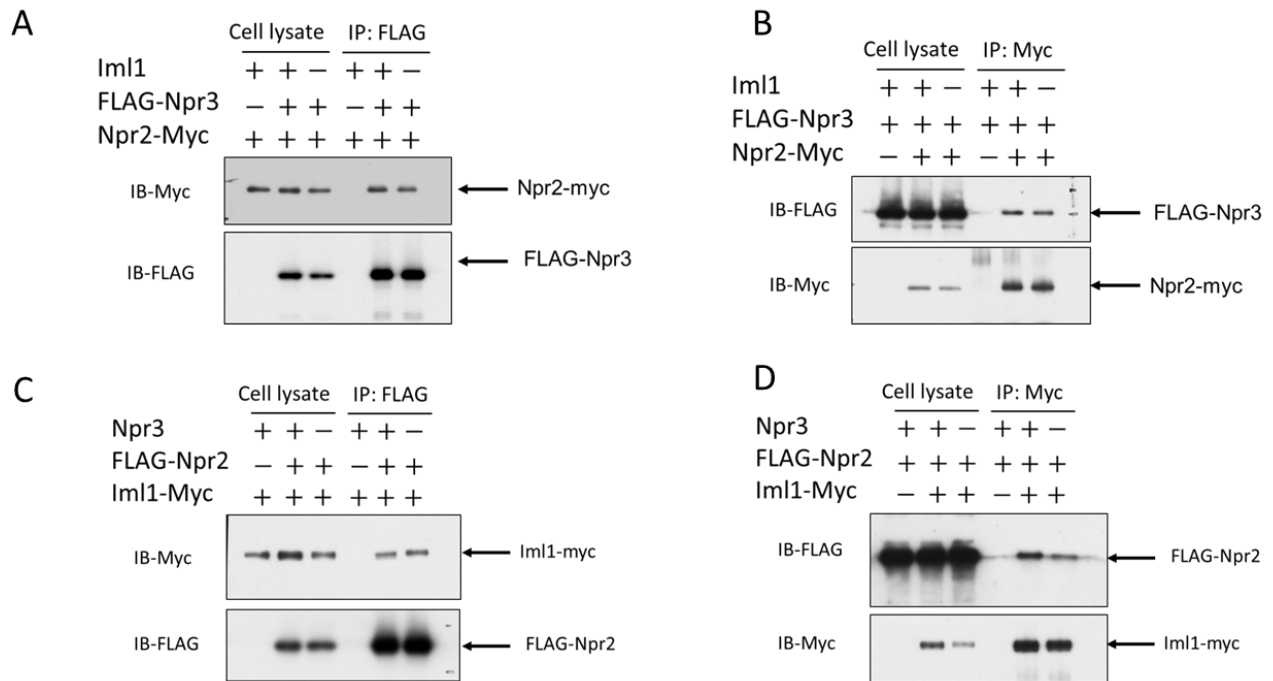


Figure .8 Iml1 と Npr3 は Npr2 を介して相互作用することで GATOR1 複合体を形成する

(A) (B). Npr2 と Npr3 は Iml1 非依存的に相互作用する

npr2-myc 株 (CA12339), *FLAG-npr3* 株 (CA8596), *npr2-myc FLAG-npr3* 株 (CA8606), *npr2-myc FLAG-npr3 Δiml1* 株 (CA12339) を対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) になるまで EMM 培地で培養し、その細胞破碎液を用いて抗 FLAG 抗体結合ビーズおよび抗 Myc 抗体結合ビーズによる免疫沈降を行った。沈殿物を溶出し、抗 Myc 抗体および抗 FLAG 抗体で免疫ブロッティングを行った。

(C) (D). Npr2 と Iml1 は Npr3 非依存的に相互作用する

iml1-myc 株 (CA8561), *FLAG-npr2* 株 (CA8594), *iml1-myc FLAG-npr2* 株 (CA8602), *iml1-myc FLAG-npr2 Δnpr3* 株 (CA12335) において、(A) (B) と同様の手法で、FLAG 抗体結合ビーズおよび Myc 抗体結合ビーズを用いた共免疫沈降実験を行った後、溶出した沈殿物に対して、抗 Myc 抗体および抗 FLAG 抗体による免疫ブロッティングを行った。

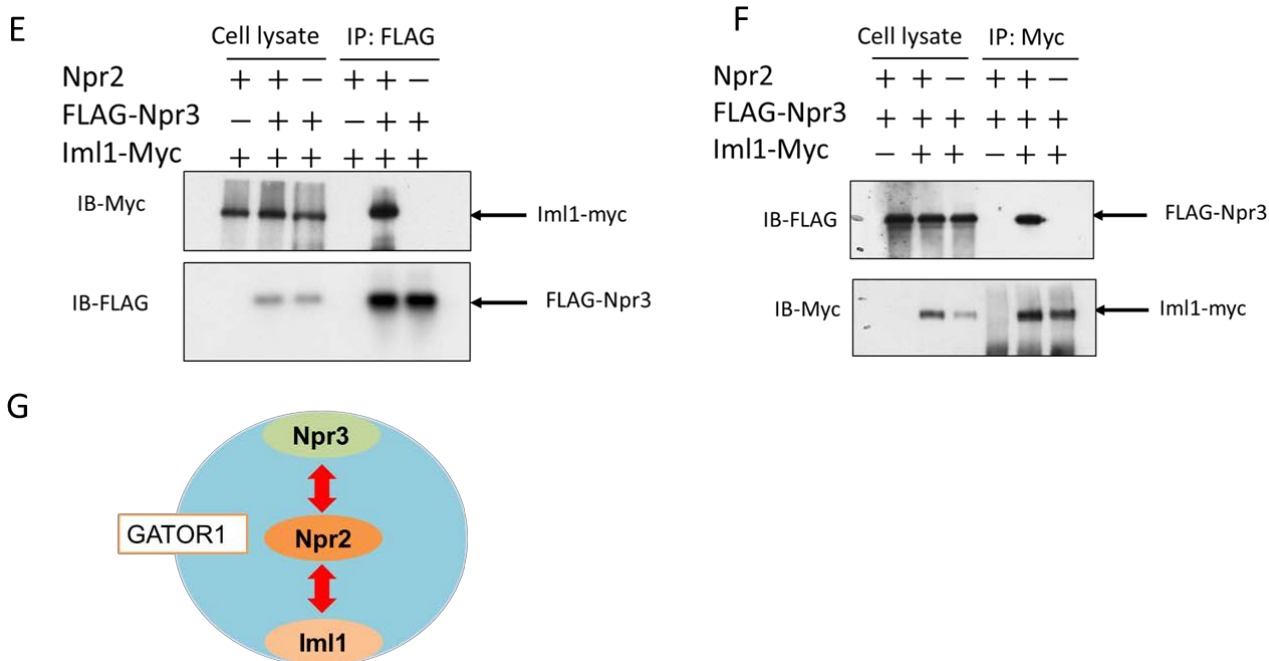


Figure .8 Iml1 と Npr3 は Npr2 を介して相互作用することで GATOR1 複合体を形成する

(E) (F). Npr2 は Iml1 と Npr3 の相互作用に必要である。

iml1-myc 株 (CA8561), *FLAG-npr3* 株 (CA8596), *iml1-myc FLAG-npr3* 株 (CA8604), *iml1-myc FLAG-npr3 Δnpr2* 株 (CA12337) において、(A) と同様の手法で、FLAG 抗体結合ビーズおよび Myc 抗体結合ビーズを用いた共免疫沈降実験を行った後、溶出した沈殿物に対して、抗 Myc 抗体および抗 FLAG 抗体による免疫ブロッキングを行った。

(G). GATOR1 構成因子の結合模式図

Iml1 と Npr3 は Npr2 を介して相互作用することで複合体を形成している

3-3. GATOR1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子である

GATOR1 複合体が、TORC1 活性を制御しているかを検討するため、GATOR1 複合体の構成因子である Iml1, Npr2, Npr3 の遺伝子破壊株をそれぞれ作製した。まず、作製した Iml1 の遺伝子破壊株において、TORC1 の活性化に必須である培地中の窒素源を除去した際の TORC1 活性の変化を、野生株および Gtr1 の遺伝子破壊株と比較した (Fig .9A)。なお、TORC1 活性の変化は、TORC1 特異的に活性化される Psk1 キナーゼのリン酸化レベルを指標として評価した (Nakashima et al., 2012)。その結果、野生株は、窒素源飢餓処理を行った 30 分後には、Psk1 が完全に脱リン酸化され、TORC1 が不活性化している。一方、Iml1 の遺伝子破壊株では、TORC1 の不活性化は見られず、窒素源飢餓処理 60 分後においても、高い TORC1 活性を維持した。つまり、GATOR1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子であることが示唆された。加えて、Npr2 および Npr3 の遺伝子破壊株も Iml1 の遺伝子破壊株と同様に、高い TORC1 活性を示したことから、Npr2 および Npr3 は GATOR1 複合体による TORC1 活性の抑制に必須であることを見出した (Fig .9B)。さらに、Iml1, Npr2 および Npr3 が 1 つの複合体として TORC1 活性を抑制しているかを検討するため、Iml1, Npr2 および Npr3 の 3 重遺伝子破壊株において、培地中の窒素源を除去した際の TORC1 活性の変化を、Iml1 の遺伝子破壊株と比較した。その結果、Iml1, Npr2 および Npr3 の 3 重遺伝子破壊株は Iml1 の単独遺伝子破壊株と同じ挙動を示したことから、Iml1, Npr2, Npr3 は 1 つの複合体として機能することで TORC1 活性を抑制していることが示された (Fig .9C)。また、GATOR1 の遺伝子破壊株を単離した際、生育速度が非常に遅いことに気づき、Iml1, Npr2, Npr3 の単独遺伝子破壊株および Iml, Npr2, Npr3 の 3 重遺伝子破壊株を用いたスポットテストを行い、野生株と生育速度を比較した (Fig .9D)。その結果、GATOR1 の遺伝子破壊株は、Yeast extract 寒天培地 (以下、YES 寒天培地) 上において、生育が顕著に阻害されることがわかった。

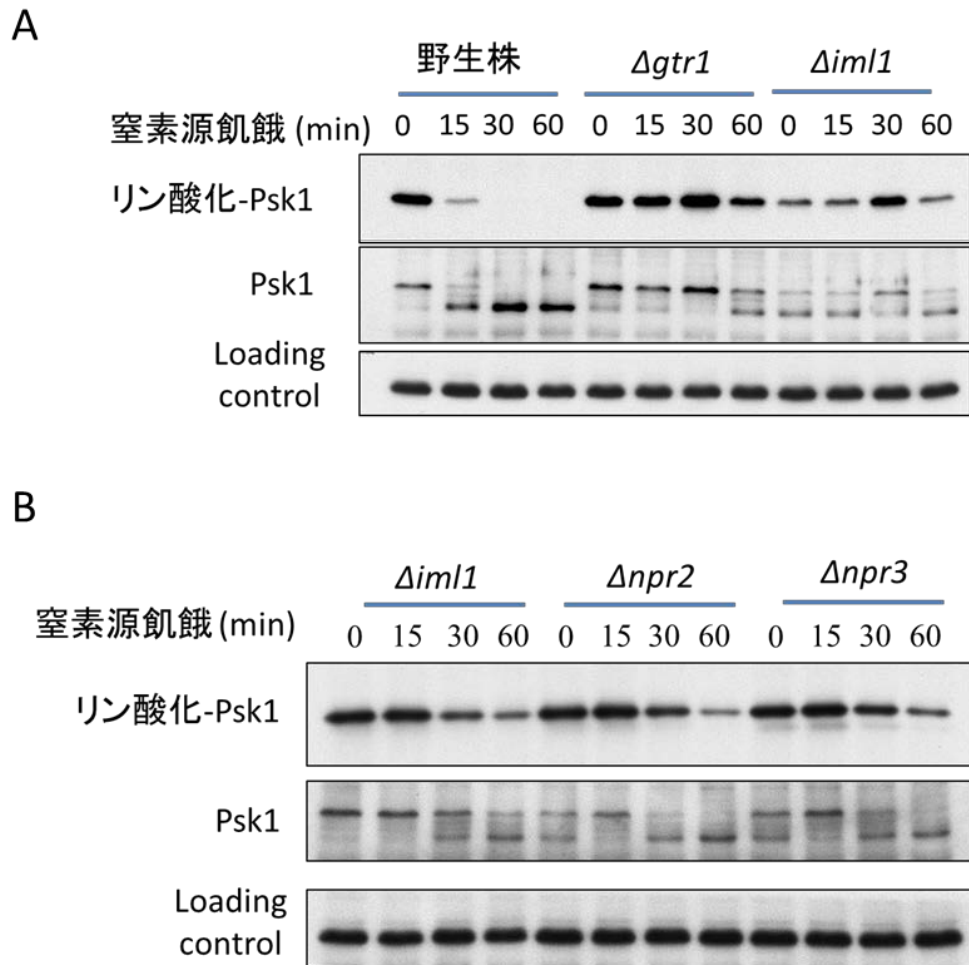


Figure . 9 GATOR1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子である

(A). GATOR1 は TORC1 活性を負に制御する

分裂酵母野生株 (CA1) , $\Delta gtr1$ 株 (CA9388) および $\Delta iml1$ 株 (CA9400) を対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) まで EMM 培地で培養後、窒素源を除去した培地 (EMM- NH_4Cl) に移し、0, 15, 30, 60 分後に集菌した。集菌した細胞から抽出した細胞粗抽出液に対して抗リン酸化 S6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗 Spc1 抗体を用いた免疫ブロッキングを行った。

(B). Npr2 および Npr3 は GATOR1 複合体による TORC1 活性の抑制に必須である

$\Delta iml1$ (CA9400) , $\Delta npr2$ (CA9402) , $\Delta npr3$ (CA9404) を (A) と同様のタイムコースで窒素源飢餓処理を行い、抽出した細胞粗抽出液に対して、抗リン酸化 S6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗 Spc1 抗体を用いた免疫ブロッキングを行った。

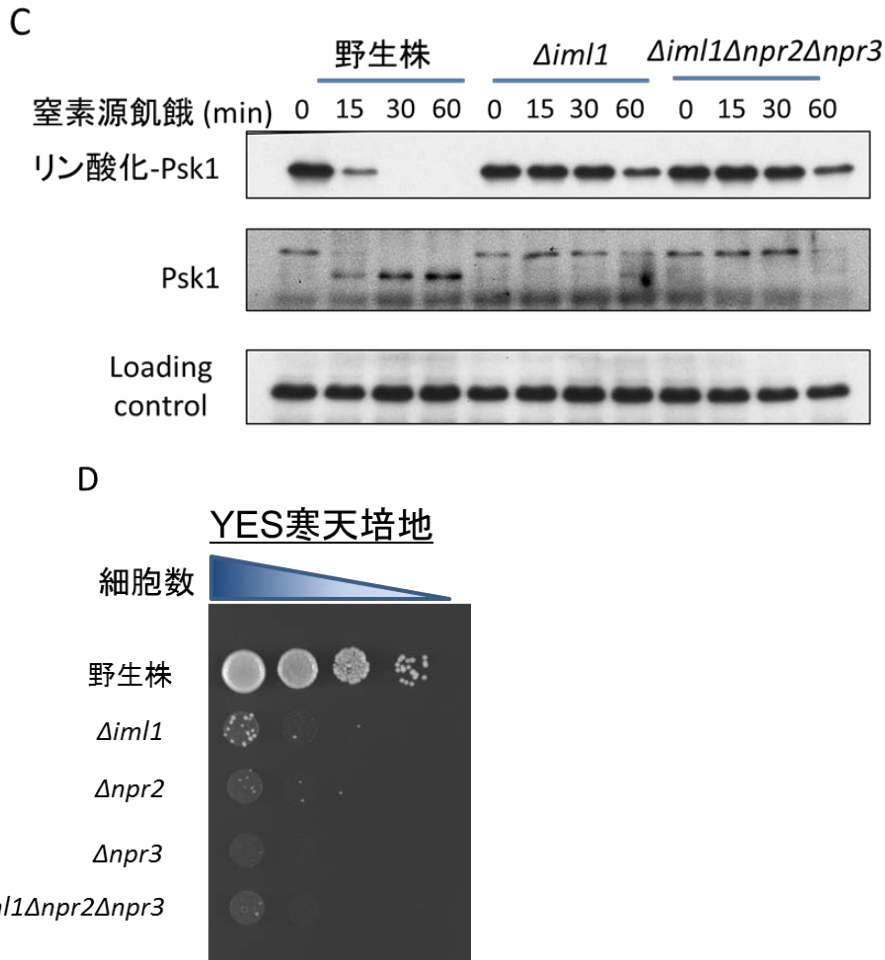


Figure . 9 GATOR1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子である

(C). Im11, Npr2, Npr3 は 1 つの複合体として TORC1 活性を制御する

分裂酵母野生株 (CA1) , $\Delta iml1$ 株 (CA9400) および $\Delta iml1 \Delta npr2 \Delta npr3$ 株 (CA9720) を (A) と同様のタイムコースで窒素源飢餓処理を行い、抽出した細胞粗抽出液に対して、抗リン酸化 S6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗 Spc1 抗体を用いた免疫ブロッキングを行った。

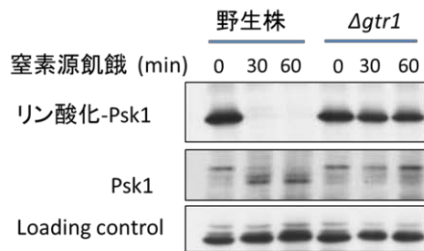
(D). GATOR1 構成因子の遺伝子破壊株は生育阻害を示す

分裂酵母野生株 (CA1)、 $\Delta iml1$ 株 (CA9400)、 $\Delta npr2$ 株 (CA9402) , $\Delta npr3$ 株 (CA9720) および $\Delta iml1 \Delta npr2 \Delta npr3$ 株 (CA9720) を対数増殖後期 ($OD_{600}=1$) まで EMM 培地で振盪培養した。その後、細胞培養液を 10 分の 1 ずつ 4 段階に希釈し、YES 寒天培地上にそれぞれ 3 μ L ずつ滴下し、30 $^{\circ}$ C で 3 日間静置培養した。

3-4. Gtr1 は TORC1 の活性を抑制する負の制御因子である

哺乳類細胞において、GATOR1 複合体は RagA/RagB に結合するヌクレオチドの GTP から GDP への加水分解を促進することで、TORC1 活性を抑制している。そこで、哺乳類細胞 RagA/RagB に相同なタンパク質である Gtr1 が、TORC1 活性を制御するかを検討するため、Gtr1 の遺伝子破壊株において、TORC1 の活性化に必須である培地中の窒素源を除去した際の、TORC1 活性の変化を野生株と比較した (Fig .10A)。驚くべきことに、Gtr1 の遺伝子破壊株では、TORC1 の不活性化は見られず、窒素源飢餓処理 60 分後においても、高い TORC1 活性を維持した。この結果から、Gtr1 は、TORC1 の活性を抑制する負の制御因子であることが示唆された。つまり、分裂酵母 Gtr1 は、これまで報告されていた哺乳類細胞 RagA/RagB の機能とは異なることが示唆された。Gtr1 による TORC1 活性の抑制機構の詳細を検討するため、出芽酵母 Gtr1 において報告されている、恒常的に GDP および GTP 結合型の Gtr1 を発現する変異 (Nakashima et al., 1999) (S21N, Q66L) を分裂酵母 Gtr1 に導入した変異株を作製した (Gtr1S16N, Gtr1Q61L) (Fig .10B)。作製した GDP および GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株を用いて、培地中の窒素源を除去した際の TORC1 活性を野生株と比較した (Fig .10C)。その結果、GTP 結合型の Gtr1 を発現する変異株は、Gtr1 の遺伝子破壊株と同様に、高い TORC1 活性を示したが、GDP 結合型の Gtr1 を発現する変異株は、野生株と同様の挙動で窒素源飢餓に応答して Psk1 が脱リン酸化された。この結果から、GDP 結合型 Gtr1 は、TORC1 が異常に活性化することを抑制し、TORC1 活性を最適な状態に維持するために必要であることが示唆された。また、Gtr1 の遺伝子破壊株、GDP 結合型 Gtr1 発現株 (S16N)、GTP 結合型 Gtr1 発現株 (Q61L) を用いたスポットテストを行い、野生株と生育速度を比較した (Fig .10D)。その結果、YES 寒天培地上において、Gtr1 の遺伝子破壊株および GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株は、GATOR1 の遺伝子破壊株と同様に著しい生育阻害を示した。一方、興味深いことに、GDP 結合型の Gtr1 を発現する変異株は、野生株と同等の生育速度を示した。つまり、Gtr1 の GDP 結合を維持し、TORC1 の異常な活性化を抑制することが、細胞の生育維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A



B

			S16	
<i>S. pombe</i>	1	MRKKVLLMGRSGSGKSSMRSIVFSNY	26	
<i>H.sapiens</i>	6	MKKKVLLMGKSGSGKTSMRSHIFANY	31	
<i>D. melanogaster</i>	1	MKKKVLLMGKSGSGKTSMRSHIFANY	26	
<i>S. cerevisiae</i>	5	NRKKLLLMGRSGSGKSSMRSIIFSNY	30	
<i>S. pombe</i>	51	LVLNLWDCGGQ ^Q EAFMENYLSA	71	
<i>H.sapiens</i>	56	LVLNLWDCGGQ ^Q DTFMENYFTS	76	
<i>D. melanogaster</i>	51	LVLNLWDCGGQ ^Q EGFMKQYFKT	71	
<i>S. cerevisiae</i>	55	MTLNLWDCGGQ ^Q DVFMENYFTK	75	Q61

Figure .10 Gtr1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子であり、この抑制には GDP 型の Gtr1 が必須である

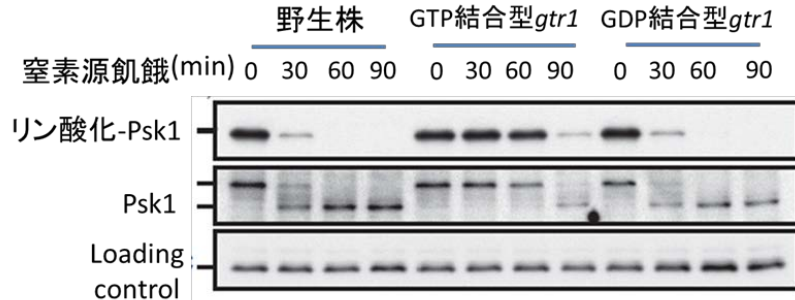
(A). Gtr1 は TORC1 活性を負に制御する

分裂酵母野生株 (CA1) および $\Delta gtr1$ 株 (CA9388) を対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) になるまで EMM 培地で培養後、窒素源飢餓培地 (EMM- NH_4Cl) に移し、0, 30, 60 分後に集菌した。集菌した細胞から抽出した細胞粗抽出液に対して、抗リン酸化 S6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗 Spc1 抗体を用いた免疫ブロッティングを行った。

(B). Gtr1S16N, Gtr1Q61L の作製

哺乳類細胞 RagA/RagB で報告されている RagA T21N(GDP 結合型)、RagA Q66L に相当する変異を Gtr1 に導入するため、アミノ酸配列を比較した。実際にアラニン置換を行った S16 および Q61 を赤字で示した。

C



D

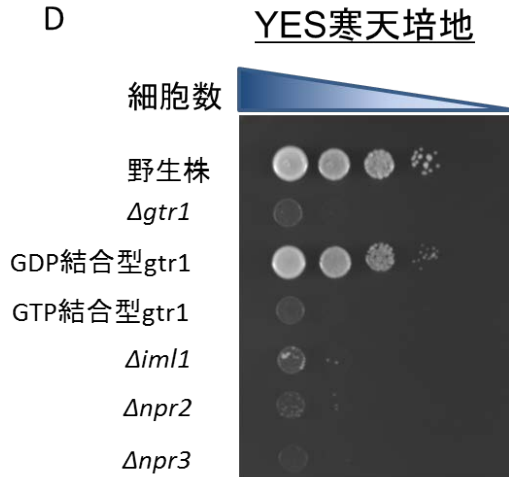


Figure .10 Gtr1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子であり、この抑制には GDP 型の Gtr1 が必須である

(C). GDP 型 Gtr1 は最適な TORC1 活性を維持するために必須である

分裂酵母野生株 (CA1)、GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株 (*gtrIQ61L*, CA9470) および GDP 結合型 Gtr1 発現する変異株 (*gtrIS16N*, CA9473) を (A) と同様の手法で窒素源飢餓処理(0, 30, 60, 90 分)を行い、抽出した細胞粗抽出液に対して、免疫ブロッティングを行った。

(D). GDP 型の Gtr1 は細胞の正常な生育に必要である

分裂酵母野生株 (CA1)、 $\Delta gtr1$ 株 (CA9388)、GTP 結合型 Gtr1 発現変異株 (*gtrIQ61L*, CA9470) および GDP 結合型 Gtr1 発現する変異株 (*gtrIS16N*, CA9473) を対数増殖後期 ($OD_{600}=1$) まで EMM 培地で振盪培養した後、培養液を 10 分の 1 ずつ 4 段階に希釈し、細胞希釈液を 3 μ L ずつ滴下し、30 $^{\circ}$ C で 3 日間静置培養した。

3-5. GATOR1 は Gtr1 を介して TORC1 活性を抑制する

哺乳類細胞において、GATOR1 複合体は RagA/RagB の GAP として、結合するヌクレオチドの GTP から GDP への加水分解を促進することで、TORC1 活性を抑制している。つまり、分裂酵母においても、GATOR1 複合体は哺乳類細胞 RagA/RagB に相同なタンパク質である Gtr1 を介して TORC1 活性を抑制していることが考えられる。そこで、まず遺伝学的解析により Gtr1 が GATOR1 の下流で働くかを検討した (Fig .11A)。Iml1、Npr2 および Npr3 の遺伝子破壊株に、GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異 (Q61L) を導入し、GATOR1 の遺伝子欠損および GDP 結合型 Gtr1 のどちらの表現型が優位であるかを検討した。その結果、GATOR1 構成因子の遺伝子欠損株が示した生育阻害は、GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異の導入によって完全に抑圧された。つまり、Gtr1 は GATOR1 の下流で機能することが示唆された。さらに、これらの株を用いて、培地中の窒素源を除去した際の TORC1 活性の変化を、野生株および iml1 の遺伝子破壊株と比較した (Fig .11B)。その結果、Iml1 の遺伝子破壊株が示した TORC1 の活性化は、GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異 (S16N) の導入によって完全に抑圧されことから、遺伝学および生化学の両面から、Gtr1 は GATOR1 の下流で機能することが示された。つまり、GATOR1 複合体は GAP として、Gtr1 に結合した GTP の GDP への加水分解を促進することで、TORC1 活性を抑制していることが示唆された。

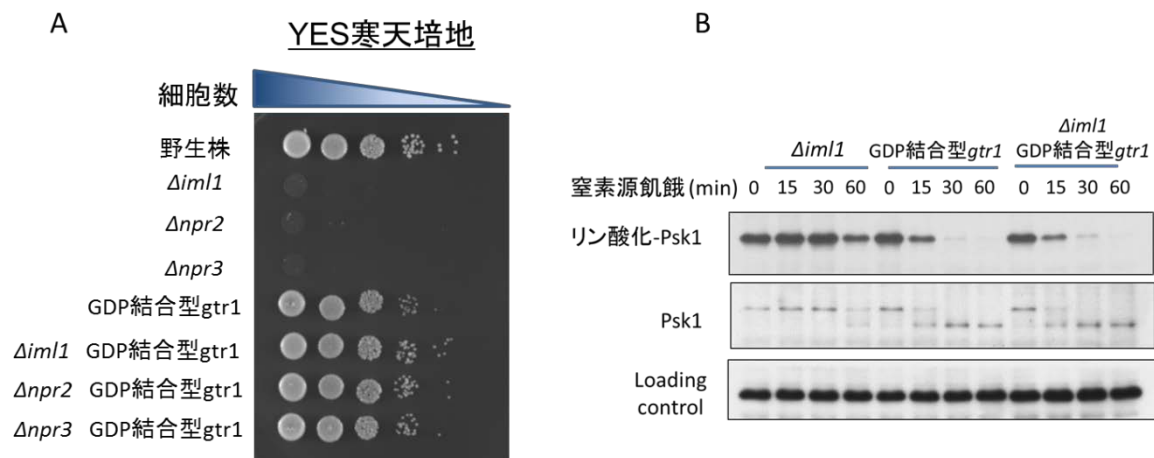


Figure . 11 GATOR1 は Gtr1 を介して TORC1 活性を抑制する

(A). GATOR1 構成因子の遺伝子破壊株が示す生育の遅延は、GDP 結合型の Gtr1 を発現する変異の導入によって抑圧された

分裂酵母野生株 (CA1), $\Delta iml1$ (CA9400), $\Delta npr2$ (CA9402), $\Delta npr3$ (CA9404), $\Delta iml1$ に GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異を導入した株 (CA9560), $\Delta npr2$ に GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異を導入した株 (CA9562), $\Delta npr3$ に GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異を導入した株 (CA9564) を対数増殖後期 ($OD_{600}=1$) になるまで EMM 培地で振盪培養した。その後、細胞培養液を 10 分の 1 ずつ 4 段階に希釈し、YES 寒天培地上にそれぞれ 3 μ L ずつ滴下し、30 $^{\circ}$ C で 3 日間静置培養した。

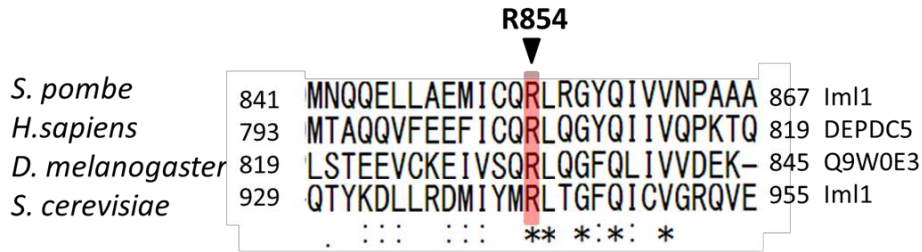
(B). Iml1 遺伝子破壊株が示す TORC1 の活性化は、GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異の導入によって抑圧された

$\Delta iml1$ 株 (CA9400), GDP 結合型 Gtr1 発現変異株 (*gtr1*S16N, CA9473) および、 $\Delta iml1$ に GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異 (S16N) を導入した株 (CA9560) を対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) になるまで EMM 培地で培養後、窒素源を除去した窒素源飢餓培地 (EMM- NH_4Cl) に移し、0, 15, 30, 60 分後に集菌した。集菌した細胞から抽出した細胞粗抽出液に対して抗リン酸化 S6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗 Spc1 抗体を用いた免疫ブロッティングを行った。

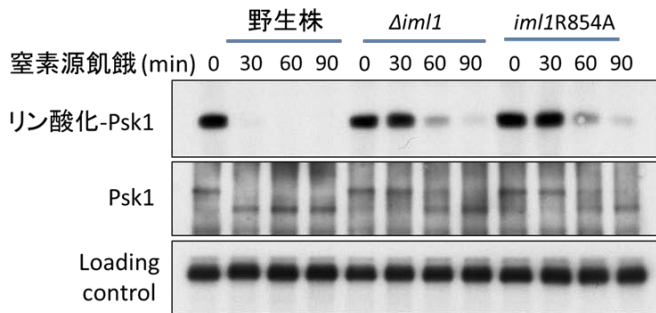
3-6. GATOR1 は Iml1 の GAP 活性依存的に TORC1 活性を抑制する

哺乳類細胞において、GATOR1 構成因子である DEPDC5 は GAP ドメインを有しており、GATOR1 は DEPDC5 の GAP 活性依存的に TORC1 活性を抑制していることが予想される。DEPDC5 の相同タンパク質である Iml1 も GAP ドメインを有していることから、GATOR1 の GAP 活性は Iml1 が担っていると考えられる。そこで、Iml1 の GAP 活性が TORC1 活性の制御に果たす役割を検討するため、Iml1 の GAP 活性を担う Arginine finger に変異 (R854A) を導入した株を作製した (Fig .12A)。そして、作製した GAP 活性を欠失した *iml1* 変異株 (R854A) において、窒素源を除去した際の TORC1 活性を野生株及び、Iml1 遺伝子破壊株と比較した。その結果、GAP 活性を欠失した *iml1* 変異株 (R854A) は、野生株と比べて高い TORC1 活性を示した。つまり、GATOR1 は構成因子である Iml1 の GAP 活性依存的に TORC1 活性を抑制していることを明らかにした (Fig .12C)。

A



B



C

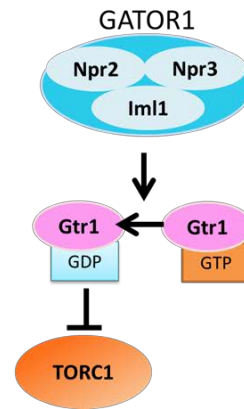


Figure . 12 GATOR1 は Iml1 の GAP 活性依存的に TORC1 活性を抑制する

(A). GAP 活性を欠失させた *iml1* 変異 (R854A) 株の作製

哺乳類細胞 DEPDC5 で報告されている GAP 活性を欠失させる変異 (R806A) を Iml1 に導入するため相同なアミノ酸部位を解析した。赤字は実際に変異を導入した R854 を示している。

(B). TORC1 活性は GATOR1 の GAP 活性依存的に抑制されている

分裂酵母野生株 (CA1), $\Delta gtr1$ 株 (CA9388) および GAP 活性を欠失した *iml1* 変異株 (R854A) (CA13452) を対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) になるまで EMM 培地で培養後、窒素源を除去した窒素源飢餓培地 (EMM- NH_4Cl) に移し、0, 30, 60, 90 分後に集菌した。集菌した細胞から抽出した細胞粗抽出液に対して抗リン酸化 S6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗 Spc1 抗体を用いた免疫ブロッティングを行った

(C) GATOR1-Gtr1 経路による TORC1 活性制御モデル図

GATOR1 は Gtr1 を介して TORC1 活性を負に制御する。

3-7. GATOR1-Gtr1 変異による TORC1 の活性化は、生育阻害を引き起こす

TORC1 が活性化する GATOR1 欠損株、GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株および Gtr1 の遺伝子欠損株では生育阻害を示し、TORC1 活性が抑えられている GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株では、生育阻害を示さなかった (Fig .9A、Fig .10C)。つまり、この生育阻害は、TORC1 の異常な活性化が原因であると考えられる。これを検証するため、TORC1 特異的な阻害剤であるラパマイシンを添加した YES 寒天培地を用いたスポットテスト解析を行った。その結果、GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株、Gtr1 および GATOR1 構成因子の遺伝子破壊株が示した生育阻害は、ラパマイシンの添加によって完全に抑圧された (Fig .13A)。このことから、GDP が結合した Gtr1 が無くなると、TORC1 が活性化し、細胞の生育を引き起こすことが示された。つまり、Gtr1 に結合するヌクレオチドを GDP に維持することは、TORC1 の異常な活性化を抑制し、細胞の正常な生育維持するために必要である (Fig .13B)。

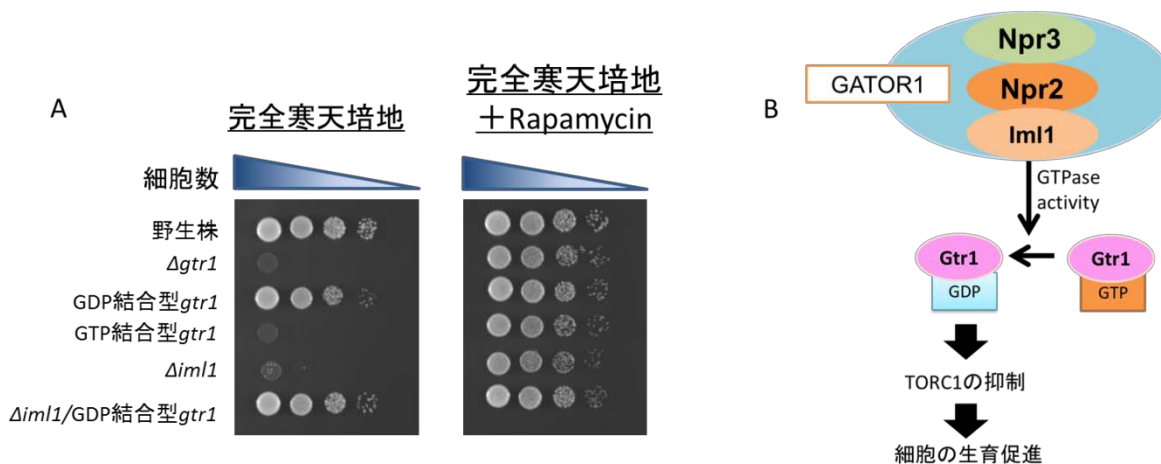


Figure .13 GDP 結合型 Gtr1 は、TORC1 活性を抑制することで細胞の生育を促進する

(A). GTP 結合型 Gtr1 が示す生育阻害はラパマイシンによって完全に抑圧される

分裂酵母野生株 (CA1), $\Delta gtr1$ (CA9388), GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株 (*gtr1S16N*, CA9473), GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株 (*gtr1Q61L*, CA9470), $\Delta iml1$ (CA9400), $\Delta iml1$ に GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異を導入した株 (CA9560) を対数増殖後期 ($OD_{600}=1$) になるまで EMM 培地で振盪培養した。その後、細胞培養液を 10 分の 1 ずつ 4 段階に希釈し、YES 寒天培地および YES+ラパマイシン培地上にそれぞれ 3 μ L ずつ滴下し、30°C で 3 日間静置培養した。

(B). GATOR1-Gtr1 による細胞の生育促進モデル図

GATOR1-Gtr1 による TORC1 活性の抑制は細胞の生育維持に必要なである。

3-8. GATOR1-Gtr1 の機能欠失株はアミノ酸を窒素源として利用できない

TORC1 シグナル伝達経路は、アミノ酸の取り込みを、正と負の両方に制御していることが知られている (Matsumoto et al., 2002; Van Slegtenhorst et al., 2004)。つまり、GATOR1-Gtr1 の遺伝子破壊株が示す生育阻害は、TORC1 の異常な活性化により、アミノ酸の取り込みが阻害されていることが原因だと仮説を立てた。これを検証するため、塩化アンモニウムを主要な窒素源とする合成寒天培地 (以下 EMM 培地) 上において、Gtr1-GATOR1 遺伝子欠損株と野生株の生育速度をスポットテストにより比較した (Fig .14) 。Gtr1-GATOR1 遺伝子欠損株が YES 寒天培地上で示した生育阻害は、EMM 寒天培地上では著しく抑圧された。また、YES 寒天培地上における GATOR1-Gtr1 遺伝子欠損株の生育阻害は、YES 寒天培地に塩化アンモニウムを添加することで抑圧された。さらに、当研究室の先行研究において、GATOR1 遺伝子欠損株は、アミノ酸を唯一の窒素源とする合成培地上において、生育できないことが明らかとなっている (Fajar 修士論文, . 2016)。つまり、これらの結果から、GATOR1-Gtr1 経路は、TORC1 活性を抑制することでアミノ酸の取り込みを促進している可能性が示唆された。

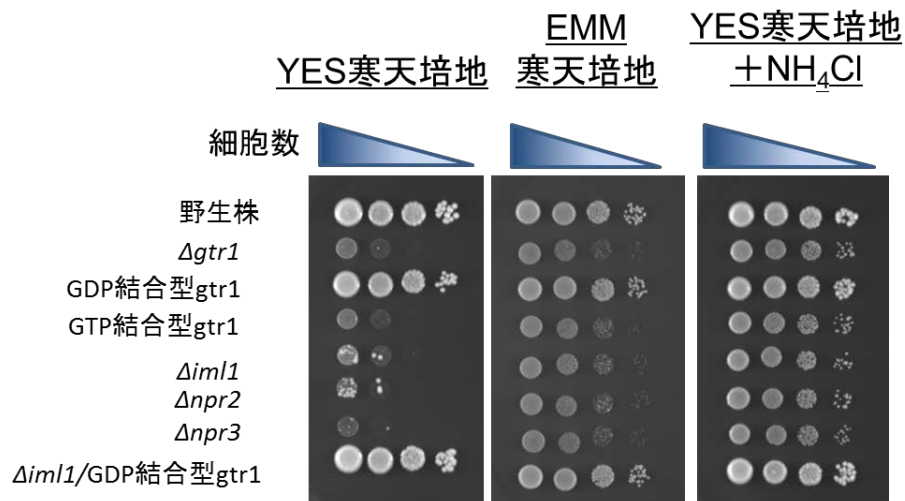


Figure .14 GATOR1-Gtr1 欠損株は塩化アンモニウムを窒素源とする培地では生育阻害を示さない

分裂酵母野生株 (CA1) , $\Delta gtr1$ (CA9388) ,GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株 ($gtrIS16N$, CA9473),GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株 ($gtrIQ61L$, CA9470) , $\Delta iml1$ (CA9400) , $\Delta iml1$ に GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異を導入した株 (CA9560) を対数増殖後期 ($OD_{600}=1$) になるまで EMM 培地で振盪培養した。その後、細胞培養液を 10 分の 1 ずつ 4 段階に希釈し、YES 寒天培地、塩化アンモニウムを加えた YES 寒天培地 (YES+NH₄Cl)、EMM 寒天培地上にそれぞれ 3 μ L ずつ滴下し、30 $^{\circ}$ C で 3 日間静置培養した。

3-9. GATOR1-Gtr1 は塩基性アミノ酸トランスポーターCat1 の細胞膜への局在を促進する

近年、TORC1 シグナル伝達経路は主要な塩基性アミノ酸トランスポーターである Cat1 の細胞膜への局在を抑制することが報告されている (Nakase *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2014)。TORC1 が活性化される栄養豊富な条件下において、Cat1 は、アダプタータンパク質である Any1 と複合体を形成するユビキチンリガーゼ Pub1 によって、ユビキチン化される。ユビキチン化された Cat1 はゴルジ体へとその局在が変化することで、アミノ酸の取り込みを抑制する。逆に、TORC1 が不活性化される栄養飢餓条件では、Cat1 は細胞膜上に局在することで、アミノ酸の取り込みを促進する。そこで、GATOR1-Gtr1 経路の欠損株が示すアミノ酸の取り込み阻害は、塩基性アミノ酸トランスポーターである Cat1 の細胞内局在制御が原因であるかを検討した。Cat1 の C 末端側に黄緑蛍光タンパク質である、mNeonGreen を付加した株を作製し、Gtr1 および GATOR1 遺伝子欠損株における細胞内局在の変化を、蛍光顕微鏡下で観察した (Fig. 15A, B)。その結果、Cat1 は野生株および GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株では、主に細胞膜に局在した。一方、GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株、Gtr1 および GATOR1 の遺伝子破壊株において、Cat1 は細胞膜ではなく、その多くが細胞質内に局在していた。また Gtr1 および Iml1 の遺伝子破壊株において、Cat1 はゴルジ体に局在化していることが知られている Krp1 (Matsuyama *et al.*, 2006) と共局在したことから (Fig. 15C)、GATOR1-Gtr1 は TORC1 活性を抑制することで、塩基性アミノ酸トランスポーター Cat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進していることが示唆された。

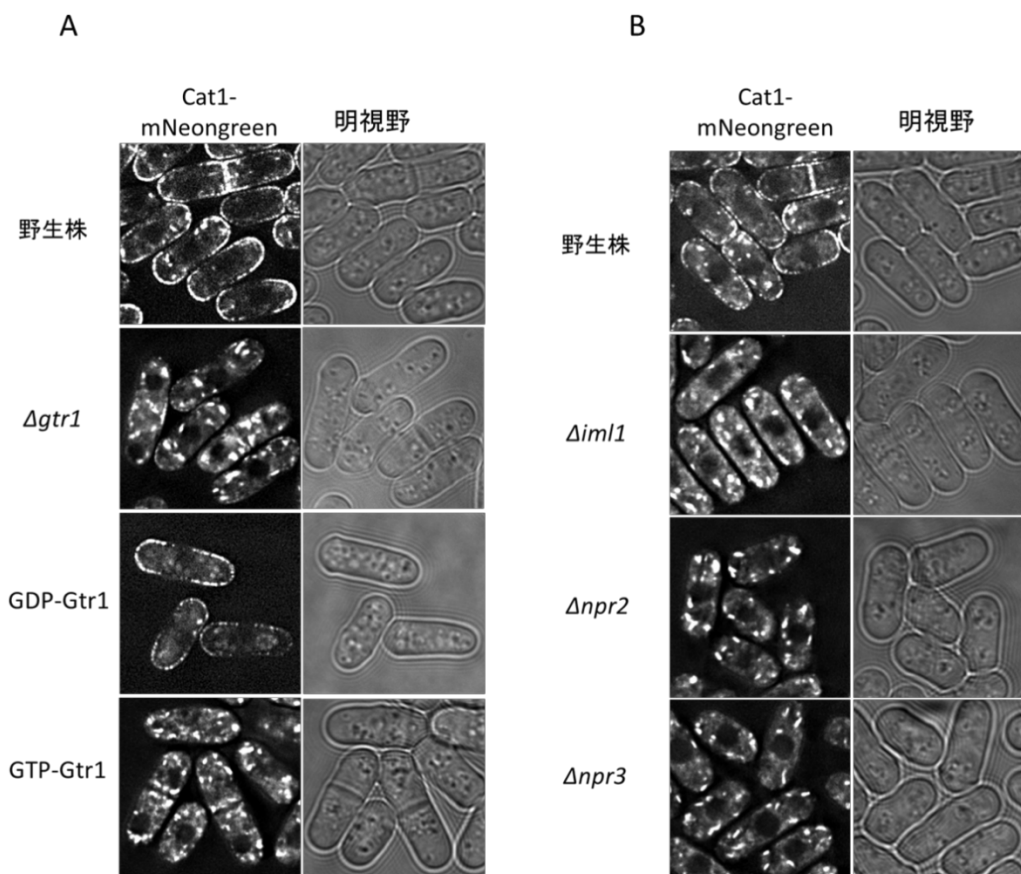


Figure . 15 GATOR1-Gtr1 は Cat1 の細胞膜への局在を促進する

(A). GDP 結合型 Gtr1 は Cat1 の細胞膜への局在化を促進する

cat1-mNeonGreen (CA11268) , $\Delta gtr1 cat1-mNeonGreen$ (CA11250) , *gtr1S16N cat1-mNeonGreen* (CA11254) , *gtr1Q61L cat1-mNeonGreen* (CA11256) を EMM 培地で培養した対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) の細胞培養液を 1.5 mL チューブに 1 mL 回収し遠心を行った (RT, 5000rpm, 1min)。上清を完全に除去した後、50 μ L の EMM 培地を加え、ボルテックスミキサー (TAITEC) でよく攪拌し、これを観察用細胞試料として、蛍光顕微鏡下で蛍光観察を行った。

(B). GATOR1 の遺伝子破壊は Cat1 の細胞膜への局在を抑制する

cat1-mNeonGreen (CA11268) , $\Delta iml1 cat1-mNeonGreen$ (CA11258) , $\Delta npr2 cat1-mNeonGreen$ (CA11260) , $\Delta npr3 cat1-mNeonGreen$ (CA11262) を (A) 同様の手法で試料を調製し、蛍光顕微鏡下で蛍光観察を行った。

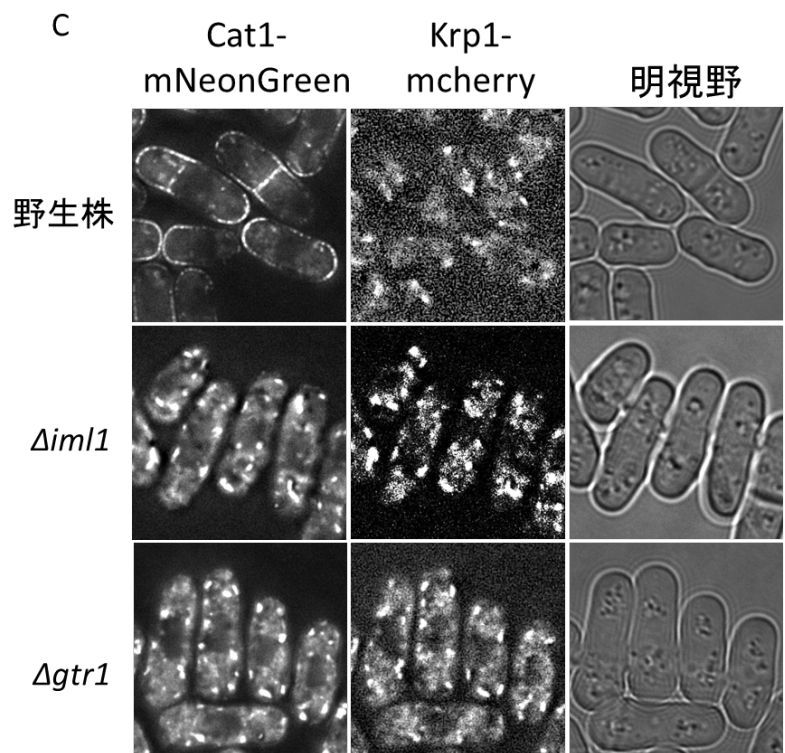


Figure . 15 GATOR1-Gtr1 は Cat1 の細胞膜への局在を促進する

(C). Cat1 は TORC1 の活性化に伴って細胞膜からゴルジへと局在が移行する *cat1-mNeonGreen krp1-mcherry* (CA11665), $\Delta iml1 krp1-mcherry cat1-mNeonGreen$ (CA11761), $\Delta gtr1 krp1-mcherry cat1-mNeonGreen$ (CA11759) を (A) 同様の手法で試料を調製し、蛍光顕微鏡下で蛍光を観察した。

3-10. GATOR1-Gtr1 は、TORC1 の抑制によるアミノ酸の取り込み促進および細胞の生育維持に必須である

TORC1 が活性化される栄養豊富な条件下において、Cat1 はアダプタータンパク質である Any1 と複合体を形成するユビキチンリガーゼ Pub1 によって、ユビキチン化される (Nakashima et al., 2014)。また、このユビキチン化によって Cat1 はエンドサイトーシスにより、ゴルジ体へとその局在が変化するため、Pub1 および Any1 の遺伝子破壊株においては、Cat1 は栄養豊富な条件下でも細胞膜に局在する。そこで、Gtr1 および GATOR1 の遺伝子破壊株で観察された Cat1 のゴルジ体への局在を、強制的に細胞膜上に局在化させることで、YES 寒天培地上で示した生育阻害が、回復すると仮説を立てた。これを検証するため、まず Gtr1、Iml1 と Any1 および Pub1 の 2 重遺伝子破壊株を作製し、この遺伝子破壊株における Cat1 の細胞内局在を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、Gtr1 および Iml1 の遺伝子破壊株が示した Cat1 のゴルジ体への局在は、Any1 および Pub1 の遺伝子を破壊することによって抑圧され、その多くが細胞膜上に局在した (Fig .16A, B)。つまり、これらの株ではアミノ酸の取り込みが回復していることが考えられる。そこで、GATOR1 構成因子と Any1 および Pub1 の 2 重遺伝子欠損株において、細胞の生育が回復するかをスポットテスト解析により検討した。その結果、GATOR1 構成因子欠損株が示した YES 寒天培地上における生育阻害は、Any1 および Pub1 の遺伝子破壊によって大きく抑圧された (Fig .16C, D)。これらの結果から、GATOR1-Gtr1 は TORC1 の活性を抑制することによって、塩基性アミノ酸トランスポーター-Cat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育を維持していると結論付けた (Fig .16E)。また、塩化アンモニウムを窒素源とする EMM 寒天培地上における、Gtr1 および GATOR1 欠損株の生育に、Any1 および Pub1 の遺伝子破壊が影響を与えなかったことも、この結論と一致する。

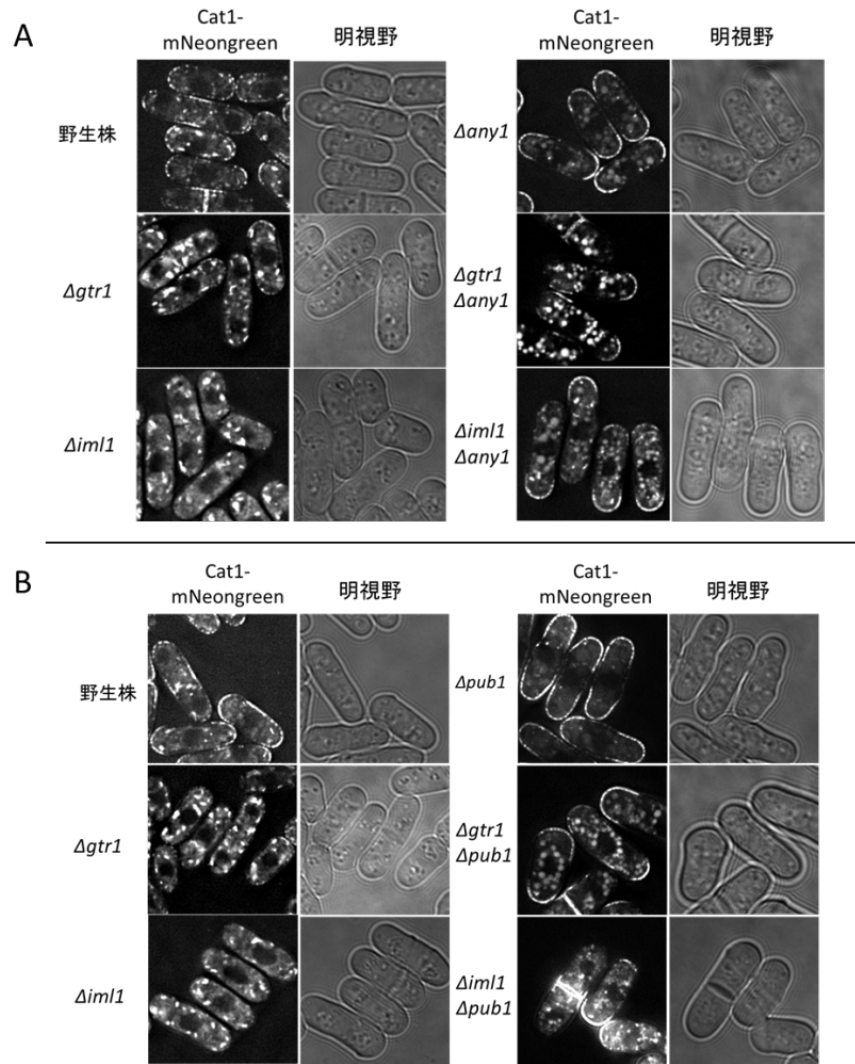


Figure .16 GATOR1-Gtr1 は塩基性アミノ酸トランスポーターCat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育維持に重要な役割を果たす

(A) (B). Any1 および Pub1 の遺伝子欠損は GATOR1-Gtr1 欠損による Cat1 の細胞膜からゴルジ体への局在変化を抑圧する

cat1-mNeonGreen (CA11268) , $\Delta gtr1 cat1-mNeonGreen$ (CA11250) , $\Delta any1 cat1-mNeonGreen$ (CA12152) , $\Delta gtr1 \Delta any1 cat1-mNeonGreen$ (CA12154) , $\Delta iml1 \Delta any1 cat1-mNeonGreen$ (CA12158) , $\Delta pub1 cat1-mNeonGreen$ (CA11617) , $\Delta gtr1 \Delta pub1 cat1-mNeonGreen$ (CA11619) , $\Delta iml1 \Delta pub1 cat1-mNeonGreen$ (CA11621) を EMM 培地 で対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$)まで培養し、蛍光顕微鏡下で蛍光観察を行った。

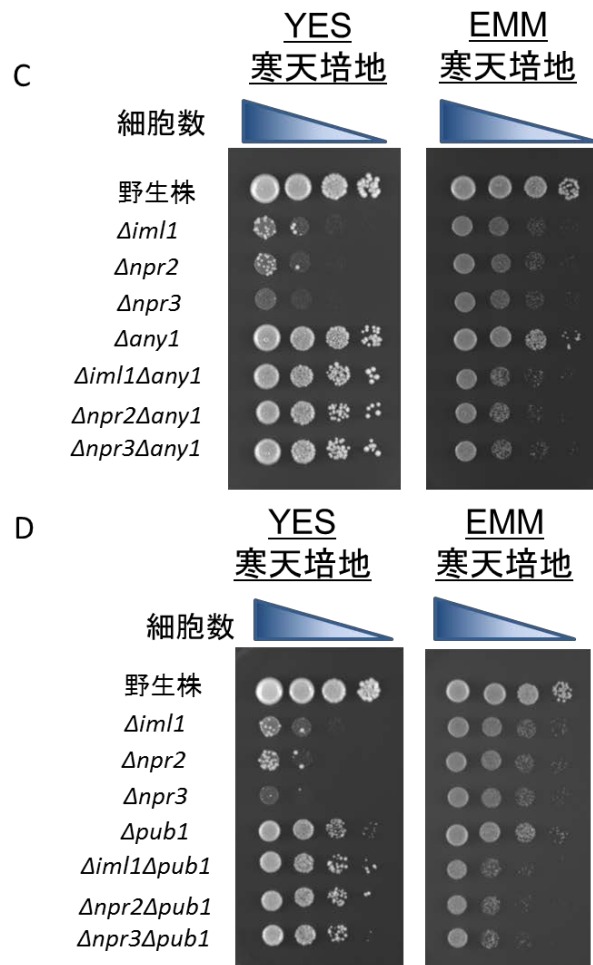


Figure .16 GATOR1-Gtr1 は塩基性アミノ酸トランスポーターCat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育維持に重要な役割を果たす

(C) (D). GATOR1 遺伝子欠損株が示す生育阻害は、Any1 および Pub1 の遺伝子を欠損させることで大きく抑圧された

分裂酵母野生株 (CA1) , $\Delta iml1$ (CA9400) , $\Delta npr2$ (CA9402) , $\Delta npr3$ (CA9404) , $\Delta any1$ (CA11491) , $\Delta iml1 \Delta any1$ (CA11497) , $\Delta npr2 \Delta any1$ (CA12162) , $\Delta npr3 \Delta any1$ (CA12164) , $\Delta pub1$ (CA10361) , $\Delta iml1 \Delta pub1$ (CA11244) , $\Delta npr2 \Delta pub1$ (CA11246) , $\Delta npr3 \Delta pub1$ (CA11248) を $OD_{600}=1$ まで EMM 培地で培養した後、培養液を 10 分の 1 ずつ 4 段階に希釈し、YES 寒天培地および EMM 寒天培地上にそれぞれ 3 μ L ずつ滴下し、30°C で 3 日間静置培養した。

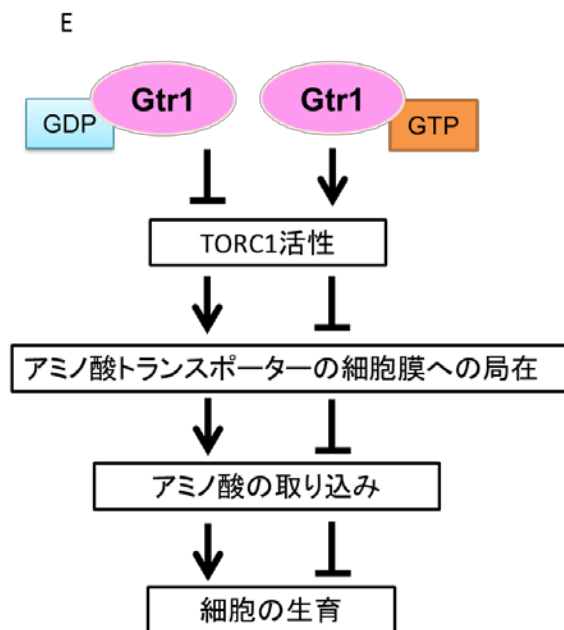


Figure .16 GATOR1-Gtr1 は塩基性アミノ酸トランスポーターCat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育維持に重要な役割を果たす

(E). Gtr1-TORC1 経路による細胞の生育制御モデル図

GDP 結合型 Gtr1 は TORC1 活性を抑制することで、塩基性アミノ酸トランスポーターCat1 を細胞膜上へ局在化させ、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育を維持している。一方、GTP 結合型 Gtr1 は、TORC1 を活性化することで、アミノ酸の取り込みを抑制する。

3-11. 窒素源に応じた TORC1 活性の制御は局在以外の機構によって担われている

現在、広く流布している TORC1 制御モデル (Efeyan et al., 2012) では、アミノ酸に応答して GTP 結合型に交換された RagA/RagB が、TORC1 をリソソーム膜上へリクルートする。そして、リソソーム膜上へとリクルートされた mTORC1 は、Rheb によって活性化される。一方、アミノ酸飢餓時には、GATOR1 が RagA/RagB に結合した GTP の GDP への加水分解を促進することで、mTORC1 がリソソーム膜から細胞質へと移行する。細胞質へと移行した mTORC1 は、Rheb による活性化を受けることができず、不活化する。つまり、哺乳類細胞において、アミノ酸に応答した mTORC1 の活性制御に最も重要なステップは、mTORC1 の細胞内局在の変化だと言える。しかし、出芽酵母 TORC1 の細胞内局在はアミノ酸の有無に影響を受けず、液胞膜上に局在することが報告されるなど (Binda et al. 2009)、窒素源に応じた TORC1 の活性化が、TORC1 の細胞内局在依存的であるかは、未だ不明な点が多い。そこで、窒素源に応じて活性が制御されている、分裂酵母 TORC1 の細胞内局在が、窒素源に応答して変化するかを検討した。TORC1 の細胞内局在を観察するため、TORC1 の構成因子である Mip1 の C 末端側に mNeonGreen を付加した株を作製し、窒素源の有無における細胞内局在の変化を観察した。なお、液胞膜を染色するため SynptoRed™ C2 (染色された細胞膜が エンドサイトーシスで取り込まれ、液胞などの細胞小器官が染色される) を使用した。窒素源を含む通常培養条件において、TORC1 は液胞膜上に局在した。興味深いことに、窒素源飢餓処理を 1 時間行い、TORC1 が十分に不活性化している条件においても、TORC1 の局在は変化せず、液胞膜上に局在した (Fig .17A) 。つまり、窒素源に応じた TORC1 の活性化および不活性化は、局在以外の機構によって制御されていることが示唆された。また、Gtr1 がヌクレオチドの結合状態に依存して、TORC1 を液胞膜上へとリクルートする機能を有しているかを検討するため、Gtr1 遺伝子破壊株、GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株および、GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株における、TORC1 の細胞内局在を観察した。興味深いことに、Gtr1 の遺伝子破壊株、および GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株においても、TORC1 は液胞膜上に局在したことから、分裂酵母 TORC1 は、Gtr1 に非依存的に液胞膜に局在していることが明らかになった。つまり、Gtr1 は局在以外の制御機構で、TORC1 活性を抑制していることが示唆された (Fig .17B)。

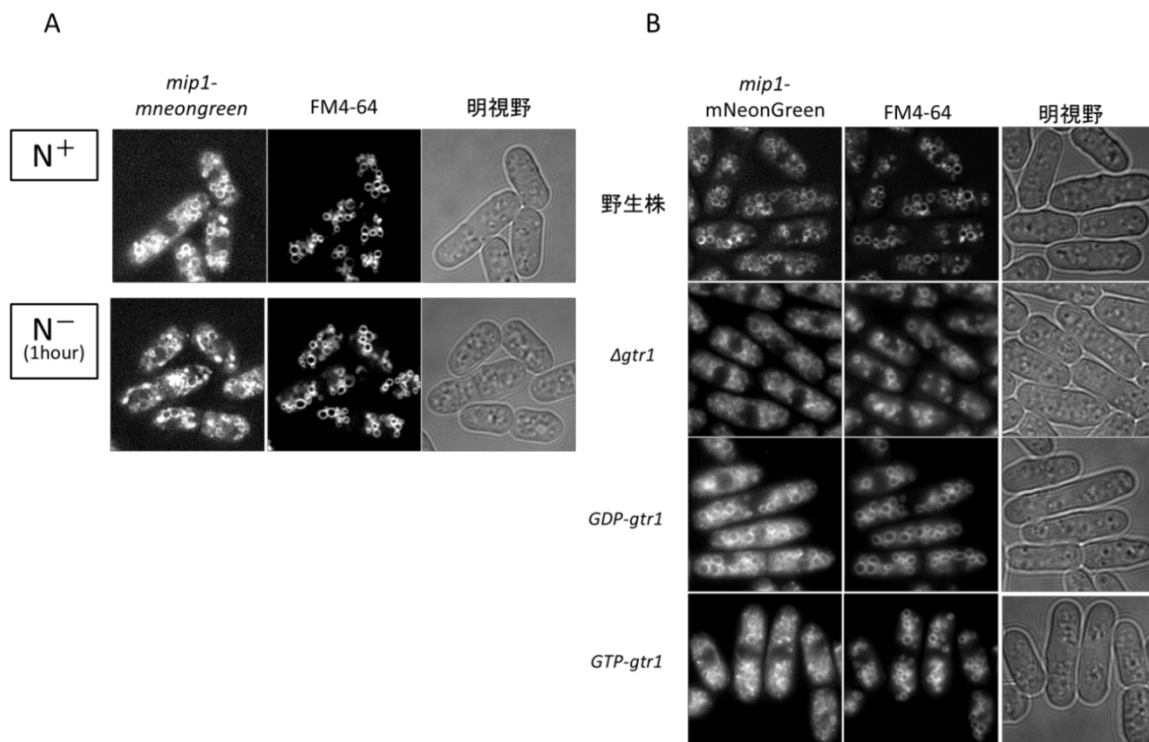


Figure .17 窒素源に応じた TORC1 の活性は局在非依存的な制御機構によって調節されている

(A). TORC1 は窒素源枯渇条件においても液胞膜上に局在する

mip1-mNeonGreen(CA13453)を EMM 培地 で対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$)まで培養した後、培地中の窒素源を除去した EMM 培地 (EMM-NH₄Cl)に移し、1 時間処理した後、蛍光顕微鏡下で観察した。

(B). Gtr1 は TORC1 の液胞膜上の局在に影響を与えない

mip1-mNeonGreen(CA13453), Δ *gtr1* *mip1-mNeonGreen*(CA11689), *gtr1S16N* *mip1-mNeonGreen*(CA13454), *gtr1Q61L*(CA13455)を EMM 培地 で対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$)まで培養した後、(A)同様に蛍光顕微鏡下で観察した。

3-12. GATOR-Gtr1 経路は液胞の形態を制御する

液胞は環境の変化に応答し、分裂および結合することで、その大きさおよび数が変化する (Baars et al. 2007)。この液胞の形態変化は、細胞内の pH などの恒常性を維持し、浸透圧ストレス、栄養飢餓や代謝等に、適切に応答するために重要な役割を果たしている (Li and Kane 2009)。近年、ER ストレスによって誘導される液胞の分裂は、TORC1 特異的な阻害剤であるラパマイシンによって抑制することが報告され、TORC1 活性が液胞の形態を制御することが示唆されていた (Michaillat et al. 2012)。本研究においても、Gtr1 の欠損株では液胞の大きさが低下していることが示唆されていた (Fig. 18B)。さらに、GATOR1-Gtr1 経路が液胞の形態を制御するかを検討するため、Gtr1 および GATOR1 の遺伝子破壊株を用いて、SynptoRed™ C2 による液胞膜の染色を行い、液胞の大きさ(直径)を測定した。その結果、GATOR1, Gtr1 の遺伝子破壊株および GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株においては、液胞の大きさが著しく低下し、液胞数が著しく増加していることが明らかになった。また、この液胞の表現型は、恒常的に GDP 結合型の Gtr1 を発現する変異を導入することによって抑圧された。したがって、Gtr1 は結合するヌクレオチド依存的に、液胞の形態を制御している可能性が示唆された。

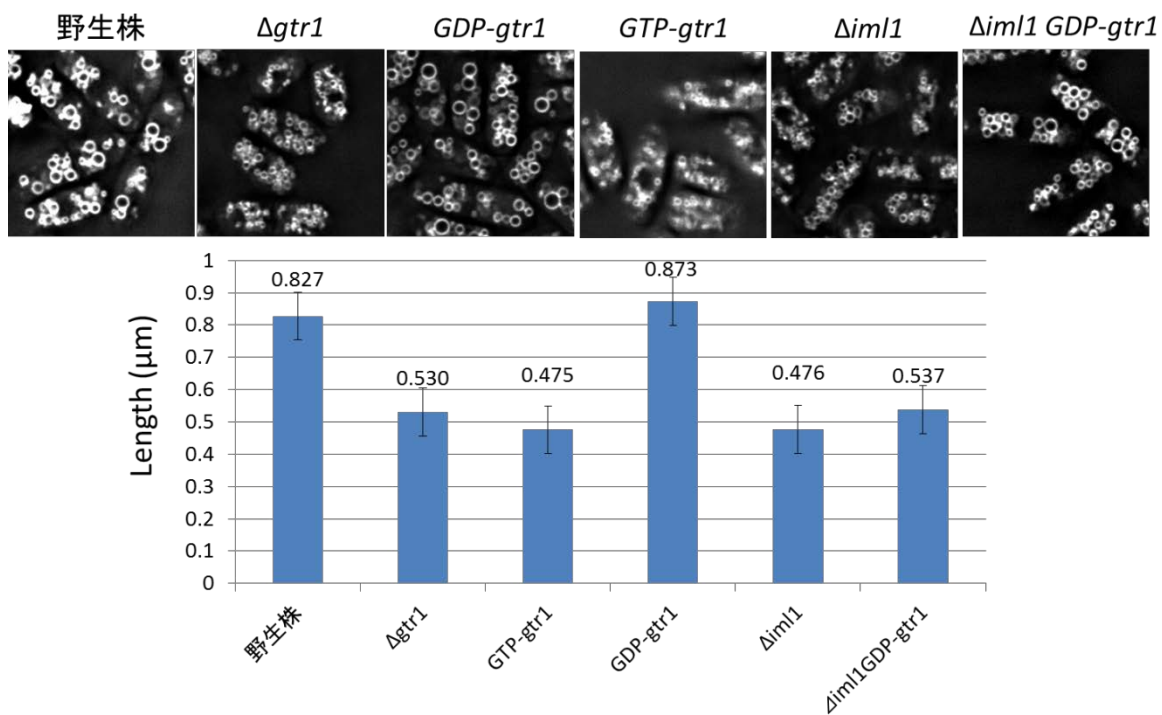


Figure . 18 GATOR-Gtr1 経路は液胞の形態を制御する

分裂酵母野生株 (CA1) , $\Delta gtr1$ (CA9388) , GDP 結合型 Gtr1 発現株 (CA9473) , GTP 結合型 Gtr1 発現株 (CA9470) , $\Delta iml1$ (CA9400) , $\Delta iml1$ GDP 結合型 Gtr1 発現株 (CA9560) を EMM 培地 で対数増殖期 ($OD_{600}=0.2$) まで培養した後、SynptoRed™ C2 で液胞膜を染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。その後、液胞の大きさ(直径)を測定した。

4. 考察

4-1. 本研究の結論

現在、広く流布している哺乳類細胞 TORC1 (mTORC1) 制御モデル (Sabatini モデル) では、リソソーム膜上に局在する低分子量 G タンパク質 RagA/RagB が、アミノ酸に応答して GTP 結合型に交換される。その結果、mTORC1 がリソソーム膜上へリクルートされ、そこに局在する Rheb と呼ばれる G タンパク質が mTORC1 を活性化する。一方、アミノ酸飢餓時には、GTPase-activating protein (GAP) 活性を有する GATOR1 複合体が、RagA/RagB に結合した GTP の GDP への加水分解を促進し、mTORC1 がリソソーム膜から細胞質へと解離することで、不活化すると考えられている。

本研究において、Iml1, Npr2, Npr3 が GATOR1 複合体を形成することを示し、GATOR1 複合体の構成因子である Iml1 の GAP 活性は、TORC1 活性の抑制に必須であることを明らかにした。さらなる遺伝学的解析から、GATOR1 が哺乳類細胞 RagA/RagB に相同な Gtr1 の GAP として機能することを示唆する結果を得て、GDP 結合型の Gtr1 が TORC1 活性を抑制する負の制御因子であることを示した。つまり、これまで単なる不活性化型とされてきた GDP 結合型の RagA/RagB の新たな生理機能が明らかになった。さらに、GATOR1-Gtr1 は、塩基性アミノ酸トランスポーターである Cat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、GATOR1-Gtr1 経路は、細胞の生育に最適な TORC1 活性を維持する役割をもつことが考えられる。

これらの結果から、Rag ファミリー G タンパク質が TORC1 の抑制に働くという、新規機能を発見し、Sabatini らが提唱した TORC1 活性化モデルとは異なる、TORC1 抑制制御モデルを提案した (Figure .19)。今後は、本研究によって明らかになった新たな TORC1 制御モデルを基に、哺乳類細胞でも Rag G タンパク質による TORC1 制御機構を再検討していく必要があると考える。

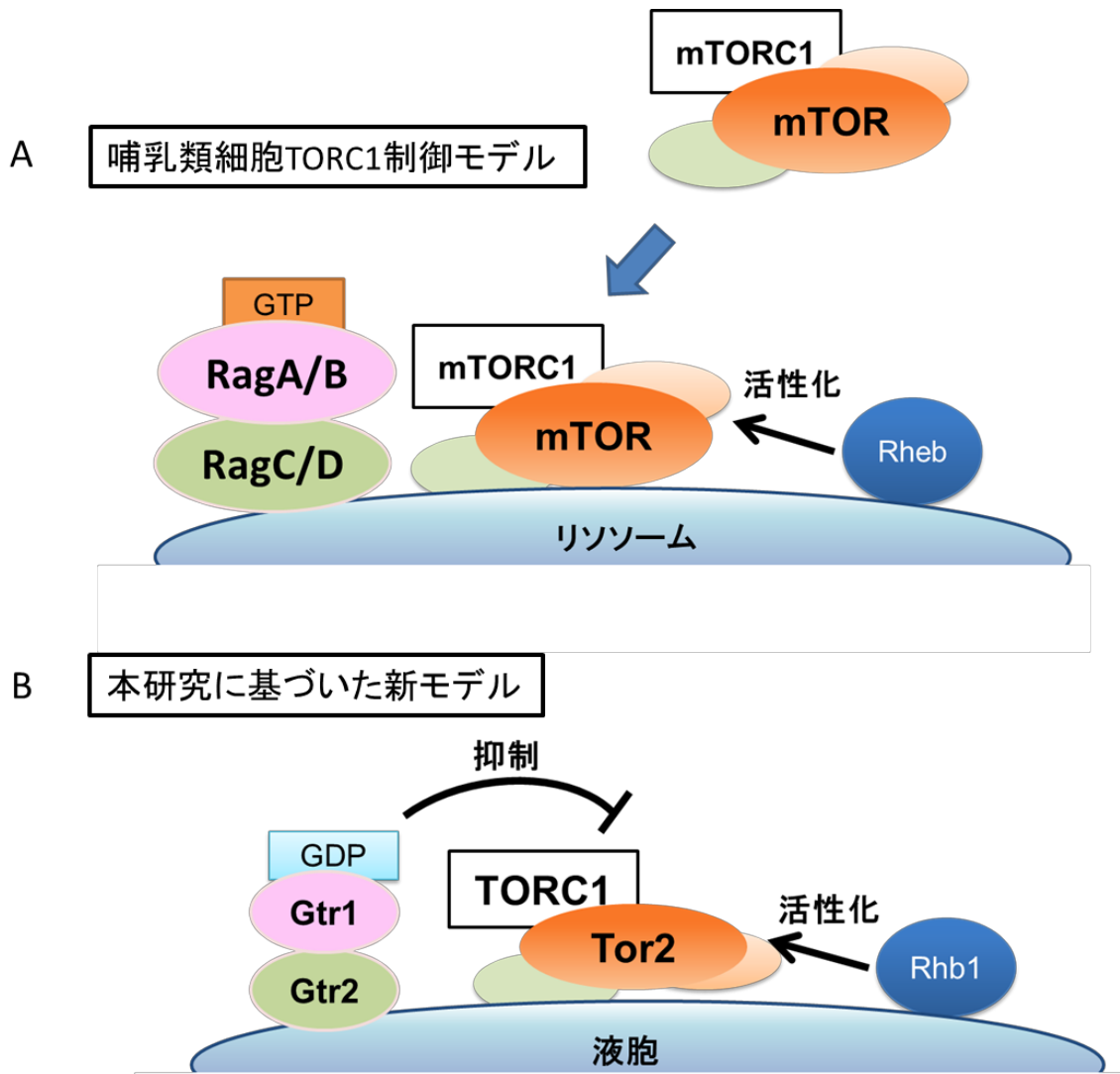


Figure . 19 哺乳類細胞および分裂酵母 TORC1 活性制御モデル

(A). Sabatini らが提唱する哺乳類細胞 TORC1 制御モデル

アミノ酸に応答して RagA/RagB の結合するヌクレオチドが GTP に交換されることで、mTORC1 と相互作用し、mTORC1 をリソソーム膜上へとリクルートする。リクルートされた mTORC1 は GTP 型の Rheb と結合することで活性化する。

(B). 分裂酵母 TORC1 制御モデル

分裂酵母 TORC1 の解析による本研究に基づいた新モデルを提案する。栄養源のある通常培養条件では、GDP 結合型の Gtr1-Gtr2 が液胞膜上に局在している TORC1 の活性を抑制する。

4-2. GATOR1 による TORC1 抑制機構

哺乳類細胞では、アミノ酸飢餓に応答して、GATOR1 と呼ばれるタンパク質複合体が、RagA/RagB に結合した GTP の GDP への加水分解を促進する GAP として働くことで、TORC1 は不活性化されることが報告されている (Bar-Peled et al., 2013)。

本研究において、哺乳類細胞 GATOR1 複合体構成因子である DEPDC5, Npr12, Npr13 に相同なタンパク質である分裂酵母 Iml1, Npr2, Npr3 は、GATOR1 複合体を形成することを示した (Fig .7)。また、この GATOR1 構成因子である Iml1 が有する GAP 活性は、TORC1 活性の抑制に必須であることを明らかにした (Fig .12C)。出芽酵母において、Npr2 はタンパク質脱リン酸化酵素である PP2A によって脱リン酸化されることが報告されており (Sutter et al., 2013)、Npr2 のリン酸化状態は SEACIT 複合体 (GATOR1 に相同) の安定性に重要であることが示唆されていた。本研究においても、Npr2 は、Iml1 と Npr3 間の相互作用に必須であったことから (Fig .8E, F)、Npr2 は GATOR1 の形成および安定性に重要であることが明らかになった。一方で、Npr3 は Iml1 と Npr2 間の相互作用に必要ではなかったことから (Fig .8C, D)、Npr3 は複合体の安定性に影響しないことが示唆された。また、GATOR1 は液胞膜上に局在することを見出しており、Npr3 は GATOR1 の液胞膜上への局在に必要なのではないかと考え、Npr3 の遺伝子欠損株において、Iml1 の細胞内局在を観察した (データ未掲載)。その結果、Npr3 の遺伝子欠損株においても、Iml1 は液胞膜上に局在したことから、Npr3 の機能は GATOR1 を液胞膜上に局在させることではないと考えられる。Npr3 は GEF として機能するタンパク質が有する “longin ドメイン” を N 末端側に持つことから、GEF として働く可能性が指摘されている (Levine et al., 2013; Nookala et al., 2012; Zhang et al., 2012)。しかしながら、Npr3 が GEF として機能する報告はなく、その機能は明らかでない。近年、出芽酵母において、アフィニティー精製および、架橋タンパク質の相互作用解析の結果に基づいたコンピューター解析から、SEA 複合体 (哺乳類細胞 GATOR 複合体に相同) の 3D 構造が報告されており (Algret et al., 2014)、Npr3 は出芽酵母 SEACAT (哺乳類細胞 GATOR2 複合体に相同) の構成因子である Sea3 の N 末端側と結合することが示唆されている。つまり、分裂酵母 Npr3 は GATOR1 と GATOR2 間の相互作用に必要な可能性がある。そこで、今後、分裂酵母において GATOR2 が保存されているか、また GATOR1 と GATOR2 間の相互作用に、Npr3 が必要であるかを共免疫沈降実験により検討したい。

2013 年に Ma らによって、分裂酵母 Npr2 は TORC1 の抑制因子であることが報告されている。この論文において、Gtr2 の遺伝子破壊株はカナバニン (アルギニンの毒性アナログ) に対して感受性だが、Npr2 の遺伝子破壊株は非感受性であった。また Gtr2 と Npr2 の二重破壊株では Npr2 の単独破壊株と同様にカナバニン非感受性であったことから、Npr2 は TORC1 の上流で機能するが、Gtr1 より下流で機能すると主張している。しかし、本研究において、GATOR1 構成因子の遺伝子破壊株が示す TORC1 の活性化および、生育阻害は恒常的に GDP 結合型の Gtr1 を発現する変異の導入によって、完全に抑圧された (Figure . 11A, B)。つまり、本研究にお

いて、分裂酵母 Npr2 は Gtr1 の上流で機能することを遺伝学的解析および、生化学的解析の両面から示している。一方、Ma らは Npr2 と Gtr1 の二重破壊株を用いた TORC1 のリン酸化解析などは示していない。また、Ma らが提唱したモデルは、哺乳類細胞 GATOR1 および出芽酵母 SEACIT (哺乳類細胞 GATOR1 に相同) における報告ともかけ離れており、あらためて本研究において、Npr2 は GATOR1 複合体の構成因子として Gtr1 を介して TORC1 活性を抑制するというモデルを提案する。

4-3. Gtr1 は TORC1 活性を抑制する負の制御因子である

哺乳類細胞では、Sabatini らが一連の論文で、Rag GTPase である RagA または RagB と、RagC または RagD がヘテロ 2 量体を形成することを見出した。そして、活性型 (GTP 結合型) の Rag GTPase が mTORC1 と相互作用し、mTORC1 をリソソーム膜上へとリクルートすることで、mTORC1 がリソソーム上に局在する Rheb によって活性化されることを報告した (Sancak et al., 2008; Kim et al., 2008)。一方、アミノ酸飢餓条件では、GATOR1 複合体が、RagA/RagB に結合した GTP の GDP への加水分解を促進することで、mTORC1 が細胞質へとリリースされ、不活性化されることを報告した (Bar-Peled et al., 2013)。これらの Sabatini のグループによる報告から、アミノ酸による TORC1 活性化機構に最も重要なステップは、GTP 結合型の RagA/RagB が TORC1 をリソソーム膜上へとリクルートすることであると考えられていた。

本研究において、分裂酵母 Gtr1 (RagA/RagB に相同) は、TORC1 活性を抑制する負の制御因子であることを示した (Fig .10A)。また、GTP 結合型の Gtr1 よりむしろ、GDP 結合型の Gtr1 が、TORC1 の過剰な活性化を抑制し、最適な TORC1 活性を維持するために必要であることを明らかにした (Fig .10A)。すなわち、単なる不活性型とされてきた GDP 結合型 RagA/RagB の新たな生理的機能が示唆された。つまり、Gtr1 は TORC1 の活性化よりむしろ、活性の抑制に必要であり、Sabatini らが哺乳類細胞を用いた研究に基づいて提唱した RagA/RagB による TORC1 活性化モデルとは異なる、TORC1 抑制制御機構が存在することを発見した (Fig .19)。Sabatini らが提唱したモデルは、飢餓状態の哺乳類細胞において、特定のアミノ酸を加えることで誘導される一過的な TORC1 の活性化の研究に基づいて構築したモデルであり、栄養の恒常性が保たれている生理的条件下では、全く異なる TORC1 の制御機構が存在している可能性が考えられる。実際、他の生物種においても、本研究から得られたモデルと一致する結果が報告されている。マウスでは RagA をノックアウトすることで、TORC1 が活性化することが報告されており (Efeyan et al., 2014)、本研究が提唱する Gtr1 による TORC1 抑制制御機構は、分裂酵母に限らず、他の生物種においても保存されている可能性がある。また、分裂酵母 TORC1 は、窒素源の有無および Gtr1 のヌクレオチドの結合状態に影響を受けず、恒常的に液胞 (哺乳類細胞でリソソームに相当する) 膜上に局在することを明らかにした (Fig .17A, B)。つまり、窒素源に応じた TORC1 の活性制御および、Gtr1 による

TORC1 活性の抑制は、TORC1 の局在非依存的な機構によって制御されていることが明らかになった。哺乳類細胞 RagA/RagB の機能は mTORC1 をリソソーム膜上へとリクルートし、Rheb による活性化を受けさせることであり、mTORC1 のキナーゼ活性には直接影響を与えないと考えられている。しかし、興味深いことに、当研究室において、Rhb1 の遺伝子欠損株 (Rhb1 は生育に必須であり、これをレスキューするために Tor2 活性化変異株バックグラウンドにて作製) においても、Gtr1 の遺伝子欠損によって TORC1 が活性化することを見出している (Kim et al., 論文投稿準備中)。つまり、Gtr1 による TORC1 活性の抑制は、Rhb1 非依存的であることを示しており、Gtr1 はヌクレオチドの結合状態依存的に TORC1 のキナーゼ活性を抑制している可能性が考えられる。今後、この可能性を検討するため、Gtr1 がヌクレオチドの結合状態依存的に TORC1 と相互作用を示すかを、共免疫沈降実験により検討したい。また GDP 結合型 Gtr1 が TORC1 のキナーゼ活性を抑制しているかを確認するため、GDP 結合型 Gtr1 を過剰発現させ、TORC1 活性が GDP 結合型 Gtr1 の発現量依存的に抑制されるかを検討する。加えて、GDP 結合型 Gtr1 を発現する変異株において、窒素源飢餓処理を一時間行うことで TORC1 を不活性化した後、再度窒素源を加えた際の TORC1 の活性化速度を野生株と比較することで、GDP 結合型 Gtr1 が TORC1 活性を抑制するかをさらに検討したい。また、哺乳類細胞 RagA/RagB による mTORC1 活性化機構と、本研究で示した Gtr1 による TORC1 抑制制御機構の違いは、TORC1 の細胞内局在が Rag ファミリー G タンパク質のヌクレオチドの結合状態に依存するかどうかである可能性がある。これを検討するため、哺乳類細胞において、mTORC1 の構成因子である Raptor に、Rheb の C 末端側に存在するリソソーム膜上に局在化するためのシグナル配列を付加し、mTORC1 を強制的にリソソーム膜上に局在化させることで、分裂酵母 TORC1 と同じ条件を再現する。そして、mTORC1 をリソソーム膜上に局在化させた条件における、GDP 結合型 RagA/RagB による TORC1 制御機構を検討したい。

また、本研究 Fig. 10C において、恒常的に GTP 結合型 Gtr1 を発現する変異株は、窒素源飢餓に対する Psk1 の脱リン酸化は遅れるものの、90 分後には TORC1 の活性は大きく減少していた。つまり、TORC1 の上流には Gtr1 以外にも、窒素源に対する応答に必要な未知の活性化因子が存在することを示唆している。実際、出芽酵母では、PI(3)リン酸に結合する FYVE ドメインを有する Pib2 が Gtr1-Gtr2 非依存的に TORC1 の活性を正に制御することが報告されている (Kim and Cunningham, 2015)。出芽酵母 Pib2 同様に、FYVE ドメインを有するタンパク質が分裂酵母にも存在することから、今後、このタンパク質が Gtr1-Gtr2 非依存的に TORC1 活性を制御している可能性も検討したい。

4-4. Gtr1 の GDP 結合を保つことが、TORC1 活性抑制および生育の維持に重要である

哺乳類細胞において、Ragulator はアミノ酸に応じて、RagA に結合するヌクレ

オチドを GTP に交換する GEF として働く (Bar-Peled et al., 2012)。また、出芽酵母では、Vam6 が Gtr1 の GEF として働くことが報告されている (Binda et al., 2009)。哺乳類細胞および出芽酵母において、GEF は栄養源の有る通常培養条件での TORC1 の活性化及び細胞の生育に重要である。しかし、驚くべきことに、本研究において、GTP 結合型よりむしろ、GDP 結合型 Gtr1 が細胞の生育に必要であることが明らかになった (Fig. 13A)。つまり、この結果から、Gtr1 に結合した GDP を維持するために、GAP である GATOR1 の重要性は明らかだが、逆に Gtr1 の GTP 型に交換する GEF が、分裂酵母に存在しているのか？またその機能は重要なのか？という疑問が生じた。今後、Ragulator および Vam6 の相同タンパク質が分裂酵母 TORC1 活性および、細胞の生育に与える影響を検討することで、分裂酵母 Gtr1 の GEF の重要性について明らかにしたい。興味深いことに、ラットでは DEPDC5 のノックアウト、またマウスでは Npr12 および Npr13 のノックアウトによって後期胚致死になることが報告されている (Kowalczyk et al. 2012; Dutchak et al. 2015; Marsan et al. 2016)。また、最近では、ショウジョウバエにおいても、GATOR1 複合体構成因子のノックアウトによる TORC1 の活性化は、成虫の生存率を低下させることが報告され (Wei et al., 2016)、TORC1 の異常な活性化は、細胞の生育を阻害することが示唆されている。このように、本論文で示した、“Gtr1 に結合した GDP を保つことで生育を維持する”というモデルを支持する結果が、多くの生物種で報告されており、このモデルは種を超えて広く保存されたメカニズムである可能性が高い。

4-5. GATOR1-Gtr1 経路はアミノ酸トランスポーターの局在を制御することで、アミノ酸の取り込みを促進し、細胞の生育を促進する。

分裂酵母では、TORC1 の負の制御因子である Tsc1-Tsc2 複合体の遺伝子破壊株や、恒常的に活性化した tor2 を発現する変異株では、アミノ酸の取り込みが抑制されることが報告されている (Matsumoto et al., 2002; Van Slegtenhorst et al., 2004)。本研究において、GATOR1-Gtr1 経路は TORC1 活性を抑制し、塩基性アミノ酸トランスポーターである Cat1 の細胞膜への局在および、アミノ酸の取り込みを促進することで、細胞の生育維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。近年の当研究室の研究において、GATOR1-Gtr1 遺伝子欠損株は、TORC1 を最も活性化することが知られているアルギニンおよび、ロイシンを唯一の窒素源とする合成培地上においても、生育阻害を示すことが明らかになっている (Fajar 修士論文, .2016)。また、分裂酵母が窒素源として利用しやすいグルタミン酸や、利用しにくいプロリンを窒素源とする合成培地上においても、GATOR1 および Gtr1 の遺伝子欠損株は生育阻害を示すことを見出している。加えて当研究室では、アミノ酸トランスポーターの網羅的局在解析によって、Im11 の遺伝子欠損株において、複数のアミノ酸トランスポーターが細胞膜から細胞質へと、その局在が変化する結果を得ている (天井 修士論文, .2017)。したがって、GATOR1-Gtr1 経路は Cat1 だけでなく、多くのアミノ酸トランスポーターの細胞膜への局在を促進すること

が示唆されている。今後、各アミノ酸を1種類ずつ含有した合成培地においてスポットテスト解析を行うことで、GATOR1-Gtr1 経路がどのアミノ酸の取り込みに重要かを決定する。また、本研究において、塩化アンモニウムを唯一の窒素源とする合成培地では GATOR1 遺伝子欠損株は生育阻害を示さなかった (Fig. 14)。つまり、GATOR1-Gtr1 経路はアンモニウムトランスポーターの局在は制御していない、もしくはアンモニウムトランスポーターの細胞膜への局在を抑制している可能性がある。そこで、今後、GATOR1 遺伝子欠損株におけるアンモニウムトランスポーターの細胞内局在を観察する。

4-6. GATOR1-Gtr1 経路は液胞の形態を制御する

液胞は環境の変化に応答し、分裂および結合することで、その大きさおよび数が変化する (Baars et al. 2007)。この液胞の形態変化は、細胞内の pH などの恒常性を維持し、浸透圧ストレス、栄養飢餓や代謝等に、適切に応答するために重要である (Li and Kane 2009)。近年、ER ストレスによって誘導される液胞の分裂は、TORC1 特異的な阻害剤であるラパマイシンによって抑制することが報告され、TORC1 活性が液胞の形態を制御することが示唆されていた (Michaillat et al. 2012)。本研究においても、GATOR1-Gtr1 欠損株では、液胞の大きさが低下し、液胞の数が増加していることを見出しており、GDP 結合型の Gtr1 は、液胞の形態を制御することで細胞内の恒常性を維持し、ストレスなどの環境の変化に対する適応においても、重要な役割を果たしている可能性がある。そこで、今後は GATOR1-Gtr1 経路が液胞の形態を制御することで、高浸透圧ストレスや酸化ストレスなどのストレスに対して適応している可能性を遺伝学的解析により検討したい。また、GATOR1-Gtr1 経路が液胞内の酸性化を制御することで、細胞の恒常性を維持している可能性をキナクリン染色により検討する。

謝辞

本研究に際して、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました、細胞シグナル研究室、塩崎一裕教授に深く御礼申し上げます。塩崎教授は研究に関することのみならず、効果的なプレゼンテーションの方法、スライドの構成、英語の文法や発音など、非常に多くのことを学ばせていただきました。本研究を遂行できたのは厳しくも優しい塩崎教授の支えがあったからだ、実感しています。塩崎さん、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、ストレス微生物科学研究室、高木博史教授と、動物細胞工学研究室の木俣行雄准教授には、多くのアドバイスをいただきました。厚く御礼申し上げます。

同研究室の福田智行 助教（現：新潟大学大学院医歯学総合研究科、機能制御学分野、准教授）、建部恒 助教、森ヶ崎進 研究員には実験の手法や進め方、結果の考察など様々な面で多大なるご指導を賜りました。特に福田さんには、博士課程の3年間、研究のスーパーバイザーとして多くのご指導を賜りました。福田さんは、研究に対して真摯で、人並みならぬ情熱をお持ちだけでなく、学生に近い目線、気持ちをお持ちでした。その姿から学んだことは非常に多く、今後、社会人生活に必ず生きるものだと確信しています。心より感謝申し上げます。

同研究室の米倉敏哉先輩は、入学時から多くの場面でお世話になりました。研究のディスカッションや進め方に関するアドバイスを頂いただけでなく、時には研究に対する悩みを聞いていただいたり、時には共に就職活動に臨んだり、この5年間に有意義に、楽しく過ごすことができたのは、米倉さんという大きな存在があったからです。心から感謝しております。同級生の世良和磨くんには、研究だけでなく常日頃から友人として支えていただきました。大学院生活を最後まで全うすることができたのは、世良くんという良き友人がいたからだと思っています。世良君、いつもありがとう。さらに、後輩である岡学くん、甲斐瑛之くん、天井貴光くん、岡慶太くん、本田葵さん、岩本珠佳さん、西岡健太くん、笠祐作くん、谷川公実子さん、星野孝幸くん、足立実音さんには大変お世話になりました。皆さんとともに、研究室での日々を過ごすことができたことを本当にうれしく思います。

留学生である Fajar Sofyantoro くん、Chia Kim Hou、Chin Lit Chein、Yen Teng Tai、Keong Choon Yue さんは、常に明るく私に接してくれました。英語が多少なりとも上達したこと、国際的な感覚が身についたのは留学生のみんながいたからです。感謝しております。Fajar くんは、私にとって初めての留学生の友人であり、Fajar くんのおかげで、海外に行きたいという意識、夢ができました。Kim くんは、共に TORC1 を研究する仲間として、研究に関する助言を多数いただきました。いつも、楽しく笑いあった日々は、僕にとって宝物です。Chein くんは、留

学生の中で最も明るく、人を笑顔にさせる、太陽のような存在でした。友人として、いつも優しく、明るく接してくれ、その度に私は笑顔になることができました。Yenさんは、表情豊かで誰とでも仲良くなれる性格で、いつも冗談を言い合ったり、中国語を教わったりしたことは、私にとっていい思い出です。留学生の親友たちに心から感謝申し上げます。

最後に、いつも私のことを支えてくれている家族に心から感謝いたします。

参考文献

- Algret, R., Fernandez-Martinez, J., Shi, Y., Kim, S.J., Pellarin, R., Cimerancic, P., Cochet, E., Sali, A., Chait, B.T., Rout, M.P., et al. (2014). Molecular architecture and function of the SEA complex, a modulator of the TORC1 pathway. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 2855-2870.
- Baars, T.L., Petri, S., Peters, C., and Mayer, A. (2007). Role of the V-ATPase in Regulation of the Vacuolar Fission Fusion Equilibrium. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3873-3882.
- 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.
- Binda, M., Péli-Gulli, M.-P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., Loewith, R., and De Virgilio, C. (2009). The Vam6 GEF Controls TORC1 by Activating the EGO Complex. *Mol. Cell* *35*, 563-573.
- Brown, E.J., Beal, P.A., Keith, C.T., Chen, J., Bum Shin, T., and Schreiber, S.L. (1995). Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* *377*, 441-446.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulić, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., and Abraham, R.T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* *277*, 99-101.
- Cam, H., and Houghton, P.J. (2011). Regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) by hypoxia: causes and consequences. *Target. Oncol.* *6*, 95-102.
- Cam, H., Easton, J.B., High, A., and Houghton, P.J. (2010). mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Mol. Cell* *40*, 509-520.

Chiu, M.I., Katz, H., and Berlin, V. (1994). RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12574-12578.

Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO Protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast. *Mol. Cell* *19*, 15-26.

Efeyan, A., Zoncu, R., and Sabatini, D.M. (2012). Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol. Med.* *18*, 524-533.

Efeyan, A., Zoncu, R., Chang, S., Gumper, I., Snitkin, H., Wolfson, R.L., Kirak, O., Sabatini, D.D., and Sabatini, D.M. (2013). Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* *493*, 679-683.

Efeyan, A., Schweitzer, L.D., Bilate, A.M., Chang, S., Kirak, O., Lanning, D.W., and Sabatini, D.M. (2014). RagA, but not RagB, is essential for embryonic development and adult mice. *Dev. Cell* *29*, 321-329.

Gao, M., and Kaiser, C.A. (2006). A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nat. Cell Biol.* *8*, 657-667.

Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., et al. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* *8*, 128-135.

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 PKCalpha, 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.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., 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.
- 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.
- 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.
- Hsu, Y.-C., Chern, J.J., Cai, Y., Liu, M., and Choi, K.-W. (2007). Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* *445*, 785-788.
- Im, E., von Lintig, F.C., Chen, J., Zhuang, S., Qui, W., Chowdhury, S., Worley, P.F., Boss, G.R., and Pilz, R.B. (2002). Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells. *Oncogene* *21*, 6356-6365.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 648-657.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* *17*, 1829-1834.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* *150*, 1507-1513.
- Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K., and Ohsumi, Y. (2010). Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1049-1058.
- Kawai, M., Nakashima, A., Ueno, M., Ushimaru, T., Aiba, K., Doi, H., and Uritani, M. (2001). Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr. Genet.* *39*, 166-174.
- Kim, A., and Cunningham, K.W. (2015). A LAPF/phafin1-like protein

regulates TORC1 and lysosomal membrane permeabilization in response to endoplasmic reticulum membrane stress. *Mol. Biol. Cell* *26*, 4631-4645.

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, 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.

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

Levine, T.P., Daniels, R.D., Wong, L.H., Gatta, A.T., Gerondopoulos, A., and Barr, F.A. (2013). Discovery of new Longin and Roadblock domains that form platforms for small GTPases in Ragulator and TRAPP-II. *Small GTPases* *4*, 62-69.

Li, S.C., and Kane, P.M. (2009). The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1793*, 650-663.

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.

Ma, N., Liu, Q., Zhang, L., Henske, E.P., and Ma, Y. (2013). TORC1 signaling is governed by two negative regulators in fission yeast. *Genetics* *195*, 457-468.

Matsumoto, S., Bandyopadhyay, A., Kwiatkowski, D.J., Maitra, U., and Matsumoto, T. (2002). Role of the Tsc1-Tsc2 Complex in Signaling and Transport Across the Cell Membrane in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* *161*.

Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F., and Yamamoto, M. (2007).

Loss of the TOR Kinase Tor2 Mimics Nitrogen Starvation and Activates the Sexual Development Pathway in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3154-3164.

Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., et al. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* *24*, 841-847.

Michaillat, L., Baars, T.L., and Mayer, A. (2012). Cell-free reconstitution of vacuole membrane fragmentation reveals regulation of vacuole size and number by TORC1. *Mol. Biol. Cell* *23*, 881-895.

Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* *194*, 795-823.

Nakase, Y., Nakase, M., Kashiwazaki, J., Murai, T., Otsubo, Y., Mabuchi, I., Yamamoto, M., Takegawa, K., and Matsumoto, T. (2013). The fission yeast β -arrestin-like protein Anyl is involved in TSC-Rheb signaling and the regulation of amino acid transporters. *J. Cell Sci.* *126*, 3972-3981.

Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., and Tamanoi, F. (2012). Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *J. Cell Sci.* *125*, 5840-5849.

Nakashima, A., Kamada, S., Tamanoi, F., and Kikkawa, U. (2014). Fission yeast arrestin-related trafficking adaptor, Arn1/Any1, is ubiquitinated by Publ E3 ligase and regulates endocytosis of Cat1 amino acid transporter. *Biol. Open* *3*, 542-552.

Nakashima, N., Noguchi, E., and Nishimoto, T. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* putative G protein, Gtr1p, which forms complexes with itself and a novel protein designated as Gtr2p, negatively regulates the Ran/Gs1p G protein cycle through Gtr2p. *Genetics* *152*, 853-867.

Nookala, R.K., Langemeyer, L., Pacitto, A., Ochoa-Montaño, B., Donaldson, J.C., Blaszczyk, B.K., Chirgadze, D.Y., Barr, F.A., Bazan, J.F., and Blundell, T.L. (2012). Crystal structure of folliculin reveals a hidDenn function in genetically inherited renal cancer. *Open Biol.* *2*.

Oh, W.J., and Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions.

Cell Cycle 10, 2305-2316.

Ortega-Molina, A., Efeyan, A., Lopez-Guadamillas, E., Muñoz-Martin, M., Gómez-López, G., Cañamero, M., Mulero, F., Pastor, J., Martinez, S., Romanos, E., et al. (2012). Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. *Cell Metab.* 15, 382-394.

Oshiro, N., Rapley, J., and Avruch, J. (2014). Amino Acids Activate Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Complex 1 without Changing Rag GTPase Guanyl Nucleotide Charging. *J. Biol. Chem.* 289, 2658-2674.

Otsubo, Y., and Yamamoto, M. (2008). TOR signaling in fission yeast. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43, 277-283.

Panchaud, N., Peli-Gulli, M.-P., and De Virgilio, C. (2013). Amino Acid Deprivation Inhibits TORC1 Through a GTPase-Activating Protein Complex for the Rag Family GTPase Gtr1. *Sci. Signal.* 6, ra42-ra42.

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.

Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2009). Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 289-290.

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.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303.

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* (80-.). 307, 1098-1101.

Saucedo, L.J., Gao, X., Chiarelli, D.A., Li, L., Pan, D., and Edgar, B.A. (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat. Cell Biol.* 5, 566-571.

- Schalm, S.S., and Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.* *12*, 632-639.
- Schalm, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M., and Blenis, J. (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr. Biol.* *13*, 797-806.
- Sekiguchi, T., Kamada, Y., Furuno, N., Funakoshi, M., and Kobayashi, H. (2014). Amino acid residues required for Gtr1p-Gtr2p complex formation and its interactions with the Ego1p-Ego3p complex and TORC1 components in yeast. *Genes Cells* *19*, 449-463.
- van Slegtenhorst, M., Carr, E., Stoyanova, R., Kruger, W.D., and Henske, E.P. (2004). *Tsc1+* and *tsc2+* regulate arginine uptake and metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* *279*, 12706-12713.
- Sutter, B.M., Wu, X., Laxman, S., and Tu, B.P. (2013). Methionine Inhibits Autophagy and Promotes Growth by Inducing the SAM-Responsive Methylation of PP2A. *Cell* *154*, 403-415.
- Tatebe, H., and Shiozaki, K. (2010). Rab small GTPase emerges as a regulator of TOR complex 2. *Small GTPases* *1*, 180-182.
- 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.* *104*, 3514-3519.
- Uritani, M., Hidaka, H., Hotta, Y., Ueno, M., Ushimaru, T., and Toda, T. (2006). Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes to Cells* *11*, 1367-1379.
- Wang, X., Fonseca, B.D., Tang, H., Liu, R., Elia, A., Clemens, M.J., Bommer, U.-A., and Proud, C.G. (2008). Re-evaluating the Roles of Proposed Modulators of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling. *J. Biol. Chem.* *283*, 30482-30492.
- Wei, Y., Reveal, B., Cai, W., and Lilly, M.A. (2016). The GATOR1 Complex Regulates Metabolic Homeostasis and the Response to Nutrient Stress in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda)*. *6*, 3859-3867.
- Weisman, R., and Choder, M. (2001). The Fission Yeast TOR Homolog, *tor1+*,

Is Required for the Response to Starvation and Other Stresses via a Conserved Serine. *J. Biol. Chem.* *276*, 7027-7032.

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* *124*, 471-484.

Yamagata, K., Sanders, L.K., Kaufmann, W.E., Yee, W., Barnes, C.A., Nathans, D., and Worley, P.F. (1994). *rheb*, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J. Biol. Chem.* *269*, 16333-16339.

Zhang, D., Iyer, L.M., He, F., and Aravind, L. (2012). Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front. Genet.* *3*, 283.