

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Chia Kim Hou

The Target of Rapamycin (TOR) protein kinase forms an evolutionarily conserved high-molecular weight complex, TOR complex 1 (TORC1), which serves as a central hub to integrate nutrient signals to coordinate cell growth and metabolism. It is believed that mammalian TORC1 (mTORC1) is recruited to lysosomal membranes upon amino acid stimuli, leading to its activation by the Rheb GTPase. The translocation of mTORC1 to lysosomes is mediated by the heterodimeric Rag GTPases (RagA or RagB pairs with RagC or RagD), which are anchored to the lysosomal surface through a protein complex named Ragulator. However, discrepant observations have also been reported, such as RagA/B-independent mTORC1 activation and amino-acid independence of guanine nucleotide loading to the Rag GTPases.

Orthologs of RagA/B and RagC/D, called Gtr1 and Gtr2, respectively, were previously reported in the model organism *Schizosaccharomyces pombe*. In this study, by isolating proteins physically interact the Gtr1-Gtr2 heterodimer, a Ragulator-like complex composed of the Lam1~4 proteins has been successfully identified. Importantly, the *lam* gene knockout disrupts the vacuolar localization of Gtr1-Gtr2, suggesting that the Lam complex is a fission yeast equivalent of the mammalian Ragulator. However, those knockout mutants exhibit severe growth defects accompanied by hyper-activation of TORC1. Further experiments demonstrate that the GDP-bound Gtr1 bound to the Lam complex on vacuoles is required for TORC1 suppression. Absence of the Lam-Gtr1-Gtr2 complex leads to a defect in cellular uptake of amino acids, resulting in the observed growth defect.

The Tsc-Rhb1 is a well-known signaling pathway upstream of TORC1. To test whether Lam-Gtr1-Gtr2 down-regulates TORC1 through the Tsc-Rhb1 pathway, TORC1 activity of a mutant in which both *gtr1<sup>+</sup>* and *tsc2<sup>+</sup>* genes were deleted was evaluated. The double mutant exhibited an additive effect on TORC1 hyper-activation as compared to the individual single mutants, suggesting that the Lam-Gtr1-Gtr2 and Tsc-Rhb1 signaling pathways regulate TORC1 independently.

This study has uncovered a novel negative regulation of TORC1 signaling by the Lam-Gtr1-Gtr2 machinery, which is important for optimal cellular response to nutrients in fission yeast. It is conceivable that the GDP-bound form of RagA/B, human orthologs of Gtr1, also has an ability to negatively regulate mTORC1, a possibility that has never been explored.

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Chia Kim Hou

進化的に保存されたタンパク質キナーゼ TOR が形成する TOR 複合体 1 (TORC1) は栄養素の供給状況、増殖刺激や細胞内のエネルギー状況などに対するセンサーとして作用し、細胞内の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。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、TORC1 がこれらの疾患の予防や新規治療薬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、TORC1 シグナル伝達経路のより詳細な理解が望まれている。

申請者が分裂酵母で同定に成功した Ragulator 複合体は、哺乳類細胞においては G タンパク質 Rag ヘテロ 2 量体をリソソーム膜に繋ぎ止める機能をもっており、アミノ酸などの栄養刺激に応答してこの Rag が TORC1 をリソソームにリクルートし、TORC1 の活性化が誘導される。申請者は、分裂酵母において発見された Ragulator (Lam タンパク質複合体) も Rag ファミリー G タンパク質である Gtr1-Gtr2 ヘテロ 2 量体を液胞膜に繋ぎとめていることを示し、ヒトと分裂酵母で Rag-Ragulator が保存されていることを証明した。加えて、分裂酵母では TORC1 の主要制御因子である TSC-Rheb 経路も保存されており、申請者の発見と考え合わせると、TORC1 制御研究のモデル生物としては、出芽酵母よりも分裂酵母が優れていると考えられる。

申請者はさらに、分裂酵母 Ragulator および Gtr1-Gtr2 の遺伝学的解析を行ったところ、液胞膜上のこれらの因子が TORC1 の活性を抑制している証拠を得た。ヒト Rag-Ragulator 複合体は TORC1 の活性化因子と信じられており、これは驚くべき結果であった。Gtr1 の種々の変異体を用いた結果から、Gtr1 の GDP 結合型が TORC1 を抑制する機能を持つこと明らかにし、この結果は申請者の研究室における先行研究である、Gtr1 の guanine nucleotide exchange factor (GEF) の機能解析の結果とも合致した。また、GDP-Gtr1 による TORC1 の抑制は、TSC-Rheb 経路に依存しない、新規の経路を介する可能性が高い。

本論文で示された結果に基づく、Gtr1 が GDP 結合型として TORC1 の抑制に働くという制御機構モデルは、Gtr1 に相同な哺乳類 RagA/B ではこれまで全く想定されていなかった新規の概念であるが、RagA/B にも同様の機能が保存されている可能性も高く、今後の TORC1 研究に大きなインパクトがあると期待される。特に、TORC1 の異常活性化が、ガンや神経疾患を引き起こすことことから、TORC1 活性の抑制機構に注目が集まりつつあり、本論文が提唱する G タンパク質 Rag の新たな抑制機能は学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。