

論文内容の要旨

申請者氏名 村山 真一

Target of Rapamycin (TOR) キナーゼは、栄養、ストレス、および増殖因子など様々な細胞外刺激を統合することによって、細胞増殖および代謝を調節する。酵母からヒトに至るまで、TOR は複数の調節サブユニットとともに、2つの異なるタンパク質複合体、TOR 複合体 1 (TORC1) および 2 (TORC2) を形成することによって機能する。哺乳類の TORC2 は、ホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3K) 経路において、AGC ファミリー・キナーゼの一つ AKT (PKB) をリン酸化・活性化する。しかし、TORC2 による基質特異性および基質認識の分子基盤はよく分かっていなかった。AKT に相同な分裂酵母の Gad8 も TORC2 によってリン酸化・活性化され、ストレス条件下における生育に必須である。また、ヒト TORC2 の制御サブユニットの一つである SIN1 が、AKT のリン酸化に必須であるのと同様、分裂酵母 Sin1 も、Gad8 のリン酸化に必須であり、また、酵母ツーハイブリッド・スクリーニングでは Sin1 と Gad8 が相互作用することが知られている。

ヒト AKT を分裂酵母で発現させたところ、Gad8 の機能を相補することが観察され、AKT と Gad8 が一次構造だけでなく、機能的にも保存されていることが強く示唆された。免疫共沈降アッセイによって、Sin1 と Gad8 との物理的相互作用が確認でき、さらに Sin1 の欠失変異体を用いることによって、Sin1 オルソログ間で保存された CRIM ドメインと重複する中央領域が Gad8/AKT 結合ドメイン (GAD) であることを見出した。この GAD 領域への変異導入により Sin1-Gad8 相互作用が破壊されると、TORC2-Gad8 間のシグナル伝達も機能しなくなる。NMR で決定された Sin1 の CRIM ドメインの構造には、酸性アミノ酸残基に富むループ構造が表面から突き出ており、部位特異的変異導入法により、このループ構造が実際に Gad8 との相互作用に重要な役割を果たしていることを示した。さらに、既報の AKT の立体構造情報を参照することによって、Gad8 において Sin1 と相互作用する可能性のある領域を予想し、部位特異的変異導入法による解析を行った。その結果、キナーゼ触媒ドメインのアミノ末端付近に位置する 3つの疎水性アミノ酸残基が Sin1 との相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの実験によって、TORC2 における基質結合部位を同定し、その構造を明らかにするとともに、基質 Gad8 との相互作用の分子機構の一端が明らかになった。また、Sin1 が TORC2 複合体に組み込まれるために必要な部位を同定するために、Sin1 の欠失変異体を用いて分析したところ、GAD 領域の N 末端側に近接する、CRIM 領域内の短い配列が TOR キナーゼとの相互作用に重要であることが示された。

以上のように、本研究は、Sin1 が TORC2 の基質認識サブユニットであることを証明し、Sin1 の CRIM ドメインが、TORC2 基質との結合、活性化ならびに TORC2 の形成という Sin1 の主要な機能を担っていることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 村山 真一

細胞は外部の栄養状態を感知し、細胞成長の状態に合わせて分裂・増殖を制御している。TOR キナーゼは、異なるサブユニット構成を持つ二種類のタンパク質複合体 TORC1、TORC2 を形成し、栄養源や環境などのシグナルの伝達や統合に中心的な役割を果たす。哺乳類細胞において TORC1 と TORC2 は、AGC ファミリー・キナーゼに属する S6K と AKT をそれぞれリン酸化・活性化する。TORC1 の基質認識サブユニットである Raptor は S6K の TOS モチーフを認識し結合する。一方、TORC2 が異なる AGC ファミリー・キナーゼを識別し、AKT を基質として認識する分子機構は不明であった。TORC2-AKT 経路は、成長因子刺激などに応答して細胞増殖を正に制御し、また、様々なガンで異常活性化していることが知られている。このシグナル伝達経路は、遺伝学的解析の容易なモデル生物である分裂酵母においても TORC2-Gad8 経路として保存されており、申請者はこの TORC2-Gad8 経路をモデルとして、TORC2 基質認識の分子機構の解明に取り組んだ。

申請者は、分裂酵母 Gad8 欠失変異体のストレス感受性をヒトの AKT 遺伝子が相補することを示し、ヒトから酵母まで TORC2 経路が機能的に保存されていることを示した。Sin1 が Gad8 と相互作用することを示し、さらに一連の Sin1 欠失変異体を用いた Gad8 との結合実験によって、CRIM と呼ばれる、生物種間で高度に保存された Sin1 の中央領域に Gad8/AKT 結合ドメイン (GAD) を同定した。NMR で決定された CRIM 領域の立体構造に基づき変異導入解析を行い、進化的に保存された、酸性アミノ酸に富むループ構造が Gad8 との結合に必須であることを示した。また、Gad8 を TORC2 サブユニットとの融合タンパク質として発現することによって、Sin1 の必須機能が基質 Gad8 を TORC2 にリクルートすることであると証明した。申請者は、Gad8 における Sin1 結合部位の探索も試み、まず Gad8 キナーゼ・ドメインの「N ロープ」断片が Sin1 と結合することを示した。さらに、Gad8 と相同な AKT の立体構造に基づき、N ロープのアミノ末端に位置するポケット構造に着目し、変異導入を行うことによって、この構造を構成する3つの疎水性アミノ酸残基が Sin1 との相互作用に必要であることを示した。加えて、申請者は、Sin1 の GAD 領域欠失変異体が TOR キナーゼとの相互作用できることを示した上で、CRIM 領域内の N 末側に TOR キナーゼとの相互作用に必要な短い領域を同定した。

以上、本論文は、分裂酵母 TORC2-Gad8 経路をモデルとし、TORC2 が特異的に基質を識別する分子機構の解明に必須の重要な発見を報告し、同じ TOR キナーゼを含む TORC1 と TORC2 が異なる基質をリン酸化して細胞内で異なる機能を果たすメカニズムの理解に大きく貢献するものである。同時にこの成果は、TORC2-AKT 経路を標的とした選択性の高いタンパク質間相互作用阻害剤開発の基盤ともなり得ることから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、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。