

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成26年度）

1. 機関番号

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 6 | 0 | 3 |
|---|---|---|---|---|

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成26年度～平成28年度

5. 課題番号

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 6 | 4 | 4 | 0 | 0 | 9 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|

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

7. 研究代表者

| 研究者番号 | 研究代表者名 | 所属部局名 | 職名 |
|-----------------|--------------------|-------------|-------|
| 9 0 2 4 2 4 8 7 | モリガサキ ススム 森ケ崎 進 | バイオサイエンス研究科 | 博士研究員 |

8. 研究分担者

| 研究者番号 | 研究分担者名 | 所属研究機関名・部局名 | 職名 |
|-------|--------|-------------|----|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

9. 研究実績の概要

本申請研究の目的は栄養状態およびストレスなどに応答し、代謝や細胞増殖を制御するターゲットオブラパマイシン（TOR）の制御機構を解析することにある。TORは細胞内情報伝達を担うタンパク質リン酸化酵素で、二つの異なるタンパク質複合体を形成し、それぞれ異なる機能を有すると考えられている。本研究では、そのうちの複合体2（TORC2）の解析を行う。

平成26年度は、（1）TORC2のグルコース飢餓応答を解析しその結果を論文として発表し、（2）TORC2構成因子であるSin1のストレス応答性MAPキナーゼSpc1との結合領域を同定した。

（1）分裂酵母TORC2の基質であるGad8のリン酸化レベルを指標にし、TORC2経路のグルコース応答を解析した。その結果、TORC2経路がグルコースのアナログである2-デオキシグルコースに応答しないこと、および、cAMP-PKA経路に非依存的にグルコースに応答することを見いだした。一方、低分子量型Gタンパク質のRyh1変異株の解析により、Ryh1がTORC2経路のグルコース応答に重要な役割を担うこと、および、グルコース飢餓環境下でRyh1非依存的にこの経路が活性化することを見いだした。これらの結果を論文として公表した（Hatano et al., Cell Cycle, 146, 848, 2015）。

（2）酵母ツーハイブリッド法により、Sin1の塩基性アミノ酸が集合する領域とSpc1の酸性アミノ酸に富む領域を介してこれらのタンパク質が結合することを突き止めた。また、Spc1はTORC2経路のグルコース応答には関与しないこと、Spc1によるTORC2経路の制御は転写因子であるAtf1依存的に起こることを見いだした。これは「Spc1によるSin1を介したTORC2経路の制御」という本研究の作業仮説の一つを否定する結果であり、今後の研究計画に若干の変更が必要であると考えている。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|------------|-----------------|----------------------|
| (1) 分裂酵母 | (2) シグナル伝達 | (3) ストレス応答 | (4) ターゲットオブラマイシ ン |
| (5) MAPキナーゼ | (6) 細胞生物学 | (7) 低分子量型Gタンパク質 | (8) |

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

平成26年6月にCohenら(J. Biol. Chem., 289, 21727, 2014)により分裂酵母TORC2経路のグルコース応答に関する論文が発表された。その内容は一部申請者らの実験結果とは異なっており、申請者らの持つ知見を早急に論文として公表する必要があると判断した。そこで、当初の計画では平成27年度に行う予定であった実験の一部を平成26年度に前倒しして実行した。低分子量Gタンパク質であるRyh1によるTORC2経路の制御に関してはグルコース応答に特化して解析を進めた。また、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素Tdh1に関してはTORC2経路のグルコース応答への関与を示唆する結果が得られなかった。これらは、当初の研究計画で平成26年度に行う予定の実験の一部である。一方、Spc1によるTORC2経路の制御の解析は、当初平成27年度に行う計画であった。しかし、上記の理由によりグルコース応答に関する解析、および、Sin1との結合部位の同定を行った。更に、計画にはなかったcAMP-PKA経路によるTORC2経路の制御の解析を行った。以上のように、申請時における研究計画の一部を変更して研究を遂行したため、平成26年度に計画していた実験の一部は実行することができなかった。しかし、平成27年度の計画実験の一部を実行し結果を得ている。これらのことを総合的に判断し、進捗状況を「おおむね順調に進展している」とした。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

平成27年度は、(1)平成26年度に実行できなかったグルコース飢餓以外のストレスに対する応答の解析、(2)Sin1のリン酸化によるTORC2経路の制御機構の解析、および(3)新規TORC2制御因子の探索、を行う計画である。
 (1) TORC2経路のストレスに対する応答 TORC2経路のストレスに対する応答をGad8およびTORC2の酵素活性の測定およびGad8とSin1間の物理的相互作用を指標に解析する。特に、グルコース飢餓以外のストレス(高浸透圧、酸化ストレスなど)の解析を行う。申請者らは、分裂酵母Gad8のin vivoにおける基質としてOrn1を単離した。Orn1はin vitroにおいてGad8によりリン酸化され、その反応は市販の抗リン酸化Akt基質を認識する抗体により検出が可能であった。この実験系を最適化することでRI標識化合物を使わずにGad8の酵素活性を測定可能であると考えた。本年度はこの系の確立し、TORC2経路のストレス応答の解析に応用する。また、TORC2の酵素活性およびGad8とSin1間の物理的相互作用の実験系の確立を目指す。
 (2) Sin1リン酸化によるTORC2の制御 平成26年度の結果はSpc1によるTORC2を制御は転写因子Atf1を介することを示唆した。従って、申請時にはSpc1によるリン酸化を解析する予定であったが、Spc1によるリン酸化に限らずSin1のリン酸化に関して解析するように計画を変更する。Hayashiら(Genes to Cells, 12, 1357, 2007)によるSin1のリン酸化部位の網羅的解析により10箇所のリン酸化部位が同定されており、それらのアミノ酸をアラニンに置換し、TORC2経路の活性およびストレス応答を解析する。
 (3) TORC2の制御因子の探索 上記の計画の進行具合によっては、遺伝学および生化学的手法を用いて新規TORC2制御因子の探索を行う。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

| 著者名 | | 論文標題 | | | |
|--|-------|--|-----|-----|---------|
| Tomoyuki Hatano, Susumu Morigasaki, Hisashi Tatebe, Kyoko Ikeda, Kazuhiro Shiozaki | | Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR complex 2 in response to glucose | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | | 最初と最後の頁 |
| Cell Cycle | 有 | 14 | 2 | 015 | 848-856 |
| 掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) | | | | | |
| 10.1080/15384101.2014.1000215 | | | | | |

(学会発表) 計(0)件 うち招待講演 計(0)件

| 発表者名 | | 発表標題 | |
|------|-------|------|--|
| | | | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 | |
| | | | |

(図書) 計(0)件

| 著者名 | | 出版社 | |
|-----|--|-----|-------|
| | | | |
| 書名 | | 発行年 | 総ページ数 |
| | | | |

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 出願年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
| | | | | | |

(取得) 計(0)件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 | 産業財産権の種類、番号 | 取得年月日 | 国内・外国の別 |
|----------|-----|-----|-------------|-------|---------|
| | | | | | |
| | | | | 出願年月日 | |
| | | | | | |

15.備考

| |
|--|
| |
|--|