

様 式 Z - 7

平成 2 7 年度科学研究費助成事業 実績報告書 (研究実績報告書)

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(B) (一般) 4. 研究期間 平成 2 6 年度 ~ 平成 2 8 年度
5. 課題番号

2	6	2	9	1	0	2	4
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 主要栄養シグナルを感知・統合するTORキナーゼ複合体ネットワーク

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
0 0 6 1 0 0 1 5	シオザキ カズヒロ 塩崎 一裕	バイオサイエンス研究科	教授

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

本研究では、真核生物細胞で保存されたTarget of Rapamycin (TOR)キナーゼ含む2つの複合体、TOR complex 1および2 (TORC1およびTORC2) がこれら2種類の栄養シグナル(窒素源、および炭素/エネルギー源であるグルコース)を感知・統合し、増殖をコントロールする細胞内情報処理ネットワークを構成することを明らかにする。

われわれは最近、分裂酵母において、TORC2が細胞外グルコースに応答して活性化し、基質であるGad8キナーゼをリン酸化・活性化することを報告した (Hatano et al., 2015)。TORC2の制御サブユニットであるSin1は、その中央部にあるConserved Region in the Middle (CRIM)が直接Gad8を認識し、結合する。われわれは、TORC2の基質認識特異性を決定しているSin1のCRIMドメインの構造をNMRによって決定し、ユビキチン様の折りたたみ構造をもっていることを示した。

さらに、分裂酵母で見出されたSin1の機能がヒトでも保存されているかを検証するため、ヒト培養細胞株においてSIN1遺伝子座をCRISPR/Cas9システムを用いて破壊したところ、ヒトTORC2の基質であるAKTのリン酸化に欠損がみられ、さらにCRIMドメインに変異をもつSin1をこの株で発現させてもAKTのリン酸化は部分的にしか回復しなかった。加えて、ヒトSin1 CRIMドメイン断片がAKTに特異的に結合することを試験管内実験によって示すことができた。以上の結果は、ヒトTORC2 (mTORC2)においても、Sin1サブユニットが基質結合サブユニットとして機能し、Sin1のCRIMドメインが基質特異性を担っていることを示している。

10. キーワード

- (1) 細胞情報伝達機構機構 (2) _____ (3) _____ (4) _____
- (5) _____ (6) _____ (7) _____ (8) _____

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(1 / 6)

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

ヒト培養細胞を用いたSin1 CRIMドメインの変異導入解析は、当初、ゲノムSIN1遺伝子由来の野生型Sin1タンパク質の共存下で試みたものの、変異型タンパク質の機能評価が困難であり、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノムSIN1遺伝子のノックアウトを行うことにした。その結果、変異型Sin1の機能欠損の程度をTORC2基質AKTのリン酸化のレベルで測定可能になった。分裂酵母からヒトまで保存されたSin1 CRIMの基質認識ドメインとしての機能を報告する論文を最近、投稿することができた。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

グルコースで活性化されるTORC2に対し、アミノ酸などの窒素源はTORC1によって感知されている。最近の報告では、哺乳類細胞におけるGタンパク質RhebによるmTORC1の活性化はリソソーム膜で起こると提案されており、アミノ酸刺激にตอบสนองしてmTORC1をリソソーム膜に局在させる機構が報告されている。同様のTORC1制御機構が分裂酵母でも保存されているかを検討し、さらにそのようなメカニズムがTORC2活性の影響を受けているかどうかを明らかにする。予備的な実験結果によると、分裂酵母ではGタンパク質二量体 Gtr1-Gtr2がTORC1の活性制御に関わっていることが明らかになっている。これと相同なRagA/B-RagC/D二量体が、哺乳類細胞においてmTORC1をリソソームに局在させるモデルが提唱されており、TORC1の活性制御機構は分裂酵母からヒトまで保存されている可能性が高い。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

H27年度は、現在投稿中の論文 (Tatebe et al. 2016)の準備のために、特に酵母の実験に注力したため、消耗品などが当初予定より低く抑えられた。

(使用計画)

H27年度の成果を基に展開する次年度の生化学実験やヒト培養細胞を用いた実験に必要な消耗品を中心に使用する計画である。

(課題番号： 26291024)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

(2 / 6)

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件/うち査読付論文 計(2)件/うち国際共著論文 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著者名		論文標題				
Hatano, T, Morigasaki, S, Tatebe, H, Ikeda, K, and Shiozaki, K		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	国際共著	
Cell Cycle	有	14	2015	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						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

著者名		論文標題				
Kataoka, S, Furuita, K, Hattori, Y, Kobayashi, N, Ikegami, T, Shiozaki, K, Fujiwara, T, Kojima, C		(1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of S. pombe Sin1 protein				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Biomol. NMR Assign.	有	9	2015	89-92	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1007/s12104-014-9550-6						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

(学会発表) 計(5)件/うち招待講演 計(4)件/うち国際学会 計(2)件

発表者名		発表標題	
Kazuhiro Shiozaki		Genetic dissection of Target of Rapamycin (TOR) signaling in cellular growth response to nutrients	
学会等名	発表年月日	発表場所	
HiHA 4th Workshop(招待講演)	2015年06月19日	広島大学(広島県東広島市)	

発表者名	発表標題	
Tomoyuki Fukuda, Hisashi Tatebe, Kazuhiro Shiozaki	Negative regulation of TOR complex 1 by heterodimeric Gtr1-Gtr2 GTPases	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 8th International Fission Yeast Meeting(招待講演)(国際学会)	2015年06月21日 ~ 2015年06月26日	生田社会館(兵庫県神戸市)

発表者名	発表標題	
Kazuhiro Shiozaki	Regulation and function of the two Target Of Rapamycin (TOR) complexes	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本分子生物学会・日本生化学会 合同大会(招待講演)	2015年12月01日 ~ 2015年12月04日	神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

発表者名	発表標題	
福田 智行、建部 恒、塩崎 一裕	Rag GTPase二量体によるTOR複合体1経路の抑制は分裂酵母の増殖に重要である	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本分子生物学会・日本生化学会 合同大会	2015年12月01日 ~ 2015年12月04日	神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

発表者名	発表標題	
Kazuhiro Shiozaki	Target of Rapamycin (TOR) signaling from and to vacuoles/lysosomes	
学会等名	発表年月日	発表場所
Progress 100: Second International Symposium: Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells(招待講演)(国際学会)	2016年02月08日 ~ 2016年02月09日	九州大学(福岡県福岡市)

(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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: 国際共同研究である

共同研究相手国	相手方研究機関			
USA	College of Medicine, Drexel University	University of California, Davis	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	/	/	/	/

17. 備考