

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840069

研究課題名(和文) TOR複合体の活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular and genetic analysis of the mechanism regulating TOR complex

研究代表者

福田 智行 (Fukuda, Tomoyuki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90415282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TOR複合体はTORキナーゼを中心とするタンパク質複合体で、栄養や成長因子に応答して標的タンパク質をリン酸化することで、細胞の生存、増殖、代謝といった様々な活動をコントロールしている。TOR複合体の活性は様々な経路や因子によって制御されており、この制御が破綻すると腫瘍形成や代謝異常を引き起こしてしまう。本研究は、TOR複合体の活性を制御する新規因子を取得することを目的に、分裂酵母を用いて生化学的および遺伝学的スクリーニングを行い、複数の因子を同定することに成功した。更なる解析により個々の制御の機序が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：TOR complex controls cellular functions such as cell survival, growth, and metabolism. TOR kinase is the catalytic subunit of TOR complex and its activity is thought to be regulated by multiple factors and signaling pathways in response to nutrient availability and growth factors. With an aim of identifying novel mechanisms that regulate TOR complex activity, biochemical and genetic screens were performed using fission yeast. The screenings identified various factors that potentially regulate the TOR complex signaling pathway either positively or negatively. Detailed analysis will be performed to reveal the molecular mechanism of each regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：TOR TORC1 TORC2 低分子量GTPase シグナル伝達 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

細胞は内外の環境や刺激を感知し、これらの情報を細胞内の分子ネットワークによって伝達、処理することで、様々なインプットに応じた適切な応答を行う。こうした情報処理システムは増殖、分化、移動、生存維持といった細胞活動の根幹を担っている。種々のシグナル伝達経路の中でも、TOR (Target of Rapamycin) 複合体が司るシグナル伝達経路は、細胞の増殖や成長を決定する重要な経路であることや、癌や糖尿病と関連することから近年注目を集めている。TOR 複合体は TOR キナーゼを中心とするタンパク質複合体で、酵母からヒトまで真核生物間で広く保存されている。2種類の TOR 複合体が存在し、主に栄養をインプットとする TORC1 (TOR complex 1)と、インスリンや成長因子による刺激に応答する TORC2 (TOR complex 2)とが、それぞれ異なる機能を果たしている。TORC1 は増殖、代謝、老化、寿命をコントロールしており、制御不能になると刺激に関係なく増殖を促進してしまうことから、癌と深く関連する。一方で TORC2 はインスリンに応じた糖の取り込みを統制することから、その機能不全は糖尿病を引き起こす。そのため、TOR 複合体は、抗癌、アンチエイジング、抗メタボリックシンドロームの標的として注目されている。実際に多種の癌細胞において TORC1 が活性化されており、TORC1 の阻害は癌細胞の増殖を抑制して細胞死を誘導することが知られている。しかし、TORC1 の阻害剤が特定の癌にしか使用できないことや高価なこと、副作用などが問題となっている。そこで、TOR 複合体経路が増殖や代謝を制御するシグナル伝達機構の詳細と全貌を明らかにすることで、創薬の標的候補因子を数多く同定し、副作用や組織特異性に関する知見を蓄積してゆく必要がある。以上から、TOR 複合体の活性がどのように制御されているのかを理解することは、生物学的にも医学的にも重要な課題といえる。

TOR 複合体経路の上流には様々なシグナル伝達経路が存在しており、各々が協調的あるいは排他的にはたらくことで、インプットの種類や強度に応じた TOR 複合体の活性制御に貢献していると考えられている。近年、TORC1 の上流から TOR 複合体の活性を制御する因子が複数同定され始めた。しかし、未だ TORC1 の活性化機構を十分に説明できないことから、未同定の活性制御機構が存在すると思われる。一方、TORC2 の上流経路は、分裂酵母で活性を正に制御する因子の一部が同定されたものの、他の生物ではほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

本研究は、TOR 複合体が種々のインプットに応じてどのように活性化されているのかについて分子レベルで明らかにすることを目的とした。これまで、TOR 複合体の活性を

制御する因子として複数の低分子量 GTPase が同定されている。これらの低分子量 GTPase は、結合するヌクレオチド (GTP/GDP) が上流からのシグナルによって変化し、ヌクレオチドの種類に応じて下流の TOR 複合体活性を制御すると考えられている。低分子量 GTPase の Rheb と、低分子量 GTPase の二量体である RagA/B-RagC/D はいずれも TORC1 の活性を、分裂酵母の低分子量 GTPase の 1 つ Ryh1 は TORC2 の活性を、それぞれ制御する。そこで本研究では、分裂酵母をモデルに、Rheb に相当する Rbh1、RagA/B-RagC/D に相当する Gtr1-Gtr2、Ryh1 に着目し、これら低分子量 GTPase に関与する因子を探索・同定することで、TOR 複合体経路の活性制御の仕組みを理解することにした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝学的スクリーニングによる TORC2 経路の制御因子の探索。

出芽酵母の遺伝学的手法として確立されている合成致死スクリーニングと呼ばれる手法を、分裂酵母に導入する。このスクリーニング法は、既知因子の変異株を用いて、既知因子がはたらく経路とはパラレルな経路に欠損をもつ変異体や既知経路を制御する因子の変異体を効率よく同定することができる。出芽酵母では、アデニン合成経路の遺伝子群を利用し、コロニーの色によって合成致死を検出できる系が確立している。そこで、分裂酵母の相同遺伝子を利用し、同様のスクリーニング法を確立する。次に、確立した方法を用いて、Ryh1 による TORC2 経路の活性化に関する知見を得る。Ryh1 は結合するヌクレオチド (GTP/GDP) に応じて TORC2 を正/負に制御する。これまで、Ryh1 による TORC2 の制御は TORC2 の構成因子の 1 つである Bit61 タンパク質を介していることが示唆されていた。Bit61 は TORC2 の構成因子にもかかわらず、コードする遺伝子を破壊しても、他の構成因子である Tor1、Sin1、Ste20 の遺伝子破壊株に比べて、TORC2 経路の欠損が部分的である。したがって、Ryh1-Bit61 とはパラレルに TORC2 経路を制御する経路が存在している可能性が挙げられた。そこで、この可能性を検討するために、*bit61* 遺伝子破壊株を用いた合成致死スクリーニングを行い、Ryh1-Bit61 とはパラレルにはたらく経路に含まれる因子を探索する。また、合成致死スクリーニングと平行して、マルチコピーサプレッサースクリーニングも行う。このスクリーニングは、過剰発現により *bit61* 遺伝子破壊株の欠損を回復させる遺伝子を探索する手法で、Ryh1-Bit61 とはパラレルにはたらく経路や下流ではたらく経路に含まれる因子を同定することが期待される。

(2) Rbh1 と相互作用する因子の探索

低分子量 GTPase である Rheb は GTP 結合型で TORC1 経路を活性化することが知られてい

る。一般的に低分子量 GTPase の活性化には GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) が、不活性化には GAP (GTPase 活性化タンパク質) がそれぞれ必要である。Rhb1 の GAP として Tsc1-Tsc2 ヘテロ二量体がすでに同定されている。Tsc1-Tsc2 は分裂酵母からヒトまでよく保存されており、家族性腫瘍の 1 つであるヒト結節性硬化症の原因遺伝子として知られる。一方、Rheb の GEF はいずれの生物種においても明らかになっていない。また、Rheb のエフェクターに関する知見も乏しく、GTP 型 Rheb と特異的に結合してシグナルを伝える因子が何であるかは分かっていない。そこで、分裂酵母の Rheb 相同タンパク質 Rhb1 と相互作用する因子を探索し、Rheb を介した TOR 複合体経路の制御を明らかにする。この際に、GTP 型の Rhb1 と GDP 型の Rhb1 とを用意し、作用する因子をそれぞれに対して同定することで、結合ヌクレオチドに応じた制御に関する知見の獲得を目指す。そこで、まず Rhb1 を大腸菌で発現させて精製し、精製した Rhb1 に GTP あるいは GDP をロードして GTP 型 Rhb1 と GDP 型 Rhb1 を形成させる。次に、分裂酵母の細胞破砕液をロードし、GTP 型 Rhb1 と GDP 型 Rhb1 に結合する因子をそれぞれ回収した後、質量分析により各因子を同定する。

(3) Gtr1-Gtr2 と相互作用する因子の探索

低分子量 GTPase のヘテロ二量体である分裂酵母 Gtr1-Gtr2 と相互作用する因子を同定する。まず Gtr1 と Gtr2 にそれぞれ異なるエピトープタグを付加した酵母株を作製する。この酵母株の細胞破砕液から一方のエピトープタグに対する抗体を用いて免疫沈降を行う。免疫沈降物を洗浄後、エピトープのペプチドを加えて競合により免疫沈降物を溶出する。この溶出液に対し、もう一方のエピトープタグに対する抗体を用いた免疫沈降を行う。得られた免疫沈降物を質量分析により解析し、ペプチド断片を同定する。以上の方法により、Gtr1-Gtr2 ヘテロ二量体と特異的に結合する因子を回収することが期待される。次に、同定された因子に関して、Gtr1-Gtr2 ヘテロ二量体との結合を確認するとともに、各因子の細胞内局在や分子特性、因子間の相互作用を解析することで特徴付けを行う。更に、各因子の遺伝子破壊株を作製し、TORC1 経路に関連する表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) 遺伝学的スクリーニングによる TORC2 経路の制御因子の探索。

分裂酵母における合成致死のアッセイ系を確立するために、出芽酵母で用いられる、アデニン合成経路の遺伝子を利用してコロニーの色で検出できる方法を導入した。相同遺伝子を用いることにより、分裂酵母において同様の系を確立することに成功した。この系が機能することを確かめるために、合成致

死であることが既に知られている *scd1* 遺伝子と *gef1* 遺伝子の二重遺伝子破壊を用いてアッセイを行ったところ、期待通りにコロニーの色によって合成致死を検出することができた。

Ryh1-Bit61 による経路とはパラレルに TORC2 の活性を制御する因子を探索した。まず、*bit61* 遺伝子破壊株との二重変異により、他の TORC2 構成因子の破壊株と同様にストレス条件下で生育が不能になるような変異体を探索する合成致死スクリーニングを行った。また、*bit61* 遺伝子破壊株の TORC2 活性の低下やストレス条件下での生育不全を過剰発現により回復させるマルチコピーサブレッサーのスクリーニングも併せて行った。これらスクリーニングにより、現在までに 3 種の候補因子を取得し、そのうち 1 種について詳細な解析を行った。

bit61 遺伝子破壊株では TORC2 の活性が低下するため、TORC2 の特異的基質である Gad8 タンパク質のリン酸化が野生株に比べて低下する。しかし、上記の候補因子を *bit61* 遺伝子破壊株で過剰発現させると、Gad8 のリン酸化が野生株と同レベルにまで回復していた。また、Bit61 と候補因子の二重遺伝子破壊株では Gad8 のリン酸化が顕著に減少しており、ストレス条件下での生育も低下していた。以上から、この候補因子は Ryh1-Bit61 経路とはパラレルに TORC2 を制御していることが明らかになった。

分裂酵母で得られた知見の保存性や多様性を哺乳類細胞で検証するために、Bit61 相同タンパク質である PRR5 をコードする遺伝子のノックアウトを、ヒト培養細胞において試みた。CRISPR-Cas9 システムを利用して作製した複数のノックアウト株において、TORC2 の基質である Akt のリン酸化を調べたところ、リン酸化レベルに影響は見られなかった。したがって、分裂酵母と同様に、哺乳類細胞においても PRR5 が関与する経路とはパラレルに TORC2 の活性を制御する経路が存在している可能性が示唆された。

(2) Rhb1 と相互作用する因子の探索

GST あるいは MBP と Rhb1 との融合タンパク質を大腸菌で発現するコンストラクトを作製し、大量発現と精製に成功した。その後の解析で、MBP を利用した場合には非特異的な結合によるバックグラウンドが高くなることを見出されたため、結合因子探索には GST 融合タンパク質を用いることにした。精製した GST 融合 Rhb1 に GTP または GDP を結合させ、GTP 型 Rhb1 あるいは GDP 型 Rhb1 に作用する因子を回収するプルダウンアッセイ系を確立した。

確立した系が期待通りに機能することを確認するために、Rhb1 との結合が予想される因子を利用した。Tsc2 タンパク質は Rhb1 の GAP としてはたらくため、GTP 型 Rhb1 と結合することが予想される。また、近年、哺乳類

細胞で Rheb のエフェクター候補として同定された CAD タンパク質の分裂酵母相同タンパク質 Ura1 も、GTP 型 Rbh1 と結合すると仮定して利用した。その結果、Tsc2 と Ura1 はいずれも GTP 型 Rbh1 特異的にプルダウンされることが明らかになった。更に、Tsc2 と Ura1 を利用し、これらのタンパク質の回収効率を指標に実験条件を検討し、系の最適化を行った。

最適化された条件で、分裂酵母の細胞抽出液から GTP 型 Rbh1 と GDP 型 Rbh1 とにそれぞれ結合するタンパク質をプルダウンし、質量分析により結合因子を同定した。その結果、それぞれと特異的に結合するタンパク質の候補を複数同定することができた。興味深い因子として、アミノ酸合成経路の酵素や糖の代謝に関わる酵素が GDP 型 Rbh1 と特異的に結合する因子として同定された。TORC1 は栄養をインプットとすることや、代謝をコントロールすることから、TORC1 経路とこれら代謝経路とのクロストークの存在や、Rbh1 が分子スイッチとしてこの過程に参与する可能性が見出された。

(3)Gtr1-Gtr2 と相互作用する因子の探索

エピトープタグを付加した Gtr1-Gtr2 を発現する酵母細胞から破砕液を用意し、免疫沈降した際に共沈降するタンパク質を質量分析により同定した。特にスコアの高かった 4 種のタンパク質を、それぞれ Rag orthologs-binding (Rob) タンパク質と名付けた。各 Rob タンパク質にエピトープタグを付加し、免疫沈降法により、Gtr1-Gtr2 や他の Rob タンパク質との結合を解析したところ、Rob タンパク質は複合体を形成し、Gtr1-Gtr2 と結合することが見出された。次に、Rob タンパク質の細胞内局在を観察したところ、いずれも TORC1 が存在する液胞膜上に検出された。また、遺伝子欠損株を用いた解析から、Rob タンパク質の液胞膜上への局在は、Gtr1-Gtr2 や TORC1 の活性とは独立していることも明らかになった。

Rob タンパク質のはたらきを明らかにするために、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。いずれの遺伝子破壊株も増殖が遅延しており、増殖遅延は Gtr1-Gtr2 の遺伝子破壊株と同程度であった。更に、Gtr1 あるいは Gtr2 と Rob タンパク質との二重遺伝子破壊株はいずれも単独破壊株と同程度の増殖遅延を示し、二重破壊による付加的な効果が見られなかったことから、Rob タンパク質は Gtr1-Gtr2 と同一の経路ではたらくことが明らかになった。

Rob タンパク質の遺伝子破壊株に対する顕微鏡観察の結果、いずれの破壊株においても液胞が顕著な形態異常を示すことが明らかになった。一方、TORC1 構成因子の 1 つ Mip1 タンパク質の細胞内局在を観察したところ、野生株同様、Rob タンパク質の遺伝子破壊株においても液胞膜上にシグナルが検出され

た。次に、TORC1 経路の活性を調べたところ、Rob タンパク質の遺伝子破壊株では野生株に比べて活性が上昇していることを示唆する結果が得られた。以上から、Rob タンパク質の破壊株が示す液胞形態の異常と TORC1 経路の活性に何らかの因果関係が存在する可能性があるといえる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

福田智行、塩崎一裕、Mammalian target of rapamycin (mTOR)、生体の科学、査読無、第 66 巻 5 号、2015、436-437

〔学会発表〕(計 1 件)

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、第 38 回日本分子生物学会年会、ワークショップ「TOR の実像に迫れ!」、2015 年 12 月 4 日、神戸ポートピアアイランド(兵庫県神戸市) 招待講演

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福田 智行 (FUKUDA, Tomoyuki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：90415282