

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440086

研究課題名(和文) TORキナーゼ複合体TORC2のグルコース応答分子機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of TOR Complex 2 on glucose stimuli

研究代表者

建部 恒 (Tatebe, Hisashi)

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：00596819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵母からヒトまで進化上保存されているTORC2 (TOR complex 2)-Akt経路は、ヒトではインシュリン刺激に反応し、分裂酵母では細胞外環境のグルコースを直接認識し反応する。研究代表者はこれまでに、自身が以前に同定したTORC2活性化因子Ryh1を通じて、分裂酵母TORC2-Akt経路がグルコースに反応していることを見出していた。

本研究では新たに、Ryh1に依存しない未知の分子機構によってもグルコースに反応した活性化制御をTORC2が受けるという事実を見出した。また、グルコースに反応したTORC2がAktを活性化する鍵分子機構について新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The TORC2 - Akt pathway is evolutionarily conserved from yeast to human. Whereas the human TORC2 pathway responds to insulin stimuli, the TORC2 pathway in a unicellular organism fission yeast directly responds to glucose in the extracellular environment. In the previous study, we utilized fission yeast as a model organism and found that Ryh1, a known activator of TORC2, is involved in glucose response of fission yeast TORC2. In this study, we have discovered a novel mechanism that regulates TORC2 on glucose stimuli independently of Ryh1, although the precise molecular mechanism has remained to be elucidated. We have also revealed a key molecular mechanism how TORC2 activates Akt.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：TOR

1. 研究開始当初の背景

TOR (Target Of Rapamycin) は酵母からヒトまで広く保存されているセリン・スレオニンキナーゼである。TOR キナーゼが形成する複合体の一つ TOR Complex 2 (以下 TORC2 と表記) はヒトでは Akt (PKB とも呼ばれる。以下 Akt で統一) を、分裂酵母では Gad8 (ヒト Akt 相同タンパク質) をリン酸化することで Akt および Gad8 を活性化する (Ikeda et al., 2008)。ヒトでは TORC2 は、インスリンや他の成長因子刺激に反応して Akt を活性化する。活性化された Akt は、未分化の初期胚やガン細胞ではアポトーシスを抑制し細胞増殖を促進すると共に、成体の筋肉や脂肪組織ではグルコース代謝制御に重要な役割を果たす。しかしながらヒト TORC2 がインスリン刺激により活性化する分子機構の詳細は未だ不明である。

研究代表者は本研究開始以前に、対数増殖期にある分裂酵母培養液からグルコースを除去すると Gad8 は速やかに脱リン酸化、不活性化され、グルコース再添加により Gad8 は速やかにリン酸化、活性化されることを見出した (研究開始時点において未発表の結果)。この結果は、多様に分化した組織を持つ多細胞生物であるヒトの TORC2 が、体内で分泌されるインスリンホルモンを介してグルコースに反応する一方、単細胞生物であり細胞外環境の栄養を直接感知し取り込む分裂酵母の TORC2 は、細胞外環境のグルコースに直接反応することを示している。ただし、インスリン受容体のような受容体チロシンキナーゼはヒトと異なり分裂酵母には存在しない。その代わりに、様々なヒトホルモンを感知することが知られている G タンパク質共役受容体が、分裂酵母では細胞外環境のグルコースを感知する受容体として機能する事が知られている。

研究代表者は本研究開始以前にまた、真核生物に進化上保存された Rab 低分子量 G タンパク質 Ryh1 (ヒト Rab6 相同タンパク質) が TORC2 を活性化することを見出した (Tatebe et al., 2010; Tatebe and Shiozaki, 2010)。さらにまた、グルコース非存在下では Ryh1 活性が有意に低下しており、*ryh1* 遺伝子機能欠損変異体や *ryh1* 恒常活性型変異体では Gad8 リン酸化がグルコースに反応しなくなっていた (研究開始時点において未発表の結果)。以上の結果から、分裂酵母では細胞外環境のグルコースに反応した Ryh1 の活性化・不活性化を通じて TORC2 活性が制御されていることが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

分裂酵母では、G タンパク質共役受容体が細胞外のグルコースを直接感知する細胞表面受容体として知られている。細胞外のグル

コースが分裂酵母 G タンパク質共役受容体に直接結合すると、細胞内の 3 量体 G タンパク質、アデニル酸シクラーゼ、PKA (cAMP-dependent protein kinase) が相次いで活性化する。従って、G タンパク質共役受容体依存的に、3 量体 G タンパク質や PKA の制御下で Ryh1 活性がグルコースに反応している可能性が考えられた。

Ryh1 を含めた低分子量 G タンパク質は、GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) により GTP と結合して活性化し、GAP (GTPase 活性化タンパク質) により GDP と結合した不活性化型に変化する。研究代表者はこれまでに、遺伝学的探索から Sat1/4 複合体を Ryh1 の GEF として同定している (Tatebe et al., 2010; Tatebe and Shiozaki, 2010)。また、分裂酵母に存在する全部で 12 個の Rab GAP のうちの幾つかが Ryh1 の GAP として機能するという予備的な結果を得ている (研究開始時点において未発表の結果)。TORC2 のグルコース反応は、これらの Ryh1 GEF、Ryh1 GAP がグルコースに反応して Ryh1 活性を制御することで引き起こされる可能性が考えられた。

以上を踏まえ本研究では、グルコースに反応した TORC2 活性化分子機構の全体像解明を目指し、「G タンパク質共役受容体および PKA に依存的なグルコース反応による Ryh1 活性制御機構の解析」、「Ryh1 GEF、Ryh1 GAP のグルコース反応とその分子制御機構の解析」に取り組むことを当初計画とした。

3. 研究の方法

細胞表面に局在する分裂酵母 G タンパク質共役受容体 Git3 が細胞外環境のグルコースに結合すると、細胞膜の細胞質側に局在する 3 量体 G タンパク質を刺激する。刺激により活性化した 3 量体 G タンパク質 α サブユニット Gpa2 は、アデニル酸シクラーゼ Cyr1 に結合して cAMP 合成を刺激し PKA の活性化を誘導する。

そこでまず、Ryh1 活性のグルコース反応に G タンパク質共役受容体 Git3 が与える影響を、野生株と *git3* 遺伝子破壊株をグルコース存在下、グルコース枯渇条件下およびグルコース再添加条件下で培養し、活性型 Ryh1 に特異的に結合するヒト Rab6 エフェクターを用い細胞内 Ryh1 活性を比較することで検討する。影響が認められた場合は引き続き、Ryh1 のグルコース反応が 3 量体 G タンパク質や PKA の制御下にあるかどうかを *gpa2*、*cyr1*、*pka1* (PKA 触媒サブユニット)、*cgs1* (PKA 制御サブユニット) 遺伝子破壊株を用いて検討する。さらにまた、グルコース反応を示す Ryh1 GEF、Ryh1 GAP を同定後には、G タンパク質共役受容体、3 量体 G タンパク質、PKA がそれらの GEF、GAP に与える影響を検討する。

グルコースに応答した Ryh1 GEF、Ryh1 GAP タンパク質量の変動を解析するために、エピトープタグ融合 Sat1、Sat4、Ryh1 GAP 候補タンパク質を内在性プロモーターの制御下でゲノム DNA から発現する分裂酵母株を、グルコース存在下、グルコース枯渇条件下およびグルコース再添加条件下で培養し、イムノブロットにより、細胞内での各 GEF、GAP タンパク質量のグルコースに応答した変動を検討する。また、Sat1、Sat4 は互いに結合して複合体を形成し Ryh1 GEF として機能するので、グルコース存在下及び非存在下で培養した分裂酵母細胞から、免疫沈降により Sat1/4 複合体を精製して複合体の量的変動を検討する。また、グルコースに応答した GEF、GAP 活性や細胞内局在の変動についても検討する。

4. 研究成果

細胞外環境グルコースを感知する G タンパク質共役受容体 Git3 とその下流で活性化する 3 量体 G タンパク質 α サブユニット Gpa2、Gpa2 により活性化されるアデニル酸シクラーゼ Cyr1、活性化 Cyr1 が産生する cAMP により活性化される cAMP 依存的タンパク質キナーゼ (PKA) 触媒サブユニット Pka1 は、グルコースに応答した Ryh1 活性化を担う分子機構である可能性が考えられた。そこで始めに、これら因子の遺伝子破壊分裂酵母変異株において TOR キナーゼ複合体 TORC2 による Gad8 キナーゼリン酸化の程度を検討した。これら因子が Ryh1 活性に影響を与えている場合は TORC2 活性に影響が及び、ひいては Gad8 リン酸化の程度に影響を及ぼすことが予想される。

これらの因子の遺伝子破壊株を分裂酵母の標準的な完全培地である YES 培地 (3% グルコースを含む) で培養したところ、当初の予想に反して、Gad8 リン酸化レベルの低下は全く認められなかった。この発見は、細胞外環境に存在するグルコースに応答した Ryh1 依存的な TORC2 活性化に、G タンパク質共役受容体および 3 量体 G タンパク質、cAMP-PKA 経路が全く関与していないという予想外の結果を意味していた。しかしながらこの解析を我々が進めていたときに、イスラエルのグループから、分裂酵母においてグルコースが cAMP-PKA 経路を通じて TORC2-Gad8 経路を活性化するという報告がなされた (Cohen et al., 2014)。

そこで我々は、さらに慎重に解析を進める事とした。その結果、我々が本研究開始当初に得ていた、G タンパク質共役受容体および 3 量体 G タンパク質、cAMP-PKA 経路が Ryh1 依存的な TORC2 活性化に寄与しないという結果が正しく、イスラエルのグループは実験条件・手法の不備から誤った結果を得ていたと結論づけ、英国テイラーアンドフラ

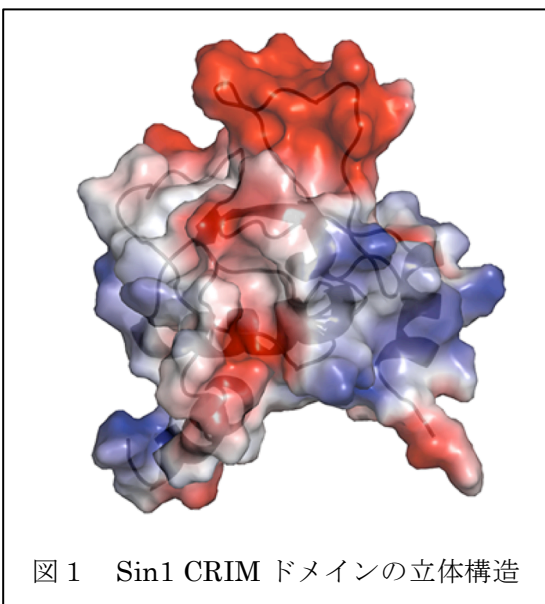
ンシス社刊行の査読付国際学術誌 Cell Cycle 誌において報告した (Hatano et al., 2015)。また、他生物種での研究から、グルコース飢餓が進み細胞内の ATP が枯渇すると TORC2 複合体が不安定化することが指摘されていたが、我々が分裂酵母をモデルとして解析している迅速な TORC2 活性のグルコース応答はそのような受動的な応答ではなく、Ryh1 活性制御を含む細胞内での能動的な制御によるものであると考えられた (Hatano et al., 2015)。グルコースに代表される炭素栄養源と並ぶ主要栄養源である窒素栄養源については、分裂酵母 TORC2 活性化を特には促進しないことも併せて示した (Hatano et al., 2015)。

さらには、Ryh1 依存的にグルコースにより活性化する TORC2 活性制御機構に加えて、細胞外環境のグルコースによって通常は抑制されている Ryh1 に依存しない TORC2 活性化機構が存在しているという、本研究開始時には全く予期していなかった事実が明らかとなってきた (Hatano et al., 2015)。2 種類の異なる活性化機構による複合的な制御の結果として、細胞外環境からグルコースが枯渇すると、Ryh1 の不活性化により分裂酵母 TORC2 は一時的に不活性化するが、グルコース枯渇により抑制が解かれた Ryh1 に依存しない活性化機構の働きにより、細胞外環境グルコースの枯渇時においてもやがて TORC2 は再度の活性化を果たす (Hatano et al., 2015)。これまでの解析から、分裂酵母の生理において TORC2 機能は低グルコース環境での生育に必須であることが明らかとなっていた (Hatano et al., 2015)。一方低グルコース環境での分裂酵母の生育に Ryh1 機能は必須ではなく、むしろ、本研究で見出した Ryh1 に依存しない TORC2 活性化機構が低グルコース環境での生育において生理的に重要な役割を担っている可能性が浮かび上がってきた (Hatano et al., 2015)。

細胞外環境のグルコースにより抑制を受ける、Ryh1 に依存しない TORC2 活性化の実態および分子機構の詳細は分裂酵母では全く未知であり、他生物種にもそれについて示唆する知見は皆無であった。そのためそこで、グルコース依存的な Ryh1 活性制御機構のより詳細な解明に先立ち、本研究の当初計画より一部を変更して、Ryh1 に依存しない TORC2 活性化分子機構の解明に焦点を当てた遺伝学的探索に着手することにした。これまでに、分裂酵母 TORC2 の恒常機能欠損変異体を用いた遺伝学的探索からは、多コピーで TORC2 欠損表現型を相補する分裂酵母ゲノムクローンを複数単離しており、それらのクローンについての解析を進めている (未発表結果)。TORC2 部分機能欠損変異体を用いた遺伝学的解析からも、同様に多コピー相補ゲノムクローンを複数単離して解析を進めている (未発表結果)。さらなる遺伝学的探索のために新たな TORC2 部分欠損変異体の

創出も行った（未発表結果）。現在までに行った多コピー相補ゲノムクローンの解析からは、単離したゲノムクローンの中に遺伝学的探索に用いた変異体の原因遺伝子を含むゲノムクローンが含まれていることが明らかとなっており、多コピー相補ゲノムクローンの遺伝学的探索が適切に行われていることが窺える（未発表結果）。また、TORC2機能の低下により引き起こされる Gad8 機能欠損を代替する Gad8 キナーゼ類似のキナーゼや、既存の TORC2 サブユニットの1つを代替する分子機能を有する可能性が示唆される新奇因子も単離されている（未発表結果）。

研究代表者が本研究開始以前に行い発表済みの研究から、グルコースに応答した Ryh1 による TORC2 活性化は、TORC2 と TORC2 基質タンパク質との物理的相互作用の促進によることが示唆されていた (Tatebe et al., 2010)。そこでまた、Ryh1 を通じた TORC2 のグルコース応答分子機構解明のための試みの一環として、本研究の当初計画にさらに加えて、TORC2 中に存在する TORC2 基質タンパク質を認識する部位についての解析を行った。その結果、TORC2 の必須制御サブユニット Sin1 中央領域に分裂酵母からヒトまで共通して存在する CRIM ドメインが、特徴的な酸性ループを有するユビキチン様ドメインであり、TORC2 基質タンパク質の認識部位として機能する事を見出し、英国で刊行されている生物学分野の査読付オープンアクセス国際学術誌 eLIFE 誌において報告した [図 1] (Tatebe et al., 2017)。本研究で得られた Sin1 CRIM ドメイ



ンの立体構造および Sin1 CRIM ドメインと Akt との物理的相互作用の様式についての知見は、ヒト発ガンの主因の一つと考えられている TORC2-Akt 経路異常活性化を抑制する分子標的薬の将来的な創出に際して、基盤を与える知見となることが大いに期待されている (Tatebe et al., 2017; 記者発表 「ガン増殖を引き起こすタンパク質 Sin1 の構造を

明らかに 分裂酵母の研究が新たな抗ガン剤創薬への扉を開く」 <http://www.naist.jp/pressrelease/2017/03/003673.html> ; 奈良新聞 2017 年 3 月 25 日朝刊 3 面 「新しい抗がん剤期待 活性化領域の構造解明」; 朝日新聞 2017 年 3 月 30 日朝刊 23 面 「がん増殖関わる酵素 活性化の仕組み解明」)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tatebe, H., Murayama, S., Yonekura, T., Hatano, T., Richter, D., Furuya, T., Kataoka, S., Furuita, K., Kojima, C., and Shiozaki, K. (2017). Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. *Elife* 6, e19594. PMID: 28264193; DOI: 10.7554/eLife.19594; 研究代表者が筆頭著者兼責任著者の一人として発表; 査読有; 記者発表 「ガン増殖を引き起こすタンパク質 Sin1 の構造を明らかに～分裂酵母の研究が新たな抗ガン剤創薬への扉を開く」 <http://www.naist.jp/pressrelease/2017/03/003673.html>
- ② Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K., and Shiozaki, K. (2015). Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle* 14, 848-856. PMID: 25590601; DOI: 10.1080/15384101.2014.1000215; 研究代表者が筆頭著者の一人として発表; 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 建部 恒、秦野 智行、森ヶ崎 進、江森 翠、塩崎 一裕 "TOR キナーゼ複合体 2 (TORC2) の環境応答制御とその生理的意義" 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ(1W5 TOR シグナリング: メカニズムと生理)、一般演題より採択され講演 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市 研究代表者による発表
- ② 建部 恒、児嶋 長次郎、塩崎 一裕 "Role of Sin1 in TORC2 signaling" 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ (3PW8. TOR ROAD - TOR への道、TOR からの道) 招待講演 2013 年 12 月 5 日 神戸ポートアイランド、兵庫県・神戸市 研究代表者による発表

6. 研究組織

(1)研究代表者

建部 恒 (TATEBE HISASHI)
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：00596819