

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291024

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) TOR kinase complexes that sense and integrate major nutritional signals

研究代表者

塩崎 一裕 (Shiozaki, Kazuhiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 教授

研究者番号：00610015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：TORキナーゼを含むTORC1およびTORC2複合体は、細胞の成長・増殖制御に中心的な役割を果たす。分裂酵母をモデルとして解析を行い、Rab様Gタンパク質が、グルコースに応答してTORC2を活性化することを発見した。また、TORC2のサブユニットの一つであるSin1のCRIMドメインが特異的にTORC2基質に結合することを示し、その立体構造を決定した。さらに、Rag様Gタンパク質のGtr1-Gtr2ヘテロ二量体が、TORC1の活性を抑制することを発見した。この抑制制御には、Gtr1のGTPase-Activating Proteinとして働くGATOR1複合体が必須であった。

研究成果の概要(英文)：TOR protein kinase forms two distinct complexes, called TOR complex 1 (TORC1) and TOR complex 2 (TORC2), both of which are implicated in cancerous cell proliferation and metabolic syndrome. By using fission yeast as a genetically amenable model system, we have demonstrated that a Rab-family GTPase activates TORC2 in response to extracellular glucose. Within TORC2, we have found that the Sin1 subunit is responsible for binding the TORC2 substrates. The TORC2 substrates interact with the Sin1 CRIM domain, whose NMR structure has a ubiquitin-like fold with a characteristic acidic loop. Lastly, we have shown that the Rag-family GTPase heterodimer Gtr1-Gtr2 at vacuolar membranes plays an important role in suppressing TORC1 activity. This negative regulation of TORC1 requires the GATOR1 complex that functions as GTPase-Activating Protein (GAP) for the Gtr1 GTPase.

研究分野：細胞生物学

キーワード：TOR 分裂酵母 栄養源 細胞増殖

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質リン酸化酵素 TOR は、複数の制御サブユニットと結合することによって2種類の機能複合体、TORC1 および TORC2 を形成する。TORC1 は、免疫抑制剤ラパマイシンの標的として集中的な研究が行われ、アミノ酸シグナルに応答したタンパク質合成の促進に働いていることが明らかになっている。他方、特異的阻害剤がないために TORC2 の研究は大きく遅れているが、インスリンに応答して活性化し、Akt キナーゼのリン酸化を通して細胞のグルコース取り込みを誘導することが報告されている。

申請者を含む国内外の研究者によって、モデル生物である分裂酵母がヒト TORC1、TORC2 経路に酷似したシグナル経路を持つことが既に明らかにされている。特に、G タンパク質 Rheb による TORC1 の活性化や、TORC2 によるグルコース取り込み制御などは、ヒトと分裂酵母の間では保存されているが出芽酵母には見られず、分裂酵母はより優れた TOR 研究のモデル系であると考えられる。

申請者は予備実験によって、TORC2 あるいはその基質 Gad8 を欠損した分裂酵母株では TORC1 の活性が顕著に低下すること、逆に人為的に TORC2 経路を活性化すると TORC1 も活性化されることを示し、TORC2-Gad8 経路が TORC1 を正に制御していることが明らかにした。すなわち、窒素源とグルコースという二つの主要栄養が TORC1 と TORC2 それぞれによって感知され、かつ TORC2 が TORC1 を制御することによって二つの栄養シグナルが統合されて、細胞増殖の開始を制御している可能性が浮かび上がってきた。

### 2. 研究の目的

#### (1) TORC2 によるグルコースシグナル感知メカニズムの解明

現在の TOR 研究における最大の謎の一つは、シグナルに応答して TORC2 が活性化されるメカニズムである。TORC2 活性化因子の探索は、様々な生物種で試みられていたが、申請者らは、低分子量 G タンパク質 Ryh1 (ヒト Rab6 相同分子) を分裂酵母 TORC2 の活性化因子として同定した。細胞外グルコースに応答した Ryh1 の制御機構を追求する。

#### (2) TORC2 による基質認識機構の究明

いずれも TOR キナーゼを触媒サブユニットとする TORC1 および TORC2 は、全く異なる基質をリン酸化することによって栄養シグナル統合回路で機能する。申請者らは、分裂酵母 TORC2 の基質特異性に Sin1 サブユニットの CRIM ドメインが必須であることを発見しており、TORC2 の基質特異性を決定する分子機構を明らかにする。さらに、ヒト TORC2 においても Sin1 が同様の機能を果たすのかを検証する。

#### (3) TORC1 制御メカニズムの解明

窒素源/アミノ酸シグナルとグルコースシグナルの統合は、窒素源による TORC1 活性の制御と TORC2-Gad8 経路による TORC1 の制御によって行われている。分裂酵母モデル系を用いて、TORC1 の活性制御の分子機構を追求する。

### 3. 研究の方法

本研究計画は、TORC1 および TORC2 複合体が、異なった栄養シグナルを感知・統合する細胞内情報処理ネットワークを構築していることを明らかにするために、(1) TORC2 へのグルコースシグナル入力機構；(2) TORC2 が基質を特異的に認識してシグナルを出力するメカニズム；および (3) TORC1 の活性制御機構、を解析する。

分裂酵母モデル系を用いた分子遺伝学的な解析に加え、申請者らの確立した生化学的アッセイ、タンパク質リン酸解析、さらに構造生物学的アプローチを組み合わせることで研究を進め、得られた知見を基にヒト培養細胞にも実験研究を拡張することによって、進化上保存された栄養シグナル情報処理の原理に迫る。

### 4. 研究成果

(1) ヒト Rab6 エフェクターである BICD2 の断片を用いて分裂酵母破砕液から GTP を結合した活性型 Ryh1 のみを吸着・定量するアッセイ系を確立して Ryh1 の活性化状態を調べたところ、細胞外グルコースに応答して Ryh1 が GTP 結合型に変換されることを発見した。一方、イスラエルの研究グループが、分裂酵母 TORC2 が cAMP-PKA 経路を介してグルコースに応答すると報告したが (Cohen et al. 2014)、より厳密な方法によるわれわれの実験ではその結果を再現できず、Ryh1 がグルコース刺激に応答して TORC2 を活性化する主要因子であると考えられる。また、Ryh1-TORC2 経路は培地中の窒素源の有無には応答しなかった。この成果は、下記雑誌論文⑤として発表した。

(2) 連携研究者である児嶋長次郎博士と共に、分裂酵母 Sin1 タンパク質の CRIM ドメインの NMR 立体構造を決定した。その CRIM ドメインが TORC2 のリン酸化基質である Gad8 を特異的に認識し、結合することを明らかにした。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。以上の結果から、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と結論できた。この成果は、下記雑誌論文④⑥⑦として発表した。

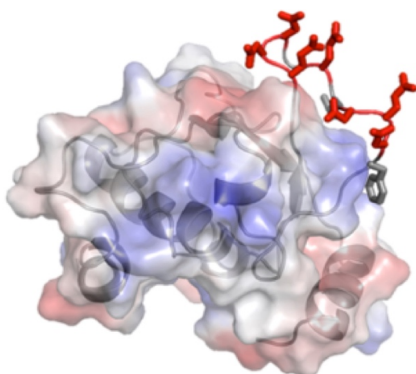


図1. Sin1 CRIM ドメインの構造。TORC2 基質の結合に必須のループ部分をスティックモデルで表示した。

(3) アミノ酸やアンモニアなどの窒素源によって活性化される TORC1 複合体についても分裂酵母をモデル系とした解析を進め、ヒト細胞で TORC1 を負に制御することが知られている GATOR1 複合体が分裂酵母でも保存されていることを明らかにした。この分裂酵母 GATOR1 は、Iml1, Npr2, Npr3 の3つのサブユニットからなり、それらの遺伝子破壊実験によって、ヒト GATOR1 と同様に分裂酵母においても GATOR1 が TORC1 活性を負に制御することを明らかにした。

また、分裂酵母の Rag GTPase である Gtr1-Gtr2 ヘテロ二量体が、液胞膜に局在し、TORC1 の活性抑制に必須であることを発見した。このメカニズムは、GDP 結合型の Gtr1 に依存しており、GATOR1 複合体が Gtr1 の GTPase-Activating Protein (GAP) として働くことを明らかにした。この結果は、これまで TORC1 の活性化因子として考えられてきた Rag GTPase が、TORC1 抑制因子としても機能することを示す、非常に予想外の結果であった。この成果は、下記雑誌論文①②として発表した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

① Fukuda, T. and Shiozaki, K. (2018). The Rag GTPase-Ragulator complex attenuates TOR complex 1 signaling in fission yeast. *Autophagy*, in press. 査読有

② Chia, K.H., Fukuda, T., Sofyantoro, F., Matsuda, T., Amai, T., and Shiozaki, K. (2017). Ragulator and GATOR1 complexes promote fission yeast growth by attenuating TOR complex 1 through Rag GTPases. *eLife* 6, e30880. 査読有 DOI:10.7554/eLife.30880

③ Tatebe, H., and Shiozaki, K. (2017). Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules* 7, 77. 査読有 DOI:10.3390/biom7040077

④ 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. 査読有 DOI:10.7554/eLife.19594

⑤ Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K., and Shiozaki, K. (2015). Fission yeast Ryl1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell Cycle* 14, 848-856. 査読有 DOI:10.1080/15384101.2014.1000215

⑥ Furuita, K., Kataoka, S., Sugiki, T., Hattori, Y., Kobayashi, N., Ikegami, T., Shiozaki, K., Fujiwara, T. and Kojima, C. (2015). Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. *J. Biomol. NMR* 61, 55-64. 査読有 DOI:10.1007/s10858-014-9882-7

⑦ Kataoka, S., Furuita, K., Hattori, Y., Kobayashi, N., Ikegami, T., Shiozaki, K., Fujiwara, T. and Kojima, C. (2015). <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of *S. pombe* Sin1 protein. *Biomol. NMR Assign.* 9, 89-92. 査読有 DOI:10.1007/s12104-014-9550-6

⑧ 福田 智行、塩崎 一裕 (2015) Mammalian target of rapamycin (mTOR)、生体の科学 66巻、436-437 査読無 <http://medicalfinder.jp/toc/2425/2015/66/5>

[学会発表] (計15件)

① 塩崎 一裕 「TOR 複合体2の必須制御サブユニット Sin1 がもつ CRIM ドメインの多重機能」ConBio2017、2017年

② 建部 恒、森ヶ崎 進、両角 祐一、塩崎 一裕 「細胞外環境に応答した TOR キナーゼ複合体2の活性化メカニズム」日本遺伝学会第89回大会、2017年

- ③ Shiozaki, K. “Fission yeast as a genetic model to dissect Target of Rapamycin (TOR) signaling”, 2nd International Conference on Molecular Biology and Biotechnology, 2017年
- ④ 梶原 拓真、渡辺 大輔、武田 鋼二郎、建部 恒、塩崎 一裕、高木 博史「酵母 Greatwall プロテインキナーゼを介したアルコール発酵調節経路」酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会、2017年
- ⑤ Shiozaki, K. and Morigasaki, S. “Interaction between the Spc1/Sty1 stress-activated protein kinase and TOR complex 2”, 9th International Fission Yeast Meeting, 2017年
- ⑥ Shiozaki, K. “Genetic dissection of Target Of Rapamycin (TOR) signaling conserved from yeast to humans: Substrate recognition by TOR complex 2”, Philippine Society for Developmental Biology 8th Annual National Convention, 2017年
- ⑦ Shiozaki, K. “Genetic dissection of Target Of Rapamycin (TOR) signaling conserved from yeast to humans: Regulation of TOR complex 1”, Philippine Society for Cell Biology 1st International and 7th Annual Convention and Scientific Meeting, 2017年
- ⑧ 松田 崇斗、Chia, K. H., Sofyanro, F., 天井 貴光、福田 智行、建部 恒、塩崎 一裕「分裂酵母GATOR1-Gtr1経路によるTORC1活性制御機構の解析」酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会、2016年
- ⑨ Shiozaki, K. “Target of Rapamycin (TOR) signaling from and to vacuoles/lysosomes”, Protein Trafficking and Intracellular Signaling of Plant and Fungal Cells, 2016年
- ⑩ Shiozaki, K. “Regulation and function of the two Target of Rapamycin (TOR) complexes”, 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会、2015年
- ⑪ Shiozaki, K. “Negative regulation of TOR complex 1 by heterodimeric Gtr1-Gtr2 GTPases”, The 8th International Fission Yeast Meeting, 2015年
- ⑫ Shiozaki, K. “Genetic dissection of Target of Rapamycin (TOR) signaling in cellular growth response to nutrients”,

Hiroshima Research Center for Healthy Ageing 4th Workshop, 2015年

- ⑬ 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 (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、2014年
- ⑭ 秦野 智行、建部 恒、塩崎 一裕「なぜTORC2はTORC1基質をリン酸化できないのか：TORC2のSin1サブユニットを介した厳密な基質認識メカニズム」第4回Target Of Rapamycin 研究会、2014年
- ⑮ 江森 翠、秦野 智行、建部 恒、塩崎 一裕「分裂酵母 TOR キナーゼ複合体はスフィンゴ脂質合成の制御に関与する」酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会、2014年

[図書] (計1件)

- ① Tatebe, H. and Shiozaki, K. (2017). PP2C. In *Encyclopedia of Signaling Molecules (Second Edition)*, S. Choi, ed. (New York: Springer). DOI: 10.1007/978-1-4614-6438-9\_249-1

[その他]

ホームページ等：  
<http://bsw3.naist.jp/courses/courses304.html>

新聞記事：

奈良新聞 2017年3月25日朝刊3面  
朝日新聞 2017年3月30日朝刊23面  
読売新聞 2017年10月18日奈良地方版

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩崎 一裕 (SHIOZAKI, Kazuhiro)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授  
研究者番号：00610015

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

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

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

児嶋 長次郎 (KOJIMA, Chojiro)  
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授  
研究者番号：50333563