

論文内容の要旨

申請者氏名 Yue Keong Choon

The Target of Rapamycin (TOR) is a serine/threonine-specific protein kinase that forms two distinct multi-protein complexes, termed TOR Complex 1 (TORC1) and 2 (TORC2). Protein-protein interactions play crucial roles in the signal-mediated regulation of the TOR complexes as well as in their execution of the specific cellular functions. One of the techniques to capture *in vivo* protein-protein interactions is to introduce photo-reactive, unnatural amino acids into a specific position of a protein of interest for chemical crosslinking analysis. Using this technique, detailed characterization of the interaction between TORC2 and its substrate Gad8 has been carried out in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The TORC2-Gad8 pathway is homologous to the human mTORC2-AKT pathway involved in cellular insulin response as well as proliferation control. The Sin1 subunit of TORC2 has a ~120-amino acid domain, called CRIM (Conserved Region In the Middle), which specifically binds Gad8 to recruit it for phosphorylation by TORC2. Aiming to elucidate how the CRIM domain specifically recognizes and interacts with Gad8, Sin1 CRIM is expressed in fission yeast with *p*-azido-L-phenylalanine (pAzF) incorporated to its protruding acidic loop essential for the interaction with Gad8. UV photo-crosslinking with Gad8 was detected when pAzF was at the positions of Asp-358, Asp-360, and Phe-361. On the other hand, when pAzF was incorporated at the positions of Glu-231, Val-235, Val-236, Gly-239, and Lys-243 in kinase subdomain I of Gad8, photo-crosslinking with Sin1 CRIM was detected. These results suggest that the acidic loop of the Sin1 CRIM domain interacts with kinase subdomain I of Gad8 for TORC2 to specifically recognize and phosphorylate Gad8. Consistently, alanine substitutions of Phe-230 and Leu-232 in Gad8 kinase subdomain I abolished the interaction with Sin1 CRIM, and fission yeast strains carrying these mutations showed defects in the TORC2-dependent phosphorylation of Gad8 and stress-sensitive growth phenotypes.

In vivo photo-crosslinking was also attempted to determine how Rhb1 GTPase interacts with TORC1 in fission yeast. Rhb1 is an ortholog of human Rheb, a key activator of mTORC1 that controls cellular protein synthesis in response to nutrients. Crosslinked products were observed when *p*-benzoyl-L-phenylalanine (pBpA) was incorporated at the positions of Tyr-35 or Thr-38 of Rhb1, suggesting that these residues are in close proximity to another protein.

This study has demonstrated the feasibility of the site-directed *in vivo* photo-crosslinking technique in fission yeast. The technique successfully identified the interaction interface between Gad8 and the CRIM in the Sin1 subunit of TORC2, providing a novel insight into the mechanism that determines the substrate specificity of TORC2.

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Yue Keong Choon

真核生物間で広く保存されている Target of Rapamycin (TOR)キナーゼは、異なる制御サブユニットと結合することで TORC1 および TORC2 と呼ばれる 2 種類の複合体を形成し、そのそれぞれが異なった基質をリン酸化することで多様な細胞機能を果たす。TORC2 の基質特異性を担う制御サブユニットである Sin1 には、その中央部に Conserved Region in the Middle (CRIM)と呼ばれるドメインが存在し、CRIM が TORC2 基質である分裂酵母 Gad8 やヒト AKT を特異的に結合することが近年、明らかになっていた (Tatebe *et al.*, 2017)。申請者は、TORC2 の基質認識機構を分子レベルで明らかにすべく、CRIM ドメインと TORC2 基質の相互作用の解析に取り組んだ。

生細胞内でのタンパク質間相互作用を検出するために、光架橋活性をもつ非天然アミノ酸を部位特異的に目的タンパク質に取り込ませる技術は既に大腸菌などで用いられているが、申請者はこの方法を分裂酵母に導入し、分裂酵母生細胞内で Sin1 の CRIM ドメインと Gad8 との光架橋に成功した。光架橋性アミノ酸を CRIM ドメイン側、および Gad8 側の異なった部位に導入して解析を繰り返すことで、CRIM ドメイン内の酸性アミノ酸に富むループ構造が、Gad8 触媒ドメイン内のサブドメイン I と呼ばれる領域と相互作用していることを明らかにした。さらに、Gad8 のサブドメイン I に系統的にアミノ酸置換を導入することで、その N 末端にある疎水性残基が Sin1 CRIM との相互作用に必須であることを明らかにした。非常に興味深いことに、それらの疎水性残基は、ヒト TORC2 の基質である AKT にも保存されており、ヒト SIN1 の CRIM ドメインとの相互作用に関わっているものと予想される。

加えて申請者は、分裂酵母生細胞内での光架橋技術を G タンパク質である Rhb1 にも適用し、そのエフェクタードメインに光架橋性アミノ酸を導入することで、相互作用タンパク質との光架橋を検出しており、本技術が多様なタンパク質の相互作用解析に適用できる可能性を示している。

以上のように本論文は、モデル生物として広く使われている分裂酵母の生細胞内でタンパク質の相互作用を解析する技術を確立したもので、この技術は今後、様々な細胞現象におけるタンパク質相互作用研究に用いられることが予想される。本論文ではこの技術を実際に活用して、TORC2 の Sin1 サブユニットと基質 Gad8 との相互作用インターフェースの同定に成功した。本研究で得られた成果は TOR キナーゼの基質認識特異性の分子基盤の理解に直結するものと予想され、ヒト TORC2 がガン遺伝子産物 AKT をリン酸化・活性化するメカニズムの解明にも発展が期待できることから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】