

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Chin Lit Chein

The Target of Rapamycin (TOR) is an evolutionarily conserved serine/threonine-specific protein kinase that controls the cellular metabolism, growth, and proliferation. TOR forms two structurally and functionally distinct complexes known as TOR complex 1 (TORC1) and 2 (TORC2), which are highly conserved from yeast to humans. In fission yeast, TORC2 consists of Tor1, Wat1, Ste20, Sin1, and Bit61, and these subunits are conserved in mammalian TORC2 (mTORC2). This study aimed to reveal the molecular function of the TORC2 subunits, using fission yeast as a model organism.

One of the TORC2 subunits, Bit61, has an uncharacterized paralog named Bit2. Bit2 is expressed at a much lower level than is Bit61, and overexpression of Bit2 complements the compromised TORC2 activity in  $\Delta bit61$  cells. Therefore, Bit61 and Bit2 have a redundant role in TORC2. Like Bit61, Bit2 associates with TORC2 through its Ste20 subunit. The C-terminal region and the conserved HbrB-like domain of Bit61 are required for binding to Ste20 and thus, for association with TORC2. Bit61 and Bit2 are not required for the assembly of TORC2, but they are required for full activation of TORC2.

Ste20 is the largest regulatory subunit of TORC2. It was found that the truncation of the N- and C-termini of Ste20 leads to the loss of TORC2 function, resulting in reduced phosphorylation of the TORC2 substrate Gad8 and stress-sensitive growth phenotypes. Further analyses indicated that the N- and C-termini of Ste20 are required to interact with Sin1, another key subunit of TORC2.

Sin1 is a substrate-binding subunit of TORC2; its Conserved Region in the Middle (CRIM) domain binds directly to the TORC2 substrate Gad8. Sin1 also contains a PH (Pleckstrin Homology) domain that binds phospholipids. Truncation analysis found that the N-terminal region of Sin1 is necessary and sufficient for binding Ste20. The Sin1 PH domain is not necessary for TORC2 activity, but is required for the membrane localization of TORC2 in the absence of Bit61 and Bit2. Interestingly, Bit2 can localize to the plasma membrane even in the absence of Ste20, suggesting that Bit2 has the intrinsic ability to localize to the plasma membrane. Collectively, these data indicate that Sin1-PH, Bit61, and Bit2 have redundant function for targeting TORC2 to the plasma membrane.

This study has delineated the subunit organization of TORC2 through characterization of the interactions among Bit61/Bit2, Ste20 and Sin1. In addition, though the function of the Bit61 subunit in fission yeast and other eukaryotes has been a conundrum for many years, the data presented in this study suggest its role in the plasma membrane localization 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 Chin Lit Chein

ガン遺伝子産物 AKT キナーゼは、インスリンに応答した細胞のグルコース取込みにも必須であることから、ガンと糖尿病の両方に関わりが深く、その活性化機構は長年、研究されてきた。AKT の活性化には2つのリン酸化が重要であり、そのうちの1つは PDK1 キナーゼによるものであるが、AKT と PDK1 は共に PH ドメインと呼ばれるイノシトールリン脂質結合ドメインをもっており、両者がこのドメインを介して細胞膜に共局在すると、PDK1 が AKT をリン酸化する。AKT の第二のリン酸化を担うキナーゼとして近年、TOR キナーゼ複合体 TORC2 が同定され、その制御サブユニットの1つである SIN1 も PH ドメインをもつことから、SIN1 を介して細胞膜に局在した TORC2 が AKT をリン酸化するというモデルが提案されていたが、これを証明する実験データはなく、むしろ分裂酵母や出芽酵母では、TORC2 の細胞膜局在に SIN1 が必須でないことが観察され、TORC2 の膜局在機構は謎のままであった。

申請者は、分裂酵母をモデル系として、機能未知の TORC2 制御サブユニットである Bit61 および Bit2 とよばれる2つの相同因子の解析に取り組んだ。この2つが重複した機能を持ち、Ste20 サブユニットを介して TORC2 に結合することを明らかにするとともに、Ste20 と Sin1 サブユニットの相互作用領域を決定し、Ste20 が TORC2 複合体の中で Bit61/Bit2 および Sin1 をつなぎとめる足場分子として働いていることを示した。さらに、Bit61/Bit2 欠損は TORC2 の細胞膜局在に影響を与えないものの、Bit61/Bit2 欠損と Sin1 の PH ドメイン欠損を組み合わせると、TORC2 が細胞膜に局在できなくなることを発見した。すなわち、Bit61 および Bit2 タンパク質には明らかな膜局在配列は存在しないが、Sin1 の PH ドメインと共に TORC2 の細胞膜局在を担っており、Bit61、Bit2、Sin1 PH ドメインを全て欠損すると TORC2 は細胞膜に結合できなくなる。Bit61 および Bit2 は、ヒト TORC2 の PRR5 および PRR5L サブユニットに相同であり、この結果はこれまで機能未知とされてきた PRR5/PRR5L がヒト TORC2 の細胞膜局在に関与している可能性も示唆する。

以上のように本論文は、TORC2 欠損が致死とならない分裂酵母モデル系の特徴を活かした変異体解析によって TORC2 複合体のサブユニット会合様式を明らかにするとともに、これまで分子機能が未知であった Bit61/Bit2 サブユニットが TORC2 の細胞膜局在に関与するという全く新しい知見を報告するもので、その成果はガン細胞増殖やインスリン応答で中心的な役割を果たすヒト AKT の細胞膜における活性化を担う TORC2 の膜局在機構の理解にも重要な手がかりとなることが期待でき、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】