

論文内容の要旨

申請者氏名 Fajar Sofyantoro

Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1), a protein kinase complex highly conserved in diverse eukaryotic species, controls cell growth and metabolism in response to extracellular signals, such as nutrients. Activation of mammalian TORC1 (mTORC1) is regulated by the heterodimer between RagA/B and RagC/D GTPases, which is under the control of the GATOR complex. GATOR consists of the GATOR1 and GATOR2 subcomplexes, with the former carrying GTPase-activating protein (GAP) activity toward RagA/B. Upon amino acid stimulation, GATOR2 positively regulates mTORC1 activity by inhibiting the GAP activity of GATOR1. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the RagA/B-RagC/D heterodimer is conserved as Gtr1-Gtr2, which is regulated by the GATOR1-like complex with GAP activity toward the Gtr1 GTPase. In this study, the applicant has identified the GATOR2 equivalent in the fission yeast and characterized its function in TORC1 signaling.

Two-step affinity-purification of fission yeast GATOR1 followed by mass spectrometry analysis of the associated proteins successfully identified Sea2, Sea3, Sea4, Seh1, and Sec13, which are orthologous to the mammalian GATOR2 components WDR24, WDR59, MIOS, SEH1L, and Sec13, respectively. In contrast to the reported function of mammalian GATOR2 in mTORC1 activation, genetic and biochemical experiments demonstrated that Seh1, Sea2, and Sea4 are dispensable for TORC1 activation required for cell growth in fission yeast. Interestingly, loss of Sea3 induced deregulated TORC1 activation similar to that in the GATOR1 defective mutants. Moreover, the *sea3Δ* defect can be suppressed by expression of the GDP-locked mutant of the Gtr1 GTPase. These data strongly suggest that Sea3 contributes to the GAP function of GATOR1.

In line with the discovered role of Sea3 in the GATOR1 function, the applicant has found that Sea3 associates with GATOR1 even in the absence of the other GATOR2 components. On the other hand, the binding of the GATOR2 components to GATOR1 was abolished in the *sea3* null mutant. These observations demonstrate that Sea3 mediates the physical interaction between GATOR2 and GATOR1, implying that Sea3 is crucial for the integrity of the GATOR holocomplex.

Together with the previous characterization of fission yeast GATOR1, this study has demonstrated that the GATOR complex and its sub-complexes are evolutionarily conserved in fission yeast. In addition, the data presented in this study collectively suggest that Sea3, a presumed GATOR2 component, is crucial for the GAP activity of GATOR1 in attenuating TORC1 signaling via the Gtr1 Rag GTPase. These results may provide clues to better understand the function of WDR59, a human ortholog of Sea3, in the GATOR complex.

- 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 Fajar Sofyantoro

タンパク質キナーゼ Target of Rapamycin (TOR) は、アミノ酸などの窒素源に応答して活性化される TORC1 と呼ばれる複合体を形成し、細胞の成長と増殖において中心的な役割を担っている。近年、TORC1 活性の異常が、ガンや神経疾患の原因となることが明らかになるにつれ、TORC1 の制御メカニズムの研究が世界的に活発化している。これまでに、栄養に応答した哺乳類 TORC1 (mTORC1) の活性化が、G タンパク質 Rag によって誘導されることが報告され、さらに米国 MIT の Sabatini のグループは、Rag の活性を調節するタンパク質複合体を同定して GATOR (GAP activity toward Rags) と名付けた。GATOR は、GATOR1 および GATOR2 と呼ばれる 2 つの部分複合体からなり、GATOR1 が Rag の GTPase-activating protein (GAP) 活性を持ち、これを GATOR2 が抑制するとされているが (*Science* **340**, 1100, 2013)、5 つのサブユニットから成る GATOR2 の機能は不明な点が多く、追試も不足している。

申請者は、修士論文研究において、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の TORC1 を制御する Rag ヘテロ 2 量体 Gtr1-Gtr2 が、Gtr1 に対する GAP 活性を持つ GATOR1 様複合体によってコントロールされることを明らかにした。本研究では、GATOR1 に結合するタンパク質を生化学的に同定することで、分裂酵母にも 5 つのサブユニットから成る GATOR2 に相当する複合体が存在することを証明し、さらにその機能解析を行った。興味深いことに、分裂酵母 GATOR2 には、GATOR1 を抑制する機能はなく、むしろ GATOR2 複合体のサブユニット Sea3 は、GATOR1 に直接結合してその GAP 活性を促進していることが示唆された。Sea3 欠損株では、TORC1 活性の異常亢進と細胞の生育阻害が観察され、Sea3-GATOR1 複合体が、TORC1 の活性調節に重要な役割を果たすことが明らかになった。しかしながら、Sea3 は GATOR1 複合体の会合や液胞膜への局在には必須ではないものの、Sea3 欠損株では GATOR1 と GATOR2 の解離が見られ、Sea3 が GATOR 複合体の形成に中心的な役割を果たすことが示された。

GATOR 複合体のサブユニット遺伝子には、ガンやてんかん患者の細胞で変異が報告されるなど、mTOR 経路の制御における GATOR 複合体の機能に注目が集まっている。しかしながら、Sea3 の相同因子であるヒト WDR59 を含め、GATOR2 サブユニットの機能については、これまで詳細な研究は行われていない。本論文で新たに示された Sea3 による GATOR1 の活性化は、今後の哺乳類 GATOR2 の機能解析、および GATOR 複合体による mTORC1 活性の抑制メカニズムの解明に重要な手がかりを与えるもので、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】