

モデル生物分裂酵母のTORシグナル伝達経路の遺伝学的解析

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2013-01-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 瓜谷, 眞裕 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/6996

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 30日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570134

研究課題名（和文） モデル生物分裂酵母のTORシグナル伝達経路の遺伝学的解析

研究課題名（英文） Genetic study of TOR signaling pathway in fission yeast

研究代表者

瓜谷 眞裕（URITANI MASAHIRO）

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：40193974

研究成果の概要（和文）：TOR は免疫抑制剤ラパマイシンの標的タンパク質で、進化的に保存されたプロテインキナーゼであり、栄養状況に応じて細胞の増殖と成長を制御する新規のシグナル経路の主役である。分裂酵母は TOR シグナル経路の良いモデル生物だが、分裂酵母の TOR には Tor1 と Tor2 があり、それぞれ TORC2 と TORC1 を形成する。今回、TORC2 と TORC1 に関わる因子として、それぞれ新規の遺伝子 *mtol* と *mtt1* を取得し解析を行った。*mtol* は進化的に保存された機能未知の遺伝子であった。*mtt1* は Zn-finger タンパク質をコードしており、アルギニン代謝に関係していた。

研究成果の概要（英文）：TOR is a conserved protein kinase, which forms two distinct complexes, TORC1 and TORC2. Fission yeast provides a powerful genetic system. Furthermore, the components of TOR signaling pathway are also conserved between fission yeast and mammalian. Thus fission yeast is an excellent model system to study the molecular mechanisms of TOR signaling. Fission yeast has two TOR, TOR1 and TOR2. In this study, novel genes that interact with TORC1 or TORC2 have been obtained: *mtol* and *mtt1*. *mtol* was a evolutionarily conserved gene which encoded a novel protein of unknown function. *mtt1* encoded a protein with a Zn-finger motif. Functional analysis showed that it was involved in the metabolism of arginine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：生物学、生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構、TOR、分裂酵母、栄養感知

1. 研究開始当初の背景

TORは免疫抑制剤ラパマイシンの標的で、真核生物に普遍的なプロテインキナーゼである (TORはTarget Of Rapamycinに由来)。最初、免疫細胞や出芽酵母の増殖に必須のキナーゼとして研究され、その後、栄養状況に応じて細胞の増殖と成長を制御する新規のシグナル経路の主役であることがわかった。また、ラパマイシンが抗癌作用を示すことや腫瘍 (tuberous sclerosis) の抑制遺伝子の産物 (Tsc1、Tsc2) がTORを負に制御することから、医学的に重要視されている。さらに、寿命、肥満、学習にも関わることが報告され、健康科学の面でも注目されている。

TORの機能は翻訳制御の他、転写調節、タンパク質の細胞内局在、オートファジー、アクチン細胞骨格の構成など多岐にわたる。TORは二種類の複合体 (TORC1とTORC2) を取る。TORC1は栄養をセンスして細胞の増殖と成長を制御し、ラパマイシンはTORC1を阻害することで飢餓に対する応答と同様な挙動を引き起こす。一方、ラパマイシンで阻害されないTORC2はアクチン細胞骨格の構成や、浸透圧などのストレス耐性に必要である。新規GTP結合タンパク質Rhebは、物理的に相互作用することでTORC1を活性化し、Tsc1/Tsc2ヘテロ二量体はRhebのGAPとしてRhebを負に制御する。

このように、TORの機能と制御機構についての理解は深まったように見えるが、まだ未解決の課題も多い。TOR研究の発展には、ユニークな視点とともに、短時間で確実にアプローチできる手法が要求されるが、遺伝解析は強力な有効な手法である。

出芽酵母は、遺伝解析が使える、過去の蓄積も大きい、ヒトに存在する Tsc1/Tsc2 を持たず、Rheb は生育に必須でない。つまり TOR の上流は出芽酵母とヒトとでは仕組みが異なっていて、その点ではヒトのモデルとして適当でない。そこで、遺伝解析が使える新たなモデルシステムが必要になる。分裂酵母は遺伝解析が自由で容易な上に、出芽酵母とは進化的に離れていて、むしろヒトに近いとされる分裂酵母には、TOR (Tor1 と Tor2)、Tsc1、Tsc2、Rheb の他に、TOR 複合体の構成要素で

ある Raptor (Mip1)、Rictor (Sin1) も存在し、p70S6 のカウンターパートは Gad8 である。以上より、分裂酵母は TOR の制御機構を研究する上で、優秀なモデルシステムと言える。

申請者らは、分裂酵母の TOR の重要性に着目し、変異株の取得と解析を手段に、研究を展開してきた。分裂酵母は (窒素源の) 飢餓になると、G1 期にアレストし異性細胞同士が接合して減数分裂・胞子形成をするので、応答が分かりやすいという点にも注目した。まず始めに *tor1⁺* を解析し、*tor1⁺* は生育に必須ではないこと、*tor1⁺* 欠失変異株 (*tor1 Δ*) は窒素源飢餓で細胞が G1 期ではなくて G2 期でアレストすること、その結果、性的分化が不能になること、さらに *tor1 Δ* は高浸透圧、高・低温、高・低 pH など様々なストレス条件下での生育不全を示すことを見つけた (Kawai *et al. Curr. Genet.* 2001)。必須遺伝子である *tor2⁺* についてはその温度感受性変異株 (*tor2^{ts}*) を取得・解析した。その結果、*tor2^{ts}* を制限温度におくと、培地に栄養源が豊富にあるにもかかわらず、窒素源飢餓応答を示した。つまり、細胞は G1 にアレストし、性的分化を開始した。この時、細胞内ではオートファジーが起き、窒素源飢餓特有の遺伝子 (*isp6⁺* など) が発現した。これより、Tor2 は窒素源をセンスして細胞の増殖と成長を制御する TORC1 として機能すると理解された。最近、Tor2 のラパマイシン感受性株 (*tor2^{ts}*) を取得し、その解析を行っているが、基本的に *tor2^{ts}* と同様の表現型を示すことが分かった (Isomura *et al. BMB*2007, Uritani *et al. BMB*2008)。Rheb1 と Tor2 の関係も調べた。Rheb1 は Tor2 と物理的相互作用するが、恒常活性型の Rheb の変異株 (*rhb1-10*) は *tor2^{ts}* の温度感受性を抑圧したので、Tor2 (TORC1) の活性を正に制御すると思われる。しかし、*rhb1-10* は窒素源飢餓で、タイミングは若干遅れるものの、ほぼ正常な応答を示した。*tsc1⁺* や *tsc2⁺* の欠失変異株でも同様であった。従って、窒素源の情報を Tor2 に伝達する経路には、Tsc1/Tsc2 や Rheb とは独

立で未知の機構が働くと示唆される。また、分裂酵母では TORC1 が制御する分子機構についても未解明である。

2. 研究の目的

(1) *tor1* 欠失変異株 (*tor1Δ*) は窒素源飢餓で細胞がG1期ではなくてG2期でアレストし、その結果、性的分化が不能になる。つまり窒素源飢餓の適応に欠陥がある。さらに *tor1Δ* は高浸透圧、高・低温、高・低pHなど様々なストレス条件下での生育不全を示す。しかし、このような広範な種類のストレスへの耐性にTor1 (すなわちTORC2) がどのように働くかについては分かっていない。そこで、この問題の解決の手がかりを関連する遺伝子を取得・解析することで得る。

(2) TORC1が制御する分子機構及びTORC1を活性化あるいは抑制するような新規の遺伝子を探索、解析することで、TORが栄養をセンスする仕組み、および飢餓時におけるTORC1の再活性化機構、さらにはTORC1が制御する分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Tor1の温度感受性株 (*tor1^{ts}*) を作成し、それを用いてストレス条件下で生育できるような多コピーサプレッサー遺伝子の取得と解析を行う。これによりTORC2が広範な種類のストレスへの耐性にどのように働くかという問題についての手がかりを得る。

(2) *tor2^{ts}* のマルチコピーサプレッサー遺伝子を取得と解析を行うことで、TOR が栄養をセンスする仕組み、および飢餓時におけるTORC1の再活性化機構、また TORC1 が制御する分子機構の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) PCR-mutagenesisによりTor1の温度感受性株 (*tor1^{ts}*) を作成した。これは25°Cではストレス培地 (0.5M KCl または 4mM ヒドロキシウレア) で生育したが、34°Cでは生育しなかった。これを指標にして *tor1^{ts}* に分裂酵母のゲノムライブラリーを導入し、37°Cで上記のストレス培地で生育するものを選抜した。これより、プラスミドを回収し解析したところ、*mtol* (*multi-copy suppressor of*

tor1^{ts}) が取得された。この遺伝子は、分裂酵母において過剰発現させるとカフェインによる増殖阻害を救済する遺伝子として報告されているが、その仕組みは不明である。*mtol* は進化的に保存されたタンパク質をコードするが、機能を暗示するようなモチーフはなく、また他の生物種での働きも分かっていない。*mtolΔ* は正常に生育し、ストレス培地での生育にも欠陥を示さなかった。*mtol* 過剰発現も生育に特に影響せず、この遺伝子の機能についての手がかりは得られていない。MtolはTORC2の新たな調節因子の可能性があるが、今後、さらに詳細な解析をしてMtolの機能を明らかにし、TORC2との関係を解明していく。

(2) *tor2^{ts}-2131* は10ng/mlのラパマイシン添加で生育不全を示す株である。この株に分裂酵母のゲノムライブラリーを導入し、ラパマイシン存在下で生育するコロニーを得た。これらからプラスミドを回収し、挿入された遺伝子を解析したところ、*tor2^{ts}* のマルチコピーサプレッサー遺伝子として *mtt1* (*multi-copy suppressor of tor2^{ts}*) が取得された。この産物はZn-fingerタンパク質であった。*mtt1Δ* は完全培地で生育したが、合成培地での生育にはアルギニン添加が必要であった。アルギニン代謝経路の酵素の遺伝子発現を調べたところ、アルギニンの合成酵素の遺伝子発現はすべて正常だったが、分解酵素のそれが上昇していた。この上昇は、野生型株を窒素源飢餓にした時にも見られた。この時、Mtt1は窒素源飢餓でタンパク質の量が劇的に減少し消失した。興味深いこととに、この現象は窒素源飢餓のみならず、*tor2-2131^{ts}* にラパマイシンを添加したときにも観察された。ラパマイシン添加時には、Mtt1は消失したままであったが、窒素源飢餓時には、数時間後にはMtt1の量は増加してきた。

以上から、Tor2はMtt1の量を制御することで、アルギニン代謝を調節すると考えられる。アルギニン分解ではアンモニアが生じるので、窒素源飢餓における窒素源確保の意義があると思われる。さらに、一旦は減少したMtt1が増加に転じたことは、TORC1の再活性化が起きていることを暗示

した。

今回の研究により、TORC1 の制御する新たなタンパク質が見つかった。このタンパク質はアルギニンの分解に関わるが、アルギニン分解により新たな窒素源が生じることにより、TORC1 の再活性化が起きた可能性が示唆された。今後、さらに詳細な解析をしていく。

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1件)

1. Katsue Daicho, Nishiho Makino, Toshiki Hiraki, Masaru Ueno, Masahiro Uritani, Fumiyoshi Abe & Takashi Ushimaru Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant FEMS Microbiol Lett. 査読有り 298, 2009, pp.218-227

[学会発表] (計10件)

1. 瓜谷真裕 分裂酵母 Tor2 のアルギニン代謝経路の制御 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 パシフィコ横浜(横浜市)

2. 中山 敬介 Fission yeast TOR2 is involved in arginine metabolism in response to nitrogen starvation The 16th shizuoka forum on health and longevity 2011年9月21日 グランシップ(静岡市)

3. 高橋 一真 Quiescence entry upon nutritional condition shift in fission yeast The 16th shizuoka forum on health and longevity 2011年9月21日 グランシップ(静岡市)

4. 伊藤健悟 分裂酵母 *tor2* ラパマイシン感受性株のマルチコピーサプレッサーの解析 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 10 日 神戸ポートアイランド

5. 瓜谷真裕 分裂酵母 Tor1 と Tor2 の機能について 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会(ワークショップ) 2010 年 12 月 9 日 神戸ポートアイランド

6. 瓜谷真裕 分裂酵母の Tor2 経路の機能 第 32 回日本分子生物学会(ワークショップ) 2009 年 12 月 12 日 パシフィコ横浜(横浜市)

7. 盛山啓史 分裂酵母 *tor1* 温度感受性変異株の取得と解析 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 11 日 パシフィコ横浜(横浜市)

8. 石川優 分裂酵母 *tor2* ラパマイシン感受性株の解析 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 11 日 パシフィコ横浜(横浜市)

9. 瓜谷真裕 Rapamycin-sensitive *tor2* mutants that mimic nitrogen starvation response in fission yeast Pombe meeting 2009 2009 年 10 月 29 日 オリンピック記念青少年総合センター(東京・渋谷区)

10. 瓜谷真裕 分裂酵母のラパマイシン感受性の *tor2* 変異株の解析 第 42 回酵母遺伝学フォーラム 2009 年 7 月 30 日 ノバホール(つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瓜谷 真裕 (URITANI MASAHIRO)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 40193974