

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 11 年度博士課程進学  
氏名 梅田達也  
指導教官 豊島 近

## 論文題目

# TOR 情報伝達経路の活性制御機構の解析

### I. はじめに

細胞増殖においては、細胞の成長と分裂は協調的に行われる必要がある。そのため、細胞は、外界の栄養状態を検知し、細胞増殖を完遂するのに十分な蛋白質合成を行うことが可能かどうかを判断し、蛋白質翻訳装置を制御しなければならない。T 細胞の増殖を阻害する免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子として同定された TOR は、この翻訳装置の制御機構への関与が強く示唆されている情報伝達因子で、PI3 キナーゼ様の触媒ドメインを持つプロテインキナーゼである。細胞の置かれた環境の栄養源の欠乏やラパマイシン処理により、翻訳開始因子 eIF-4E の阻害因子 4E-BP1 やリボソーム蛋白質 S6 をリン酸化する S6 キナーゼのリン酸化状態が低下することから、TOR はこれらの翻訳制御因子の調節を介して翻訳過程を制御していると考えられる。また、TOR が哺乳類ではα4、出芽酵母では Tap42p という相同な蛋白質を介してプロテインホスファターゼ 2A の機能を調節していることも示唆されている。これらの標的経路の解析から、TOR が翻訳過程、さらには細胞増殖を制御する機構についての知見が得られることが期待される。これに対し、外界の栄養状態によって TOR 自身の機能がどのように制御されているかについては、これまで全く明らかにされていない。

真核微生物である酵母にも TOR の相同蛋白質 Tor1p/Tor2p が存在し、哺乳類の TOR と同様な働きをしていることが示されている。本研究では、遺伝学的解析の容易な酵母をモデル系として、TOR 経路の活性制御機構を明らかにすることを目的とした。

## II. 結果・考察

### 1. ラパマイシン非感受性型 Tap42p の単離および解析

野生株酵母に Tor2p を過剰発現させても生育に影響はなかったのに対し、Tor2p の活性中心変異体を過剰発現させたところ著しく成長が抑制されたことなどにより、TOR の活性を制御する因子の存在が示唆された。次に、栄養源の欠乏によっても不活性化されない恒常的活性化型 Tor2p の単離を試みた。実験は、PCR によりランダムに変異を導入した変異 TOR2 ライブラリーを野生株酵母に導入し、栄養飢餓状態で生存率が急激に低下する株のスクリーニングを行った。なお PCR は、適当な頻度で変異が導入されると思われる条件を、ラパマイシン非感受性変異型 TOR2 の生じる頻度などを指標に検討した。しかし、約 11 万の変異クローンをスクリーニングしたが、有望な変異体を単離することはできなかった。

そこで TOR の下流因子である Tap42p に注目し、恒常的活性化型 Tap42p、すなわちラパマイシン非感受性型 Tap42p を、同様な手法を用いることにより単離することを試みた。約 12 万の変異クローンをスクリーニングしたところ、高発現したときに限りラパマイシンに対する抵抗性を付与し、アミノ酸配列の異なる 18 クローンを得ることに成功した。これらのクローンは全て C 末端領域に欠損、もしくは点変異を持つという共通の特徴を有することより、この領域が TOR による活性調節に重要な役割を担っていることが推測された。また、これらのラパマイシン非感受性型 TAP42 は、tap42 破壊株の致死性を相補できないことが明らかになった。したがって、変異型 Tap42p の高発現によるラパマイシン非感受性は、ラパマイシン存在下において Tap42p の活性を抑制する機構から内在性の Tap42p を解放することにより付与されると考えられる。

### 2. ラパマイシン非感受性型 TAP42 を用いた TOR 経路上流因子の同定

ラパマイシン非感受性型 TAP42 を用いて TOR 経路の上流で活性を制御する因子のスクリーニングを行った。その原理は次のとおりである。TOR の活性を制御する因子が欠損した株は、ラパマイシン処理した時と同様に TOR が細胞増殖に必要な活性を発揮できないために生育できない。しかし、ラパマイシン非感受性型 Tap42p を発現した細胞は、ラパマイシン処理下でも生育できるのと同様、TOR の活性制御因子が欠損しても生育を回復させることができると考えられる。すなわち、ラパマイシン非感受性型 Tap42p が発現しているときに限り生育できるような変異株は、TOR 経路の上流因子の欠損変異株であることが期待される。このことを利用して、以下のような方法で上流因子の変異株を単離することを試みた。上で得られた変異型 TAP42 のうち、ラパマイシン非感受性の強い TAP42-W348\*、あるいは TAP42-R295\* (\*は終止コドンに変化したアミノ酸の番号) を持つプラスミドを形質転換した株を、変異原 EMS (Ethyl Methanesulfonate) で処理することでゲノムにランダムに突然変異を誘起し、こ

のプラスミドを失っては生育できなくなるような変異株をスクリーニングした。生存率約25%の変異株プールから約7.3万クローンをスクリーニングしたところ、プラスミド依存的な生育を示す18クローンを得ることに成功した。相補性試験などの結果から、これらの変異は全て劣性であること、相補性群は5つ以上あることなどが判明した。これらの変異には野生型 Tap42p を高発現した時にもその致死性が回復するものも含まれていた。

次に、単離された変異株にゲノムライブラリーを形質転換し、その変異を相補する遺伝子のクローニングを試みた。すなわち、ラパマイシン非感受性型 Tap42p の高発現なくとも生育の戻る形質転換体をスクリーニングした。その結果、これらの変異株を相補する遺伝子、*LST8*、*DBF2*、および *TRS31* を同定した。Lst8p は WD-repeat からなる蛋白質で、栄養源としてアミノ酸を取り込むアミノ酸トランスポーター Gap1p の細胞表面への輸送を司る蛋白質であり、その破壊株は致死であることが知られている。また Dbf2p は核分裂後期 (anaphase/telophase) で働く Serine/Threonine 細胞周期キナーゼであり、*dbf1* もしくは *dbf20* との二重破壊株で致死であると報告されている。さらに Trs31p は、ER から Golgi への小胞輸送における Transport Protein Particle I (TRAPPI) 複合体と、Golgi における膜の輸送 Transport Protein Particle II (TRAPPII) 複合体の両方に関わる構成因子であり、その破壊株は致死であることが知られている。同定された3つの遺伝子のうち、*LST8* 遺伝子の産物は、アミノ酸トランスポーターの膜輸送に関わっていることから栄養因子情報伝達への関与が示唆されること、またアミノ酸トランスポーターの輸送に関連した他の遺伝子群と異なり増殖に必須であること、さらに哺乳類の相同分子がインシュリンの刺激により発現量上がることなどから最も機能的に重要と思われ、この遺伝子に注目して以下の実験を行った。

### 3. TOR 経路活性化における Lst8p の機能の解明

はじめに、*LST8* 遺伝子の破壊株を作成した。*lst8* 破壊株は致死のため、*LST8* をプラスミドとして形質転換した。この株に、スクリーニングに用いたラパマイシン非感受性 *TAP42* (*TAP42-W348\**、もしくは *TAP42-R295\**) を形質転換した後、*LST8* プラスミドなくとも生育が可能であるか否かを解析した。その結果、ラパマイシン非感受性 Tap42p を高発現した場合に限り、*lst8* 破壊株の致死性を抑圧することが判明した。このことは、Lst8p の欠損による増殖阻害が Tap42p の活性化により回復することを示している。このことから、Lst8p は、Tap42p の上流、おそらく TOR よりも上流で機能していることが推測された。

そこで、Lst8p が TOR 経路に及ぼす効果を検討するため、温度感受性 *lst8* のスクリーニングを行った。変異 *TAP42* ライブラリーの作成と同様、PCR によってランダムに変異を導入した。約 5.2 万クローンのスクリーニングから 19 クロ

ーンを温度感受性 *lst8* として得ることに成功した。

得られた温度感受性 *lst8* を持つ株を作製し、制限温度下においてこの蛋白質が機能しなくなった場合に TOR 経路に及ぼす影響を検討している。具体的には、TOR 経路を介してその存在量、活性が制御されているアミノ酸トランスポーター Tat2p や Gap1p、また TOR によりリン酸化状態が制御されているオートファジー制御因子 Apg13p や転写因子 Gln3p に及ぼす効果を指標に、TOR 経路の活性化状態を評価できる。

### III. まとめ

本研究では、外界の栄養条件による細胞の翻訳や増殖、自食作用の制御において重要な役割を果たす TOR 情報伝達経路の活性制御機構を、酵母の整備された遺伝学的手法を駆使して明らかにすることを目指した。その結果、アミノ酸トランスポーターが環境の栄養状態によってゴルジ体から細胞膜へと小胞輸送される過程において必須な機能を担う蛋白質 *Lst8p* を、TOR 経路活性制御因子の候補として同定した。今後は、これまでの遺伝学的な解析から得られた知見を生化学的に検討することで、TOR 自身の活性制御機構の解明に迫りたいと考えている。また得られた知見を哺乳類に応用することでこの複雑な TOR 経路の制御機構について明らかにしたい。