

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 15 年度 博士課程進学
氏名 米山 京
指導教員名 豊島 近

論文題目

活性化型 TOR 変異体を用いた酵母 TOR 経路の生理機能の解析

はじめに

細胞の成長と増殖は、増殖因子などの増殖刺激に加え、栄養状態に応じて制御されている。細胞外の栄養状態を検知し、細胞の成長を制御する機構の主要な因子が TOR (Target Of Rapamycin) である。プロテインキナーゼである TOR は、真核生物に広く保存されており、哺乳類には mTOR、酵母には Tor1p、Tor2p の二つが存在する。

Tor1p、Tor2p は、機能的に異なる二つの TOR 複合体を形成し、様々な生理的制御に関わっている。TORC1 (TOR Complex 1) は、Tor1 もしくは Tor2p、Kog1p、Lst8p、Tco89p の 4 つのタンパク質で構成されており、ラパマイシンに感受性を示す。TORC1 は、タンパク質の翻訳、リボソームの生合成、オートファジー、転写因子の活性化、細胞周期、栄養源トランスポーターの選別と代謝回転などを制御している。TORC2 (TOR Complex 2) は、Tor2p、Avo1p、Avo2p、Tsc11p、Lst8p、Bit61p、Slm1p、Slm2p の 8 つのタンパク質で構成されており、ラパマイシンに非感受性を示す。TORC2 は、アクチン骨格系の局在化を制御している。この 2 種類の TOR 複合体は、サブユニット構成に差異はあるものの、哺乳類においても保存されている。

TOR は細胞の大きさと増殖を制御することから、癌に代表されるような増殖性疾患と関連して研究が進められている。腫瘍細胞での mTOR 自体の異常は知られていないものの、ある種の癌抑制遺伝子の欠損によって引き起こされた mTOR の活性化が、細胞

の腫瘍化に繋がることを示す証拠がある。実際に、TOR を標的分子とする免疫抑制剤ラパマイシンの、抗癌剤としての臨床治験も始まるなど、発癌における mTOR の関与は臨床的にも関心を集めている。

これまでに、ラパマイシンによって TORC1 の機能を阻害した場合に細胞に引き起こされる応答や、TOR の機能を欠損もしくは低下させた変異細胞の表現型の解析から、TOR が制御していると考えられる種々の生理反応が報告されてきた。しかしながら、これらが実際に TOR によって制御されているのか、あるいは TOR は単にこれらの反応に許容的な役割を果たしているのかは明らかにされていない。また、栄養源がシグナルとしての役割を持つこと自体は疑いの無い事実だと思われるが、栄養源のシグナルが実際に TOR の活性調節を介して種々の応答反応を制御しているか否かも定かではない。

我々はこの点に着目し、遺伝学的解析の容易な酵母を用いて TOR の機能獲得型変異体を作製し、この変異体を用いて栄養源のシグナルが細胞の応答反応を制御するメカニズムを明らかにすること目的として本研究を行った。

活性化型 TOR2 遺伝子の候補の単離

修士課程において、ラパマイシンに対する耐性を指標に、活性化型であると考えられる変異型 TOR2 遺伝子を 15 クローン取得した。この中には *lst8^{ts}* 変異の致死性を抑圧できる変異型 TOR2 遺伝子が 5 クローン存在した。5 つの中で、*lst8^{ts}* 致死性の抑圧能とラパマイシン耐性が共に強い変異型 TOR2 遺伝子を一つ (*TOR2-LM*) 選び、以降の解析に用いることにした。*TOR2-LM* で変異していたアミノ酸残基は mTOR には保存されていなかったが、Tor1p には保存されていた。そこで相同な変異を *TOR1* 遺伝子にも導入し、*TOR1-LM* を作製した。

TOR1-LM 変異と TOR2-LM 変異は

TOR 複合体構成因子の欠損による致死性を抑圧する

TOR 複合体構成因子をコードする *KOG1* と *LST8* はどちらも必須遺伝子であり、欠損変異株は致死となる。*kog1^{ts}* 株と *lst8Δ* 株を用いて、*TOR1-LM* もしくは *TOR2-LM* がこれらの致死性を抑圧できるかどうかを調べた。その結果、*TOR1-LM* は *kog1^{ts}* の温度感受性による致死性を抑圧する事ができたが、*lst8Δ* の致死性を抑圧する事ができなかった。一方、*TOR2-LM* は、*lst8Δ* の致死性を抑圧する事ができ、*kog1^{ts}* の温度感受性による致死性を弱く抑圧した。これらの結果は、*TOR1-LM* が TORC1 機能の欠損を、*TOR2-LM*

がTORC1 機能とTORC2 機能の欠損を抑圧することを示し、これらの変異が活性化型であることを示唆している。

TOR1-LM変異株とTOR2-LM変異株は栄養飢餓条件下の生存率が著しく低下する

始めに、TOR1-LM、TOR2-LMそれぞれの変異遺伝子をゲノムに組み込んだ変異株を作製した。さらに、2つの変異を合わせ持つ二重変異株(TOR1-LM TOR2-LM)、TOR2-LMのみの効果を見るためにTOR2-LMを持たせた上でTOR1を破壊した株(*tor1Δ* TOR2-LM)も作製し、以下の解析を行った。

まず、アミノ酸を欠乏させた培地において、TOR1-LM変異株とTOR1-LM TOR2-LM二重変異株の生育が悪化した。これは、TOR1-LMが正常な飢餓応答を行う事ができず、貧栄養状態に適応できなかった為であると考えられ、TOR1-LMが恒常的活性化型であるという予想と矛盾しない。さらに、各株を窒素源飢餓培地に移したところ、TOR1-LMでは著しい生存率の低下が引き起こされた。これもまたTOR1-LMが恒常的活性化型であることを裏付けている。ラパマイシン添加培地における生育も検討したところ、活性化型の変異株は全てラパマイシンに対して弱い耐性を示していた。また、TOR1-LM株とTOR1-LM TOR2-LM二重変異株の生育を悪化させたアミノ酸欠乏培地にラパマイシンを添加すると、これらの株の生育が回復した。

TOR1-LM変異とTOR2-LM変異によるTORC1経路への影響

次にこれらの株を用いて、変異がTORC1依存的応答反応へ及ぼす影響について調べた。代表的なTORC1の下流因子として、Atg13pとNpr1pを用いた。オートファジーの誘導に重要なAtg13pは、TORC1依存的にリン酸化され制御されており、ラパマイシン添加時や飢餓時には脱リン酸化される。栄養源トランスポーターの選別と代謝回転に重要なNpr1pも同様である。上記変異株を窒素源飢餓条件下においたところ、TOR1-LM株とTOR1-LM TOR2-LM二重変異株ではAtg13pとNpr1pの脱リン酸化が抑制されていることが示された。対照として行ったラパマイシンの添加に対しても変異体は耐性を示し、Atg13pとNpr1pは共にリン酸化状態を維持していた。

また、野生株では飢餓時やラパマイシン添加時にはグリコーゲンの蓄積が引き起こされる。上記変異株を窒素源飢餓条件下においたところ、TOR1-LM株とTOR1-LM TOR2-LM二重変異株では、グリコーゲンの蓄積が野生株に比して阻害されていた。

これらの結果は、TOR1LM変異が恒常的活性化型であることを示すものである。

まとめ

はじめに述べたように、腫瘍細胞における mTOR の活性化型変異は未だ報告がなく、本研究で単離した変異型 TOR は、あらゆる系を通じて、機能獲得型・恒常的活性化型の TOR 変異体の唯一の例である。さらに、栄養シグナルが実際に TOR の活性調節を介して種々の応答反応を引き起こしていることを示した最初の報告でもある。

今後はこの変異体が、キナーゼ活性が亢進するような変異型であるのか、または活性の制御がかからない脱抑制の状態にあるために活性化型であるのかを生化学的に確かめる必要がある。また、*TOR1-LM* 変異株を用いた、遺伝子発現のマイクロアレイ解析を行うことにより、活性化状態の TOR が細胞に引き起こす応答反応を、栄養シグナルの引き起こす他の応答とは区別して網羅的に調べるのが可能になった。

また、mTOR に関しても同様な恒常的活性化型変異体を単離することができれば、これまで示唆されていたように、mTOR の活性化が細胞の腫瘍化を引き起こすか否かを明らかにすることができよう。一般にシグナル伝達因子の活性化型変異体が、経路解明のための研究ツールとして特に有効であったことを踏まえ、本研究で得られた恒常的活性化型 TOR 変異体が、TOR 経路の全容解明に大きく資することを期待したい。