

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 16 年 博士課程進学
氏名 神谷 昌男
指導教員名 豊島 近

論文題目

酵母アミノ酸トランスポーター制御因子 Aly1/2p の同定と機能解析

序論

TOR (Target of Rapamycin) は、免疫抑制剤ラパマイシンの標的因子として同定されたプロテインキナーゼである。ラパマイシン処理により TOR の活性が阻害されると、タンパク質合成の抑制など様々な応答反応が引き起こされ、細胞は増殖停止に向かう。そして、この応答反応が細胞を栄養飢餓状態に置いた時の反応と一致することから、TOR 経路は細胞が外界の栄養状態を検知して細胞増殖を制御するための情報伝達経路であると考えられている。

酵母 TOR には Tor1p と Tor2p が存在し、Tor1p または Tor2p-Kog1p-Lst8p-Tco89p で構成される TORC1 (TOR complex 1) 複合体と Tor2p-Avo1p-Avo2p-Avo3p-Lst8p-Bit61p で構成される TORC2 (TOR complex 2) 複合体を形成している。TORC1 はラパマイシン感受性であり、リボソームの生合成、アミノ酸トランスポーターの安定性制御、オートファジーの開始などを制御している。これに対して、TORC2 はラパマイシン非感受性であり、アクチン骨格の制御に関与している。

現在までに、TOR 経路の下流で増殖制御や飢餓応答を担う因子に関しては詳細な解析が進みつつあるが、TOR が外界の栄養状態をどのように検知しているのかという分子機構については不明な点が多く残されている。当研究室では TORC1 と TORC2 の共通の構成因子である Lst8p を TORC1 の上流因子として同定していた。さらに、制限温度下の *lst8^Δ* 株では、TORC1 によりリン酸化レベルが制御されている Atg13p、Npr1p のリン酸化が低下し、TORC2 によって制御されているアクチン骨格が脱局在していたことや、恒常的活性化型 Tor2p の導入により *lst8Δ* 株の致死性が回復したことなどから、Lst8p は TORC1 および TORC2 の活性化に必須の上流因子であることを明らかにした。しかしながら、Lst8p がどのように TOR の活性制御に関与しているのか、また栄養状態の検知機構がこの活性制御にどのように関与しているのかは分かっていない。そこ

で、本研究では *Lst8p* と協調して TOR 活性制御に関わる因子を単離することを目的に、*lst8^{ts}* 株を用いてマルチコピーサプレッサー遺伝子のスクリーニングを行った。そして、同定した *ALY1*、*ALY2* の機能解析を通じて栄養状態に応じた TOR の活性制御機構の解明を目指した。

結果

第1章 *ALY1*、*ALY2* の同定

lst8^{ts} 株にマルチコピーのベクターに構築された酵母ゲノムライブラリーを導入してスクリーニングを行った。約 1.2×10^4 クローンをスクリーニングした結果、*lst8* 温度感受性変異を抑圧する 14 個のマルチコピーサプレッサー遺伝子を同定することに成功した。同定した 14 個のマルチコピーサプレッサー遺伝子の中に、遺伝子産物の機能が報告されていない遺伝子 *ALY2* (Arresin-like protein in yeast 2) が存在した。また、酵母ゲノムデータベースを参照した結果、Aly2p とアミノ酸配列で 56% の相同性をもつタンパク質をコードする *ALY1* がゲノム上に存在していた。Aly1p、Aly2p にはアレスチンドメインに加えて、ユビキチンリガーゼ E3 である Rsp5p と結合することが知られている PY モチーフ (PPXY、PXY) が存在していた。そこで、Aly1p も Aly2p と類似の機能をもつ因子であるか否かを調べるために、*lst8^{ts}* 株に *ALY1* をマルチコピーで導入したところ、制限温度下での生育阻害が回復した。このことから、Aly1p、Aly2p は重複した機能をもつ因子であると推測される。

第2章 *ALY1*、*ALY2* 破壊株と高発現株の解析

ALY1、*ALY2* の遺伝子産物の生理的機能を詳しく解析するために、*aly1Δ*株、*aly2Δ*株、*aly1Δ aly2Δ*株を作製し、種々の培地における増殖曲線を調べた。その結果、細胞の生育に最低限必要な窒素源や糖類を含む最少合成培地である SD 培地では、いずれの破壊株も増殖は野生株と同程度あったが、SD 培地に 13 種類のアミノ酸と核酸塩基を加えた完全合成培地である SC 培地では野生株より遅かった。

次に、アミノ酸類似体を含むプレート上での破壊株の生育観察を行った。7 種類のアミノ酸類似体を使用して破壊株の生育を観察した結果、アルギニン類似体 L-カナバニンプレートで破壊株は野生株より耐性を示したことから、破壊株ではアルギニン取り込み能が低下していると推測された。そこで、 ^{14}C アルギニンを使用し、細胞のアルギニン取り込み能を直接測定したところ、いずれの破壊株も野生株より低下していた。

アルギニンはアルギニントランスポーター Can1p により取り込まれることが知られている。はじめに、各破壊株の *CAN1* 転写量を解析したが破壊株と野生株の間に大きな違いは見られなかった。次に、Can1p のタンパク質量を測定した結果、各破壊株では野生株に比べて減少していた。そして、免疫染色により Can1p の細胞内局在を解析した結果、野生株では主に液胞、細胞膜に局在していたのに対して、*aly1Δ aly2Δ*株では Can1p のはっきりした局在が見られなかった。以上のことから、破壊株のアルギニン取り込み能の低下は、転写後の Can1p のタンパク質量の減少とともに、細胞膜局在も低下したことが原因であると推測される。

一方、*ALY1* または *ALY2* をマルチコピーで細胞に導入した *ALY1++*株、*ALY2++*株、

*ALY1++ ALY2++*株では、*Can1p* のタンパク質量や細胞内局在に野生株と比べて顕著な変化は見られなかったものの、L-カナバニンプレートで野生株より感受性を示し、¹⁴Cアルギニン取り込み測定でも野生株より取り込み能が亢進していた。以上の結果から、*Aly1p*、*Aly2p* はアルギニンに代表される栄養の取り込みに関与する因子であると推測される。

ラパマイシン処理により TORC1 の活性化を抑制すると、複数のアミノ酸トランスポーターの発現量や局在が変化することが知られている。一方、*Can1p* は低グルコース状態でタンパク質量が減少することが報告されているが、ラパマイシン処理に影響を受けるか否かは報告されていない。そこで、ラパマイシンにより *Can1p* のタンパク質量、アルギニン取り込み能が変化するか否かを調べた結果、いずれも低下していた。

*aly1Δ*株、*aly2Δ*株、*aly1Δ aly2Δ*株においても *Can1p* のアルギニン取り込み能の低下が起きている。そこで、ラパマイシンの作用が *Aly1p*、*Aly2p* を介したトランスポーターの制御とどのような関係にあるのか解析した。具体的には、*aly1Δ aly2Δ*株にラパマイシンを加えた後のアルギニン取り込み能を測定したが、破壊株により低下していたアルギニン取り込み能は、ラパマイシンによりさらに低下した。これらのことから、TORC1 機能は、*Aly1p*、*Aly2p* とは独立にトランスポーターを制御していると推測される。

第3章 *Aly1p*、*Aly2p* の PY モチーフの解析

Aly1p、*Aly2p* には *Rsp5p* と結合することが報告されている PY モチーフが存在していた。そこで、*Aly1p*、*Aly2p* が PY モチーフを介して *Rsp5p* と結合していることを検証するために、PY モチーフをアラニンに置換した *Aly1-ΔPYp*、*Aly2-ΔPYp* を作製し、*Rsp5p* との結合実験を行った。その結果、野生型 *Aly1p*、*Aly2p* と *Rsp5p* の結合は確認できたのに対して、*Aly1-ΔPYp*、*Aly2-ΔPYp* と *Rsp5p* は結合しなかった。このことから、*Aly1p*、*Aly2p* は PY モチーフを介して *Rsp5p* と結合していると考えられる。

次に、*Rsp5p* との結合が *Aly1p*、*Aly2p* の機能に与える影響を調べた。ゲノム上の *ALY1*、*ALY2* を *ALY1-ΔPY*、*ALY2-ΔPY* に置換した株を作製してアルギニン取り込み能を測定した結果、*ALY1-ΔPY* 株、*ALY2-ΔPY* 株では *aly1Δ*株、*aly2Δ*株と同程度に低下していた。また、*ALY1-ΔPY*、*ALY2-ΔPY* をマルチコピーで導入しても、*lst8^{ts}* 株の制限温度下での生育阻害は回復しなかった。以上のことから、*Rsp5p* の結合が *Aly1p*、*Aly2p* の機能に必要であると推測される。

第4章 *ALY1*、*ALY2* 高発現による *lst8* 温度感受性変異抑圧の機構

Aly1p、*Aly2p* 高発現による制限温度下の *lst8^{ts}* 株の生育阻害の抑圧機構について解析するために、*ALY1*、*ALY2* をマルチコピーで導入した *lst8^{ts}* 株の制限温度下のアルギニン取り込み能を測定した。その結果、制限温度下で *lst8^{ts}* 株のアルギニン取り込み能が約 70%低下したのに対して、*ALY1*、*ALY2* をマルチコピーで導入するとアルギニン取り込み能の低下は約 20%に抑えられていた。

次に、*ALY1*、*ALY2* をマルチコピーで導入した *lst8^{ts}* 株において、制限温度下で TORC1、TORC2 の活性が回復しているか否かを検証した。その結果、*ALY1*、*ALY2* をマルチコピーで導入すると、制限温度でのアクチン骨格の脱局在は観察されたものの *Npr1p*、

Atg13p の脱リン酸化は見られなかった。以上のことから、*ALY1*、*ALY2* 高発現による *lst8* 温度感受性変異の抑圧は、TORC1 の活性が回復したためであると考えられる。*ALY1*、*ALY2* 高発現でアルギニンの取り込みが回復したことを考え合わせると、*Can1p* 以外にも種々の栄養源トランスポーターの活性化により細胞内の栄養状況が改善され、このことが TORC1 活性の回復を引き起こしたというモデルが考えられる。

まとめ

lst8^{ts} 株を使ったスクリーニングにより、制限温度下の生育阻害を抑圧するマルチコピーサプレッサー遺伝子 *ALY1*、*ALY2* を同定した。*lst8^{ts}* 株に *ALY1*、*ALY2* をマルチコピーで導入すると、制限温度下で低下していたアルギニン取り込み能が回復し、TORC1 が活性化されていた。*Rsp5p* はユビキチン化を介していくつかの栄養源トランスポーターの細胞膜局在を制御することが知られている。*ALY1-ΔPY*、*ALY2-ΔPY* を用いた解析から、*Aly1p*、*Aly2p* は *Rsp5p* との結合を介して機能する因子であると推測され、*Rsp5p* と協調して複数のトランスポーターの制御に関与している可能性がある。

今後は、*ALY1* *ALY2* 破壊株、高発現株で *Rsp5p* によって制御されることが知られている栄養源トランスポーターの栄養源の取り込み能測定を行うことで、*Aly1p*、*Aly2p* と *Rsp5p* によるトランスポーター制御機構を明らかにしていきたい。また、*Aly1p*、*Aly2p* 高発現により活性化されたトランスポーターが、具体的にどのような機構で TORC1 経路の活性化に関与しているのか解析することで、TOR の活性制御機構についての重要な知見が得られると期待している。