

## 論文の内容の要旨

### 分裂酵母の有性生殖開始を制御する TOR 経路の解析

(Analysis of the TOR pathways that regulate the onset of sexual development in fission yeast)

大坪瑠子

すべての生物は、様々な細胞内情報伝達経路を活用して、細胞外界の環境の変化に対応している。TOR (target of rapamycin)タンパク質は、情報伝達に関わる真核生物に広く保存されたフォスホイノシチドキナーゼ様の巨大な(~280kDa)キナーゼタンパク質である。

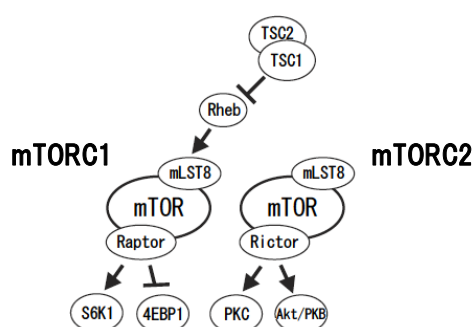
出芽酵母やほ乳類での研究から、TOR キナーゼは、インシュリンなどの増殖因子、アミノ酸などの栄養源、エネルギー、ストレスに反応して、転写、翻訳、タンパク質分解、リボソーム生合成、代謝、アクチン骨格形成など、細胞の成長・増殖に関わる様々な機構を調節していることが明らかとなっている。ほ乳類細胞の TOR (mTOR)の下流には、40S リボソームタンパク質の S6 をリン酸化する AGC ファミリーキナーゼ S6K1 と eIF4E binding protein の 4EBP1 が存在することが知られており、アミノ酸やインシュリンなどの増殖刺激に応答して、mTOR がこれらをリン酸化し、翻訳制御を行っていることが示されている。しかし、TOR 経路の詳細なシグナル伝達機構については未だ不明な点も多い。

ほ乳類、出芽酵母では、TOR は 2 種類の複合体、TORC1、TORC2 を形成していることが知られている。ほ乳類では、Raptor、mLST8、mTOR から mTORC1 複合体が、Rictor、mSIN1、PRR5 (Protor)、mLST8、mTOR から mTORC2 複合体が形成され、それぞれ異なる下流の因子にシグナルを伝達することが報告されている(図 1)。出芽酵母には 2 種類の TOR タンパク質、Tor1p および Tor2p が存在し、TORC2 は Tor2p のみからなるが、TORC1 には Tor1p と Tor2p の両者が含ま

れていることが報告されている。これら複合体の構成因子を表 1 に示した。

mTOR の上流に関しては、ヒト結節性硬化症の原因遺伝子産物 TSC1-TSC2 複合体が GAP として small G protein Rheb を制御し、Rheb が mTORC1 に結合して TOR 活性を正に制御していることがわかってきている。出芽酵母は TSC の相同遺伝子を持たないが、分裂酵母には相同遺伝子が存在し、それらの産物はほ乳類細胞と同様に TSC 複合体を形成し、Rheb (Rhb1)を制御していることが報告されている。また、ほ乳類で、mTORC2 の下流の因子である Akt/PKB が、TSC2 をリン酸化して抑制しているという、mTORC1 と mTORC2 のクロストークの例が報告されている。

表 1. TORC1、TORC2 複合体構成因子



	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mammals
TORC1	Tor2	TOR1 or TOR2	mTOR
	Mip1	KOG1	Raptor
	Wat1/ Pop3	LST8	mLST8
	Tco89	TCO89	-
	Toc1	-	-
TORC2	Tor1	TOR2	mTOR
	Sin1	AVO1	hSIN1
	-	AVO2	-
	Ste20	AVO3	Rictor
	Wat1/Pop3	LST8	mLST8
	Bit61	BIT61	PRR5
	-	-	-

図 1. ほ乳類の TOR 経路

本研究で用いた分裂酵母は、通常、栄養源が豊富な培地では一倍体として分裂を繰り返し、増殖する。栄養源が枯渇すると体細胞分裂を G1 期で停止し、異なる接合型の細胞間でフェロモンの授受を行い、接合して二倍体となり、減数分裂を経て孢子形成を行う。

分裂酵母には出芽酵母と同様に、二種類の TOR タンパク質、Tor1p および Tor2p が存在する。分裂酵母の Tor1p は、生育に必須ではないが、Tor1p を欠く細胞は、栄養源が枯渇しても G1 期で停止できず、有性生殖不能の表現型を示す。また、ストレス条件下での生育にも欠損が生じる。分裂酵母が有性生殖の初期に G1 期で停止するという事に注目して、当研究室の先行研究で G1 期停止に欠損のある変異株の単離とその解析が行われ、その中の一つ *gad2* 変異株の原因遺伝子が *tor1* であると突き止められた。さらに、Tor1p の標的として AGC ファミリーキナーゼである Gad8p が同定された。ほ乳類では AGC ファミリーキナーゼが PDK1 様キナーゼによってリン酸化され活性化されることが知られていたが、分裂酵母でも PDK1 様キナーゼの Ksg1p が Tor1p と協調して Gad8p を活性化することが示され、TOR-PDK1-AGC ファミリーキナーゼによるシグナル伝達経路が、真核生物で広く保存されている可能性が提唱された。ほ乳類と同じように TSC1/TSC2-Rheb-TOR 経路、TOR-PDK1-AGC ファミリーキナーゼ経路が分裂酵母に存在することから、分裂酵母の TOR 経路の研究結果が、他の真核生物の TOR 経路の解明につながってい

くことも期待できる。

分裂酵母のもう一つの TOR、Tor2p は生育に必須である。当研究室で、Tor2p の解析を進めるために Tor2p の温度感受性株が作製された。この温度感受性株は、制限温度に移すと富栄養条件下で細胞周期を G1 期で停止し、接合を開始することがわかった。また、当研究室で、分裂酵母の減数分裂開始制御因子 Mei2p を抑制する因子のスクリーニングでとられた Mip1p が、その後、mTORC1 複合体構成因子 Raptor のホモログであることが判明していた。

以上のような背景のもとに、本研究で Mip1p の温度感受性株を新たに作製したところ、この株は *tor2* 温度感受性株と同様の表現型を示すことが明らかとなった。Mip1p に加え、mTORC 複合体構成因子である Rictor ホモログの Ste20p と、hSin1 ホモログの Sin1p と、mLst8 ホモログの Wat1p が分裂酵母にも保存されていたので、これらの因子と Tor1p および Tor2p との相互作用を調べた。その結果、Mip1p は主に Tor2p と、Ste20p と Sin1p は主に Tor1p と、Wat1p は Tor1p、Tor2p 両方と結合していることがわかった。さらに、*ste20* 破壊株と *tor1* 破壊株は非常に類似した表現型を示すことがわかり、このことから Ste20p が TORC2 の構成因子であると考えられた。以上の結果から、分裂酵母においても TORC1、TORC2 の2つの複合体が存在することが確認され(表 1)、G1 期停止して有性生殖を開始する制御において、TORC2 (Tor1p)は正に、TORC1 (Tor2p)は負に働いていることが明らかとなった。

Tor1p と Tor2p は高い相同性を持つにも関わらず、対照的な機能を示した。そこでこの機能の違いがどこから生じているかを検討した。*tor1* 破壊と *tor2* 温度感受性変異が互いに抑圧するということはなかった。次に、Tor1p と Tor2p の機能の違いを構造的に探るために、キメラタンパク質を作製した。TOR には、いくつかの保存されたドメインが存在し、N 末端側にはタンパク質相互作用に関わるとされている HEAT リピート構造が広がっており、C 末端側には、FAT ドメイン、FRB ドメイン、キナーゼドメイン、FATC ドメインを持つ。Tor1p と Tor2p の N 末側 HEAT リピート部位を入れ替えたキメラタンパク質と、Tor1p と Tor2p のキナーゼドメインを含む C 末側を入れ替えたキメラタンパク質をつくり、*tor2* 温度感受性株および *tor1* 破壊株の表現型を相補できるかを調べた。その結果、N 末側 HEAT リピート部位が Tor1p あるいは Tor2p として機能するために重要であることがわかった。また、Tor1p の下流で働く Gad8p の活性化型を *tor2* 温度感受性株に高発現させると、半制限温度で抑圧が見られたことから、分裂酵母の Tor1p、Tor2p 経路にも何らかのクロストークがある可能性が考えられた。

当研究室では二種類の *tor2* 温度感受性株、*tor2-ts6* と *ts10* が単離されていた。これらの変異部位を決定したところ、*ts6* では HEAT リピート部位の変異が、*ts10* ではキナーゼドメインと FAT ドメインの変異が温度感受性に重要であることがわかった。また、これらの変異タンパク質は性質も異なっており、Tor2-ts6p は Mip1p との結合能が弱くなっていたのに対し、Tor2-ts10p は不安定で壊れやすくなっていることが明らかとなった。

分裂酵母では、Tor2p の下流の因子は未同定である。本研究では、Tor2p 経路上の新規因子を単離することを目的として、いくつかのスクリーニングを行った。キメラタンパク質の解析などから、異なる機能が損われていると予想される HEAT リピート部位に変異が入った *tor2* 温度感受性株とキナーゼドメインに変異が入った *tor2* 温度感受性株を使い、それぞれ高温感受性を抑圧する因子のスクリーニングを行った。その結果、キナーゼドメインに変異が入った *tor2* 温度感受性の抑圧因子として、TORC 複合体構成因子の Wat1p が得られ、HEAT リピート部位に変異が入った *tor2* 温度感受性の抑圧因子として、新規の因子 Spr1p が単離された。Spr1p と Tor2p 経路の関係について詳細に検討した結果、ミトコンドリアの機能とつながりがある可能性が示された。また、Tor2p の局在を観察したところ、ミトコンドリアに局在していることがわかった。

さらに、*tor2* 温度感受性株と同様な表現型を示す変異株(高温感受性かつ富栄養培地上でも接合)が当研究室で単離されていたが、それらの原因遺伝子をクローニングしたところ、アミノアシル tRNA 合成酵素、tRNA の修飾酵素、RNA polymerase III サブユニットなど、tRNA と関係した因子をコードする遺伝子であることが判明した。tRNA はアミノアシル tRNA 合成酵素によってアミノアシル化され、翻訳伸長因子 eEF1 によって翻訳伸長が行われているリボソーム上に運ばれて行く。スクリーニングで単離されなかった他のアミノアシル tRNA 合成酵素の温度感受性変異株を作製したところ、これらの変異株も *tor2* 温度感受性株と同様の表現型を示すことがわかった。また、アミノアシル tRNA 合成酵素と Tor2p が物理的に相互作用している可能性が示された。さらに、Wat1p を使ったツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、eEF1 の構成因子である eEF1a が単離された。eEF1a の破壊株を作製したところ、この破壊株も *tor2* 温度感受性株と同様の表現型を示すことがわかり、tRNA や翻訳機構が有性生殖開始の制御と関わっている可能性が示唆された。