

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 25 年度博士課程進学
氏 名 亀井（豊水）理恵
指導教員名 舘 川 宏 之

論文題目

酵母 RNA ヘリカーゼ Ded1 および Dbp1 による TORC1 活性制御機構の解析

背景および目的

細胞は、栄養状態やストレスなどの細胞内外のシグナルを統合し、自身の成長と代謝を制御している。この制御を担う主要な因子が TOR (target of rapamycin) である。TOR は、その名の通り免疫抑制剤/抗がん剤ラパマイシンの標的分子として同定されたプロテインキナーゼで、シグナル伝達複合体 TORC1 (TOR complex 1) を構成して機能する。TORC1 経路は真核生物で広く保存されており、特にモデル生物として優れた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は TORC1 研究において先導的な役割を担ってきた。

酵母 TORC1 は、アミノ酸に応答し 2 つの独立した経路を介して活性が制御される。一つは、液胞タンパク質 Pib2 を介する Pib2 経路である。Pib2 経路はグルタミン刺激によって活性化されることが知られているが、そのメカニズムは未だ不明である。もう一つは、低分子量 G タンパク質である Gtr1 と Gtr2 からなる二量体を介する Gtr 経路である。Gtr1 および Gtr2 は、他の G タンパク質と同様に、結合するグアニンヌクレオチドによって活性が制御され、Gtr1 が GTP 結合型、Gtr2 が GDP 結合型の二量体の時に活性型となる。Gtr1 と Gtr2 それぞれに GAP (GTPase-activating protein) と GEF (guanine nucleotide exchange factor) が報告されているが、これらの制御因子がアミノ酸に応答してどのように制御されるかについて、多くは明らかになっていない。そこで本研究では、Gtr 経路の新規制御因子を探索するべくスクリーニングを行った。その結果、Ded1 とそのパラログの Dbp1 を有力な候補として取得した。

TORC1 が制御している生理機能としては、翻訳の活性化がよく知られている。Ded1 と Dbp1 は、二重鎖 RNA と結合し ATP を加水分解することによって RNA を直鎖に解いていく RNA ヘリカーゼであり、特に、翻訳開始コドン上流の 5'非翻訳領域が長い mRNA 特異的に翻訳開始前複合体の結合を促し、翻訳を促進させる役割があると報告されている。酵母には RNA ヘリカーゼが数多く存在するが、Ded1 は欠損すると死に至ることから、特に重要な機能を担っていると考えられる。近年、単純なヘリカーゼ活性以外の Ded1 の役割として、種々のストレスに応答して、mRNA と付随する因子が形成する mRNP (messenger

ribonucleoprotein) をストレス顆粒 (stress granule) へ局在させることによって、翻訳を制御するという報告がある。TORC1 経路との関連については、これまでも、ラパマイシンによって TORC1 活性が阻害されると Ded1 がリン酸化されるという報告や、TORC1 阻害時における翻訳開始の抑制が Ded1 の C 末端領域を介するという報告がある。後者の根拠として、Ded1 の C 末端領域を欠失した Ded1- Δ ACT を導入した株は強いラパマイシン耐性を示し、ラパマイシン存在下においても翻訳が抑制されないことが示されている。これらのことから、Ded1 は TORC1 による制御を受けている下流因子であると提唱されている。しかしその一方、ロイシン刺激により Ded1 と Gtr1 の結合が誘導されるという報告もあり、Ded1 が Gtr 経路の活性化を介して、逆に TORC1 の活性を制御する可能性も考えられる。

そこで本研究では、Ded1 および Dbp1 による TORC1 活性制御機構の解明を目指した。

lst4-ts 株および *lst7-ts* 株の取得とマルチコピーサプレッサーの探索

Gtr 経路における TORC1 の新規活性制御因子の同定を目指して、この経路の温度感受性変異株 (*ts* 株) を用いたマルチコピーサプレッサーの取得を行った。はじめに述べたように、TORC1 は Pib2 経路と Gtr 経路を介して独立に制御されるため、Pib2 経路と Gtr 経路が共に機能不全になると細胞は死に至る。また、Gtr2 の GAP として機能する Lst4 と Lst7 の二量体 (Lst 二量体) の機能不全は Gtr2 の不活性化 (GTP 結合型の蓄積) を引き起こすことから、Pib2 経路と共に機能不全になると同じく細胞は死に至る。この致死性を利用し、*pib2 Δ* を親株として *lst4-ts* 株または *lst7-ts* 株を取得した。

これらの株に、酵母遺伝子の 9 割以上を網羅するライブラリーをマルチコピーで導入し、制限温度で培養することによって、Lst4-*ts* または Lst7-*ts* の機能低下による致死性を抑圧し生育が回復するような遺伝子をスクリーニングした。取得された遺伝子には、*ts* 性の原因遺伝子 *PIB2*、*LST4*、*LST7* の他、*DED1* と *DBP1* が含まれていた。*DED1* と *DBP1* は、パラログが両方取得されたこと、生育の回復がよかったことから、TORC1 の新規制御因子の有力な候補であると考え、解析を進めた。

Dbp1 による Gtr1 依存的な TORC1 活性制御の検証

Ded1 と Dbp1 のマルチコピープラスミドによる高発現で *lst4-ts* 株または *lst7-ts* 株の生育が回復したのは、低下した TORC1 活性の回復によるものなのかを確認した。そのためにまず、Ded1 と Dbp1 のマルチコピープラスミドをそれぞれ野生株に導入し、ラパマイシンに対する感受性の変化を観察した。その結果、Dbp1 のマルチコピープラスミドを含む野生株は、ラパマイシン耐性が亢進していた。これに対して、Ded1 導入株ではラパマイシン耐性の亢進は認められなかったが、これは Ded1 の高発現が引き起こす生育阻害の影響であると考えられる。そのため、以後の解析は Dbp1 のみについて言及する。

もし Dbp1 によるラパマイシン耐性の亢進が TORC1 活性化を介したものであれば、Pib2 経路または Gtr 経路のいずれかに依存していると考えられる。逆に TORC1 下流の翻訳活性の回復によるものならば、Pib2 経路にも Gtr 経路にも依存せずラパマイシン耐性を示すと考えられる。そこで、Gtr 経路の主要因子である Gtr1 と Gtr2 それぞれを欠損した株 (*gtr1Δ* 株、*gtr2Δ* 株)、両方を欠損した株 (*gtr1/2Δ* 株)、Pib2 を欠損した株 (*pib2Δ* 株) のそれぞれに、Dbp1 のマルチコピープラスミドを導入し、ラパマイシンに対する感受性の変化を検討した。その結果、Dbp1 高発現によるラパマイシン耐性の亢進は Gtr1 をもつ株でのみ観察された。つまり、Dbp1 高発現が引き起こすラパマイシン耐性の亢進には、Gtr1 が必須であることになる。

次に、Dbp1 が Gtr1 の活性を制御する因子であるのか、それとも Gtr1 によって制御される因子であるのかを検証した。そこで、GAP や GEF によってグアニンヌクレオチド結合状態が変化しない変異型 Gtr 二量体を含むプラスミドと、Dbp1 のマルチコピープラスミドを同時に細胞に導入し、ラパマイシンに対する感受性の変化を確認した。もし Dbp1 が Gtr1 の活性化を介して TORC1 活性を制御するならば、変異型 Gtr 二量体を発現する株では Dbp1 の高発現によりラパマイシン耐性は変化しないと考えられる。種々の変異型 Gtr 二量体をもつ株の生育を比較すると、Dbp1 導入株では Gtr1 の結合型に依らずラパマイシン耐性の亢進が見られ、その様子は Gtr1 が活性型の株でより顕著だった (ただし、Gtr1 と Gtr2 としてともに不活性型をもつ場合には、著しく生育が阻害され、Dbp1 の影響は検討できなかった)。つまり、Dbp1 が Gtr1 の活性化状態を制御しているのではなく、Gtr1 から TORC1 にシグナルが伝達される過程に Dbp1 が関与する可能性が示唆された。

Ded1、Dbp1 および Ded1- Δ ACT が *lst7-ts* 株制限温度下の TORC1 活性に与える影響

Ded1 と Dbp1 の高発現が Gtr 経路依存的に TORC1 を活性化するか否かを、TORC1 基質のリン酸化レベルを指標に検討した。この時、Ded1 と Dbp1 の高発現だけではなく、*dbp1Δ* 株も用いた。*ded1Δ* は死に至るため検討に含めなかった。まずは、アミノ酸刺激に応答した TORC1 活性化に差異が見られるかを検証したが、Ded1 もしくは Dbp1 高発現によっては TORC1 活性化の亢進は認められなかった。加えて、*dbp1Δ* によっては TORC1 活性化の抑制も確認できなかった。次に、ラパマイシンによる TORC1 活性の低下に与える影響を検討したが、この場合にも、TORC1 活性低下には Ded1 および Dbp1 高発現による抑制も、*dbp1Δ* による TORC1 活性低下の亢進も見られなかった。さらに、Ded1 および Dbp1 のマルチコピープラスミドを導入した *lst7-ts* 株を制限温度で培養し、TORC1 活性の低下を Ded1 もしくは Dbp1 高発現が抑制するかを解析したが、高発現による変化は認められなかった。これらの結果は、TORC1 活性に生じている差があまりにも小さく、これまでの実験条件では検出できないためである可能性も考えられた。そこで、冒頭で触れたように、C 末端領域を欠失した Ded1- Δ ACT を導入した株はラパマイシン耐性が亢進すると報告されていることから、全長の Ded1 よりも強い作用を示すことを期待して、*lst7-ts* 株に Ded1- Δ ACT のマルチコピー

プラスミドを導入した。その結果、制限温度下で見られる TORC1 活性の低下が Ded1- Δ ACT 導入株では見られなかった。つまり、Ded1 は TORC1 活性低下を抑制する機能を持っており、その機能は C 末端領域を欠失することによって亢進することが示された。

まとめ

本研究の解析から、Lst 二量体の ts 株で取得されたマルチコピーサプレッサーの Ded1 と Dbp1 は、Lst 二量体による制御の対象である Gtr2 ではなく、Gtr1 に依存して TORC1 の活性を制御していることが示唆された。そして、Ded1 は TORC1 活性低下を抑制する機能を有し、C 末端領域を欠失するとその機能がより顕著になることが明らかになった。

本研究では、Ded1 および Dbp1 の高発現が TORC1 活性に与える影響を解析してきたが、欠損した時の TORC1 活性も解析する必要がある。DED1 が必須遺伝子であるために、オーキシン依存的に目的のタンパク質の分解を誘導できるオーキシンドェグロン法を Ded1 に適用しようと試みたが、成功していないため、他の手法も含めて検討したい。加えて、ヘリカーゼ活性が今回見出した TORC1 制御に関わるのかを検証することは重要であろう。Ded1 のヘリカーゼ活性を失活させた変異体は、マルチコピープラスミドで高発現すると細胞が死に至ったため、GAL プロモーターなどを用いて誘導的に高発現する実験で TORC1 活性に与える影響を検討する必要がある。しかし、この問題は最終的には、多くの試みにもかかわらず未だに実現していない、Gtr 経路依存的 TORC1 活性化の *in vitro* 再構成系において検討されるべきであろう。さらに、TORC1 活性化能のみが特異的に亢進した活性化型変異 Ded1 および Dbp1 を取得できれば、*in vivo* でも TORC1 活性制御機構の詳細を明らかにできると考える。

RNA ヘリカーゼである Ded1 および Dbp1 による TORC1 活性制御機構が明らかになることで、翻訳が TORC1 に制御されるというだけでなく、翻訳制御系と TORC1 の間のこれまでに考えられてきた以上に密接な機能的連関が明らかになると期待される。