

Title	Pib2の遺伝学的相互作用因子の解析
Author(s)	竺, 珊
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82154
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (竺 珊)	
論文題名	Pib2の遺伝学的相互作用因子の解析
論文内容の要旨	
<p>はじめに</p> <p>細胞が内外の栄養状態を厳密に感知し、その量に応じて適切に応答することは生物の生存において必須である。真核細胞において栄養依存の生存に中心的な役割を担うのはタンパク質リン酸化酵素複合体TORC1(Tor complex1)である。十分な栄養源が存在するとTORC1は自身のリン酸化酵素が活性化し同化作用を亢進すると同時に、異化作用を抑制して細胞の成長を促す。こうした栄養に応じた細胞の増殖と成長の制御因子としてのTORC1の機能は真核生物において進化的に広く保存されている。</p> <p>近年、リソソーム(酵母では液胞)膜上でのTORC1の時間的空間的制御が栄養状態と細胞成長を協調する情報伝達のハブであることが明らかになりつつある。一方でTORC1がどのように活性化されるのか、TORC1が何をリン酸化しているのか、というTORC1の制御と基質の分子機構の解明が依然重要な課題として残っている。</p> <p>TORC1相互作用因子として単離された低分子Gタンパク質Ragはアミノ酸によるTORC1の制御に必須である。アミノ酸の刺激により活性化したRagはTORC1と相互作用できるようになり、活性の場であるリソソームに局在するようになる¹⁾。Ragは進化上高度に保存されており、酵母のオーソログGtrは酵母におけるTORC1の唯一の活性化経路であると考えられていた。TORC1はGtrが存在する液胞(リソソームに相当)膜上で活性化する。しかし、酵母TORC1が生育に必須であるにもかかわらずGtrは生育に必須ではないことから、Gtrに依存しないTORC1活性化経路の存在が予想された。</p> <p>このGtr非依存経路を特定するために、Gtr経路の構成因子と合成致死となる因子が探索され、機能未知因子Pib2が単離された²⁾。Pib2とGtrは互いに排他的な異なる複合体をTORC1と形成する。さらにPib2とGtr経路を同時に遮断するとTORC1は完全に不活性化する。この時、TORC1は液胞膜から遊離し、細胞質に一様に局在した。以上からPib2はGtr経路と独立した、新規TORC1活性化経路(Pib2経路)に参画することが明らかとなった²⁾。</p> <p>本研究について</p> <p>上述のように、Pib2経路がTORC1の活性化経路として新たに発見された。既存のGtr経路にはGtr1、Gtr2、Ego1-3複合体など複数の関与因子(タンパク質)が報告されているのに対して、Pib2経路の構成因子は全く未知である。加えて、Pib2経路がどのように活性制御されるのかも解明されていない。本研究では、Pib2経路には複数の構成因子、制御因子が存在していると考え、Pib2経路に関与する因子を遺伝学的に単離し、その機能を解析した。</p> <p>実験には、Gtr経路を欠損し、Pib2タンパク質の機能が減弱した温度感受性<i>pib2</i>変異株を用いた。この変異株は30度では生育できるが、37度ではTORC1が不活化するため致死となる。過剰発現により温度感受性を抑圧する、即ち37度でも変異株が生育できるようになる酵母遺伝子を探索した。その結果、<i>NCS2</i>を同定した。<i>NCS2</i>はGtr経路とPib2経路を双方欠失した変異株の致死性を抑圧できないことから、<i>NCS2</i>はPib2経路に関与していると考えられた。</p> <p>全ての生物において、3種類のtRNA(tK^{UUU}、tE^{UUC}、tQ^{UUG})の下線部のアンチコドンウリジン</p>	

は硫黄修飾される。この修飾によりアンチコドンウリジンとコドンの3文字目の間に安定した塩基対が形成され、翻訳時の揺らぎ (Wobble) が減少し、コドンが正確に解読される。硫黄修飾される3種類のtRNA (tK^{UUU}、tE^{UUC}、tQ^{UUG}) をチオレーションtRNAと呼ぶ。Ncs2はチオレーションtRNAの硫黄修飾に必須な酵素であり、Ncs6と二量体を形成して機能する³⁾。NCS2が*pib2*変異株の温度感受性を抑圧するにはNCS6が必要であった。加えて*pib2*変異株において、3種類のチオレーションtRNAを同時に過剰発現することにより温度感受性が抑圧された。これより、アンチコドンウリジンが硫黄修飾されたチオレーションtRNAがPib2経路に深く関与することが強く示唆された。さらにチオレーションtRNAとNCS2の過剰発現は細胞内のPib2タンパク質の発現量も増加させることが判明した。つまり、NCS2及びその基質のチオレーションtRNAの過剰発現はPIB2遺伝子の翻訳を促進することでPib2経路を活性化させた結果、*pib2*変異株の温度感受性が抑圧されたと考えられる。PIB2遺伝子の塩基配列において、チオレーションtRNAを指定するコドンが四つ連続した領域が存在する。アミノ酸配列を変化することなく翻訳時にチオレーションtRNAを必要としないコドンに置換すると、Pib2タンパク質の発現量が減少したことから、硫黄修飾によって成熟化した3種類のチオレーションtRNAによるコドンの解読がPib2タンパク質の翻訳に必要なことが明らかとなった。

本研究により、Ncs2及びその下流のチオレーションtRNA がPib2タンパク質の発現量を亢進させることでPib2経路の活性化に寄与するという新規のTORC1活性化機構が判明した。TORC1の特異的阻害剤は様々な疾患の治療薬として用いられているが、その副作用が問題となっている。本研究はこれら生命現象のメカニズムの理解に留まらず、更なる精緻な治療法の開発の基盤となる成果が期待される。

参考文献

- 1) Sancak Y., Peterson T. R., Shaul Y. D., Lindquist R. A., Thoreen C. C., Bar-Peled L., Sabatini D. M. *Science* 320, 1496–501 (2008).
- 2) Ukai H., Araki Y., Kira S., Oikawa Y., May A. I., Noda T. *PLoS Genet.* 26, e1007334. (2018).
- 3) Leidel S., Pedrioli P. G., Bucher T., Brost R., Costanzo M., Schmidt A., *et al.* (2009). *Nature* 458, 228–232 (2009)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (竺 珊)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 副 査 副 査 副 査	教授 教授 准教授 講師
		野田健司 鷗澤成一 久保庭雅恵 住友倫子
論文審査の結果の要旨		
<p>本論文は抗ガン剤・免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子であり、栄養など外的環境に应答して細胞成長やオートファジー等を制御する中心的な因子 TORC1の制御機構の解明を目指したものである。</p> <p>酵母 Pib2 はアミノ酸の1種グルタミンに应答して TORC1 を活性化する。温度感受性 <i>pib2</i> 変異株の表現型を大量発現により抑制する因子として <i>Ncs2</i> を同定した。<i>Ncs2</i> は3種類のtRNA のアンチコドンを硫黄化することにより翻訳効率の安定化をもたらす。実際 <i>Ncs2</i> や標的 tRNA の大量発現により、Pib2 の発現量が増加し、TORC1 の活性の上昇が見られた。このことは翻訳効率の変動を通じた新たな TORC1 制御機構の存在を示唆するものである。</p> <p>本研究はヒトを含む真核生物に普遍的な制御因子 TORC1 の活性制御機構の解明に向けて新たな視点を提供するものであり、博士(歯学)の学位に値すると考えられる。</p>		