

ストレス応答を制御する MAPK-TOR クロストーク

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
細胞シグナル研究室
塩崎 一裕

1. はじめに

環境からのシグナルを感知・伝達して細胞の応答を決定するいくつもの情報伝達経路が同定されているが、それらがどのように高次のネットワークを構成して情報の統合・処理を行うのか、いわゆる経路間のクロストーク(crosstalk)については、まだまだ不明な点が多い。申請者はこれまで分裂酵母(*S.pombe*)をモデル系として、真核生物間で保存された環境ストレスに応答するMAPキナーゼ (SAPK) 経路; Target Of Rapamycin (TOR) キナーゼを中心とするTORC2経路;の同定と解析を行ってきた [1,2,3,4]。本研究では、SAPK経路とTORC2経路の両方と相互作用するSin1タンパク質[5]に注目し、2つの経路間のクロストークの分子機構の解明を目指した。ヒトSAPKは細胞のストレス・薬剤耐性とアポトーシスを制御し[6]、一方TORC2はガン遺伝子産物Aktの活性化因子として細胞増殖の誘導に関わっており[7]、SAPK経路とTORC2-Akt経路のクロストークは、ガン細胞の化学・放射線・温熱療法などに対する反応を左右するものと予想される。

本研究は、遺伝学的解析の容易な分裂酵母をモデルとして両経路の相互作用を解明し、ヒトがん細胞におけるSAPK-TORC2クロストークを理解するための基盤構築を目的とする。

2. 方法

Sin1とSpc1の相互作用の解析: Spc1とSin1間の物理的相互作用を酵母ツーハイブリッド(Y2H)法により解析した。Sin1の塩基性クラスター領域の塩基性アミノ酸(リジン, K;アルギニン, R)およびSpc1のCDドメイン内の酸性アミノ酸(アスパラギン酸, D;グルタミン酸, E)へ変異を導入し、Spc1とSin1間の結合に対する影響を解析した。

Sin1のリン酸化レベルの解析: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)における泳動度がリン酸化により遅くなることを利用し、Sin1のリン酸化レベルを解析した。Sin1のカルボキシル末端にFLAGタグを付けたSin1-FLAG融合タンパク質を発現する分裂酵母株を作製し、10%トリクロロ酢酸(TCA)中で総タンパク質を抽出した。抽出タンパク質をSDS-PAGEにより分離後、抗FLAG抗体を用いたイムノブロットティング法によりSin1-FLAGを検出し、その移動度を解析した。

TORC2の*in vivo*活性の解析: TORC2の基質であるGad8のSer546のリン酸化を特異的に認識する抗体(抗pS546抗体)を用いたイムノブロットティング法により、Gad8のSer546のリン酸化レベルを解析することで、細胞内のTORC2活性を推測した。

3. 結果

(1) Sin1とSpc1 SAPKの相互作用機構の解析

Y2HによるSin1とSpc1の物理的相互作用の解析により、塩基性クラスター(KKKVRDKK)を削除したSin1(Sin1 Δ 513-520)およびこのクラスター内のKKKをMMMに置換したSin1_3KMはSpc1と結合しないことが判明した。さらに、Spc1のカルボキシ末端に存在するCDドメインの欠損、あるいはCDドメインの機能に必須とされるアスパラギン酸残基の変異は、Sin1との結合を損なうことも確認できた。以上、Sin1内の塩基性クラスター領域がSpc1 SAPKのCDドメインとの結合に必須であることを示すこれらの結果は、Spc1とSin1を介したSAPK経路とTORC2経路間のクロストークの存在を強く示唆する。

(2) Spc1 SAPKによるSin1のリン酸化の解析

Sin1のリン酸化レベルは*spc1*遺伝子の破壊株(Δ *spc1*)において低下したが、その影響は限定的であった。Sin1リン酸化に複数のリン酸化酵素が関与し、その一つがSpc1であることを示す。(1)の結果と合わせて、Sin1がSpc1の基質であり、Spc1がSin1をリン酸化することによりTORC2経路を制御することと考えられた。

(3) TORC2の*in vivo*活性の解析

Δ *spc1*株におけるGad8 Ser546のリン酸化レベルを指標に、Spc1によるTORC2経路の制御を解析した。その結果、 Δ *spc1*株ではTORC2経路の活性は野生株のその47 \pm 10%とほぼ半減していた。一方、グルコース飢餓および酸化ストレスに対するTORC2経路の応答は Δ *spc1*株と野生株間で大きな差はなかった。

4. 考察

Sin1 は当初、分裂酵母の Spc1 SAPK [1] と相互作用するタンパク質として報告されたが、その後、キナーゼ複合体 TOR complex 2 (TORC2) の制御サブユニットであることが明らかになった [3]。Sin1 はヒトでも保存されており、本研究では、Sin1 が SAPK カスケードからのシグナルを TORC2-Akt 経路に伝達する「クロストーク因子」である可能性を検証した。

本研究によって、Sin1とSpc1 SAPKの相互作用機構が明らかになった。すなわち、Sin1に存在する塩基性アミノ酸のクラスターと酸性アミノ酸に富むSpc1のCDドメインが分子間の相互作用を担っていることを示すデータが得られた。さまざまなMAPKに存在するCDドメインは、MAPKの基質に含まれる塩基性残基のクラスターと相互作用することによって基質を結合し、リン酸化すると考えられており、Sin1がSpc1 SAPKの基質の一つであるという可能性が考えられた。実際に、Sin1タンパク質のリン酸化レベルの低下が *spc1*遺伝子破壊株で検出され、Sin1がSpc1 SAPKの基質であることが強く示唆された。しかしながら、*spc1*遺伝子破壊株においても、Sin1のリン酸化が完全に消失するわけではなく、Spc1 SAPK以外のキナーゼもSin1をリン酸化していることは間違いない。例えば、Sin1が相互作用するもう1つのキナーゼであるTORもSin1をリン酸化していると考えられるが、その生理学的意義は明らかでない。

分裂酵母TORC2はAGCファミリーに属するGad8キナーゼをリン酸化し、活性化する。このTORC2依存的なGad8のリン酸化が、*spc1*遺伝子破壊株で約半分にまで減少していることが本研究で明らかになった。すなわち、Spc1 SAPKがTORC2の活性を正に制御している可能性が考えられる。この制御がSpc1に

よるSin1のリン酸化を介したものであるかどうかを今後、検討する必要がある。これについては、本研究で作成したSin1の塩基性アミノ酸クラスターの変異やSpc1のCDドメインの変異がTORC2の活性にどのような影響を与えるかを調べることによって、明らかにできるはずである。

将来的には、本研究の結果を基にして、ヒト細胞におけるSin1とSAPKの相互作用を検証したい。p38やJNKと呼ばれる哺乳類SAPKは、その構造と細胞機能の両面で分裂酵母Spc1と共通点が多く、Sin1を介して哺乳類TORC2 (mTORC2)と相互作用し、リン酸化制御を行っている可能性は高いと予想している。mTORC2はAktを通して細胞増殖制御とインスリン応答を担っていることから、SAPKによる新たなmTORC2制御機構の同定は、ガンだけでなく、糖尿病など代謝病の理解にも重要な知見となることが期待される。

5. 参考文献

- [1] Shiozaki, K. and Russell, P. (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* *378*, 739–743.

- [2] Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M. and Shiozaki, K. (2008) Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol. Cell* *30*, 108–113.

- [3] Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., and Shiozaki, K. (2008) Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle* *7*, 358–364.

- [4] Tatebe, H., Morigasaki, S., Murayama, S., Zeng, C.T., and Shiozaki, K. (2010) Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Curr. Biol.* *20*, 1975–1982.

- [5] Wilkinson, M.G., Pino, T.S., Tournier, S., Buck, V., Martin, H., Christiansen, J., Wilkinson, D.G., and Millar, J.B. (1999) Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J.* *18*, 4210–4221.

- [6] Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol. Rev.* *92*, 689–737.

- [7] Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* *149*, 274–293.