

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

2020年 3月 12日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 静岡大学・理学部
 職 名 教授
 研究代表者名 丑丸 敬史

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 191004)

1. 共同利用研究 課題名	DNA ダメージによる TORC1 局在移動の分子機構の解析			
2. 共同利用研究 目的	TORC1 キナーゼ複合体は栄養源飢餓だけでなく、様々なストレスによりその活性が制御されている。申請者のグループは、DNA ダメージが TORC1 活性を減弱することを最近見出した。本研究は、この分子機構の解明を目的とする。			
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ～ 2020年3月31日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(申請代表者) 丑丸敬史	理学部	教授	研究のプランニング・総括	
(分担研究者) 小池直暉	創造科学技術大学院	D3	実験の実行	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御研究部 門・細胞情報研究分野	氏名	中嶋昭雄

※ 次の6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 191004)

6. 共同利用研究計画

[1] DNA ダメージによる TORC1 局在移動の分子機構の解析(申請者のグループ)

(1-1) 出芽酵母 TORC1 は、EGO 複合体(Ego1-3/Gtr1/2; 哺乳類細胞の Rag/Ragulator)、およびフォスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI3P)結合性タンパク質 Pib2 を介して液胞膜上に恒常的に繫留されている。

DNA ダメージ後に EGO 複合体、Pib2 のどちらと結合した TORC1 が局在変化するのかが検証するため、両足場タンパク質自身の局在移動の有無と、それぞれの欠損株での TORC1 の局在変化を調べる。

(1-2) 上記の実験で EGO 複合体結合性の TORC1 が DNA ダメージ後に局在移動することが判明した場合には、EGO 複合体を含む液胞膜がどのように断片化するのか解析する。EGO 複合体は液胞膜上の脂質ラフト部位に局在するため、脂質ラフト部位が優先的に断片化するのか検証する。一方、もしも Pib2 複合体結合性の TORC1 が DNA ダメージ後に局在移動することが判明した場合には、Pib2 が結合する PI3P の液胞膜局在の DNA ダメージ後の変化が疑われるため、これを検証する。

(1-3) DNA ダメージ応答系(DNA damage response; DDR)が DNA ダメージ後の TORC1 の局在移動を仲介する可能性を検証するため、DDR を欠損した株(*mec1Δ tell1Δ*)を用いて、DNA ダメージ後の TORC1 の局在変化を観察する。

[2] TORC1 の DNA ダメージ応答の進化的保存性の検証(中嶋昭雄先生と申請者のグループ)

(2-1) DNA ダメージ後の TORC1 の活性低下(Atg13 のリン酸化で評価)、および局在変化という現象が真核生物で広く保存されているのか、分裂酵母を用いて検証する。

7. 共同利用研究の成果

上記の計画に沿って以下の結果を得た。

[1] DNA ダメージによる出芽酵母 TORC1 局在移動の分子機構の解析

(1-1) DNA ダメージ試薬 MMS 処理後に TORC1 (Tor1、Kog1、Lst8 でモニター)は液胞膜上かその近傍に点状集積した。同様な現象が TORC1 繫留因子 Pib2 でも観察され、TORC1 と Pib2 は同所で点状集積した。一方、DNA ダメージ後も別の TORC1 繫留因子 EGO はそのまま液胞膜上に均一に局在し続けた。これらのことは Pib2 に結合した TORC1 が液胞膜上近傍に集積することが示唆された。

(1-2) 液胞膜上の脂質ラフト部位(Ivy1 でモニター)、非脂質ラフト部位(Vph1 でモニター)は TORC1 と同所に点状集積しなかったものの、Pib2 が膜に結合する際に必要な PI3P (GPF-2xFYVE でモニター)は同所に集積した。このことは、少なくとも液胞膜上の PI3P に Pib2 が結合する形で DNA ダメージ後に TORC1 が移動・集積することを示唆する。

(1-3) DDR 欠損株では DNA ダメージ誘導後に FYVE は野生株と同様に局在変化したものの、TORC1 の点状集積の頻度は低下した。これらのことは、DDR は DNA ダメージ後の PI3P の局在変化には関与しないが、そこに集積する TORC1 の点状集積には関与することを示すとともに、DNA ダメージ後の PI3P の局在変化と TORC1 の点状集積は異なるシグナル伝達系で制御されることを示唆する。

[2] 分裂酵母を用いての TORC1 の DNA ダメージ応答の進化的保存性の検証

(2-1) MMS 処理後に TORC1 (Mip1 でモニター)は微小管様局在を示し、実際に微小管(チューブリンでモニター)と共局在し、微小管脱重合剤処理により微小管形成を阻害すると TORC1 の線状集積も消失した。以上のことは、微小管上に TORC1 が局在することを示す。この様に、出芽酵母と分裂酵母とでは DNA ダメージ後に異なる局在移動のパターンを示した。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

上記のデータに今後データを足して論文を作成し、投稿する予定である。

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

本研究を元にした科研費申請を予定している。