

# 酵母の冷凍ストレス応答における TOR シグナル経路の役割の解明

井上 善晴

京都大学大学院 農学研究科

## 研究の目的

生物は環境の変化に巧みに適応しながら生存を図っている。生育環境の温度変化や栄養状況の変化は、それに対応したセンサーにより感知され、その環境に適した遺伝子発現や代謝調節が行われる。例えば、生育環境の温度の上昇により熱ショックタンパク質の発現が上昇するが、そのメカニズムについては大腸菌からヒトに至るまで、よく研究が行われている。一方、冷凍も自然界でも実験室環境においても、細胞が最も頻繁に遭遇する環境ストレスの一つであると言える。酵母にとっては、冷凍パン生地など、産業面でも遭遇するストレスである。それにもかかわらず、冷凍ストレス応答に関する研究は、熱（高温）ショックストレスに関するそれと比べ遅れているのが現状である。

筆者は、定常期の酵母が対数生育期の細胞よりも高い冷凍耐性を示すことから、対数生育期と定常期の細胞における違いの一つとして、液胞形態に着目した。通常、対数生育期の酵母は、細胞内に2~3個の断片化した液胞を持つ。これに対し、定常期の細胞では、一つの大きな肥大化した液胞に形態が変化する。そこで、本研究では液胞形態と冷凍耐性との関連性について検討することを目的の一つとした。また、対数生育期と定常期の違いの一つとして、定常期では栄養が枯渇する。真核生物において栄養シグナルを伝達する機構にTOR (target of rapamycin) 経路がある。栄養が十分存在する条件ではTORシグナルは活性化されている。一方、栄養が枯渇するとTOR経路は不活性化される。そこで本研究では、TORシグナル経路と冷凍耐性の関係を明らかにすることを第二の目的とした。

## 方法

冷凍耐性試験：YPD 培地(2% グルコース、1% 酵母エキス、2% ペプトン; pH 5.5) で対数期まで生育させた菌体を滅菌した 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) で洗浄後、同バッファーに懸濁し、1.5 ml 容エッペンドルフチューブに分注して-30°C のフリーザーで1~3日凍結した。その後、25°C、20分間ヒートブロックにて解冻し、滅菌した生理食塩水で菌体懸濁液を希釈後、YPD 寒天培地にプレーティングした。28°C で数日間培養してコロニーを形成させ、凍結前のサンプルと生存率を比較した。

## 結果

### 1. Vps34 と冷凍耐性

定常期の酵母細胞の形態学的な特徴の一つに、液胞の肥大化がある。そこで、液

胞形態の変異株のうち、対数生育期においても肥大化した液胞を持つ class D に分類される各種変異株 (*vps8Δ*、*vps9Δ*、*vps15Δ*、*vps34Δ*、*vps45Δ*、*fab1Δ*、*vac14Δ*) について、冷凍耐性試験を行った。その結果、液胞が肥大化した細胞が必ずしも全て冷凍耐性を獲得するわけではなかったものの、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼである Vps34 と、その制御因子である Vps15 の欠損株では、対数生育期においても有意に高い冷凍耐性を示した。

そこで、Vps34 の脂質キナーゼ活性が冷凍耐性の獲得に必要なかどうかを確かめるため、脂質キナーゼ活性が低下した Vps34<sup>N736K</sup> 変異株<sup>1)</sup>を用いて解析を行った。その結果、*vps34Δ*株にベクターを導入した株は高い冷凍耐性を獲得したままであるのに対し、野生型 *VPS34* 遺伝子を戻した株では冷凍耐性を失った。Vps34<sup>N736K</sup> 変異体では高い冷凍耐性を維持したままであったこと、また Vps34 の反応によって生じるホスファチジルイノシトール-3-リン酸(PI3P)をホスファチジルイノシトール-3,5-ビスリン酸にする Fab1 の欠損株は冷凍耐性を示さないことから、冷凍耐性の獲得には PI3P が関与していると考えられた。

## 2. TOR シグナル伝達機構と冷凍耐性

定常期における環境変化の一つとして、細胞内外の栄養分の減少(枯渇)が挙げられる。そこで、栄養培地で培養している対数生育期の細胞を、炭素源や窒素源を枯渇させた培地に移した後の冷凍耐性を比較した。その結果、いずれの栄養源の枯渇においても冷凍耐性が獲得された。

真核生物において保存されている栄養シグナル伝達経路に TOR シグナルがある。TOR は Ser/Thr キナーゼであり、細胞内では機能が異なる 2 種類の TOR 複合体 (TORC1 と TORC2) を形成する。これらのうち、栄養シグナルを伝える TOR 複合体は TORC1 であり、栄養が十分に存在する条件では TORC1 は活性化しており下流にシグナルを伝達するが、栄養が枯渇すると不活性化される。TORC1 の阻害剤としてラパマイシンが知られている。そこで、培地中に栄養が十分量存在する対数生育期の培養液にラパマイシンを添加した後、細胞の冷凍ストレス耐性を比較した。その結果、ラパマイシン処理細胞は、非常に高い冷凍耐性を獲得した。これらのことから、TOR シグナル伝達経路の阻害が、冷凍耐性の獲得に関与していると考えられた。

## 3. Vps34 と TORC1 の機能的相関性

Vps34 欠損も TORC1 の機能不全も、ともに冷凍耐性という共通した表現型を与えたことから、両者には機能的な相関性が存在する可能性が考えられた。そこで、Vps34 の欠損が TORC1 のキナーゼ活性に及ぼす影響を調べるため、TORC1 の基質である Sch9 のリン酸化状態を検討した。その結果、Vps34 欠損株では Sch9 は脱リン酸化状態であった。従って、Vps34 は TOR キナーゼの活性化に関与することが示唆された。

TORC1 の活性化経路には、低分子量 G タンパク質 Gtr1 が関与する経路と、PI3P 結合ドメイン (FYVE ドメイン) を持つ液胞膜結合タンパク質 Pib2 が関与する 2 つの経路がこれまでに明らかにされている<sup>2)</sup>。そこで、Gtr1 ならびに Pib2 欠損株の冷凍耐性を検討した。その結果、*pib2*Δ株は冷凍耐性を示さなかったのに対し、*gtr1*Δ株は冷凍耐性を示した。しかしながら、*gtr1*Δ株は *vps34*Δ株ほどの強い冷凍耐性は示さなかった。

## 結論

酵母において Vps34 は PI3P を介して TORC1 活性の制御に関与し、TORC1 は冷凍耐性を負に制御している。冷凍耐性に関与する TORC1 の機能制御には、Pib2 とは異なる経路が関与している可能性が示唆される。

## 文献

- 1) Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Oshumi, Y. (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complex function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152, 519-530
- 2) Tanigawa, M., and Maeda, T. (2017) An *in vitro* TORC1 kinase assay that recapitulates the Gtr-independent glutamine-responsive TORC1 activation mechanism on yeast vacuoles. *Mol. Cell. Biol.* 37: e00075-17.