



ラパマイシン標的タンパクmTORを介した細胞内情報伝達系の研究（研究）

米澤，一仁

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 18:93-96

(Issue Date)

2002-08

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81007749>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007749>



研究——

ラパマイシン標的タンパク mTOR を介した 細胞内情報伝達系の研究

神戸大学バイオシグナル研究センター 米 澤 一 仁 (56年卒)

I インスリンによる蛋白合成促進作用 と免疫抑制剤ラパマイシン

インスリンによって、蛋白質の合成が促進されることは以前より知られていた。インスリンの下流にあって、蛋白合成を司るシグナル伝達分子として p 70 S6 キナーゼ（以下、p 70 と略す）（図 1）と翻訳開始因子 eIF-4 E に結合する蛋白質 eIF 4 E-binding protein 1（以下、4 E-BP 1 と略す）（図 2）がある。p 70 は、インスリン刺激をうけると、複数の部位にリン酸化を受け活性化され、リボゾーム 40 S サブユニットに存在する S 6 蛋白をリン酸化するセリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素である⁽¹⁾。一方、4 E-BP 1 は、翻訳開始因子 eIF-4 E と結合しているが、インスリン刺激をうけると、複数の部位にリン酸化を受け、eIF 4

E と解離することにより、mRNA 翻訳の開始にかかわるシグナル伝達分子である⁽¹⁾。

さて、ラパマイシンは、マクロライド系の抗生物質の 1 種であるが、生体に投与すると、T 細胞の増殖を抑制し、免疫抑制効果を発揮することが知られている。この免疫抑制剤であるラパマイシンで細胞を処理してからインスリン刺激をうけると、p 70 は脱リン酸化を受け、活性化されなくなり、4 E-BP 1 も、脱リン酸化を受け、eIF-4 E と結合し、翻訳の開始を抑制する⁽¹⁾。このように、ラパマイシンが翻訳に関連するシグナル伝達因子群を脱リン酸化し、翻訳を抑制することが明らかとなったが、その詳細な分子メカニズムは謎のままであった。

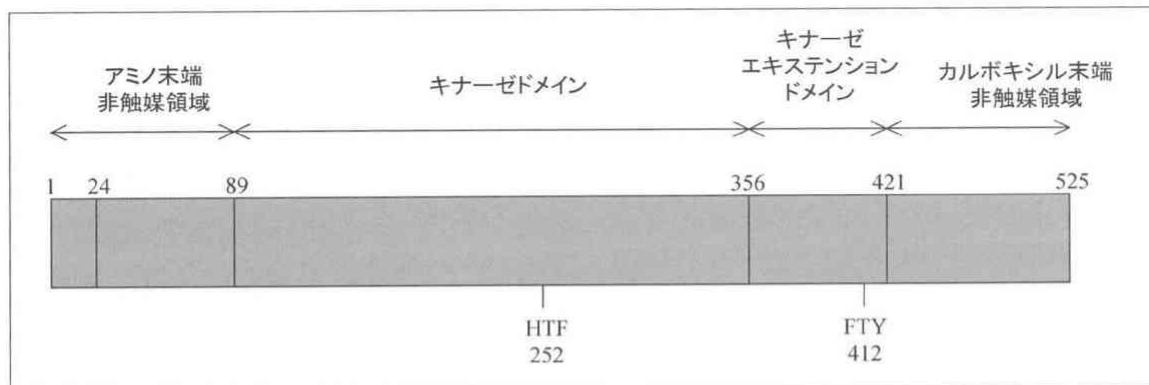


図1 p 70 S 6 キナーゼ (p 70 α 1) の構造とリン酸化部位

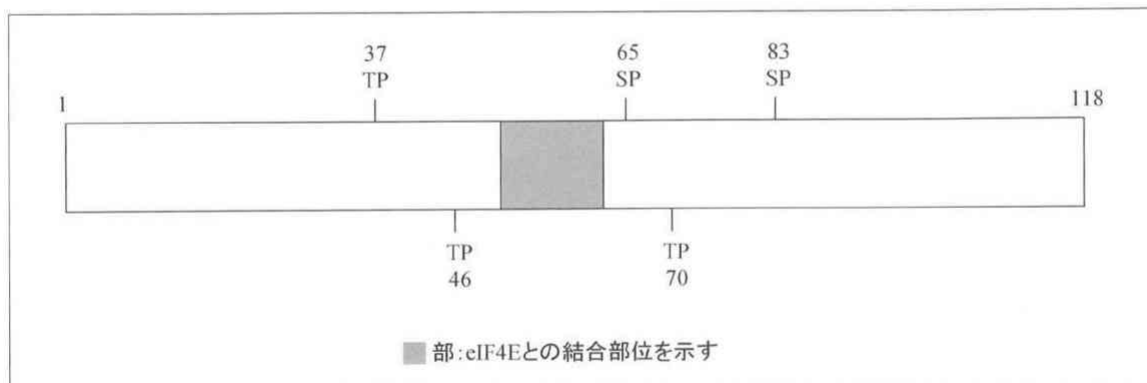


図2 eIF 4 E-binding protein の構造とリン酸化部位

II ラパマイシン標的蛋白質 mTOR の発見

ラパマイシンは細胞膜を透過すると、FK 506 結合蛋白質12（以下、FKBP 12と略す）と結合して、複合体を形成する。このラパマイシン - FKBP 12 複合体の細胞内標的蛋白質が探索され、mammalian target of rapamycin (mTOR) (図3) が同定された¹⁾。mTOR は分子量約 290 kDa の巨大蛋白質で、そのC末端に lipid kinase に似た kinase domain をもつセリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素である。N末端には、Heat repeat と呼ばれる構造、kinase domain を挟むように FAT および FATC domain、そして kinase domain のすぐN末端側にはラパマイシン - FKBP 12 複合体が結合する FRB domain が存在する。ラパマイシン - FKBP 12 複合体が FRB domain に結合すると mTOR キナーゼ活性化が抑制されることが知られている。最近、我々も含めた複数のグループにより、この mTOR 蛋白質が、p 70 と 4 E - BP 1 の上流に存在する分子であり、これら翻訳に関連するシグナル伝達因子群のリン酸化の制御にかかわっていることが明らかになってきた^{2,3)}。

III mTOR シグナル伝達系とアミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸ロイシンとの関連

mTOR を活性化する上流のシグナルは何であろうか？ p 70 および 4 E - BP 1 と同じようにインスリンなどの細胞増殖因子からのシグナルであろうか？その答えは、意外な事に細胞培養液中のアミノ酸成分であった⁴⁾。細胞培養液には、通常、アミノ酸成分・グルコース・ビタミン類などが含まれている。Hek 293 細胞や CHO 細胞を使って、血清非存在下に、通常の細胞培養液を phosphate buffered saline (PBS) に変更し、p 70 活性の時間経過を観察すると、PBS に変更して30分で p 70 の活性はほぼ0にまで低下する。ここに Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に含まれるアミノ酸と同等のアミノ酸を加えると、p70活性は30分ではば元の活性まで回復する。この現象は、グルコース・ビタミン類の再添加では観察されない。このアミノ酸による同様の活性化現象は、4 E - BP 1 のリン

酸化においても観察された。即ち、4 E - BP 1 は、アミノ酸の除去により脱リン酸化をうけ、アミノ酸の添加によりリン酸化をうける⁴⁾。

このアミノ酸による p 70 の活性化そして 4 E - BP 1 のリン酸化はラパマイシンの添加により抑制される。この実験結果より間接的ではあるが、アミノ酸から p 70 あるいは 4 E - BP 1 へのシグナル伝達の際に mTOR が存在していることが示された⁵⁾。

さて、アミノ酸は20種類存在するが、どのアミノ酸が mTOR シグナル伝達系の活性化に重要な役割を果たしているのだろうか。これは、活性化に用いた DMEM からアミノ酸を1種類ずつ取り除いた溶液を準備し、細胞を処理し、p 70 の活性を測定する事で解析が試みられた。その結果、分岐鎖アミノ酸のロイシンを取り除いた時に、たとえ他のアミノ酸が含まれていても、p 70 活性が劇的に低下するということから、分岐鎖アミノ酸のロイシンの重要性が明らかとなった⁶⁾。しかしながら、HEK 293 や CHO 細胞ではロイシンを単独で加えても、p 70 の活性化は観察されない。ただし、ラット肝癌細胞である H 4 IIE 細胞を用いると、ロイシンの単独添加でも p 70 の活性化が観察できる⁶⁾。

この系を用いる事によって、ロイシンの構造のどの部分が大切であるかの検討が可能となった。ロイシンには市販で様々な誘導体が存在しており、それらを用いて p 70 の活性化を検討した。その結果、a) ロイシンの側鎖構造は必要、b) ロイシンのアミノ基が必要、c) ロイシンの光学異性性 (L 体) が重要、d) ロイシンのカルボキシル基は重要な要素ではないという事が判明した⁶⁾。

IV アミノ酸 - mTOR シグナル伝達系とインスリンシグナル伝達系とのクロストーク

まず、p 70 が mTOR キナーゼの基質になる可能性を検討した。FLAG-tagged p 70 cDNA を HEK 293 細胞に transfection し、細胞回収前にラパマイシンで処理することにより、脱リン酸化された p 70 を調整し、これを基質に用いた、mTOR キナーゼを特異的モノ

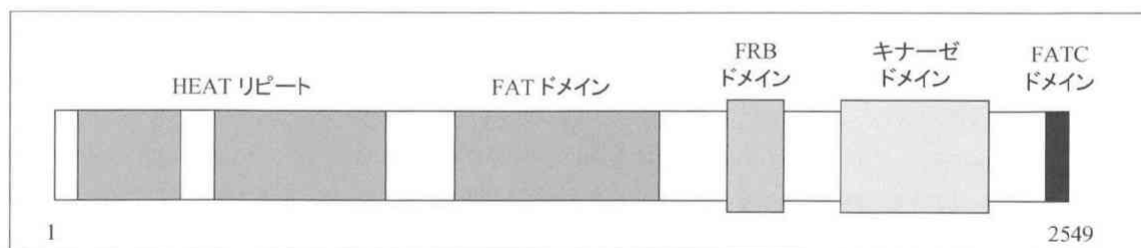


図3 mTOR の構造

クロナル抗体で、かつ FLAG-tagged p 70 を抗 FLAG 抗体で別々の細胞より同じプロテイン G セファロースビーズ上に免疫沈降し、p 70 のリン酸化を³²P および部位特異的リン酸化抗体でモニターした。この結果、p 70 は時間依存性に mTOR キナーゼによりリン酸化された。p 70 のキナーゼエクステンションと呼ばれる部位に存在する412番のスレオニンは、*in vivo* で p 70 活性と密接に連動することが報告されている。mTOR キナーゼとのインキュベーションにより、p 70 のスレオニン412のリン酸化が時間依存性に増加することが明らかとなった。同時にこの mTOR による p 70 のリン酸化が、p 70 活性の上昇を時間依存性に惹起することも明らかとなった⁶⁾。

さて、従来より、p 70 のリン酸化・活性化にはインスリン等の細胞増殖因子からのシグナルが最も重要視されていた。特に細胞増殖因子受容体にカップリングするホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（以下、PI3-キナーゼと略す）によって活性化される下流の蛋白質キナーゼである3-ホスフォイノシタイド依存性蛋白キナーゼ1 (PKD1) による p 70 のキナーゼドメインの触媒ループ上のスレオニン252のリン酸化が、p 70 の活性調節に重要であることが明らかとなっていた¹⁾。

しかしながら、我々はこの細胞増殖因子による p 70 の活性化に、アミノ酸-mTOR キナーゼからのシグナルインプットが必要不可欠であることを見いだした。図4に示すように横軸にアミノ酸濃度、縦軸に p 70 活性をとり、アミノ酸濃度依存曲線を描くと、ア

ミノ酸濃度依存性に p 70 の活性が上昇していくことがわかる。これにインスリンを添加すると、各アミノ酸濃度での p 70 の活性は、さらに上昇し、グラフは全体として左方に移動する。ここにおいて重要な点は、細胞外液中にアミノ酸が全く存在しない状況下では、インスリンを加えても p 70 の活性の上昇は全く観察されないということである。つまり、p 70 においてはアミノ酸-mTOR からのシグナルインプットが細胞増殖因子のインプットを受け入れるためのスイッチになっているということである。言い換えれば、アミノ酸-mTOR からのシグナルインプットが、“priming シグナル”になっているという事ができる⁴⁾。

我々はこの予想を見事に *in vitro* で再現することに成功した。即ち、不活性化された p 70 を mTOR そして PDK1 と sequential にリン酸化することにより p 70 活性を100倍以上上昇させることに成功した。この活性上昇は、細胞を10%胎児牛血清で刺激した後に、免疫沈降した p 70 活性と同等度あるいはそれ以上のもので、*in vivo* での活性化を *in vitro* で再現できたといえる^{6,7)}。

以上の結果をまとめると図5のようなシグナル伝達経路が考えられる。即ち、細胞外液のアミノ酸バランスを感知した mTOR が、p 70 のスレオニン412番をリン酸化すると同時に、細胞増殖因子によって活性化された PDK1 が p 70 のキナーゼドメインの触媒ループにあるスレオニン252番をリン酸化し p 70 を活性化へと導くという考え方である。

4E-BP1においては、*in vitro* および *in vivo* で5

つのリン酸化部位が知られており、そのうちスレオニン37番とスレオニン46番が mTOR によってリン酸化されるといわれている⁸⁾。このリン酸化が、いわゆる“priming シグナル”になって他の酵素による残りの3つの部位セリン65番、スレオニン70番、セリン83番のリン酸化を誘導すると考えられているが、インスリンなどの細胞増殖因子系のシグナルとの関連はいまだに議論のあるところである。

V mTOR 免疫沈降物に含まれるキナーゼ活性

通常、一般的なキナーゼは、ある特定のモチーフをリン酸化することでその基質特異性が決定され

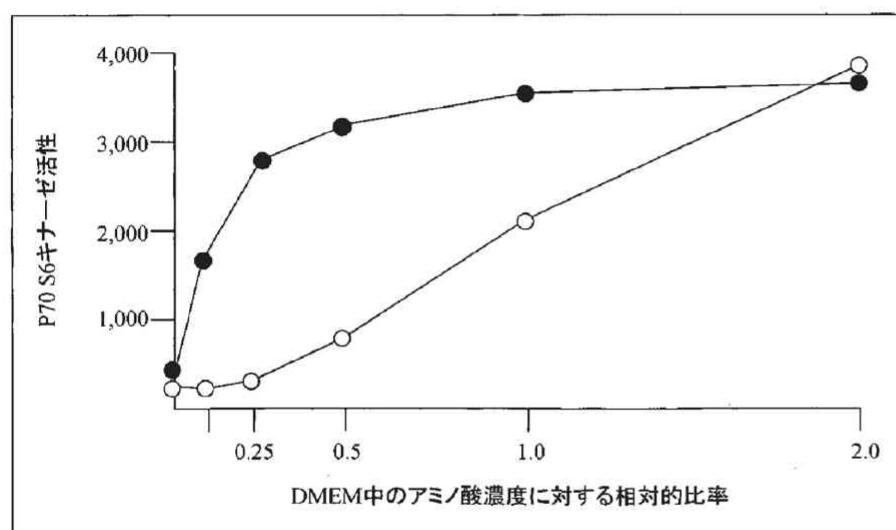


図4 p 70 S6 キナーゼ活性のアミノ酸濃度依存性曲線とそれに対するインスリンの効果

繊維芽細胞をアミノ酸を添加した PBS (○: アミノ酸)、あるいはアミノ酸添加 PBS に 10^{-7} M インスリンを加えたもの (●: アミノ酸+インスリン) で処理後、p 70 S6 キナーゼ活性を測定した。

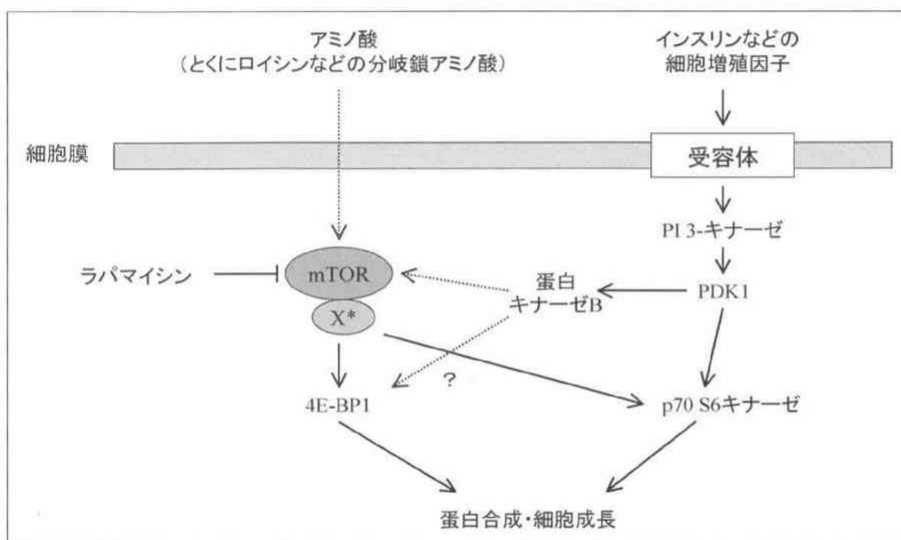


図5 アミノ酸-mTORのシグナル伝達系と細胞増殖因子のシグナル伝達系のクロストーク

*はmTORに結合する未知の因子を示す

ている。しかしながらmTORキナーゼの場合、その免疫沈降物を用いた実験では、p70においてはPhe-Thr-Tyrという疎水性のモチーフを、4E-BP1においてはSer/Thr-ProといったいわゆるProが後に続くモチーフを主としてリン酸化する。1つのキナーゼがこれほど違うモチーフをリン酸化するというのは、非常に珍しい例である。加えて、mTOR免疫沈降物に含まれるこの2つのリン酸化活性はCHAPSやNP-4といった界面活性剤に対する感受性が大きく異なっている。即ち、p70のPhe-Thr-Tyrという疎水性のモチーフをリン酸化する活性は、界面活性剤処理に対して抵抗性であるが、4E-BP1におけるSer/Thr-Proモチーフのリン酸化活性は、mTOR免疫沈降物の界面活性剤処理により、完全に消失してしまう。これらの実験結果より、我々は、mTOR免疫沈降物中に界面活性剤に感受性を持ち、4E-BP1のSer/Thr-Proモチーフのリン酸化に深く関与する分子の存在を考え、現在探索中である。

VI 結語

以上のような研究結果から、アミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸のロイシンがmTORキナーゼを活性化し、その下流のp70・4E-BP1といった翻訳関連シグナル伝達分子群をリン酸化・活性化し、蛋白合成に繋がって行くというシグナル伝達機構が考えられる。mTORキナーゼを中心としたこの分野の研究は、細胞成長といった視点からも興味をもたれつつあり、生物一般のシグナル伝達系として非常に重要と考えられ、今後の発展が期待されている。

References

- 1) Avruch, J., Belham, C., Weng, Q.-P., Hara, K., and Yonezawa, K. (2001). The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. In *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, R. E. Rhoads, ed. (Berlin Heidelberg), pp. 115-154.
- 2) Brown, E. J., Beal, P. A., Keith, C. T., Chen, J., Shin, T. B., and Schreiber, S. L. (1995). Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 377, 441-446.
- 3) Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., Kasuga, M., Nishimoto, I., and Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4 E BP 1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 272, 26457-26463.
- 4) Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4 E BP 1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 273, 14484-14494.
- 5) Shigemitsu, K., Tsujishita, Y., Miyake, H., Hidayat, S., Tanaka, N., Hara, K., and Yonezawa, K. (1999). Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 447, 303-306.
- 6) Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J., and Yonezawa, K. (1999). Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J Biol Chem* 274, 34493-34498.
- 7) Minami, T., Hara, K., Oshiro, N., Ueoku, S., Yoshino, K., Tokunaga, C., Shirai, Y., Saito, N., Gout, I., and Yonezawa, K. (2001). Distinct regulatory mechanism for p70 S6 kinase b from that for p70 S6 kinase a. *Genes Cells* 6, 1003-1015.
- 8) Gingras, A.-C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP 1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13, 1422-1437.