



Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of Rapamycin-induced inhibition of mTOR function

大城, 紀子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2969

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002969>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 9 】

氏 名・(本 籍) 大城 紀子 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博い第1579号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function
(ラパマイシンは、mTOR と raptorの結合を抑制することにより mTOR の機能を阻害する)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊介
教 授 齋藤 尚亮
教 授 横野 浩一

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a Ser/Thr protein kinase that plays a crucial role in a nutrient-sensitive signaling pathway that regulates cell growth. TOR signaling is potently inhibited by rapamycin, through the direct binding of a FKBP12/rapamycin complex to the TOR FRB domain, a segment aminoterminal to the kinase catalytic domain. The molecular mechanisms by which the binding of the FKBP12/rapamycin complex to the TOR FRB domain interferes with TOR signaling remain incompletely understood. In mammalian cells, rapamycin induces dephosphorylation of the translational regulators, p70 S6 kinase (p70S6k) and eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein 1 (4E-BP1). Rapamycin inhibits p70S6k activity and 4E-BP1 phosphorylation *in vivo* with an IC50 of 2-5 nM. The addition *in vitro* of rapamycin to mTOR in the presence of excess of FKBP12 does result in inhibition of the mTOR kinase activity toward p70S6k or 4E-BP1, however nearly one hundred fold higher concentration of rapamycin is required than is necessary for inhibition *in vivo*. Moreover, the phosphorylation *in vivo* of mTOR Ser2481, a site of mTOR-catalyzed autophosphorylation *in vitro*, is not affected by treatment of cells with rapamycin. These findings suggest that primary mechanism by which rapamycin interferes with mTOR function *in vivo* is other than through the inhibition of mTOR's intrinsic kinase catalytic activity.

Raptor (regulatory associated protein of mTOR) is a recently identified mTOR binding partner that is essential for mTOR signaling *in vivo*, and whose binding to mTOR is critical for mTOR-catalyzed substrate phosphorylation *in vitro*. Raptor serves as a scaffold for the apposition of mTOR with its substrates 4E-BP1 and p70S6k. Raptor does not alter the catalytic activity of mTOR; rather, raptor binds p70S6k and to 4E-BP1 and the association of raptor with mTOR increases mTOR phosphorylation of p70S6k *in vitro* four to five fold and is required absolutely for the mTOR-catalyzed phosphorylation of 4E-BP1 *in vitro*.

Here we characterized the effects of rapamycin on the stability of the mTOR/raptor

complex. The association between raptor and mTOR was severely diminished in rapamycin-treated cells. The inhibitory effect of rapamycin on the association between raptor and ST-mTOR, which lacks the ability to bind to the FKBP12/rapamycin complex, was not observed. Thus the ability of rapamycin to inhibit the association of raptor with mTOR depends on the ability of mTOR to bind the FKBP12/rapamycin complex. The binding of raptor to mTOR is critical for the mTOR-catalyzed phosphorylation of 4E-BP1 and p70S6k *in vitro*. We therefore treated cells with various concentrations of rapamycin *in vivo*, immunoprecipitated the mTOR complex, and examined the binding of raptor to mTOR and the mTOR-catalyzed phosphorylation of p70S6k and 4E-BP1. The recovery of raptor with mTOR decreased progressively as the concentration of rapamycin was increased, accompanied by a progressive reduction in mTOR-catalyzed phosphorylation of GST-p70S6k *in vitro*. Similar results were observed when GST-4E-BP1 was employed as substrate. Notably, at no concentration of rapamycin was an inhibition of mTOR autophosphorylation evident. We next inquired whether incubation of FKBP12/rapamycin with mTOR complex *in vitro* is sufficient to promote the dissociation of raptor from mTOR. Rapamycin, in the presence of FKBP12, inhibited the association of raptor with mTOR directly *in vitro*, and concomitantly reduced the mTOR-catalyzed phosphorylation of raptor-dependent, but not raptor-independent substrates; mTOR autophosphorylation was unaltered. These observations indicate that rapamycin inhibits mTOR function, at least in part, by inhibiting the interaction of raptor with mTOR; this action uncouples mTOR from its substrates, and inhibits mTOR signaling without altering mTOR's intrinsic catalytic activity.

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|------------|--|----|------|
| 受付番号 | 甲第1598号 | 氏名 | 大城紀子 |
| 論文題目 | Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function ラパマイシンは、mTORとraptorの結合を抑制することによりmTORの機能を阻害する | | |
| 審査委員 | 主査 中村俊一 副査 斎藤尚亮 副査 横野浩一 | | |
| 審査終了日 | 平成16年 2月 20日 | | |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

mTOR (mammalian target of rapamycin)は、免疫抑制剤、抗癌剤、そして狭心症治療後の冠動脈再狭窄抑制剤として注目されるマクロライド系抗生剤に属する有機化合物rapamycinの細胞内標的蛋白質として同定されたSer/Thr kinaseである。mTORは、細胞をとりまく栄養環境の変化、すなわちアミノ酸濃度の変化を感知して下流の分子であるp70 S6 kinase (p70S6k) や eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) をリン酸化し、蛋白質合成を制御すると考えられている。蛋白質のリン酸化は、細胞内情報伝達や蛋白質の機能制御において重要な役割を担っており、蛋白質リン酸化酵素の活性制御機構を解明することは必須の課題であると考えられる。現在までのmTORの生理機能に関する知見は、多くの場合mTORの阻害剤であるrapamycinを用いた解析から得られている。Rapamycinは、細胞内でFKBP12と複合体を形成し、この複合体がmTORのFRB domainに結合することによりmTORの機能を阻害する。しかし、rapamycinがどのような機序でmTORの機能を阻害するのかについては明らかになっていなかった。一昨年、本研究者らは、mTORと複合体を形成する新規蛋白質としてraptor (regulatory associated protein of mTOR)を同定した。Raptorは、mTORの基質であるp70S6k、4E-BP1とmTORの両方に結合し、mTORが基質を効率よくリン酸化するための足場を提供するスキャフォールド蛋白質として機能している。

そこで、本研究者らは、rapamycinによるmTOR阻害機構を明らかにすることを目的とし、mTORとraptorの相互作用に注目して解析を行ったところ、以下のような実験結果が得られた。

1) *In vivo*におけるmTORとraptorの結合は、培地中のアミノ酸の有無によっては変動しなかったが、細胞をrapamycinで処理するこ

とにより著しく阻害された。

2) FKBP12/rapamycin が結合することができない mTOR 変異体と raptor の結合は、rapamycin 処理によって抑制されなかった。

3) rapamycin 処理により raptor との結合が阻害された mTOR は、下流の分子である p70S6k および 4E-BP1 に対するリン酸化活性が抑制された。

4) *In vitro* においても、FKBP12/rapamycin は直接 mTOR と raptor の解離を引き起こした。

5) wild type の p70S6k (p70S6k-WT) と、raptor と結合できない p70S6k 変異体 (p70S6k-F28A) を基質として *in vitro* リン酸化 assay を行ったところ、FKBP12/rapamycin は、mTOR の p70S6k-WT に対するリン酸化活性を抑制したが、p70S6k-F28A に対するリン酸化は抑制しなかった。つまり、FKBP12/rapamycin は、raptor 依存性のリン酸化のみを抑制した。

これらの研究結果より、rapamycin は、mTOR の触媒活性を直接抑制するのではなく、mTOR と raptor の結合、すなわち mTOR が効率よく基質をリン酸化するための足場の形成を阻害することにより、mTOR の機能を抑制していることが示唆された。

以上、本研究は、rapamycin による mTOR 機能の阻害機序について、その分子機序を研究したものであるが、mTOR 結合蛋白質 raptor に対する rapamycin の作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認められる。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。