



mTORシグナル伝達系と細胞成長

江口, 賢史

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2006-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3736

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003736>

※ 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。



【 2 8 0 】

氏 名・（本 籍） 江口 賢史 （ 岡山県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

学 位 記 番 号 博い第319号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年9月25日

【 学位論文題目 】

mTORシグナル伝達系と細胞成長

審 査 委 員

主 査 教 授 前川 昌平

教 授 吉川 潮

教 授 小野 功貴

mTOR は細胞を取り巻く栄養環境の変化、特にアミノ酸をシグナルとして感知し、翻訳開始因子 eIF4E 結合タンパク質である 4E-BP1 および 40S リボソームを構成する S6 タンパク質のリン酸化酵素である S6K をリン酸化し、翻訳開始を調節する事により細胞成長を制御する事が知られている。また、ラパマイシンは TOR 特異的阻害剤としてこれらの翻訳制御分子のリン酸化を抑制する。近年、mTOR 結合タンパク質として同定された raptor は scaffold タンパク質として 4E-BP1 や S6K と結合し、mTOR がこれらの基質を効率よくリン酸化する上で重要な分子である事が明らかになった。これまでに、ショウジョウバエにおいて成長因子シグナル経路の遺伝子である *dinr*、*dIRS-1*、*dPI3k*、*dAkt* 等を欠損させると細胞のサイズおよび細胞の数が減少するのに対し、TOR の下流分子である *dS6k* 遺伝子を欠損させると細胞数は変化せず細胞サイズのみが減少する事が報告されている。また、哺乳類においてはラパマイシンによる mTOR シグナル経路の阻害は U2O2 骨肉種細胞や HEK293T 細胞において細胞サイズの減少を引き起し、マウス ES 細胞においても mTOR のコンディショナルノックアウトにより細胞サイズの減少が引き起こされる事が報告されている。これらの結果は TOR シグナル伝達系が特異的に細胞サイズの制御に関与する事を示唆している。

4E-BP1 は eIF4E と結合し、eIF4G 等の他の翻訳開始因子との複合体形成を抑制しており、mTOR による 4E-BP1 のリン酸化によって eIF4E から 4E-BP1 が解離しタンパク合成が促進される。これまでに 4E-BP1 には主要なリン酸化部位として (Thr37、Thr46、Ser65、Thr70、Ser83) のリン酸化部位が同定されており、まず Thr37、Thr46 がリン酸化され、続いて Thr70、Ser83、最後に Ser65 の順にリン酸化される。また、Ser83 のリン酸化については eIF4E の解離には重要ではないとの報告があるが、Ser83 のリン酸化の意義及びこの部位のリン酸化を担う酵素については明らかになっていない。さらに、Thr37、Thr46 を Ala に置換した変異体は残りの部位がリン酸化されないことから Thr37 および Thr46 のリン酸化は他の部位の連続的なリン酸化に必要なプライミングサイトであることが明らかになっている。近年、4E-BP1 上に TOS と RAIP の 2 種類のモチーフが同定された。TOS モチーフは S6K の ortholog と 4E-BP1 の isoform 間の相同性のある配列から同定された 5 つのアミノ酸残基から構成されており、raptor との結合を仲介し、mTOR による基質のリン酸化に重要である事が示されている。それに対し、RAIP モチーフはカスパーゼが触媒する切断により生成されたアミノ末端を欠く 4E-BP1 においてはインスリンの下流におけるリン酸化が低下する事から同定された 4 つのアミノ酸残基からなる配列である。しかし、RAIP モチーフの raptor との結合における役割については相反する報告が行われており、その機能

については不明な点が多い。本研究では、これら TOS および RAIP モチーフの変異体を用いて 4E-BP1 のリン酸化に対する 2 つのモチーフの役割を検討するとともに、4E-BP1 による細胞サイズの制御の解明を目的として解析を行った。

始めに mTOR による 4E-BP1 のリン酸化に対して、モチーフの変異がどのような影響を与えるかについて検討するため、大腸菌から精製したモチーフ変異体を基質として *in vitro* リン酸化アッセイを行った。TOS モチーフ変異体は mTOR によってプライミングサイトである Thr37、Thr46 のみがリン酸化されるが、RAIP モチーフ変異体は野生型と同様にプライミングサイトのみならず Thr70 もリン酸化される事を見出した。続いて、モチーフ変異体を HEK293 細胞に過剰発現させアミノ酸刺激やラパマイシン処理を行う事により mTOR による 4E-BP1 の *in vivo* リン酸化を解析した。モチーフ変異体は野生型と異なりアミノ酸非存在下では Thr37、Thr46 のリン酸化が検出されなかったが、アミノ酸刺激により Thr37、Thr46 がリン酸化されラパマイシンにより抑制された。この結果から 4E-BP1 の Thr37、Thr46 は mTOR によってリン酸化されている事が示唆された。また、*in vivo* においても *in vitro* の結果と同様に RAIP モチーフ変異体では mTOR によって 4E-BP1 の Thr70 がリン酸化されるのに対し TOS モチーフ変異体ではリン酸化されない事が明らかとなった。これらの結果から 2 つのモチーフ変異体はアフィニティーの違いはあるものの、依然として raptor と相互作用をしており mTOR によってリン酸化される事が示唆された。これらのモチーフを介した 4E-BP1 のリン酸化の違いが細胞サイズの制御に影響を及ぼすかに関してさらに解析を行った。RAIP モチーフ変異体の発現は野生型に比べ細胞サイズに影響を与えず、TOS モチーフ変異体は細胞サイズの減少をもたらす事が示された。以上の結果から TOS、RAIP モチーフは 4E-BP1 のリン酸化に対するそれぞれ役割が異なり、モチーフの変異によるリン酸化の違いが細胞サイズの減少を引き起こす事が明らかとなった。

次に 4E-BP1 のリン酸化部位変異体を用いて raptor および eIF4E との結合を解析した。始めに 5 つのリン酸化部位を Ala もしくは Glu に置換した変異体を用いて raptor および eIF4E との結合を検討した。4E-BP1-5A 変異体では raptor および eIF4E と強く結合したのに対し、4E-BP1-5E 変異体では結合が観察されなかった。この結果から 4E-BP1 のリン酸が raptor および eIF4E との結合を制御している事が明らかとなった。また、4E-BP1-37/46/83E-65/70A 変異体では raptor および eIF4E と結合した事からプライミングサイトがリン酸化されるだけでは解離には不十分であり、更なるリン酸化が必要である事を示している。これに対し、4E-BP1-37/46/70/83E-65A 変異体では raptor および eIF4E との解離が観察され

(氏名： 江口 賢史 NO.4)

Thr70 のリン酸化が鍵となっている事が示唆された。一方、4E-BP1-70/83E-37/46/65A 変異体は raptor および eIF4E と強く結合していた。これらの結果から Thr70 のリン酸化のみでは 4E-BP1 と raptor および eIF4E の解離に不十分であり、Thr37、46 および Thr70 のリン酸が必要である事が明らかとなった。さらにリン酸化部位変異体を用いて細胞サイズに対する影響を検討した結果、eIF4E や raptor と解離する変異体の発現は細胞のサイズに影響を与えず、解離できない変異体は細胞サイズの減少をもたらす事が示された。

以上の結果から mTOR による TOS モチーフを介した 4E-BP1 の Thr37、Thr46 および Thr70 のリン酸化は raptor および eIF4E との解離に必要不可欠であり、mTOR は 4E-BP1 リン酸化を介した eIF4E による翻訳制御により細胞サイズを制御している事が明らかとなった。近年、ラパマイシンは免疫抑制作用のみならず抗がん作用を有する事が報告されているが、ラパマイシンがどのような機序によりがんを抑制するかについては不明な点が数多く存在した。しかし、本研究において明らかにされた mTOR による eIF4E を介した細胞成長制御機構を阻害する事が、がん細胞の増殖を抑制すると想定される。翻訳制御を介した mTOR による細胞成長制御を明らかにする事が、がん治療における創薬につながる事が期待される。

氏名	江口 賢史		
論文 題目	mTOR シグナル伝達系と細胞成長		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	前 川 昌 平
	副 査	教 授	吉 川 潮
	副 査	教 授	小 野 功 貴
	副 査		
	副 査		印
要 旨			
細胞増殖は生命活動における基本的な現象であり、細胞数の増加（細胞分裂）と細胞サイズの増大（細胞成長）とに分けることができる。従来、両者は明確に区別されることなく、また主として前者（細胞分裂）について研究が行われてきた。しかし、近年、後者についても解析が実施され、細胞成長は多細胞生物において器官や個体の大きさを決定し、またその均衡を維持する重要なプロセスであり、細胞分裂とは異なる制御を受けていると考えられるようになった。細胞成長の調節においては、細胞を取り巻く環境中のアミノ酸が、タンパク合成の原料となるのみならずシグナル分子として作用することが明らかにされている。そして、免疫抑制剤ラパマイシンの細胞内標的タンパク質である mammalian Target of Rapamycin (mTOR) が細胞環境のアミノ酸を感知し、細胞成長を制御するシグナル機構において重要な役割を果たしていることが知られている。mTOR はセリン・トレオニンタンパク質リン酸化酵素であり、細胞のアミノ酸刺激に応じて scaffold タンパク質である raptor を介して翻訳制御タンパク質 4E-BP1（翻訳開始因子 eIF4E 結合タンパク質）をリン酸化する。リン酸化を受けた 4E-BP1 からは eIF4E が遊離され、eIF4E が他の翻訳開始因子群とともに mRNA の 5' cap 構造に結合することが翻訳の開始機序となっていると考えられている。また、mTOR による 4E-BP1 リン酸化反応の亢進はラパマイシンにより阻害される。しかし、mTOR/raptor 複合体による 4E-BP1 の認識ならびに複合体からの 4E-BP1 解離の詳細については不明の点が残されていた。本研究は、4E-BP1 分子内の raptor との結合に関与する 2カ所のモチーフ部位ならびに mTOR によるリン酸化残基を置換した変異体を作成し、mTOR/raptor 複合体による 4E-BP1 の認識の分子機構を検討するとともに、4E-BP1 を介する細胞サイズ調節を明らかにすることを目的とした。なお、本研究では K562 細胞を宿主として 4E-BP1 変異体を高効率に導入し、コールターカウンターを用いた発現細胞の粒子径測定により、細胞サイズの変動を検出する方法を開発し解析に用いた。 これまでの研究により、4E-BP1 分子内には TOS および RAIP と命名される 2カ所のモチーフ構造が存在し、4E-BP1 はこれらのモチーフを介して raptor と会合し mTOR によるリン酸化を受けると考えられてきた。また、4E-BP1 には複数箇所のリン酸化部位が同定され、これらの残基は順次、リン酸化反応を受けることから、第1群 (Thr37、Thr46)、第2群 (Thr70)、第3群 (Ser65) に区別されている。すなわち、まず第1群がリン酸化を受け、これらの残基が修飾を受けた分子が、次いで第2群、さらに第3群のリン酸化を受ける。こういった第1群のみ、第1群および第2群、第1、2、3群の全てがリン酸化を受けた 4E-BP1 分子は、SDS-PAGE 上の移動度が異なる 3種類のバンドとして分離され、またそれぞれのリン酸化部位特異的抗体を用いたイムノブロット法により識別される。 そこで、まずモチーフ部位変異体を用いてそれぞれのモチーフの役割を検討した。野生型ならびにモチーフ部位に変異を導入した 4E-BP1 を glutathione S-transferase 融合タンパク質として構築、精製し、試験管内で HEK293 細胞から免疫沈降した mTOR/raptor 複合体によりリン酸化した。その結果、TOS および RAIP の両モチーフともに変異を受けた 4E-BP1 は野生型タンパク質がリン酸化を受ける条件下でほとんどリン酸化されないことが示された。また、TOS モチーフ変異体は第1群のリン酸化は受けるものの第2群は修飾を受けず、一方、RAIP モチーフ変異体は野生型とほぼ同様に第1群、第2群ともにリン酸化を受けることが明らかとなった。 次に HEK293 細胞にモチーフ部位変異体を発現し、アミノ酸刺激ならびラパマイシン処理によるリン酸化の変動を検討した。野生型 4E-BP1 はアミノ酸非存在下でも第1群がリン酸化を受けており、アミノ酸刺激により第1群のリン酸化亢進と第2群以降の修飾反応が誘導され、これらのリン酸化の増加はラパマイシン処理により阻害された。これに対して、両モチーフ部位変異体では基底状態の第1群のリン酸化が検出されず、また細胞刺激によってもリン酸化の誘導は観察されなかった。TOS モチーフおよび RAIP モチーフの単独変異体においても非刺激状態でのリン酸化はほとんど検出されなかったが、アミノ酸刺激により第1群のリン酸化が誘導され、この亢進はラパマイシン処理により阻害された。なお、RAIP モチーフ変異体では細胞刺激により第1群に加えて第2群もリン酸化が誘導されていることが示唆された。従って、両モチーフとも mTOR/raptor			

氏名	江口 賢史
複合体との会合に関わるもののそれぞれの機能は異なり、TOS モチーフは複合体による 4E・BP1 分子の認識に必須であるのに対して、RAIP モチーフの役割は副次的なものであると推定される。 また、モチーフ部位変異体を K562 細胞に発現し細胞サイズへの影響を検討したところ、両モチーフ部位変異体や TOS モチーフ変異体の発現細胞では有意なサイズの減少が観察されたが、RAIP モチーフ変異体の発現は細胞サイズにほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、4E・BP1 分子内の 2 つのモチーフ部位は mTOR/raptor 複合体との会合に対して異なる役割を持ち、また、両者の比較から第 2 群のリン酸化が細胞サイズの制御に重要であると考えられる。 なお、これまでの検討により、4E・BP1 分子中でリン酸化を受けることが知られている第 1、2、3 群を含む 5 箇所（セリンならびにトレオニン残基）の全てをアラニンに置換することにより脱リン酸化状態を模倣した 5A 変異体は野生型 4E・BP1 よりも強固に raptor と結合し、これに対して 5 箇所を全て酸性残基であるグルタミン酸に置換しリン酸化状態を模倣した 5E 変異体は raptor と結合しないことが明らかにされている。そこで、4E・BP1 の各種のリン酸化部位変異体および raptor にそれぞれ異なるエピトープタグを付加し HEK293 細胞に共発現し、共免疫沈降によりその結合を観察することにより、それぞれのグループのリン酸化の意義を解析した。 まず、第 1 群のみをアラニンに置換した変異体は 5A 変異体と同様に raptor と強く結合し、第 1 群をグルタミン酸に置換し、第 2、3 群をアラニンに置換した変異体も raptor と強固に結合することが示された。従って、4E・BP1 の raptor からの解離には第 1 群のリン酸化が必要であるものの十分ではなく、第 2 群以降の修飾反応も必須であると考えられる。また、第 1、2 群をグルタミン酸に置換し、第 3 群をアラニンに置換した変異体では raptor との結合が検出されず、第 2 群のみをグルタミン酸に置換し第 1、3 群をアラニンに置換した変異体は raptor と強く結合することが示された。これらの結果から、4E・BP1 と raptor の解離には第 1 群と引き続く第 2 群のリン酸化が重要な役割を果たしていると考えられる。 次に、各種リン酸化部位変異体を発現した HEK293 細胞抽出液と mRNA の 5'cap 構造を模した 7-methyl-GTP Sepharose とをインキュベートし、レジンに結合した内因性 eIF4E ならびに 4E・BP1 変異体のイムノブロット解析により両者の相互作用を検討した。その結果、eIF4E と 4E・BP1 の分離には、raptor からの解離と同様に第 1 群と引き続く第 2 群のリン酸化が必要であることが示された。 そこで、これらのリン酸化部位変異体を K562 細胞に発現し、細胞サイズへの影響を検討した結果、第 1 群と第 2 群のいずれか一方をアラニンに置換した変異体の導入は細胞サイズの減少をもたらし、これに対して raptor および eIF4E のいずれとも結合しない 5E 変異体等の発現細胞ではそのサイズの変化は観察されなかった。 以上のように、本論文は mTOR/raptor 複合体による 4E・BP1 の制御に焦点をあてた検討を行い、従来、その機能が十分に解明されていなかった 4E・BP1 分子内の TOS および RAIP モチーフが mTOR/raptor 複合体との会合に際して異なる役割を担うことを示すとともに、4E・BP1 分子のリン酸化の意義について詳細に解析し、その第 1 群および第 2 群のリン酸化反応が mTOR/raptor 複合体ならびに eIF4E 翻訳開始因子との解離に必須であることを明らかにした。また、本研究において開発した発現細胞のサイズ変動の測定法を用いて、上記のモチーフ部位ならびにリン酸化反応を介した mTOR/raptor 複合体による 4E・BP1 の制御が細胞サイズ調節に関わることを実証している。 本研究は細胞成長制御について、その mTOR シグナル伝達機構による翻訳制御タンパク質 4E・BP1 の役割を研究したものであり、細胞サイズ調節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る。 よって、学位申請者の江口賢史は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。	