

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19596

研究課題名(和文)mTOR栄養シグナルを標的とした老化・がん化制御

研究課題名(英文)Regulation of aging and cancer progression by targeting mTOR nutrient signaling

研究代表者

岡田 雅人(Masato, Okada)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10177058

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):がんの進展を抑制するためには、がん細胞の活発な成長や増殖を支える細胞の栄養シグナルを制御する必要がある。本研究では、細胞の成長や代謝調節の制御を担うシグナル分子mTORC1に注目し、その活性を制御することによりがん進展および細胞老化を抑制する新規薬剤の開発を目指して、mTORC1の活性制御因子の分子構造に基づく制御機構の解明と新たな制御領域の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では、高齢化が進むにつれて医療費などが増大するなど様々な社会問題が生じ、健康寿命の延伸が重要課題となってきた。また、健康寿命の延伸を阻む重大な要因として「がん」の罹患率も上昇し続けている。がんの発症は老化と密接に関わることから、それを抑制するためには、細胞の栄養状態に応じて代謝や細胞増殖、ひいては老化や寿命を調節するシグナル分子をコントロールすることが重要となる。本研究では、栄養シグナル分子mTORの調節機構を分子レベルで解析し、その働きを抑制する新規薬剤の標的候補部位を明らかにした。

研究成果の概要(英文):To suppress tumor progression, it is important to control nutrient signaling that supports active growth and proliferation of cancer cells. In this study, to develop new anti-cancer and/or anti-aging drugs by targeting the nutrient signaling molecule mTORC1, which is a master regulator of cell growth and cellular metabolism, we elucidated the regulatory mechanisms of mTORC1 based on the molecular structures of its regulators and explored new regulatory surfaces that can be accessed by therapeutic drugs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：栄養シグナル 老化 がん化 健康寿命 mTOR シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

平成27年の日本人の平均寿命は男性が80.79歳（世界4位）、女性が87.05歳（世界2位）であり、世界順位は下がったもののまぎれもなく長寿大国である。しかし一方で、がん罹患率や死亡率の上昇や、アルツハイマーなどの認知症患者の増大、さらに、加齢による循環器系の機能不全、運動機能障害、慢性疼痛などなど、高齢者の抱える疾患の絶対量が増え、これらが医療費や介護費用の増大、ひいては国の社会補償費の増大となっている。こういった現状から近年、「健康寿命」（健康上問題がない状態で日常生活を送れる期間）が注目され、限られた人生を充実したものにするためだけでなく、地域さらには国家の「健康寿命」を永遠のものとするためにも、個々人の「健康寿命」を延ばすことが急務となってきている。

そのためには、食事の改善、運動による生活習慣病の予防の重要性が謳われている。しかしながら、生活習慣の改善だけではある程度の予防は期待できるものの、完全な克服が困難な疾患が多く残されている。その代表的なものが「がん」である。がんは、細胞の老化に伴うゲノム変異の蓄積を原因として発生し、エネルギー消費がコントロール不能になって無限に増殖する不可逆的メタボ細胞となる。したがって、がんの発生や進展を抑えるためには、積極的に細胞レベルでの老化現象（ストレス応答能や遺伝子修復能の低下など）を抑え、また、その活発な成長・増殖を抑えるために栄養状態をコントロールする必要があると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、上記のがんの特性ときわめて密接に関連する細胞内シグナル伝達経路として mTOR シグナル（図1）に注目し、その活性をコントロールすることにより細胞レベルでの老化やがん発症を制御する全く新しい薬剤の開発を最終目標とした研究を行う。mTOR シグナルは、成長因子刺激やアミノ酸などの栄養素、さらにエネルギー状態などに応じて活性調節され、細胞成長や生存維持、ストレス応答や老化・寿命の制御などにおいて中心的な役割を担う、生命活動の根幹をささえるきわめて重要なシグナル経路である。具体的には、成長因子シグナルとリンクした mTORC1 に焦点をあてて、その活性制御因子である Ragulator と RagA/C GTPase との複合体の X 線結晶構造解析による分子構造を解明し、その情報を基に、既存の mTOR 阻害剤とは作用機作の異なる mTORC1 阻害剤標的の探索を行う。

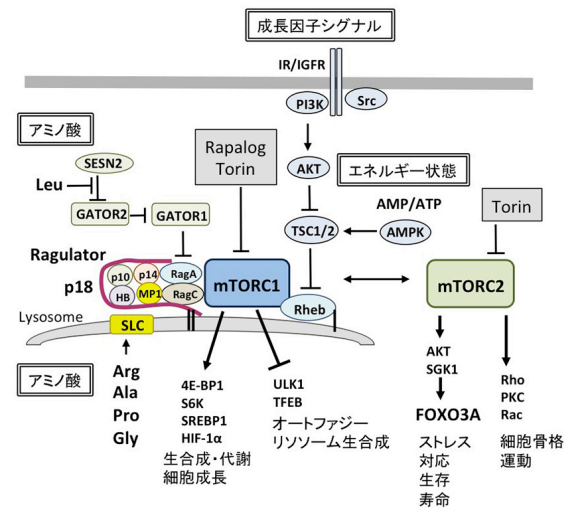


図1. mTOR シグナル伝達機構の概略

3. 研究の方法

(1) mTORC1 の活性制御機構の分子基盤の解明

応募者は現在、mTORC1 の活性調節の要となるリソソーム膜上の Ragulator、およびその RagA/C GTPase との複合体の X 線結晶構造解析を完成することによって、mTORC1 の活性制御機構の分子基盤を解明し、活性制御に重要な分子間相互作用表面を同定する。

(2) mTORC1 の活性制御に関わる因子との相互作用の解析

主にアミノ酸に依存した mTORC1 活性化に、GATOR1 と FLCN という RagA および RagC の GAP が関わるということが明らかとなっている。そこで、それらの分子と Ragulator との相互作用を主に細胞系で解析する。そのために、Ragulator 構造を欠失させて強制的に Rag や mTORC1 をリソソームに局在化させた細胞、また、GATOR1 や FLCN などの制御因子をノックアウトした細胞を作製し、それらの相互作用の意義および分子機序を解明する。

(2) mTORC1 の活性抑制剤のスクリーニング系の構築

Ragulator と Rag GTPase との相互作用を阻害する薬剤スクリーニングのために、FRET 法により Ragulator と Rag との結合を検出する系を構築する。具体的には、p18 に CFP、RagA に YFP を融合させた蛋白質を作製し、それらが複合体を形成する際の FRET シグナルを抑制する因子のスクリーニング系の構築を試みる。

4. 研究成果

(1) mTORC1 の活性制御機構の分子基盤の解明
 Regulator (p18, p14, MP1, p10, HBXIP の 5 者複合体) および Regulator と RagA/C の roadblock domain との 7 者複合体の X 線結晶構造解析に成功した。その解析から、7 者複合体が天然変性蛋白質である p18 が、p14-MP1 ダイマー、p10-HBXIP ダイマー、さらに RagA と RagC の Roadblock domain ダイマーを一定方向にラッピングするというきわめて興味深い構造をとることが明らかとなった (図 2)。また、*in vitro* での再構成実験より、p18 が 3 種の Roadblock domain ダイマーを順番にラッピングすることも示された (図 3)。さらに、p18 の C 末端の数残基で RagA と安定に相互作用していることも明らかとなり、mTORC1 の活性制御のポイントとして機能する可能性が示唆された (図 4)。

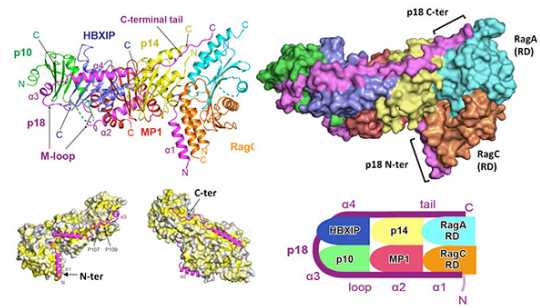


図 2. Ragulator-RagA/C 複合体の構造

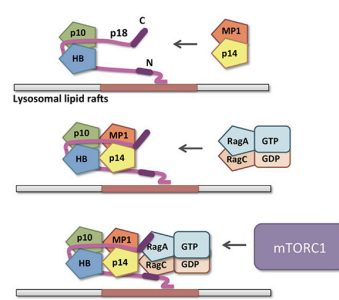


図 3. Ragulator-RagA/C 複合体の形成過程

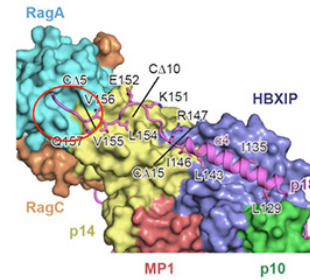


図 4. p18 と RagA との相互作用領域

(2) mTORC1 の活性制御に関わる因子との相互作用の解析

一方で、p18 が 3 種の Roadblock domain ダイマーを一定方向に規則正しくラッピングすることにより形成される蛋白質表面が、Rag GTPase の活性制御に関わるシグナルプラットフォームとして機能する可能性も示唆されたので、その意義を検証するために以下の実験を行った。まず、Ragulator が形成されない p18 KO 細胞に、p18 のリソソーム局在シグナルを融合させた RagC あるいは mTORC1 を発現させ、アミノ酸に対する応答性を評価した。その結果、Ragulator 構造がないと、アミノ酸非依存的に mTORC1 が活性化することが見出された (図 5)。また、RagA の活性制御に関わる GATOR1 を KO した場合にも同様のアミノ酸非依存性が観察された (図 6)。これらのことから、Ragulator が、アミノ酸による GATOR1 を介する mTORC1 の活性制御に必須の役割を担うことが明らかとなった。さらに、mTORC1 の直接の活性化を担う Rheb GTPase およびその上流の制御因子である TSC1/2 の KO 細胞も作製し、それらの意義を解析した。その結果、TSC1/2 の活性もアミノ酸によって制御されることが新たに見出され、Ragulator と TSC1/2-Rheb 経路との cross-talk の重要性も明らかとなった (図 7)。以上より、Ragulator が形成するシグナル制御プラットフォームが新たな薬剤標的として機能する可能性が示唆された (論文準備中)。

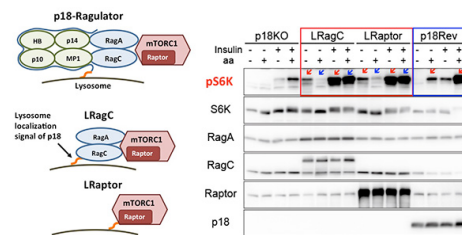


図 5. Ragulator 欠損によるアミノ酸非依存的 mTORC1 の活性化

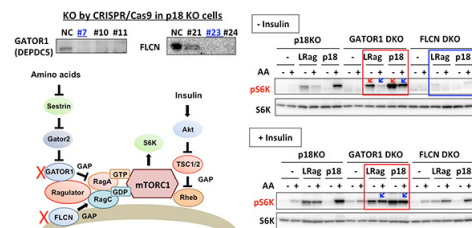


図 6. GATOR1 欠損によるアミノ酸非依存的 mTORC1 の活性化

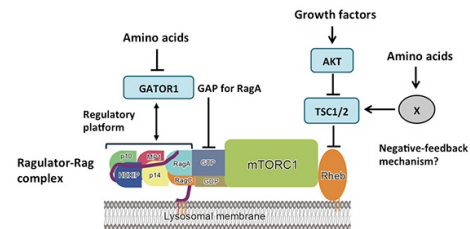


図 7. Ragulator を介するアミノ酸依存的な mTORC1 活性制御機構 (モデル)

(3) mTORC1 の活性抑制剤のスクリーニング系の構築

Ragulator と Rag GTPase の相互作用を FRET 法で定量的に解析するシステムの構築を試みた。しかしながら、p18 の末端に CFP を付加すると Rag との相互作用が阻害され、複合体を再構成

することができなかつた。そこでリンカーの長さを調整したりなど様々な工夫を試みてきたが、現在までに安定な複合体を得ることは出来ていない。このことから、p18 を利用したアッセイ系の構築が困難なことが明らかとなった。そこで現在、細胞レベルで mTORC1 のリソソーム局在を指標にした新たなスクリーニング系の構築を試みている。一方、p18 の C 末端の短いペプチドが Rag GTPase との結合に重要なことが明らかとなったので、今後、そのペプチドおよび誘導体による mTORC1 の活性阻害効果を in vitro プルダウンアッセイで解析することも計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件) 全て査読あり

1. Tsukamoto T, Kajiwara K, Nada S, Okada M. Src mediates TGF- β -induced intraocular pressure elevation in glaucoma. *J Cell Physiol.* 234(2): 1730-1744, 2019. doi: 10.1002/jcp.27044.
2. Kimura T, Kumanogoh A, Okada M. Roles of Lamtor1 in Macrophages, CD4+ T-cells, and Regulatory T-cells. *Critical reviews in immunology.* 38(5): 403-414, 2018. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2018028252
3. Hayama Y, Kimura T, Takeda Y, Nada S, Koyama S, Takamatsu H, Kang S, Ito D, Maeda Y, Nishide M, Nojima S, Sarashina-Kida H, Hosokawa T, Kinehara Y, Kato Y, Nakatani T, Nakanishi Y, Tsuda T, Koba T, Okada M, Kumanogoh A. Lysosomal Protein Lamtor1 Controls Innate Immune Responses via Nuclear Translocation of Transcription Factor EB. *J Immunol.* 200(11): 3790-3800, 2018. doi: 10.4049/jimmunol.1701283
4. Hao F, Kondo K, Itoh T, Ikari S, Nada S, Okada M, Noda T. Rheb localized on the Golgi membrane activates lysosome-localized mTORC1 at the Golgi-lysosome contact site. *J Cell Sci.* 131(3), pii: Jcs208017, 2018. doi: 10.1242/jcs.208017
5. Yonehara R, Nada S, Nakai T, Nakai M, Kitamura A, Ogawa A, Nakatsumi H, Nakayama KI, Li S, Standley DM, Yamashita E, Nakagawa A, Okada M. Structural basis for the assembly of the Regulator-Rag GTPase complex. *Nature Commun.* 8(1): 1625, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-01762-3.
6. Hosokawa T, Kimura T, Nada S, Okuno T, Ito D, Kang S, Nojima S, Yamashita K, Nakatani T, Hayama Y, Kato Y, Kinehara Y, Nishide M, Mikami N, Koyama S, Takamatsu H, Okuzaki D, Ohkura N, Sakaguchi S, Okada M, Kumanogoh A. Lamtor1 Is Critically Required for CD4+ T Cell Proliferation and Regulatory T Cell Suppressive Function. *J Immunol.*199(6): 2008-2019, 2017. doi: 10.4049/jimmunol.1700157

〔学会発表〕(計7件)

1. 岡田雅人「がん進展制御における Src および mTOR シグナルの役割」金沢大学がん進展制御研究所セミナー 2019年3月1日
2. Masato Okada「Molecular basis for the regulation of mTORC1 nutrient signaling」数理シグナル」第1回国際シンポジウム 東京大学医科学研究所 2019年2月2日
3. 岡田雅人「リソソーム膜上での mTORC1 栄養シグナルの制御機構」大阪大学蛋白質研究所セミナー 2018年3月2日
4. 中井 昌弘、米原 涼、名田 茂之、中井 友和、中川 敦史、岡田 雅人「The structural basis for the assembly of the Regulator-RagGTPase complex」数理シグナル第2回公開シンポジウム 東京大学医科学研究所 2018年2月10日
5. 中井 昌弘、米原 涼、名田 茂之、中井 友和、北村 彩佳、小川 輝、山下 栄樹、中山 敬一、中津海 洋一、中川 敦史、岡田 雅人「The structural basis for the assembly of the Regulator-RagGTPase complex」第40回日本分子生物学会 神戸ポートアイランド 2017年12月6日
6. 名田 茂之、米原 涼、中井 昌弘、北村 彩佳、小川 輝、山下 栄樹、中川 敦史、岡田 雅人「Regulator の構造と Rag との複合体形成機構」2017年度生命科学系学会合同年次大会 神戸ポートアイランド 2017年12月6日
7. 岡田雅人「リソソーム膜上における mTORC1 シグナルの制御機構」第四回バイオシグナル研究会 神戸大学 2017年9月1日

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。