

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06623

研究課題名（和文）Ragulatorによるリソソームシグナル制御の新規側面

研究課題名（英文）The new aspects of lysosomal signal regulation by Ragulator

研究代表者

名田 茂之（Nada, Shigeyuki）

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：50291448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：mTORC1の活性調節に必要なRagulatorについて、腸上皮における生理機能の解析をノックアウトマウスを用いて行った。その結果、Ragulatorが腸上皮の正常な発達に必要であり、特にゴブレット細胞の機能に必須であることを示した。またノックアウト細胞等を用いた解析からRagulator構造がmTORC1のアミノ酸による調節に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究はmTORC1活性調節の中でもRagulatorに関する部分に焦点を当てたものである。mTORC1研究は国内外に多数あるが、Ragulatorに関しては我々が同定し機能を明らかにしてきた。当研究もその一翼を担うものであり、mTORC1の調節と機能に関する新たな知見を提供できたものとする。

研究成果の概要（英文）：Ragulator is an important component for mTORC1 regulation. In this study the physiological function of Ragulator in intestinal epithelium was evaluated by use of conditional knockout mice. The results showed that Ragulator is essential for the development of intestinal epithelium, especially for goblet cell function. In addition, knockout cell studies revealed that the structure of Ragulator is indispensable for amino-acid regulation of mTORC1 activation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：mTORC1 Ragulator Lamtor1 p18

## 1. 研究開始当初の背景

Ragulator は mTORC1 活性化に必要なリソソーム膜上のスカフォールドタンパク質複合体である。p18、p14、MP1、p10、HBXIP (あるいは Lamtor1~5) からなるヘテロ 5 量体が Ragulator 本体であり、加えて small GTPase である RagA と RagC のヘテロダイマーと複合体を形成した 7 量体の状態で mTORC1 と結合する。この結合には細胞内部でのアミノ酸によるシグナルが必要で、これが RagA/C の GTP/GDP 結合状態を mTORC1 複合体中の Raptor 分子と結合できる形状へと変化させる。結果的に、mTORC1 はアミノ酸存在下においてのみ Ragulator-RagA/C と結合してリソソーム膜上へリクルートされ、通常は増殖因子シグナルの支配下にある Rheb によって活性化される。mTORC1 活性調節はこのように複雑な機構により調節されているが、その調節系の全貌はまだ明らかとなっていない。また、アミノ酸による Ragulator-RagA/C を介したリソソーム局在化と、増殖因子シグナルによる Rheb を介した活性化は mTORC1 活性調節の中ではそれぞれ独立したシグナルとなっているが、それぞれのシグナルの重要度、特に生理的な条件下での重要性については不明瞭な状況となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 2 点を焦点とした研究を行った。

### (1) 腸上皮細胞における Ragulator の生理的機能の解明

腸上皮はクリプト下辺部の上皮幹細胞より増殖し、数種の細胞へと分化して腸上皮としての機能を果たす。mTORC1 は一般的に細胞増殖に必要なシグナルとして機能していると考えられるが、腸上皮細胞においてどのような機能を果たすかを、マウス腸上皮幹細胞を標的としたコンディショナルノックアウトマウスを作製することにより解析した。

### (2) Ragulator 構造の意義と新規相互作用因子の探索

Ragulator は 5 量体であり、p18 がリソソーム膜アンカーとして、p14、MP1、p10、HBXIP のうち p14 と MP1 の 2 分子で形成されるヘテロダイマー部分が RagA/C の足場を作っている。Ragulator の最終的な機能が RagA/C のリソソーム膜結合だけであるならば、RagA/C を直接リソソーム膜へ局在化するような脂質修飾部位を RagC に付与することでも達成可能である。しかしそのような人為的な変異体分子では正常なアミノ酸による活性調節が果たせないことが明らかとなっていた。つまり Ragulator の構造部分にアミノ酸による調節に必要な部位が存在すると考えられた。そこで Ragulator 構造によって発揮されるアミノ酸調節機能の解明と、新たに結合する可能性のある分子についての探索を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸上皮細胞における Ragulator の生理的機能の解明

マウス腸上皮幹細胞でタモキシフェン依存的な loxP 配列特異的組換え酵素遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (CK19-CreERT2 マウス) と p18 遺伝子の 2 か所のイントロン中に loxP 配列を挿入した p18 flox/flox マウスを交配して CK19-CreERT2/p18 flox/flox マウスを作製した。このマウスの腹腔内にタモキシフェンを 4 週間投与してクリプト内での p18 ノックアウトを誘導し、小腸および大腸の組織形成や機能について組織学的な解析を行った。また p18 ノックアウトマウスクリプトを取り出し、マトリゲル中での三次元オルガノイド培養を行って、p18 欠損による影響を観察した。

### (2) Ragulator 構造の意義と新規相互作用因子の探索

Ragulator 構造の意義を確認するために、Ragulator 構造なしで RagA/C をリソソーム膜へ局在化させる RagC の変異体である Lysosomal anchoring RagC (LRagC) とコントロールとして Ragulator-RagA/C の介在なしにリソソーム膜へ局在化する Lysosomal anchoring Raptor (LRaptor) を構築した。Ragulator を持たない p18 ノックアウト細胞へこれら分子を導入してそれぞれの分子による mTORC1 活性化の状態について調べた。また、RagA/C のアミノ酸調節にかかわる上流因子である Gator1 と Folliculin について、それぞれ p18 とのダブルノックアウト細胞を作製して、LRagC 分子への影響について解析した。さらに、p18 と Rheb をダブルノックアウトした細胞を作製して、アミノ酸による Rheb を介した調節系の存在についても調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 腸上皮細胞における Ragulator の生理的機能の解明

腸上皮幹細胞で p18 をノックアウトしたマウス大腸より組織切片を作製し、免疫組織化学染色によって p18 タンパク質が消失したクリプトの存在を確認した。この実験系では p18 のノックアウトは腸上皮の全ての細胞では起こらず、ノックアウトされたクリプトとノックアウトされていないクリプトが混在して存在し、ノックアウトされていないクリプトをコント

ロールとして観察可能であった。p18 ノックアウトクリプトでは培養細胞でのノックアウトと同様の mTORC1 活性の低下やリソソーム局在の消失、またリソソームの分布変化が腸上皮でも起こることが観察された。さらに形態学的な変化として、p18 ノックアウトクリプトではクリプト自体の矮小化とゴブレット細胞の消失も観察された。

クリプトあたりの細胞数減少が見られる反面、Ki67 や PCNA 陽性細胞の増加が見られ、細胞増殖は起こるものの細胞分裂や分裂後の成熟に時間がかかる可能性が考えられた。同時にクリプト全体でβカテニンのシグナルが増強されており、クリプトの成熟にかかわる Wnt シグナルの変動の可能性が示された。またムチン産生が大きく低下しており、ゴブレット細胞の明確な減少が確認された。βカテニンの増加に対して同じくクリプトでの細胞分化シグナルにかかわる Klf4 や Cdx2 については明確な変動は観察できなかったことから、ゴブレット細胞への分化は影響されておらず、ゴブレット細胞の消失はムチン産生や分泌胞の形成などのゴブレット細胞特異的な細胞機能発現に mTORC1 シグナルがかかわる可能性を示していると考えられた。

p18 ノックアウトクリプトをオルガノイド培養したところ、in vitro でもムチン産生に消失が見られたこと、正常なオルガノイドに mTORC1 の阻害剤を投与して培養した場合にも同様のムチン産生の低下が見られたことから、mTORC1 シグナルが特にゴブレット細胞のムチン産生に大きくかかわることが確認できた。

## (2) Ragulator 構造の意義と新規相互作用因子の探索

Ragulator を欠く p18 ノックアウト細胞にリソソーム局在型の変異体 RagC である LRagC、あるいはリソソーム局在型 Raptor (LRaptor) を発現させて、p18 ノックアウト細胞あるいは正常な p18 を発現させて正常化したコントロール細胞と mTORC1 の活性やリソソーム局在について観察した。その結果、mTORC1 活性は LRagC や LRaptor を発現させることで部分的に回復し、また mTORC1 のリソソーム局在も正常化することが確認できた。これらの細胞にアミノ酸あるいはインスリン刺激をそれぞれ行うことで mTORC1 の活性調節機能を調べたところ、LRagC や LRaptor を発現させた細胞ではアミノ酸もインスリンも加えていない状態で mTORC1 が弱く活性化し、インスリンを加えた場合にはアミノ酸非依存的な強い活性化が生じた。一方でアミノ酸のみ添加した場合はコントロールの mTORC1 活性が弱く活性化されるのに対してこれらの分子では活性化が抑制されている状態であった。これらの条件下では LRagC と LRaptor の mTORC1 活性化が同じ様態であったことから、LRagC はアミノ酸により調節されていないと考えられた。アミノ酸による mTORC1 活性化のパターンが正常な Ragulator 発現状態とは逆になることから、p18 ノックアウト細胞に LRagC と p18 を同時に発現させてみると、mTORC1 活性化のパターンが正常化したことから、正常な Ragulator 存在下では LRagC が正常なアミノ酸調節を受けると考えられた。これらの結果は Ragulator 構造の存在が RagA/C の活性調節に必要であることを示している。

RagA/C の活性調節には、活性化因子として Folliculin が、抑制因子として Gator1 が知られている。そこで p18 と Folliculin あるいは Gator1 のダブルノックアウト細胞を作製した。Gator1 のノックアウトには Gator1 構成因子の中でも GAP 活性を持つとされる DEPDC1 遺伝子を標的として作製した。これら細胞に LRagC あるいは p18 を発現させてそれぞれのアミノ酸あるいはインスリン依存的な mTORC1 活性について調べた。その結果、Folliculin ノックアウト状態では mTORC1 活性が全般的に低下するものの活性化パターン自体には変化が見られない一方、Gator1 ノックアウト状態では本来なら活性が抑制されるアミノ酸非存在時により強く活性化されるパターンが現れた。Gator1 のノックアウトが LRagC の発現時のパターンと同じ mTORC1 活性化を示していたことから、Ragulator 構造が Gator1 の機能発現に必要な可能性が示された。

ビオチン化修飾酵素である TurboID を p18 と結合させて Ragulator 構造に近接して存在するタンパク質を網羅的にビオチン化し質量分析で検出した。検出されたタンパク質として Gator1 の構成因子群や Gator1 の抑制因子である Gator2 の構成因子群が複数検出されたことから、Gator2 から Gator1 へのアミノ酸による調節シグナルが Ragulator 近傍で行われている可能性が考えられた。Ragulator と Gator1、あるいは Gator2 の直接的な会合については化学修飾によるクロスリンク実験などで検出を試みたが、検出されたもののバックグラウンドとの区別がつきづらく結果を保留とした。

LRagC 発現時のアミノ酸依存的な mTORC1 活性化パターンの変化はオカダ酸添加で正常化することも観察された。オカダ酸の添加は Akt から TSC を介して Rheb を調節する経路に影響を与えることも Rheb や TSC2 のノックアウト細胞を用いた実験で確認できた。これはアミノ酸によるシグナルが Rheb の調節経路へも影響していることを示している。

以上の観察結果は、Ragulator は単なる RagA/C の足場ではなく、アミノ酸シグナルによる mTORC1 活性調節にとって必須であることを示すものとなる。

TurboID による近接標識法で検出した Ragulator 近傍タンパク質群として様々な分子を同定したが、その中でもリソソームの形成や分布にかかわる重要な因子として Rab7 が再現性良く観察された。そこで Rab7 と Ragulator の関係を検証したところ、p18 ノックアウト時に見られるリソソーム形成や分布の変化が Rab7 活性を抑制するドミナントネガティブ型 Rab7 の過剰発現により抑制されたことから、Ragulator 欠損時には Rab7 の活性が上昇し、

リソソームの小型化や細胞周縁部への分布の移動が誘導される可能性が示された。他にも多数の機能未知のタンパク質を検出しており、Ragulator とその近傍がこれらタンパク質群によるアミノ酸依存的な mTORC1 活性調節やリソソームなどの細胞内膜系のダイナミクス調節の場になっている可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsujimoto K, Jo T, Nagira D, Konaka H, Park JH, Yoshimura SI, Ninomiya A, Sugihara F, Hirayama T, Itotagawa E, Matsuzaki Y, Takaichi Y, Aoki W, Saita S, Nakamura S, Ballabio A, Nada S, Okada M, Takamatsu H, Kumanogoh A.	4. 巻 42
2. 論文標題 The lysosomal Ragulator complex activates NLRP3 inflammasome in vivo via HDAC6.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e111389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111389.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Tetsuya, Hayama Yoshitomo, Okuzaki Daisuke, Nada Shigeyuki, Okada Masato	4. 巻 298
2. 論文標題 The Ragulator complex serves as a substrate-specific mTORC1 scaffold in regulating the nuclear translocation of transcription factor EB	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101744 ~ 101744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakatani Takeshi, Tsujimoto Kohei, Park JeongHoon, Jo Tatsunori, Kimura Tetsuya, Hayama Yoshitomo, Konaka Hachiro, Morita Takayoshi, Kato Yasuhiro, Nishide Masayuki, Koyama Shyoei, Nada Shigeyuki, Okada Masato, Takamatsu Hyota, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 The lysosomal Ragulator complex plays an essential role in leukocyte trafficking by activating myosin II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23654-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nada Shigeyuki, Okada Masato	4. 巻 168
2. 論文標題 Genetic dissection of Ragulator structure and function in amino acid-dependent regulation of mTORC1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 621 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Shizuka, Nada Shigeyuki, Yamazaki Daisuke, Kimura Tetsuya, Kajiwara Kentaro, Miki Hiroaki, Okada Masato	4. 巻 45
2. 論文標題 p18/Lamtor1-mTORC1 Signaling Controls Development of Mucin-producing Goblet Cells in the Intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 93~105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.20018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 名田 茂之、岡田 雅人
2. 発表標題 Regulator and the surrounding system for mTORC1 regulation
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名田 茂之、岡田 雅人
2. 発表標題 アミノ酸によるmTORC1活性調節におけるRegulator構造の意義
3. 学会等名 227.第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 名田 茂之、伊藤 静夏、山崎 大輔、三木 裕明、岡田 雅人
2. 発表標題 アミノ酸依存的mTORC1栄養シグナルの制御と機能
3. 学会等名 229.第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 名田 茂之、岡田 雅人
2. 発表標題 アミノ酸によるmTORC1活性調節はRagulator構造に依存する
3. 学会等名 230. 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------