

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07155

研究課題名（和文）mTORC1依存的液-液相分離制御によるがん促進機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Cancer-Promoting Mechanisms Through mTORC1-Dependent Regulation of Liquid-Liquid Phase Separation

研究代表者

中津海 洋一（Nakatsumi, Hirokazu）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・准教授

研究者番号：20596837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リン酸化酵素mTORC1によりP-bodyの液-液相分離が制御されることを同定した。リボソームプロファイリング解析とプロテオーム解析の結果、P-bodyに局在するmRNAについて、mTORC1によって翻訳が促進されることが明らかになった。これまでmTORC1により、リボソームタンパク質を標的とした翻訳制御が知られていたが、一方で本研究で見出した制御は異なるmRNAを標的とした制御であり、既知のシグナル伝達とは独立したものであった。P-bodyはこれまでに翻訳抑制に機能することが知られていたが、本研究からP-body形成は特定のmRNA群に対して翻訳促進的に機能することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORC1の異常活性化はがんをはじめとした様々な疾患を増悪させる。mTORC1の阻害剤であるラパマイシンは抗がん剤として既に使用されているが、未だ改善の余地を残している。mTORC1の分子機能の詳細を解明することは、関連疾患の治療法の開発や、ラパマイシンの副作用の低減に寄与する。本研究ではこれらの分子機能の一端を明らかにし、タンパク質合成に関連した新たな制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified that the liquid-liquid phase separation of P-bodies is regulated by the phosphorylation enzyme mTORC1. Results from ribosome profiling and proteome analysis revealed that mTORC1 promotes the translation of mRNAs localized in P-bodies. While it was previously known that mTORC1 controls translation by targeting ribosomal proteins, the regulation discovered in this study targets different mRNAs and is independent of the known signaling pathways. Although P-bodies have been known to function in translational repression, our research indicates that the formation of P-bodies functions to promote the translation of specific groups of mRNAs.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：mTORC1 P-body Translation

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

mTORC1 はアミノ酸やインスリンといった栄養シグナルにより活性化するリン酸化酵素である。mTORC1 は下流の様々な分子をリン酸化することで活性を制御し、タンパク質、脂質、核酸の同化を促進して細胞を成長へとシフトさせる(Battaglionni et al., 2022; Simcox and Lamming, 2022)。mTORC1 の作用点としてよく知られているのはオートファジーの抑制とリボソームの合成による翻訳の促進とであり、これらの制御について特に盛んに研究が行われている。

mTORC1 は疾患との関りが深い。多くのがん種において mTORC1 の恒常的な活性化が観察され、がん促進的に機能することが知られている(Kim et al., 2017)。また栄養に応答して活性化する mTORC1 は、過剰な栄養摂取に起因する生活習慣病においても恒常的な活性化がみられ、糖尿病や非ウイルス性脂肪性肝炎、動脈硬化等との関りが報告されている(Saxton and Sabatini, 2017)。しかしながらこのように mTORC1 関連疾患は数多くあるものの、mTORC1 阻害剤であるラパマイシンが臨床応用に至った例は少ない(Oleksak et al., 2022)。その大きな原因の一つとして mTORC1 の下流が広範囲であるために副次的な作用が避けられないことが挙げられる。これを解決するためには、mTORC1 の下流を詳細に解析し、様々な疾患の治療標的や副作用のメカニズムを同定することが重要である。

2. 研究の目的

われわれは、これまで大規模プロテオミクス解析から数万に及ぶリン酸化の変動データを取得し、50 におよぶ新規 mTORC1 下流分子を同定してきた(Nakatsumi et al., 2017; Nakatsumi et al., 2018; Yonehara et al., 2017)。これら mTORC1 下流分子の機能制御を解明することが、mTORC1 による疾患と、ラパマイシンの薬効の解明に繋がる。特に mTORC1 による液-固相分離の制御と、タンパク質翻訳との関連に着目し、解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、リボソームプロファイリング解析とプロテオーム解析を中心に解析を行った。各々の解析では mTORC1 の活性化条件下や、P-body の形成が損なわれる遺伝子改変を行った細胞についてデータを取得した。また分子メカニズムの詳細を同定するために、公開データベースの再解析を行い、われわれのデータと比較解析を行った。

4. 研究成果

mTORC1 は P-body の形成を促進する

CRISPR Cas9 システムを用いて TSC1 を欠失させ、mTORC1 の活性化を誘導した HeLa 細胞では、P-body の数の増加が見られた。一方で mTOR 阻害剤である Torin1 やラパマイシン処理した際には P-body の数は減少した。また、mTORC1 の構成因子 Raptor を欠失させると P-body の数が減少したが、mTORC2 の構成因子 Rictor では変化がなかった。さらに、ATG13 や LARP1 の発現抑制によるオートファジーやリボソーム合成の阻害は P-body の形成に影響しなかった。これらの結果から、mTORC1 は既知の経路とは独立し、P-body の形成を促進することが示された。

mTORC1 は P-body 構成タンパク質のリン酸化を制御する

過去にわれわれが報告した定量的リン酸化プロテオミクスの大規模データから、P-body の構成タンパク質である PATL1 と DCPIA が mTORC1 依存的なリン酸化を受ける可能性が示唆され

た(Nakatsumi et al., 2017)。この結果を検証するため、インスリンを添加し mTORC1 活性化を誘導した条件と、Torin1 を処理したサンプルについて、二次元電気泳動法で解析を行ったところ、PATL1 と DCPIA は、インスリン処理によってリン酸化され、Torin1 前処理によってリン酸化が阻害されることが確認された。以上のことから、PATL1 と DCPIA は mTORC1 依存的なリン酸化制御を受けることが確認された。

mTORC1 依存的な P-body 形成は、P-body に局在する m⁶A 修飾 mRNA の翻訳に影響を与える

次にわれわれは、P-body 形成が mTORC1 による翻訳制御に寄与するかについて調べるため、リボソームプロファイリング解析を行った。まず、TSC1 ノックアウト HeLa 細胞株を元に、CRISPR Cas9 システムにより PATL1 をノックアウトし、P-body が形成されない細胞株を調製した。この細胞について mTORC1 活性化時と不活化時のリボソームプロファイリングの変化についてデータを取得し、親株と比較した。併せて P-body 局在についての公開データと m⁶A 修飾についての公開データを再解析したところ、P-body に局在し、なおかつ m⁶A 修飾を受けた mRNA において、P-body 形成による翻訳効率の変化が観察された。その一方で P-body 局在かつ m⁶A 非修飾の mRNA 群や、P-body 非局在の mRNA 群について有意差は見られなかった。これらのことから、P-body に局在し、なおかつ m⁶A 修飾を受けた mRNA 群が、mTORC1-P-body 制御軸によって何らかの翻訳制御を受けていることが示唆された。

mTORC1-P-body 軸による翻訳制御は、YTHDF2 が介在する

次にわれわれはプロテオーム解析を行い、翻訳制御がタンパク質発現量に変動を与えるかについて解析を行った。その結果リボソームプロファイリング解析の結果とプロテオーム解析の結果に齟齬は無く、P-body 形成は m⁶A 修飾を受けた P-body 局在 mRNA の翻訳を促進するという結果が得られた。さらに様々な遺伝子を発現抑制した細胞で同様の解析を行った結果、m⁶A を認識するタンパク質である YTHDF2 を発現抑制した細胞では本シグナル経路が遮断されることが明らかとなった。

mTORC1-P-body 経路は転写関連因子群の翻訳を制御する

次に、P-body に局在し、m⁶A 修飾を受けた mRNA 群の機能的特徴について調べるために Gene Ontology 解析を行った。その結果、当該 mRNA 群は転写機能を持つものが有意に濃縮されることがわかった。一方、P-body に局在するものでも m⁶A 非修飾の mRNA 群であれば、転写機能の濃縮は観察されず、同様に P-body 非局在 mRNA 群でも転写機能の濃縮は観察されなかった。これらのことから、mTORC1 は P-body に局在する転写関連因子の翻訳を制御することがわかった。

結論

以上の結果から、mTORC1 の活性依存的に P-body の形成が制御され、P-body に局在する m⁶A 修飾を受けた mRNA について、YTHDF2 依存的に翻訳が促進される分子メカニズムが同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Funasaki S, Hatano A, Nakatsumi H, Koga D, Sugahara O, Yumimoto K, Baba M, Matsumoto M, Nakayama KI.	4. 巻 26(9)
2. 論文標題 A stepwise and digital pattern of RSK phosphorylation determines the outcome of thymic selection.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107552	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 Fujinuma S, Nakatsumi H, Shimizu H, Sugiyama S, Harada A, Goya T, Tanaka M, Kohjima M, Takahashi M, Izumi Y, Yagi M, Kang D, Kaneko M, Shigeta M, Bamba T, Ohkawa Y, Nakayama KI.	4. 巻 42(5)
2. 論文標題 FOXK1 promotes nonalcoholic fatty liver disease by mediating mTORC1-dependent inhibition of hepatic fatty acid oxidation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112530	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 Wada R, Fujinuma S, Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI.	4. 巻 173(2)
2. 論文標題 Phosphorylation of PBX2, a novel downstream target of mTORC1, is determined by GSK3 and PP1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 129-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac094.	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 Wada Reona, Fujinuma Shun, Nakatsumi Hirokazu, Matsumoto Masaki, Nakayama Keiichi I	4. 巻 173
2. 論文標題 Phosphorylation of PBX2, a novel downstream target of mTORC1, is determined by GSK3 and PP1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 129 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac094	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 Huda Nazmul, Khambu Bilon, Liu Gang, Nakatsumi Hirokazu, Yan Shengmin, Chen Xiaoyun, Ma Michelle, Dong Zheng, Nakayama Keiichi I., Yin Xiao-Ming	4. 巻 14
2. 論文標題 Senescence Connects Autophagy Deficiency to Inflammation and Tumor Progression in the Liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 333 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.04.003	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 該当する

1. 著者名 Huda Nazmul, Khambu Bilon, Liu Gang, Nakatsumi Hirokazu, Yan Shengmin, Chen Xiaoyun, Ma Michelle, Dong Zheng, Nakayama Keiichi I., Yin Xiao-Ming	4. 巻 -
2. 論文標題 Senescence Connects Autophagy Deficiency to Inflammation and Tumor Progression in the Liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	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) 10.1016/j.jcmgh.2022.04.003	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 該当する

1. 著者名 Higa Tsunaki, Okita Yasutaka, Matsumoto Akinobu, Nakayama Shogo, Oka Takeru, Sugahara Osamu, Koga Daisuke, Takeishi Shoichiro, Nakatsumi Hirokazu, Hosen Naoki, Robine Sylvie, Taketo Makoto M., Sato Toshiro, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Spatiotemporal reprogramming of differentiated cells underlies regeneration and neoplasia in the intestinal epithelium	5. 発行年 2022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/s41467-022-29165-z	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中津海洋一
2. 発表標題 mTORC1はP-bodyに局在するmRNAの翻訳を制御する
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirokazu Nakatsumi
2. 発表標題 mTOR-dependent Regulation of Liquid-Liquid Phase Separation and Translation
3. 学会等名 日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirokazu Nakatsumi
2. 発表標題 mTOR-dependent Regulation of Liquid-Liquid Phase Separation and Translation
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2023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