

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370087

研究課題名(和文)後期エンドソームリン酸化シグナルによる細胞機能制御

研究課題名(英文)Regulation of cellular function by late endosomal kinase signaling

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) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：後期エンドソーム・リソソームに存在する膜アンカータンパク質p18について相互作用する細胞内キナーゼ情報伝達系の機能を調べた。その結果、メンブレントラフィックについては主にmTORC1シグナルが、細胞増殖に関してはmTORC2の活性上昇によるFoxO3aの活性化が大きな役割を果たすことが判明した。さらに表皮におけるp18ノックアウトマウスの解析から、p18が表皮ケラチノサイトの細胞分化と表皮バリア形成に必須の役割を果たすことが明らかとなった。以上の結果から、p18による後期エンドソーム・リソソームからのキナーゼシグナルが組織形成と細胞の機能調節に必須なシグナル経路であることを示した。

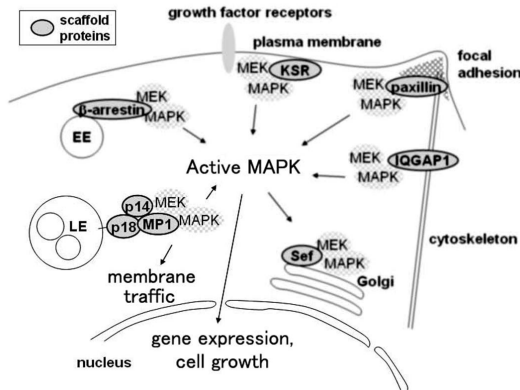
研究成果の概要(英文)：A membrane-anchoring protein p18, which is localizing onto late endosomes and lysosomes, takes roles to regulate cell growth and intracellular membrane trafficking. Here, the kinase signal pathways interacting with p18 were analyzed and we found that mTORC1 and its downstream effects including the change of gene expression is the major path of membrane trafficking regulation. As to the cell growth control, we found that mTORC2 is activated by the suppression of mTORC1 in p18 knockout cells, and activated mTORC2 induces the expression of cell cycle inhibitor proteins through the SGK1-FoxO3a axis. To access the physiological importance of p18 in vivo, a keratinocyte-specific conditional p18 knockout mouse was generated, and we found that p18 act as an essential regulator for keratinocyte differentiation and epidermal barrier formation. These results indicate that p18 and associated kinase signals are crucial for tissue formation and the regulation of cellular function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム メンブレントラフィック 細胞内情報伝達

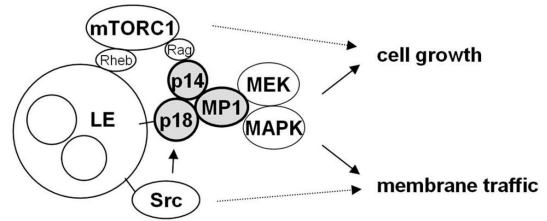
1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達系は、細胞外シグナルを細胞表面の受容体分子と共役して細胞質内でのリン酸化シグナルやセカンドメッセンジャーへと変換し、最終的には遺伝子転写調節などを行う核へ情報を伝達する。その過程を担うタンパク質リン酸化酵素は細胞質中に均一に存在するわけではなく、たとえば細胞膜やオルガネラ膜上のラフトに集合することで効率よく情報を伝達する機構を形成しており、この機構はその存在場所特異的なシグナル発信装置としても働く。例えば下図左は、代表的なタンパク質リン酸化シグナルの担い手である MAPK による情報伝達の場を簡略にまとめたものである。MAPK は細胞表面の受容体や細胞内各所のスカフォールドタンパク質で活性化され、核へ移行して細胞増殖シグナルを伝達すると考えられている。しかし、何故このような多様な場所で活性化される必要があるのか、どの場所で活性化された MAPK も同じ増殖シグナルを伝えているのか、などの疑問点も残っている。



これまでに我々は、独自に同定した新規膜アンカータンパク質 p18 が、エンドサイトーシス経路最後の後期エンドソーム・リソソームに特異的に存在することを見出した。また p18 が MAPK スカフォールド p14/MP1 複合体を後期エンドソーム・リソソームへリクルートすること、その機能不全が細胞増殖やメンブレントラフィックに異常をもたらすことを証明した(Nada S et al. EMBO J. 2009)。またさらに、p18 ががん原遺伝子チロシンキナーゼ Src の基質であること、p18 と p14/MP1 複合体がアミノ酸飢餓状態をセンシングしてタンパク質翻訳調節シグナルを発する mTORC1 を後期エンドソーム・リソソームにリクルートすることを示した(Sancak Y

et al. Cell 2010)。これらの発見から、後期エンドソーム・リソソームには細胞増殖やメンブレントラフィックを制御するリン酸化シグナルの新しい拠点があることがわかってきた。



LE: 後期エンドソーム

2. 研究の目的

後期エンドソーム・リソソームリン酸化シグナルの機能と制御メカニズム解明を目的とする。

後期エンドソーム・リソソーム上の p18 を基点とするタンパク質複合体には Src、MAPK、mTORC1 の3種のキナーゼシグナル経路が関わる。p18 ノックアウトマウス、p18 ノックアウト細胞では細胞の増殖速度低下やリソソーム機能の障害がみられるが、これらシグナル経路のうちどのシグナルがこれらの p18 ノックアウト表現型を引き起こすのかを明らかにする必要がある。またそのシグナル経路についても詳細を解析する。さらに p18 を基点とするシグナルの生体での役割について、コンディショナルノックアウトマウスを用いて調べる。

3. 研究の方法

(1)後期エンドソームキナーゼシグナルの機能分担

Src、MAPK、mTORC1 経路を遮断する阻害剤や遺伝子の発現、あるいは p18 ノックアウト細胞にそれぞれの経路だけを活性化させるような組換え遺伝子を発現させることにより、経路特異的なシグナルの遮断、あるいは活性化を行う。それらの効果を細胞増殖やリソソーム機能を指標に観察し、p18 ノックアウト細胞で見られる表現型への影響度から主要なシグナル経路の特定を行う。

(2)後期エンドソームキナーゼシグナルの細胞増殖制御メカニズム

p18 によるキナーゼシグナルのうち、細胞増殖を制御する分子の発現や機能調節に関

わる経路を特定する。またその経路の調節機構と p18 機能との関連を、p18 ノックアウト細胞系を用いて調べる。

(3)p18 の生理的役割

皮膚上皮で p18 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製して、皮膚の形成と機能調節における p18 の生理的役割を解析する。

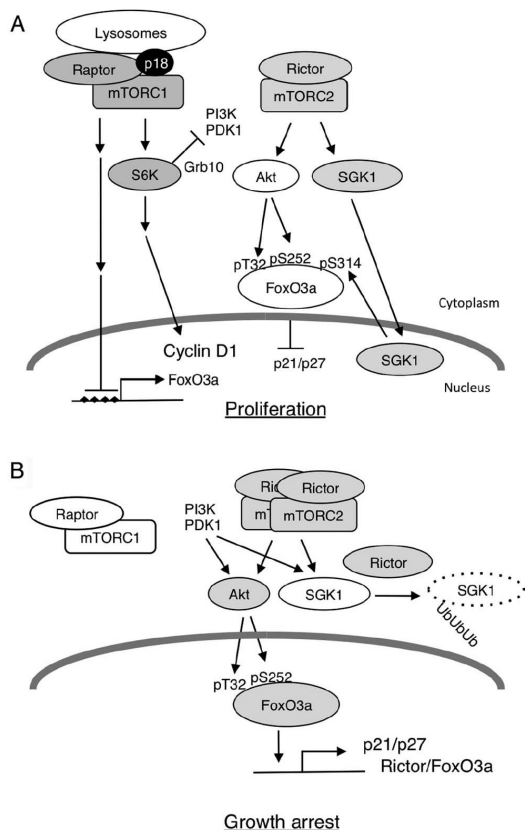
4. 研究成果

(1)後期エンドソームキナーゼシグナルの機能分担

p18 ノックアウト細胞では後期エンドソーム・リソソームのマーカートンパク質である LAMP1、Rab7、RagC などの発現量が上昇し、同時にこれらオルガネラの形態的な小型化、数の増加、細胞質周辺部位への分布の変化がみられた。mTORC1 経路の特異的阻害剤であるラパマイシンを正常細胞に投与することで、これら後期エンドソーム・リソソームのマーカートンパク質の発現上昇、形態的な小型化と数の増加および分布の変化の全てが観察されたことから、これらメンブレントラフィックに関わると考えられる p18 ノックアウトの表現型は主に mTORC1 経路に依存していると考えられた。しかしながら、その表現型の誘導にはラパマイシン投与後 12 時間以上かかることから、mTORC1 キナーゼの活性の変化が直接作用するのではなく、mTORC1 経路の下流で調節される遺伝子の発現が関わる可能性が考えられた (Takahashi et al. 2012)。一方で後期エンドソーム・リソソームの形態変化や分布変化は MAPK 経路の阻害剤でも観察されている。新たに MAPK キナーゼカスケードの酵素 Mek1 を p18 の N 末部分と融合させた p18-Mek1 を p18 ノックアウト細胞に発現させてその機能を検証したところ、リソソームでのタンパク質分解を正に調節する機能があることが判明した。さらに MEK1 阻害剤である PD0325901 が後期エンドソームとオートファゴソームの相互作用を阻害することが観察され、後期エンドソーム・リソソームのメンブレントラフィック制御には mTORC1 に加えて MAPK 経路も関与することが示された (Soma-Nagae et al 2013)。

(2)後期エンドソームキナーゼシグナルの細胞増殖制御メカニズム

p18 ノックアウト細胞では、細胞周期の G1 期にある細胞が正常細胞と比べて多く、また細胞内では細胞周期を抑制する p27KIP1、p21CIP1 の発現上昇がみられることが判明した。さらにこれら遺伝子の発現を調節する因子のうち、FoxO3a が p18KO 細胞で核局在を示すことを見出した。また実際に FoxO3a の機能亢進を正常細胞にて誘導したところ、細胞増殖の低下と p27KIP1 の発現上昇を引き起こすことが確認された。次に FoxO3a の機能亢進の原因を調べたところ、p18KO 細胞では FoxO3a のゲノム領域のメチル化に変化があること、FoxO3a をリン酸化して機能を調節するキナーゼである SGK1 の動態に変化があることを発見した。p18KO 細胞では mTORC1 活性の低下とともに mTORC2 活性の上昇が起こることから、FoxO3a の機能上昇が異常な mTORC2 活性の上昇によるものであると考えられた (Mori et al. 2014)。

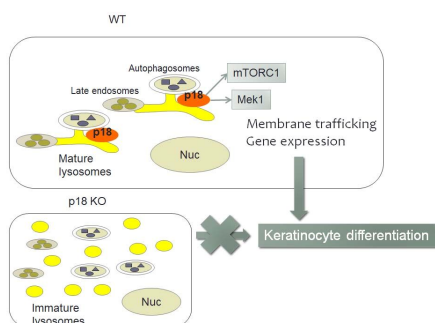


(3)p18 の生理的役割

p18 発現の多い表皮でのコンディショナル

ノックアウトマウスを作製して、皮膚の形成と機能における p18 の役割を調べた。p18 遺伝子座に loxP 配列を挿入したマウスを ES 細胞での相同組換えにより作製し、皮膚上皮基底細胞で発現する K5-Cre トランスジェニックマウスとの交配により表皮特異的なノックアウトを行った。その結果、表皮 p18 ノックアウトマウスは出産されるものの半日以内にすべて死亡することが判明した。帝王切開により取り出したマウス表皮の組織切片観察から、ノックアウトマウスは角質層を持たず、表皮バリア機能不全で致死となることが判明した。また p18 ノックアウト表皮では顆粒細胞層の発達不全も見られ、顆粒細胞の成熟から角質細胞への分化時に必要なケラトヒアリン顆粒の成長やオルガネラ分解なども阻害されていることが判明した。表皮バリアを構成する脂質の合成と分泌の低下も観察され、p18 が表皮の正常な発達と表皮バリア形成に必須の役割を果たすことが示された。

Lysosomal membrane trafficking is necessary for keratinocyte differentiation



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, Oneyama C, Okada M. The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One*. 査読有 2014 Feb 18;9(2):e88891. doi:10.1371/journal.pone.0088891.

Nada S, Mori S, Takahashi Y, Okada M. p18/LAMTOR1: a late endosome/lysosome-specific anchor

protein for the mTORC1/MAPK signaling pathway. *Methods Enzymol*. 査読無 2014;535:249-63.

doi:10.1016/B978-0-12-397925-4.00015-8.

Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, Takahashi Y, Mori S, Oneyama C, Okada M. The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. *J Cell Sci*. 査読有 2013 Aug 15;126(Pt 16):3575-84. doi: 10.1242/jcs.121913.

Takahashi Y, Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Oneyama C, Okada M. The late endosome/lysosome-anchored p18-mTORC1 pathway controls terminal maturation of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2012 Jan 27;417(4):1151-7. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.082.

Yoshida S, Hong S, Suzuki T, Nada S, Mannan AM, Wang J, Okada M, Guan KL, Inoki K. Redox regulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity by modulating the TSC1/TSC2-Rheb GTPase pathway. *J Biol Chem*. 査読有 2011 Sep 16;286(37):32651-60. doi: 10.1074/jbc.M111.238014.

Kuroiwa M, Oneyama C, Nada S, Okada M. The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *J Cell Sci*. 査読有 2011 May 15;124(Pt 10):1726-38. doi: 10.1242/jcs.080291.

[学会発表](計11件)

Okada M, Kitamura A, Mori S, Nada S, Nakatsumi H, Nakayama K 「Functional and molecular architecture of the lysosomal mTORC1 anchor: Ragulator」日本分子生物学会 2014年11月25日~2014年11月27日 パシフィコ横浜

小宮 優, 呑村 優, 名田 茂之, 小根山 千歳, 岡田 雅人 「がん進展における Ephexin family Rho GEF の機能解析」 日本分子生物学会 2014年11月25日~2014年11月27日 パシフィコ横浜

名田 真理, 名田 茂之, 長江(相馬) 多恵子, 森 俊介, 岡田 雅人 「マウス表皮の正常な発達はリソソーム膜アダプタータンパク質 p18 に依存している」 日本分子生物学会 2014年11月25日~2014年11月27日 パシフィコ横浜

岡田 雅人, 名田 茂之, 森 俊介, 相馬-長江 多恵子, 高橋 佑介, 北村 彩香, 小根山 千歳 「リソソーム mTOR キナーゼを介する細胞の分化増殖制御」 日本分子生物学会 2013年12月3日~2013年12月6日 神戸ポートアイランド

名田 茂之, 長江 多恵子, 岡田 雅人 「皮膚バリア機能形成における p18 の役割」 日本生化学会 2013年9月11日~2013年9月13日 パシフィコ横浜

森 俊介, 名田 茂之, 岡田 雅人 「リソソームタンパク質動態の網羅的解析」 日本細胞生物学会 2013年6月19日~2013年6月21日 ウィンクあいち

長江 多恵子, 北川 真理, 名田 茂之, 森 俊介, 高橋 祐介, 岡田 雅人 「マウス表皮形成には p18-mTORC1 経路を介したリソソーム代謝が必要である」 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日~2012年12月16日 福岡国際会議場

Nada S, Mori S, Soma-Nagae T, Takahashi Y, Okada M 「The late endosomal signaling of mTOR and MAPK takes differential roles in the cellular proliferation and the membrane trafficking.」 日本細胞生物学会 2011年6月27日 北海道大学 学術交流会館

Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, Takahashi Y, Mori S, Okada M, et al. 「The

late endosomal anchoring protein LAMTOR1 is essential for the epidermal barrier formation.」 日本細胞生物学会 2011年6月29日 北海道大学 学術交流会館

Soma-Nagae T, Kitagawa M, Nada S, Kajiwara K, Okada M 「LAMTOR1 (p18) is required for epidermal barrier formation.」 日本分子生物学会 2011年12月13日 パシフィコ横浜

森 俊介, 小根山 千歳, 名田 茂之, 岡田 雅人, 他 「細胞増殖における後期エンドソームアンカータンパク質 p18 の役割」 日本分子生物学会 2011年12月16日 パシフィコ横浜

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/ocogene/index.htm>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

木村 透 (KIMURA TOHRU)
北里大学・理学部・教授
研究者番号：50280962