

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790345

研究課題名(和文)新規mTOR活性制御因子およびシグナル伝達因子のプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic approaches for identification of novel mTOR signaling molecules

研究代表者

佐藤 龍洋(Sato, Tatsuhiro)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：70547893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞においてRheb-mTORシグナル伝達経路の異常活性が報告されているが、Rheb-mTORによる細胞がん化のメカニズムについては不明な点が多い。そこで我々は新規Rheb-mTORシグナル伝達経路を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、RhebがDNA合成の基質量を調節する新規経路の可能性を明らかにした。また、mTOR複合体2(mTORC2)が細胞-基質間接着を制御する経路を明らかにした。本研究で明らかにした新規経路により、これまで知られていなかった細胞がん化経路の新展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although the ablation of Rheb-mTOR signaling pathway has been reported in many type of cancer cells, the mechanism by which Rheb-mTOR transforms cell has not been fully elucidated. Therefore, we explored novel Rheb and/or mTOR signaling pathways and found the novel signaling from Rheb, which appears to regulate pyrimidine nucleotide synthesis. In addition, we revealed the novel mTORC2 signaling pathway and showed that this pathway plays an important role in cell-matrix adhesions. Our findings may shed light on how Rheb and mTOR are involved in cancer signalings.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：mTOR Rictor Rheb シグナル伝達 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) は細胞外のアミノ酸およびインスリンに反応して細胞増殖や細胞の大きさ、アクチン細胞骨格形成の制御など、多くの機能を担う栄養応答因子である。mTOR の持つこの多機能性は、主にキナーゼ反応による下流タンパク質のリン酸化によって行われると考えられている。しかしながら、現在までに明らかにされている基質だけではすべての機能を説明できず、mTOR 経路にはいまだ未知のシグナル伝達因子が数多く存在すると考えられていた。

2. 研究の目的

mTOR にリン酸化調節される新規タンパク質の解析を行い、未知の mTOR シグナル伝達経路を同定する。また、新規 mTOR 結合タンパク質の同定を行い、mTOR 活性調節機構について解析を行う。そしてこれらの結果から mTOR を中心とした細胞機能を明らかにすると共に、mTOR 活性化と細胞がん化機構について解析を行い、新規抗がん剤のターゲット分子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) mTOR 複合体を構成する因子 mTOR, Raptor, Rictor, mLST8, Sin1, および mTORC1 活性化因子 Rheb をそれぞれ細胞内に発現させた後、免疫沈降法により精製して、これらのタンパク質に特異的に結合するタンパク質を同定する。これらのタンパク質は mTOR 複合体の制御因子、およびシグナル伝達因子に参与する可能性が考えられるため、mTORC1, mTORC2 への選択的結合の可能性、mTOR 活性へ影響、mTOR によるリン酸化の可能性について明らかにしたのち、それらが生理的条件においてどのように作用するかについて、培養細胞を用いて検討する。

(2) 培養細胞を 2 種類の異なる作用を持つ mTOR 阻害剤 (ラパマイシン、Torin1) で処理し、未処理細胞と比較して細胞内リン酸化タンパク質量の変化を 2 次元電気泳動 (2D-DIGE) 法で解析する。ラパマイシンは mTOR が構成する 2 つの複合体 mTORC1, mTORC2 のうち、mTORC1 のみを阻害し、一方 Torin1 は両複合体を阻害するため、未処理細胞、ラパマイシン処理細胞、Torin1 処理細胞のリン酸化タンパク質量を比較することで mTORC1, mTORC2 それぞれの基質タンパク質の網羅的検出が可能になると考えられる。このようにして検出したリン酸化タンパク質のスポットについて、LC-MS/MS 装置を用いてそのタンパク質の同定を行う。同定後、新規 mTOR 基質と考えられるタンパク質についてはその遺伝子をクローニングし、試験管内 mTOR 活性測定法により mTOR 基質の可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) Rheb 結合タンパク質の同定と解析

FLAG タグを付与した Rheb を HEK293T 細胞内に発現させて免疫沈降した結果、ピリミジヌクレオチド合成酵素のひとつである CAD を同定した (図 1)。

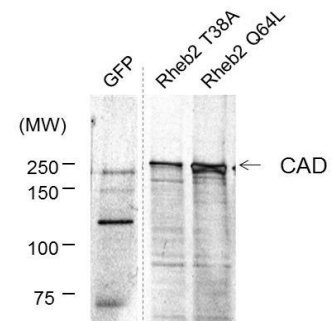


図 1. CAD の同定

Rheb-CAD の結合を解析した結果、CAD は Rheb の活性化型変異体、および Rheb-GTP 活性化型に強く結合することを見出した。また、Rheb が属する他の small GTPase には結合せず、Rheb 特異的に結合することを確認した。

Rheb による CAD 活性化を測定するために試験管内で簡易に CAD 酵素活性を測定する系を確立した。この方法を用いて活性を測定した結果、Rheb は CAD の持つ CPSase 酵素活性を上昇させることを見出した (図 2)。また、内在性の CAD 酵素活性の抑制因子、UTP や PRPP に対しては影響を及ぼさないことを明らかにした。

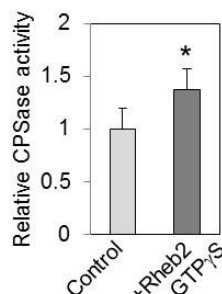


図 2. Rheb による CPSase 活性の調節

Rheb-mTOR シグナル伝達経路における CAD の関与について検討したが、CAD の細胞内過剰発現は mTOR シグナル伝達因子である S6 や Akt のリン酸化に変化をおよぼさなかった。このことから CAD は Rheb-mTOR シグナル伝達に影響しないと考えられた。

最後に、Rheb の活性化が細胞内ピリミジヌクレオチド量に及ぼす影響について検討した。その結果、TSC2 遺伝子欠損により Rheb が活性化した細胞では、TSC2 遺伝子を導入した細胞と比較してピリミジヌクレオチド量が増大していることがわかった。また、この細胞では、ラパマイシンを投与してもピリミジヌクレオチド量が維持されており、このことから Rheb の活性化が mTOR 非依存的に細胞内ピリミジヌクレ

オチド量を調節すると考えられた。

ピリミジンヌクレオチドの生合成は細胞の増殖に必須であり、がん細胞の増殖に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、Rheb が CAD を活性化すること、また Rheb がピリミジンヌクレオチド量を調節することを明らかにした。これらの結果をもとにさらなる解析を行うことで、TSC 遺伝子変異や Rheb 活性化に伴う細胞がん化機構の一端が解明され、新規抗がん剤開発に貢献することが期待できる。

(2) rictor 結合タンパク質の同定と解析

HEK293T 細胞に内在する rictor を特異的抗体を用いて免疫沈降した結果、新規結合タンパク質として Filamin A を同定した。

mTOR 複合体と filamin A の結合について検討したところ、filamin A は mTOR 複合体 2 (mTORC2) に結合するが、mTOR 複合体 1 (mTORC1) 構成因子 raptor には結合しなかった (図 3)。また、mTOR が結合しない条件においても filamin A は rictor に結合することから、filamin A は rictor を介して mTORC2 に結合することが示唆された。

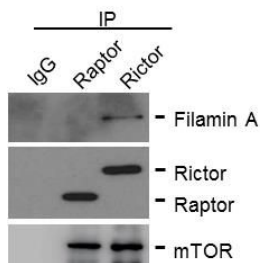


図 3 . Rictor と filamin A の結合

mTORC2 と filamin A が結合する条件を免疫染色により検討したところ、インスリン刺激時において運動先端に共局在すること (図 4) また、PI3K-Rac1 経路依存的事であることを明らかにした。

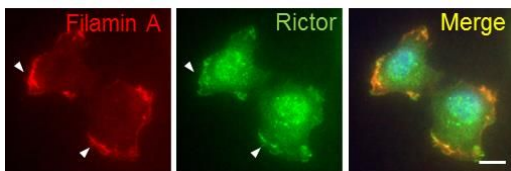


図 4 . Filamin A-rictor の共局在

mTORC2 を免疫沈降により精製し、試験管内において filamin A のリン酸化を検討したところ、mTORC2 は直接 filamin A のセリン 2152 番をリン酸化することを見出した。また、このリン酸化は細胞内においても観察され、インスリンにより上昇すること、mTOR 阻害剤により阻害されることを明らかにした (図 5)。

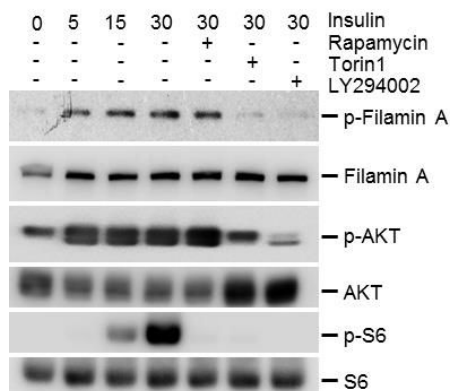


図 5 . mTORC2 による filamin A のリン酸化

mTORC2 による filamin A リン酸化の生理的意義を検討するため、非リン酸化変異体を作成して解析を行った。その結果、変異体は野生型と比較して integrin beta7 の細胞内ドメインへの結合が弱く、また、培養細胞に発現させた時、野生型と比較して変異体発現細胞はより小さい接着斑しか形成しなかった。このことから mTORC2 は filamin A をリン酸化して細胞-基質間の接着を制御すると考えられた。

(3) 2D-DIGE 法による新規 mTOR 基質の探索

CHO-IR 細胞からリン酸化タンパク質を精製し、2D-DIGE 法を用いてこれらの網羅的検出、比較を行った結果、複数のスポットが mTOR 阻害剤ラパマイシンおよび mTOR 阻害剤 Torin1 により減弱もしくは消失することを明らかにした (図 6、丸印)。これらのスポットを切り出し、LC-MS/MS 解析を行ったところ、複数のタンパク質を同定した。

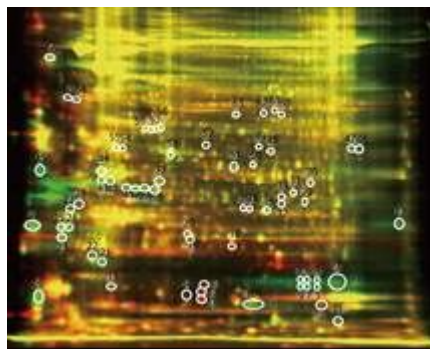


図 6 . 2D-DIGE 法による mTOR 基質探索

これらの遺伝子をクローニングし、細胞に発現させて 2 次元電気泳動を行ったところ、これらのタンパク質の等電点移動度の変化が確認できた。

そこでこれらのタンパク質を精製し、試験管内で mTOR キナーゼ反応を行った結果、2 つのタンパク質が mTOR 複合体 1 (mTORC1) によりリン酸されることを新規

に見出した。さらにこれらのタンパク質のリン酸化部位を検討し、それぞれのタンパク質においてリン酸化部位を1つ同定した。

なし

(3)連携研究者

なし

mTORC1 経路はさまざまながん細胞において異常に活性化していることが報告されているが、mTORC1 活性化による細胞がん化機構についてはほとんどわかっていない。本研究による新規基質の発見は mTOR による細胞がん化メカニズムの解明のきっかけとなることが期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド、神戸) 2013/12/5

佐藤 龍洋 「mTORC2 は filamin A を介して接着斑形成と細胞運動を制御する」

HUPO 12th Annual World Congress (パシフィコ横浜、横浜) 2013/09/16

佐藤 龍洋 「mTOR complex 2 phosphorylates filamin A to regulate cell migration」

第 35 回日本分子生物学会 (福岡国際会議場、博多) 2012/12/12

佐藤 龍洋 「mTORC2 は Filamin A を介して細胞運動を制御する」

22nd IUBMB-37th FEBS 2012/09/06 (Sevilla Convention Center, Spain, Sevilla)

佐藤 龍洋 「The analysis of the mechanism by which mTOR complex 2 regulates actin cytoskeleton」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 龍洋 (SATO, Tatsuhiro)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号: 70547893

(2)研究分担者