

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07295

研究課題名(和文) 可逆的アセチル化によるTSC2分子機能制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of TSC2 function by reversible acetylation

研究代表者

川口 禎晴 (Kawaguchi, Yoshiharu)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・主任研究員

研究者番号：00450833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分子に起こるアセチル化は、その分子の働きを調節する翻訳後修飾の一つである。我々は線維性硬化症の疾患因子であるTSC2分子にアセチル化が起こることを見出した。本研究では、可逆的アセチル化によるTSC2分子の機能調節の可能性について研究を行った。その結果、TSC2のアセチル化は、TSC2分子内のリン酸化状態を変化させてTSC2の働きを調節すること、またmTORシグナリングの活性化因子であるRhebとTSC2との相互作用を変化させることを明らかにし、結果としてmTORシグナリングを活性化することを発見した。さらに、このアセチル化は概日リズムに伴って変動することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、タンパク質のアセチル化がヒストンによる遺伝子発現調節以外にも重要な役割を担うことを示す重要な成果である。また、TSC2分子がmTORシグナリングの調節因子であることから、アセチル化によるTSC2分子の機能調節の発見はmTORの機能障害が関与する様々な疾患の病態解明や新規治療法の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Protein acetylation, a post transcriptional modification, is known to control protein function. We found a novel acetylation site on Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), and that this acetylation regulates TSC2 activity, which in turn controls mTOR signaling. Mechanistically, acetylation reduced Akt-mediated phosphorylation (Thr1462) and increased the ability of TSC2 to sequester an mTOR-activating GTPase, Rheb, thereby preventing mTOR activation. Moreover, we found that acetylation status of TSC2 changes with circadian rhythm. Our study suggests a mechanism whereby reversible acetylation regulates TSC2 activity to modulate mTOR activation, and provides a new therapeutic target for mTOR-mediated diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：アセチル化 TSC2 mTOR 翻訳後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアセチル化は分子の機能調節に関与する重要な翻訳後修飾の一つである。近年の網羅的なアセチル化タンパク質の解析から、ヒストンのアセチル化による遺伝子発現の調節以外にも様々なタンパク質分子が可逆的なアセチル化を受けていることが予想されていた。我々は独自の技術により、Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2)がアセチル化することを発見していた。このことは、TSC2分子が可逆的なアセチル化により機能調節を受けている可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

本研究では、可逆的なアセチル化による TSC2 分子の機能調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究計画 1 : TSC2 のアセチル化異常がもたらす機能異常の解明

TSC2 のアセチル化部位であるリジンをアルギニンに置換した変異体 (TSC2 アセチル化不全変異体) の発現プラスミドを作製し、培養細胞に発現させて TSC2 分子の mTOR 活性抑制を p70S6K のリン酸化を指標として評価した。また、TSC2 分子自身に起こるリン酸化修飾への影響を検討した。さらに、この変異体による mTOR 活性への影響の分子メカニズムについて、mTOR の活性化に必要な Rheb 分子との関連を検証した。

研究計画 2 : TSC2 分子の脱アセチル化酵素の探索

TSC2 の脱アセチル化を担う分子を決定するために、まずアセチル化された TSC2 を特異的に検出する抗体 (抗アセチル化 TSC2 抗体) をウサギを用いて作製した。続いて、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDACs) と NAD 依存ヒストン脱アセチル化酵素 (SIRT6) の各特異的阻害剤を培養細胞に投与し、TSC2 のアセチル化状態を抗アセチル化 TSC2 抗体により評価した。この実験により候補となった脱アセチル化酵素については、発現プラスミドを入手し、培養細胞に発現させて TSC2 のアセチル化状態を検証した。

4. 研究成果

1. TSC2 のアセチル化不全は TSC2 の働きを増強する。

作製した TSC2 アセチル化不全変異体 (TSC2-707KR) を培養細胞に発現させて TSC2 のリン酸化状態や、TSC2 の働きである mTOR 活性抑制作用を調べた。TSC2 は AKT により 1462 番目のスレオニン残基 (Thr1462) にリン酸化が起こる。このリン酸化により TSC2 の活性は抑制されることが報告されている。我々は、TSC2 アセチル化不全変異体では Thr1462 のリン酸化が野生型と比べて起こりにくいことを見出した (図 1A, B)。この結果は、TSC2 アセチル化不全変異体の働きが増強されていることを示唆している。TSC2 は mTOR 活性を抑制する因子である。このため、TSC2 の働きが高まると mTOR 活性はより強く抑制される。実際に mTOR 活性の指標である p70S6K のリン酸化を調べたところ、TSC2 アセチル化不全変異体ではリン酸化の強い抑制が観察された。これらのことは、TSC2 のアセチル化状態は TSC2 のリン酸化状態を変化させ、アセチル化不全では mTOR に対する抑制作用が増強されることにより、結果として mTOR 活性が抑制されることを示している。

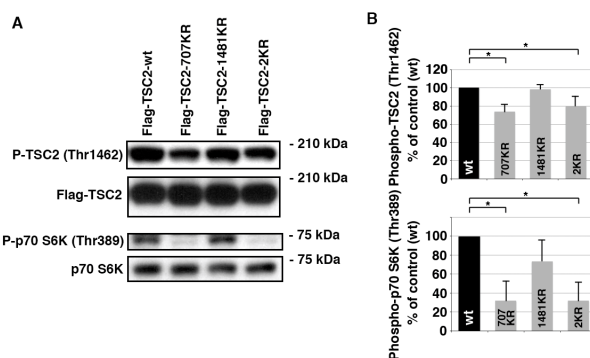


図 1. アセチル化不全変異体のリン酸化と mTOR 阻害効果

2. TSC2 アセチル化不全変異体は Rheb 分子を自身に取り込む

我々は、アセチル化不全変異体を用いた実験から、TSC2 のアセチル化不全は mTOR に対する抑制作用を増強させることを示した。この分子メカニズムを更に明らかにするために、mTOR の活性化因子である Rheb 分子に着目し、TSC2 分子との相互作用について検証を行った。培養細胞に TSC2 を発現させ、同時に Rheb も発現させて免疫沈降法で結合を観察した。その結果、TSC2 アセチル化不全変異体は野生型と比べて Rheb とより強く結合することを見出した (図 2 赤枠)。このことから、アセチル化不全は TSC2 の Rheb に対する結合能力を増強させ、mTOR 分子から Rheb を奪うことで mTOR の活性化を抑制していることが考えられた。

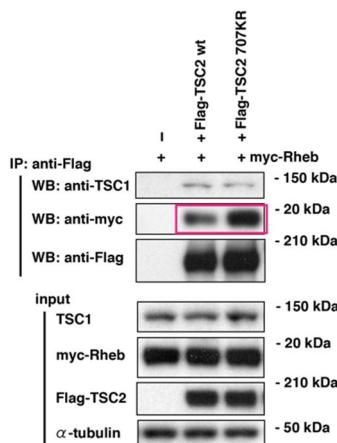


図2 . アセチル化不全変異体は Rheb 分子を取り込む

3 . SIRT1 は TSC2 の脱アセチル化酵素である

TSC2 の可逆的アセチル化を担う分子を決定するために、本研究では、脱アセチル化酵素の探索を行った。HDACs に対する特異的阻害剤 TSA と SIRT s に対する特異的阻害剤ニコチンアミドを培養細胞に投与し、抗アセチル化 TSC2 抗体を用いて TSC2 のアセチル化の程度を評価した。その結果、ニコチンアミドにおいてアセチル化 TSC2 の増加が観察された (図 3 A)。一方、TSA では TSC2 のアセチル化は影響を受けなかった。このことから、TSC2 の脱アセチル化酵素として SIRT s が考えられた。続いて、SIRT s の中で細胞質で働く SIRT1 に着目し、TSC2 の脱アセチル化酵素としての可能性を検証した。培養細胞に SIRT1 の野生型 (wt) と酵素活性欠損型 (H386Y) をそれぞれ発現させて、上述と同様に TSC2 のアセチル化の程度を評価した。その結果、野生型を発現させた場合において、アセチル化 TSC2 量の著しい減少が観察された。また、この時 p70S6K のリン酸化も減少しており、mTOR 活性の強い阻害が起こっていると考えられた。この結果は上述のアセチル化不全変異体の実験結果と一致した。一方、酵素活性欠損型ではいずれの影響とも観察されなかった。これらの結果は、SIRT1 が TSC2 の脱アセチル化酵素として働くことを示している。

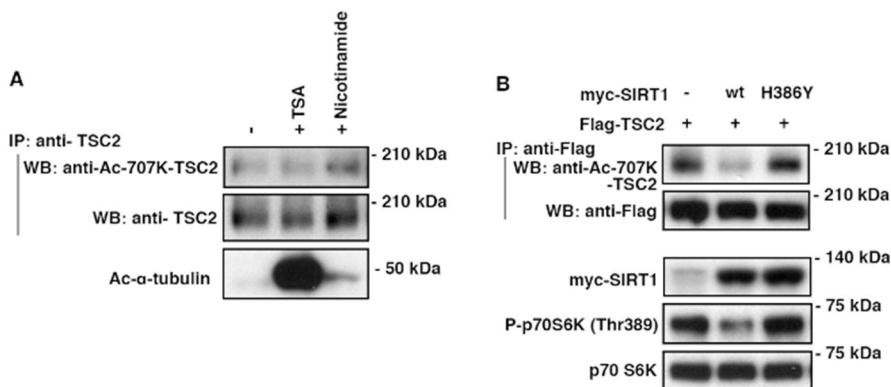


図3 . SIRT1 は TSC2 の脱アセチル化酵素である

以上の結果から、TSC2 のアセチル化は TSC2 の mTOR 活性に対する阻害効果を調節し、結果として mTOR シグナリングを制御していることが示された。また、その脱アセチル化を担う分子として SIRT1 が同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口禎晴、深田斉秀、竹島京子、中山敦雄
2. 発表標題 自閉症関連因子TSC2の可逆的アセチル化による制御とmTOR活性
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2018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
---------	---------