

平成 21年 5月 25日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590308

研究課題名 (和文) mTOR を介した栄養環境感知システムの機能異常と病態

研究課題名 (英文) Regulation of mTOR-mediated nutrition sensing system

研究代表者

原 賢太 (HARA KENTA)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70397826

研究成果の概要：

1. mTOR を介した細胞内シグナルの分子基盤の解明:Raptor に結合する新規蛋白として PRAS40 を見出した。PRAS40 は mTOR によって直接リン酸化される生理的基質であることが判明した。
2. mTOR シグナル改変モデルマウスの解析：膵β細胞特異的に mTORC1 経路が活性化されたマウスを作製し解析した。このマウスは良好なインスリン分泌能を示し、膵β細胞の破壊や肥満によって引き起こされる糖尿病の発症を抑制していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：分子病態栄養学

1. 研究開始当初の背景

哺乳細胞には、単細胞生物から進化的に保存された細胞外栄養環境を感知するシステムが存在し、栄養条件の低下した状況では、無駄な細胞増殖刺激を抑制し、生命の恒常性を維持するシステム：細胞栄養環境チェックポイントシステムが存在する。この栄養環境チェックポイントシステムに中心的役割を担っている分子が、ラパマイシン標的分子で

あるリン酸化酵素 mTOR である。

臨床的側面から、mTOR 阻害剤ラパマイシンに関して以下のような重要な点が知られている。

(1) mTOR の阻害剤ラパマイシンは免疫抑制剤としてまず臨床応用が始まり、現在移植医療において、世界で広く利用されている。

(2) Drug Eluting Stent として、ラパマイシンは冠動脈ステントの再狭窄を劇的に低下させることが報告され、虚血性心疾患の

インターベンション治療において、非常に重要な位置を占めるに至っている。

(3) ラパマイシンは抗癌剤としても、欧米各国で既に第三相臨床治験が行われている。これらの臨床効果はすべて、ラパマイシンの mTOR に対する特異的阻害効果から得られるものである。

裏を返せば、ヒト生体において mTOR を解した細胞内シグナルは、免疫応答、動脈硬化や血管内皮機能と増殖、発癌のメカニズムに非常に深く関わっていることを臨床的に示している。

しかしながら、以下のような点が全く解明されずに残っている。

(1) 細胞がいかんして細胞環境中のアミノ酸濃度を感知するか？

(2) アミノ酸が mTOR を介して細胞の成長・増殖を引き起こす詳細な分子メカニズム

(3) mTOR シグナルが生体でどのように組織の成長・再生やエネルギー代謝に関与しているか？

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本申請の目的は、細胞外栄養バランスの感知システムの分子基盤を明らかにし、その生理的意義を解明するとともに、その異常がもたらす病態がいかなる分子メカニズムによっているのかを明らかにすることである。

そのため、以下の3点に着目して研究計画を立て遂行した。

- (1) mTOR を解した細胞内シグナルの分子基盤を分子生物学的に明らかにする。特に mTOR-Raptor を中心としたシグナル複合体の解析を中心にして解析。
- (2) マウスモデルを用いて mTOR シグナルの機能異常と病態を分子生物学的に明らかにする。特に Rheb 発現トランスジェニックマウスの作成と解析。
- (3) 糖尿病や肝不全への臨床応用の糸口を見出す。マウスを用いて特に膵β細胞と肝の再生に注目して解析。

3. 研究の方法

- (1) mTOR を解した細胞内シグナルの分子基盤の分子生物学的解析

FLAG-Tag 付きの Raptor や Rheb を培養細胞や実験動物ラットの肝臓に発現させ、抗 FLAG 抗体で FLAG-Raptor や FLAG-Rheb を精製し、共精製されてくる蛋白を探索する。候補蛋白はサンプルを SDS-PAGE で分離後、ゲ

ル内で protease で peptide 断片化した後、質量分析装置にかけ、マスフィンガープリンティング法にて蛋白を同定する。同定した蛋白に対しては、更に以下のような解析を行う。
①特異抗体を作成し、内因性蛋白が実際に Rheb や Raptor と会合するか。それらの会合が、細胞環境中の栄養の変化によって影響を受けるか。
②新規同定蛋白の結合が mTOR の酵素活性や、エフェクター分子 p70 と 4EBP1 のリン酸化や活性化に対してどのような影響を及ぼすか。
③インスリンや各種の細胞外に由来する細胞増殖刺激による細胞の挙動が、新規同定蛋白を RNAi 法でノックダウンした場合に、いかなる影響を受けるか。
④得られた新規分子に酵素活性を示唆する領域が認められる場合は、その蛋白の酵素活性が細胞環境中の栄養素、特にアミノ酸濃度の変化によって変動が見られるか。

- (2) Rheb トランスジェニックマウスを用いた解析

rat insulin promotor を用いて膵β細胞特異的に Rheb を発現するモデルマウスを作成した。①糖負荷に対するインスリン分泌能を解析し、②組織学的に膵島やβ細胞のサイズや増殖に対する影響を検討する。③免疫染色やウエスタンブロット法を用いて、各種 mTOR シグナルのエフェクター分子の活性化をリン酸化抗体を用いて検討する。④単離膵島を用いて、in vitro でインスリンやアミノ酸刺激を加えて、細胞内リン酸化シグナルを解析するとともに、糖刺激に対するインスリン分泌能を検討する。⑤STZ 処理をしたマウスは膵β細胞の破壊が起こり糖尿病を発症する。そこで、Rheb トランスジェニックマウスに STZ 処理を行い、糖尿病発症に対する抑制効果を検討する。⑤肥満糖尿病モデルマウスを用いて、糖尿病発症に対する抑制効果を検討する。

4. 研究成果

- (1) mTOR を解した細胞内シグナルの分子基盤の分子生物学的解析

Raptor 結合蛋白のひとつとして、PRAS40 (Proline Rich Akt Substrate of 40 kda) を同定した。PRAS40 には既知の mTOR の基質である p70S6K や 4EBP1 に存在する TOS motif (TOR signaling motif) が存在していた。TOS motif は raptor との結合に必要とされているアミノ酸配列であり、PRAS40 上に存在する TOS motif 中の Phe129 を Ala に置換すると Raptor との結合性が低下していた。更に mTOR によるリン酸化部位として、Ser183 を同定したが、この Ser 残基を Asp に置換した

mutant では Raptor との結合能が低下していた。Ser183 のリン酸化はラパマイシン処理や 2-deoxyglucose 処理による AMPK の活性化によって mTOR を阻害することにより低下していた。更に、アミノ酸除去によっても Ser183 のリン酸化は低下しその低下は mTOR の活性化を引き起こす Rheb の発現によって回復した。PRAS40 の過剰発現は、p70S6K や 4EBP1 の mTOR によるリン酸化部位のリン酸化を抑制する一方、p70S6K や 4EBP1 の過剰発現は PRAS40 の Ser183 のリン酸化を抑制した。逆に PRAS40 の発現を RNAi で抑制すると p70S6K や 4EBP1 のリン酸化は上昇していた。これらの結果は、PRAS40 が mTORC1 の生理的基質であることを示しており、mTORC1 の基質が相互にリン酸化制御に影響していることを示している。

(2) Rheb トランスジェニックマウスを用いた解析

膵臓 β 細胞特異的に Rheb を発現させたトランスジェニックマウスにおいては、良好なインスリン分泌を示し、肥満やストレプトゾトシン誘導糖尿病の発症を抑制した。その機序として、膵 β 細胞の増殖の亢進やアポトーシスの抑制には有意な差が認められなかったのに対し、膵 β 細胞の成長がトランスジェニックマウスで有意に亢進していた。一方、mTOR 阻害剤ラパマイシンでマウスの処理を行うと、耐糖能異常が出現し、インスリン抵抗性に対する代償性の β 細胞の増大が抑制されている可能性が考えられた。また Rheb 発現によって得られた良好なインスリン分泌能が抑制されていた。mTOR シグナルは全身のインスリン抵抗性と膵 β 細胞の代償性過形成の両方に関与している可能性が考えられた。

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 8 件)

1. Hamada S., Hara K., Hamada T., Yasuda H., Moriyama H., Nakayama R., Nagata M., Yokono K. Upregulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Rheb in Pancreatic β Cells Leads to Increased β Cell Mass and Prevention of Hyperglycemia. *Diabetes* 58: 1321-1332 査読有(2009)
2. Okumachi Y., Moriyama H., Kamenno M., Arai T., Kishi M., Kurohara M., Yamada

- K., Yasuda H., Hara K., Yokono K., Nagata M. One amino acid difference is critical for suppression for the development of experimental autoimmune diabetes (EAD) with intravenous injection of insulin:9-23 peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 581-586 査読有(2008)
3. Sakata M., Yasuda H., Moriyama K., Yamada K., Kotani R., Kurohara M., Okumachi Y., Kishi M., Arai T., Hara K., Hamada H., Yokono K., Nagata M. Prevention of recurrent but not spontaneous autoimmune diabetes by transplanted NOD islets adenovirally transduced with immunomodulating molecules. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 80:352-359 査読有(2008)
4. Oshiro N., Takahashi R., Yoshino K-I., Tanimura K., Nakashima A., Eguchi S., Miyamoto T., Hara K., Takehana K., Avruch J., Kikkawa U., Yonezawa K. The Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mTOR complex 1. *J. Biol. Chem.* 282: 20329-20339 査読有(2007)
5. Zhou J., Hara K., Inoue M., Hamada S., Yasuda H., Moriyama H., Endo H., Hirota K., Yonezawa K., Nagata M., Yokono K. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions. *Kobe J. Med. Sci.* 53: 283-296 査読有(2007)
6. Yamada K., Moriyama H., Yasuda H., Hara K., Maniwa Y., Hamada H., Yokono K., Nagata M. Modification of the Rb-binding Domain of Replication-Competent Adenovirus Vector Enhances Cytotoxicity Against Human Esophageal

Cancers via NF- κ B Activity. *Human Gene Therapy* 2007 18:389-400 査読有(2007)

7. Moriyama H., Nagata M., Arai T., Okumachi Y., Yamada K., Kotani R., Yasuda H., Hara K., Yokono K. Insulin as a T cell antigen in type 1 diabetes supported by the evidence from the insulin knockout NOD mice. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77:S155-160 査読有(2007)
8. Nagata M., Moriyama H., Kotani R., Yasuda H., Kishi M., Kurohara M., Hara K., Yokono K. Immunological Aspects of 'Fulminant Type 1 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77:S99-103 査読有(2007)

[学会発表] (計 4 件)

1. 濱田水鈴、原 賢太、中村 晃、安田尚史、森山啓明、永田正男、横野浩一 膵 β 細胞におけるmTORシグナルの活性化と糖尿病発症の抑制。第 50 回日本老年医学会学術集会・総会(2008. 6. 19-21. 千葉)
2. Kenta Hara, Suirin Hamada, Akira Nakamura, Hisafumi Yasuda, Hiroaki Moriyama, Masao Nagata, Koichi Yokono; Upregulation of mTORC1 pathway by Rheb in pancreatic β cells leads to increased β cell mass and prevention of hyperglycemia. 68th Scientific Sessions, The American Diabetes Association (2008. 6. 6-10. San Francisco, CA, USA)
3. 濱田水鈴、原 賢太、中村 晃、安田尚史、森山啓明、永田正男、横野浩一 mTORシグナルのRhebによる活性化は膵 β 細胞の成長を促し高血糖を抑制する。第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会(2008. 5. 22-24. 東京)
4. 原 賢太、濱田水鈴、濱田 猛、中村 晃、安田尚史、森山啓明、永田正男、横野浩一 RhebによるmTORC1 経路の活性化は膵 β 細胞の成長を促し高血糖を抑制する。第 19 回分子糖尿病学シンポジウム(2007. 12. 8. 神戸)

[図書] (計 1 件)

1. 原賢太、米澤一仁 西村書店
糖尿病学 基礎と臨床 (分担執筆)
「インスリンによる蛋白合成系とその調節」
(p221-225) 2007 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 賢太 (HARA KENTA)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：7 0 3 9 7 8 2 6

(2) 研究分担者

横野 浩一 (YOKONO KOICHI)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：5 0 1 4 4 5 8 0

永田 正男 (NAGATA MASAO)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：7 0 2 9 4 2 2 0

森山 啓明 (MORIYAMA HIROAKI)
神戸大学・大学院医学研究科・臨床研究員
研究者番号：7 0 3 7 2 6 4 6

安田尚史 (YASUDA HISAFUMI)
神戸大学・大学院医学研究科・臨床研究員
研究者番号：5 0 4 0 3 2 3 3

(3) 連携研究者

該当なし