

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770129

研究課題名(和文)リン酸化プロテオミクスによる新規mTOR下流候補分子群の網羅的同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of mTOR downstream molecules using phosphoproteomic technology

研究代表者

中津海 洋一 (NAKATSUMI, Hirokazu)

九州大学・生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：20596837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：mTORC1キナーゼ阻害剤であるラパマイシンは、抗がん剤としての作用に注目が集まるものの、mTORC1抑制以下の詳細な作業機序は不明であった。申請者はリン酸化プロテオミクス解析により、のべ20000を超えるリン酸化を解析し、mTORC1キナーゼによって制御されるリン酸化を新規に約30分子同定した。その中でも転写因子FOXK1に着目して解析した結果、mTORC1-FOXK1-CCL2というシグナル経路の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rapamycin, mTORC1 inhibitor, has drug efficacy of anti-cancer. However, effectors of mTORC1 kinase are not fully understood. To explore the effectors of mTORC1, we carried out phosphoproteomics analysis and newly identified 30 effectors from the total 20000 phosphopeptides. Next, we analyzed FOXK1 as a transcription factor activated by mTORC1, and identified mTORC1-FOXK1-CCL2 signaling pathway.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：mTOR

### 1. 研究開始当初の背景

近年、mTORの研究は爆発的な広がりを見せている。mTORは真核生物全般に広く保存されたリン酸化酵素である。そしてアミノ酸感知やインスリンシグナル経路の中心に位置し、細胞成長を司る分子として知られている。mTORは様々な細胞機能を制御する。活性化したmTORは転写・翻訳の制御、細胞の大きさや細胞骨格の制御、オートファジーの制御などを行い、細胞を成長へとシフトさせる。またmTORの重要性に加えて、その阻害剤であるラパマイシンの薬効作用も大きな注目を集めている。線虫やマウスにラパマイシンを投与すると寿命が延長することが知られ、またヒトの悪性腫瘍や2型糖尿病のような代謝不全、さらに良性の造腫瘍症候群に対して高い治療効果をあげる。以上のようにmTORについての研究は盛んになされているが、これまでの研究はmTOR自身の活性化機構に集中しており、一方で「活性化したmTORがどの下流分子を活性化させるか」についての知見は圧倒的に少ない。mTORが活性化させる下流分子群には細胞を成長へと導く際の実行因子や、ラパマイシンの薬効を説明する分子が含まれるはずだが、現在知られている下流分子だけではmTORの多彩な機能を説明するには十分とは言えず、未知の下流分子群の同定は大きな課題といえる。

### 2. 研究の目的

mTORの下流分子群を同定することで、細胞の栄養応答や、ラパマイシンの薬効について分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

申請者の所属する研究室では質量分析計を用いた解析技術の開発を10年以上にわたって行ってきた。その中でリン酸化の大規模な定量解析のための新規技術(Phospho-iTRAQシステム)を確立している。このシステムを用いれば、一度の解析で10,000を超えるリン酸化についてその変動を定量的に比較することが可能である。申請者は複数の実験条件におけるリン酸化の変動について大規模データを取得し、以下の条件を満たすリン酸化の絞り込みを行う。①血清刺激によってmTORを活性化させた際に亢進するリン酸化の中で、②ラパマイシン処理によって抑制されるものを選び、③その中からERK阻害剤では抑制されないリン酸化をリスト化する。またその中から④インス

リン刺激によってmTORを活性化させると亢進するリン酸化で、⑤かつアミノ酸刺激によっても亢進するリン酸化を選び出す。上記の5つの条件を組み合わせた解析から新規のmTOR下流候補分子を探索する。さらにその中からいくつかの分子に着目し、詳細な解析を進める。

### 4. 研究成果

申請者は上述したPhospho-iTRAQシステムを用いて、ラパマイシン処理、インスリン刺激、アミノ酸刺激による細胞内リン酸化の応答を解析した。のべ20,000を超えるリン酸化を同定し、刺激前後でのリン酸化の変動を定量した結果、mTORC1の新規下流分子として30分子を同定した。その中にはフォークヘッド転写因子FOXK1が含まれ、申請者はこれに着目した(図1)。

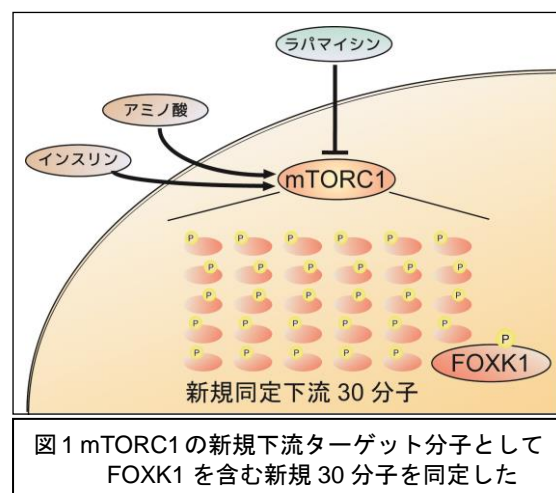
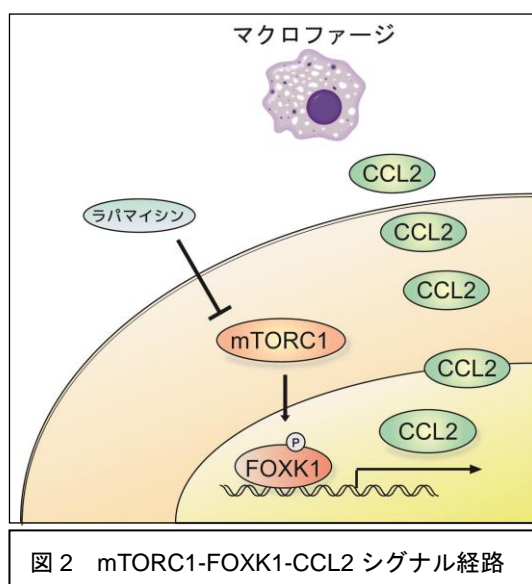


図1 mTORC1の新規下流ターゲット分子としてFOXK1を含む新規30分子を同定した

引き続きマイクロアレイ解析とChIP解析を行った。mTORC1-FOXK1経路の下流で発現上昇する遺伝子を探索するために、RhebCAを細胞に導入しmTORC1したサンプル、RhebCA導入とともにRapamycinを処理したサンプル、FOXK1をノックダウンしたサンプル、FOXK1をノックダウンしたのちにRhebCAを導入したサンプルで遺伝子発現を網羅的に比較したところ、炎症性ケモカインであるCCL2が唯一のターゲット遺伝子であるとわかった。さらにChIP-qPCR解析を行ったところ、CCL2上流にFOXK1が結合し、またその結合能はmTORC1の活性依存的に変動することが明らかとなった。これらの結果を総合すると、新規経路としてmTORC1-FOXK1-CCL2経路を明らかにしたと言える。(図2)



### 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 3 件)

1) Kanie T., Onoyama I., Matsumoto A., Yamada M., Nakatsumi H., Tateishi Y., Yamamura S., Tsunematsu R., Matsumoto M., Nakayama K. I.: Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. *Mol. Cell Biol.*, 32: 590-605 (2012) doi: 10.1128/MCB.06570-11.

2) 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一 「mTOR ターゲットのリン酸化プロテオミクス」 *細胞工学* 31: 1360-1367 (2012)

3) 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一 「次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新天地平: ウェスタンブロッティングはもう要らない?!」 *生化学* 84: 53-57 (2012)

[学会発表] (計 6 件)

1) °Nakatsumi H., Matsumoto M., Nakayama K. I.: FOXK1 mediates mTORC1-dependent chemokine production and promotes cancer progression. *The 23<sup>th</sup> Hot Spring Harbor Symposium, Japan* (2013) (Poster presentation) (査読有)

2) °Nakatsumi H., Matsumoto M., Nakayama K. I.: Identification of a novel mTOR target linking to transcriptional regulation and cancer progression. *The 8<sup>th</sup> International Symposium of the Institute*

*Network, Japan* (2013) (Poster presentation)

3) °中津海洋一 「リン酸化プロテオミクス解析から明らかになった mTORC1 による癌微小環境の制御」 *大阪大学蛋白研究所セミナー キナーゼ・シグナリング研究の進展* (2013) (招待講演)

4) °中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一 「mTORC1 と炎症性ケモカインをつなぐ新規分子の発見とがん促進作用」 *第 36 回分子生物学学会* (2013) (ポスター発表)

5) °中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一 「栄養シグナルと炎症の接点!? : mTORC1 と炎症性ケモカインをつなぐ新規分子の発見とがん促進作用」 *第 25 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム* (2013) (ポスター発表)

6) °中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一 「mTOR と転写をつなぐ新規分子 FOXK1 の発見と癌進展における促進作用」 *第 35 回分子生物学会* (2012) (ワークショップ) (招待講演)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中津海 洋一 (NAKATSUMI Hirokazu)  
九州大学・生体防御医学研究所・学術研究員  
研究者番号：20596837

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：