

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成16年度博士課程 進学

氏名 大根 陽一郎

指導教員名 高橋 直樹

論文題目 mTOR 経路解析のツールとしての高活性型変異 mTOR の単離と解析

細胞にとって周囲の栄養状態の検知は能動的なプロセスであり、その変動を細胞内シグナルに変換し、様々な細胞機能を制御することで個体の生存を有利にしていく。TOR (Target of rapamycin)は免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子として同定されたセリン/スレオニンキナーゼであり、栄養源の検知とそれに伴う細胞応答に中心的な役割を担っている。TOR は構成的に異なる2種類の複合体である TORC1、TORC2 として存在しており、互いは独立した機能を持っている。TOR 自身のみならず、複合体の構成因子も酵母から哺乳類まで高度に保存されており、TOR が有する機能の普遍性が示唆されている。TORC1 (TOR complex 1)はラパマイシン感受性であり、栄養状態に応答して、翻訳やリボソーム合成、栄養素の取り込み、オートファジーの制御を行う。一方 TORC2 はラパマイシン非感受性であり、アクチン骨格の制御に関与することが知られている。

哺乳類 mTOR においては mTORC1 が栄養、特にアミノ酸に応答し、翻訳を制御することが詳細に調べられており、S6K (ribosomal S6 kinase) や 4EBP1 (eIF4E binding protein 1)を直接リン酸化することで翻訳開始を促進する。一方 mTORC2 に関しては、アクチン骨格の制御に加え、これまで未知であった Akt の疎水性領域のリン酸化 (Ser473)を担うキナーゼであることが最近報告され、酵母とは異なる哺乳類独自の機能を持つことが注目されている。また、mTORC1 の上流には PI3K、Akt など、下流因子には 4EBP1 や eIF4E といった細胞癌化に関

与する因子が見られること、さらに上述した mTORC2 が Akt の上流で働くという知見からも、発癌への関与が注目を集めている。同時に PI3K/Akt 経路は細胞の大きさを制御することも知られており mTOR の心筋の過形成による心臓疾患への関与も示唆されている。この他にも多くの細胞応答において mTOR の関与が報告されており、多様な機能を持つことが推測される。また、それらの機能を制御するための mTOR 下流因子の同定なども詳細な研究が進みつつある。

一方、mTOR 経路に関していくつかの重要な点が明らかにされていない。まず、mTOR 自体の活性化制御については多くが不明である。すなわち、mTOR が活性化されたとする条件において mTOR のリン酸化活性は変化するのか、あるいは mTOR と基質の接近を可能にする scaffold 因子がリクルートされるのか、ということに関しての答えは得られていない。さらに、アミノ酸の検知と mTOR の間をつなぐ上流因子に関しても未知の点が多い。また、これまでの多くの研究がラパマイシンを用いた機能阻害に依るものであり、その逆の経路活性化による解析が対となるべきであるとも考えられる。このような点から、mTOR 経路を詳細に解析するにあたり、ツールとしての活性化型変異 mTOR の存在は欠かせないものであろう。そこで本研究ではその単離を目指した。

mTOR の活性化型変異に関して、少なくとも現時点で疾患の原因となるような機能獲得型の変異は報告されていない。また、前述の通り mTOR 自体の活性化を制御する分子機構についてはほとんどわかっておらず、恒常的活性化型 mTOR を設計して作成することは難しいと思われる。

当研究室では以前、酵母 TOR2 においてリン酸化活性が高い変異体の単離に成功した。ただし、この変異 TOR2 の相同変異を mTOR に導入しても同じような性質は認められなかった。そこで本研究では mTOR そのものにランダムな変異を導入し、高活性化変異体のスクリーニングを試みた。さらに得られた変異体の解析と、細胞における mTOR 機能の解析を行うことにした。

#### 酵母を用いた活性化 mTOR のスクリーニング

活性化型 mTOR のスクリーニングは以下の 2 つの知見に基づいて行った。

- 1 当研究室が取得した酵母 TOR2 の活性化型変異体はキナーゼドメインの変異により野生型に比べ高いキナーゼ活性を有しており、遺伝学的にも活性化型と呼べるものだった。さらにこの活性化型 TOR2 は、TORC1 と TORC2 に共通したサブユニットである LST8 の温度感受性株 (*lst8<sup>ts</sup>* 株) の温度感受性を抑圧することができた。
- 2 酵母 TOR2 のキナーゼドメインを含む C 末端領域は、その高い相同性により mTOR の相同部分による置換が可能であった。

実際のスクリーニングは次のように行った。TOR2 の C 末端領域を mTOR の相同部分で置

換した TOR2-mTOR キメラを作成する。この TOR2-mTOR キメラの mTOR 由来の部分に PCR によりランダムに変異を導入し、*Ist8<sup>ts</sup>* 株の温度感受性を抑圧することを指標にスクリーニングを行う。得られた変異を mTOR に戻し、活性化型の性質を有することを確認する。

上記の戦略の下、約 600 万の変異体をスクリーニングし、191 クローンの候補を得た。しかし、プラスミドを回収し *Ist8<sup>ts</sup>* 株に再形質転換を行ったところ、抑圧に再現性を示すプラスミドは得られなかった。ただし、いくつかの変異体で野生型 TOR2-mTOR キメラと異なる性質を示すと考えられたため詳細に検討したところ、これらの変異体は野生型に比べ高い活性を有しているが、*Ist8<sup>ts</sup>* 株の温度感受性を抑圧するまでには至っていないことが推測された。そこでそれまでの予備実験によって、より感度良く TOR2-mTOR キメラの活性化状態をモニターできると考えられた *tor1 Δ tor2<sup>ts</sup>* 株に候補クローンを導入したところ、複数の変異体で野生型に比べ温度感受性を強く相補した。このことから、活性化型 TOR2-mTOR キメラが得られたと結論した。得られた複数の変異体に関し変異箇所を決定し、培養細胞での検討のため mTOR に同じ変異を導入した。

#### 培養細胞における活性化 mTOR の解析

得られた変異 mTOR が培養細胞においても活性化型の性質を示すか否か検討した。まず、S6K とともに FLAG タグを N 末に融合した野生型 mTOR (mTOR (wt)) もしくは変異型 mTOR を HeLa 細胞に同時に導入し、その S6K のリン酸化状態をウエスタン法により調べた。S6K は増殖培地中では強くリン酸化されているが、アミノ酸を除いた培地で培養すると速やかに脱リン酸化される。mTOR (wt) を導入した細胞では S6K はアミノ酸除去により速やかに脱リン酸化されたのに対し、変異型 mTOR ではリン酸化が保持された。ただし、野生型に比べて脱リン酸化のスピードは遅れるものの、時間が経つと変異型でもいずれは脱リン酸化されてしまうことが分かった。また、興味深いことに mTOR (wt) と変異型 mTOR のプラスミド DNA を等量導入しているにもかかわらず、変異型 mTOR の発現量が mTOR (wt) と比較して増加しており、変異型 mTOR の導入により細胞内で翻訳の活性化が起こっていることを示唆していた。試行した変異体のうち、最も活性が強いと思われた mTOR (15-1) を以後の解析に用いた。また、S6K 以外の mTOR の基質である 4EBP1 についても S6K と同様の結果が得られた。

次にキナーゼアッセイを行い、変異型 mTOR のリン酸化活性を調べた。mTOR (wt) もしくは mTOR (15-1) を HeLa 細胞に導入し、細胞抽出液から抗 FLAG ピーズを用いて免疫沈降により精製し、ビーズ上で 4EBP1 を基質にリン酸化反応を行った。続いて 4EBP1 のリン酸化特異的抗体を用いたウエスタン法によりリン酸化 4EBP1 を検出したところ、mTOR (wt) に比べ mTOR (15-1) で 4EBP1 が強くリン酸化されていた。次に  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて同様の実験を行い、4EBP1 のリン酸化状態を定量したところ、変異型 mTOR では野生型に比べ 4 倍以上の比活性を持つことが示された。また、mTOR の自己リン酸化も mTOR (15-1) で強く検出され

た。これらのことより、得られた変異体は当初の狙い通り高い活性を示す mTOR であると思われた。また、TOR 複合体の構成を共免疫沈降により調べたところ、結合しているサブユニットの量は野生型と変異型 mTOR の間に大きな差は見られず、*in vivo*、*in vitro* における高い活性はサブユニットの構成の変化によるものではなく、キナーゼドメインの変異による触媒活性の上昇であることが強く示唆された。

以上の解析により、mTOR (15-1)は mTORC1 の基質に関して活性化型の挙動を示すことがわかった。次に mTORC2 における活性化型 mTOR の影響について、mTORC2 によりリン酸化される Akt の Ser473 のリン酸化を指標に検討した。Akt を mTOR (wt)もしくは mTOR (15-1)と同時に HeLa 細胞に導入し、血清を除去したときの Akt のリン酸化状態を調べた。Akt のリン酸化は血清除去の時間依存的に減少したが、野生型に比べ、活性化型でリン酸化の減少が抑えられており、mTORC2 においても活性化型 mTOR が機能することが示された。

#### まとめと今後の展望

本研究において、酵母を用いたスクリーニングによりこれまで報告のなかった mTOR の活性化型変異体の単離に成功した。現在この変異体の安定発現細胞株を作成しており、この細胞株において、これまで mTOR が関与すると考えられてきた機能における活性化型変異体の影響を調べる予定である。例えば、前述したように mTOR は癌化における関与が示唆されており、PI3K や Akt の活性化型変異体により引き起こされる癌化はラパマイシン添加により抑制される。よって、活性化型 mTOR を発現する細胞において癌化に関連した形質を調べること、mTOR 自体の活性化が発癌に対して積極的な作用を持ちうるかについて検討できると思われる。

このこととは別に、活性化型 mTOR の導入により細胞は周囲のアミノ酸濃度の低下に対する応答が鈍くなることが示されていることから、多細胞生物における栄養飢餓応答の意義に迫れるのではないかと考えている。すなわち、酵母のような単細胞生物では周囲の栄養が乏しくなったとき、速やかにタンパク質合成を停止しオートファジーを誘導することで、生存率を保つと考えられる。実際に、活性化型 TOR1 が導入された酵母においては適切な飢餓応答が出来ないことにより、栄養飢餓時の生存率が顕著に減少することを当研究室では明らかにしている。

一方、多細胞生物では個々の細胞や組織は細胞接着や液性因子などを介して協調しており、個々の細胞の飢餓応答は均一ではない可能性がある。またショウジョウバエでは、脂肪体（哺乳類の肝臓や脂肪組織に当たる）特異的に TOR を欠損させた場合、幼虫全体の成長が抑制されるという報告もあり、組織毎の栄養検知の役割の違いも示唆されている。これらのことから、活性化型 mTOR を導入したノックインマウスの作成を計画している。体内の栄養レベルの低下に対する応答が鈍くなったときに、個体としてどのような形質が出るかを観察することで、個体レベルの飢餓応答の意義について調べたいと考えている。