

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 大根 陽一郎

---

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。哺乳類におけるTORであるmTORはアミノ酸の変動を検知し、細胞成長を制御している。mTORは発癌への関与が示唆されていることから、その研究成果は病理学的や薬理的にも有用な知見に繋がることが見込まれる。mTORの機能を解析する手段の一つとして、活性化型変異体を利用することが考えられるが、これまでにmTORの活性化型変異体は得られていない。本研究では、活性化型mTORの単離のために酵母を用いたスクリーニング系を構築し、得られた活性化型変異体を哺乳類の培養細胞で解析を行っている。

序章では、研究の背景と目的を述べている。酵母TOR、哺乳類mTORの構造的な特徴や機能を記述した後、酵母TORがTORC1、TORC2という異なる複合体として機能すること、哺乳類においても相同なmTORC1、mTORC2が存在することを説明している。さらに、mTOR経路の上流や下流の因子について詳説している。最後に、未だ詳細が不明であるmTOR自体の活性制御や発癌への関与、個体におけるmTORの機能について記述し、その解明に活性化型mTORが寄与しうる可能性について概説し、本研究の目的を明らかにしている。

一章では、酵母を用いた活性化型mTORのスクリーニングと、得られた変異体について記述している。酵母Tor2pとmTORを融合させたTOR2-mTORキメラを作成し、これを用いることにより、酵母内で活性化型mTORをスクリーニングすることを可能にしている。活性化型TOR2-mTORキメラの選択の指標として、酵母TORC1、TORC2に共通のサブユニットである*lst8*温度感受性株の温度感受性を抑圧することとしている。TOR2-mTORキメラのmTOR部分に変異を導入し、約1100万のクローンのスクリーニングを行い、4個の候補を取得に成功している。これらの候補は*lst8*温度感受性株の温度感受性株を部分的にしか抑圧していないが、*tor1Δ tor2*温度感受性株の温度感受性を抑圧したことが明らかにされ、得られた変異TOR2-mTORキメラは活性化型と結論づけている。続いて得られた変異体の一つである15-1変異体について、変異箇所の立体構造上の位置について記述し、活性化型となりうるメカニズムについて考察している。

二章では一章で得られた変異TOR2-mTORの変異をmTORに戻し、培養細胞の系で機能解析を行っている。変異mTORが活性化であるかを検証するため、初めにmTORの既知の基質であるp70S6Kを野生型、変異型mTORと共にHeLa細胞に導入し、アミノ酸飢餓時のp70S6Kのリン酸化を調べている。変異mTORの導入により、アミノ酸飢餓時のp70S6Kの脱リン酸化が抑制されることを明らかにし、変異mTORが活性化型変異体であるという証拠を示している。得られた4個の変異体のうち、mTOR(15-1)の活性が最も強いと考え、その後の解析に使用している。続いてmTOR(15-1)のキナーゼ活性を*in vitro* キナーゼアッセイにより測定し、野生型mTORに比べ、キナーゼ活性が顕著に高いことを示した。ここにおいてmTOR(15-1)がキナーゼ活性の高い活性化型mTORであると結論づけている。次にこのmTOR(15-1)がp70S6Kとは異なるmTORC1の基質である4EBP1やmTORC2の基質であるAktに及ぼす影響について検討し、共に活性化型mTORの導入により脱リン酸化が抑制されることが示している。以上の結果からキナーゼ活性の高いmTOR(15-1)はmTORC1、mTORC2の両方の経路について刺激非依存的に経路を活性化できることを示している。最後に活性化型mTORが細胞にどのような影響を及ぼすかについて調べるため、2つの実験を行っている。まず、活性化型mTORの導入による細胞のタンパク質合成能を、リポーター遺伝子を用いて調べている。血清存在下でタンパク質合成能は野生型、活性化mTORのどちらの導入によっても上昇しているが、野生型と活性化型mTORの間に差は見られていない。この理由として、血清の存在下ではタンパク質合成能が上がりきっているため差が見られず、今後は血清飢餓条件で実験を行うべきであると考察している。次に活性化型mTORがトランスフォーミング活性を持つか否かについて調べている。NIH3T3細胞におけるフォーカスの形成を指標に行ったが、活性化型mTORは野生型mTORやvectorと同様フォーカスの形成は観察されず、活性化型mTORはトランスフォーミング活性を持たないことを示している。この結果を受けて、発癌に関してmTORは必要であるが充分ではないという可能性について考察している。

最後に総合討論で、得られた活性化型mTORを用いることで、今後どのようなことを明らかにできるかについて論じている。

以上、本研究では、これまでに報告のない活性化型 mTOR を単離することに成功している。この活性化型 mTOR はシグナル伝達機構の解析におけるツールとなるだけでなく、mTOR の機能に関してより深い知見を提供するものと考えられ、学術上または応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位として価値あるものとして認めた。