

## 審査結果の要旨

氏名 菊池 貴子

近年ラパマイシンに非感受性の mTOR complex (mTORc 2) が Akt をリン酸化する PDK2 の候補と報告され、mTORシグナルとインスリンシグナルの密接な関係が明らかとなっている。本研究では、mTORc 1 の構成蛋白である Raptor の C 端を欠損させた優性阻止型 Raptor- $\Delta$ CT をアデノウイルスを用い肝細胞由来の培養細胞である HepG2 細胞に発現させ、その際に認められるインスリン非刺激時の Akt リン酸化亢進の機序を解析した。結果、LST8 を介する mTORc 1 と 2 の関連性についての結果を得た。

1. 優性阻止型 Raptor- $\Delta$ CT の過剰発現によって、糖尿病モデルである KKAY マウスでは、糖負荷試験での血糖値が改善するが、この際インスリン刺激時だけでなく、インスリン非刺激時においてもインスリンシグナル伝達系の改善を認める。この機序を解析するために HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞においてもインスリン刺激時で 3 倍程度 Akt のリン酸化 (セリン-473、スレオニン-308) が上昇し、インスリンシグナル伝達系の有意な改善を認めた。さらにインスリン刺激時だけでなく、インスリン非刺激時においてもインスリンシグナル伝達系の有意な改善を認めた。
2. Akt の上流シグナルである、IRS-1 チロシンリン酸化、及び PI 3-Kinase 活性は、KKAY マウスで得られた結果と同様、インスリン刺激時で 2 倍程度上昇していたが、一方インスリン非刺激時ではコントロール群と Raptor- $\Delta$ CT 群に有意差を認めなかった。
3. セリン、スレオニンリン酸化された蛋白は Protein Phosphatase によって脱リン酸化を受けリン酸化/脱リン酸化状態のバランスをとっているが、Akt を直接脱リン酸化する特異的脱リン酸化酵素である PP2A (Protein Phosphatase 2A) については、Raptor- $\Delta$ CT 群において活性が上昇傾向にあり、PP2A と Akt の結合もインスリン非刺激時において有意差を認めなかった。また、PP2A 以外で、非特異的に蛋白の脱リン酸化を行なう他の Protein Phosphatase の関与については、脱リン酸化アッセイ法により評価を行なったが、脱リン酸化を受ける程度は同等であり、脱リン酸化の関与は否定的であった。
4. PI 3-kinase と Akt の間に位置する PDK1、lipid Phosphatase である PTEN に Raptor- $\Delta$ CT による変化がないかを調べるため蛋白発現量を測定したが、いずれも差を認めなかった。
5. Akt が PDK1 によってリン酸化を受けるためには、細胞膜近辺に移動してることが重要であるが、Akt の局在を、超遠心分離法を用いて確認し、実際に Raptor- $\Delta$ CT 群ではコントロール群と比べ膜分画へ移動していることを確認した。
6. mTORc 1 及び 2 については、各構成蛋白の発現量は 2 群間で差を認めなかった。しかし Raptor- $\Delta$ CT 群ではコントロール群と比較して、mTORc 1 に関して内因性の Raptor と mTOR

の結合が約 1/3 と有意に低下していた。一方 mTORc 2 に関しては Raptor-ΔCT 群ではコントロール群と比較して LST8 と Akt の結合、LST8 と Rictor の結合がそれぞれ約 2.5、2 倍増加しており、mTORc 2 のシグナルが増強していることが確認された。Rictor と mTOR の結合については有意ではないが、増加傾向を認めた。つまり Raptor-ΔCT 発現によって mTORc 1 シグナルが減少し、mTORc 2 シグナルが増加していることがわかった。

7. さらに詳しく mTOR complex の作用を解析するために、mTORc 1 及び 2 の共通のアダプター蛋白である LST8 過剰発現アデノウイルスを作成した。このアデノウイルスを用い LST8 を過剰発現させた HepG2 細胞において、mTORc 1 及び 2 の下流シグナルである p70S6K、Akt のリン酸化について調べたところ、LST8 過剰発現群でいずれのリン酸化もコントロール群と比較して有意な上昇を認めた。近年 LST8 は mTOR と Raptor の結合に対する stabilizer として作用すると報告されたが、今回の結果より mTORc 1 だけでなく mTORc 2 の stabilizer としての作用もあると考えられた。
8. 上記6、7より、Raptor-ΔCT と mTOR の複合体からフリーになった LST8 が mTORc 2 に向かい mTOR-Rictor の複合体を安定化させて、下流の Akt との結合を促すこととなり、mTORc 2 による Akt のリン酸化が促進されたのではないかと推測された。

以上、本研究ではいまだ未知である Akt セリン-473 のキナーゼ、PDK2 が mTORc 2 である有力な根拠をしめした。またアダプター蛋白である LST8 を介する mTORc 1 と 2 の関連性についてひとつの見解を得た。Akt は糖取り込み、グリコーゲンや脂肪合成の促進、アポトーシス抑制など多岐にわたる生体の重要なシグナルの中心的な役割を果たす蛋白であり、その活性調節の解明は糖脂質代謝異常や悪性疾患などの病態の解明、治療・創薬に結びつくため、意義深く、学位の授与に値するものと考えられる。