

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

米澤 一仁

(神戸大学バイオシグナル研究センター 教授)

「細胞成長を司るたんぱく質群の同定と機能解析」

1. 研究実施の概要

ラパマイシンの細胞内標的たんぱく質であるmammalian Target of Rapamycin (mTOR)は分子量290Kの巨大なセリン・スレオニンたんぱく質リン酸化酵素であり、これまでの研究実績から、mTORを介するシグナル伝達系が、細胞を取り巻く環境中のアミノ酸バランスを感知し、細胞成長（細胞のサイズ）を制御していると考えている。本研究課題では「細胞成長を司るたんぱく質群」の構成因子とその機能を明らかにすることを目的としている。本年度に行われた種々の解析から、哺乳類および出芽酵母の系において、これまでTORとの関連が知られていなかった複数のたんぱく質が、TOR情報伝達系に関与していることを示す結果が得られた。いずれのたんぱく質も、細胞の機能において重要な役割を持っている分子であり、これらの分子の一部は、mTORを中心としたたんぱく質複合体の構成因子である可能性が高く、また複合体を構成していなくとも「細胞成長を司るたんぱく質群」の一員として、細胞成長に深く関わっているたんぱく質であることが予想される。これらの成果に加え、mTORのノックアウト解析、ラパマイシンの作用機構や翻訳抑制機能の解析等の解析も行い、mTORシグナリングが、細胞成長を中心とした細胞の機能に重要な役割を担っていることがより明確にされてきた。今後は本年度見出されたたんぱく質分子とmTORシグナリング、さらには細胞成長との機能的な関連性を詳細に解析するとともに、さらに「細胞成長を司るたんぱく質群」構成因子の探索を続け、mTORを中心として「細胞成長を司るたんぱく質群」全貌の解明を目指す。

2. 研究実施内容

1. mTORを中心としたたんぱく質複合体構成因子の解析

- ① 我々はこれまで、mTORが形成しているたんぱく質複合体の構成因子として、raptorおよびWD40ドメインより構成されるmLST8を同定した。本研究課題は、細胞成長制御シグナリングを司る蛋白質複合体の構成メンバーを同定することを目的として、raptorおよびmLST8に結合する蛋白質の探索、同定を試みた。RaptorおよびmLST8に、FLAG-Tagを付加したリコンビナント蛋白質をHEK293細胞に発現させ、このFLAG-raptor、もしくはFLAG-mLST8と共精製される蛋白質を、SDS-PAGEによって

分離し、質量分析法によって同定を試みた。質量分析法による解析は、H15年度にCREST予算で導入したLC-Qを用いたmLST8の全長、raptorの全長、raptorのアミノ末端側だけを有した変異体、およびraptorのカルボキシル末端側のWD40ドメイン構造のみを持つ変異体をベイトとして用いたところ、mLST8およびraptorのWD40ドメイン構造を持つカルボキシル末端側の変異体に、アミノ酸代謝に重要な役割を担っているある蛋白質（Protein X）が有意に結合していることが見出された。アミノ酸代謝に重要な役割を担っている蛋白質Protein Xが、細胞環境中のアミノ酸バランスを感知して細胞成長を制御する中枢分子mTORと深く関連していることは極めてリーズナブルなことであるが、この分子とmTORとの関連はこれまで全く調べられていなかった。我々は、mTORシグナル伝達系に抑制的に働くとの知見が得られている結節性硬化症たんぱく質TSC1およびTSC2の複合体がProtein Xと総合作用する結果も得ている。

- ② 加えて、我々はFLAG-raptorをベイトとしたスクリーニングにおいて、mTORシグナリングと深く関わる情報伝達系を構成するたんぱく質の転写や翻訳に関与するたんぱく質Protein Yがraptorと結合することを見出した。このProtein YとmTORシグナリングとの直接的な関連は知られていなかった。
- ③ 一方、細胞成長制御シグナリングを司るmTORを中心とした蛋白質複合体の機能を解明するためにRapamycinのこの複合体に対する影響を検討した。Rapamycinは、細胞内でFKBP12と複合体を形成し、この複合体がmTORに結合することによりmTOR機能を阻害するといわれているが、その詳細は不明であった。我々は、mTORが効率よく基質をリン酸化するために必要なraptorと、mTORとの相互作用に対するrapamycinの影響を解析した。その結果、以下のことが判明した。
 - a) *in vivo*におけるmTORとraptorの結合は、rapamycin処理により著しく阻害された。
 - b) FKBP12/rapamycinが結合できないmTOR変異体とraptorの結合は、rapamycin処理によって抑制されなかった。
 - c) rapamycin処理によりraptorとの結合が阻害されたmTORは、p70S6kなどに対するリン酸化活性が低下していた。
 - d) *in vitro*においても、FKBP12/rapamycinは直接mTORとraptorの解離を引き起こした。

以上より、rapamycinは、mTORとraptorの結合、すなわちmTORが効率よく基質をリン酸化するための足場形成を阻害することにより、mTORの機能を抑制していることが明らかにされた。

2. 細胞成長を司るたんぱく質群と他のリン酸化カスケードとのクロストークの解析

AMP-activated protein kinase (AMPK)は、細胞のエネルギー代謝ストレスによって上昇する細胞内AMPレベルを感知し活性化されるたんぱく質リン酸化酵素であり、これまでに、AMPKがmTORシグナル系を抑制している可能性を報告してきた。現在、

raptorをはじめとするmTORを中心としたたんぱく質複合体を構成する分子とAMPKの三量体サブユニットとのたんぱく質間相互作用について解析を行なった結果、一部の複合体の構成因子と一部のAMPKサブユニットが相互作用している知見を得た。

3. ノックアウトES細胞およびノックアウトマウスを用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析

これまでmTORの生化学的な機能解析は行われてきたが、哺乳類細胞におけるmTORの果たす役割は遺伝的には解析されていなかった。そこでmTOR遺伝子ノックアウトを行った。キナーゼドメインを破壊するターゲティングベクターを作成し、ES細胞で相同組み換え体を得た。これを胚盤胞に注入し、キメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。ヘテロ変異マウス同士を交配させたが、誕生するマウスにホモ変異体は存在しなかった。胎児を解析したところ、ホモ変異胚は着床後すぐに細胞が増殖できず致死となった。ホモ変異の胚盤胞は存在したが、これを生体外で培養しても細胞の増殖は起こらなかった。通常のノックアウトではホモ変異のES細胞は得ることができなかった。そこでCre-loxPシステムを用いたコンディショナルノックアウトを行った。キナーゼ活性のC末端をloxP配列で囲むベクターを作成し、相同組み換えES細胞を樹立した。これを高濃度の薬剤で選択することによりホモ変異体を得た。この細胞をCreで処理し、C末端を欠失させるとES細胞は増殖を停止し、細胞の大きさも縮小化した。これらの結果から、mTORはES細胞の増殖と成長の両者において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

4. 出芽酵母を用いた細胞成長を司るたんぱく質群の同定と機能解析

① TORによるAtg1複合体形成の制御

Atg1プロテインキナーゼは、その活性をTORにより負に制御されている。今年度、その制御にAtg1結合タンパク質Atg17が関与していることを見いだした。すなわち、Atg1-Atg17結合はTOR阻害剤ラパマイシン投与時のみに観察されることを明らかにした。

② TOR1結合タンパク質遺伝子KOG1の遺伝的解析

KOG1遺伝子はTOR結合タンパク質をコードしている必須遺伝子であり、昨年度までにその温度感受性株 (kog1ts) を取得している。今年度、kog1tsを用いてその多コピーサプレッサーを取得し、現在解析中である。

③ TOR2下流因子YPKキナーゼの同定とその活性化機構

出芽酵母TOR2遺伝子はPKC/MAPKカスケードを介して細胞壁合成・アクチン構築を制御する重要な役割を担っている。ところが、その直接の下流因子は不明であった。遺伝学的スクリーニングの結果、プロテインキナーゼYPK2がTOR2の下流因子であることを見いだした。YPK2の活性化型変異体がTOR2の機能を完全に相補できること、*in vitro*でTOR2がYPK2を直接リン酸化できることから、YPK1/2がTOR2の直接の下流に位置することが示された。

5. mRNAの翻訳制御と細胞成長を司るたんぱく質群の相互作用解析

細胞が静止、成長、増殖、がん化、アポトーシスと変化するに従い細胞中の翻訳が高まる。成長と増殖に特異的な翻訳挙動を示す遺伝子を同定し細胞を成長状態に導く遺伝子を明らかにする目的として、静止期、成長および増殖中の細胞のmRNAの翻訳効率を調べた。細胞が静止から増殖期へ移行して亢進された翻訳はrapamycinにより阻害される。そこで、rapamycinに高感受性のBJAB細胞にrapamycinを添加し、任意に選んだ遺伝子を個別に解析した。その結果、数種のmRNAsにおいて細胞内局在により、rapamycinによる翻訳抑制率が異なることを認めた。これは、同一の遺伝子のmRNAが細胞内局在により異なる翻訳調節を受けていることを示唆する。次に、神経細胞の軸索形成を細胞成長の研究モデルとして用いるために、遺伝子の情報が豊富なマウスneuroblastoma系NS20Y細胞の軸索伸長が高頻度で起こる条件設定に成功した。更に、細胞の遊走・増殖に関与する遺伝子解析モデルとして実験創傷治癒系における受傷シグナル応答での各種阻害剤キネティクスを検討した。その結果、ある種の細胞の治癒反応では従来考えられていた転写・翻訳の順とは逆に、受傷から20分までの翻訳過程と受傷後20分から40分までの転写過程の寄与が大きいことが明らかになった。従って、受傷後20分前後における転写因子mRNAの翻訳効率解析を網羅的に行うことで、この細胞の遊走・増殖に寄与する遺伝子クラスターの発現状態の予想が可能になると思われる。

6. 細胞成長を司るたんぱく質群の機能を制御する化合物の探索

細胞成長を司る蛋白質群のひとつである分子の活性を指標とした細胞培養系を用いた評価系を構築し、栄養成分がこの評価系にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、細胞種により細胞成長を司る蛋白質群の活性化に必要とされる栄養素のプロファイルが異なることが確認された。今後は、ある種の特異的な細胞の細胞成長を司る蛋白質群の活性を制御する栄養素の選択性に関して研究を進める。

3. 研究実施体制

米澤一仁グループ

① 研究分担グループ長：

米澤 一仁（神戸大学・バイオシグナル研究センター、教授）

② 研究項目：

細胞成長を司るたんぱく質群の同定と分子間相互作用解析

細胞成長を司るたんぱく質群の翻訳後修飾基の解析

迅速に細胞内情報伝達系を解明するためのプロテオーム解析法新技術、新方法論の開発

RNAi法を用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析

細胞成長を司るたんぱく質群の細胞内における時間・空間的変動の解析

細胞成長を司るたんぱく質群とリン酸化カスケードとのクロストークの解析

山中伸弥グループ

① 研究分担グループ長：

山中 伸弥（奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター・動物分子工学部門、教授）

② 研究項目：

ノックアウトES細胞およびノックアウトマウスを用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析

鎌田芳彰グループ

① 研究分担グループ長：

鎌田 芳彰（岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・細胞内エネルギー変換機構研究部門、助手）

② 研究項目：

出芽酵母を用いた細胞成長を司るたんぱく質群の機能解析

懸川友人グループ

① 研究分担グループ長：

懸川 友人（千葉大学大学院・薬学研究院・遺伝子薬物学部門、助教授）

② 研究項目：

mRNAの翻訳制御と細胞成長を司るたんぱく質群の相互作用解析

竹鼻健司グループ

① 研究分担グループ長：

竹鼻 健司（味の素（株）・医薬研究所・創薬第2研究室、主任研究員）

② 研究項目：

細胞成長を司るたんぱく質群の機能を制御する化合物の探索

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

米澤一仁グループ

- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif.

J. Biol. Chem. **278**, 15461-15464 (2003)

- Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T.,

Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., and Hirayama, T.

Protein-tyrosine phosphatase α , RPTP α , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor.

J. Biol. Chem. **278**, 19183–19189 (2003)

- Shindo, M., Irie, K., Masuda, A., Ohigashi, H., Shirai, Y., Miyasaka, K., and Saito, N.

Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes: DGK γ and DGK β are new targets of tumor-promoting phorbol esters.

J. Biol. Chem. **278**, 18448–18454 (2003)

- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A.

Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1.

Nat. Cell Biol. **5**, 427–432 (2003)

- Nishizuka, Y., and Kikkawa, U.

Early studies of protein kinase C: A historical perspective.

Methods Mol. Biol. **233**, 9–18 (2003)

- Yamamoto, T., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Matsuzaki, H., and Kikkawa, U.

Tyrosine phosphorylation of protein kinase C.

Methods Mol. Biol. **233**, 207–216 (2003)

- Mukai, H., and Ono, Y.

Expression and purification of protein kinase C from insect cells.

Methods Mol. Biol. **233**, 21–34 (2003)

- Takahashi, M., and Ono, Y.

Pulse-chase analysis of protein kinase C.

Methods Mol. Biol. **233**, 163–170 (2003)

- Saito, N.

Fluorescence imaging of protein kinase C translocation in living cells.

Methods Mol. Biol. **233**, 93–103 (2003)

- Fredholm, B.B., Assender, J.W., Irenius, E., Kodama, N., and Saito, N.

Synergistic effects of adenosineA1 and P2Y receptor stimulation on calcium mobilization and PKC translocation in DDT₁ MF-2 cells.

Cell. Mol. Neurobiol. **23**, 379–400 (2003)

- Yonezawa, K.

Identification of TOR-interacting proteins.

Mol. Interv. **3**, 189–193 (2003)

- Oka, M., Okada, T., Nakamura, S., Ohba, M., Kuroki, T., Kikkawa, U., Nagai, H., Ichihashi, M., and Nishigori, C.
PKC δ inhibits PKC α -mediated activation of phospholipase D1 in a manner independent of its protein kinase activity.
FEBS Lett. **554**, 179-183 (2003)
- Yonezawa, K., Yoshino, K., Tokunaga, C., and Hara, K.
Kinase activities associated with mTOR.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **279**, 271-282 (2004)
- Yonezawa, K., Tokunaga, C., Oshiro, N., and Yoshino, K.
Raptor, binding partner of target of rapamycin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **313**, 437-441 (2004)
- Tokunaga, C., Yoshino, K., and Yonezawa, K.
mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **313**, 443-446 (2004)
- Yagi, K., Shirai, Y., Hirai, M., Sakai, N., and Saito, N.
Phospholipase A2 products retain a neuron specific γ isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain -a molecular mechanism for sustained enzyme activity.
Neurochem. Int. **45**, 39-47 (2004)
- Oshiro, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., and Yonezawa, K.
Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function.
Genes Cells **9**, 359-366 (2004)
- Matsuzaki, H., Yamamoto, T., and Kikkawa, U.
Distinct activation mechanisms of protein kinase B by growth-factor stimulation and heat-shock treatment.
Biochemistry **43**, 4284-4293 (2004)
- Gotoh, Y., Oishi, K., Shibata, H., Yamagiwa, A., Isagawa, T., Nishimura, T., Goyama, E., Takahashi, M., Mukai, H., and Ono, Y.
Protein kinase PKN1 associates with TRAF2 and is involved in TRAF2-NF- κ B signaling pathway.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **314**, 688-694 (2004)

山中伸弥グループ

該当なし

鎌田芳彰グループ

- Kamada, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y.

Autophagy in Yeast: A TOR-mediated response to nutrient starvation.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. **279**, 73-84 (2004)

懸川友人グループ

- 懸川友人、根本麻代、松田 恵、斎藤浩美、小林 弘

ラパマイシンのNF- κ B誘導作用

The Japanese Journal of Antibiotics **544**, 97-99 (2003)

- 松田 恵、後藤亜耶乃、斎藤浩美、小林 弘、懸川友人

スピラマイシンの細胞増殖抑制作用

The Japanese Journal of Antibiotics **544**, 121-123 (2003)

竹鼻健司グループ

該当なし

(2) 特許出願

平成15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：0件）