

「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。これまで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、本年度は昨年度に見出されたたんぱく質の、アミノ酸感知システム、TORシグナル伝達システム、細胞成長制御システムにおける機能解析を進めた。またさらに数種のmTOR複合体に関連する候補分子を見出すことができた。いずれのたんぱく質も、細胞成長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、また直接的な複合体構成因子ではなくても「細胞成長を司るたんぱく質群」の一員として、複合体と強く相互作用し、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、マウス初期胚やES細胞におけるmTORのノックアウト解析からもmTORシグナリングが細胞成長制御機能に重要な役割を担っていることが明確になった。今後も引き続き、複合体関連候補たんぱく質分子と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を中心とした「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

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たんぱく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に結合するたんぱく質の探索、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たんぱく質をHEK293細胞に発現させ、このFLAG-raptor、もしくはFLAG-mLST8と共精製されるたんぱく質を、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、平成15年度にCREST予算で導入したLC/MSシステムを用いた。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たんぱく質 (Protein X) が有意に結合していることが見出された。

Protein Xに関する解析を進めたところ、細胞内で過剰発現させたFLAG-mLST8に加え、内因性のmLST8とProtein Xとの結合が観測された。さらにmTORの上流因子である結節性硬化症原因遺伝子産物TSC2やRhebとの結合も確認することができた。Protein Xはアミノ酸からピリミジンの生合成に関わる酵素活性を有する。マウスのProtein XをHEK293細胞内で過剰発現させ、これらの細胞を一晩、血清非存在下で培養することで血清飢餓状態とし、その後、血清存在下、血清非存在下アミノ酸存在下、血清およびアミノ酸非存在下でそれぞれ2時間培養を行った。培養後の細胞からリコンビナントのProtein Xを精製し、*in vitro*のピリミジン合成活性を測定した。血清およびアミノ酸非存在下で培養した細胞から精製されたProtein Xは、アミノ酸存在下で培養した細胞由来のProtein Xと比べ、30%程度の活性の低下が見られた。以上の結果より、我々は、mLST8やraptor等のmTOR関連因子が細胞環境中のアミノ酸を感知してProtein Xの活性を調節していると考えている。

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。Protein Yは、RNA結合能を有することが知られている。一方、mTORのキナーゼ活性のスキヤホールドたんぱく質raptorと結合する翻訳開始因子4E結合たんぱく質(4E-BP1)は、翻訳開始因子4Eと複合体を形成し、この複合体はmRNA5'末端のCAP構造に結合することが知られている。そのため、Protein YとFLAG-raptorが含まれる複合体にはmRNAの存在が不可欠であることが示唆された。FLAG-raptorを発現させた細胞の抽出液をリボヌクレアーゼ処理しRNAを分解した後、FLAG-raptorを精製したところ、Protein Yは共精製されなかった。この結果より、Protein YとFLAG-raptorを含む複合体には、mRNAが不可欠であり、Protein YがmTOR複合体とたんぱく質の翻訳系に関わっている可能性が示唆された。今後詳細な解析を進める予定である。

結節性硬化症原因遺伝子産物であるTSC1とTSC2の複合体は、mTORシグナル伝達系に抑制的に働くことが知られている。TSC1とTSC2にFLAG-Tagを付加したリコンビナントたんぱく質をHEK293細胞に発現させ、このFLAG-TSC1とFLAG-TSC2と共精製されるたんぱく質の探索を試みた。その結果、約30 kDaの機能未知たんぱく質 (Protein Z) が同定された。このたんぱく質は、そのアミノ酸配列から低分子量GTP結合たんぱく質のGTPase活性促進たんぱく質と相同的なドメインを持つことが予想され、さらに抗体を用いた解析から、内因性

のProtein ZとTSC1-TSC2複合体との結合が確認された。特にその結合は、TSC1を介している可能性が示唆された。TSC1-TSC2複合体は、Rheb、Rac1、Rab5、Rhoといった低分子量GTP結合たんぱく質に機能することが報告されている。現在、これら低分子量GTP結合たんぱく質とProtein Zとの関係を解析している。

FLAG-raptorに有意に結合するたんぱく質の一つとして、主要な分子シャペロンHeat shock protein (Hsp) 90が同定された。mTOR複合体に対するHsp90の寄与を検討するため、Hsp90の阻害剤ゲルダナマイシンのmTORシグナリングに対する効果を検討した。その結果、ゲルダナマイシン存在下ではmTORの下流因子であるリボソームたんぱく質S6、S6リン酸化酵素、翻訳開始因子4E結合たんぱく質1のリン酸化が阻害された。また、mTORの自己リン酸化部位Ser-2481のリン酸化レベルが低下した。Hsp90は標的たんぱく質の正確な立体構造の維持と機能の発現を支援する機能を有している。ゲルダナマイシン存在下でmTORの下流因子ならびにmTOR自身のリン酸化が抑制されたことからraptorを含むmTOR複合体がHsp90の標的であることが示唆された。ゲルダナマイシンは抗癌剤としての薬効があり、臨床治験が行われているが、この薬剤の作用点の一つがmTORシグナリングである可能性が高い。

2. 低分子量GTP結合たんぱく質の一種RhebのmTOR制御機構

低分子量GTP結合たんぱく質の一種Rheb (ras homolog enriched in brain)が、mTORシグナル伝達系に関与する分子であることが明らかにされた。Rhebは他のGTP結合たんぱく質と同様にGTP結合型とGDP結合型の変換によって活性が調整されており、GTP結合型のRhebはmTORの正の制御因子として働くことが示唆されている。しかしながら、Rhebの具体的なmTORの制御機構は不明であった。RhebによるmTOR制御メカニズムの詳細を検討したところ、以下のことが判明した。

- a) RhebとmTORが直接結合することを実証し、その結合はグアニンヌクレオチド非依存的であった。
- b) GTP結合モチーフに変異が導入され、不活性型となったRhebはmTORのたんぱく質リン酸化酵素活性を抑制した。
- c) GTP結合モチーフに変異が導入され、活性型となったRhebはmTORのたんぱく質リン酸化酵素活性を促進した。

以上のことから、活性型であるGTP結合型Rhebの直接の標的たんぱく質はmTORであり、mTORの活性化は結合しているRhebのGTPとGDPの変換によって制御されていることが明らかとなった。

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**：mTORたんぱく質複合体構成因子の解析による細胞成長を司るたんぱく質候補群の探索
過剰発現法、RNAi法などを用いた細胞成長を司るたんぱく質候補群の機能解析
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他の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**：ES細胞におけるmTOR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（自然科学研究機構・基礎生物学研究所・分子細胞生物学研究部、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同定と機能解析

懸川友人グループ

- ① **研究分担グループ長**：懸川 友人（城西国際大学・薬学部・医療薬学科・生理化学講座、教授）
② **研究項目**：mRNAの翻訳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）・医薬カンパニー・医薬研究所・創薬第一研究部・アミノ酸開拓研究室、主任研究員）
② **研究項目**：mTOR活性化剤のスクリーニング

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

米澤一仁グループ

- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S.
mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells.
Mol. Cell Biol. **24**, 6710-6718 (2004)

- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., and Nawa, H.
Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites.
J. Neurosci. **24**, 9760–9769 (2004)
- Yonezawa, K.
mTOR signaling pathway.
Hepatol. Res. **30S**, S9–S13 (2004)
- Kajimoto, T., Shirai, Y., Sakai, Y., Yamamoto, T., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., and Saito, N.
Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation, and activation of protein kinase C δ in the Golgi complex.
J. Biol. Chem. **279**, 12668–12676 (2004)
- Ueyama, T., Lennartz, M.R., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H., and Saito, N.
Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through β I protein kinase C during Fc γ R-mediated phagocytosis in microglia.
J. Immunol. **173**, 4582–4589 (2004)
- Sakai, N., Tsubokawa, H., Matsuzaki, M., Kajimoto, T., Takahashi, E., Ren, Y., Ohmori, S., Shirai, Y., Matsubayashi, H., Chen, J., Duman, R.S., Kasai, H., and Saito, N.
Propagation of γ PKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in γ PKC-GFP transgenic mice.
Genes Cells **9**, 945–957 (2004)
- Kuriyama, M., Taniguchi, T., Shirai, Y., Sasaki, A., Yoshimura, A., and Saito, N.
Activation and translocation of PKC δ is necessary for VEGF-induced ERK activation through KDR in HEK293T cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **325**, 843–851 (2004)
- Yonezawa, K.
Mammalian target of rapamycin (mTOR).
NASH and Nutritional Therapy (Okita, K. (Ed.)) 92–99 (2005)
- Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H-S., Mukai, H., and Ono, Y.
Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex.

Genes Cells **10**, 75-86 (2005)

- Seki, T., Matsubayashi, H., Amano, T., Shirai, Y., Saito, N., and Sakai, N.
Phosphorylation of PKC activation loop plays an important role in receptor-mediated translocation of PKC.

Genes Cells **10**, 225-239 (2005)

- Fukunaga-Takenaka, R., Shirai, Y., Yagi, K., Adachi, N., Sakai, N., Merino, E., Merida, I., and Saito, N.

Importance of chroman ring and tyrosine phosphorylation in the subtype-specific translocation and activation of diacylglycerol kinase α by D- α -tocopherol.

Genes Cells **10**, 311-319 (2005)

- Sakakibara, K., Sato, K., Yoshino, K., Oshiro, N., Hirahara, S., Hasan, A. K. M. M., Iwasaki, T., Ueda, Y., Iwao, Y., Yonezawa, K., and Fukami, Y.

Molecular identification and characterization of *Xenopus* egg uroplakin III, an egg raft-associated transmembrane protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization.

J. Biol. Chem. **280**, 15029-15037 (2005)

山中伸弥グループ

- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S.

mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells.

Mol. Cell Biol. **24**, 6710-6718 (2004)

- Wang, X., Beugnet, A., Murakami, M., Yamanaka, S., and Proud, C. G.

Distinct signaling events downstream of mTOR co-operate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins.

Mol. Cell Biol. **25**, 2558-2572 (2005)

鎌田芳彰グループ

該当なし

懸川友人グループ

- 懸川友人、平田 悟、斎藤浩美、小林 弘

ラパマイシンによるmRNA選択的な翻訳抑制へのhnRNP Dの関与

Jpn. J. Antibiot. **57**, Supple. A, 88-91 (2004)

竹鼻健司グループ

該当なし