

細胞成長システム制御因子分子情報の集積と構築

●米澤 一仁 ◆吉野 健一 ◆徳永 千春

神戸大学バイオシグナル研究センター

〈研究の目的と進め方〉

ラパマイシンの細胞内標的蛋白mTORを介するシグナル伝達経路が、細胞環境中のアミノ酸バランスを感知して、細胞増殖因子とともに細胞のサイズ（細胞成長）を制御しているという考えに基づき、mTORシグナル伝達系のシグナル伝達分子を同定し、その機能解析を行なうことを目的としている。シグナル伝達分子の同定には生化学手法とともに質量分析計による解析を用い、機能解析には生化学的・分子生物学的手法、RNA interference法などを用いて研究を進める。

2003年度の研究の当初計画

- 1) 細胞成長制御システムを司る蛋白質群の同定
- 2) 細胞成長制御システムを司る蛋白質群の機能解析

〈2003年度の成果〉

1) 最近我々が見出した新規mTOR結合蛋白質raptorは、mTORシグナル伝達系でリン酸化カスケードを下流に伝えるスクヤホールド蛋白質として重要な役割を担っている。Raptorにtagを付加したりコンビナント蛋白質をHEK293細胞に発現させ、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ところ、アミノ酸代謝に重要な役割を担っている蛋白質が有意に結合していることを見出した。この分子は、mTOR蛋白複合体を形成している他の分子とも有意に結合していることが明らかとなった。

2) 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。そこで、mTORとraptorの結合に及ぼすrapamycinの影響を解析した。その結果、以下のことが判明した。(i) 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。(ii) 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。(iii) 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。(iv) 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示された。

〈国内外の成果の位置づけ〉

Rapamycinは、免疫抑制剤、抗がん剤などとして、その臨床治療薬としての応用が期待されているが、rapamycinのこれら薬理効果の詳細な分子機構は長らく不明であった。我々の研究は、rapamycin作用の分子機構を明らかにした研究として高く評価されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉
特になし。

〈今後の課題〉

mTORそしてmTOR結合蛋白質raptorなど、かつmTORの上流、下流で機能していると予測される分子群を手がかりに質量分析計を用いたFocused Proteomicsを実施する。同定された候補分子の機能解析を進め、細胞成長制御システムを司る蛋白質群を網羅的に同定することを試みる。

〈成果公表リスト〉

1. 305011625Nojima, 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).

2. 404081310

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).

3. 404081320

Yonezawa, K., Identification of TOR-interacting proteins, *Mol. Interv.*, 3, 189-193 (2003).

4. 404081325

Yonezawa, K., Yoshino, K., Tokunaga, C., and Hara, K., Kinase activities associated with mTOR, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 279, 271-282 (2004).

5. 404081329

Yonezawa, K., Tokunaga, C., Oshiro, N., and Yoshino, K., Raptor, binding partner of target of rapamycin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 437-441 (2004).

6. 404081333

Tokunaga, C., Yoshino, K., and Yonezawa, K., mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 443-446 (2004).

7. 404081337

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).

8. 404081343

吉野健一, 徳永千春, 原 賢太, 米澤一仁, 細胞成長を司る情報伝達システムの中央情報集積装置mTOR複合体, 蛋白質核酸酵素, 48, 1378-1385 (2003).

9. 404081352

徳永千春, 大城紀子, 吉野健一, 原 賢太, 米澤一仁, ラパマイシン標的タンパク質mTORシグナル伝達系, 細胞工学, 23, 340-348 (2004).