The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain)-dependent Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Activation Becomes Indispensable for Cardiac Hypertrophic Growth after Early Postnatal Period
Author(s)	Tamai, Takahito
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26323
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

〔論文題名：Thesis Title〕
Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain)-dependent Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Activation Becomes Indispensable for Cardiac Hypertrophic Growth after Early Postnatal Period.
(心筋細胞の肥大・成長過程におけるRheb-mTORC1経路の意義)

専攻名 Division ：内科系臨床医学専攻　　学位申請者 Name ：玉井　敬人

〔目　的(Purpose)〕
mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は、タンパク質合成の促進とタンパク質分解の抑制に関わる、セリン/スレオニンキナーゼ活性を有するmTORを中心としたタンパク質複合体である。Rheb (Ras homolog enriched in brain) はインスリン受容体からAktに至るシグナル伝達機構の下流に位置するタンパク質であり、 mTORC1と結合することでmTORC1の立体構造変化と活性化を誘導する。in vitroにおいてRhebが心筋細胞の肥大・成長に関与している報告はなされているものの、in vivoにおける機能は明らかでない。本研究では遺伝子改変動物を用い、心筋細胞の成長・肥大過程における in vivoでのRheb-mTORC1経路の機能解析を目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕
心筋細胞特異的*Rheb*欠損マウスを作成するため、*Rheb*遺伝子のexon3の前後にloxP配列を挿入したfloxed *Rheb*マウスを作成した。floxed *Rheb*マウスをαmyosin-heavy-chain promoter制御下にCre Recombinaseを発現する*αMHC-Cre* Tgマウスと交配した。$Rheb^{flox/flox}$; $\alpha MHC\text{-}Cre^{+}$の心筋細胞特異的*Rheb*欠損(KO)マウスと$Rheb^{flox/flox}$; $\alpha MHC\text{-}Cre^{-}$ のコントロール(CTL)マウスを得るために$Rheb^{flox/flox}$マウスと$Rheb^{flox/+}$; $\alpha MHC\text{-}Cre^{+}$マウスを交配した。KOマウスは生後8日から死亡し始め10日には全例が死亡した。生後5日では両群間で心重量の有意差が認められなかったが、生後8日においてKOマウスはCTLマウスに比べ心重量は有意に低値を示した。次いで心臓超音波法を用いて拡張末期左室内腔径LVIDdと収縮末期左室内腔径LVIDs、左室径短縮率FSを測定し心機能を評価した。生後5日では両群間でLVIDd、LVIDs, FSに有意差は認めなかった。KOマウス生後8日では、KOマウス生後5日およびCTLマウス生後8日に比べてLVIDd、LVIDsの有意な拡大とFSの有意な低下が認められた。心臓HE標本から心筋細胞横断面積を測定したところ、生後5日では両群間で有意差が認められなかったが、生後8日ではCTLマウスに比べKOマウスの横断面積は有意に低値を示した。下流シグナリング評価として、ウエスタンブロット法にてリボソームタンパク質S6と翻訳開始因子eIF4Eの結合制御タンパク質4E-BP1のリン酸化状態を検討した。S6、4E-BP1ともにKOマウスではCTLマウスに比べて生後５日からリン酸化が低下していた。KOマウスではCTLマウスに比べてmTORC1の活性が生後5日から低下していることが示唆された。生後8日のeIF4Eと4E-BP1の結合を免疫沈降法にて評価したところ、KOマウスにおいてのみ両者の結合が認められた。翻訳活性を評価するためsucrose gradient法を用いて翻訳活性解析を行った。生後8日ではKOマウスはCTLマウスに比べポリソーム領域の低下を認め、mRNA翻訳活性低下が示唆された。KOマウスにおける心機能低下の原因がmRNAの翻訳低下によるタンパク質合成不全であると考え、*Rheb*と*4E-BP1*との両欠損マウスを作成した。$Rheb^{flox/flox}$; $4EBP1^{-/-}$; $\alpha MHC\text{-}Cre^{+}$をDKOマウスとし、$Rheb^{flox/flox}$; $4E\text{-}BP1^{+/+}$; $\alpha MHC\text{-}Cre^{+}$をSKOマウスとして生後8日で比較した。DKOマウスはSKOマウスに比べ、翻訳活性の改善、心筋細胞横断面積の有意な増大、心重量の有意な増加、LVIDd、LVIDsの有意な縮小、FSの有意な上昇を認めた。生存率においてもDKOマウスはSKOマウスに比べ有意な改善が認められた。以上より*Rheb*欠損によって認められた表現型は*4E-BP1*との両欠損により救済されることが示された。*Rheb*のもう一つの下流であるタンパク質分解に関わるオートファジー亢進の関与を検討するため、オートファジーの評価を行った。生後8日におけるオートファジーマーカータンパク質p62およびLC3-IIの変化は認められなかった。また、オートファジー必須遺伝子*Atg5*の欠損はKOマウスの生存率を救済できなかった。以上より心筋細胞における生後早期の*Rheb*の機能は、タンパク質合成亢進による心筋細胞成長にあることが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕
Rheb-mTORC1経路は心筋細胞の肥大・成長過程 において必須であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　玉井　敬人

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	小室 一成
	副　査	大阪大学教授	菊池 章
	副　査	大阪大学教授	山田 徹

論文審査の結果の要旨

mTORC1(mammalian target of rapamycin complex 1)はタンパク質の合成促進と分解抑制を行うタンパク質複合体であり、Rheb(Ras homologue enriched in brain)はその活性化を誘導する。本研究では心臓のin vivoにおけるRhebの機能解析を行った。心筋細胞特異的Rheb欠損（KO）マウスは、生後５日からmTORC1活性が低下し、生後8日から10日に心筋細胞の肥大・成長障害と心機能低下を伴って死亡した。生後８日のKOマウス心ではmRNAの翻訳低下が認められた。翻訳開始因子eIF4Eの結合タンパク質である4E-BP1との二重欠損により、KOマウスの表現型が改善した。しかしオートファジーによるタンパク質分解については、KOマウス表現型への関与は認められなかった。以上よりmRNAの翻訳低下がKOマウスの表現型に関与することが示唆された。

Rhebが心臓の肥大・成長に必須の役割を果たすことを明らかにした研究であり学位に値するものと認める。