The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a via SGK1 kinase
Author(s)	森, 俊介
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34064
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　森　俊介　）	
論文題名	The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a via SGK1 kinase （mTORシグナル経路はSGK1を介したFoxO3aの制御により細胞増殖を調節する）

論文内容の要旨

mTORC1 (mammalian target of Rapamycin complex 1)シグナル経路は、オートファジー、脂質合成、リソソーム生合成、細胞増殖など様々な細胞機能の制御に関与することから、細胞内恒常性維持に必須なシグナル伝達経路として考えられている。しかしながら、mTORC1がメインストリームとして制御する細胞増殖の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

mTORC1の活性化はリソソームに局在化することが必須である。我々の研究室で同定したp18は、MP1/p14ヘテロダイマーをリソソームにリクルートし、足場タンパク質複合体（Ragulator）を形成することでRagGTPaseの足場となる。RagGTPaseは細胞内のアミノ酸により活性化し、mTORC1をリソソームに局在化させる。このことからp18は、mTORC1活性化の要として考えられる。実際p18の欠損は、リソソーム成熟の低下、オートファジー誘導による表皮形成の破綻などを示し、mTORC1シグナルの生理的機能解析に有用な系として用いられてきた。そこで本研究は、p18欠損細胞（p18KO細胞）を用いた解析から、mTORC1により統制された増殖シグナルの解明に向けて研究を進めた。

まずMEFから樹立した野生型細胞（WT細胞）とp18KO細胞を用いて、mTORC1シグナルの活性化をWestern blotにより解析した結果、p18KO細胞で低下が見られた。次に細胞増殖速度、およびFACSを用いた細胞周期の解析から、p18KO細胞は細胞周期G1期の停滞により顕著な細胞増殖の低下を示した。よってmTORC1は、細胞周期G1期の進行に関与する分子の発現制御を行うことで、正常な細胞増殖を維持していることが考えられた。細胞周期G1期の進行はCyclinD1、そして停止は$p27^{Kip1}$などのCDK inhibitorの発現によって制御される。mTORC1は、CyclinD1のタンパク質合成を制御することが知られており、p18KO細胞はCyclinD1の発現低下が見られた。一方$p27^{Kip1}$はmRNAレベルで発現増加を示した。$p27^{Kip1}$は転写因子FoxO3a (Forkhead box O3a)により発現制御を受ける。FoxO3aは、インスリンシグナル下流因子であるAkt、SGK1 (Serum- and Glucocorticoid-inducible kinase 1)からリン酸化を受けることで、核内移行が抑制される。p18KO細胞はFoxO3aのmRNAレベルでの発現増加、および核内移行を示すことから、mTORC1シグナルがFoxO3aの制御機構に関与することが予想された。

まずFoxO3aの発現増加について調べた。FoxO3aは、プロモーター領域から広範囲でCpG islandを持つことから、転写制御にエピジェネティクスの関与が考えられた。そこでTrichostatin A (HDAC阻害剤)と5-Aza-deoxycytidine (DNAメチル化阻害剤)をWT細胞に添加すると、DNAメチル化阻害によりFoxO3aの発現増加が見られた。次に、FoxO3a CpG island内のDNAメチル化解析から、p18の発現に依存して、第2イントロン領域で高度なメチル化が検出され、さらにメチル化領域近傍にエンハンサー活性を持つことが示された。よってmTORC1シグナルがFoxO3aのDNAメチル化に関与し発現調節を行っていることが示唆された。

次にFoxO3aの核内蓄積のメカニズムを解析した。FoxO3aは、AktからThr32/Ser252、SGK1からSer314をリン酸化されることで核内移行を抑制される。そこで各リン酸化状態を調べた結果、p18KO細胞はAktの活性化に伴いThr32/Ser252リン酸化が亢進し、SGK1の発現低下に伴いSer314リン酸化の低下を示した。よって、SGK1によるSer314のリン酸化がFoxO3a核内蓄積に寄与する事が示唆された。そこで、FoxO3a Ser314脱リン酸化型変異体を作製してWT細胞に導入した結果、$p27^{Kip1}$の発現増加に伴う細胞増殖の低下が見られた。次にSGK1発現量と細胞増殖の関連を解析した。SGK1は長さの異なるアイソフォームを発現することが知られており、p18KO細胞ではタンパク質レベルでSGK1 short isoform (SGK SI)の発現低下が見られた。そこでSGK SIをp18KO細胞に導入すると、$p27^{Kip1}$の発現低下に伴い細胞増殖が亢進した。さらにWT細胞においてshRNAによるSGK1のノックダウンを行った結果、$p27^{Kip1}$の発現増加により細胞増殖が低下した。このことからSGK1の発現変化が、FoxO3a核移行に関与し、細胞増殖を制御することが示唆された。

以上のことから、mTORC1シグナルはFoxO3aの転写制御、そしてSGK1 SIを介したFoxO3a核移行を調節することで正常な細胞増殖を維持していることが明らかになった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　森　俊介　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	岡田　雅人
	副 査	教授	関口　清俊
	副 査	教授	吉川　和明

論文審査の結果の要旨

mTORC1 (mechanistic target of Rapamycin complex 1)は、タンパク質合成や転写因子の核内移行を制御することで、リソソーム生合成、オートファジー、そして細胞増殖など様々な細胞機能に関与することから、細胞の恒常性維持に必須のシグナル伝達経路として考えられている。しかしながら、mTORC1 が制御する細胞増殖の詳細なメカニズムは未解明のままであった。一方、mTORC1 の活性化には、近年申請者らの研究室で同定されたリソソームアンカータンパク質 p18 が必須であることが見いだされ、mTORC1 の制御の場が明らかとなってきた。そこで申請者は、p18 欠損細胞を用いることによって、mTORC1 に統制される増殖シグナル経路を特定することを目的とした研究を行った。まず、p18 欠損によって細胞周期 G1 期の停滞により細胞増殖能が顕著に低下することを明らかにした。その細胞内シグナルを詳細に解析した結果、１）mTORC1 の不活性化による細胞周期 G1 期の進行を担う CyclinD1 の蛋白質発現低下、２）転写因子 FoxO3a の遺伝子発現制御部位近傍の DNA 脱メチル化による発現亢進、３）SGK1 キナーゼの発現減少による FoxO3a のリン酸化低下、４）それらの結果としての FoxO3a の核内蓄積、５）さらにそれに伴う細胞周期阻害蛋白質 $p27^{Kip1}$ の発現誘導などの現象を見いだした。そして、これらの現象の意義を、FoxO3a および SGK1 の変異体の発現やノックダウン実験により検証することにより、mTORC1 シグナルが FoxO3a の転写制御および SGK1 を介した FoxO3a 核移行を調節することで細胞増殖を維持していることを明らかにした。本成果は、mTORC1 による細胞増殖制御機構の新たなメカニズムを提唱するものであり、mTORC1 シグナルの異常によるがんや生活習慣病の病態解明や治療薬開発に向けた応用展開も期待される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。