

## 論文の内容の要旨

論文題目 小脳プルキンエ細胞における mTOR シグナルの機能解析

氏名 坂井祐介

### 背景

Mammalian target of rapamycin (mTOR)は、進化的に保存されたセリン・スレオニンキナーゼであり、PIKK (phosphoinositide kinase-related kinase) ファミリーに属する分子量 289 kDa のタンパク質である。mTOR は、mTOR complex 1 (mTORC1) および complex 2 (mTORC2) と呼ばれる異なる複合体を形成して機能している。mTORC1 は非常に高いラパマイシン感受性を持つものに対して、mTORC2 はラパマイシンの慢性投与にのみ感受性があることが知られている。mTORC1 は、アミノ酸刺激や細胞内エネルギー状態などに応答して活性化し、その基質である S6K1 (S6 kinase 1) および 4E-BP 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) を直接リン酸化することで、タンパク質合成の活性化や脂肪合成、エネルギー代謝の促進を行っている。また、mTORC1 の亢進はオートファジーによるタンパク質分解を抑制することが知られている。

真核生物において mTOR は生存に必須の遺伝子であり、マウスにおける mTOR 全身ノックアウトは致死となる。また、mTOR シグナルは細胞内エネルギー代謝の中樞を担っていることから、その異常はがんや糖尿病・肥満に深く関与することが明らかになっている。脳の神経細胞においても mTOR シグナルは重要な役割を担っており、早期の終脳発達や神経回路の構築・維持などに関与していることが報告されている。これまでに、神経疾患に関わる mTOR シグナル分子として結節性硬化症の原因遺伝子である TSC (tuberous sclerosis complex) 1/2 などの mTORC1 活性を負に制御する遺伝子が報告されている。TSC1/2 の機能欠損は、全身に過誤腫を生じる結節性硬化症の発症だけでなく、てんかんや ASDs (Autism spectrum disorders)、知的障害の発症にも関与している。興味深いことに、これらの神経疾患において、mTOR シグナルはいずれも亢進していることが報告されている。また、mTOR シグナルの下流のオートファジーがアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の発症に関与していることも報告されている。

小脳は運動協調や運動学習を司る領域であるが、一部の ASDs において小脳の形態異常やプルキンエ細胞の脱落が報告されていることから ASDs との関与が示唆されている。ASDs や angelman syndrome において mTOR シグナルの亢進が起こっている。また、プルキンエ細胞の脱落は、小脳プルキンエ細胞特異的に *Tsc1* 遺伝子を欠損させることで mTOR シ

グナルを亢進したトランスジェニック (Tg) マウスでも見られた。この Tg マウスについて、行動解析を行ったところ、Tg マウスには運動協調に障害があり、社会行動の異常といった ASDs の特徴となるような表現型も観察された。

これまでに mTOR シグナルの亢進が神経疾患に強い関連性があることが示唆されているが、mTOR 自身を直接活性化した Tg マウスは作られていない。mTOR シグナルを間接的に亢進させると、mTORC1 シグナルにかかるフィードバック制御や内在性の mTOR シグナル分子の領域・時期での発現量の差によるばらつきを制御しきれない可能性が高い。そこで、本研究では、恒常的に活性化状態にあるラット mTOR 変異体 (以下、活性型 mTOR) を小脳プルキンエ細胞特異的に発現させることで mTORC1 シグナルを亢進したトランスジェニックマウス (L7-mTOR Tg マウス) を用いて、小脳における mTOR シグナルの機能解析を試みた。

## 結果

Tet-off システムを用いて、活性型 mTOR をプルキンエ細胞特異的に発現する Tg マウスを作製した。活性型 mTOR は、mTOR 遺伝子配列中に 4 ヶ所のアミノ酸置換が導入されており、培養細胞において飢餓条件下でも活性化状態が維持される変異体である。この恒常的活性化能は、mTORC1 シグナル亢進特異的であり、mTORC2 シグナルの亢進には大きな影響を与えないことが明らかとなっている。

L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞における活性型 mTOR の発現時期をウェスタンブロット解析により検証したところ、2 週齢から 4 週齢にかけて活性型 mTOR が多く発現していたが、その後、発現量は徐々に低下し、6 週齢ではほとんど検出されなかった。また、抗リン酸化 S6 抗体を用いた免疫染色によりプルキンエ細胞における mTORC1 シグナルの亢進を確かめたところ、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞では、Control マウスよりも強いリン酸化 S6 陽性シグナルが確認された。

これまでに、小脳プルキンエ細胞特異的な *Tsc1* ノックアウトマウスにおいて、運動協調能の障害や自閉症様の社会性行動を示すことが報告されている。そこで、L7-mTOR Tg マウスの運動協調能および社会行動について検証した。その結果、ロータロッドテストと foot print 解析から、L7-mTOR Tg マウスは運動協調に異常があることが明らかになった。一方で、L7-mTOR Tg マウスの社会行動については、Control マウスと比較して有意な差は観察されなかった。

L7-mTOR Tg マウスの小脳プルキンエ細胞において、活性型 mTOR の発現は、2 週齢をピークに徐々に減少していた。この発現量の低下は、おそらくプルキンエ細胞数の減少によるものであると推測し、プルキンエ細胞数とその形態について調べた。Control マウスと比較して、L7-mTOR Tg マウスでは、プルキンエ細胞の細胞体や樹状突起が肥大化していること

が明らかになった。また、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞数の経時変化を定量したところ、3 週齢以降 Control マウスと比較して有意に減少していくことがわかり、6 週齢では Control マウスのプルキンエ細胞数の 3 割程度になることが明らかになった。

L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞数減少の分子メカニズムを調べるために、アポトーシスマーカーである Cleaved caspase 3 および酸化ストレスマーカーである Heme oxygenase 1、低酸素マーカーである Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ ) による免疫染色を行った。その結果、これらのマーカーが陽性のプルキンエ細胞が Control マウスよりも L7-mTOR Tg マウスにより多く検出された。このことからプルキンエ細胞は細胞ストレスによるアポトーシス細胞死を起こしていると考えられた。

次に、L7-mTOR Tg マウスで見られた表現型のレスキューを試みた。L7-mTOR Tg マウスと Control マウスに mTORC1 阻害剤である rapamycin を 3 週齢から 6 週齢まで投与したところ、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の細胞体の肥大化や細胞数の減少といった表現型がレスキューされた。このことから、一連の表現型は mTORC1 シグナルの異常な亢進に起因することが強く示唆された。

これまでの結果から、活性型 mTOR の発現により mTORC1 シグナルが亢進することでプルキンエ細胞数の減少や肥大化といった現象が引き起こされていると考えられる。そこで、mTORC1 シグナルの下流に存在する HIF1 $\alpha$  の発現が増加していたことに着目し、プルキンエ細胞における mTORC1-HIF1 $\alpha$  シグナルの影響を検証した。HIF1 $\alpha$  阻害剤である PX-478 を rapamycin と同様に投与を行ったところ、L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の細胞体の肥大化やプルキンエ細胞数の減少が有意に抑制された。これらのことから、L7-mTOR Tg マウスで見られた表現型には mTORC1 シグナルの中でも HIF1 $\alpha$  に繋がるシグナルの関与が強く示唆され、小脳における mTORC1-HIF1 $\alpha$  シグナルがプルキンエ細胞の生存や形態形成に関わっていることが示唆された。

以上のことから、小脳プルキンエ細胞における mTORC1 シグナルの亢進が、プルキンエ細胞の発生や発達に異常をきたすことが明らかとなった。

## 考察

小脳において、mTOR シグナルの異常を起こさせたマウスモデルはこれまでにいくつか報告されている。例えば、mTORC1 の上流遺伝子の *Tsc1* もしくは *Tsc2* 遺伝子を小脳プルキンエ細胞特異的にノックアウトし、mTORC1 シグナルを亢進した Tg マウスである。これらのマウスでは、小脳プルキンエ細胞の肥大化や脱落、そしてマウスの運動機能に異常が見られるといった表現型が確認されている。また、社会行動に異常が見られ、新奇マウスに対する興味が失われることから、自閉症様のモデルマウスとされている。このような報告から、今回我々が作製した小脳プルキンエ細胞特異的に活性型 mTOR を発現させた L7-mTOR Tg

マウスにおいても、同様の表現型が見られることが予想された。実際に、小脳プルキンエ細胞の肥大化や脱落が観察され、先行研究において報告された表現型と一致していた。行動解析を行ったところ、運動協調能の異常が見られたが、社会行動のテストにおいて、L7-mTOR Tg マウスと Control マウス間に有意な差はなかった。小脳プルキンエ細胞特異的な活性化型 mTOR の発現により直接 mTORC1 シグナルを亢進した L7-mTOR Tg マウスよりも、*Tsc1* や *Tsc2* ノックアウトによる間接的な mTOR シグナルの亢進を行ったマウスの方が顕著な自閉症様行動を示したことは大変興味深く、mTORC1 シグナル以外のシグナルが自閉症発症に関与している可能性が考えられる。例えば、TSC1 および 2 を制御するシグナルとして LKB1-AMPK-mTOR シグナルがあり、AMPK は同時に mTORC1 構成因子である Raptor をリン酸化することで抑制制御も行う。また、*Tsc1* ノックアウトマウスにおいて見られた表現型が L7-mTOR Tg マウスでは、より早期の週齢から見られた。このことから、mTOR シグナルの亢進の程度についても先述した各マウスと L7-mTOR Tg マウスで異なることが考えられる。このように、*Tsc1* ノックアウトマウスは結節性硬化症の原因遺伝子に変異を入れることで、結節性硬化症に伴う自閉症の再現には優れているが、mTORC1 シグナルの関与を考察する点においては活性化型 mTOR を発現させた L7-mTOR Tg マウスの方が特異性の高いモデルマウスになったと考えられる。また、L7-mTOR Tg マウスの mTORC1 シグナルの亢進は活性化型 mTOR の発現量に依存するが、*Tsc1* ノックアウトマウスでは、内在性の mTOR シグナル因子の発現量に依存する。そのため、*Tsc1* ノックアウトマウスでは、mTORC1 シグナルの亢進が時期により大きく変動することが考えられる。さらに、ヒトの結節性硬化症は、神経細胞における TSC1/2 の loss of heterozygosity、あるいはハプロ不全による発症と考えられており、その点からも患者によって mTOR シグナルの亢進の度合いが違うことが示唆されている。

本研究は、小脳プルキンエ細胞特異的に活性化型 mTOR を発現させることで、小脳機能や精神神経疾患に対する mTORC1 シグナルの病態生理学的な寄与を直接的に明らかにすることに繋がると考えられる。今後、このモデルマウスを用いて、mTORC1 シグナルが亢進している精神疾患や神経変性疾患などの治療薬の候補となる化合物のスクリーニング等に使用することも期待できると考えている。