

博士論文

新規 TGF- β 標的因子 TUFT1 の
mTOR シグナルにおける機能解析

川崎 夏実

目次

要旨.....	1
序文.....	2
1. PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達機構とがん	
2. メンブレントラフィックと mTOR シグナル	
3. 転写調節因子 TTF-1 と TGF- β の肺腺がんにおける関係	
4. TUFT1 とがん	
方法.....	15
結果.....	30
1. がん予後不良因子 TUFT1 の同定	
2. TUFT1 と mTORC1 シグナル	
3. TUFT1 とメンブレントラフィック	
4. メンブレントラフィックと mTORC1 シグナル	
5. TUFT1 結合因子 RABGAP1 と mTORC1 シグナル	
6. 治験薬 perifosine の新規作用機序	

考察.....	77
---------	----

1. mTORC1 シグナル制御機構における TUFT1 の位置づけ

2. TUFT1 の機能

3. TGF- β シグナルと mTOR シグナル

4. 治療応用を見据えて

結論.....	88
---------	----

引用文献.....	89
-----------	----

謝辞.....	105
---------	-----

要旨

mTORC1 は長くがんの治療標的として注目されてきたが、その複雑な分子機構の全貌は未だ明らかでない。本研究では、がんの増殖・転移に重要な機能を持つ mTORC1 の新規制御因子 TUFT1 を同定した。TUFT1 は RABGAP1 と結合し、Rab の活性を制御することで mTORC1 シグナルの統制を図っていると考察された。さらに、*TUFT1* の発現量が治験薬 perifosine の感受性と有意な負の相関を示すことを見出し、perifosine の新規作用機序を同定した。本研究の結果は、TUFT1 自身、もしくは関連するメンブレントラフィックが新たながんの治療標的、もしくはバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

序文

1. PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達機構とがん

Rapamycin は、およそ 30 年前にイースター島で、放線菌の一種である *Streptomyces hygroscopicus* より単離された。もともとは抗真菌薬として開発されていたが、その後強力な免疫抑制作用や増殖抑制作用を有することが明らかとなり、注目を浴びることとなった薬剤である。1990 年代、酵母を用いた分子遺伝学的スクリーニング法により、rapamycin のターゲット遺伝子が同定され、target of rapamycin 1 および 2 (*TOR1* および *TOR2*)と命名された [1, 2]。後に、これは様々な種で保存されていることが明らかとなり、哺乳類では mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR)と呼ばれる。

mTOR は phosphatidylinositol kinase-related kinase (PIKK)ファミリーに属する、非典型的なセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞の増殖や生存に重要な役割を担う。mTOR はその構成サブユニットの違いにより、mTOR complex 1 (mTORC1) および mTOR complex 2 (mTORC2)という二つの複合体を形成する [3-5]。そのうち、mTORC1 は、mTOR、Raptor、mLST8、PRAS40、DEPTOR から構成され、増殖因子やアミノ酸・細胞内の栄養・ストレス状態に応答して活性化されて、そ

の下流で mRNA の翻訳やリボソームの生合成を司る [6]。

mTOR の上流には EGFR、HER2/ErbB2、VEGFR、IGFR-1 などのチロシンキナーゼ型受容体が存在する。受容体が活性化すると、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を膜にリクルートし、活性化した PI3K は PIP2 をリン酸化して、PIP3 を産生する。PIP3 は、pleckstrin homology (PH) ドメインを介して AKT や phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1)などを膜に呼び込むことで AKT を活性化させる。こうして活性化した PI3K-AKT 経路は、低分子量 G タンパク質 Rheb の GTPase-activating protein (GAP)である tuberous sclerosis complex (TSC/ TSC1, TSC2, TBC1D7)を不活性化し、結果として活性型となった Rheb が mTOR と結合することで mTORC1 が活性化する [7]。

一方で、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化には低分子量 G タンパク質 Rag が関与する。Rag には RagA/B/C/D の 4 種類が存在し[8, 9]、GTP 型の RagA (または RagB)と GDP 型の RagC (または RagD)からなるヘテロ二量体が活性型となる。Rag が活性状態になると mTORC1 は細胞質から、リソソーム膜表面にリクルートされることが知られている (図 1) [10, 11]。

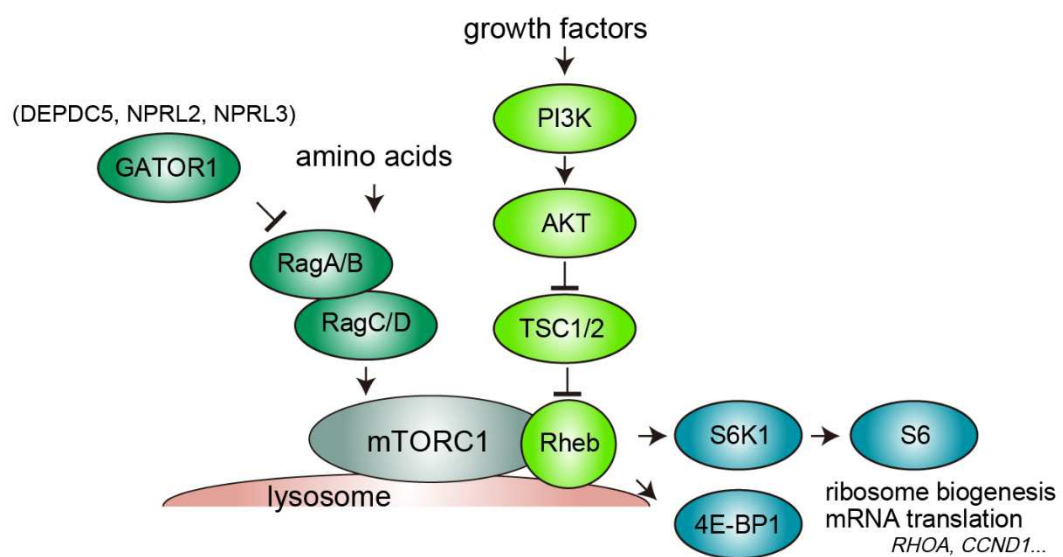


図1. mTORC1シグナル伝達機構

mTORC1はがんや代謝疾患とも関連が深い重要なシグナル伝達経路である。細胞内の栄養状態や増殖因子に応答して活性化され、その下流でmRNAの翻訳やリボソーム生合成、代謝、オートファジーなどを制御することが知られる。

mTORC1 は、PI3K/AKT 経路や Ras/MAPK 経路など、代表的ながん関連シグナルの下流に位置するため、ヒトのがんにおいて頻繁に活性化が認められる。また mTORC1 は 4E-BP1 による翻訳制御をはじめ多くの下流のプロセスを活性化するが、これらもがんの進行と深く関わるため、治療の標的として長く注目されてきた。Rapamycin 誘導体 “rapalogs” が、第一世代の mTOR 阻害剤であり、temsirolims (Pfizer) が 2007 年に、everolimus (Novartis) が 2009 年に腎細胞がん治療薬として承認されたものの、残念ながらその効果は芳しくない。原因として、rapalogs では mTORC1 のキナーゼ活性を完全には抑制できないこと [12, 13]、また rapalogs では mTORC2 の抑制が不十分であり、フィードバック制御により insulin/PI3K/AKT 経路を活性化させてしまうという問題が挙げられた [14]。加えて、mTORC1 の抑制はオートファジーを誘導してしまうため [15]、逆に飢餓状態に置かれたがん細胞の生存に有利に働いてしまうという課題も存在し、これについてはオートファジー阻害剤との併用療法について現在臨床試験が行われている [16]。一方、第二世代の mTOR 阻害剤として、mTOR の酵素活性を直接抑制することで、mTORC1 と mTORC2 をどちらも抑制する ATP 競合性キナーゼ阻害剤が開発された。しかしながら、これらの阻害剤も長期に投与することで insulin/PI3K のフィードバックがかかり、AKT が再活性化してしまうという課題に直面した。そこで現在は第三世代の mTOR 阻害剤 “RapaLink” が注目を浴びて

いる[17]。RapaLink は、mTOR キナーゼ阻害剤と rapamycin を適切な長さのリンカーで結ぶ構造をしており、第一世代、第二世代の薬剤が抱える耐性への問題を相互に補完できるものと期待される。一方で、それと同時に新たなタイプの mTOR 阻害剤の開発も強く求められている。

2. メンブレントラフィックと mTOR シグナル

メンブレントラフィックとは、細胞内の複雑なオルガネラネットワーク制御に関与する、膜や小胞を介した細胞内の物質輸送システムである (図 2) [18, 19]。

メンブレントラフィックの重要な制御因子として、低分子量 G タンパク質 Rab が存在し、ヒトでは 60 種類以上もの Rab ファミリーの存在が報告されている。

Rab は、GTP 結合型の活性化状態と GDP 結合型の不活性化状態との間を変化することで、分子スイッチとして機能するが、こうした活性状態は、様々な Rab グアニンヌクレオチド交換因子 (Rab-GEF)、Rab GTPase 活性化因子 (Rab-GAP)、Rab GDP 解離阻害因子 (Rab-GDI)によって制御されていることが知られる。活性化した Rab はさまざまなエフェクタータンパク質と作用し、メンブレントラフィックを制御する。

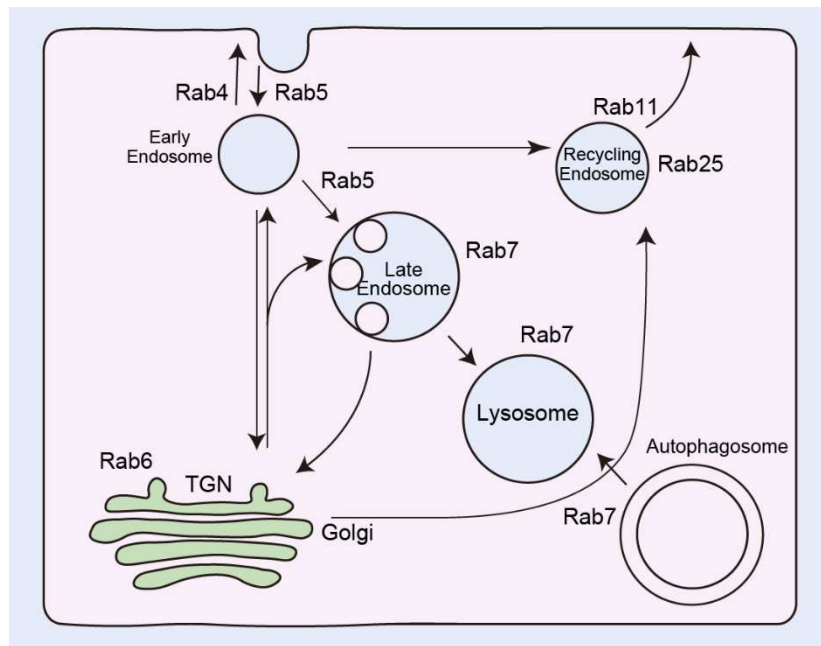


図2. メンブレントラフィックとRab

Rabは低分子量Gタンパク質の中で最大のファミリーを形成し、それぞれ特定のオルガネラおよび細胞内膜に局在する。例えばRab7は後期エンドソームおよびオートファゴソームに局在し、両者のリソソームとの融合に関与している。

個々の Rab はそれぞれ異なるオルガネラに局在する場合が多い。例えば Rab7 は初期エンドソームから後期エンドソーム・リソソーム、オートファゴソームに存在して分解経路に作用するのに対し、Rab5 や Rab21 は初期エンドソームの輸送に関与して主にエンドサイトーシスを促す。トランスゴルジネットワーク (TGN) から細胞膜へのエクソサイトーシスの経路には、Rab3、Rab11、Rab26、Rab27、Rab37、Rab38 と多くの Rab が関与する。

生体のさまざまなプロセスに関与する Rab タンパク質自体や、その活性制御因子の異常が、がんに関係することは既に良く知られている。例えば Rab5A は乳がん、RAB7 は肺がんにおいて高発現が認められ、メラノーマではドライバー遺伝子と言われている [20-22]。また Rab25 は AKT シグナルの活性化と関わり、乳がんや卵巣がんにおいて高発現している予後不良因子である [23]。しかしながら、Rab の発現異常ががん悪性化に関わるメカニズムについては不明な部分が多い。

一方でメンブレントラフィックは mTOR の活性化の過程にも必要であるとも考えられてきた [24-28]。いくつかの Rab 変異体の過剰発現は mTOR 活性を抑制することも知られている。即ち、正常な Rab の活性制御が、正常な mTOR の活

性制御に必須であると考えられる。mTORC1 の活性を制御する Rab の制御因子もいくつか知られているが、いずれにしても Rab の活性と mTOR を結びつけるメカニズムは不明な部分が多く残されている。

3. 転写調節因子 TTF-1 と TGF- β の肺腺がんにおける関係

高齢化に伴いがんによる死亡者数は年々増え続け、その中でも肺がんは我が国で死亡数の最も多いがんである。肺がんは、組織学的な分類と治療の方向性から、大きく非小細胞肺がん (non-small cell lung cancer : NSCLC) と小細胞肺がん (small cell lung cancer : SCLC) に分けられるが、そのうち患者全体の 8 割以上が非小細胞肺がんである。

非小細胞肺がんはさらに、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんなどに分類されるが、発生頻度が最も高いのは腺がんである。この肺腺がんにおいて一般に予後良好因子として、ホメオドメインを持つ転写因子 thyroid transcription factor-1 (TTF-1; 別名 NKX2-1) が知られている [29]。TTF-1 は甲状腺、肺、および前脳の一部で発現し、それぞれの組織特異的な遺伝子 (さまざまな肺サーファクタントタンパク質など) の発現を直接制御する因子である。肺がんのうち小細胞がんでは

90%以上、腺がんでは 70-80%で発現しているため、肺がんの病理診断にも利用される因子だが、TTF-1 陽性の肺がん患者は、陰性の肺がん患者と比べて平均生存期間が長いという報告がある。さらに、所属研究室の先行研究の中で、肺腺がん細胞において TTF-1 が transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルの主要な細胞内情報伝達因子 Smad3-Smad4 複合体形成を核内で阻害し、上皮間葉転換 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)などを抑制することでがん抑制的に働いていることが明らかとされてきた (図 3) [30, 31]。

TGF- β は、TGF- β ファミリーの代表的なサイトカインである。細胞増殖や分化、運動、接着、アポトーシス、細胞外基質の産生などの多くの細胞応答を制御し、胚発生時や成熟組織での細胞運命の決定にも重要な役割を担う [32]。TGF- β は、膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼである I 型受容体と II 型受容体に結合してシグナルを伝達する。細胞外基質中に存在する TGF- β が各種刺激によって活性化されると、細胞膜上の I 型および II 型受容体に結合して TGF- β 受容体複合体を形成する。II 型受容体のキナーゼにより I 型受容体がリン酸化を受けるとその細胞内ドメインのセリン/スレオニンキナーゼが活性化され、活性化された I 型受容体は細胞内にシグナルを伝達する。細胞内での TGF- β シグナル伝達は、主に Smad と呼ばれるタンパク質を介して行われる。TGF- β の特異型 Smad は Smad2

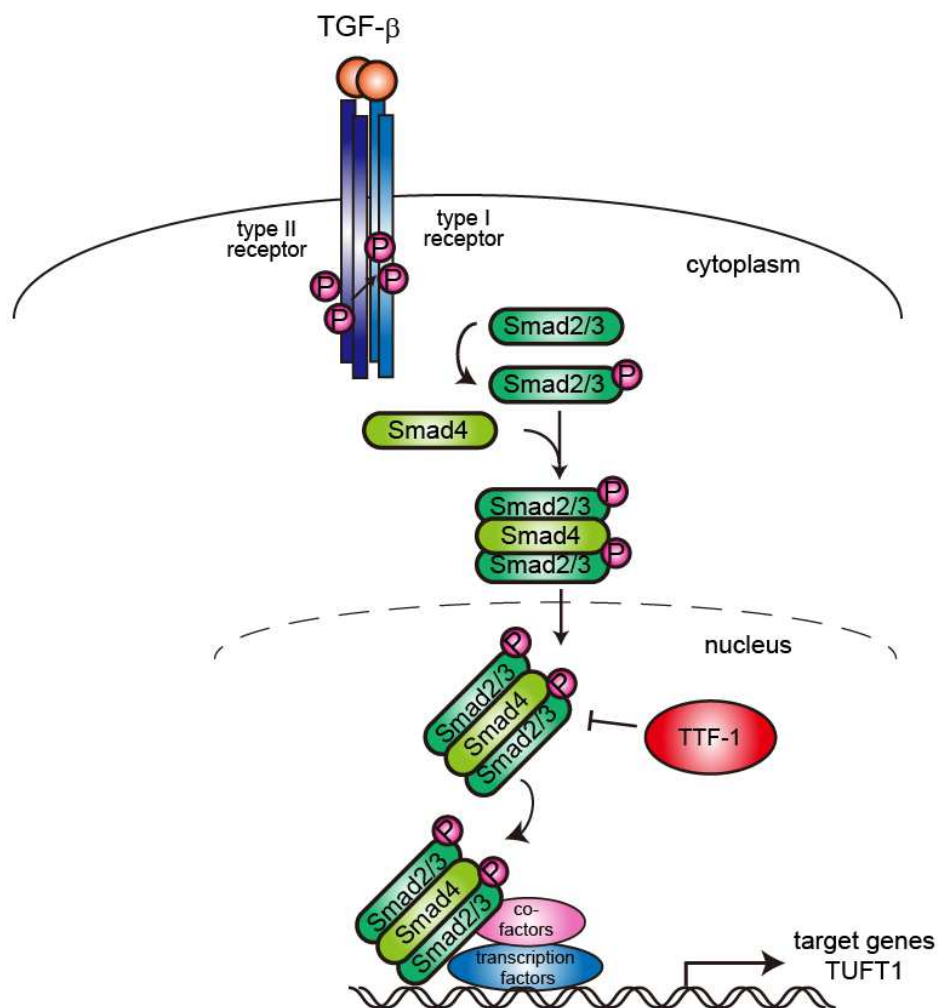


図3. TGF-βシグナル伝達機構とTTF-1

TGF-βの刺激によりType I Receptorが活性化されると、Smad2/3をリン酸化する。リン酸化したSmad2/3は、Smad4とともに複合体を形成して核内移行し、標的遺伝子の転写を制御することが知られている。所属研究室の先行研究の中で、肺腺がん細胞において、TTF-1はSmad3、Smad4と拮抗して働き、EMTなどを抑制することでがん抑制的に機能することが明らかとされてきた。

と Smad3 であり、Smad2/3 が I 型受容体の有するキナーゼ活性によって直接リン酸化を受ける。リン酸化された Smad2/3 は Smad4 とヘテロ三量体を形成して核内へと移行し、核では他の転写因子や転写調節因子と複合体を形成することで標的遺伝子の転写を調節する [33, 34]。

TGF- β は、上皮細胞を初めとする多くの細胞で増殖抑制因子として機能するためもともとのがん抑制因子として注目されてきた。現に、大腸がんや膵臓がんなど多くのがんで TGF- β シグナル分子に変異が見られるため、TGF- β シグナルの異常はがん化の原因の一つと考えられている。ところがその一方で、進行がんにおいて、TGF- β はさまざまなメカニズムを介し、がんの進展を促進する因子としても作用すると考えられている。実際、TGF- β はしばしばがん組織で高発現し、腫瘍微小環境、即ち宿主の多くの細胞に作用して、血管新生や細胞外基質の産生、免疫抑制、EMT などさまざまな現象を引き起こすことで、がんの発生・悪性化において促進的な役割も合わせ持つことが知られる (TGF- β 作用の二面性) [35, 36]。

本研究では、肺腺がんにおける TGF- β と TTF-1 の詳細な関係を探るため、chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing および DNA マイクロアレイによる網羅的解析データを解析し [30]、TTF-1 による発現抑制と Smad3 による発現

誘導を受ける代表的な新規標的として TUFT1 を同定した。

4. TUFT1 とがん

ヒト TUFT1 は 390 アミノ酸から構成される酸性タンパク質であるが、もともとはエナメル芽細胞とエナメル象牙境の細胞外マトリックスにおいて同定され、歯のエナメル質の発生、構造形成および石灰化に関与する因子と考えられてきた[37, 38]。一方、その同定からおよそ 10 年後、TUFT1 は歯以外にも肺・腎・肝臓などの組織、特にがん組織で広く発現が認められることが明らかとなり、石灰化以外にも普遍的な機能を持つことが期待された [39, 40]。これまでに、TUFT1 の mRNA レベルは低酸素状態にある組織において高発現していることが示され [41]、関連して、ラット副腎皮質由来の褐色細胞腫 PC12 細胞では、低酸素誘導因子 HIF1 α 依存的に TUFT1 の発現誘導が起こることも示されている [42]。また肺がんにおいて、TUFT1 は転写因子 Snail の発現を正に制御することで、EMT 関連因子の発現を誘導するという報告や [43]、乳がん細胞において MAPK シグナル等に関係し、細胞周期およびアポトーシス誘導にも影響を与えるという報告もある [44]。以上の知見は、TUFT1 とがんとの関連性を示唆するが、TUFT1 の詳細な機能については未だ明らかでない。

以上のことから、本研究では TUFT1 の肺がんなどにおける機能を解明することを目的として、研究を開始した。

方法

1) 細胞培養

ヒト肺腺がん細胞株 A549 は、東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより、ヒト肺大細胞がん細胞株 NCI-H460-Luc は JCRB 細胞バンクより入手した。MDA-231-D は、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 より樹立された高い転移能を有するクローンである [45]。A549、MDA-231-D、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T およびマウス胚性線維芽細胞 MEF は、10% fetal bovine serum (FBS #SH30910.03, Thermo Fisher Scientific)、100 U/mL penicillin G および 100 µg/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM#11965, Thermo Fisher Scientific) を用いて培養した。ヒト肺腺がん細胞株 NCI-H441 およびヒト胃がん細胞株 MKN45 には、10% FBS および penicillin-streptomycin を含む Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640 #11875, Thermo Fisher Scientific) を用いた。ヒト肺大細胞がん細胞株 NCI-H460-Luc は 15% FBS、0.023 IU/mL insulin および 100 U/mL penicillin G および 100 µg/mL streptomycin を含む RPMI 1640 を用いた。また、細胞はいずれも 37°C、5%CO₂ 条件下で培養を行った。

2) 試薬、抗体

TGF- β 3 は R&D systems より入手した。Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled (#P5282)、LysoTracker Red (DND-99) (#L7528)、perifosine (#SML0612) および edelfosine (#SML0332) は Sigma-Aldrich より購入した。MK-2206 (ENZ-CHM164) は Enzo Life Sciences より、Cytochalasin D (#037-17561) は Wako Pure Chemical Industries より得た。Ciliobrevin D (#250401) は Merck Millipore より、erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) (#13352) は Cayman Chemical より入手した。

mTOR (#2983)、pS6K1 (Thr389) (#9234)、S6K1 (#9202)、pAKT (Thr308) (#2965)、AKT (#9272)、pS6 (Ser240/244) (#2215)、S6 (#2217)、p4E-BP1 (Ser65) (#9451)、4E-BP1 (#9644)、pERK1 and 2 (pERK1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101)、以上の抗体はいずれも Cell Signaling Technology より購入した。抗 TUFT1 抗体 (#sc-47536)、抗 cyclin D1 抗体 (#sc-718)、抗 cyclin D3 抗体 (#sc-182)、抗 RhoA 抗体 (#sc-418) および 抗 cathepsin D 抗体 (#sc-6487) は、Santa Cruz Biotechnology より入手した。抗 LAMP2 抗体 (#ab25631) および、抗 RABGAP1 抗体 (#ab153992) は、Abcam より得た。抗 HDAC1 抗体 (#2E10)、抗 ERK1 and 2 抗体 (#05-1152) および 抗 EGFR 抗体 (#05-101) は、Merck Millipore より、抗 EEA1 抗体 (#610457) は、BD Biosciences より購入した。また、抗 c-Myc 抗体 (#017-21871) は Wako Pure Chemical Industries より、抗 FLAG 抗体 (M2, #F3165, #F1804) および α -tubulin (#T6199) 抗

体は Sigma-Aldrich より、抗 Cdc42 抗体 (#ACD03)は Cytoskeleton より入手した。

3) プラスミド

ヒト TUFT1、ヒト RABGAP1、ヒト Rab36 およびイヌ Rab7a の発現ベクターは PCR 法により作製した。増幅フラグメントは、pcDEF3-FLAG ベクター (TUFT1)、pGEX-6P-1 ベクター (TUFT1)、pcDNA3-FLAG ベクター (Rab7a)、また pcDNA3-Myc ベクター (Rab36)にそれぞれサブクローニングした。変異体の Rab7a、RABGAP1 および Rab36 は PCR 変異導入により作製した。マウス Kif5b の発現ベクター (pKin1B, Addgene plasmid # 31604)は Anthony Brown 博士より供与を受けた [46]。また、すべての cDNA 産物はシーケンスにより配列を確認した。

4) アミノ酸刺激

細胞をアミノ酸飢餓培地 (10% 透析処理済み FBS (#SH30079, GE Healthcare) を含む DMEM with sodium pyruvate, without amino acids (#048-33575, Wako Pure Chemical Industries))で 2 回リンスし、37°C で 3 時間培養した。その後、10% FBS を含むアミノ酸含有 DMEM (#11965)で刺激した。

5) 栄養飢餓刺激

細胞を低グルコース (1000 mg/L)、アミノ酸 (Arg, Leu, Lys) 不含 DMEM (#D9443, Sigma-Aldrich) で 2 回リンスし、37°C で 3 時間培養した。その後、10% FBS を含むアミノ酸含有 DMEM (#11965) で刺激した。

6) ノックアウトマウス

以下、全ての動物実験は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会による承認の計画に従った。

Tuft1^{tm1a(KOMP)Wtsi} アレルを持つ ES 細胞 (EPD0383_4_G08) を International Mouse Phenotype Consortium (<http://www.mousephenotype.org>) より入手し、3i (SU5402, PD184352, CHIR99021) を含む培地で培養した [47]。C57BL/6N マウス由来のブラストシストに ES 細胞をインジェクション、ICR に移植し、キメラマウスを得た。雄のキメラマウスと野生型 C57BL/6N 雌マウスを掛け合わせ、ヘテロマウスを得た。マウスのジェノタイピングには以下のプライマーを用い、multiplex PCR を行った。

WT-R: 5'-CCCTGAGGGACCAGCCACATAGAACAGA-3'

mutant allele, Tuft1-F: 5'-TGGTCTGAGCTCGCCATCAGTTTCA-3'

wild-type allele, WT-F: 5'-CTGTTAGCATTCTGTCTAAACTTCACCCCA-3'

7) 皮下移植

BALB/c nu/nu 4 週齢雄マウスは、三協ラボサービスより入手した。個体あたり 5×10^5 個ずつの細胞を移植した。各々腫瘍径 (長径および短径) を測定し、腫瘍体積を計算した。腫瘍体積は、以下の計算式を用いて推算した。

$$\text{腫瘍体積} = ((\text{長径}) \times (\text{短径})^2) / 2$$

8) *In vivo* 骨転移モデル

各種 shRNA およびタンパク (GFP、TUFT1) をレンチウイルスで恒常的に発現させた 1×10^5 個ずつの MDA-231-D-luc 細胞を BALB/c nu/nu 4 週齢雌マウスに移植した。移植 5 週後に、骨転移を形成した細胞をルシフェラーゼによる *in vivo* イメージングで検出した。イメージングは、D-luciferin potassium salt (Wako Chemicals) を腹腔内注射した後、photon counting (LB983, Berthold Technologies) により行った。

9) 透過型電子顕微鏡による形態観察

各種 siRNA をトランスフェクションした A549 細胞を固定した。以前研究室で確立したプロトコルに従い、細胞全体像を観察した [48]。

10) レンチウイルスの作製・感染

pCAG-HIV-gp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev は、以前研究室で用いたものを使用した [45]。shRNA を発現させるレンチウイルスは、パッケージング細胞として用いた 293FT 細胞に発現ベクターとパッケージングベクターを同時トランスフェクションすることで作製した。3 日後にウイルス上清を回収し、Lenti-X Concentrator (Takara Bio) で濃縮のうえ、A549 細胞、MDA-231-D 細胞にそれぞれ感染させた。

shRNA ベクターの作製に使用したオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

(5' → 3'): Human TUFT1 #1,

GATCCCCGCTGGTCATTCTCTGGCTTACGTGTGCTGTCCGTAAGCCAGAGAAT

GACCAGCTTTTTTGAAAT,

CTAGATTTCCAAAAAGCTGGTCATTCTCTGGCTTACGGACAGCACACGTAAG

CCAGAGAATGACCAGCGGG; human TUFT1 #2:

GATCCCCGGATATAAGTAGCAAGCTTACGTGTGCTGTCCGTAAGCTTGCTAC

TTATATCCTTTTTTGAAAT,

CTAGATTTCCAAAAAGGATATAAGTAGCAAGCTTACGGACAGCACACGTAA

GCTTGCTACTTATATCCGGG.

11) siRNA による RNA 干渉

ノックダウン実験に用いた siRNA は siDirect (RNAi inc.)で設計したものを使用した。siRNA 導入には、Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Scientific)を用い、推奨プロトコルに従った。培養液中の siRNA の最終濃度は、10 nM とした。siRNA の配列を以下に示す。コントロール配列情報は非開示である。

Human TUFT1#1, GGAUAUAAGUAGCAAGCUUGA and
AAGCUUGCUACUUAUAUCCUC; Human TUFT1#2,
GUAGCCUUUUGCGGAAAAAUU and
UUUUUCCGCAAAAGGCUACUC; Human mTOR#1,
GAUCUCAUGGGCUUCGGAACA and UUCCGAAGCCCAUGAGAUCUU; Human
mTOR#2, CCAAUUAUACCCGUUCUUUAG and
AAAGAACGGGUUAUAAUUGGUU; Human LAMP2#1,
GAUAAGGUUGCUUCAGUUAUU and UAACUGAAGCAACCUUAUCCU; Human
LAMP2#2, GCUCUACUUAGACUCAAUAGC and
UAUUGAGUCUAAGUAGAGCAG; Human RABGAP1#1,
GGGAUAUUAACCGAACAUUC and AAUGUUCGGUUAUAUCCCGG; Human
RABGAP1#2, GACGCAUGUUGGUAGGUCACU and
UGACCUACCAACAUGCGUCUA.

SMAD4 の siRNA は、Thermo Fisher Scientific より入手した Stealth Select siRNA (HSS106256, UAAGGCACCUGACCCAAACAUCACC) を使用し、ネガティブコントロールとして Negative Control Med GC Duplex #2 (12935112、配列情報非開示) を用いた。

12) cDNA のトランスフェクション

トランスフェクション試薬には Lipofectamine 2000 もしくは、Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific) を用い、各々の推奨プロトコルに従った。

13) アデノウイルスの作製

FLAG-TUFT1 およびコントロールの LacZ を発現させるアデノウイルスを作製するため、293A 細胞に Pac1 処理した発現ベクターを Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。ほとんどの細胞が cytopathic effect (CPE) を起こすまで数週間培養した後、培養上清を回収して凍結融解を 3 度繰り返した後に、4°C、3000 rpm で 30 分間遠心し、ウイルス上清を回収した。回収したウイルスの一部を 293A 細胞に感染させることでウイルスの増幅を行った。最終的には Adenovirus Standard Purification Virakit (VIRAPUR) により調製

した。

14) SDS-PAGE と immunoblotting

細胞を PBS で洗浄後、NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1% NP-40、cOmplete EDTA-free protease inhibitor (Roche))で溶解させ、4℃で 15000 rpm 10 分間遠心し上清を回収した。BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)によりタンパク質濃度を測定し、濃度をそろえたサンプルを作製した。3×sample buffer (300 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.08% bromophenol blue、80% glycerol、5.2% SDS、13.2 mM DTT)を加えて 98℃ 3 分間ボイルし、polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で分離後、セミドライ法にて PVDF メンブレン (Pall)に転写した。メンブレンを Blocking Buffer (5% スキムミルク (森永) 、Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS)-T) にて室温で 1 時間インキュベーションした後、各種一次抗体を 4℃で一晩、二次抗体を室温で 1 時間インキュベーションした。バンドの検出には enhanced chemiluminescence (ECL)法を用い、ECL1 液 (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 2.5 mM luminol, 0.4 mM p-coumaric acid)と ECL2 液 (0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.015% H₂O₂)を 5 ml ずつ混ぜ合わせてメンブレンを浸し、LAS-4000 (FUJIFILM)にて検出した。バンドの定量には ImageJ 1.50b (National Institutes of Health)を使用した。

15) GST プルダウンアッセイ

GST 融合 TUFT1 およびコントロールの GST タンパク質を大腸菌に発現させ、Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) ビーズで精製した。リコンビナント RABGAP1 は Abcam (#ab161730) より入手した。TUFT1 と RABGAP1 の結合実験には RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% Triton X-100) を用いた。洗浄後、immunoblotting、もしくは CBB 染色により解析した。

16) 核・細胞質分画実験

核・細胞質分画には、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) を使い、推奨プロトコルに従った。

17) 蛍光免疫染色

細胞の培養には 8-well Culture Slides (Thermo Fisher Scientific) を使用した。細胞を 4% PFA にて室温で 15 分間固定した後、0.1% TritonX-100 により室温で 7 分間細胞膜透過処理を行った。各一次抗体は Blocking One (ナカライテスク) で希釈し、4°C で一晩インキュベーションした。Alexa 蛍光標識された二次抗体 (Invitrogen)

も Blocking One で希釈のうえ、室温で 1 時間インキュベーションした。最後に VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) で封入、核染色を行った。

また F-アクチンの蛍光染色には、Fluorescein Isothiocyanate Labeled Phalloidin (#P5282, Sigma Aldrich) を用いて室温で 1 時間インキュベーションした。観察には、FV10i 共焦点顕微鏡(Olympus)を用いた。

18) *In situ* PLA

細胞は、上記手法の通り固定、細胞膜透過処理を行った。*In situ* PLA は、Duolink (Sigma-Aldrich) のキットを用い、推奨プロトコルに従った。最後に VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI で封入、核染色を行った。

19) RNA 抽出と RT-PCR

細胞の total RNA は TriPure Isolation Reagent (Roche) もしくは RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、推奨プロトコルに従って回収した。first-strand cDNAs への逆転写には、PrimeScript II reverse transcriptase (Takara Bio) を用いた。定量的 RT-PCR 解析には FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) を用いて、Stepone plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して検出した。

GAPDH は内部標準として使用した。

使用したプライマーの配列を以下に示す (表 1)。

表 1. PCR プライマー配列

Gene	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
<i>TUFT1</i>	TTGCTAGGGATGGAGACGGA	TTGGCAGTCAGCATTGTTGC
<i>RHOA</i>	TATCGAGGTGGATGGAAAGC	TTCTGGGGTCCACTTTTCTG
<i>RAC1</i>	AACCAATGCATTTCTGGAGA	CTGTTTGCGGATAGGATAGGG
<i>CDC42</i>	GTGTGTTGTTGTGGGCGATG	TGTGGATAACTCAGCGGTCG
<i>CDH1</i>	TGCACCAACCCTCATGAGTG	GTCAGTATCAGCCGCTTTCAG
<i>FN1</i>	GACAGGAGGAAATAGCCC	CATCGTGCAAGGCAACCAC
<i>SNAI1</i>	TTCTCACTGCCATGGAATTCC	GCAGAGGACACAGAACCAGAAA
<i>CCND1</i>	ATCTACACCGACAACCTCCATCC	GCATTTTGGAGAGGAAGTGTTT
<i>CCND3</i>	TGACCATCGAAAACTGTGC	ACAGAGGGCCAAAAAGGTCT
<i>GAPDH</i>	TCTTTTGCGTCGCCAGCCGAG	TGACCAGGCGCCCAATACGAC
<i>NPRL3</i>	CTGAGGACCTCCGCATGTTTG	CAAACAGCATGAGCAGCTGG

20) トランスフェリン取り込みアッセイ

A549 細胞を無血清 DMEM 条件で 37°C で 1 時間培養した。エンドサイトーシスの追跡には、Alexa-488 conjugated transferrin (#T13342) (50 µg/mL)を添加のうえ一定時間後に固定した。リサイクリングの追跡には、Alexa-488 標識したトランスフェリン (50 µg/mL)で 15 分間処理した後、PBS で洗浄し、37 °C で一定時間培養した後固定した。細胞の固定は上記の手法で行い、観察には FV10i 共焦点顕微鏡を用いた。

21) Chamber migration assay

細胞を PBS で洗浄後、0.05% Trypsin/EDTA で処理し、細胞数を計数した。全ての条件において細胞数を一定に揃え、細胞懸濁液を 8 μm ポアの Cell Culture Inserts (BD) に添加した。一定時間 37°C、5% CO₂ 条件でインキュベーションした後に、チャンバーを取りだし、10%ホルマリンで細胞を 15 分間室温にて固定、PBS で洗浄後、Crystal Violet 液 (0.5% Crystal Violet, 20% メタノール)に 1 分間つけて細胞を染色した。倒立顕微鏡にてランダムに撮像した。染色された細胞数を計数し、視野毎の平均を取って定量した。

22) GAP activity assay

HEK293T 細胞に FLAG-RABGAP1 もしくは FLAG-TUFT1 を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降、洗浄した。免疫沈降に用いたビーズをリコンビナント Rab36 (#ab160571, Abcam)とともにインキュベーションした。*In vitro* GTPase 反応には、*in vitro* GAP activity assay kit (GTPase-Glo Assay, Promega)を用い、推奨プロトコルに従った。

23) 統計解析

2 群間の *in vitro* のデータ解析には Welch の t 検定を用いた。*In vivo* のデータ解析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。多重比較検定には Turkey-Kramer 検定 (*in vitro*)および Steel-Dwass 検定 (*in vivo*)を各々用いた。統計解析には R (version R-3.3.2)プログラムを使用した。

24) RNA シークエンス

siRNA をトランスフェクションした A549 細胞から、トータル RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出した。mRNA は、Dynabeads mRNA DIRECT Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用して精製した。cDNA ライブラリは、Ion Total RNA-Seq Kit v2 を用いて作製した。Ion PI chip v2、Ion PI IC 200 Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて、Ion Proton により cDNA ライブラリのハイスループットシーケンシングを行った。シーケンズのリードは、TopHat2 を用いて human reference transcriptome (hg19) にアラインメントした。発現量比較と定量は、cuffdiff プロトコルを用いて行った。シーケンズ生データは GEO (GSE99149)より入手可能である。

25) 人権の保護及び法令等の遵守への対応

ヒトの遺伝子解析は本研究には含まれていない。本研究で行った遺伝子組換え実験は、東京大学医学部遺伝子組換え生物等委員会において承認を受けた医学部分子病理学分野の「TGF- β シグナルの機能解析などを目的としたプラスミド・アデノウイルス・レトロウイルス・レンチウイルス・センダイウイルス・バキュロウイルスの培養細胞および遺伝子改変マウス等への導入およびゲノム編集実験」に含まれており、適切な拡散防止措置をとった。

結果

1. がん予後不良因子 *TUFT1* の同定

肺腺がんにおける TGF- β と TTF-1 の詳細な関係を探る目的で、ヒト肺腺がん細胞 NCI-H441 における Smad3 の ChIP-sequencing および発現マイクロアレイのデータを解析し [30]、TGF- β による発現誘導を受け、Smad3 の直接標的であり、かつ TTF-1 存在下で Smad3 の結合が抑制され発現抑制を受ける因子として複数の候補遺伝子を同定した。そのうち、*TUFT1* は、機能未知でありながら、公開データベースを用いた予後解析の結果より、その発現が高いほど肺がん、乳がん、胃がんなど複数のがんにおいて予後不良となることが明らかになった (図 4A-C)。特に stage 1 の肺腺がん患者群においてはその傾向が強く、*TUFT1* の発現の高さが、早期がんの患者予後規定因子となりうる可能性も示唆された (図 4A)。以上のことより、本研究では *TUFT1* に着目し、その機能解析を行うこととした。

A549 細胞と NCI-H441 細胞は、ともにヒト肺腺がん細胞株であるが、NCI-H441 細胞はタンパク質レベルにおいて TTF-1 の発現が比較的高い細胞であり、A549 細胞は TTF-1 の発現が認められない細胞である。*TUFT1* は TTF-1 による発現抑制を受ける因子として同定したが、まず予想通り NCI-H441 細胞と比較して A549

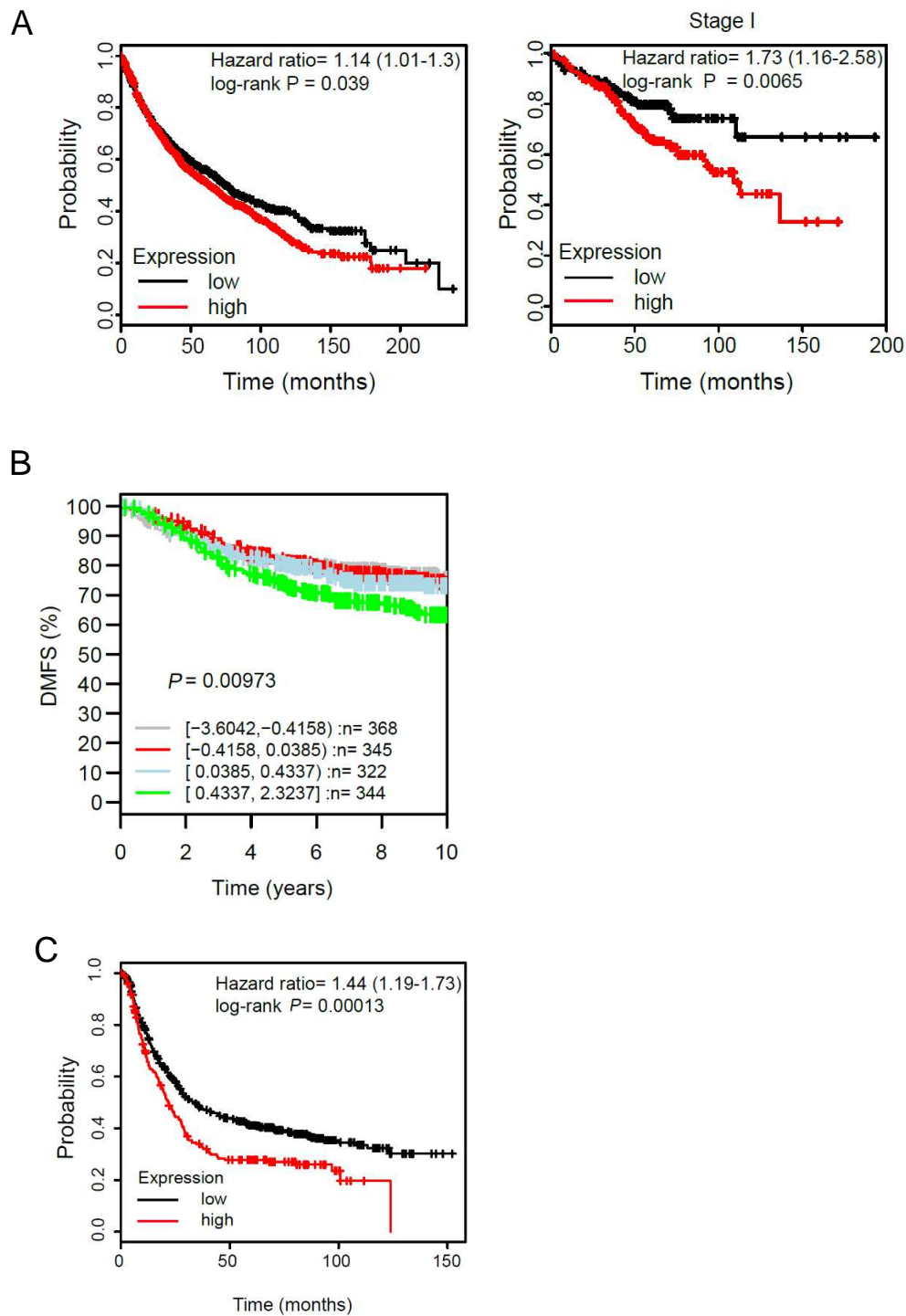


図4. *TUFT1*は複数のがんにおける予後不良因子である

(A) *TUFT1*の発現に基づく、肺腺がん患者のカプランマイヤー生存曲線 (KM-Plotter)。左は全患者、右はステージIの肺腺がん患者の全生存率を示す。

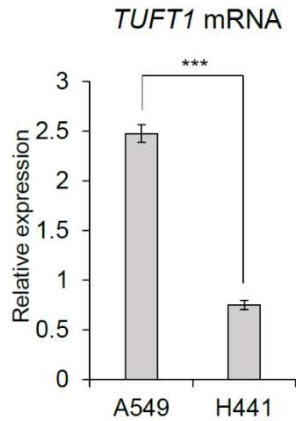
(B) *TUFT1*の発現に基づく、乳がん患者のカプランマイヤー生存曲線 (GOBO)。無遠隔転移生存率を示す。

(C) *TUFT1*の発現に基づく、胃がん患者のカプランマイヤー生存曲線 (KM-Plotter)。全生存率を示す。

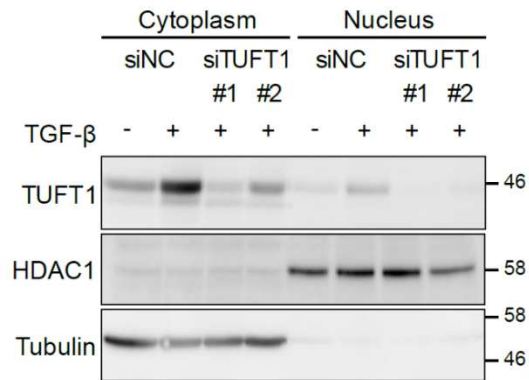
細胞で有意に *TUFT1* の mRNA 発現が高いことを確認した (図 5A)。次いで、内因性のタンパク質について核画分と細胞質画分に分画し immunoblotting を行った。まずコントロール siRNA (siNC) において *TUFT1* の発現が TGF- β 刺激 (48 時間) によってタンパク質レベルでも確かに誘導されることを確認した。また、*TUFT1* は一部核における局在も認められるが、主として細胞質で発現するタンパク質であることも示唆された (図 5B)。A549 細胞では TGF- β 刺激 (48 時間) によって、*TUFT1* の発現が mRNA レベルで約 3 倍に誘導されるが、この誘導は Smad4 のノックダウンによって抑制されたことから、*TUFT1* は Smad 依存的に発現誘導を受けると言える (図 5C)。以上の結果より、*TUFT1* は TGF- β /Smad の標的で、主に細胞質で機能する因子と考えた。

次に *TUFT1* の機能を探索するため、特異的 siRNA を用いたノックダウン実験を試みた。TGF- β 刺激条件下で phalloidin 染色を行ったところ、*TUFT1* をノックダウンした細胞において、紡錘形に伸びた形態の細胞数が減少した。またアクチン構造では、アクチンストレスファイバーが減少し、フィロポディア様の構造の増加を認めた (図 6A)。EMT とは、上皮細胞がその細胞極性を失い、アクチン骨格の再構成を伴って間葉系様細胞に形態的及び機能的に変化する現象であり、原腸陥入や器官形成などの発生プロセス、がんの浸潤・転移などの過程で重要であ

A



B



C

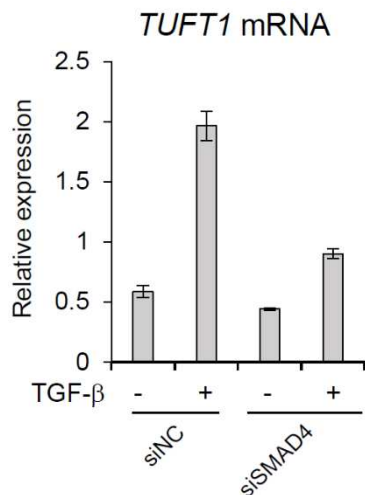


図5. TUFT1はSmad依存的にTGF- β により誘導される

(A) A549細胞およびNCI-H441 (H441)細胞における*TUFT1*の発現量をqRT-PCRにより解析した。補正には*GAPDH*を用いた。エラーバーは標準誤差を示す。*** $P < 0.001$.

(B) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL)有無の条件で48時間培養した。細胞質画分および核画分に分画してタンパク質を回収し、immunoblottingにより解析した。

(C) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL)有無の条件で48時間培養した。mRNAを回収し、定量的RT-PCRにより解析した。補正には*GAPDH*を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。

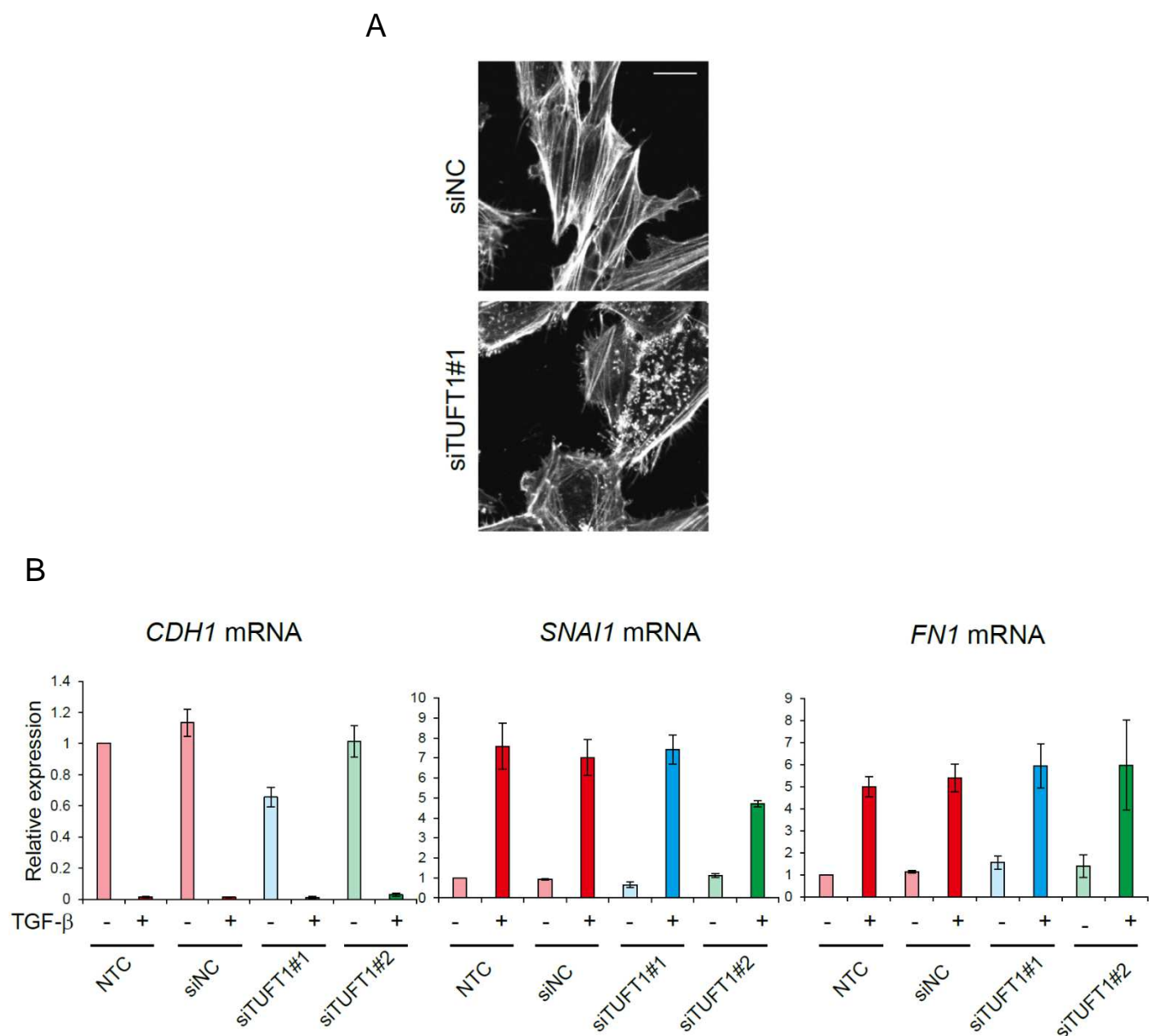


図6. TUFT1はEMT非依存的に細胞形態に影響を及ぼす

(A) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL) で48時間刺激した。その後細胞を固定し、FITC標識ファロイジンを用いてアクチンストレスファイバーを染色した。スケールバーは20 μ mを示す。

(B) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL)有無の条件で48時間刺激した後にmRNAを回収し、各種EMTマーカーの発現を定量的RT-PCRにより確認した。補正には*GAPDH*を用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

ると考えられている。TGF- β はEMTを誘導する代表的なサイトカインであり、A549細胞でもTGF- β 刺激を与えると細胞が紡錘形に変化し、EMTを引き起こすことが既に知られている [31]。EMTは細胞の形態変化、細胞間接着の不安定化、細胞の運動性の亢進に加え、上皮系マーカーの発現低下や間葉系マーカーの発現上昇等によって評価される。そこで、TUFT1ノックダウン条件下における代表的なEMTマーカー遺伝子 (E-cadherinをコードする *CDH1*、Fibronectinをコードする *FNI*、Snailをコードする *SNAIL*)の発現変動をRT-PCRにより検討したが、大きな変動は認められなかった (図 6B)。よって、TUFT1は、EMTとは異なる機構を介して、A549細胞の形態を変化させるものと考えられた。

先のphalloidin染色の結果は、TUFT1が細胞運動性に影響を及ぼす可能性を示唆するものであった。細胞の運動能は、血管新生、免疫応答、腫瘍細胞の転移、浸潤など様々な過程で中心的な役割を果たすため、がんの悪性化の過程を考える上でも重要な指標となる。そこで、細胞運動性の評価をするにあたり、まずchamber migration assayを試みたところ、TUFT1のノックダウンはA549細胞の運動性を有意に低下させ、この表現型は野生型TUFT1を発現させることでレスキューされた (図 7A)。さらに、GFPを恒常的に発現するA549細胞を用いてタイムラプス観察し、single cell trackingを行ったところ、TUFT1のノックダウン

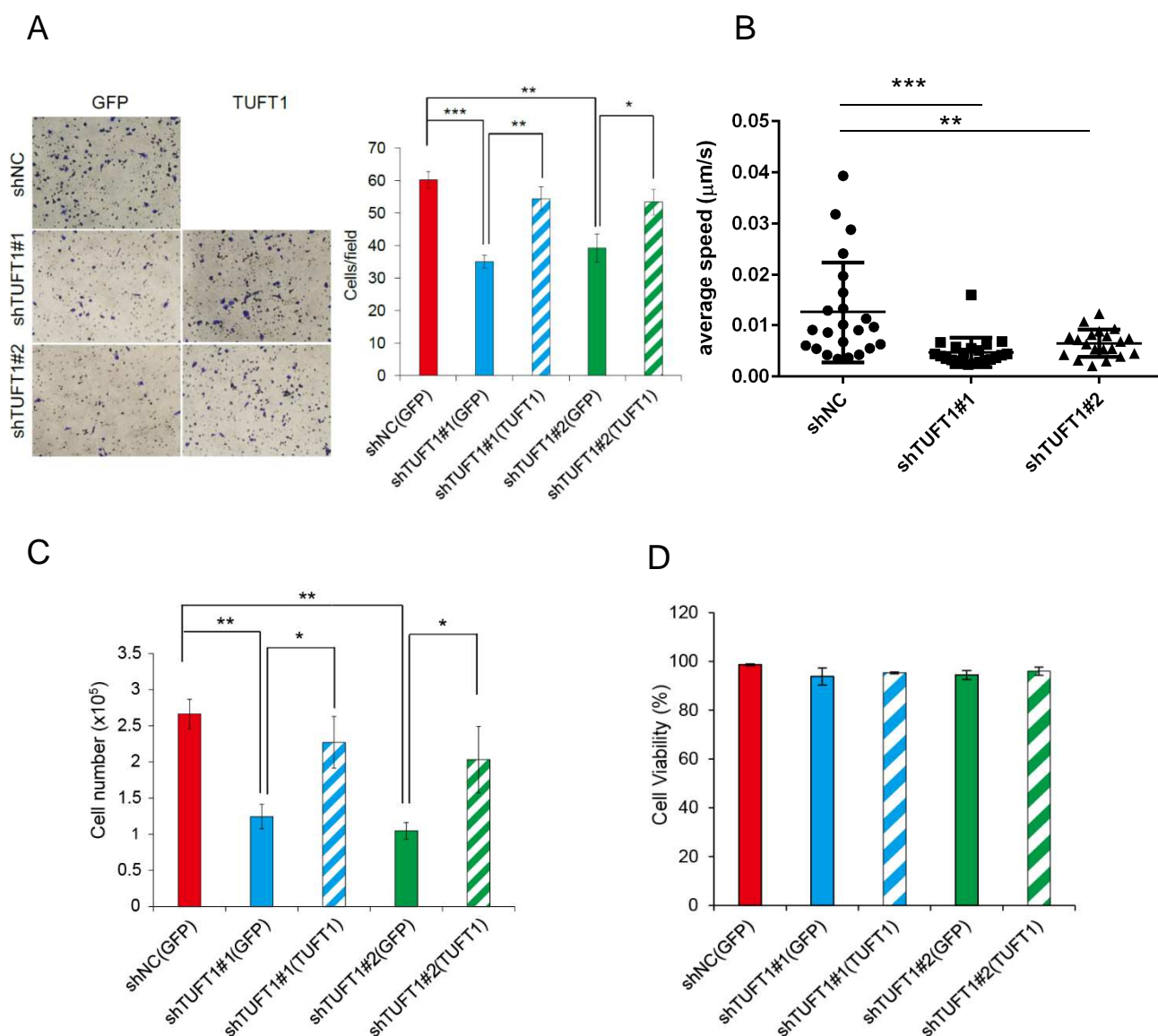


図7. TUFT1のノックダウンは細胞の運動能・増殖能を抑制する

(A) shRNAおよび括弧内に示すタンパク質をレンチウイルスで導入したA549細胞を回収し、コラーゲンコートしたチャンバーに播種した。固定後、膜を通過した細胞を染色して、視野毎の細胞数を数え、その平均を取った。各条件における代表的な視野を左に示す。右のグラフは、独立した実験の平均(n=6)で、エラーバーは標準誤差を示す。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

(B) shRNAおよびGFPをレンチウイルスで導入したA549細胞について、FV10i顕微鏡 (Olympus)を用いて4時間のタイムラプス観察を行った。個々の細胞の平均移動速度はImage Jによって算出した。** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

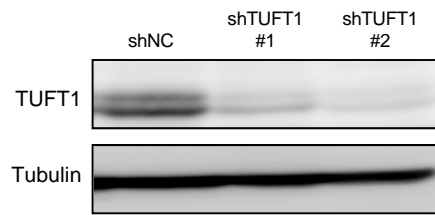
(C) shRNAおよび括弧内に示すタンパク質をレンチウイルスで導入したA549細胞 5×10^4 個を播種し48時間培養後、細胞数をカウントした。グラフは、独立した実験の平均(n=3)で、エラーバーは標準誤差を示す。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

(D) shRNAおよび括弧内に示すタンパク質をレンチウイルスで導入したA549細胞について、細胞生存率をトリパンブルー染色により評価した。細胞生存率は、TC10™ Automated Cell Counter (Bio-Rad)を用いて算出した。結果は、独立した2実験の平均を示し、エラーバーは標準偏差を表す。

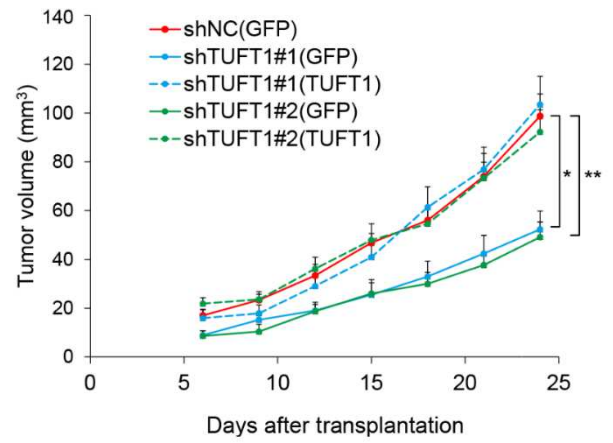
が個々の細胞の平均移動速度を低下させることを示唆した (図 7B)。また運動能のみならず、TUFT1 のノックダウンは A549 細胞において、細胞増殖能を大きく低下させ、これは野生型 TUFT1 の発現により回復することを確認した (図 7C)。これと関連してトリパンブルー染色により細胞生存率を調べたが、TUFT1 ノックダウン、もしくはレスキューによる細胞生存率の差は認められなかった (図 7D)。

さらに、TUFT1 ががんの増殖・転移に及ぼす影響を探索するため、マウスを用いた *in vivo* 実験を試みた。まず、shRNA を用いて TUFT1 を恒常的にノックダウンした A549 細胞を樹立後 (図 8A)、ヌードマウスに皮下移植して腫瘍増殖への影響を探った。その結果、コントロール shRNA (shNC) を導入した細胞と比較して TUFT1 をノックダウンした細胞を移植した個体では皮下腫瘍の増殖を抑制したが、野生型 TUFT1 の発現を戻したレスキュー株で、増殖抑制表現型の回復が認められた (図 8B)。さらに乳がんの骨転移モデルとして、TUFT1 をノックダウンした MDA-231-D 細胞 (ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞より樹立した高転移株) をヌードマウスの左心室から接種し、移植後の骨転移形成・進展の過程をルシフェラーゼの発光量を指標として *in vivo imaging* により評価した [45]。その結果、骨転移形成数は、TUFT1 をノックダウンすることによって低下し (図

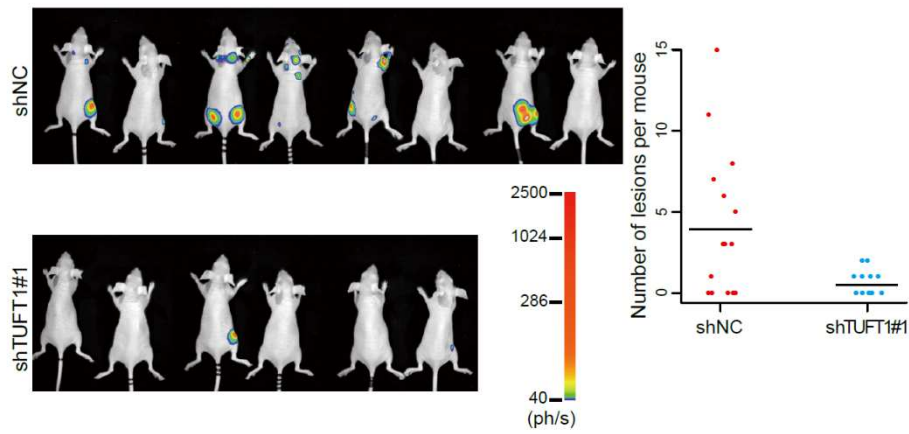
A



B



C



D

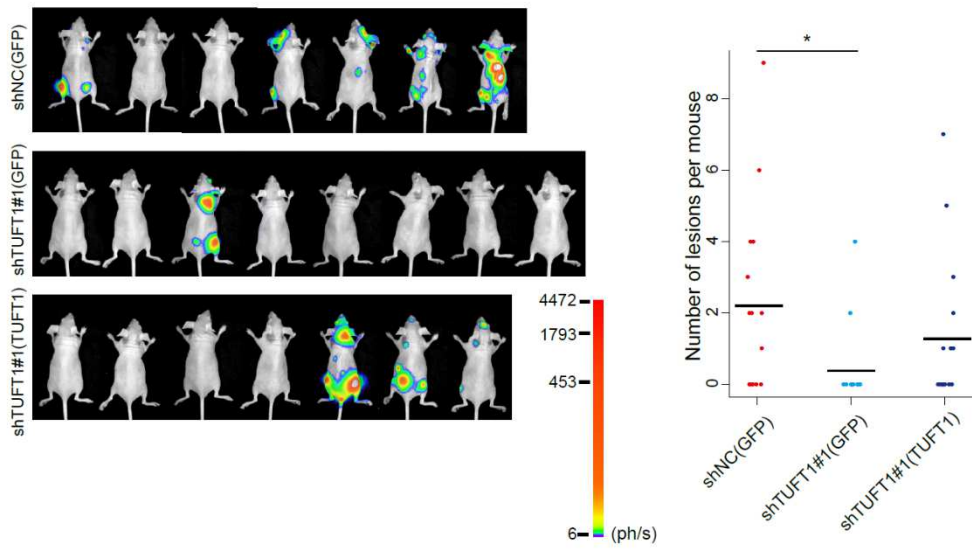


図8. TUFT1のノックダウンはがん細胞の増殖・転移を抑制する

(A) shRNAをレンチウイルスで導入したA549細胞について、タンパク質を回収し、immunoblottingにより解析した。

(B) shRNAおよび括弧内に示すタンパク質をレンチウイルスで導入したA549細胞 1×10^6 個をヌードマウスに皮下移植した後、腫瘍径を測定し腫瘍体積を見積もった。結果は独立実験2回分の合計であり、エラーバーは標準誤差を示す。n= 9 (shTUFT1#2 (GFP))、n=10 (それ以外)。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

(C) shRNAをレンチウイルスで導入したMDA-231-D細胞 1×10^5 個をヌードマウスの左心室に注射し、移植5週後にルシフェラーゼによる*in vivo*イメージングを行った。左は、代表的なイメージング画像を示す。右のドットプロットは、各個体における転移の形成数を示し、独立実験2回分の平均値を水平バーで示す。n= 15 (shNC)、n= 11 (shTUFT1#1)。 (ph/s: photon counts per second)

(D) shRNAおよび括弧内に示すタンパク質をレンチウイルスで導入したMDA-231-D細胞 1×10^6 個をヌードマウス左心室に注射し、移植5週後にルシフェラーゼによる*in vivo*イメージングを行った。左は、代表的なイメージング画像を示す。右のドットプロットは、各個体における転移の形成数を示し、独立実験2回分の平均値を水平バーで示す。n= 15 (shNC)、n= 16 (それ以外)。* $P < 0.05$

8C)、このノックダウンによる影響は野生型 TUFT1 の強制発現によって一部であるが回復が認められた (図 8D)。

次に、包括的に TUFT1 の機能を探索するべく、RNA-sequencing により網羅的な遺伝子発現データを取得し、GSEA (gene set enrichment analysis)を行った。その結果、TUFT1 ノックダウン細胞と比較し、コントロールにおいて最も濃縮した遺伝子セットの一つとして、mTORC1 シグナルが挙げられた (図 9A)。

アクチンなどの細胞骨格の形態形成は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質によって制御されている [49]。なかでも RhoA・Rac1・Cdc42 が特に研究されており、RhoA はストレスファイバーを、Rac1 はラメリポディアを、Cdc42 はフィロポディアをそれぞれ誘導すると言われているが、これら Rho ファミリーG タンパク質は mTORC1 シグナルにより正の翻訳制御を受ける主要な標的としても知られている [50]。そこで Phalloidin 染色の観察結果を基に (図 6A)、TUFT1 が Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に影響を及ぼす可能性について mTOR によるこれらの翻訳制御機能を考慮しつつ検討した。その結果、A549 細胞において TUFT1 ノックダウンにより RhoA、Rac1、Cdc42 のタンパク総量が減少する様子が観察されたが、いずれも転写レベルでの減少はほとんどなく (図 9B-D)、

A

NAME	SIZE	NES	FDR q-val
E2F TARGETS	159	4.93	0.000
G2M CHECKPOINT	149	3.84	0.000
MYC TARGETS V1	198	3.82	0.000
MYC TARGETS V2	51	2.31	0.018
MTORC1 SIGNALING	166	2.17	0.017

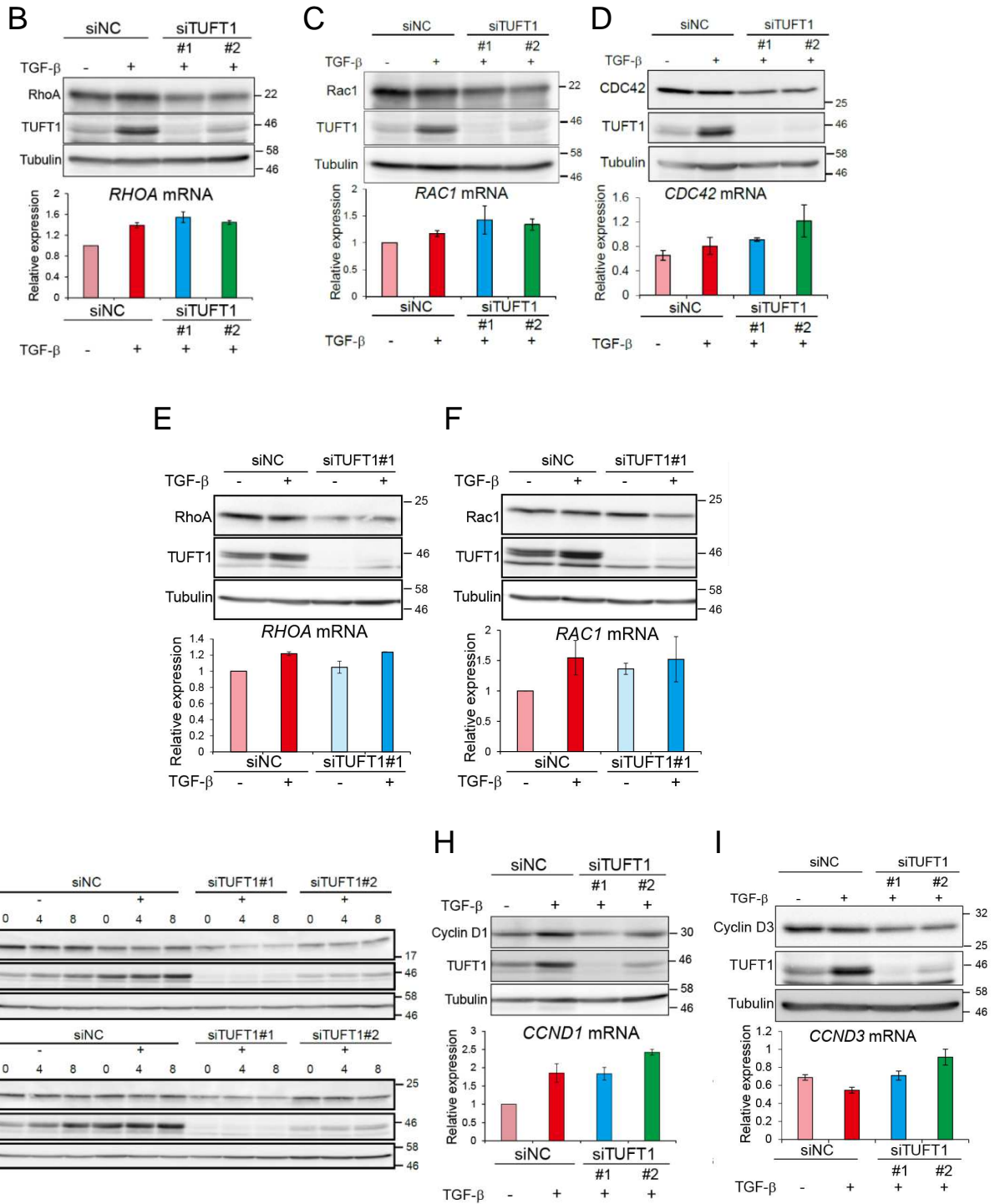


図9. TUFT1はRhoAおよびCyclin D1の発現をタンパク質レベルで制御する

(A) A549細胞にsiRNAをトランスフェクションし、RNAを回収してRNAシーケンスを行い、得られたFPKM値を元にGSEA解析を行った。上位に濃縮してきたHallmark遺伝子群 (MSigDB)を表に示す。(NES; normalized enrichment score, FDR; false discovery rate)

(B-D) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL) 有無の条件で48時間刺激した。タンパク質およびRNAを回収して、それぞれimmunoblotting (上段)および定量的RT-PCR (下段)にて解析した。補正にはGAPDHを用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

(E-F) MDA-231-D細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL) 有無の条件で48時間刺激した。タンパク質およびRNAを回収して、それぞれimmunoblotting (上段)および定量的RT-PCR (下段)にて解析した。補正にはGAPDHを用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

(G) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL) 有無の条件で48時間刺激した。その後MG132 (10 μ M)で処理し、タンパク質を回収して、immunoblottingにより解析した。

(H-I) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、TGF- β (1 ng/mL) 有無の条件で48時間刺激した。タンパク質およびRNAを回収して、それぞれimmunoblotting (上段)および定量的RT-PCR (下段)にて解析した。補正にはGAPDHを用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

TUFT1 はこれらの因子の発現をタンパク質レベルで発現誘導している可能性が示唆された。また、同様な結果は MDA-231-D 細胞においても観察された (図 9E-F)。これについて、プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えても RhoA および Rac1 のタンパク質発現は回復しなかったことから、タンパク質分解による制御ではない可能性が高いと考えられた (図 9G)。同様に mTORC1 シグナルにより翻訳制御を受ける主要な標的として知られ [51]、細胞周期の重要な制御因子である cyclin D1 および cyclin D3 の発現を検討したところ、TUFT1 のノックダウンによってタンパク質レベルで低下が認められた (図 9H-I)。以上の結果を踏まえ、次いで TUFT1 による mTORC1 シグナル増強の可能性について着目することとした。

2. TUFT1 と mTORC1 シグナル

アミノ酸などの栄養状態、エネルギー状態、増殖因子などに応答し、mTORC1 シグナルは様々な生体プロセスを制御する。Ribosomal S6 kinase 1 (S6K1) は mTORC1 の直接的な標的かつ mTORC1 キナーゼ活性の指標として用いられ、その下流では mRNA 翻訳に重要な役割を果たす。まず TUFT1 が mTORC1 に及ぼす影響を評価したところ、インスリン依存的に亢進する S6K1 リン酸化レベルは

TUFT1 のノックダウンによって著しく低下した (図 10A)。このとき、上流の AKT のリン酸化は低下させることなく、寧ろ逆に増加させる傾向が認められたが、これはフィードバック制御によるものと考えられる [52]。TUFT1 ノックダウンによる S6K1 リン酸化レベルの低下は、MDA-231-D 細胞でも同様に認められた (図 10B)。さらに、TUFT1 の生理的な機能を調べる目的で、LacZ カセットにスプライシングを誘導することにより転写レベルでノックアウトとなるようデザインされた *Tuft1*^{tm1a(KOMP)Wisi} アレルを持つ ES 細胞を、NIH ノックアウトマウスプロジェクト (KOMP) より入手し [53]、TUFT1 タンパク発現を欠失したマウスの樹立を試みた。その結果、*Tuft1* ノックアウトマウスは出生後数時間のうちに致死となる表現型を示した。そこで *Tuft1* をノックアウトした MEF を樹立し、mTORC1 シグナルへの影響を探索したところ、ノックアウト細胞において S6K1 リン酸化レベルの低下を認めた (図 10C)。

アミノ酸存在下において Rag が活性化を受けると、mTORC1 はリソソーム膜表面に局在化し、Rheb により活性化される。TUFT1 ノックダウンによる AKT リン酸化への影響は少なかったことより、次に mTORC1 の細胞内局在に対して TUFT1 が及ぼす影響を調べることとし、抗 LAMP2 抗体、および抗 mTOR 抗体を用いて免疫蛍光細胞染色を行った。LAMP2 は、リソソーム膜上に存在するグ

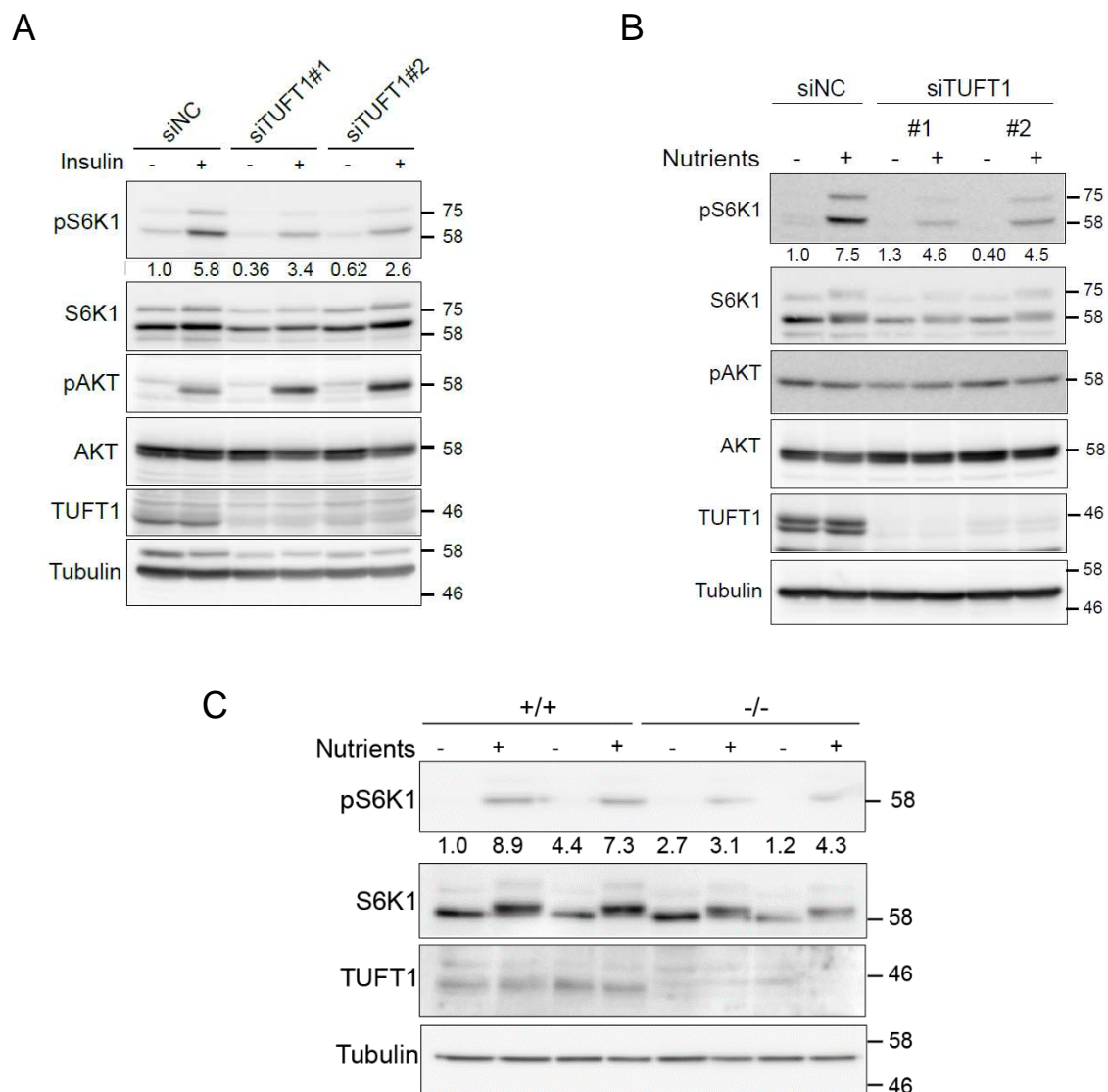


図10. TUFT1はmTORC1シグナルの正の制御因子である

(A) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、無血清培地にて24時間培養した後、インスリン (10 $\mu\text{g/mL}$)で3時間刺激した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

(B) MDA-231-D細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間栄養飢餓条件で培養した後、10分間栄養刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

(C) 野生型 (+/+)もしくはTuft1ノックアウト (-/-)のMEF細胞を、3時間栄養飢餓条件で培養した後、10分間栄養刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

リコシル化タンパク質 lysosomal-associated membrane protein (LAMP)ファミリーの一つであり、リソソームのマーカーとして用いた。染色の結果、TUFT1 をノックダウンした細胞では、リソソームと mTOR の両者が細胞質全体に拡散することが示唆された (図 11A)。さらに電子顕微鏡を用いた解析においても、TUFT1 のノックダウンは、電子密度の高いリソソーム様の構造体を細胞質に拡散させた (図 11B)。

アミノ酸依存的な mTOR のリソソーム膜への局在化は、Rag ファミリー低分子量 G タンパク質によって制御される [9]。Rag の活性状態は複数の制御因子によって支配されており、例えばリソソーム内腔のアミノ酸濃度を感知して RagA/B に対する GEF 活性を示す Ragulator や、細胞内のアミノ酸 (特にロイシンおよびアルギニン)濃度を感知し、RagA/B に対する GAP 活性を示す GATOR1 複合体 (DEPDC5、NPRL2、NPRL3)などが挙げられる [10, 54]。こうしたアミノ酸-Rag 経路に対する TUFT1 の作用を調べるため、次にヒトびまん性胃癌細胞株 MKN45 を用いることとした。MKN45 細胞では GATOR1 複合体構成因子の NPRL3 が欠失していることから、RagA/B が恒常活性型となり、アミノ酸飢餓に不応であることが知られている。そこでまず MKN45 細胞において確かに NPRL3 が欠失していることを確認した上で (図 12A)、mTOR とリソソームの細胞内局

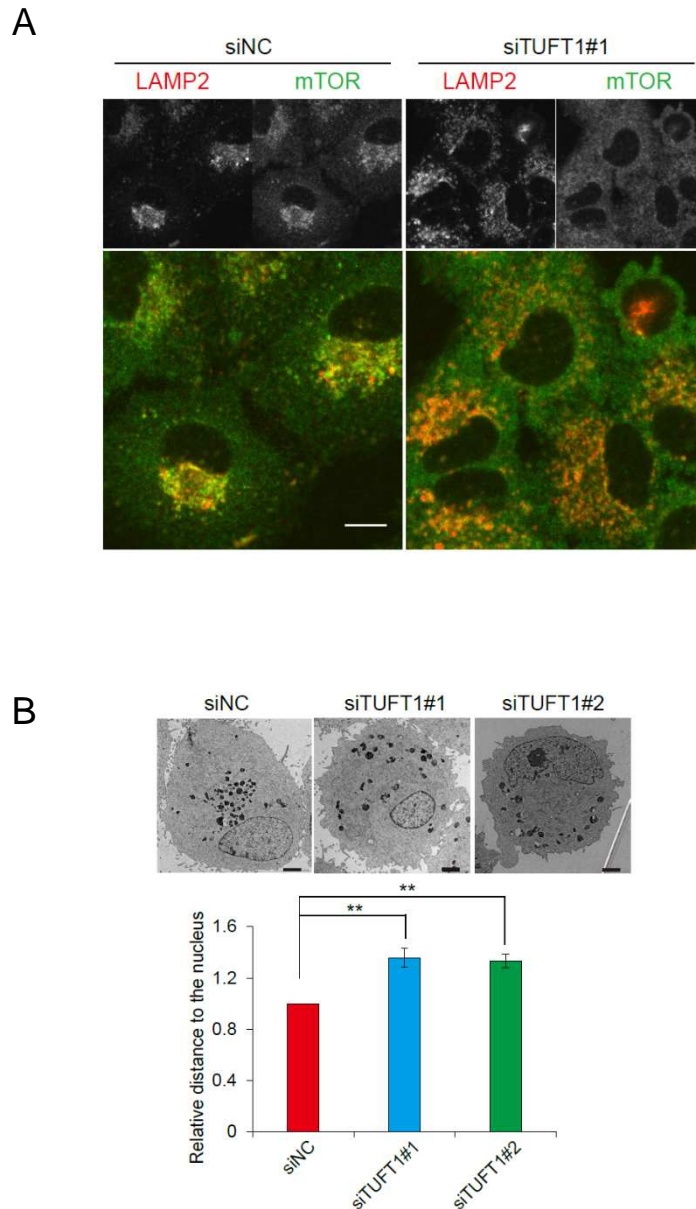
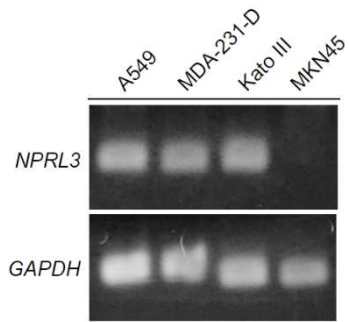
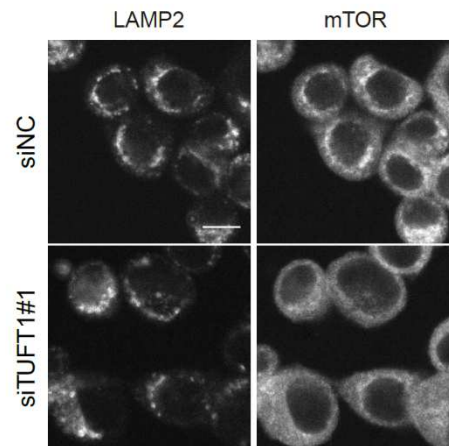


図11. TUFT1のノックダウンはmTORおよびリソソームの細胞内局在に影響する
 (A) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間アミノ酸飢餓条件で培養した後、10分間アミノ酸刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)によって染色した。スケールバーは10 μm を示す。
 (B) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、固定の後、薄切片を作製して電子顕微鏡にて観察した。上段は、各条件における代表的な画像を示す。下段は、独立した3実験について核の重心からリソソーム様構造体の重心までのsiNCに対する相対距離の平均を表す。スケールバーは2 μm を示す。** $P < 0.01$

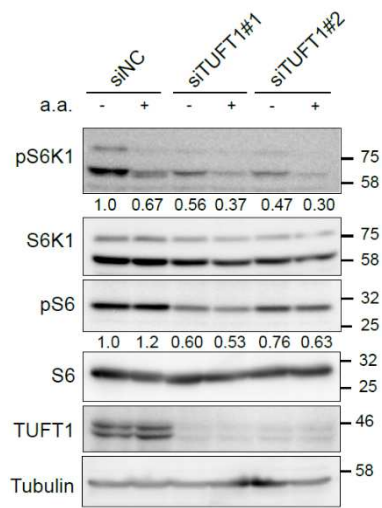
A



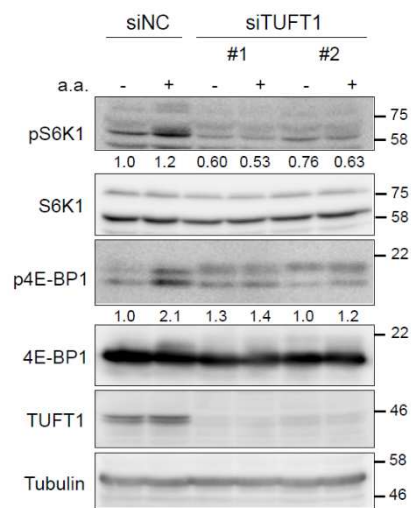
B



C



D



E

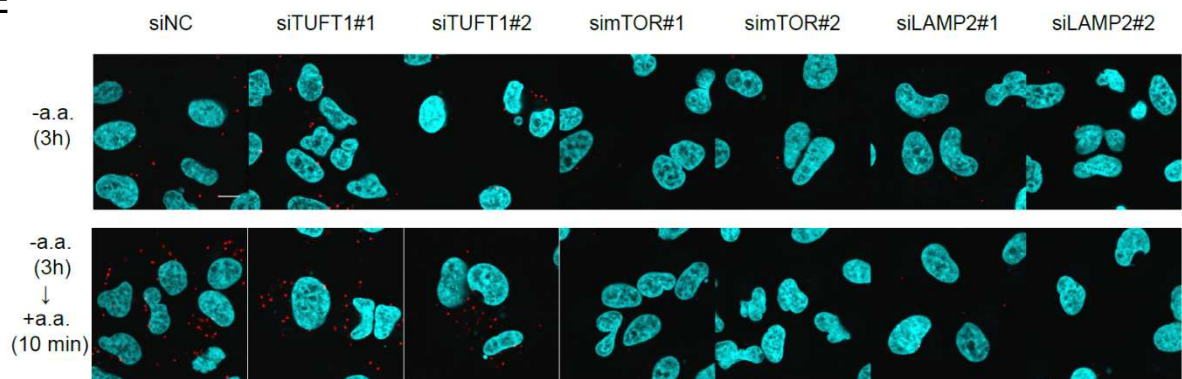


図12. TUFT1はRag経路非依存的にmTORC1シグナルを制御する

(A) A549細胞、MDA-231-D細胞、Kato III細胞、MKN45細胞についてそれぞれRNAを回収し、RT-PCRにより*NPRL3*の発現を評価した。コントロールには*GAPDH*を用いた。

(B) MKN45細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間アミノ酸飢餓条件で培養した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体もしくは抗mTOR抗体によって染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(C) MKN45細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間アミノ酸飢餓条件で培養した後、10分間アミノ酸刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全タンパク質に対する相対リン酸化タンパク質量をImageJで定量した値を示す。

(D) Kato III細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間アミノ酸飢餓条件で培養した後、10分間アミノ酸刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全タンパク質に対する相対リン酸化タンパク質量をImageJで定量した値を示す。

(E) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間アミノ酸飢餓条件で培養した後、10分間アミノ酸刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理の後、抗LAMP2抗体および抗mTOR抗体を用いて*in situ* PLAを行った。核はDAPIにより染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

在を評価したところ、既報の通りアミノ酸飢餓条件においても mTOR と LAMP2 の共局在性が観察された (図 12B)。一貫して、MKN45 細胞ではアミノ酸飢餓条件においても、S6K1 および下流の S6 のリン酸化が確認されたが、TUFT1 のノックダウンは両者のリン酸化レベルを抑制した (図 12C)。一方で、コントロールとして用いた別のヒトびまん性胃癌細胞株 Kato III では確かにアミノ酸による S6K1 リン酸化の亢進が認められ、この細胞においても TUFT1 ノックダウンは S6K1 および 4E-BP1 のリン酸化レベルを抑制した (図 12D)。さらに、アミノ酸に応答した mTOR のリソソーム膜表面への局在化を、*in situ* proximity ligation assay (PLA) によって評価した。*In situ* PLA に用いる一対のオリゴヌクレオチド標識した二次抗体 (プローブ) は、両者が近接 (< 40nm) したときのみ増幅シグナルを示すため、細胞や組織間における内在性タンパク質の相互作用および局在を検出することができる。今回は A549 細胞において、抗 mTOR 抗体および抗 LAMP2 抗体を用いて PLA シグナルを観察したところ、アミノ酸刺激に応答して PLA シグナルが増大し、これは TUFT1 をノックダウンしても減少することはない (図 12E)。即ち、TUFT1 のノックダウンはリソソームの細胞内局在に影響を与えるものの、mTOR がリソソーム膜表面に局在化する過程には干渉しておらず、TUFT1 はアミノ酸-Rag 経路とは独立した経路を介して mTORC1 活性を増強することが示唆された。

3. TUFT1 とメンブレントラフィック

以上の結果を受け、TUFT1 がリソソームの機能に及ぼす可能性についていくつかの手法で調べることにした。Epidermal growth factor (EGF)刺激後、活性化した EGFR は細胞内にエンドサイトーシスされ、リソソームにおいて速やかに分解を受けることが知られるが、TUFT1 のノックダウンはこの分解速度に大きな影響を与えないことを確認した (図 13A)。また、細胞透過性 LysoTracker-Red は酸性オルガネラをターゲットとする色素であり pH センサーとしても機能するが、LysoTracker 染色の結果、TUFT1 ノックダウンによるリソソーム酸性度に対する影響も少ないと考えられた (図 13B)。加えて、リソソーム性アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D は不活性型の前駆体として合成され、リソソームの酸性環境下で活性型となるが、TUFT1 のノックダウンはこのプロセッシング過程にも干渉しなかった (図13C)。以上のことより、TUFT1 はリソソームの細胞内局在に作用するものの、リソソーム自体の活性には影響しないものと考えられた。

次いで、TUFT1 がリソソーム以外の細胞内膜系オルガネラ局在、ひいてはメン

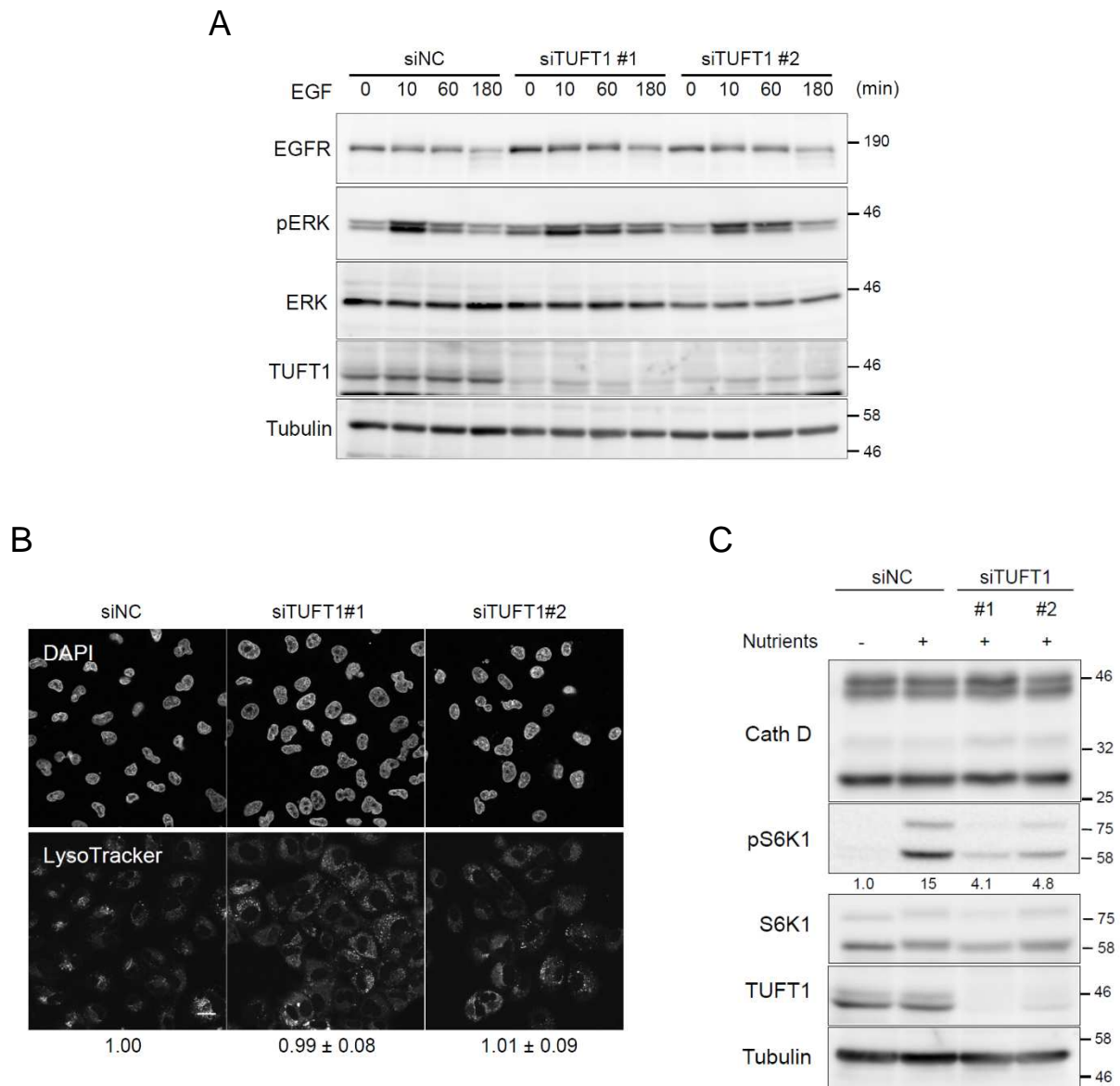


図13. TUFT1ノックダウンによるリソソーム活性への影響は認められない
 (A) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、EGF (100 ng/mL)で記載の時間刺激した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。
 (B) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、LysoTracker Red (DND-99)を加えて1時間培養した。細胞は固定後、核はDAPIにより染色した。スケールバーは20 μ mを示す。各条件における相対シグナル強度はImageJによって定量した。
 (C) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間栄養飢餓条件で培養した後、10分間栄養刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingを行い、カテプシンD (Cath D)のプロセッシングに及ぼす影響を評価した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

ブレントラフィックに対する影響を探索することとした。まず初期エンドソームマーカーである early endosomal antigen 1 (EEA1)の局在を免疫蛍光細胞染色により評価すると、LAMP2 同様、TUFT1 をノックダウンした細胞において EEA1 のシグナルが細胞質内に拡散した局在をとる様子が観察された (図 14A)。さらに、エンドサイトーシス・エキソサイトーシスの過程を調べる目的で、トランスフェリン取り込みアッセイを行った。トランスフェリンは鉄イオンの血中への供給に役割を果たすタンパク質であり、受容体と結合すると速やかに細胞内に取り込まれる。その後、小胞内腔の酸性化に伴ってトランスフェリンは鉄を解放し、空になったトランスフェリンはリサイクリングされて、細胞外へと放出されることが知られている。この仕組みを利用し、Alexa594 で蛍光標識されたトランスフェリンを培地に添加し観察を行ったが、エンドサイトーシス・エキソサイトーシスの反応速度に対して TUFT1 ノックダウンによる影響は認められなかった。一方で、いずれの時点においても細胞内のトランスフェリンを含む小胞分布は細胞質全体に拡散する様子を示した (図 14B-C)。以上の結果を統合し、TUFT1 が小胞の局在や細胞内輸送に関与することで、mTORC1 シグナルを増強しているという仮説を立てた。

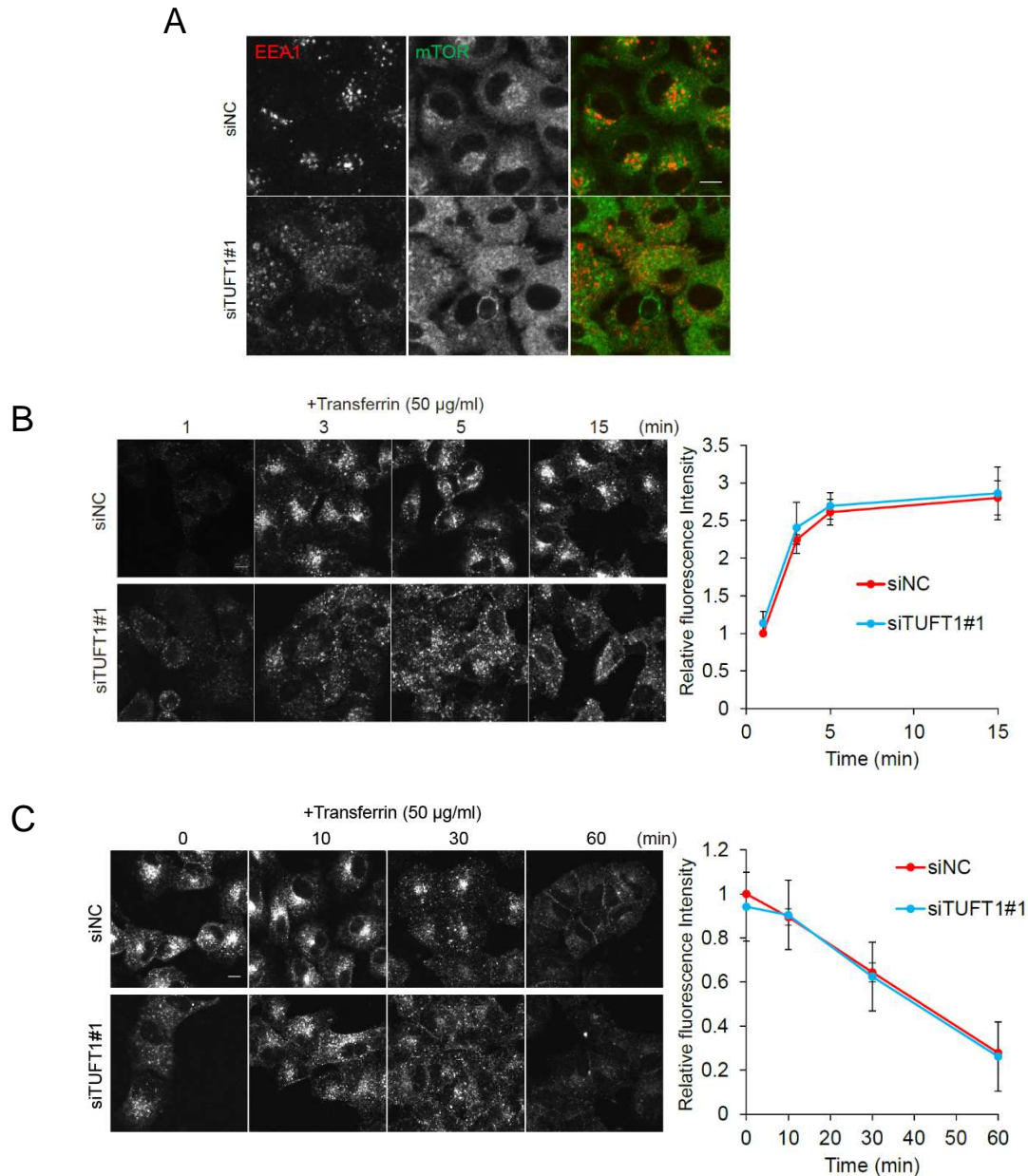


図14. TUFT1はメンブレントラフィックに作用する

(A) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、3時間栄養飢餓条件で培養した後、10分間栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗EEA1抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μm を示す。

(B) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、無血清培地で1時間培養した後、Alexa594標識したトランスフェリン (50 $\mu\text{g/mL}$) で記載の時間刺激した。代表的な視野を左に示す。スケールバーは10 μm を示す。右のグラフは細胞内のトランスフェリンの相対蛍光強度を示す。エラーバーは標準偏差を表す (n=2)。

(C) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、無血清培地で1時間培養した後、Alexa594標識したトランスフェリン (50 $\mu\text{g/mL}$) で15分刺激した。その後培地を交換によりトランスフェリンを除き、記載の時間後に固定した。スケールバーは10 μm を示す。右のグラフは細胞内のトランスフェリンの相対蛍光強度を示す。エラーバーは標準偏差を表す (n=2)。

4. メンブレントラフィックと mTORC1 シグナル

前述の通り、TUFT1 は Rho ファミリーG タンパク質のタンパク質発現制御等を介して、アクチン骨格に影響を与えているものと考えられる。そこでまずアクチン制御による、mTORC1 活性への寄与を調べることを目的とし、アクチン重合阻害剤 cytochalasin D を使用した。Cytochalasin D は、明らかにアクチン骨格形成を阻害する濃度で用いたが (図 15A)、既報の通り [55]、mTORC1 のリソソーム移行 (図 15B)および下流のリン酸化 (図 15C)の何れにおいても、cytochalasin D による mTORC1 シグナルへの影響は僅かであった。このことより、TUFT1 はアクチン経路非依存的に mTORC1 シグナルを制御しているものと考えられた。

細胞内メンブレントラフィックは、微小管輸送に依存している。そこで、次に微小管一端方向への逆行性輸送を司るモータータンパク質ダイニンの阻害剤として、ciliobrevin D および EHNA を用いた実験を試みた。まずこれら阻害剤が、ダイニンによる局在制御を受ける初期エンドソームの局在を細胞質に拡散させることを確認した (図 16A) [56]。さらに、リソソームについても、TUFT1 をノックダウンした細胞と類似した細胞内分布を観察し (図 16B)、このとき、既報の通り、AKT 非依存的な S6K1 リン酸化レベルの低下も認めた (図 16C) [57]。また、抗 mTOR 抗体と抗 LAMP2 抗体を用いた *in situ* PLA assay を行ったら、

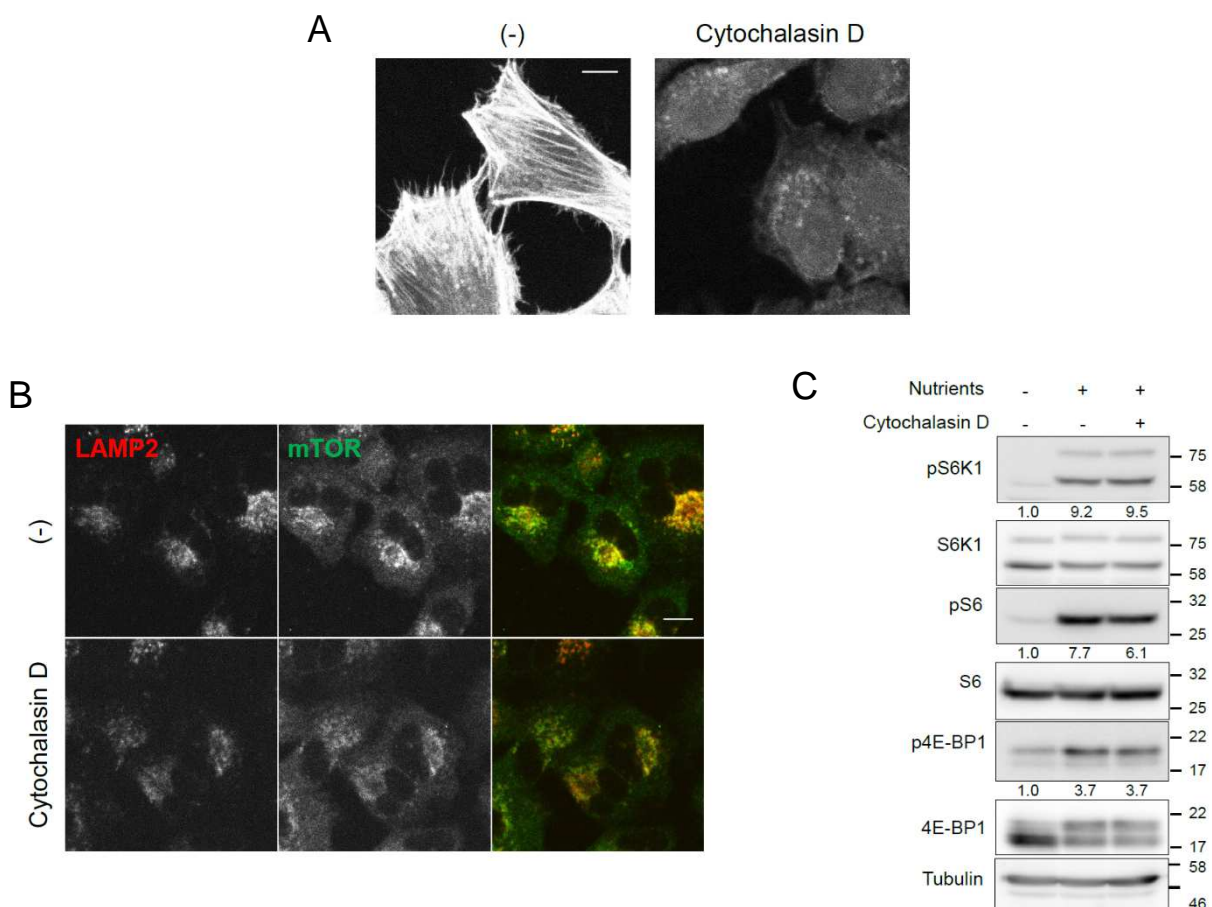


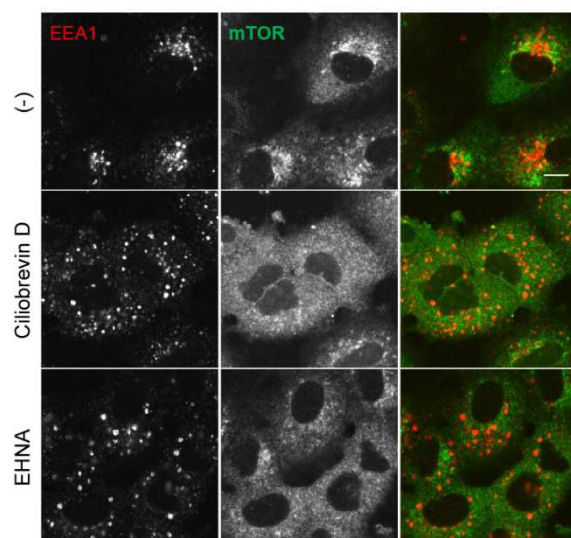
図15. アクチン重合阻害剤によるmTORC1活性への影響は僅かである

(A) A549細胞を栄養飢餓条件にて2時間培養した後、cytochalasin D (0.1 μ M) でさらに一時間培養し、10分間栄養刺激を行った。細胞は固定後、FITC標識ファロイジンを用いてアクチンストレスファイバーを染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

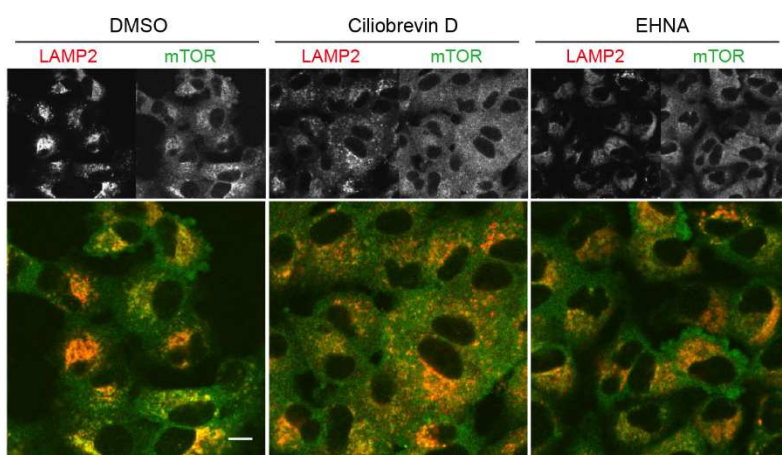
(B) A549細胞を (A)と同様に処理した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(C) A549細胞を (A)と同様に処理した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。

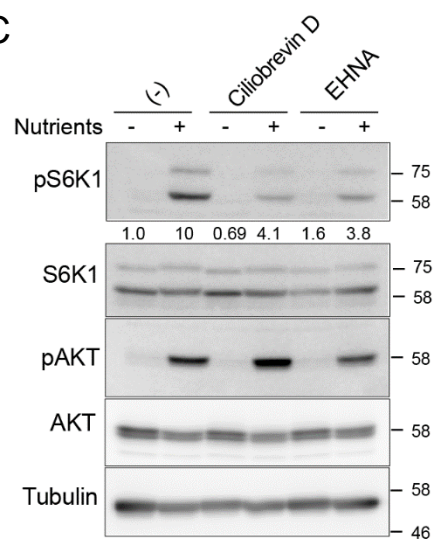
A



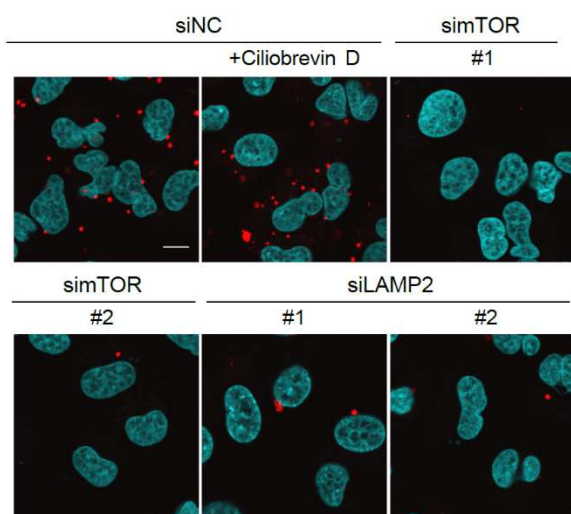
B



C



D



E

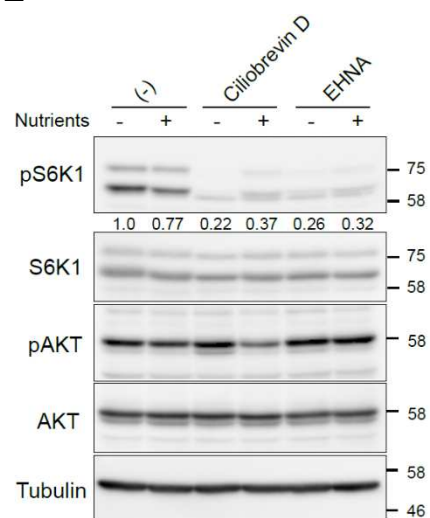


図16. ダイニン阻害剤はmTORC1シグナルを抑制する

(A) A549細胞をciliobrevin D (50 μ M)もしくはEHNA (500 μ M)で1時間処理した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(B) A549細胞を(A)と同様に処理した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗EEA1抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(C) A549細胞を(A)と同様に処理した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

(D) A549細胞に図の通りsiRNAをトランスフェクションし、細胞を2時間栄養飢餓条件にて培養した後、ciliobrevin D (50 μ M)もしくはEHNA (500 μ M)を加えてさらに1時間培養し、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理の後、抗LAMP2抗体および抗mTOR抗体を用いて*in situ* PLAを行った。核はDAPIにより染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(E) MKN45細胞を2時間栄養飢餓条件にて培養した後、ciliobrevin D (50 μ M)もしくはEHNA (500 μ M)を加えてさらに1時間培養し、10分間の栄養刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

ダイニン阻害剤処理条件下でも PLA のシグナルは消失せず、両者の共局在性は保たれたままであった (図 16D)。さらに、恒常活性型の RagA/B を保持する MKN45 細胞においてもダイニン阻害剤は mTORC1 シグナルを抑制した (図 16E)。微小管モータータンパク質である Kinesin heavy chain protein (Kif5b)は Kinesin-1 スーパーファミリーに属し、各々のアダプタータンパク質や足場タンパク質を介してリソソームやミトコンドリアをはじめとしたオルガネラや輸送小胞と結合し、その局在を制御する主要因子であることが知られる [58]。そこでこの Kif5b を A549 細胞に過剰発現させたところ、リソソームの局在異常を引き起こし、他のオルガネラや輸送小胞にも影響を及ぼしていると考えられる状態において (図 17A)、S6K1 および S6 のリン酸化の低下をもたらした (図 17B)。以上の結果より、細胞内オルガネラ局在およびメンブレントラフィックに関わる微小管ネットワークは、Rag 非依存的に mTORC1 活性に影響を及ぼすことが期待された。

続いて、mTORC1 の活性を規定する制御対象の同定を目指し、mTORC1 活性化の土俵であるリソソームに着目した。リソソームの逆行性輸送を司る Rab7 の恒常活性型変異体 (Q67L)は、エフェクタータンパク質 Rab interacting lysosomal protein (RILP)を介して、リソソームの核周囲への集積を引き起こすことが知ら

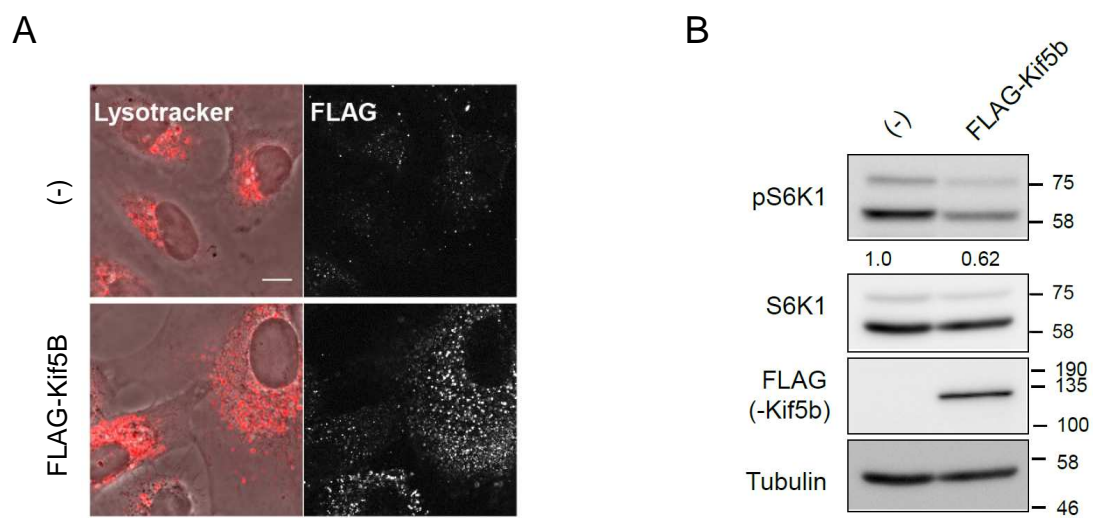


図17. リソソーム局在はmTORC1活性の規定因子となり得る

(A) A549細胞に図の通りプラスミドをトランスフェクションし、LysoTracker Red (DND-99, 赤)を添加して2時間培養した。細胞は固定後、核はDAPIにより染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

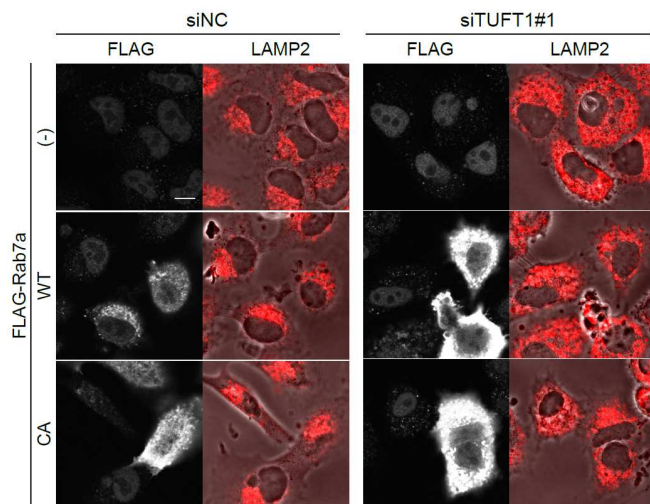
(B) A549細胞に図の通りプラスミドをトランスフェクションし、培養した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

れている [59]。そこで本変異体を用いた検討を行ったところ、Rab7 の恒常活性型変異体の過剰発現は TUFT1 をノックダウンした細胞においても、リソソームを一部集積させ (図 18A)、mTORC1 の活性低下を一部レスキューしたが、その効果はわずかであった (図 18B)。以上の結果より、TUFT1 による mTORC1 活性増強作用の一部は、リソソーム局在制御を介する可能性が示唆される一方、リソソーム局在に依存しないメカニズムの存在も示されることとなった。

5. TUFT1 結合因子 RABGAP1 と mTORC1 シグナル

TUFT1 の結合タンパク質を同定するべく、アフィニティー精製と質量分析 (AP-MS) を組み合わせた手法で解析された、ヒトインタラクトームデータベースを検索し、候補として RABGAP1 (TBC1D1, GAPCenA) に着目した [60, 61]。RABGAP1 は TBC (TRE2-BUB2-CDC16) ドメインを持つファミリーに属し、Rab 低分子量 G タンパク質が備える GTPase 活性を亢進する GAP として機能して、メンブレントラフィックを制御すると考えられているが、機能の詳細については未解明な部分も多いタンパク質である。まず、RABGAP1 と TUFT1 の結合を、HEK293T 細胞における過剰発現の系において、共免疫沈降法により確認した (図 19A)。また、A549 細胞においては両者の内在性結合も同定した (図 19B-C)。さらには、

A



B

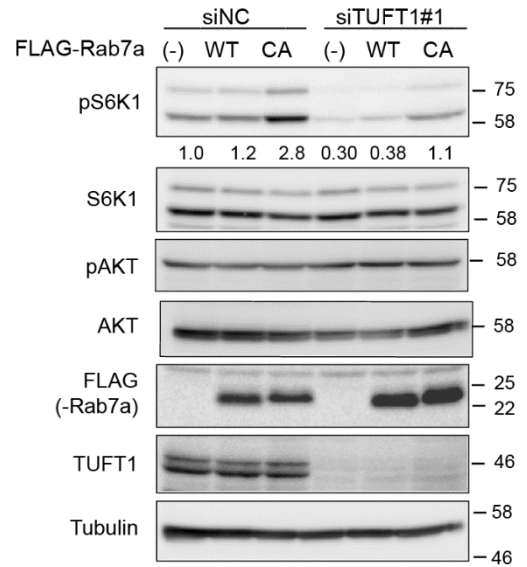


図18. リソソーム局在はmTORC1活性の規定因子となり得る

(A) A549細胞に図の通りsiRNAおよびプラスミドをトランスフェクションし、細胞を3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗FLAG抗体 (白)もしくは抗LAMP2抗体 (赤)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。(WT: wild-type, CA: constitutively active form)

(B) A549細胞を、(A)と同様に処理した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

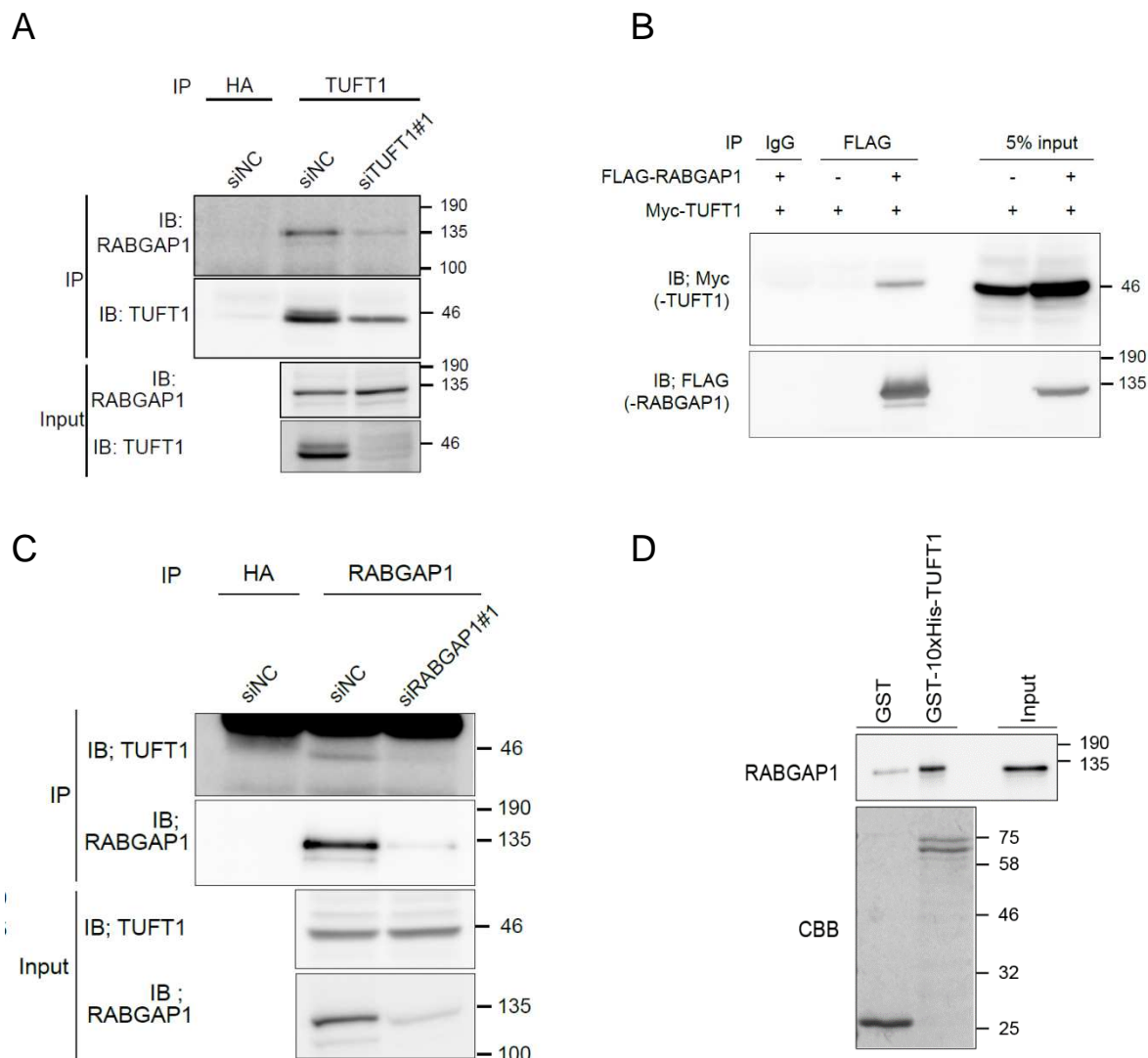


図19. TUFT1はRABGAP1と直接相互作用する

(A) A549細胞に図の通りsiRNAおよびプラスミドをトランスフェクションした。細胞からタンパク質を回収し、抗HA抗体 (コントロール)もしくは抗TUFT1抗体を用いて免疫沈降を行った後、immunoblottingによって解析した。

(B) HEK293T細胞に図の通りプラスミドをトランスフェクションした。細胞からタンパク質を回収し、コントロールIgGもしくは抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行った後、immunoblottingによって解析した。

(C) A549細胞に図の通りsiRNAおよびプラスミドをトランスフェクションした。細胞からタンパク質を回収し、抗HA抗体 (コントロール)もしくは抗RABGAP1抗体を用いて免疫沈降を行った後、immunoblottingによって解析した。

(D) GST (コントロール)もしくはGST-10xHis-TUFT1および、リコンビナントRABGAP1を用いてGST プルダウンアッセイを行った。タンパク質間相互作用はimmunoblottingによって解析し、各GSTタンパク質の発現量はCBB (Coomassie Brilliant Blue)染色により確認した。

リコンビナント RABGAP1 と GST 融合 TUFT1 を用いたプルダウンアッセイ法により、TUFT1 が RABGAP1 と直接相互作用することも見出した (図 19D)。

次いで、RABGAP1 の機能を探索するため siRNA を用いた実験を行うと、RABGAP1 のノックダウンは、mTORC1 シグナルの活性低下をもたらした (図 20A-B)、リソソームおよび初期エンドソームの集積を抑制した (図 20C-D)。さらに抗 mTOR および抗 LAMP2 抗体を用いた *in situ* PLA の結果、RABGAP1 が mTOR のリソソーム膜表面への移行には影響しないことも示唆され (図 20E)、何れの結果も TUFT1 ノックダウン細胞と類似した表現型を示すことが明らかとなった。

Rab-GAP は一般的に、標的とする Rab の GTP 結合状態を変化させることで機能すると考えられている。そこで、RABGAP1 による mTORC1 シグナル制御に関する GAP 活性依存性を探索するため、コントロール (GFP)、野生型 RABGAP1 (RABGAP1-WT)もしくは GAP 活性欠失変異体 RABGAP1 (R612A) (RABGAP1-mut)をそれぞれ恒常的に発現させた細胞を樹立し [62]、レスキュー実験を試みた。その結果、RABGAP1 をノックダウンした影響は、S6K1 リン酸化を指標としても (図 21A)、リソソーム局在を指標とした場合にも (図 21B)、野生型 RABGAP1 でのみレスキューされる方向に働き、RABGAP1 が持つ GAP 活性が

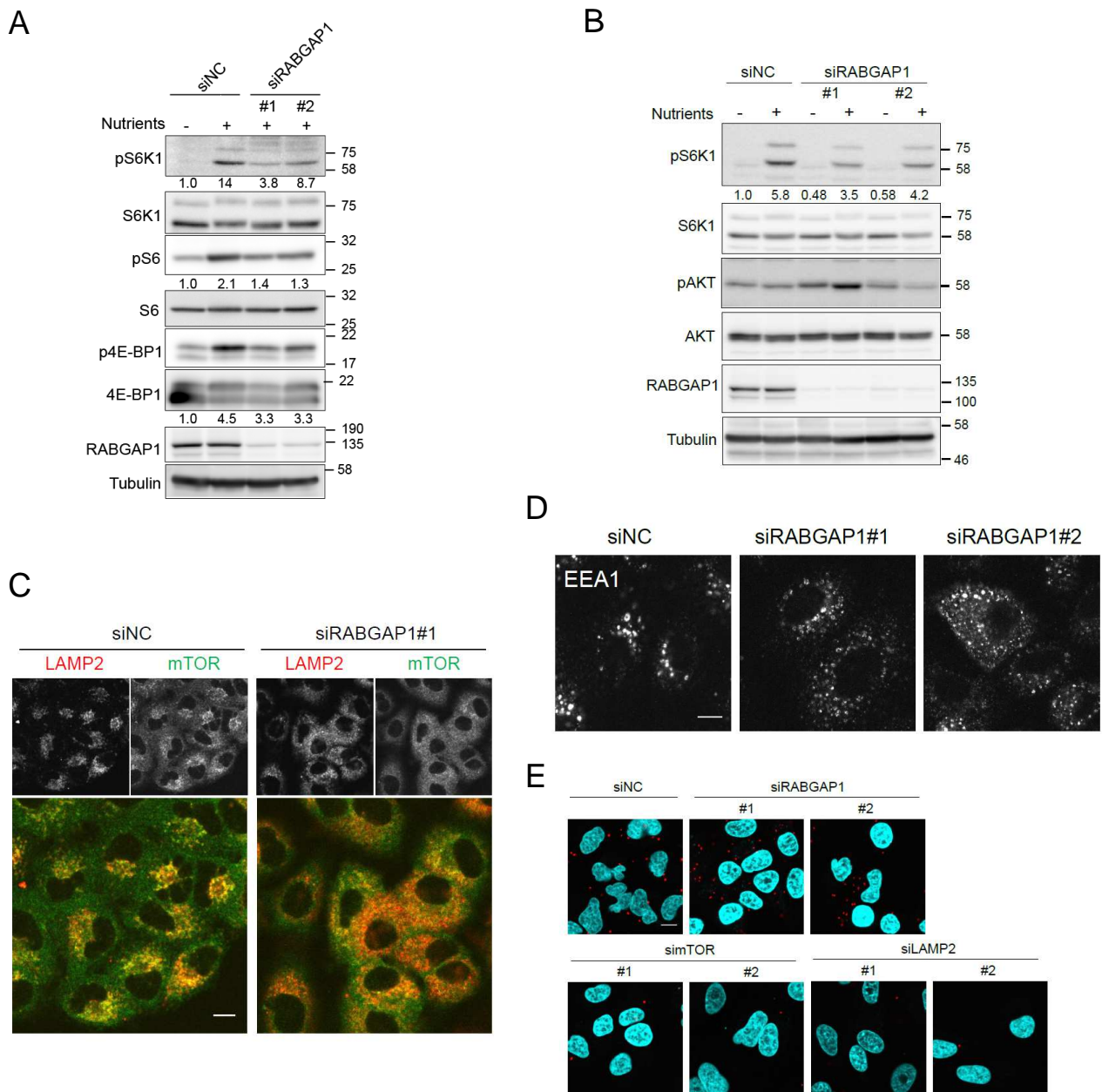


図20. RABGAP1はメンブレントラフィックとmTORC1シグナルを制御する

(A) A549細胞に図の通り siRNA をトランスフェクションし、細胞を3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。回収したタンパク質は immunoblotting にて解析した。数値は全タンパク質に対する相対リン酸化タンパク質量を ImageJ で定量した値を示す。

(B) MDA-231-D 細胞を、(A) と同様に処理した。回収したタンパク質は immunoblotting にて解析した。数値は全 S6K1 に対する相対 pS6K1 量を ImageJ で定量した値を示す。

(C) A549 細胞を、(A) と同様に処理した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗 LAMP2 抗体 (赤) もしくは抗 mTOR 抗体 (緑) を用いて染色した。スケールバーは 10 μm を示す。

(D) A549 細胞を、(A) と同様に処理した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗 EEA1 抗体を用いて染色した。スケールバーは 10 μm を示す。

(E) A549 細胞を、(A) と同様に処理した。細胞は固定・膜透過処理の後、抗 LAMP2 抗体および抗 mTOR 抗体を用いて *in situ* PLA を行った。核は DAPI により染色した。スケールバーは 10 μm を示す。

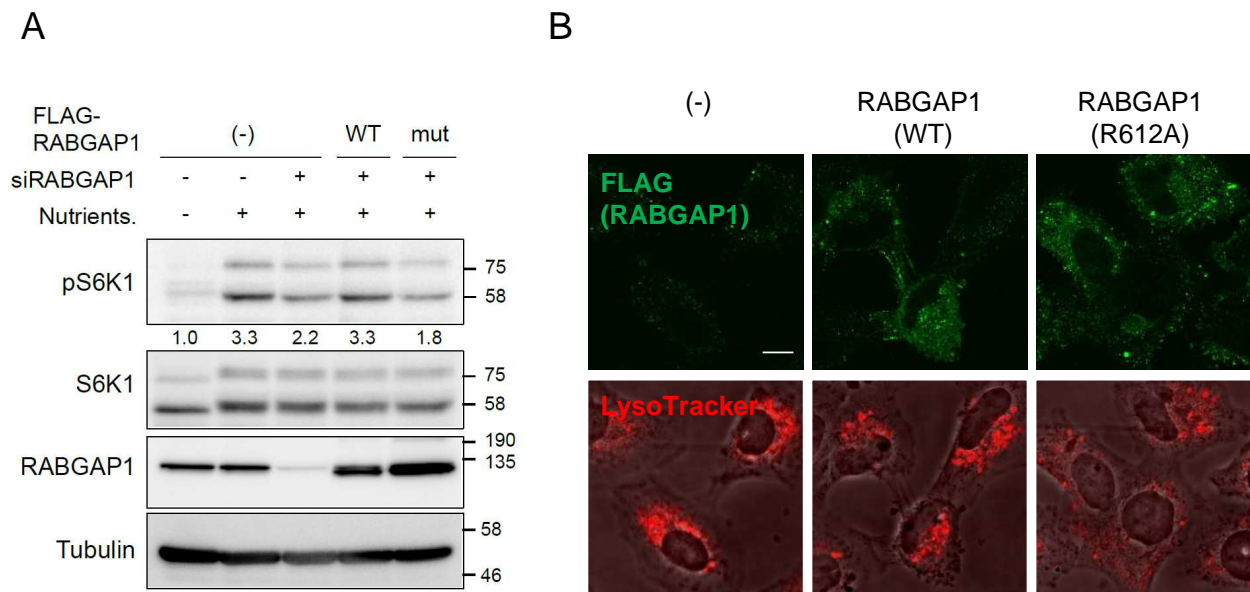


図21. RABGAP1はメンブレントラフィックとmTORC1シグナルを制御する
 (A) 図に示すタンパク質をレンチウイルスで導入したA549細胞にsiRNAをトランスフェクションし、細胞を3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。
 (B) A549細胞に図の通り図の通りプラスミドをトランスフェクションした。細胞を1時間栄養飢餓条件にて培養し、LysoTracker Red (DND-99、赤)を添加してさらに2時間培養した後、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗FLAG抗体(緑)を用いて染色した。

mTORC1 シグナルに重要であることが示された。

RABGAP1 が GAP 活性を示す対象としては Rab4、Rab11、Rab14、Rab6、Rab36 などが報告されている [63-65]。そこで当該 Rab についてそれぞれ恒常活性型変異体、およびドミナントネガティブ変異体を作製し、mTORC1 活性への影響を指標に検討したところ、mTORC1 シグナルに関与するものの一つとして Rab36 を同定した。Rab36 は、野生型および恒常活性型変異体 (Q182L)のみ RABGAP1 と結合能を持ち (図 22A)、Rab36 の恒常活性型変異体の過剰発現は、HEK293T 細胞における S6K1 のリン酸化レベルを僅かに低下させた (図 22B)。また Rab36 変異体を過剰発現しても、A549 細胞においてリソソームの局在には影響を与えないものの、初期エンドソームの細胞内局在を変化させることも明らかとなった (図 22C-D)。さらに、TUFT1-RABGAP1 結合の意義を探索するため、RABGAP1 の Rab36 に対する GAP 活性を *in vitro* GAP activity assay にて調べた。その結果、RABGAP1 は既報の通り、Rab36 に対する GAP 活性を示し、またこの GAP 活性は TUFT1 の存在により亢進することも併せて示された (図 22E)。以上のことより、TUFT1 は RABGAP1 と協調して機能し、Rab36 をはじめとする Rab ファミリー低分子量 G タンパク質の活性を制御することで、mTORC1 シグナルを正に制御する因子であることが示唆された (図 23)。

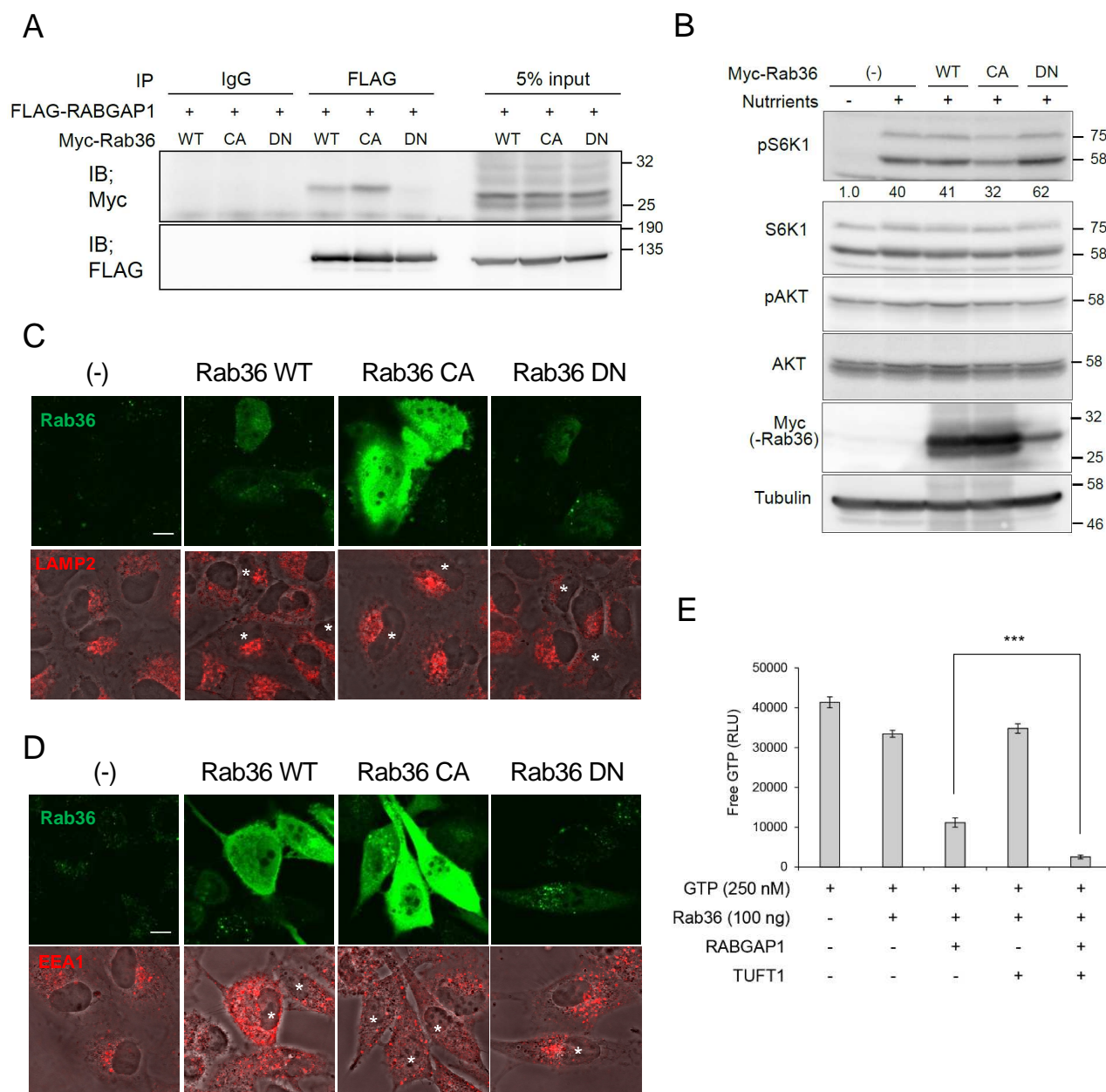


図22. Rab36はRABGAP1の標的候補因子である

(A) HEK293T細胞に図の通りプラスミドをトランスフェクションした。細胞からタンパク質を回収し、コントロールIgGもしくは抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行った後、immunoblottingによって解析した。(WT: wild-type, CA: constitutively active form, DN: dominant negative form)

(B) HEK293T細胞に図の通りプラスミドをトランスフェクションし、細胞を3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

(C-D) A549細胞に図の通りプラスミドをトランスフェクションし、細胞を3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(E) リコンビナントRab36とFLAG-RABGAP1、FLAG-TUFT1を反応させ、in vitro GAP activity assayを行った。グラフは独立した3実験の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示す。(RLU: Relative Light Unit) *** $P < 0.001$

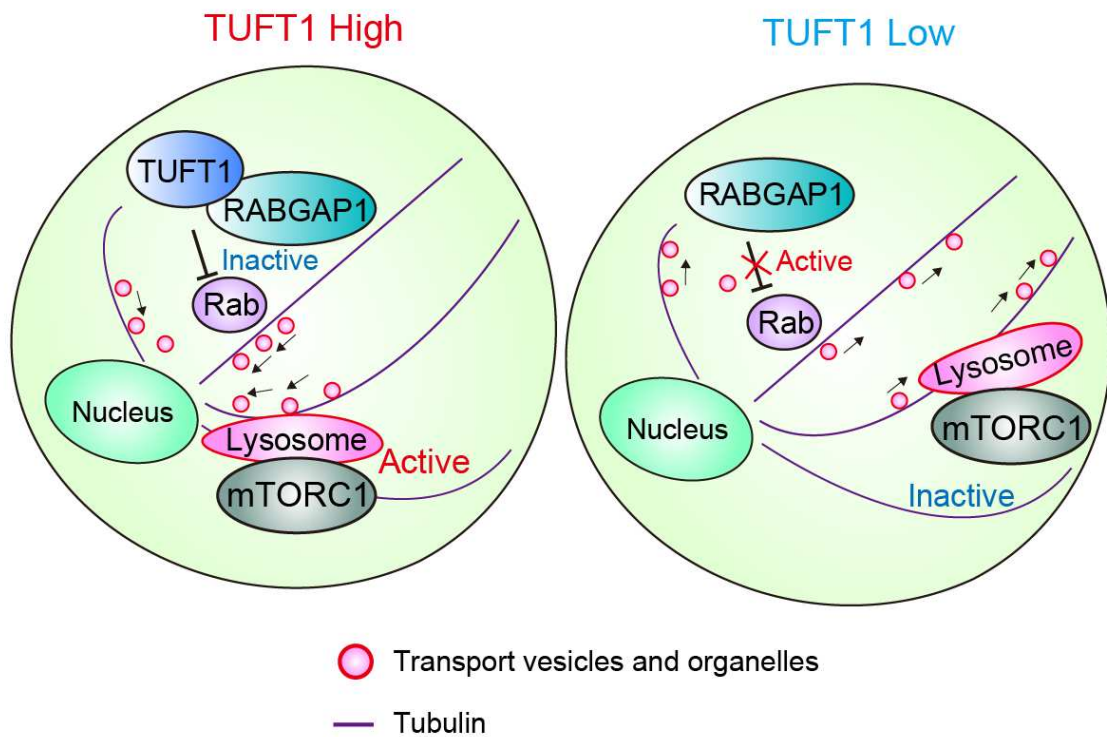


図23. TUFT1-RABGAP1によるmTORC1シグナル制御のモデル図

TUFT1はRABGAP1のエフェクタータンパク質としてそのGAP活性を制御することで、Rab36を始めとした標的Rabの活性を制御しているものと思われる。TUFT1-RABGAP1によるメンブレントラフィックの制御、オルガネラ局在の変化がmTORC1シグナル活性の基盤となっていると考えられる。

6. 治験薬 **perifosine** の新規作用機序

最後に、**TUFT1** によるメンブレントラフィック、細胞内コンパートメントの局在制御機構が、がんの治療標的となり得る可能性を探索するべく、**TUFT1** の mRNA 発現量と薬剤感受性の相関解析を行った。用いた薬剤感受性のデータは 39 種類のヒトがん細胞を用いた細胞パネル (JFCR39)より入手し、**TUFT1** の発現量には Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)のデータを使用した [66-68]。今回は従来の抗がん剤と **PI3K-AKT-mTOR** シグナル阻害剤を含む 67 薬剤を感受性解析に用いたが、その中で **TUFT1** の発現の高さと治験薬 **perifosine** の薬剤感受性が有意に負の相関を示した (表 2、図 24)。**Perifosine** は合成アルキルリン脂質の **PI3K-AKT** 阻害剤の一種であり、細胞膜の脂質ラフトに直接作用して **AKT** 経路を阻害すると考えられている。一方で、その作用は多岐に渡り、詳細な作用機序については明らかでない。**perifosine** は、大腸がんおよび多発性骨髄腫においては第三相試験にも進んだ治験薬としても期待されており、作用機序の解明は急務である。

表 2. 薬剤感受性試験結果

Compounds	average $ \log_{10}$ GI50	Pearson r	P value
Perifosine	5.075	-0.64612	0.000272
Akt Inhibitor III	4.720	-0.49821	0.008175
Methotrexate	6.249	-0.4754	0.012206
Akt inhibitor II	5.064	-0.38932	0.044726
6-Mercaptopurine	5.132	-0.338	0.084642
(-)-Deguelin	5.191	-0.31364	0.11114
Vinblastine	8.622	-0.28731	0.146198
Akt Inhibitor X	5.427	-0.28025	0.156815
Topotecan	6.964	-0.24954	0.209378
Akt Inhibitor VIII	5.581	-0.24707	0.214077
Bleomycin	4.844	-0.23393	0.240229
Navelbine	8.441	-0.22955	0.249394
Carboplatin	4.060	-0.21789	0.274911
Cytarabine	4.978	-0.21195	0.288547
NVP-BEZ235	8.051	-0.20213	0.311986
Aclacinon	6.956	0.201754	0.312897
AZD6244	4.825	-0.19743	0.323601
SN-38	7.467	-0.19448	0.33103
Actinomycin-D	8.810	-0.19089	0.34021
PI3K-alpha inhibitor IV	6.100	-0.19023	0.341908
4-Hydroperoxycyclophosphamide	4.993	-0.18845	0.346534
6-Thioguanine	5.857	-0.18591	0.353172
Akt Inhibitor XI	4.978	-0.18155	0.364783
Vincristine	8.111	-0.17948	0.370366
E7010	6.402	-0.16007	0.425128
Etoposide	5.207	-0.15466	0.44115
5-Fluorouracil	4.583	-0.15253	0.44754
Gemcitabine	6.542	-0.14699	0.464386
Akt Inhibitor V	4.616	0.135241	0.501213
Akt inhibitor	4.877	-0.12225	0.543544
E7070	4.870	-0.12023	0.550283
Cl-F-ara-A	5.626	-0.10057	0.617703

PI103	6.801	-0.09989	0.620095
FMDC	6.029	-0.09812	0.626342
ZSTK474	6.321	-0.0977	0.6278
Temsirolimus	6.665	-0.09607	0.633605
Akt Inhibitor IX	5.991	0.094799	0.638111
Pirarubicin	8.042	0.074832	0.710666
PX-866	5.753	-0.07214	0.720664
Carboquone	7.031	-0.07157	0.722785
LY294002	5.078	0.060414	0.764682
Doxorubicin	7.018	-0.05834	0.77255
Rapamycin	6.621	-0.05133	0.799301
GDC-0941	6.285	-0.05081	0.801278
Mitomycin-C	5.905	-0.04918	0.807525
Neocarzinostatin	6.459	0.048664	0.809523
PD98059	4.115	0.046192	0.819036
Oxaliplatin	5.238	-0.04433	0.826207
Epirubicin	7.096	0.041956	0.835398
Wortmannin	4.965	0.041939	0.835462
U0126	4.906	0.038305	0.849552
Akt Inhibitor IV	6.559	-0.03769	0.851925
HCFU	4.839	-0.03662	0.856086
IC87114	4.082	0.033607	0.867832
Paclitaxel	7.597	0.033426	0.868541
RAD-001	7.441	-0.02849	0.887823
ICRF-193	4.372	-0.02442	0.903769
TGX221	4.964	0.023338	0.908013
Docetaxel	7.798	0.022492	0.911334
Amsacrine	6.187	0.018903	0.925438
AS605240	5.008	-0.01531	0.93957
Cisplatin	5.120	0.009597	0.962107
CPT-11	4.890	-0.0069	0.972746
Melphalan	4.672	-0.00519	0.979493
Semaxanib	4.294	0.004729	0.981325
Nedaplatin	4.642	0.001674	0.99339
Mitoxantrone HCl	7.163	-0.00038	0.998504

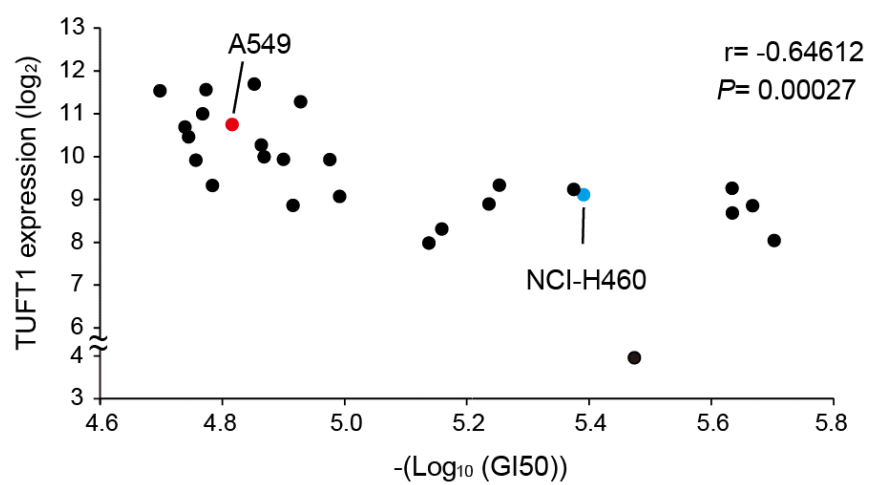


図24. Perifosine感受性と*TUFT1*発現量は有意な負の相関を示す
*TUFT1*発現量 (Log2)とperifosine感受性 (-log₁₀(GI₅₀))の相関を示す。ピアソンの相関係数 (r)およびp値を右上部に記載した。

そこで、perifosine の作用点と TUFT1 の関係を探るため、細胞内コンパートメントの局在を指標に調べることにした。用いた薬剤は perifosine、perifosine アナログである edelfosine、PI3K 阻害剤の wortmannin、AKT 阻害剤の MK-2206 の 4 剤であり、いずれも AKT と S6K1 のリン酸化を抑制する濃度において使用した (図 25A)。その結果、perifosine と edelfosine のみ、リソソームおよび初期エンドソームの局在に影響を及ぼした (図 25B-C)。また TUFT1 を過剰発現した細胞においては、リソソーム局在を指標とした際に、perifosine に抵抗性を示した (図 25D)。また *TUFT1* の発現が比較的高い A549 細胞 (GI50 値 15.3 μ M) と比較的低い NCI-H460 細胞 (GI50 値 4.06 μ M) を用いて perifosine 感受性を比較したところ、NCI-H460 細胞においてより低濃度でリソソーム局在に影響することが明らかとなった (図 25E-F)。さらに、NCI-H460 細胞において perifosine が AKT よりも低濃度の条件で S6K1 のリン酸化を抑制することも明らかとなった (図 25G)。以上の結果は、治験薬 perifosine の新たな作用機序として、メンブレントラフィックに影響を及ぼすことで mTORC1 シグナルを抑制する可能性と、その有用性が示唆される結果が得られたと考える。

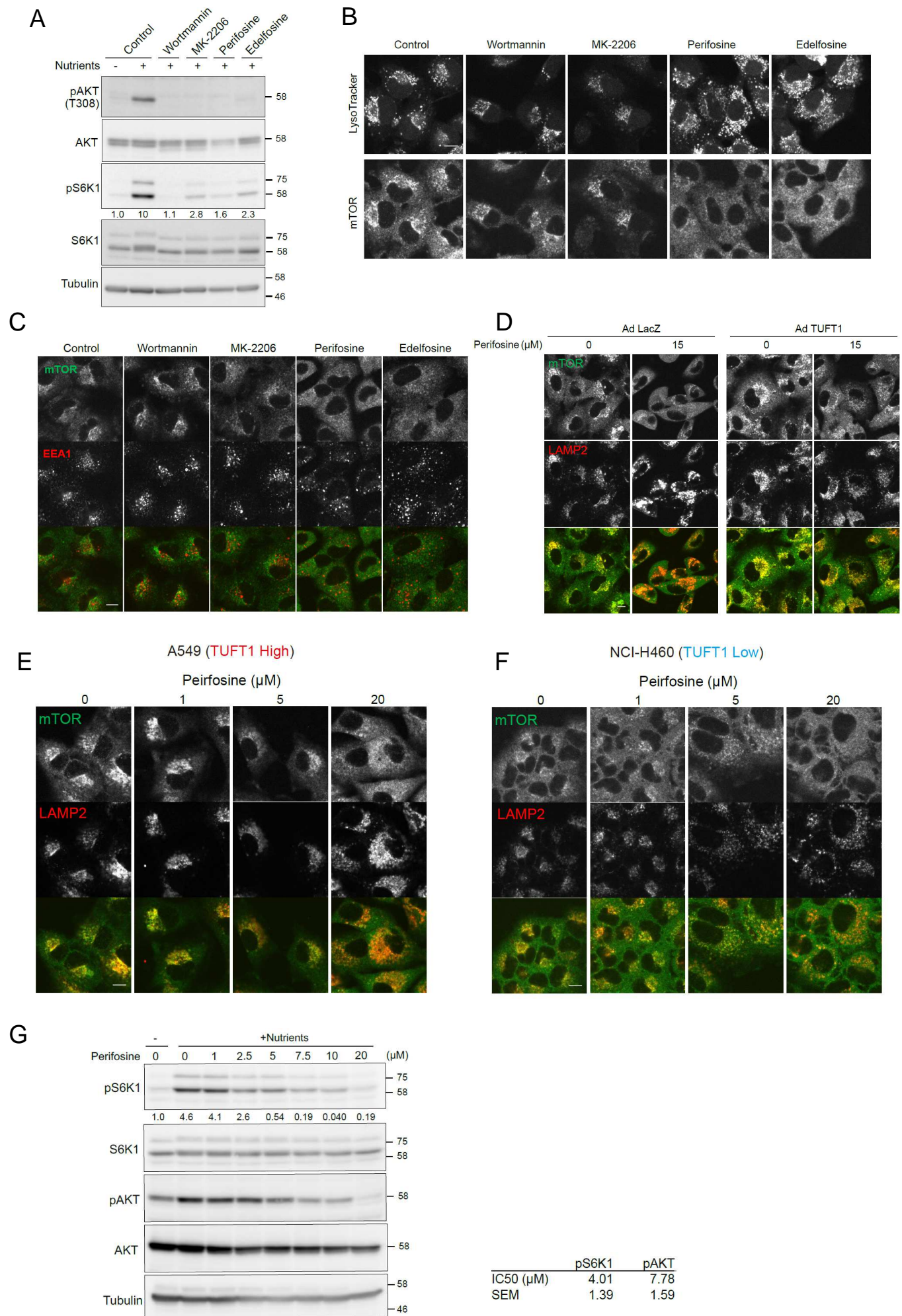


図25. Perifosineはメンブレントラフィックに作用する

(A) A549細胞を各種阻害剤で処理すると同時に3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。各々の阻害剤の濃度は以下の通りである：wortmannin (2 μ M)、MK-2206 (2 μ M)、perifosine (20 μ M)、edelfosine (10 μ M)。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。

(B) A549細胞を各種阻害剤で処理すると同時に2時間栄養飢餓条件にて培養し、LysoTracker Red (DND-99)を添加してさらに1時間培養した後、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗mTOR抗体を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(C) A549細胞を、(A)と同様に処理した。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗EEA1抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(D) A549細胞にアデノウイルスでLacZもしくはTUFT1を導入し、perifosineで処理すると同時に3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(E-F) A549細胞もしくはNCI-H460細胞について、perifosineで処理すると同時に3時間栄養飢餓条件にて培養した後、10分間の栄養刺激を行った。細胞は固定・膜透過処理を行った後、抗LAMP2抗体 (赤)もしくは抗mTOR抗体 (緑)を用いて染色した。スケールバーは10 μ mを示す。

(G) NCI-H460細胞は (E)と同様に処理した。回収したタンパク質はimmunoblottingにて解析した。数値は全S6K1に対する相対pS6K1量をImageJで定量した値を示す。独立した実験 (n=3)から計算されたIC50値を右の表に示す。

考察

本研究では、TGF- β の新規標的因子かつ新規のがん予後不良因子である TUFT1 の機能解析を行った。多方面からの解析の結果、TUFT1 は RABGAP1 のエフェクタータンパク質として機能し、メンブレントラフィックを介して mTORC1 シグナルを正に制御する因子であることを示唆する結果を得た。mTOR シグナルは、がんの進行と密接に結び付く重要な分子標的であるが、そのメカニズムは複雑で現時点では完全な理解には遠いと言える。本研究が、生物学的にも臨床的にも重要な知見となることを期待したい。

1. mTORC1 シグナル制御機構における TUFT1 の位置づけ

mTORC1 の上流には、増殖因子と栄養の両者が必須である。まず mTORC1 の主要な負の制御因子として Rheb の GAP である TSC 複合体があるが、様々な増殖因子からの刺激の多くは、この TSC に集約される。例えば、インスリンおよび IGF-1 の下流で AKT が活性化すると、TSC2 がリン酸化を受けてリソソーム膜から遊離し、Rheb が活性化される。また、RTK/Ras シグナルの下流でも、TSC2 のリン酸化が調節されていると言われており、Wnt や TNF- α は TSC1 を制御していると考えられている。TSC はこれらのシグナルのハブのような役目を果たし、

mTORC1 の活性化に関わる。一方、mTORC1 は細胞内ストレスや栄養状態による制御も受ける。例えばグルコース飢餓や低酸素条件で AMPK が活性化すると、AMPK は TSC2 もしくは Raptor を介して mTORC1 の活性を抑制する。また、アミノ酸濃度も mTORC1 の活性化に重要である。様々なアミノ酸の濃度の情報は、リソソーム膜上にある Rag ヘテロ二量体 (RagA/B-RagC/D) の活性状態という形で集約され、mTORC1 をリソソーム膜上に呼び込む。つまり、増殖因子と栄養の両者が存在し、Rheb と Rag が活性状態にある場合に、mTORC1 は活性化されると考えられている。

細胞内におけるメンブレントラフィックも、mTORC1 シグナルの活性制御と深く関係することが既に知られている。例えば、Rab に対する RNAi スクリーニングの結果、複数の Rab のノックダウンが *Drosophila* S2 細胞における S6K のリン酸化状態に影響を及ぼした [24]。恒常活性型変異体の Rab5 を発現させ、初期エンドソームから後期エンドソームへの成熟を抑制すると、mTORC1 シグナルが抑制される [25]。また Rab5 の過剰発現は Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) 依存的に mTOR の細胞内局在異常を引き起こすことで mTORC1 を抑制することが知られる [26]。Rab12 は細胞表面におけるアミノ酸トランスポーター PAT4 の発現量に影響し、細胞内のアミノ酸レベルを上昇させることで mTORC1 を活性

化するという報告もある [27]。さらに、自然免疫系において、LPS によって Toll-like receptor 4 (TLR4)が活性化すると Rab8A が PI3K γ とともに膜に呼び込まれ、mTOR シグナルを活性化させると言われている [28]。以上の知見は、mTORC1 の正常な活性化には、Rab による細胞内の正常な輸送制御が不可欠であることを示唆するものの、その詳細な分子機序については明らかではない。本研究は TUFT1-RABGAP1 に着目し、その機序の一つを明らかとした。TUFT1 のノックダウンは mTORC1 を不活性化したが、そのメカニズムを探索したところ、TSC-Rheb 経路、Rag 経路ともに非依存的であると考えられた。つまり TSC-Rheb 経路、Rag 経路と独立した、その活性化を支える根幹として TUFT1-RABGAP1 をはじめとするメンブレントラフィックが存在すると期待される。

加えて、細胞内コンパートメントの局在も mTORC1 シグナルを制御する重要な因子であるとの報告がある。特に、mTORC1 の活性化の場であるリソソームの局在が活性に及ぼす影響については研究が進み、論争の的となっている。例えば、リソソームの細胞辺縁部への局在は mTORC1 を活性化させるとの報告がある一方で、ハンチントン病の細胞モデルにおいてはリソソームの核周囲への集積に伴う mTOR の過剰活性化が認められると報告されており、HEK293T 細胞でもアミノ酸刺激に伴う mTOR の核周囲への集積が認められる [9, 69-71]。本研究で

は、A549 細胞において、TUFT1 や RABGAP1 のノックダウンが、リソソームの拡散とともに mTORC1 の不活性化を引き起こすことを見出した。これは、後者と類似した表現型とも取れる。ただし、恒常活性型 Rab7a の過剰発現によって TUFT1 ノックダウン細胞のリソソームを強制的に集積させた際のレスキュー効果は高いとは言えなかった。つまり、TUFT1 や RABGAP1 による核周囲へのリソソームの集積そのものが mTORC1 を活性化させるというより、寧ろ両者は正常なメンブレントラフィックを維持することで基底状態における mTORC1 の活性を制御している可能性が高いと考察する。本知見は、これまでに報告されている対立した報告を説明する、一助となることを期待する。

2. TUFT1 の機能

ヒト TUFT1 は 390 アミノ酸から成る酸性タンパク質である [72]。全長に渡り長い 2 つのコイルドコイル領域を持ち、C 末付近に自己集合ドメインがあるほかには、機能ドメインなどは明らかでなく、その機能の予測には困難を伴う。本研究において RABGAP1 の活性試験を行ったところ、TUFT1 が RABGAP1 の GAP 活性を増強し、標的とする Rab の活性を制御している可能性が示唆された。RABGAP1 の標的候補としては既に Rab4、Rab11、Rab14、Rab6、Rab36 などが

知られているが [63-65]、本研究ではその中で特に mTORC1 シグナルに關与する可能性がある Rab として Rab36 を同定した。Rab36 は RILP と結合するという報告がある [73]。RILP は Rab7 のエフェクタータンパク質として機能してリソソームの局在制限に關与することからも、mTORC1 シグナルとの關連が示唆される。ただ、A549 細胞において Rab36 変異体の過剰発現が及ぼす mTORC1 シグナルへの影響は限定的で、リソソームの細胞内局在に対しても大きな影響が認められなかったことから、Rab36 の機能は細胞依存的のようである。一般に Rab-GAP は複数の標的を持つことが知られており、このことから Rab36 が TUFT1-RABGAP1 の単独の標的とは考えにくい。ヒトでは 60 種類以上もの Rab がメンブレントラフィックに関わっていることが知られているが [18, 19]、今後これらの変異体や RNAi スクリーニングによる網羅的な探索を行うことで、TUFT1-RABGAP1 制御下にある Rab G タンパク質の一群を同定することができれば、より詳細な mTORC1 制御機構が明らかになるだろう。また、現時点において TUFT1 の結合が RABGAP1 の GAP 活性を制御する機序は不明であるが、両者の結合ドメインの同定、複合体の構造解析等により、その詳細を明らかにしたい。

一方で、TUFT1-RABGAP1 制御下にある Rab が、mTORC1 を介さない経路によって

機能を果たすことも考えられる。Rab は細胞運動と直接深く関わることが知られており、例えば Rho によるアクチン再構成と深く関わる Rab35 は転移性乳がんにおいて高発現が認められ、乳がん細胞株 MCF7 において Rab35 をノックダウンすると細胞運動能が抑制される [74]。同様に Rab5 も、ラメリポディア形成、アクチン再構成と深く関与し、細胞運動能を制御することが知られている [75]。以上の知見は、TUFT1-RABGAP1 がより直接的な形でも、アクチン骨格形成やがんの転移を促進している可能性を示唆する。また、上皮系由来のがんにおいて、EMT は、細胞運動能・浸潤能の亢進に重要な役割を果たすと考えられているが、EMT の制御には、H-Ras や K-Ras、Rho などさまざまな低分子量 G タンパク質が関与しており、Rab もその一端を担う。本研究では、A549 細胞において TUFT1 をノックダウンしても EMT マーカーの mRNA 発現にほとんど影響しなかったが、確かにアクチンストレスファイバーを減少させ、EMT 様の形態変化を阻害した。これらの観察は、TUFT1 が、代表的な EMT 誘導因子である TGF- β の標的であることを意義づけると考える。

また、TUFT1 は RABGAP1 以外にも、RABGAP1L、RABGEF1、RABEP1 といった Rab 関連タンパク質とも相互作用することが報告されており [60, 61, 76]、これらもまた標的 Rab の活性や機能と深く関わる。例えば RABGAP1 のオーソログである RABGAP1L もまた TBC ドメインを持つ Rab-GAP の一種であり、

Rab22A の GAP として働くと考えられている [77]。TUFT1 は RABGAP1 以外にも、これらの Rab 関連因子との相互作用、機能制御等を介し、メンブレントラフィックに作用する可能性も期待できる。

さらに、RNA-sequencing より得られたデータの GSEA 結果によると、TUFT1 は mTORC1 シグナルの他に、E2F ターゲットや G2M チェックポイントといった細胞周期関連の遺伝子発現にも関与することが示唆された。これに関する RABGAP1 依存性は明らかでないが、TUFT1 は何らかの形で細胞周期制御にも関与し、がん促進的な機能を持つことも期待される。また、上記オントロジー解析の結果との関連性には検討の余地があるが、TUFT1 は主として細胞質で発現する因子である一方、核においても機能を示す可能性も存在する。本研究で行った分画実験においても、ごく一部の TUFT1 は核画分にも発現が認められ、既報においてもいくつかの臓器において核における局在が報告されている [39]。TUFT1 結合タンパク質の一つとして Tuftelin-interacting protein 11 (TFIP11) が知られるが、TFIP11 は核に局在し、スプライシング因子として機能すると考えられている [78, 79]。この TFIP11 と TUFT1 の結合部位であり、かつ TUFT1 の自己集合ドメインである C 末部位は、哺乳類において高度に保存されており、TUFT1 の構造および機能における重要性が期待できる [72]。また、TUFT1 は染色体の高次構造と機能維持

に関わる structural maintenance of chromosome (SMC)タンパク質や複数の転写因子と結合能を持つことも報告されており [60, 61]、TUFT1 が核内において Rab の制御とは独立した機能を発揮する可能性も考えられる。

3. TGF- β シグナルと mTOR シグナル

TGF- β シグナルには Smad 経路 (Smad pathway)の他に、Smad を介さない経路 (non-Smad pathway)で直接転写を制御する例も存在し、それには Erk、JNK、p38 などの MAPK 経路や、PI3K/AKT 経路などが含まれる [34]。これまで報告されてきた TGF- β と mTOR のクロストークについて見ると、一つは、non-Smad pathway を介した AKT/mTOR 活性化による、EMT 制御が挙げられる [80, 81]。逆に、ナチュラルキラー細胞においては、TGF- β 刺激が II 型受容体を介して mTOR シグナルを抑制するという報告も存在するが [82]、これらはいずれも短期スパンでの両者のクロストークであると考えられている。一方 TUFT1 は 48 時間という長時間で TGF- β により誘導されることから、間接的かつより長期スパンで TGF- β と mTOR 経路を結ぶ、正の制御因子であると考えられる。また TUFT1 を介した mTOR シグナル制御は、EMT などの限定的なメカニズムでなく、メンブレントラフィックを介した、より一般的な機構であることが期待される。

4. 治療応用を見据えて

メンブレントラフィックは、細胞の分化や、運動、形質転換、細胞骨格形成など様々な生理的機能と関連が深いことから、トラフィックの異常はさまざまな疾患をひき起こす。特に、がんとの関連については報告が多数あり、いくつかの Rab については発現異常も認められる。一方で、両者を関連付ける具体的なメカニズムは不明な部分が多い。本研究は、メンブレントラフィックとがんとの進展を関連付ける新たな知見となったと考える。TUFT1 をノックダウンすると、輸送小胞や細胞内コンパートメントの局在を変化させることで mTORC1 を不活性化し、確かに *in vivo* における腫瘍の増殖・転移を抑制した。また、RABGAP1 も mTORC1 シグナルに対して同様な働きを示した。つまり、TUFT1 や RABGAP1 のノックダウンは、がん細胞において TUFT1 の発現が亢進したことにより生じたメンブレントラフィックの脱制御を解除し、レスキューする方向に働いたものと考えられる。

PI3K-AKT-mTOR シグナルはがんにおいて頻繁に活性化が認められ、がんの治療標的として長く注目され続けてきた [83, 84]。ところが、これまで数多くの阻害剤が開発されてきたものの、治験に進んだ薬剤はほんの一握りであり、さらにそ

のごく一部で治療効果が示されているに過ぎない。肺がん (特に NSCLC)に限っても、PI3K-AKT-mTOR シグナルは極めて重要であり、EGFR を始めとするチロシンキナーゼ型受容体活性化や *KRAS* の変異、PI3K の p110 α 触媒サブユニットをコードする *PIK3CA* の変異もしくは遺伝子増幅、*PTEN* の欠失もしくは変異など様々な要因によってシグナルが活性化されていることが知られる。また EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の耐性獲得とも深く関わるが、本経路の分子標的としての有用性に関しては、未だ前臨床・臨床試験の途上である。また、本研究の薬剤感受性試験の中で、その感受性と *TUFT1* の mRNA 発現量に有意な負の相関が認められるとして同定した AKT 阻害剤である治験薬 perifosine も、大腸がんおよび多発性骨髄腫において第三相試験に進んだものの、上市には至っていない。

細胞膜の脂質ラフトは、コレステロールとスフィンゴ脂質に富み、様々なシグナル伝達の足場となる重要な微小膜領域であるが、AKT はこの脂質ラフト部分に結合し、高次構造を変化させることで二か所のリン酸化 (T308 および S473)を受けて活性化される。アルキルリン脂質の経口 AKT 阻害剤である perifosine は、もともと AKT の PH ドメインに直接作用して AKT の脂質ラフトへの移行を阻害すると考えられていたが、それ以外にも多岐に渡る作用を示すことが知られており、作用機序の全貌は明らかでない [85]。本研究によって得られた、NCI-

H460 細胞において perifosine が AKT よりも低濃度で S6K1 のリン酸化を抑制するという結果は、perifosine が AKT を介した間接的な経路以外にも、mTORC1 シグナルを直接抑制することを示唆した。mTORC1 と perifosine の関係としては、perifosine が mTOR、Raptor といった複合体の主要構成因子をユビキチン分解し、mTOR/Raptor の複合体形成を阻害するという報告が存在するが [86]、本研究では、上記に加えた perifosine の新たな作用機序として、TUFT1-RABGAP1 と関連したメンブレントラフィックを阻害する可能性を示した。以上の知見は、*TUFT1* 発現量が perifosine の薬効予測マーカーとなり得る可能性のみならず、TUFT1-RABGAP1 によるメンブレントラフィック制御システム自体が、がんの治療標的となり得る可能性も示唆する。Perifosine は rapamycin などと異なり、長期間投与した後も S6 の再活性化が起こらないと報告されていることから、mTOR 阻害剤としての有用性が示唆される [87]。特に TUFT1 はステージ I の肺腺がんにおいて予後と強く関連したことから、TUFT1-RABGAP1 が制御するメンブレントラフィックは早期がんにおいて重要である可能性もある。将来的に、TUFT1 自身、もしくは関連するメンブレントラフィックが新たながんの治療標的、もしくはバイオマーカーとなり得ることに期待したい。

結論

本研究では TGF- β の新規標的であり、肺がんや乳がんなど複数のがんにおける予後不良因子である TUFT1 に着目し、その機能解析を行った。各種 *in vitro*、*in vivo* 解析の結果、TUFT1 は、がんの増殖・転移に対し促進的な働きを示した。また、TUFT1 のノックダウンは mTORC1 シグナルの抑制と、細胞内メンブレントラフィックの異常を引き起こしたが、その機序として、TUFT1 が Rab-GAP の一つである RABGAP1 と結合し、その GAP 活性を制御することで、Rab36 をはじめとする標的 Rab の活性状態を制御している可能性を見出した。以上の結果は、mTORC1 シグナルとメンブレントラフィックを結ぶ新たな知見である。さらに、*TUFT1* の発現量は治験薬 perifosine の感受性と有意な負の相関を示すことも見出した。Perifosine はアルキルリン脂質の AKT 阻害剤の一種であるが、その作用機序は多岐に渡り、詳細な機序の解明が求められていた。本研究ではその新たな作用機序として、TUFT1 および RABGAP1 と関連したメンブレントラフィックへの影響を同定した。以上の結果は、TUFT1 それ自身および関連するメンブレントラフィックが、新たなタイプの mTOR 阻害剤として、もしくはバイオマーカーとして利用し得ることを期待したい。

引用文献

- [1] J. Kunz, R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N.R. Movva, M.N. Hall, Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression, *Cell*, 73 585-596 (1993).
- [2] J. Heitman, N.R. Movva, M.N. Hall, Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast, *Science*, 253 905-909 (1991).
- [3] R.A. Saxton, D.M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease, *Cell*, 169 361-371 (2017).
- [4] S. Wullschleger, R. Loewith, W. Oppliger, M.N. Hall, Molecular organization of target of rapamycin complex 2, *J Biol Chem*, 280 30697-30704 (2005).
- [5] D.M. Sabatini, mTOR and cancer: insights into a complex relationship, *Nat Rev Cancer*, 6 729-734 (2006).
- [6] M.K. Holz, B.A. Ballif, S.P. Gygi, J. Blenis, mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events, *Cell*, 123 569-580 (2005).
- [7] K. Inoki, Y. Li, T. Xu, K.L. Guan, Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling, *Genes Dev*, 17 1829-1834 (2003).
- [8] K. Powis, C. De Virgilio, Conserved regulators of Rag GTPases orchestrate amino

acid-dependent TORC1 signaling, *Cell Discov*, 2 15049 (2016).

[9] Y. Sancak, T.R. Peterson, Y.D. Shaul, R.A. Lindquist, C.C. Thoreen, L. Bar-Peled, D.M. Sabatini, The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1, *Science*, 320 1496-1501 (2008).

[10] L. Bar-Peled, L.D. Schweitzer, R. Zoncu, D.M. Sabatini, Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1, *Cell*, 150 1196-1208 (2012).

[11] M. Laplante, D.M. Sabatini, mTOR signaling in growth control and disease, *Cell*, 149 274-293 (2012).

[12] A.Y. Choo, S.O. Yoon, S.G. Kim, P.P. Roux, J. Blenis, Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 17414-17419 (2008).

[13] M.E. Feldman, B. Apsel, A. Uotila, R. Loewith, Z.A. Knight, D. Ruggero, K.M. Shokat, Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2, *PLoS Biol*, 7 e38 (2009).

[14] J. Tabernero, F. Rojo, E. Calvo, H. Burris, I. Judson, K. Hazell, E. Martinelli, S. Ramon y Cajal, S. Jones, L. Vidal, N. Shand, T. Macarulla, F.J. Ramos, S. Dimitrijevic, U. Zoellner, P. Tang, M. Stumm, H.A. Lane, D. Lebwohl, J. Baselga, Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a

phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors, *J Clin Oncol*, 26 1603-1610 (2008).

[15] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.L. Guan, AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1, *Nat Cell Biol*, 13 132-141 (2011).

[16] R. Rangwala, Y.C. Chang, J. Hu, K.M. Algazy, T.L. Evans, L.A. Fecher, L.M. Schuchter, D.A. Torigian, J.T. Panosian, A.B. Troxel, K.S. Tan, D.F. Heitjan, A.M. DeMichele, D.J. Vaughn, M. Redlinger, A. Alavi, J. Kaiser, L. Pontiggia, L.E. Davis, P.J. O'Dwyer, R.K. Amaravadi, Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma, *Autophagy*, 10 1391-1402 (2014).

[17] V.S. Rodrik-Outmezguine, M. Okaniwa, Z. Yao, C.J. Novotny, C. McWhirter, A. Banaji, H. Won, W. Wong, M. Berger, E. de Stanchina, D.G. Barratt, S. Cosulich, T. Klinowska, N. Rosen, K.M. Shokat, Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor, *Nature*, 534 272-276 (2016).

[18] H. Stenmark, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 513-525 (2009).

[19] Y. Zhen, H. Stenmark, Cellular functions of Rab GTPases at a glance, *J Cell Sci*, 128 3171-3176 (2015).

- [20] P.S. Yang, P.H. Yin, L.M. Tseng, C.H. Yang, C.Y. Hsu, M.Y. Lee, C.F. Horng, C.W. Chi, Rab5A is associated with axillary lymph node metastasis in breast cancer patients, *Cancer Sci*, 102 2172-2178 (2011).
- [21] T. Nakano, K. Shimizu, O. Kawashima, M. Kamiyoshihara, S. Kakegawa, M. Sugano, T. Ibe, T. Nagashima, K. Kaira, N. Sunaga, Y. Ohtaki, J. Atsumi, I. Takeyoshi, Establishment of a human lung cancer cell line with high metastatic potential to multiple organs: gene expression associated with metastatic potential in human lung cancer, *Oncol Rep*, 28 1727-1735 (2012).
- [22] D. Alonso-Curbelo, E. Riveiro-Falkenbach, E. Pérez-Guijarro, M. Cifdaloz, P. Karras, L. Osterloh, D. Megías, E. Cañón, T.G. Calvo, D. Olmeda, G. Gómez-López, O. Graña, V.J. Sánchez-Arévalo Lobo, D.G. Pisano, H.W. Wang, P. Ortiz-Romero, D. Tormo, K. Hoek, J.L. Rodríguez-Peralto, J.A. Joyce, M.S. Soengas, RAB7 controls melanoma progression by exploiting a lineage-specific wiring of the endolysosomal pathway, *Cancer Cell*, 26 61-76 (2014).
- [23] K.W. Cheng, J.P. Lahad, W.L. Kuo, A. Lapuk, K. Yamada, N. Auersperg, J. Liu, K. Smith-McCune, K.H. Lu, D. Fishman, J.W. Gray, G.B. Mills, The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers, *Nat Med*, 10 1251-1256 (2004).
- [24] L. Li, E. Kim, H. Yuan, K. Inoki, P. Goraksha-Hicks, R.L. Schiesher, T.P. Neufeld,

K.L. Guan, Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases, *J Biol Chem*, 285 19705-19709 (2010).

[25] R.J. Flinn, Y. Yan, S. Goswami, P.J. Parker, J.M. Backer, The late endosome is essential for mTORC1 signaling, *Mol Biol Cell*, 21 833-841 (2010).

[26] D. Bridges, K. Fisher, S.N. Zolov, T. Xiong, K. Inoki, L.S. Weisman, A.R. Saltiel, Rab5 proteins regulate activation and localization of target of rapamycin complex 1, *J Biol Chem*, 287 20913-20921 (2012).

[27] T. Matsui, M. Fukuda, Rab12 regulates mTORC1 activity and autophagy through controlling the degradation of amino-acid transporter PAT4, *EMBO Rep*, 14 450-457 (2013).

[28] A.A. Wall, L. Luo, Y. Hung, S.J. Tong, N.D. Condon, A. Blumenthal, M.J. Sweet, J.L. Stow, Small GTPase Rab8a-recruited Phosphatidylinositol 3-Kinase γ Regulates Signaling and Cytokine Outputs from Endosomal Toll-like Receptors, *J Biol Chem*, 292 4411-4422 (2017).

[29] R.S. Saad, Y.L. Liu, H. Han, R.J. Landreneau, J.F. Silverman, Prognostic significance of thyroid transcription factor-1 expression in both early-stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung, *Hum Pathol*, 35 3-7 (2004).

- [30] K. Isogaya, D. Koinuma, S. Tsutsumi, R.A. Saito, K. Miyazawa, H. Aburatani, K. Miyazono, A Smad3 and TTF-1/NKX2-1 complex regulates Smad4-independent gene expression, *Cell Res*, 24 994-1008 (2014).
- [31] R.A. Saito, T. Watabe, K. Horiguchi, T. Kohyama, M. Saitoh, T. Nagase, K. Miyazono, Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells, *Cancer Res*, 69 2783-2791 (2009).
- [32] X.H. Feng, R. Derynck, Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21 659-693 (2005).
- [33] C.H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature*, 390 465-471 (1997).
- [34] A. Moustakas, C.H. Heldin, Non-Smad TGF-beta signals, *J Cell Sci*, 118 3573-3584 (2005).
- [35] K. Miyazono, H. Suzuki, T. Imamura, Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors, *Cancer Sci*, 94 230-234 (2003).
- [36] J. Massagué, TGFbeta in Cancer, *Cell*, 134 215-230 (2008).
- [37] D. Deutsch, A. Palmon, L.W. Fisher, N. Kolodny, J.D. Termine, M.F. Young, Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein, *J Biol Chem*,

266 16021-16028 (1991).

[38] D. Deutsch, A. Palmon, M.F. Young, S. Selig, W.G. Kearns, L.W. Fisher, Mapping of the human tuftelin (TUFT1) gene to chromosome 1 by fluorescence in situ hybridization, *Mamm Genome*, 5 461-462 (1994).

[39] D. Deutsch, Y. Leiser, B. Shay, E. Fermon, A. Taylor, E. Rosenfeld, L. Dafni, K. Charuvi, Y. Cohen, A. Haze, A. Fuks, Z. Mao, The human tuftelin gene and the expression of tuftelin in mineralizing and nonmineralizing tissues, *Connect Tissue Res*, 43 425-434 (2002).

[40] Z. Mao, B. Shay, M. Hekmati, E. Fermon, A. Taylor, L. Dafni, K. Heikinheimo, J. Lustmann, L.W. Fisher, M.F. Young, D. Deutsch, The human tuftelin gene: cloning and characterization, *Gene*, 279 181-196 (2001).

[41] Y. Leiser, A. Blumenfeld, A. Haze, L. Dafni, A.L. Taylor, E. Rosenfeld, E. Fermon, Y. Gruenbaum-Cohen, B. Shay, D. Deutsch, Localization, quantification, and characterization of tuftelin in soft tissues, *Anat Rec (Hoboken)*, 290 449-454 (2007).

[42] Y. Leiser, N. Silverstein, A. Blumenfeld, D. Shilo, A. Haze, E. Rosenfeld, B. Shay, R. Tabakman, S. Lecht, P. Lazarovici, D. Deutsch, The induction of tuftelin expression in PC12 cell line during hypoxia and NGF-induced differentiation, *J Cell Physiol*, 226 165-172 (2011).

- [43] B. Zhou, H. Zhan, L. Tin, S. Liu, J. Xu, Y. Dong, X. Li, L. Wu, W. Guo, TUFT1 regulates metastasis of pancreatic cancer through HIF1-Snail pathway induced epithelial-mesenchymal transition, *Cancer Lett*, 382 11-20 (2016).
- [44] W. Liu, L. Zhang, Z. Jin, M. Zhao, Z. Li, G. Chen, L. Sun, B. Chen, TUFT1 is expressed in breast cancer and involved in cancer cell proliferation and survival, *Oncotarget*, 8 74962-74974 (2017).
- [45] S. Ehata, A. Hanyu, M. Fujime, Y. Katsuno, E. Fukunaga, K. Goto, Y. Ishikawa, K. Nomura, H. Yokoo, T. Shimizu, E. Ogata, K. Miyazono, K. Shimizu, T. Imamura, Ki26894, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor, inhibits in vitro invasion and in vivo bone metastasis of a human breast cancer cell line, *Cancer Sci*, 98 127-133 (2007).
- [46] A. Uchida, N.H. Alami, A. Brown, Tight functional coupling of kinesin-1A and dynein motors in the bidirectional transport of neurofilaments, *Mol Biol Cell*, 20 4997-5006 (2009).
- [47] Q.L. Ying, J. Wray, J. Nichols, L. Battle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen, A. Smith, The ground state of embryonic stem cell self-renewal, *Nature*, 453 519-523 (2008).
- [48] K. Matsuura, T. Jigami, K. Taniue, Y. Morishita, S. Adachi, T. Senda, A. Nonaka, H.

Aburatani, T. Nakamura, T. Akiyama, Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway, *Nat Commun*, 2 548 (2011).

[49] C.D. Nobes, A. Hall, Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*, 81 53-62 (1995).

[50] J.F. Gera, I.K. Mellingerhoff, Y. Shi, M.B. Rettig, C. Tran, J.H. Hsu, C.L. Sawyers, A.K. Lichtenstein, AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression, *J Biol Chem*, 279 2737-2746 (2004).

[51] L. Liu, Y. Luo, L. Chen, T. Shen, B. Xu, W. Chen, H. Zhou, X. Han, S. Huang, Rapamycin inhibits cytoskeleton reorganization and cell motility by suppressing RhoA expression and activity, *J Biol Chem*, 285 38362-38373 (2010).

[52] M. Breuleux, M. Klopfenstein, C. Stephan, C.A. Doughty, L. Barys, S.M. Maira, D. Kwiatkowski, H.A. Lane, Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition, *Mol Cancer Ther*, 8 742-753 (2009).

[53] W.C. Skarnes, B. Rosen, A.P. West, M. Koutsourakis, W. Bushell, V. Iyer, A.O. Mujica, M. Thomas, J. Harrow, T. Cox, D. Jackson, J. Severin, P. Biggs, J. Fu, M. Nefedov,

P.J. de Jong, A.F. Stewart, A. Bradley, A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function, *Nature*, 474 337-342 (2011).

[54] L. Bar-Peled, L. Chantranupong, A.D. Cherniack, W.W. Chen, K.A. Ottina, B.C. Grabiner, E.D. Spear, S.L. Carter, M. Meyerson, D.M. Sabatini, A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1, *Science*, 340 1100-1106 (2013).

[55] A. Saci, L.C. Cantley, C.L. Carpenter, Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size, *Mol Cell*, 42 50-61 (2011).

[56] C. Valetti, D.M. Wetzel, M. Schrader, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.E. Kreis, T.A. Schroer, Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170, *Mol Biol Cell*, 10 4107-4120 (1999).

[57] A.J. Clippinger, J.C. Alwine, Dynein mediates the localization and activation of mTOR in normal and human cytomegalovirus-infected cells, *Genes Dev*, 26 2015-2026 (2012).

[58] Y. Tanaka, Y. Kanai, Y. Okada, S. Nonaka, S. Takeda, A. Harada, N. Hirokawa, Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, *kif5B*, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria, *Cell*, 93 1147-1158 (1998).

[59] N. Taub, D. Teis, H.L. Ebner, M.W. Hess, L.A. Huber, Late endosomal traffic of the

epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signaling, *Mol Biol Cell*, 18 4698-4710 (2007).

[60] E.L. Huttlin, L. Ting, R.J. Bruckner, F. Gebreab, M.P. Gygi, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, G. Colby, K. Baltier, R. Dong, V. Guarani, L.P. Vaites, A. Ordureau, R. Rad, B.K. Erickson, M. Wühr, J. Chick, B. Zhai, D. Kolippakkam, J. Mintseris, R.A. Obar, T. Harris, S. Artavanis-Tsakonas, M.E. Sowa, P. De Camilli, J.A. Paulo, J.W. Harper, S.P. Gygi, The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome, *Cell*, 162 425-440 (2015).

[61] E.L. Huttlin, R.J. Bruckner, J.A. Paulo, J.R. Cannon, L. Ting, K. Baltier, G. Colby, F. Gebreab, M.P. Gygi, H. Parzen, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, L. Pontano-Vaites, S. Swarup, A.E. White, D.K. Schweppe, R. Rad, B.K. Erickson, R.A. Obar, K.G. Guruharsha, K. Li, S. Artavanis-Tsakonas, S.P. Gygi, J.W. Harper, Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks, *Nature*, 545 505-509 (2017).

[62] X. Pan, S. Eathiraj, M. Munson, D.G. Lambright, TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism, *Nature*, 442 303-306 (2006).

[63] E. Fuchs, A.K. Haas, R.A. Spooner, S. Yoshimura, J.M. Lord, F.A. Barr, Specific

Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways, *J Cell Biol*, 177 1133-1143 (2007).

[64] M.H. Cuif, F. Possmayer, H. Zander, N. Bordes, F. Jollivet, A. Couedel-Courteille, I. Janoueix-Lerosey, G. Langsley, M. Bornens, B. Goud, Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome, *EMBO J*, 18 1772-1782 (1999).

[65] E. Kanno, K. Ishibashi, H. Kobayashi, T. Matsui, N. Ohbayashi, M. Fukuda, Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs, *Traffic*, 11 491-507 (2010).

[66] J. Barretina, G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A.A. Margolin, S. Kim, C.J. Wilson, J. Lehár, G.V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M.F. Berger, J.E. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jané-Valbuena, F.A. Mapa, J. Thibault, E. Bric-Furlong, P. Raman, A. Shipway, I.H. Engels, J. Cheng, G.K. Yu, J. Yu, P. Aspesi, M. de Silva, K. Jagtap, M.D. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palesscandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R.C. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Winckler, M. Reich, N. Li, J.P. Mesirov, S.B. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V.E. Myer, B.L. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J.L. Harris, M. Meyerson, T.R. Golub, M.P. Morrissey, W.R. Sellers, R. Schlegel, L.A. Garraway, The Cancer Cell Line Encyclopedia enables

predictive modelling of anticancer drug sensitivity, *Nature*, 483 603-607 (2012).

[67] S. Dan, T. Tsunoda, O. Kitahara, R. Yanagawa, H. Zembutsu, T. Katagiri, K. Yamazaki, Y. Nakamura, T. Yamori, An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines, *Cancer Res*, 62 1139-1147 (2002).

[68] S. Dan, M. Okamura, M. Seki, K. Yamazaki, H. Sugita, M. Okui, Y. Mukai, H. Nishimura, R. Asaka, K. Nomura, Y. Ishikawa, T. Yamori, Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations, *Cancer Res*, 70 4982-4994 (2010).

[69] C. Erie, M. Sacino, L. Houle, M.L. Lu, J. Wei, Altered lysosomal positioning affects lysosomal functions in a cellular model of Huntington's disease, *Eur J Neurosci*, 42 1941-1951 (2015).

[70] V.I. Korolchuk, S. Saiki, M. Lichtenberg, F.H. Siddiqi, E.A. Roberts, S. Imarisio, L. Jahreiss, S. Sarkar, M. Futter, F.M. Menzies, C.J. O'Kane, V. Deretic, D.C. Rubinsztein, Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses, *Nat Cell Biol*, 13 453-460 (2011).

[71] Z. Hong, N.M. Pedersen, L. Wang, M.L. Torgersen, H. Stenmark, C. Raiborg, PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning, *J Cell Biol*, 216

4217-4233 (2017).

[72] S. Delgado, D. Deutsch, J.Y. Sire, Evolutionary Analysis of the Mammalian Tuftelin Sequence Reveals Features of Functional Importance, *J Mol Evol*, 84 214-224 (2017).

[73] T. Matsui, N. Ohbayashi, M. Fukuda, The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes, *J Biol Chem*, 287 28619-28631 (2012).

[74] C.E. Chua, Y.S. Lim, B.L. Tang, Rab35--a vesicular traffic-regulating small GTPase with actin modulating roles, *FEBS Lett*, 584 1-6 (2010).

[75] M. Spaargaren, J.L. Bos, Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration, *Mol Biol Cell*, 10 3239-3250 (1999).

[76] K. Boldt, J. van Reeuwijk, Q. Lu, K. Koutroumpas, T.M. Nguyen, Y. Texier, S.E. van Beersum, N. Horn, J.R. Willer, D.A. Mans, G. Dougherty, I.J. Lamers, K.L. Coene, H.H. Arts, M.J. Betts, T. Beyer, E. Bolat, C.J. Gloeckner, K. Haidari, L. Hetterschijt, D. Iaconis, D. Jenkins, F. Klose, B. Knapp, B. Latour, S.J. Letteboer, C.L. Marcelis, D. Mitic, M. Morleo, M.M. Oud, M. Riemersma, S. Rix, P.A. Terhal, G. Toedt, T.J. van Dam, E. de Vrieze, Y. Wissinger, K.M. Wu, G. Apic, P.L. Beales, O.E. Blacque, T.J. Gibson, M.A. Huynen, N. Katsanis, H. Kremer, H. Omran, E. van Wijk, U. Wolfrum, F. Kepes, E.E.

Davis, B. Franco, R.H. Giles, M. Ueffing, R.B. Russell, R. Roepman, U.K.R.D. Group, An organelle-specific protein landscape identifies novel diseases and molecular mechanisms, *Nat Commun*, 7 11491 (2016).

[77] F. Qu, D.N. Lorenzo, S.J. King, R. Brooks, J.E. Bear, V. Bennett, Ankyrin-B is a PI3P effector that promotes polarized $\alpha 5 \beta 1$ -integrin recycling via recruiting RabGAP1L to early endosomes, *Elife*, 5 (2016).

[78] M.S. Jurica, M.J. Moore, Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins, *Mol Cell*, 12 5-14 (2003).

[79] X. Wen, Y.P. Lei, Y.L. Zhou, C.T. Okamoto, M.L. Snead, M.L. Paine, Structural organization and cellular localization of tuftelin-interacting protein 11 (TFIP11), *Cell Mol Life Sci*, 62 1038-1046 (2005).

[80] S. Lamouille, R. Derynck, Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway, *J Cell Biol*, 178 437-451 (2007).

[81] S. Lamouille, E. Connolly, J.W. Smyth, R.J. Akhurst, R. Derynck, TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion, *J Cell Sci*, 125 1259-1273 (2012).

[82] S. Viel, A. Marçais, F.S. Guimaraes, R. Loftus, J. Rabilloud, M. Grau, S. Degouve,

S. Djebali, A. Sanlaville, E. Charrier, J. Bienvenu, J.C. Marie, C. Caux, J. Marvel, L. Town, N.D. Huntington, L. Bartholin, D. Finlay, M.J. Smyth, T. Walzer, TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway, *Sci Signal*, 9 ra19 (2016).

[83] I. Vivanco, C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer, *Nat Rev Cancer*, 2 489-501 (2002).

[84] J.A. Engelman, Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations, *Nat Rev Cancer*, 9 550-562 (2009).

[85] J.J. Gills, P.A. Dennis, Perifosine: update on a novel Akt inhibitor, *Curr Oncol Rep*, 11102-110 (2009).

[86] L. Fu, Y.A. Kim, X. Wang, X. Wu, P. Yue, S. Lonial, F.R. Khuri, S.Y. Sun, Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy, *Cancer Res*, 69 8967-8976 (2009).

[87] F. Zhu, J. Kai, L. Chen, M. Wu, J. Dong, Q. Wang, L.H. Zeng, Akt Inhibitor Perifosine Prevents Epileptogenesis in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy, *Neurosci Bull*, (2017).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導を賜りました東京大学大学院 医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学分野の宮園浩平教授に厚く御礼申し上げます。また、研究方針や細部の実験手技・解析に至るまで、終始ご指導を賜りました鯉沼代造准教授に深く御礼申し上げます。また、研究遂行にあたり多大なるご協力を賜り、本博士論文の共同研究者である、がん研究会 がん化学療法センター 分子薬理部 旦慎吾副部長、がん研究会 がん研究所 細胞生物部の八尾良司部長に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にあたりご指導賜りました東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授、吉川雅英教授、Uppsala University の Carl-Henrik Heldin 教授に心より感謝申し上げます。そして、日々の研究遂行にあたり多くのご助言とご協力を賜りました、江幡正悟特任准教授、森川真大助教、森下保幸さんをはじめとする分子病理学分野のスタッフの先生方、先輩方、室員の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、博士課程進学より現在に至るまで温かく見守り、あらゆる面で支えてくれた両親に心より感謝致します。