

審査の結果の要旨

氏名 川崎 夏実

本研究では、TGF- $\beta$  の新規標的因子である TUFT1 を同定し、そのがん細胞における機能解析を行い、以下の結果を得ている。

1. TUFT1 の高発現は、肺がん、乳がん、胃がんなど複数のがんにおいて患者予後不良と相関することを見出した。特異的 siRNA を用いたノックダウン実験を行うと、TUFT1 をノックダウンした細胞において、アクチンストレスファイバーの減少を認め、運動能、細胞増殖能も大きく低下させた。さらに、*in vivo* 実験系において、TUFT1 ががんの増殖・転移にも影響を及ぼすことも見出した。RNA-sequencing により遺伝子発現データを取得し、GSEA (gene set enrichment analysis) を行ったところ、TUFT1 をノックダウンした細胞と比較してコントロール細胞において mTORC1 シグナルに関する遺伝子セットが濃縮した。また、TUFT1 は mTORC1 シグナルにより翻訳制御を受ける主要な標的である RhoA、Rac1、Cdc42 および、cyclin D1、cyclin D3 の発現をタンパク質レベルで制御することも示された。
2. TUFT1 が mTORC1 に及ぼす影響を検討したところ、TUFT1 のノックダウンは上流の AKT のリン酸化を低下させることなく、下流の S6K1 のリン酸化レベルを低下させた。mTORC1 はアミノ酸存在下においてリソソーム膜表面に局在し活性化を受ける。これについて、mTORC1 の細胞内局在に対する TUFT1 の影響を調べたところ、TUFT1 をノックダウンした細胞において、リソソームと mTOR 両者の細胞質全体への拡散を認めた。一方、mTOR のリソソーム局在には影響がなく、これは Rag とは独立した経路を介することも示した。さらに、初期エンドソームの局在およびトランスフェリン取り込みアッセイの結果より、TUFT1 はオルガネラ小胞の局在や細胞内輸送全般に関与すると考えられた。
3. 微小管の逆行性輸送を司るダイニンの阻害剤を用いた場合にも、リソソームおよび mTOR の拡散および S6K1 リン酸化レベルの低下がもたらされた。また微小管モータータンパク質である Kif5b を過剰発現させた場合にも、同様な結果を得た。さらに、リソソームの逆行性輸送を司る Rab7 の恒常活性型変異体を介して、リソソームの核周囲への集積を引き起こすと、TUFT1 ノックダウンによる mTORC1 の活性低下をわずかにレスキューした。このことより、TUFT1 による mTORC1 活性制御の一部は、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が示された。

4. TUFT1 の結合因子として、Rab 低分子量 G タンパク質の GAP として機能する RABGAP1 を同定した。RABGAP1 のノックダウンは、mTORC1 シグナルの活性低下と、リソソームの拡散を引き起こし、TUFT1 ノックダウン細胞と類似した表現型を示した。また、この表現型は RABGAP1 の GAP 活性依存的であることも示唆された。さらに RABGAP1 の標的候補のうち、mTORC1 シグナルに関与するものの一つとして Rab36 を同定するとともに、RABGAP1 の Rab36 に対する GAP 活性は、TUFT1 の存在により亢進することも示された。以上の結果より、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ことが示唆された。

5. TUFT1 によるメンブレントラフィック制御機構が、がんの治療標的となり得る可能性の探索のため、薬剤感受性試験を行ったところ、TUFT1 の mRNA 発現量と治験薬 perifosine の薬剤感受性について有意な負の相関が示された。Perifosine はアルキルリン脂質 AKT 阻害剤の一種であるが、その作用は多岐に渡り、詳細な作用機序は明らかでない。本研究では、perifosine が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すことを示した。さらに、TUFT1 の発現が比較的低い 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。

以上、本論文は機能未知であった TGF- $\beta$  の新規標的因子 TUFT1 に着目し、メンブレントラフィックおよび mTORC1 シグナル制御における新たな機能を見出した。また本研究では、治験薬 perifosine が TUFT1-RABGAP1 と関連したメンブレントラフィックに作用し、mTORC1 を直接阻害する可能性を示した。これらの知見は、生物学的にも臨床的にも重要な意義を見出したという点で評価でき、学位の授与に値すると考えられる。