

研究終了報告書

「mTORC1 活性動態の生物学的意義の解明」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：小松直貴

1. 研究のねらい

mTOR 複合体 1 (mechanistic target of Rapamycin complex1: mTORC1) は多くの入出力を担う細胞内シグナル伝達分子であり、癌や糖尿病、精神疾患といった幅広い疾患に関わっている。これまでに mTORC1 活性化の分子機構や mTORC1 と疾患との関連が活発に研究されており、病的な状態では mTORC1 の異常な活性上昇あるいは活性減少がおきていること、mTORC1 の活性をある一定のレベルに保つことが健康の維持において重要であることが分かってきた。しかしながら、そもそも mTORC1 の活性化が組織や細胞でどのように時間的に変化しているのか、実はほとんど分かっていない。また、組織や細胞が恒常性を保ちつつ適切に表現型を発現するためには、mTORC1 が司る複数の生理機能が協調的かつ選択的に制御される必要があると考えられる。しかしながら、そのように高度な情報処理がどのような原理に基づいて行われているのか、まだ分かっていない。

本研究では研究開始に先駆けて、mTORC1 の活性は細胞内で時間的にゆらいでいること、また細胞外からの刺激や変化によって異なる時間パターンのゆらぎが生じることを、予備的に見出していた。これらの結果から、「mTORC1 活性の強度に加えて活性ゆらぎの時間パターンに mTORC1 表現型を制御するための情報が埋め込まれている」という仮説を立てた。そこで本研究では、生細胞イメージングにより mTORC1 の活性動態と mTORC1 表現型の一つである細胞周期を同時に計測すること、さらに mTORC1 の活性化を光を用いて時間的に操作する系を開発し、それを利用して mTORC1 活性を操作した時の細胞周期を計測することにより、上述の仮説を検証することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

mTORC1 活性とその表現型の一つである細胞周期を生細胞内可視化するために、mTORC1 活性の蛍光プローブおよび細胞周期の蛍光プローブの安定発現用レンチウィルスベクターを構築した。さらに多色対応の蛍光顕微鏡システムのセットアップを行うことで、HeLa 細胞における mTORC1 活性と細胞周期を同時に可視化することに成功した。さらに細胞自動追尾・輝度定量のプログラムを開発し、mTORC1 活性と細胞周期を 1 細胞ごとに定量、時系列データを取得できるようになった。細胞周期プローブの輝度の時間変化を基に細胞周期の 4 つのフェーズ(G1,S,G2,M)を自動で推定するプログラムを開発し、それを用いて mTORC1 活性の時系列を細胞周期フェーズでラベルしたところ、各フェーズに特徴的な mTORC1 活性化(ゆらぎ)がおきていることを見出した。更に上述の解析パイプラインの駆使により多数(>100 細胞)の時系列データを収集し、機械学習を行うことで、細胞周期の各フェーズに特徴的な時間パターンを抽出した。mTOR 阻害剤を用いた検討により、G1 期

と S 期の進行には mTORC1 活性が必要な一方、G2 期と M 期は必要ではないことを見出した。すなわち mTORC1 は活性化の時間パターンを利用して G1 期と S 期の進行を制御している、という可能性が示された。数種類の培養細胞株についても計測を行い、細胞株ごとに活性ゆらぎの形状が異なるものの、細胞周期依存的な時間パターンが出現することを見出した。

mTORC1 活性を光で操作する系の開発に取り組んだ。青色光依存的にヘテロ 2 量体化するタンパク質ペアを利用して、mTORC1 の構成因子や mTORC1 周辺の活性制御因子を mTORC1 活性化場であるリソソーム膜上に光依存的に局在移行させる系を構築した。青色光のパルス照射により分子の局在を操作できるようになったが、引き続き mTORC1 活性の有意な上昇を計測するには至らなかった。

本研究を進めるにあたり、国内の複数の研究者と本研究で得られた結果について議論を行い、助言を得ることができた。

以上、ACT-X の支援により、mTORC1 活性ゆらぎに関する研究を本格始動し、大きな進展を得ることができた。

(2) 詳細

研究テーマ 1「mTORC1 活性と細胞周期の同時生細胞イメージング」

mTORC1 活性ゆらぎと下流の表現型との関係について理解するために、mTORC1 活性および mTORC1 表現型の一つである細胞周期について、生細胞イメージングを用いて計測を行った。計測を行うに先立ち、次の 3 つの準備を行った：

- ① mTORC1 直下のキナーゼである S6K の活性を可視化する FRET プローブ Eevee-S6K、細胞周期の蛍光プローブ Fucci(CA)および細胞核マーカー H2B-BFP を安定発現させるためのレンチウィルスベクターの構築およびプローブ発現培養細胞株の樹立
- ② 長時間観察が可能かつ多色対応の、電動蛍光顕微鏡システムのセットアップ
- ③ 顕微鏡画像から個々の細胞を自動追尾し、プローブの輝度定量を行う解析プログラムの作成

これらの実施により、培養細胞における mTORC1 活性と細胞周期を生細胞可視化し、さらに時系列変化を 1 細胞レベルで取得できるようになった。

続いて、mTORC1 と細胞周期との関係をより深掘りしていくために、細胞周期プローブの輝度変化から細胞周期の 4 つのフェーズ(G1,S,G2,M)を自動で推定するプログラムを開発した。プログラムを用いて mTORC1 活性の時系列を細胞周期フェーズで色分けしたところ、各フェーズに特徴的なゆらぎが起きていることを見出した。続いて細胞周期フェーズ依存的な活性化の時間パターンを多数の細胞から統計的に抽出することを試みた。細胞周期の推定プログラムを用いて、フェーズごとに 100 細胞以上の mTORC1 活性時系列を収集、機械学習による解析を行った。これにより細胞周期依存的な mTORC1 活性化の時間パターンを同定した。

同定した時間パターンは細胞周期の進行を促進している可能性がある。そこで、mTORC1 活性が細胞周期のどのフェーズの進行に必要なか調べるために、mTOR 阻害剤の添加により mTORC1 を急速に不活性化した時の細胞周期進行について、タイムラプスイメ

ーシングにより解析した。その結果、mTORC1 不活性化により G1 期と S 期が延長した。一方で、G2 期と M 期は延長しなかった。特に G1 期は顕著な延長を示した。興味深いことに延長する長さは細胞ごとにまちまちであり、幅広い分布を示した。以上の結果から、G1 期と S 期に出現する mTORC1 活性化の時間パターンが各細胞周期フェーズを促進している可能性が示唆された。

本研究で発見した、細胞周期依存的な mTORC1 活性のゆらぎは、HeLa 細胞以外の複数の細胞株でも観察された。細胞株ごとに細かい時間パターンが異なるものの、細胞周期フェーズごとに特徴的な時間パターンが出現する点で共通しており、細胞種間である程度保存された分子機構の存在が示唆される。

研究テーマ 2「mTORC1 活性を光で操作する方法の開発」

mTORC1 活性のゆらぎが実際に細胞周期の G1 期および S 期の進行を促進するか検証するにあたり、mTORC1 の活性を任意の時間パターンで操作するアプローチが有用である。一方で、mTORC1 を選択的かつ時間分解能良く活性操作できる系はまだ開発されていない。そこで mTORC1 の活性化を光で操作する系の開発に取り組んだ。これまでに、mTORC1 はリソソーム膜上で活性化すること、リソソーム膜上に mTORC1 の構成因子および活性制御因子が局在移行することで活性化すると報告されている。そこで青色光によりヘテロ 2 量体化するタンパク質ペア iLiD-sspB 等を用いて mTORC1 構成因子もしくは活性化因子をリソソーム膜上に局在移行させる系を遺伝子工学的に構築した。局在移行系を HeLa 細胞に発現させて青色光をパルス照射したところ、光依存的な分子の局在移行が観察された。一方で局在移行に引き続いて起こるはずの mTORC1 活性化は起きなかった。そこで使用する活性化因子の選択やタグの付加について見直しの実験検討を行った。現在までに、局在制御により mTORC1 活性化を誘導しうる候補について、目処が立ちつつある状況である。

研究テーマ 3「mTORC1 活性の光操作と細胞周期進行の計測」

mTORC1 活性の光操作系の開発が、研究期間中の成功には至らず、このため本テーマについては実施できなかった。

3. 今後の展開

今後は、本研究で構築した、mTORC1 活性と細胞周期を可視化するための多色生細胞イメージング系および時系列データ解析基盤の二つを最大限活用していくことで、細胞周期(細胞増殖)に留まらず、mTORC1 が関わる他の表現型と mTORC1 活性化のダイナミクスとの関係について、解明に取り組む。

(2-3 年以内) 現在進行中の mTORC1 活性ゆらぎと細胞周期に関する研究を、その因果関係の解明まで含めてさらに進展させ、成果を論文化する。

(4 年以内) mTORC1 活性の光操作系について開発を進め、成果を論文化する。

(6 年以内) 細胞周期以外の表現型の解明を目指し、その最初のステップとして、動物組織

および組織由来の細胞における mTORC1 活性の可視化に取り組む。表現型としては、細胞分化や恒常性維持(オートファジー)を想定している。

mTORC1 活性ダイナミクスに関する研究で得られる成果は、新しい作用機序に基づく新規治療法の開発に繋がることが期待される。そこで、6 年後程度までに得られる mTORC1 活性と複数の表現型との関係についての知見、および動物組織のイメージング系の両方を活用することで、以降は病態と mTORC1 活性の関係について、研究を進めていく。

(8-10 年以内) 動物組織のイメージング系および病態モデル動物の利用により、mTORC1 活性と疾患との関係を解明する。

(15 年以内) mTORC1 活性ゆらぎを操作することで、病気を治療できる可能性を動物レベルで実証する。

本研究の(および本研究の発展により今後得られる)成果が示唆するのは、「細胞があるタイミングである時間パターンの mTORC1 活性ゆらぎを受容することが、表現型発現において重要である」ということである。そこで、例えば複数の薬剤について各々の投薬スケジュールを変えて組み合わせることにより、mTORC1 阻害の強度と持続時間を制御するといった治療法を設計する。また、設計した治療法を動物モデルで検証する。検証にあたり、必要に応じて製薬企業等と連携する。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】本研究の実施により、mTORC1 活性を可視化・計測ための技術基盤を構築することができた。これにより mTORC1 活性の時間的なゆらぎ、および細胞周期との関係について、具体的に示すことができた。コロナ禍による所属機関の立ち入り制限の影響もあり、2020 年度前半は実験実施に大きな遅れが生じたものの、代わりに解析に必要なプログラム(特に細胞周期の推定プログラムや機械学習のプログラム)を集中的に開発できた。コロナ禍の影響はあったものの、当初計画した研究内容である、mTORC1 活性と細胞周期の可視化については、大きな変更なく遂行できた。

並行して、mTORC1 活性の光操作系の開発にも取り組んだ。実用的な系を期間内に開発することはできなかったが、得られた失敗データを基に専門家と議論し、助言を得られた。今後開発を進めるあたり、必要な基盤を構築できたと考える。

【研究の進め方】本研究の実施に必要な備品や資材及び試薬を、ACT-X 研究費の活用により揃えることができ、研究環境を改善することができた。具体的には、実験を自動化・省力化する備品を複数導入した。特にプラスミド DNA 自動精製装置の導入により遺伝子工学実験の省力化を図ることで、光操作系の構成因子の発現プラスミド群を多数構築できた。

【今後の見込み(波及効果)】細胞および組織における mTORC1 活性の時空間動態は、現在ほとんど分かっていない。本研究では mTORC1 直下のキナーゼである S6K の活性を可視



化する蛍光プローブと細胞周期プローブを使用することで、mTORC1 の活性が細胞周期依存的にゆらいでいることを発見した。今後、mTORC1 活性ゆらぎと細胞周期との因果関係について明らかにすることで、mTORC1 と細胞周期に関する、新しいインパクトのある成果が生まれると期待される。

現行の mTORC1 活性操作では、遺伝子ノックダウンや過剰発現、阻害剤が主流であり、mTORC1 活性化を時間的に任意のタイミングで選択的に操作することは難しい。mTORC1 活性化を光で時間分解能よく操作する系が開発できれば、未知の mTORC1 制御機構を解明する研究や mTORC1 活性と表現型との関係を組織・動物レベルで明らかにする研究で利用できる。これまでの mTORC1 研究では予想されない新しい成果を生み出す可能性があり、今後も開発を続ける必要がある。

最後に、本研究により取得した mTORC1 活性の時系列データは複雑で人間の目では正確な解釈が難しい一方、機械学習や統計解析との相性が良いと考えられる。表現型の時系列データと組み合わせることにより、例えば mTORC1 活性と表現型との関係をバイアスレスに推定するといった研究が実施できると考えられる。

【研究者としての個の確立に関して】本研究は、小松が大学院博士課程の頃より数年来構想を温めてきた研究計画に基づいている。発案当初は、研究材料や解析プログラムの準備が多数必要であったため、すぐには研究を開始できなかった。本領域の支援により、本格的に研究を始動し取り組むことができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】計 6 件 (うち代表的なもの 4 件を以下に記載)

1. Naoki Komatsu, Asako Sakae-Sawano, Atsushi Miyawaki. Unraveling mTORC1 activity dynamics and its biological roles in cell cycle progression. ASCB|EMBO 2019 Meeting(アメリカ、ワシントン D.C., 2019 年 12 月 7 日-11 日)(国際学会、ポスター 発表日:2019 年 12 月 10 日)

2. 小松 直貴 mTORC1 活性動態の細胞周期進行における生物学的意義の解明. 多次元細胞計測ワークショップ(日本、和光、2020 年 1 月 27,28 日)(国内学会、口頭 発表日:2020 年 1 月 28 日)

3. 小松 直貴 mTORC1 活性動態の細胞周期進行における生物学的意義の解明 第 73 回日本細胞生物学会大会(日本、Zoom、2021 年 6 月 29 日-7 月 2 日)(国内学会、口頭 発表日:2021 年 7 月 1 日)



4. Naoki Komatsu, Atsushi Miyawaki Visualization of cell cycle-dependent mTORC1 activity waves RIKEN CBS Online Retreat 2021(日本、Zoom、2022年2月25, 28日)(国内学会、ポスター 発表日:2022年2月28日)

【受賞】計1件

1. (受賞年月日): 2022年2月28日 (受賞者名):Naoki Komatsu (受賞名): CBS Director Poster Award Gold Prize (表彰団体名): RIKEN Center for Brain Science