

がん抑制タンパク質 TSC2 が抑制する mTOR 非依存的経路の解明

## ＜研究概要＞

*TSC1*、*TSC2* 遺伝子は、家族性腫瘍の一つである結節性硬化症 (TSC) の原因遺伝子として同定された癌抑制遺伝子ファミリーの一つであり、それぞれ hamartin (*TSC1*) と tuberin (*TSC2*) タンパク質をコードする。この疾患の特徴として、全身に良性の過誤腫を発症し、顔面や腎臓においては血管繊維腫がみられ、脳では皮質結節や上衣下結節などが形成され、その他にも、てんかんや精神発達の遅滞などの症状を呈する。Drosophila を用いた研究から、複合体を形成した *TSC1* と *TSC2* が ras ファミリーである Rheb を介し、インスリンシグナル経路内のタンパク質合成を司る mTOR を負に制御することを明らかにした。従って、TSC 患者の腫瘍部分に見られる巨大細胞 (giant cell) の原因がこの経路の制御不能に起因する事が明らかとなった。このことから、mTOR の活性抑制剤である rapamycin がモデル動物や患者へ試験的に投薬されたが、根本的改善には至らなかった。すなわち、この単一経路だけが、*TSC1* および *TSC2* によりコントロールされているのではない事が予想された。そのことから *TSC1* と *TSC2* は多様なシグナル系を制御するシグナル因子として機能する可能性が示唆された。先行研究から、変異体 *TSC2* が細胞遊走を制御する因子 (Rac1) を活性化する事が明らかとなっていることから、変異型 *TSC2* を用いる事で、いままで不明であった新たな *TSC2* の役割が明らかにできることが実証された。そこで、変異 *TSC2* に着目し、*TSC2* による Rac1 活性化および ROS 産生メカニズムを解析し mTOR 経路以外の新規 *TSC2* シグナル伝達経路を示す事で *TSC2* による新たな細胞内情報伝達経路を明らかにすることを目的に研究を進めた。

初年度では、患者由来の変異型 *TSC2* 複数より、従来の mTOR 非依存的に Rac1 活性を上昇させる変異体の同定を行った。またそのメカニズムについてリン酸化および、*TSC2*/Rac1 複合体形成から解析を行った。次年度では、*TSC2* が NADPH oxidase 活性を制御する因子であることに着目し、NADP<sup>+</sup>/NADPH 比への影響を解析し、この比率によって活性が制御されるペントースリン酸経路の律速酵素である、グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) への影響を解析した。さらに、Rac1 の下流因子である、JNK が制御する転写調節因子 AP-1 への影響を解析した。またビタミン D 核内受容体を介したビタミン D 代謝への影響の可能性を示す結果を得た。最終年度では、結節性硬化症モデルラットを用いた解析により、コーヒーが有効な腫瘍抑制食品因子として作用する可能性を示す結果を得た。また、天然有機化合物からインスリンシグナルを活性指標とした、スクリーニングの系を確立することに成功した。

これらの、結果は rapamycin と他の薬剤のコンビネーション投薬による TSC 患者の延命や治療の可能性を示すばかりではなく、TSC 患者にみられる自閉症、学習障害の解明にも寄与できると確信している。

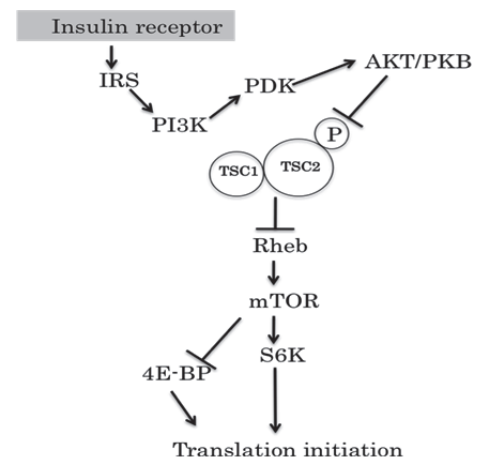
## 研究報告

### I 研究目的

結節性硬化症は、常染色体優性遺伝する全身性多系統疾患であり、その頻度は 10,000 ~6,000 人に一人の出生率と比較的頻度の高い遺伝性疾患であると報告されている。[4, 5]。さらに、本疾患の 60~70 パーセントは家族歴が無く、新しい突然変異による孤発例であり、高い自然突然変異率は父方及び母方の効果はなく、いわゆる刷り込みではないと考えられている。本疾患は、過誤腫病変が多臓器に出現するが、特異的臓器における特徴的所見が認められる。特に中枢神経病変においては、大脳皮質結節 (cortical tubers)、脳室上衣下結節 (subependymal nodules)、巨細胞性星細胞腫 (giant cell astrocytoma)、けいれん、精神発達停滞、てんかん発作などが挙げられる。また、顔面の血管線維腫も特徴的である。皮膚症状の中でも最も高頻度 (約 50%) に認められる特徴的皮疹で、特に鼻部から口唇周囲、顎部にかけて発生し増大する。さらに、腎病変においては嚢胞、血管筋脂肪腫が高頻度に認められる。腫大した腫瘍は出血や壊死を起こす事があり、腎血管筋脂肪腫の出血を伴う腎不全が、死亡原因として最も頻度が高い。従って、現在では、てんかん、精神発達の遅滞、血管線維腫が本疾患の 3 徴候として挙げられる。

本疾患の原因遺伝子の *TSC1*、*TSC2* は 1987 年に結節性硬化症の原因遺伝子がヒト染色体 9 番長腕 (9q34) に連鎖することが報告され (*TSC1*)、1997 年に単離、同定された [7]。その後、1992 年に 9q34 に連鎖が認められない 5 家族において、ヒト染色体 16 番短腕に連鎖が認められ (*TSC2*)、1993 年に単離、同定された。また、患者の腫瘍部分において、これら遺伝子のヘテロ接合性の欠損 (LOH)、両対の遺伝子の変異が確認されたことから、*TSC1*、*TSC2* 遺伝子が癌抑制遺伝子であることが認められた。

*TSC1*、*TSC2* 遺伝子の変異は細胞レベルにおいてサイズや周期、また遊走など、多くの影響を及ぼすことが報告されていることから、*TSC2* にコードされる tuberin (*TSC2*)、*TSC1* にコードされる hamartin (*TSC1*) が細胞内において多彩な働きをするのではないかと予想された。その一つの糸口として、近年の研究により、細胞内においてインスリンシグナルによって活性化される Akt が *TSC1* と複合体を形成する *TSC2* をリン酸化し、Rheb (Ras homolog enriched in brain) の Gase activating protein (GAP) として作用することでその下流因子である m-TOR (mammalian target of rapamycin) の活性を制御することが明らかとなった。従って、*TSC1* および *TSC2* が普段 Rheb の活性



を阻害することで細胞の大きさを調節しているが、結節性硬化症の患者は *TSC1*、*TSC2* の遺伝子に変異しているため、Rheb の活性を阻害できず、細胞の異常な肥大化を起こして過誤腫となると考えられる。しかし、上記に述べたような経路だけでは両遺伝子の変異により認められる他の異常については説明ができず、そのことから *TSC1* と *TSC2* はこれらの他にも生理活性機能を持つシグナル因子として作用する可能性が考えられた。*TSC1* はアミノ酸配列から膜貫通タンパク質であると当初予想されたが、我々の研究から、*TSC1* と *TSC2* ともに細胞膜画分のみならず、細胞質画分にも検出されたことから、これらタンパク質は細胞内局在性やその形態を変える事により、複数の機能を制御・発揮する多機能シグナル因子であると考えられた。さらに、*TSC2* がアクチンフィラメントを制御する因子として低分子量 G タンパク質である Rho ファミリーのひとつである、*Rac1* の活性を制御することを、*TSC* の患者の腫瘍から同定された変異型 *TSC2* を用いることで初めて明らかにした。加えて、*mTOR* の活性抑制剤である rapamycin を *TSC* モデル動物や患者へ試験的に投薬したが、根本的改善には至らなかった。すなわち、この *mTOR* 経路だけが、*TSC1* および *TSC2* によりコントロールされているのではない事が予想された。したがって、*TSC1* と *TSC2* は複数のシグナル系を制御する因子として機能する可能性が示唆され、複数の薬剤投与によるコンビネーション治療法の可能性が示唆された。そこで、*TSC2* により制御される新規経路を明らかにすることにより、治療の新たなターゲット因子を明らかにすることで、*TSC* およびてんかんや生活習慣病などのインスリンシグナル関連疾病の緩和を目指した新規治療法の可能性明らかにする事を目的に研究を行った。

当研究室における先行実験結果として、*Rac1* は変異体 *TSC2* と複合体を形成することで *Rac1* 活性を上昇させ、細胞遊走を誘導することが明らかとなっており、本研究では、*Rac1* の下流因子に着目しながら、あらたながん抑制タンパク質 ***TSC2*** が抑制する *mTOR* 非依存的経路の解明を目的に研究を行った。

## II 実験計画及び材料と方法

*TSC2* が制御する *mTOR* 非依存的な新規シグナル経路の探索：

変異体 *TSC2* が *Rac1* を活性化する先行結果を受けて、そのメカニズムの解明と、*Rac1* の下流因子が制御されるか否かについての解析を試みた。

### a) *Rac1* の制御メカニズム

患者から同定された変異体の中には、*mTOR* 活性を上昇させない変異体が報告されている。これらの変異体の中から、*Rac1* 活性を上昇させる変異体が同定できれば、*mTOR* 経路と独立して *Rac1* が *TSC2* によって制御されるモデルとしてその後の解析ができるもと考えた。はじめに、本疾患患者由来の腫瘍から同定された 13 種の変異型 *TSC2* をそれぞれ培養細胞内で強制発現させ、これらの細胞の *Rac1* 活性を EZ-Detect *Rac1* activation kit を用いた pull-down assay 法にて解析した。次に *mTOR* の活性がこの経路に関与するか否かを明らかにする目的で、rapamycin (*mTOR* 阻害剤)の *Rac1* 活性に及ぼす影響解析を行った。また、野生型 *TSC2* (WT) に比べ、共同研究先より供与された

TSC 患者の腫瘍から同定された複数の変異型 TSC2 で、Rac1 の活性の上昇が観察されたことから、TSC2 による Rac1 の活性制御メカニズムの解析の一端を明らかにする目的で、これらの TSC2 に共通のリン酸化修飾が行われているかについて解析を試みた。本実験系ではタンパク質のリン酸部位特異的に結合し、リン酸化の違いに SDS-PAGE 中の移動度が異なる Phos-tag (和光純薬) を用いた電気泳動法により解析を行った。

#### b) TSC2・Rac1 経路が転写活性に及ぼす影響解析

近年の研究により、Rac1 は細胞運動機構だけではなく、JNK カスケードや p38MAP キナーゼカスケードを介した転写因子の活性化やアポトーシスの誘導など遺伝子発現制御にも重要な役割を果たしていることが示されている。そこで、Cos-1 細胞に 2 種類の変異型 TSC2 (TSC2<sup>R611Q</sup>, TSC2<sup>Y1571H</sup>) を強制発現させ、EZ-Detect Rac1 activation kit を用い Rac1 活性が上昇することを確認した後、Rac1 シグナルの下流に位置する PAK (The p21-activated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinases), ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) の活性を特異的リン酸化抗体を用い解析した。

JNK は活性化されると AP-1 (activator protein1) 転写因子の活性化することで AP-1 依存的な転写を促進し、発癌、分化、アポトーシスなど多くの細胞プロセスに参与している。そこで、Cos-1 細胞に 2 種類の変異型 TSC2 (TSC2<sup>R611Q</sup>, TSC2<sup>Y1571H</sup>) を強制発現させ、活性化した JNK の核内移行を免疫染色法にて解析した。さらに、変異型 TSC2 により活性化した JNK が AP-1 の構成因子 c-Jun, c-Fos の活性を変化させるか否かを解析し、Luciferase Assay 法による AP-1 のプロモーター活性の解析を行った。

#### TSC2 が代謝に及ぼす影響解析 :

TSC2・Rac1 経路のシグナルが代謝に対してどのような影響を及ぼすかを検討することで、TSC2 の新たな制御経路の解明の一端に、さらに TSC の治療戦略の糸口になることが期待される。

##### (a) 核内受容体を介した代謝制御

TSC2 の C 末端には Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質である Calmodulin (CaM) 結合することがアミノ酸配列から予想されている。従って、TSC2 は活性型 CaM の標的タンパク質になり得ることが予想されるが、その詳細については不明であった。本研究では CaM が果たす TSC2 機能へ及ぼす影響について探った。そこで、細胞内の Ca<sup>2+</sup>を上昇させる条件下で TSC2 が細胞膜から、解離する結果をうけて、はじめに、CaM による細胞内局在性の変化の解析をした。さらにその結果から予想された、転写制御系に及ぼす影響解析を行った。また、TSC 患者由来の CaM 結合ドメインに変異のある変異 TSC2 を用い、解析を試みることで、これらの実験結果が生理的に重要である事を証明する事を試みた。一方、TSC2 のアミノ酸配列上に核内で転写を制御することが既に知られているエストロゲンレセプター  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) との結合領域やビタミン D レセプター (VDR) との結合領域が存在することが報告されている。そこで、TSC2 と CaM, ER $\alpha$ , VDR が核内で複合体を形成している可能性について HeLa 細胞の核画分を TSC2 抗体で免疫沈降して解析した。また、HeLa 細胞の mRNA を抽出し、qPCR 法を用いて VDR ターゲット遺伝子である CYP24 の転写活性を解析した。

## (b) 補酵素 NADP<sup>+</sup>/NADPH 比を介した代謝制御

一方で、変異型 TSC2 (TSC2<sup>R611Q</sup>) が mTORC1 のみならず Rac1 を活性化しその下流の、NADPH oxidase (NOX) を活性化する結果を受けて、TSC2<sup>R611Q</sup> が NOX 活性化に伴い、NADP<sup>+</sup>/NADPH 比率を変化させることで、これら因子を補酵素とする代謝系に影響を及ぼす可能性が示唆された。Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) は NADP<sup>+</sup> を補酵素とするペントースリン酸経路 (PPP) の律速酵素であり、NADP<sup>+</sup> 量に活性が依存することが知られていることから、本研究では TSC2<sup>R611Q</sup> を HepG2 細胞に一過性に発現させ、NADP<sup>+</sup>/NADPH 比を測定した。さらに G6PD の活性を測定し、PPP の亢進と連動するリボースの生合成を DNA 複製を指標に解析した。

### TSC 改善因子のスクリーニング：

TSC の症状を改善する食品因子や天然有機化合物の同定が可能となれば、その作用メカニズムから TSC2 がコントロールする mTOR 非依存的な経路の解明の足がかりとなるものと期待される。そこで、TSC モデル動物を用いた実験系および、インスリンシグナルを指標とした天然有機化合物のスクリーニング系による新規制御因子の探索を試みた。

#### (a) TSC モデル動物を用いた解析

Eker rat は、結節性硬化症の原因遺伝子である *TSC2* 遺伝子の片アレルが欠損しており原因は定かではないが、残りのアレルの *TSC2* 遺伝子が欠失することで、癌抑制機構が破上し、腫瘍を形成する。生後、5 週目頃から腎臓に変異が起き始め 1 年で両側の腎臓に癌が出来ることが知られており、それにより腎臓癌モデルラットとしても用いられる。TSC の病変発生の多くの場合には、体細胞変異による野生型アレルの不活性化による機能欠失 (LOH)、すなわち Knudson 博士の提唱する Two-hit 仮説が適用される。一方で、コーヒーは近年に疫学的調査により腎臓がんの発症リスクを軽減する食品因子であると報告されている。そこで、6 週齢の Wild type (WT) と Hetero type (HT) の雄性 Eker rat を用い、AIN-93G を給餌した Cont 群 (WT, HT)、1 % Coffee を添加した Coffee 群 (WT, HT)、1 % coffee (Non caffeine) を添加した Non caffeine 群 (WT, HT)、の計 6 群を自由摂食、自由給水で 100 日間飼育し、100 日目に 12 時間絶食後、屠殺したものを試料として用いた。Coffee が癌の腫瘍形成に及ぼす影響を解析する目的で、多くの癌細胞に対して癌抑制機能を有する P53 遺伝子に着目し、その遺伝子発現レベルを qRT-PCR にて測定した。その結果、WT に対して Hetero で有意な上昇が認められた。また、Coffee 添加により癌抑制遺伝子 p53 の遺伝子発現量が上昇した。次に腎臓における癌組織の組織学的解析を行った。

#### (b) In cell western 法によるスクリーニング解析

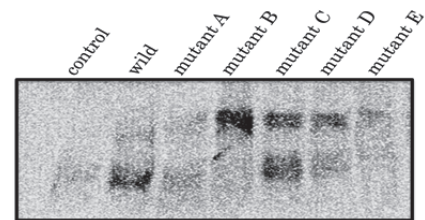
インスリンシグナル下流に位置する分子である S6 リボソームタンパク質 (以下 S6) のリン酸化状態 (p-S6) を標的とし NIH-3T3 細胞 (マウス線維芽細胞) を用いて行った in cell western 法によるインスリンシグナルを制御する化合物の効率的にスクリーニ

ングを試みた。インスリン(-)、インスリン(+)(100nM)、阻害剤 LY294002(以下 LY)(15  $\mu$ M)の3つの条件でP-S6/S6値を測定した。天然化合物約150種類(東京理科大学 菅原二三男教授より供与)を最終濃度10  $\mu$ Mになるように培地に添加後、90分間培養した。その後インスリンを100nMになるよう添加し、20分間反応させた後、ICWに供した。インスリンシグナルを抑制する12種類の化合物について、化合物のインスリンシグナルにおける作用機序を明らかにする目的で、特に重要と考えられるインスリンシグナル構成タンパク質のリン酸化の検出を指標に解析を行った。

## II 研究成果

*TSC2* が制御する *mTOR* 非依存的な新規シグナル経路の探索：

\_\_野生型 *TSC2* (WT) に比べ、複数の変異型 *TSC2* (G62E、T1075I、P1292A) で、*Rac1* の活性の上昇が観察される変異型 *TSC2* の同定に成功した。これら、変異型の *Rac1* 活性への rapamycin 添加の効果を解析したところ、*Rac1* 活性に及ぼす影響について解析したところ、変異型 *TSC2* (G62E) では、rapamycin の添加による *Rac1* 活性の影響は観察されなかった。従って、変異型 *TSC2* (G62E) は、*mTOR* 経路から独立し *Rac1* 活性をコントロールしているものと推察された。次に、*TSC2* のリン酸化の変化と *Rac1* 活性の制御との間に関連性があるか否かを Phos-tag 法により検証した結果、変異型 *TSC2* によるリン酸化パターンの違いが見いだされた(左図)。また、Phos-tag 法を用いた解析により異なるリン酸化修飾を受けている可能性が考えられたため、任意に *TSC2* リン酸化部位に変異を導入した *TSC2* 変異体を数種作製した。これらの成果はリン酸化パターンの変動が *TSC2* 活性の重要な要因であることを示すものであり、今後リン酸化部位の同定の足がかりとなる。ことから変異型 *TSC2* が *mTOR* を介さずに *Rac1* を活性化する経路においては、*TSC2* のリン酸化が関与する可能性が示唆された。



また、*Rac1* の活性化は下流因子である ERK および JNK への影響を解析した結果、JNK が変異体 *TSC2* の導入により活性化し、JNK の下流の AP-1 の構成因子 c-Jun, c-Fos が活性化していた。従って、変異型 *TSC2* が AP-1 による転写制御に影響を及ぼしている可能性が示唆されたことからプロモータアッセイ法により解析した結果、変異型 *TSC2* により AP-1 プロモーターが活性化していた。さらに興味深いことにこの現象は野生型 *TSC2* でも観察され、*TSC2* 濃度依存的であったことから、*TSC2* の存在量がシグナル因子として作用する可能性が示された。

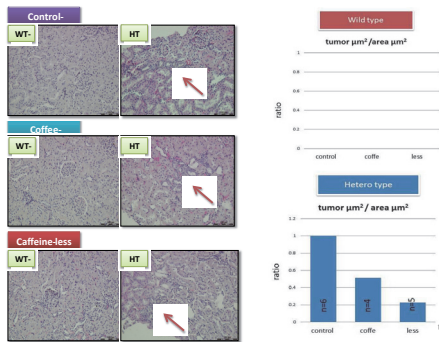
*TSC2* が代謝に及ぼす影響解析：

変異型 *TSC2* 発現細胞で Ros の産生が有意に上昇し NOX の阻害剤である Apocynin 添加により ROS 産生が阻害されたことから変異型 *TSC2* は NOX を介して ROS を産生することを見いだした。また、NOX 活性に伴う NADP<sup>+</sup>/NADPH 比の変動が NADP<sup>+</sup>を補酵素とする G6PD 活性に影響するか否かについて解析したところ、変異型 *TSC2* は G6PD の活性を有

意に増加させた。さらに、PPP の律速酵素である G6PD 活性が上昇した事から、リボース生成量が増加しているものと推察されたことから、細胞増殖を指標に検討した。その結果、DNA 合成が増加していることを見いだした。これらの成果は、がん細胞の成長に共通する DNA 合成の活性化が必須であることと一致し、TSC のみならず多くのがん細胞の治療法の一助となるものと期待される。

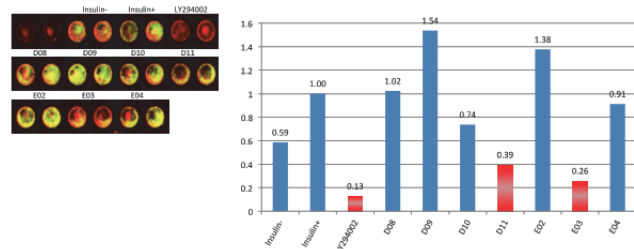
### TSC 改善因子のスクリーニング：

TSC モデルラット (Eker rat) の腎臓の病理組織学的解析を試みたところ、WT ではいずれの群でも病変は観察されなかったが、HT では癌細胞が観察された。癌細胞の面積比を検討した結果、HT の Cont 群に対し、coffee 群 coffee (Non caffeine) 群で、顕著な腫瘍面積の低下が観察された。P53 遺伝子発現解析および病理組織学的所見とあわせ、Coffee が腎臓における癌形成を抑制している事が考えられた (左図)。



一方で、筋肉における脂質代謝が亢進しており、コーヒー接種により、正常値まで低下していることから、臓器特異的な TSC2 のシグナルが存在する可能性が示された。また、肝臓においては、生化学的解析結果からインスリン抵抗性を示している可能性を示す結果が得られた。当研究室では、代謝改善の可能性を探る目的で、低炭水化物ダイエットの有効性について検証しており、肝臓で脱アセチル化酵素の活性が上昇している結果から考察して、TSC2 がケトン体合成を促進することで細胞内でのタンパク質アセチル化をコントロールする可能性も考えられ、新たな制御機構の可能性が考察された。

また、インスリンシグナルを制御する新たな有機化合物の探索を目的に研究を展開したところ、共同研究先から供与された、サンプルの中から、いくつかのインスリンシグナルを抑制する有効な化合物を同定するに至った (右図赤棒グラフ)。これらの化合物の中には TSC2 の機能を直接制御する可能性を示す可能性のあるものも含まれており、今後詳細に検討することで、あらたながん抑制薬剤の開発の一助になるものと期待される。



### III 考察

本実験課題の遂行により、mTOR 活性に制御されない、Rac1 活性を上昇させる変異型 TSC2 を見だし、TSC における新たながん発症メカニズムが明らかになることができた。Rac1 が細胞遊走と深く関わる因子であることから TSC の細胞が転移性のある細胞



である可能性を示すことができた。女性の結節性硬化症患者の34~42%に、異常な平滑筋様細胞（LAM細胞）が、肺を中心としてリンパ節、腎臓（血管筋脂肪腫）、などで増殖する疾患肺リンパ脈管筋腫症 Lymphangiomyomatosis (LAM)を合併症として引き起こすことが知られている。LAMは単独で発生する孤発性LAM (sporadic LAM) と、結節性硬化症と伴って発生する TSC-LAM の2種類が存在する。また、sporadic LAM患者のLAM細胞における肺血管筋脂肪腫においても、TSC2遺伝子の変異が確認されている。また興味深いことに、LAM患者で肺移植の後に再びLAMを発症したとの報告があり、レシピエント細胞がドナーの肺に転移したとの考えが提唱されている。また、TSC2遺伝子の変異により、神経細胞の遊走にも影響が報告されていることからTSC2が細胞遊走を制御する可能性が示唆されている。また、これらの機能はTSC2のリン酸化パターンの違いである可能性が示されたことから、Rac1活性の制御はリン酸化制御によりコントロールされるものと推察された。今後、リン酸化パターンの重要性について解析を加えることで、さらに詳細な分子メカニズムが解明できるものとする。さらに、Rac1の下流因子への影響を解析した結果、TSC2が遺伝子発現制御にも関わることを明らかにした。Rac1がNOXを介してこれらの生理機能を発揮することが予想されたため、NOXの阻害剤や、活性酸素種(ROS)産生を抑制する抗酸化能を有する薬剤、食品成分の有効性の可能性が示唆された。

さらに代謝酵素の活性との関連性についても検討し、ビタミンDシグナルとのクロストークを見いだした（投稿準備中）。ビタミンDが近年、がん抑制因子としての作用を示すことが数多く報告されていることから、新たながん抑制メカニズムを提唱できるとともに、TSC患者へのrapamycinとビタミンD抗酸化剤などの他の薬剤のコンビネーション投薬によるTSC患者の延命や治療の可能性を示すばかりではなく、TSC患者にみられる自閉症、学習障害の解明にも寄与できると確信している。

また、遺伝的素因と環境素因が癌発症に及ぼす影響についてモデル動物を用い解析を行った。その結果、遺伝的素因のみならず代謝に影響を及ぼすことで、細胞が癌化する可能性が示唆された。従って、TSC2が代謝経路を改変することで、細胞のがん化が進行することが予想され、食品成分によるがん抑制の可能性への一歩になることが期待される。特に今回のラットを用いた実験結果から、食事因子(coffee)摂取で改善できる可能性も示唆された。

以上より、癌形成には遺伝的素因と環境的素因の相互に影響し合い、代謝が変動することを実験的に明らかにできたものとする。また、これまでの疫学的調査主体の追求から提唱されてきたCoffeeの癌抑制機能について新たな科学的アプローチによりその有効性を示す糸口ができたものとする。これらの成果から、新しいシグナル経路の発掘と、代謝に影響を及ぼす可能性を示すことができ、Warburg説に基づく、がん細胞特異的な代謝経路の他についての新しいメカニズムが提唱できるものとする。

## V 研究成果の発表

- 1) Yasutomi Kamei, Takayoshi Suganami, Sayaka Kanai, Koji Hayashi, **Yuji Yamamoto**, Shinji Miura, Osamu Ezaki, Masaki Okano, Yoshihiro Ogawa  
Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice overexpressing Dnmt3a *Obesity* **18** (2)314-321 (2010)
- 2) Hirofumi Inoue, Takumi Uyama, Junko Hayashi, Akito Watanabe, Ken-Ichi Kobayashi, Tadahiro Tadokoro, **Yuji Yamamoto**  
N-formyl-3, 4-methylenedioxy-benzylidene- $\gamma$ -butyrolactam, KNK437 induces caspase-3 activation through inhibiting the mTORC1 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **395** 56-60 (2010)
- 3) Erina Inoue, Aoi Yamashita, Hirofumi Inoue, Mariko Sekiguchi, Asuka Shiratori, **Yuji Yamamoto**, Tadahiro Tadokoro, Yoshiko Ishimi, and Jun Yamauchi  
Identification of glucose transporter 4 knockdown dependent transcriptional activation element on the retinol binding protein 4 gene promoter and requirement of the 20 s proteasome subunit for transcriptional activity *J. Biol. Chem.* **285** (33) 25545-25553 (2010)
- 4) Makoto Hagiwara, Hiroto Shinomiya, Masakuni Kashihara, Ken-Ichi Kobayashi, Tadahiro Tadokoro, and **Yuji Yamamoto**  
Interaction of activated Rab5 with actin-bundling proteins, L- and T-plastin and its relevance to endocytic functions in mammalian cells *Biophysical Research Communication* **407** 615-619 (2011)
- 5) Kazuhiro YAMADA, Nozomi MAEDA, Junko NOGUCHI, Hideaki YAMADA, Emi MORINAGA, Hitomi YATAKE, **Yuji YAMAMOTO**, Tadahiro TADOKORO, and Tetsunori KAWATA  
Influences of maternal B<sub>12</sub> and methionine intake during gestation and lactation on testicular development of offspring in rats. *JNSV*(2013)(in press)
- 6) Kazami M., Inoue H., Suzuki T., Kobayashi K., Matsui Y., **Yamamoto Y.** TSC2 regulates the vitamin D mediated CYP27 gene expression (in preparation for resubmission)
- 7) Aizawa Y., Shirai Y., Kazami M., Inoue Ketogenic synthesis and glycogenesis is enhanced in TSC2 model rat (Eker rat) H., Suzuki T., Kobayashi K., Matsui Y., **Yamamoto Y.** (in preparation)
- 8) Suzuki T., Kobayashi K., Matsui Y., **Yamamoto Y.** TSC2 controls the AP-1mediated gene expression through Rac1 activation. (in preparation)
- 9) Honma D., Fukuchi M., Suzuki T., Kobayashi K., Matsui Y., **Yamamoto Y.** TSC2 controls the Pentose phosphate pathway *via* Rac1 activity

(in preparation)

10) Tanaka Y., Suzuki T., Kobayashi K., Matsui Y., **Yamamoto Y.** Molecular screening by in cell western that regulates the TSC2 expression. (in preparation)