

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14826

研究課題名（和文）オルニチンにより仲介される新規アミノ酸シグナル経路の同定

研究課題名（英文）Identification of novel amino acid signaling pathways mediated by ornithine

研究代表者

西 宏起（NISHI, Hiroki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：90845653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：オルニチンを共有結合させたビーズの作製に成功し、十分な収量が得られた。それと、ラット肝がん由来H4IIE細胞の細胞抽出液を混合し、質量分析に供することで、オルニチン特異的に結合する複数のタンパク質の取得に成功した。H4IIE細胞を用いたそれらのタンパク質の機能解析は現在鋭意進行中である。

一方で低タンパク食給餌したキイロショウジョウバエにおける脂質蓄積の解析については、原因不明ながら研究途中で実験系の再現性が不安定になってしまったため、現在その原因を究明するとともに実験系の再構築を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物個体や細胞がアミノ酸の有無に応じて様々な代謝応答を示すことは広く知られている。しかし細胞が具体的にどのような仕組みでアミノ酸に反応しているのかは一部の例を除き大部分が不明である。本研究成果は、細胞がアミノ酸を認識する過程でその代謝産物の一種であるオルニチンをシグナル仲介因子として利用するという仮説の下、そのシグナルの伝達に関わるタンパク質の同定に成功した点で、仮説証明に向けた大きな一歩である。この成果はアミノ酸による代謝制御の詳細な分子メカニズム解明の礎となり、日々の食を介した人々の健康増進に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：I have succeeded in generating the sufficient amount of ornithine-conjugated beads. Then, mixing them with the lysate of H4IIE rat hepatoma cells and analyzing the pulled-down proteins by LC-MS, I have succeeded in obtaining several proteins which specifically bind to ornithine. Experiments to define the physiological function of the obtained proteins in the amino acid signal transduction are currently in progress using H4IIE cells. Regarding the analyses on neutral lipid accumulation in *Drosophila melanogaster* that is fed a low-protein diet, the experimental reproducibility has suddenly become lower for unknown reason. Thus, I have been trying to overcome the problem and simultaneously to re-design the assay method.

研究分野：代謝栄養学

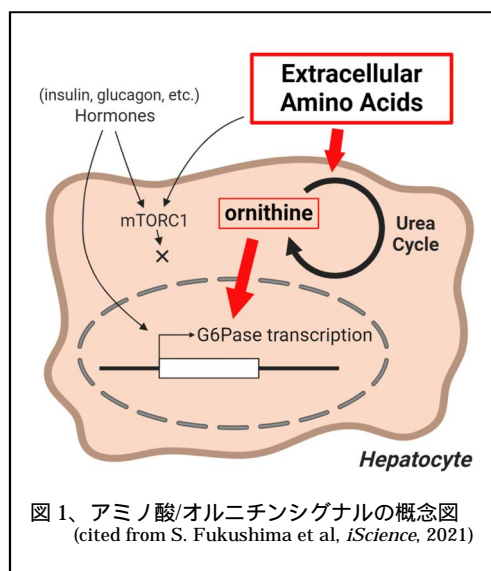
キーワード：アミノ酸 オルニチン アミノ酸シグナル 栄養シグナル 肝細胞 脂質代謝 代謝制御 栄養センシング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、タンパク質栄養状態を悪化させたラットにおいて種々の物質代謝が変化することを見出し、その分子メカニズムの解明を進めてきた。その過程で、タンパク質/アミノ酸の栄養状態が肝臓の尿素回路に大きな影響を及ぼし、オルニチンをはじめとする中間代謝物の量が増減すること、さらにオルニチン自体に糖新生活活性や中性脂質蓄積量など種々の物質代謝を調節する生理活性があることを発見した。その他の結果もあわせて、申請者らは「アミノ酸は内分泌系・神経系とは独立して細胞自律的に物質代謝調節を誘導するシグナル様活性を有している(アミノ酸シグナル)」、「オルニチンは生理活性物質として物質代謝を調節する作用を有しており、アミノ酸シグナル(の少なくとも一部)を仲介するシグナル分子として機能している」という仮説を構築するに至っている。

現在アミノ酸シグナルを仲介する因子はほとんど明らかになっていないが、その中でも target of rapamycin complex (TORC) 1 や general control nonderepressible (GCN) 2 がアミノ酸濃度に応じて活性調節されるキナーゼとして知られている [D. Sabatini, *PNAS*, 2017; M. Kilberg et al., *Trends Endocrinol Metab*, 2009]。これら既知の因子は、酵母、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類などほとんどの動物種で共通に保存されており、この事実はアミノ酸シグナル経路の普遍的な重要性を示唆している [L. Chantranupong et al., *Cell*, 2015]。しかし興味深いことに、これらの因子の阻害剤処理や発現抑制をしてもアミノ酸・オルニチン添加に応答した表現型には影響が認められなかったことから、申請者らが見出したオルニチンを介するアミノ酸シグナル経路はこれらの既知の経路とは独立した未知の経路を形成している可能性が示されている(図1) [S. Fukushima and H. Nishi et al., *iScience*, 2021]。



## 2. 研究の目的

したがって本研究の目的は、「オルニチンを起点としたシグナル経路を解明することを目指し、細胞内外のオルニチン量をモニターする分子およびその情報を伝達して代謝調節を誘導するシグナル分子を探索・同定すること」である。そしてそれを明らかにすることで最終的に mTORC1 や GCN2 に非依存的な新規のアミノ酸シグナル経路を解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究の目的達成のためには未知のシグナル伝達因子を網羅的に探索する必要があるため、プロテオームレベル(H4IIE細胞)、ゲノムレベル(キロショウジョウバエ)の二通りの方向からオルニチン応答性のシグナル伝達分子をスクリーニングすることを試みた。

### (1) H4IIE細胞破碎液中のオルニチン結合タンパク質の探索

オルニチンを共有結合させたビーズを作製し、そのビーズをラット肝がん細胞由来 H4IIE 細胞の細胞破碎液と混合した後、遠心分離によりビーズを回収することでオルニチン結合タンパク質をプルダウンした。得られたサンプルを質量分析に供し、オルニチン結合タンパク質候補が複数同定された。得られた候補タンパク質の中からシグナルタンパク質または転写因子類に優先的に着目して、H4IIE細胞で発現抑制もしくは過剰発現するなどの定法により H4IIE細胞の物質代謝への影響を解析した。

### (2) キロショウジョウバエモデルを用いたオルニチン応答タンパク質の探索

低タンパク食給餌したラットでは脂肪肝が観察されるが、キロショウジョウバエでも同様に低タンパク食に応答して中性脂質の蓄積が観察されることが知られている [H. Nishi et al., *Sci Rep*, 2018; N. Agrawal et al., *Cell Metab*, 2016]。そこでこのモデルを用いて、低タンパク食給餌したショウジョウバエの脂質蓄積誘導に必須の遺伝子の遺伝学的スクリーニングを試みた。

## 4. 研究成果

### (1) H4IIE細胞破碎液中のオルニチン結合タンパク質の探索

上記の方法により H4IIE 細胞破碎液の中からオルニチンに結合するタンパク質を複数同定することに成功した。同時に作製したオルニチンと分子構造のよく似たシトルリンを共有結合させたビーズ、および何も共有結合させなかったビーズも用いてオルニチン結合ビーズと同様の実験を行い、得られたタンパク質同士を比較することでオルニチン特異的に結合すると考えられるタンパク質を絞り込み、複数のオルニチン結合タンパク質を得た。未発表データのため具体名は差し控えるが、得られたいくつかのタンパク質を H4IIE 細胞において発現抑制したところ、オルニチン刺激に応答した特定の RNA 代謝の変化が抑制されることが確認された。

当初の研究計画では研究代表者がすでに報告した糖新生酵素 (G6Pase) [S. Fukushima and H. Nishi et al, *iScience*, 2021] のオルニチンに応答した転写調節に関わるタンパク質を探索する目的で実験を進めていたが、現在までにそのプロセスに決定的に関与するものはまだ見つからない。一方でそれとは別の実験系から H4IIE 細胞のオルニチン刺激に応じた RNA 代謝制御に関わるタンパク質が明らかになってきたため、本研究の目的である「オルニチンを起点としたシグナル経路の解明」に関してはその達成に向け大きく前進した。

#### (2) キイロショウジョウバエモデルを用いたオルニチン応答タンパク質の探索

上述のようにショウジョウバエに低タンパク食を給餌すると中性脂質が蓄積することが報告されており、実際に研究代表者が行った実験においても本課題申請当初は同様の表現型が観察されていた。したがって研究開始当時はこの実験系をもとにして、RNAi スクリーニング系の設計を進めていた。しかしその途中で予期せず、低タンパク食給餌に応じた脂質蓄積の表現型の再現性が不安定になってしまった。そのままでは遺伝学的スクリーニングに適用はできないと判断し計画を一時中断した。未だ原因は不明なため、現在はその原因の特定を急ぐとともに、新しい実験系の確立も含めて研究計画の再構築を至急進めている。

(2) の計画については予期せぬ問題によりやむなく中断してしまったものの、(1) の実験ではオルニチン依存性シグナル伝達経路の一部を明らかにすることに成功した。この経路も mTORC1 非依存性であることが確認されていることから、本研究課題の目指していた“既知のシグナル経路とは独立した新規のアミノ酸シグナル経路を解明する”という目的の一部は達成された。一方で、本研究課題期間中には上記シグナル経路の全体、およびその生理的意義の完全な解明には至っていない。今後は本研究成果を足掛かりとしてオルニチン依存性シグナル伝達経路の全容解明が急務である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroki Nishi, Kaito Uchida, Maki Saito, Daisuke Yamanaka, Haruka Nagata, Hinako Tomoshige, Ichiro Miyata, Koichi Ito, Yuka Toyoshima, Shin-Ichiro Takahashi, Fumihiko Hakuno and Asako Takenaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential Amino Acid Intake Is Required for Sustaining Serum Insulin-like Growth Factor-I Levels but Is Not Necessarily Needed for Body Growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11091523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西宏起、高橋伸一郎、伯野史彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 一般財団法人 バイオインダストリー協会	5. 総ページ数 2
3. 書名 Bioscience and Industry	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Method for regulation of lipid metabolism in liver	発明者 伯野史彦、高橋伸一郎、西宏起、中西瀨名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P230047US00	取得年 2023年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------