

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23651233
 研究課題名（和文） 活性依存型阻害剤をプローブとしたシグナル伝達因子の細胞内活性評価法の開発
 研究課題名（英文） Development of an activity quantitation method for signal transduction factors in living cells using inhibitors as probes
 研究代表者
 前田 達哉 (MAEDA TATSUYA)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
 研究者番号：90280627

研究成果の概要（和文）：シグナル伝達因子を標的とし、標的因子が活性化されてその触媒残基の反応性が高い状態にある場合に限り共有結合する活性依存型阻害剤に対する反応性を、シグナル伝達因子の活性化状態の指標として用いる方法論を検討した。阻害剤による修飾の検出には、阻害剤をハプテンとして作製した特異抗体を用いたウエスタン法を活用した。TOR 経路と酵母 Rim101 経路をモデルに、3 種類の活性依存型阻害剤を用い、方法論の有効性を確認した。

研究成果の概要（英文）：Some inhibitors for signal transduction factors covalently attach to the target catalytic residues in their targets only when the targets are activated and the reactivity of the catalytic residues become high. A methodology was developed that exploits this reactivity as an activity quantitation method for signal transduction factors. To detect covalent modifications by inhibitors, western blotting using antibodies raised against the modification groups as haptens was used. To evaluate the methodology, three inhibitors targeting the TOR pathway or the yeast Rim101 pathway were tested.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：活性依存型阻害剤、mTOR、カルパイン、ワートマニン、TPCK、E-64-d、抗ハプテン抗体

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達系は、細胞が刺激や環境に対して適切に応答する上で重要な役割を果たしている。受容体やセンサーの活性化から細胞応答の惹起にいたる経路には、種々のシグナル伝達因子が機能する。シグナル伝達系の研究においては、シグナル伝達因子が同定され経路の構築が明らかになった後には、これら因子が刺激に応答してどのように活性化されるかを明らかにする必要があるが、*in vivo* でその過程を追跡することは容易ではない。

シグナル伝達系の研究に特異的阻害剤が果たしてきた役割は大きい。特に、細胞透過

性を備えた阻害剤を用いることで、特定のシグナル伝達因子を阻害することによる効果を細胞レベルで簡便に検討することができる。阻害剤を用いた研究の利点としては、ノックアウトやノックダウン実験に比して、望んだタイミングで迅速に活性を阻害することが可能であることが挙げられる。阻害剤の内には、標的因子に不可逆的に共有結合して阻害活性を示す化合物がある。中でも、標的因子が活性化され、その触媒残基の反応性が高い状態にある場合に限り反応するような阻害剤も多い。

2. 研究の目的

本課題では、そのような活性依存型阻害剤に対する反応性を、シグナル伝達因子の活性化状態の指標として用いることを検討した。阻害剤による修飾の検出には阻害剤をハプテンとして作製した特異抗体を用い、ウエスタン法により修飾を定量的に評価した。また、免疫染色法により細胞内における活性化の場を明らかにすることも可能である。

具体的には、申請者がこれまで研究してきた、栄養応答性 TOR 経路と酵母アルカリ環境応答性 Rim101 経路をモデルに、3種類の活性依存型阻害剤を用い、標的因子が既知の場合と未知の場合のそれぞれに対して上記の方法論の有効性を確認した。

本研究で目指す方法論は、活性依存型阻害剤が存在する全ての経路に適用可能な汎用性を持つ。阻害剤の持つメリットを活かしつつ、生きた細胞におけるシグナル伝達因子の活性化機構や活性化の場を明らかにするための有力なツールとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 阻害剤をハプテンとして作製した抗体の精製と評価

TOR を含む PI3 キナーゼ関連キナーゼの活性に依存して活性中心のリジン残基を修飾するワートマニン、活性化されたヒスチジン残基を主に修飾するアルキル化剤で、TOR 経路の活性を抑制する TPCK、システインプロテアーゼの活性に依存して活性中心のシステイン残基を修飾する E-64-c (細胞透過性の前駆体である E-64-d) の修飾基をハプテンとした抗体を作製する。抗体の特異性をポジティブコントロールを用いて評価する。特異性が不十分である場合には、同じハプテンを担体に用いて抗体をアフィニティー精製する。

(2) 阻害剤濃度と処理時間の最適化

HEK293 細胞もしくは酵母細胞を用い、標的分子の活性を阻害するのに必要な阻害剤の濃度と必要な処理時間を決定する。

(3) TPCK 標的分子の同定

TPCK 処理した細胞から穏和な条件で TOR、もしくは TOR 経路の既知の上流因子を免疫沈降することにより共沈されてくる標品から、抗 TPCK 抗体と反応するタンパク質をウエスタン法で検出する。これらの方法で検出されたタンパク質が何であるのか、分子量から候補が推定できる場合については、そのタンパク質に対する抗体もしくは cDNA を得て確認する。また、分子量から候補が推定できない場合には、抗 TPCK 抗体を用いた免疫沈降法により TPCK 化されたタンパク質の標品を得て、質量分析計を用いたマス・フィンガーブ

プリント法により同定する。

(4) 本法を用いたシグナル伝達因子の活性制御機構の解析

シグナル伝達因子の活性化状態を阻害剤による修飾の程度を指標に比較する。いずれの場合も、経路活性化と阻害剤による修飾の程度の間に関連があるようであれば、その標的因子自体の活性化が経路活性化の分子基盤であると結論できる。

TOR 経路に関しては、TOR が十分に活性化される血清含有 DMEM 培地と、TOR が完全に阻害されるアミノ酸枯渇培地に置いた細胞をワートマニン処理し、そこから抗 TOR 抗体を用いた免疫沈降法により TOR を回収し、抗ワートマニン抗体を用いたウエスタン法によりワートマニン修飾を検出する。もしくは、同様な細胞を TPCK 処理し、TPCK 標的因子を免疫沈降法により回収し、抗 TPCK 抗体を用いたウエスタン法により TPCK 修飾を検出する。

酵母 Rim101 経路に関しては、Rim13 が活性化されるアルカリ性培地と、活性が阻害される酸性培地で培養した酵母細胞から、Rim13 に付加したエピトープタグに対する免疫沈降法により Rim13 を回収し、抗 E-64-c 抗体を用いたウエスタン法により E-64-c 修飾を検出する。

4. 研究成果

(1) 栄養応答性 TOR 経路において TOR 自体を標的とするワートマニン、TOR 活性化機構の未同定因子を標的とする TPCK、酵母アルカリ環境応答性 Rim101 経路においてプロテアーゼ Rim13 を標的とする E-64-d という 3種類の活性依存型阻害剤に対し、その修飾基をハプテンとした抗体を作製した。各々の抗体を用いた解析の結果を順に以下に述べる。

(2) 抗ワートマニン抗体は、HEK293 細胞を用いた実験において、内在性 mTOR のワートマニン化をウエスタン法により検出することが可能な力価と特異性を備えていた。そこで、ワートマニン処理条件の最適化を行った後に、mTOR に対するワートマニンの反応性が培地中のアミノ酸栄養の有無により変化するかどうかをこの抗体を用いて調べたところ、mTORC1 活性が低下することが確認されたアミノ酸飢餓条件下においても、反応性の低下は認められなかった。このことは、mTORC1 活性が mTOR 自体のキナーゼ触媒活性とは別のレベルで制御されていることを示唆している。これは、mTORC1 活性が、Rag 複合体を介したリソソーム膜上へのリクルートにより活性化されるとするモデルを支持する結果である。

(3) 抗 TPCK 抗体は、哺乳類培養細胞を用いた実験において、ウエスタン法により複数の内在性タンパク質の TPCK 化を検出することができた。これらの TPCK 化タンパク質には、raptor、ricator、mLst8、mSin1 などの mTOR 複合体構成因子は含まれていなかったが、mTOR が TPCK 化されることを見出した。TPCK 化される残基を mTOR 上に 2 箇所同定したが、これらの残基に変異を導入した変異体 mTOR も TPCK 耐性を示さなかったため、これらの修飾の意義は不明である。

(4) 抗 E-64-c 抗体は、ハプテンを抗原とした ELISA では十分な力価と特異性を備えていたが、E-64-c 化したパパインをウエスタン法により検出することができなかった。E64 化された種々の基質に対する反応性を検討した結果、ペプチド内のシステイン残基が修飾された抗原に対する力価が低いことが明らかになり、修飾プロテアーゼの検出のためにはペプチド性の抗原を用いて抗体を作製する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Héricourt F, Chefdor F, Bertheau L, Tanigawa M, Maeda T, Guirimand G, Courdavault V, Larcher M, Depierreux C, Bénédicti H, Morabito D, Brignolas F, Carpin S, Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a Populus multistep phosphorelay, *Physiol Plant.*, 査読有、2013、(印刷中)

DOI : 10.1111/pp1.12024

(2) 高原照直、前田達哉、ストレス刺激に応答した TOR 複合体 1 (TORC1) の活性制御機構、*生化学*、査読有、Vol. 85、2013、pp. 205-213

(3) Tanigawa M, Kihara A, Terashima M, Takahara T, Maeda T, Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway, *Mol. Cell. Biol.*、査読有、Vol. 32、2012、pp. 2861-2870
DOI: 10.1128/MCB.06111-11

(4) Takahara T, Maeda T, TORC1 of fission yeast is rapamycin-sensitive, *Genes to Cells*、査読有、Vol. 17、2012、pp. 698-708
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01618.x

(5) Takahara T, Maeda T, Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress, *Mol. Cell*、査読有、Vol. 47、2012、pp. 242-252
DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.019

(6) Maeda T, The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi, *FEBS Journal*、査読有、Vol. 279、2012、pp. 1407-1413
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08548.x

(7) 前田達哉、mTORシグナルの分子メカニズムと生理的役割、*Jpn. J. Antibiotics*、査読無、Vol. 65 Suppl. A、2012、101-105

(8) Takahara T, Maeda T, Stress granules: The last refuge of TORC1?, *Cell Cycle*、査読無、Vol. 11、2012、pp. 3707-3708
DOI: 10.4161/cc.22044

[学会発表] (計 10 件)

(1) 前田達哉、mTORシグナルの分子メカニズムと生理的役割、第 18 回マクロライド新作用研究会 (招待講演)、2011 年 7 月 16 日 北里大学 コンベンションホール (東京)

(2) 高原照直、ストレス顆粒による TORC1 制御、酵母遺伝学フォーラム・第 44 回研究報告会、2011 年 9 月 5 日、九州大学 医学部百年講堂 (福岡)

(3) 谷川美頼、アルカリストレス応答経路における 7 回膜貫通タンパク質とアレクチン様タンパク質 Rim8 の結合解析、酵母遺伝学フォーラム・第 44 回研究報告会、2011 年 9 月 6 日、九州大学 医学部百年講堂 (福岡)

(4) 前田達哉、ストレス顆粒による酵母 TORC1 制御、日本遺伝学会・第 83 回大会、2011 年 9 月 20 日、京都大学農学部農学研究科 (京都)

(5) 高原照直、TORC1 regulation mediated by stress granule formation upon heat stress、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜)

(6) 葛西秀俊、Genetic manipulation of mTOR signaling during corticogenesis、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜)

(7) 高原照直、Stress granule への TORC1 隔離は熱ストレスによる細胞障害を抑制する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場 (福岡)

(8) 葛西秀俊、中枢神経系において恒常的活

性化型 mTOR を発現するマウスの作製と解析
第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月
13 日、福岡国際会議場（福岡）

(9) 前田達哉、Transient sequestration of
TORC1 into stress granules during heat
stress、第 10 回プロテインホスファターゼ
国際カンファレンス、2013 年 02 月 07 日、が
ん研究振興財団 国際研究交流会館（東京）

(10) 谷川美頼、カルパイン様プロテアーゼ
Rim13 による Rim101 切断部位の同定、酵母遺
伝学フォーラム・第 45 回研究報告会、2012
年 09 月 05 日、京都大学宇治キャンパス お
うばくプラザ きはだホール（京都）

〔図書〕（計 2 件）

(1) 山本雅、羊土社、シグナル伝達キーワー
ド事典、2012、pp.61-63

(2) 前田達哉（監修）、学研メディカル秀潤
社、細胞工学 特集「ターゲット・オブ・mTOR
－明らかになる mTOR の標的分子と生理機能」、
2012 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/1KEN/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 達哉 (MAEDA TATSUYA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号：90280627

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし