

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591315

研究課題名(和文)新規LST8結合蛋白XのmTORシグナルおよび糖脂質代謝における役割の検討

研究課題名(英文) Role of a novel LST8-binding protein on mTOR signal and glucose and lipid metabolism

研究代表者

迫田 秀之 (Sakoda, Hideyuki)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：50376464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：mTORシグナルは、過食肥満でシグナルが亢進し、糖脂質代謝異常と深い関係がある。mTORC1とmTORC2に共通の構成蛋白LST8に結合する新規蛋白proteinXをMEFタグを用いたpull-down assayでクローニングしたので、本申請ではその生理的意義を明らかにすることを目的とした。Protein XのGST蛋白とアデノウイルスを作製し、LST8との結合を検討したがはっきりした結合の確認ができなかった。Protein Xは、八量体を形成する蛋白であり、各アイソフォーム単独ではLST8と結合しない可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：mTOR signal is activated by overnutrition and obesity, and is strongly related with glucose and lipid metabolic disorder. The novel ProteinX was identified as a LST8, which is a common component of mTORC1 and mTORC2, by MEF-tagged pull-down assay. In this study I tried to reveal the role of ProteinX on mTOR signal. GST fusion protein of Protein X and adenovirus were constituted and the association between LST8 and ProteinX was examined by GST-pull-down assay and co-immunoprecipitation. But I could not prove the association between them. I speculate that ProteinX is the protein complex consisted with 8 isoforms, thus one of them can not bind with LST8.

研究分野：内科学

キーワード：インスリンシグナル伝達系 mTOR

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の変化に伴い肥満が増加し糖尿病、脂質代謝異常、高血圧などの慢性疾患が増加しているが、いずれも**動脈硬化**の大きな危険因子となっている。現在、日本人の死因の1位は悪性腫瘍で、2位心疾患、3位脳血管障害である。心疾患、脳血管障害のほとんどが動脈硬化を元として発症し、合わせて日本人の死因の約3割を占める。動脈硬化は一旦進行してしまうと、心臓カテーテルや人工血管置換術などの大きな侵襲を伴う治療が必要となるため、リスクファクターのコントロールによって動脈硬化の進行を予防することが非常に重要である。脂質代謝異常、高血圧は様々な薬剤によって厳格なコントロールが可能となってきている。ところが、糖尿病は、近年、新しい内服薬やインスリン製剤の開発が進んできてはいるものの十分に血糖を管理することが難しい疾患であり、未だに治療の原則は食事運動療法である。糖尿病の発症には、インスリン分泌低下と**インスリン抵抗性**が寄与するが、日本人は遺伝的にインスリン分泌が低いことが多く、軽度の肥満や運動不足によって少しでもインスリン抵抗性が増すとすぐに耐糖能異常を生じてしまう。したがってインスリン抵抗性のメカニズムを解明することはより重要と考えられる。

我々の研究グループでは、これまでインスリン受容体から IRS、PI3 キナーゼ、Akt を介しての糖取込み上昇 (Glut4 translocation) やグリコーゲン合成促進などのインスリンシグナル伝達系の解析を培養細胞やモデル動物を用いて続けてきた。また、アミノ酸(過食)や growth factor (インスリン)によって活性が上昇する **mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル**に注目してインスリンシグナル伝達系との関連を調べてきた。mTOR は、2,549 のアミノ酸残基からなる巨大なセリン・スレオニンリン酸化酵素であり、p70 S6 キナーゼ、4E-BP1 ヘシグナルを伝えて、細胞成長に関わる蛋白質合成の制御機構において重要な役割を担っていることが明らかにされていた。この系には、Raptor (regulatory-associated protein of mTOR)、

LST8 が結合しており、mTOR complex 1 (**mTORC1**) と呼ばれ、一方 Rictor (rapamycin-insensitive component of mTOR)、LST8 と結合した場合は、mTOR のラパマイシン非感受性シグナルを伝達し、インスリンシグナル伝達系の中心にある **Akt/PKB の Ser473 をリン酸化し、活性化する PDK2 の候補**と報告され、**mTORC2** と称されている。また、mTORC1 シグナルは、ネガティブフィードバック機構を介して、インスリン受容体基質 (IRS-1) の 307 番目のセリン残基 (Ser307) をリン酸化しインスリン抵抗性を惹起する。われわれは、Raptor の C 端を欠失させた変異型 (**TORC1 抑制遺伝子**) のアデノウイルスを過剰発現すると、mTORC1 から mTORC2 に mTOR-LST8 が移行することで、mTORC1 シグナルは抑制され mTORC2 は亢進することを報告した (研究業績1)。さらに、過食肥満から糖尿病を発症するモデルマウス KKAy にこのアデノウイルスを静脈注射することによって、肝臓へ過剰発現し mTORC1 シグナルを抑制させた。その結果、IRS1 のチロシンリン酸化改善に加えて、インスリン非刺激時においても Akt のシグナルが亢進することから、耐糖能が改善するという結果を得た。さらに mTORC1/2 に共通の LST8 をマウス肝に過剰発現させると、耐糖能が改善することを見出し現在その機序を詳細に解析中である (図1)。また、共同研究で、高脂肪食負荷におけるインスリン抵抗性に、中枢における mTORC1 が重要な役割を果たしていることを明らかとしてきた。このように、mTORC が脂質代謝と大きく関与していることは、我々の研究を含めて明らかであるが、mTORC の構成蛋白は PRR5、IPMK など次々と新規の構成蛋白が明らかになってきており、まだまだ未知のことが多く、研究が盛んである。我々も、mTORC の構成蛋白をみつけるために、2 種類の独立したエピトープタグ (myc と FLAG) を、TEV プロテアーゼ切断配列とスペーサー配列を直列に連結させた構造を持つ **特殊なタグ (MEF タグ)** をもちいた pulldown assay を試みた。具体的には LST8、Raptor、Rictor に MEF タグを付けたアデノウイルスを作成し、大量に増幅した後に濃縮精製。精製したアデノウイルスをマウスの尾静脈より静脈内投与することで肝臓に過剰発現させ、

pulldown assay を行い、結合してくる蛋白を LC/MS により解析し同定した。その結果、LST8 を bait とした場合に、50-60kD に非常に濃いバンドを認め、これまでに LST8 あるいは mTOR と結合することが報告されていない新規結合蛋白を同定した。

2. 研究の目的

LST8 新規結合蛋白として同定した Protein X と mTOR シグナル、インスリンシグナル伝達系との関与を詳しく調べていくことによって、糖尿病、インスリン抵抗性における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 結合蛋白のクローニング、ウイルス、抗体作成

Protein X の cDNA をクローニングし、GST 融合蛋白を作製し特異抗体作製用の抗原として用いる。また、Protein X をいくつかの flagment にわけそれらの GST 融合蛋白を作製し、以下の結合部位を特定する実験に用いる。Protein X のアデノウイルスを作製する。野生型に加えて、活性型、不活性型も同時に作製する。また、Protein X shRNA を構築し、これもアデノウイルスとして作製する。mTORC 関連のアデノウイルスや特異抗体はすでにほとんどのものを作製済みである。

2) Protein X と mTORC の結合確認

Protein X が mTORC1、mTORC2 あるいは、未知の mTORC3 いずれに属するか明らかにする。

mTORC1: mTOR, LST8, Deptor, Raptor, PRAS40, IPMK

mTORC2: mTOR, LST8, Deptor, Rictor, Sin1, PRR5

2 - 1) tag 付の Protein X をアデノウイルスを用いて培養細胞に過剰発現し、tag の抗体で免疫沈降する。その免疫沈降サンプルを上記の mTORC1/2 構成蛋白それぞれの特異抗体で Western blotting をおこない、共沈してくるものを特定する。

2 - 2) GST-Protein X 融合蛋白を大腸菌から精製し、GST-beads に結合させたものと、

マウス肝の lysate を incubation し、pulldown assay を行う。GST-Protein X 融合蛋白に結合してくる mTORC 構成蛋白を Western blotting で特定する。

3) Protein X と LST8 の結合部位を特定

Protein X と LST8 を、それぞれいくつかの flagment に分けたコンストラクトを作製する。それらを、GST 融合蛋白、タグ付き発現ベクターに組み込み、GST pulldown assay、タグを用いた免疫沈降法などによって、結合部位を特定する。その上で、結合部位に変異を入れたり、欠失させたり、競合ペプチドを導入したりすることによって、Protein X と LST8 の結合を調整させる方法を模索する。LST8 新規結合蛋白 X (Protein X) の抗体やアデノウイルスなどを作製し準備を整える。mTORC 構成蛋白の中で LST8 以外にも結合するか同定する。LST8 と Protein X の結合部位をそれぞれ特定し、結合による活性の変化などを測定する。LST8 に Protein X が結合することによる mTOR シグナル、インスリンシグナル伝達系へ与える影響を明らかにする。最終的には、Protein X の摂食やインスリン刺激、アミノ酸刺激などによる発現量や活性の変化、病態モデルマウスにおける発現量などを調べ、Protein X の mTOR シグナルやインスリンシグナル伝達系における生理的意義を明らかにする。さらに、mTORC1/2 以外の、mTORC3 である可能性も模索し、Protein X に結合してくる蛋白を同定し、その役割を明らかにしていく。

4. 研究成果

Protein X の GST 蛋白とアデノウイルスを作製し、LST8 との結合を検討したがはっきりした結合の確認ができなかった。Protein X は、八量体を形成する蛋白であり、各アイソフォーム単独では LST8 と結合しない可能性が考えられた。今後は、いくつかのアイソフォームを同時に発現させる、マウスの肝にアデノウイルスで発現させることになどの方法で、より生理的に近い環境をつくり結合や活性の変化を調べていく。

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 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

迫田 秀之(Hideyuki Sakoda)

宮崎大学医学部講師

研究者番号：50376464