

平成 28 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860171

研究課題名(和文) セルフリー解析系によるトランスポーターからmTORへのアミノ酸情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of amino acid-dependent signal transduction from transporters to mTOR by cell-free assay system

研究代表者

奥田 傑 (OKUDA, Suguru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50511846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸によるmTORC1活性化機構を解明することを目的として実験を行い、次のような成果を得た。1) 様々なロイシン誘導体を用いて、がん細胞において細胞膜に局在しロイシンの取り込みを主に担うアミノ酸トランスポーターLAT1によるロイシンの認識部位と、mTORC1活性化に必要なロイシンの構造を明らかにした。2) mTORへのアミノ酸情報伝達に重要な新因子の探索およびその分子機構解析を行うためのセルフフリー実験系を構築した。この実験系では外部から物質を加えることでmTORの活性の変化を観察することが可能であり、細胞におけるアミノ酸感受と成長・増殖の関係を解析するために大いに役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We performed experiments to reveal the mechanism of mTORC1 stimulation by amino acids. The main results are described below. 1) The recognition moieties of leucine by an amino acid transporter LAT1, which localizes on the plasma membrane of cancer cells and is a main transporter to take leucine up into cells, were determined by the experiments with various leucine derivatives. The important moieties of leucine to activate mTORC1 were also revealed. 2) We established the cell-free assay to identify important factors for mTOR to sense amino acid availability, and to analyze its molecular mechanism. In this assay system, we could observe the effect of additives for mTOR activity. This system is expected to be used for analyzing how the amino acid sensing relates to cell growth and proliferation.

研究分野：生化学

キーワード：アミノ酸 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

細胞が細胞外環境に適合して成育するためには、細胞外の状況を検知する機能が必須である。それによって細胞外環境の特定の情報がシグナル化されて細胞内へと伝わり、環境に応じた生体システムが発動される。細胞へのストレスや、利用可能な栄養素・アミノ酸量などの情報は、酵母から哺乳類細胞に至るまで高度に保存されたセリン/スレオニン系キナーゼ TOR (target of rapamycin) へと伝達され、オートファジーや細胞成長等を制御する。なかでもアミノ酸は最も効率的に TOR を活性化する因子であると考えられている。哺乳類細胞において mTOR (mammalian/mechanistic TOR) は、基質認識を補助するタンパク質や負調節因子と相互作用し、複合体 mTORC1 (mTOR complex 1) を形成する。この複合体は細胞へのアミノ酸供給量を感知することで遺伝子の転写と翻訳を制御し、アミノ酸供給量を越えたタンパク質合成が起こらないよう監視する役割を果たしている。アミノ酸情報伝達は細胞の成育・生存維持において極めて重要であるため、その経路の解明に近年多大な努力が注がれているが、この複雑な経路の全貌解明にはまだ至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではアミノ酸のなかでも非常に強く mTORC1 を活性化するロイシンを中心にその情報伝達機構を解明することを目的とする。LAT1 (L-type amino acid transporter 1) はがん細胞特異的に高発現し、ロイシン等の大型中性アミノ酸を輸送するアミノ酸トランスポーターであり、補助サブユニット CD98hc/4F2hc と複合体を形成することで細胞膜に局在化して機能を発現する。ロイシンによる mTORC1 の活性化は LAT1 阻害薬や LAT1 ノックダウンによって抑制されることから、細胞内におけるロイシンの情報は LAT1 から mTORC1 へ伝達されると考えられるが、その伝達機構は不明な点が多い。mTORC1 はアミノ酸存在下でリソソーム表層へと導かれ、その後、リソソーム表層に局在する Rheb によって活性化され、タンパク質合成促進へとつながる S6K1 や 4E-BP1 のリン酸化を引き起こす。そこで本研究では、LAT1 を介して取り込まれたアミノ酸と結合し、リン酸化情報に変換しつつ mTORC1 まで伝達する、あるいはアミノ酸自体を mTOR 周辺の未知のアミノ酸センサーへと輸送する因子が存在するという想定のもと、その分子を同定すること、またその因子同定のための実験法の確立を目指す。そして、その因子の分子機構を解析することで、細胞内アミノ酸情報が細胞成長・増殖を引き起こす機構の全貌を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) ロイシンによる mTORC1 活性化の機構を

解明するため、まずはロイシンの化学構造に着目し、mTORC1 活性化に必要なロイシンの構造を解析した。様々なロイシン誘導体を HeLa S3 細胞に加え、ウェスタンブロッティングによって細胞内のリン酸化 S6K1 を検出することで mTORC1 活性を評価した。また、外部から加えたアミノ酸による mTORC1 の活性化にはアミノ酸が細胞内へと取り込まれる必要がある。そこで、これらのロイシン誘導体の細胞内への取り込みを、培養細胞を用いたアミノ酸取り込み実験によって評価した。ただし、ロイシン誘導体の取り込みを直接観察することは困難なため、放射性標識したロイシンを用いて取り込み競合実験を行うことで評価した。

2) アミノ酸トランスポーターから mTOR までのアミノ酸情報伝達に必要な新因子の探索およびその分子機構の解析を行うための、mTOR 活性を観察するセルフフリー実験系の構築を目指した。現在のモデルでは、mTOR はリソソーム上で活性化され、その下流因子をリン酸化するとされている。そこでまずは HEK293T 細胞をテフロンホモジナイザーを用いて物理的に破碎し、遠心分離することでリソソームを含むライトオルガネラ画分を単離し、この画分に局在する mTORC1 の活性を測定した。また細胞質画分をサイズ排除クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーによって分画したものを、同様にライトオルガネラ画分に加えて mTOR 活性を評価した。また、その際にアミノ酸も同時に加えることで、アミノ酸依存的な mTOR 活性の変化の観察を試みた。

### 4. 研究成果

1) 25 種類のロイシン誘導体を用いて、それらの細胞への取り込みや排出をロイシンとの競合実験によって調べた。その結果、LAT1 によって認識されるために重要な構造は、カルボニル基、カルボキシル基のアルコキシ酸素、アミノ基、疎水的な側鎖であることが明らかになった。また、mTOR 活性化に重要な役割を果たすロイシンの構造部位はより厳密なもので、上記に加え、カルボキシル基のカルボニル酸素とアルコキシ酸素の距離や  $\alpha$ -炭素のアミノ基が必要であることが示された。さらに L 体であることや、末端にイソプロピル基を持った適切な長さの側鎖も重要であることが明らかになった (図 1)。

以上の結果より、mTORC1 の活性化に必要なロイシンの構造部位と LAT1 によって認識されるロイシンの構造部位は完全には一致しないことが明らかとなり、LAT1 自体はロイシンセンサーとはなり得ず、他に細胞内においてその役割を担う因子が存在していることが示唆された。

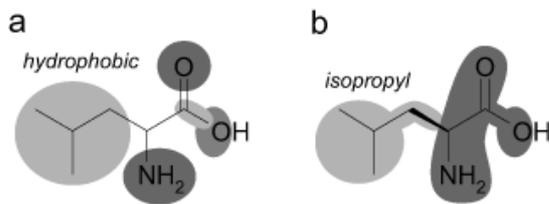


図 1. LAT1 による認識 (a) と mTORC1 の活性化 (b) に重要なロイシンの部位  
 ダークグレー：非常に重要で必須  
 ライトグレー：重要だが必須ではない

2) 培養細胞を破碎して回収したリソソームを含むライトオルガネラ画分を用いて、その画分に局在する mTORC1 の活性を評価するセルフフリーの実験系を確立した。この実験系では、外部から加えた ATP 依存的な mTOR の活性が観察でき、またその活性は mTOR 阻害剤によって抑制された。さらに、この画分に細胞質画分を加えることで mTOR の活性の変化を観察することができた。細胞質画分をサイズ排除クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーによって分画したものをライトオルガネラ画分に加えると、画分によって mTOR 活性を促進したり抑制したりといった現象が観察された。これまでも細胞質内には mTORC1 の活性を制御する因子が多く報告されており、この実験結果はそれらを再現していることから、外部から物質を添加することによって mTOR 活性の変化を観察できるセルフフリーの実験系を確立できたと考えられる。また同実験を行う際にアミノ酸を加えて mTOR 活性の変化を観察したが、アミノ酸はいずれの画分を加えた場合も mTOR 活性に大きな影響を及ぼさなかった。しかし、細胞質を加えずに行った実験ではいくつかのアミノ酸によって mTOR 活性に変化が見られ、アミノ酸感受機構の一部はリソソーム画分に備わっていることが示唆された。本研究で得られた知見や確立したセルフフリーの実験系は、細胞におけるアミノ酸感受と成長・増殖の関係を解析するために大いに役立つことが期待できる。

##### 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 4 件)

Wei L, Tominaga H, Ohgaki R, Wiriyaermkul P, Hagiwara K, Okuda S, Kaira K, Kato Y, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y., "Transport of 3-fluoro-l- $\alpha$ -methyl-tyrosine (FAMT) by organic ion transporters explains renal background in [(18)F]FAMT positron

emission tomography" *J Pharmacol Sci.* 査読有り 2016 Feb;130(2):101-9. doi: 10.1016/j.jphs.2016.01.001

Wei L, Tominaga H, Ohgaki R, Wiriyaermkul P, Hagiwara K, Okuda S, Kaira K, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y., "Specific transport of 3-fluoro-l- $\alpha$ -methyl-tyrosine by LAT1 explains its specificity to malignant tumors in imaging" *Cancer Sci.* 査読有り 2016 Mar;107(3):347-52. doi: 10.1111/cas.12878

Nagamori S, Wiriyaermkul P, Guarch ME, Okuyama H, Nakagomi S, Tadagaki K, Nishinaka Y, Bodoy S, Takafuji K, Okuda S, Kurokawa J, Ohgaki R, Nunes V, Palacin M, Kanai Y., "Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a missing partner of cystinuria-related plasma membrane protein rBAT/SLC3A1" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有り 2016 Jan 19;113(3):775-80. doi: 10.1073/pnas.1519959113

Nagamori S, Wiriyaermkul P, Okuda S, Kojima N, Hari Y, Kiyonaka S, Mori Y, Tominaga H, Ohgaki R, Kanai Y., "Structure-activity relations of leucine derivatives reveal critical moieties for cellular uptake and activation of mTORC1-mediated signaling" *Amino Acids.* 査読有り 2016 Apr;48(4):1045-58. doi: 10.1007/s00726-015-2158-z

[学会発表](計 8 件)

Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyaermkul, Noriyoshi Isozumi, Kazuko Kaneda-Nakashima, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "Leucine transported by a cancer-type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular processes in pancreatic cancer cells" BMB2015、第 38 回 日本分子生物学会年会、第 88 回 日本生化学会大会、2015 年 12 月 2 日、神戸

Wei Ling、富永英之、Wiriyaermkul Pattama、大垣隆一、萩原浩平、奥田傑、永森收志、金井好克、"Transport of 3-fluoro-l- $\alpha$ -methyl-tyrosine (FAMT) by organic ion transporters: a possible cause of renal background in  $^{18}\text{F}$ -FAMT PET" 第 127 回 日本薬理学会近畿部会 2015 年 6 月 26 日、岐阜

Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyaermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Suguru Okuda, Kenjiro Tadagaki,

Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "Inhibition of the LAT1-mediated leucine transport affects multiple cellular processes in pancreatic cancer cells" 第 62 回 日本生化学会近畿支部例会 2015 年 5 月 16 日、草津

Suguru Okuda, Pattama Wiriyasermkul, Naoto Kojima, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "ロイシンによる mTOR 活性化機構解明のためのロイシン誘導體とロイシン結合タンパク質との相互作用解析" 第 88 回 日本薬理学会年会 2015 年 3 月 19 日、名古屋

Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Kazuko Kaneda-Nakashima, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "Suppression of cancer-type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular events in pancreatic cancer cells" 第 88 回 日本薬理学会年会 2015 年 3 月 19 日、名古屋

Ling Wei, Hideyuki Tominaka, Pattama Wiriyasermkul, Ryuichi Ohgaki, Kohei Hagiwara, Suguru Okuda, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "Molecular mechanism of renal accumulation of 3-fluoro-l- $\alpha$ -methyltyrosine (FAMT) in  $^{18}\text{F}$ -FAMT PET" 第 88 回 日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18 日、名古屋

Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Suguru Okuda, Kenjiro Tadagaki, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "Inhibition of cancer-type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular events in pancreatic cancer cells" 第 126 回 日本薬理学会近畿支部会 2014 年 10 月 24 日、和歌山

Pattama Wiriyasermkul, Suguru Okuda, Naoto Kojima, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "ロイシン結合タンパク質との相互作用と mTOR 活性化に必要なロイシンの構造部位の同定とその相関" 第 87 回 日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日、京都

Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Suguru Okuda, Kenjiro Tadagaki, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai, "Study of a cellular signaling network stimulated with leucine transported by a cancer-type amino acid transporter LAT1" 第 61 回 日本生化学会近畿支部例会 2014 年 5 月 17 日、京都

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

奥田 傑 (OKUDA Suguru)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 50511846

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :