

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08273

研究課題名(和文)細胞膜ロイシン受容体の分子同定とmTORC1シグナル経路における意義の解明

研究課題名(英文)Molecular identification of amino acid sensor and its function in mTORC1 signaling pathway

研究代表者

大垣 隆一(Ohgaki, Ryuichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20467525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸はシグナル分子として機能し、細胞内代謝機能を司るセリンスレオニンキナーゼmTORC1の活性を制御している。しかし、シグナル経路の起点にあってアミノ酸を認識する機構は明らかにされていなかった。本研究では、細胞が細胞外のアミノ酸を認識する分子機構の解明に取り組んだ。細胞膜画分を用いたプロテオミクス解析の手技の確立、アミノ酸飢餓・刺激等の実験条件の最適化、mTORC1活性検出の簡便化と迅速化をおこない、将来の分子同定に向けた重要な技術基盤を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：Amino acids play an important role as signaling molecules to activate mTORC1, a serine/threonine kinase complex which regulates cellular metabolism. However, the detailed molecular mechanisms of amino acid sensing still remain elusive. In this study, we have tried to understand the molecular basis of amino acids sensing in the upstream of mTORC1, especially focusing on how the cells recognize the extracellular amino acids. The experimental protocol for the comparative proteomics analysis using the plasma membrane fractions has been established. Also, the conditions of cell treatments as well as the methods for detection of mTORC1 activity were optimized, to improve the reliability and the throughput of the analyses. The outcomes the research would significantly contribute to identifying the amino acid sensing molecules in the future studies.

研究分野：薬理学・生化学・細胞生物学

キーワード：アミノ酸 mTORC1 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸供給量に応じて転写・翻訳を制御することは、細胞の増殖や成長にとって極めて重要である。細胞内代謝制御を司るセリン/スレオニンキナーゼ複合体 mTORC1 (Mechanistic target of rapamycin complex 1) の活性化においては、シグナル分子としてのアミノ酸が必須であることが知られる。mTORC1 シグナル経路の破綻は癌・糖尿病・メタボリック症候群などの疾患において報告されており、近年、シグナル分子としてのアミノ酸の機能的側面が注目されている。アミノ酸-mTORC1 シグナル経路を構成する因子のうち、特に mTORC1 周辺に位置するものは急速に解明が進められている。しかし、シグナル経路の起点にあってアミノ酸認識する機構は明らかにされていなかった。

研究代表者の所属研究室では、複数の哺乳類培養細胞株を用いた比較解析により、細胞外のアミノ酸を認識する細胞膜アミノ酸受容体様の活性を見出した。さらに、リガンドに対する構造要求性の解析から、細胞膜型アミノ酸受容体に選択的に作用して mTORC1 を活性化するアミノ酸誘導体を見出した。

2. 研究の目的

アミノ酸は、タンパク質合成の材料やエネルギー源であるのみならず、シグナル分子としての機能を有する。特に、転写・翻訳、脂質合成、オートファジーなどの多様な細胞内代謝反応の制御を介して細胞の増殖や成長を司るキナーゼ複合体 mTORC1 の活性化には、アミノ酸シグナルの入力が必須である。しかしながら、そのシグナル経路においてアミノ酸を認識する分子機構の詳細は未だに十分に明らかにされていない。本研究では、細胞が細胞外アミノ酸を認識する分子機構を明らかにし、細胞内代謝をはじめとする多様な細胞機能制御における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロテオミクス解析による分子探索

細胞膜アミノ酸受容体の活性を示す細胞と、示さない細胞から、細胞膜画分を密度勾配遠心法により調製した。プロテオミクス解析により、細胞膜画分において検出される膜タンパク質を網羅的に比較した。細胞膜アミノ酸受容体の活性を示す細胞由来の細胞膜画分においてのみ同定された因子を候補因子とした。

(2) アミノ酸飢餓・刺激条件の最適化

これまでの研究では慣例的に、まず血清及びアミノ酸の両方を除いた培地で長時間細胞を飢餓処理して細胞内のリン酸化シグナル全般を大きく低下させ、その後、複数種類のアミノ酸の混合液を加えて細胞の応答を解析してきた。この方法では、血清が全く存在しないことの影響が懸念されるほか、刺激

溶液に含まれる個々のアミノ酸の重要性については十分な検討を加えることが出来ないと考えられた。そこで、mTORC1 活性化に特に重要なロイシンに着目し、血清やその他のアミノ酸の有無を全く変化させることなく、培地中のロイシンの有無のみを切り替えることで mTORC1 の不活性化と活性化を制御できる細胞処理条件を模索した。mTORC1 の活性の評価は、リン酸化基質である p70S6K および 4EBP1 のリン酸化状態をウエスタンブロット法により確認しておこなった。

(3) mTORC1 活性検出の簡便化と迅速化

mTORC1 の活性を評価する上で、従来は上記のウエスタンブロット法を採用してきた。同法は作業工程が複雑であり、解析のスループットも低いことから研究全体の律速段階となっていた。そこで本研究では、1枚のマイクロプレートで解析の全工程を完結できる、Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay 法 (ALPHA 法) の適用を検討した。

(4) 遺伝子ノックダウンによる候補因子の機能解析

上記(1)で絞り込んだ約40種類の候補因子について、siRNAを用いた遺伝子ノックダウンによる機能解析を実施した。各因子をノックダウンした細胞に対してロイシン飢餓・刺激処理をおこない、mTORC1 活性化への影響を検討した。また、研究期間中に海外の複数の研究グループによって幾つかのアミノ酸センサー分子の同定が方向されたことをうけて、これらの因子についても遺伝子ノックダウンによる機能解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) プロテオミクス解析による分子探索

スクロース密度勾配遠心法により細胞膜画分を高効率で濃縮する方法を最適化した。調製した細胞膜画分を用いたプロテオミクス解析の結果に基づき、約140種類の膜貫通タンパク質を候補因子として見出した。そのうち、約40種類については、機能未知あるは分子機能が殆ど知られていないものであった。

(2) アミノ酸飢餓・刺激条件の最適化

血清やその他のアミノ酸の有無を全く変化させることなく、ロイシンの有無のみで mTORC1 の不活性化と活性化を制御できる細胞処理条件を見出した。mTORC1 リン酸化基質の p70S6K のリン酸化状態を指標としたウエスタンブロット法により、飢餓後にはほぼ完全に脱リン酸化リン酸化状態にあること、刺激後には飢餓前とほぼ同等のレベルのリン酸化状態にあることが確認された。この条件は、従来法よりもはるかに簡便であり、細胞を短時間処理するだけで充分であり、且つ長時間の血清飢餓等の処理をおこなわない

め、より生理的な条件に近い状態でアミノ酸シグナルの実体を捉える事を可能にするものであると期待される。

(3)mTORC1 活性検出の簡便化と迅速化

ALPHA 法を用いることにより、上記(2)で見出した実験条件下で、ロイシン飢餓と刺激によって引き起こされる mTORC1 の不活性化と活性化を十分なシグナル強度とダイナミックレンジで捉えることが可能になった。同法は、従来のウエスタンブロット法に比較して作業工程が簡潔である。また、単回の実験において、各サンプルについて十分な数のレプリケーションを設定することが可能であり、再現性の確認も容易というメリットがある。これにより、機能解析のスループットが大幅に改善された。上記(1)のプロテオミクス解析により絞り込まれる多数の候補因子について遺伝子ノックダウンによる機能解析をするうえで有用な技術的基盤を確立することが出来た。

(4)遺伝子ノックダウンによる候補因子の機能解析

海外の複数の研究グループによって報告された幾つかのアミノ酸センサーについては、本研究で使用している培養細胞株および実験条件下においては、遺伝子ノックダウンをおこなってもアミノ酸-mTORC1 シグナルに対する影響が認められなかった。この結果は、用いる細胞や実験条件によってアミノ酸認識機構に差異があることを強く示唆するものとなった。

細胞膜画分のプロテオミクス解析によって絞り込んだ候補因子群について遺伝子ノックダウンによる解析を実施した結果、IRS4 (Insulin receptor substrate 4) の遺伝子ノックダウンによりロイシン依存的な mTORC1 の活性化が顕著に低下することを見出した。しかしながら、その後の詳細な解析により、IRS4 のリン酸化はインスリンやインスリン様増殖因子 I の刺激により上昇するが、ロイシンを含むアミノ酸では変化しないことが明らかとなった。従って、IRS4 の遺伝子ノックダウンによる mTORC1 の活性低下はロイシンからのシグナル伝達に直接関連したものではなく、増殖因子から mTORC1 に入力するシグナルの減弱によるものと考えられる。最終的に、研究期間中にロイシン刺激依存的に mTORC1 活性化に關与する因子は見出すことが出来なかった。

(5)まとめ

本研究の以上の結果は、少数の細胞株間の膜タンパク質の発現プロファイルの比較のみから適切な候補を絞り込むことは容易ではないことを示唆するものとなった。これは、由来する臓器や組織などのバックグラウンドが大きく異なる細胞株間の比較では、アミノ酸認識機構以外の細胞間の差異を反映し

た膨大な情報に、必要な情報が埋もれてしまうためと考えられる。今後の研究の展開としては、アミノ酸認識機構の異なる細胞株の情報をより多く集めることが重要であると考えられる。また、同一細胞株でもロイシン感知機構のタイプが切り替わるような培養条件を見出すことができれば、極めて有用な比較材料となることが期待される。本研究により細胞外のアミノ酸を認識する分子機構の解明には至らなかったが、実験条件の最適化、解析技術の確立を完了した。将来の分子同定に向けて重要な成果を得ることが出来たと考えている。

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9件) 全て査読有

1. Ohgaki R, Ohmori T, Hara S, Nakagomi S, Kanai-Azuma M, Kaneda-Nakashima K, Okuda S, Nagamori S, Kanai Y. Essential roles of L-type amino acid transporter 1 in syncytiotrophoblast development by presenting fusogenic 4F2hc. *Mol Cell Biol.* 2017; 37: e00427-16. DOI:10.1128/MCB.00427-16.
2. Kongpracha P, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Tanaka Y, Kaneda K, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relationship of a novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). *J Pharmacol Sci.* 2017; 133: 96-102. DOI:10.1016/j.jphs.2017.01.006.
3. Tărlungeanu DC, Deliu E, Dotter CP, Kara M, Janiesch PC, Scalise M, Galluccio M, Tesulov M, Morelli E, Sonmez FM, Bilguvar K, Ohgaki R, Kanai Y, Johansen A, Esharif S, Ben-Omran T, Topcu M, Schlessinger A, Indiveri C, Duncan KE, Caglayan AO, Gunel M, Gleeson JG, Novarino G. Impaired Amino Acid Transport at the Blood Brain Barrier Is a Cause of Autism Spectrum Disorder. *Cell* 2016; 167:1481-1494. DOI:10.1016/j.cell.2016.11.013.
4. Nagamori S, Wiriyasermkul 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.* 2016; 48: 1045-1058.

DOI:10.1007/s00726-015-2158-z.

5. Wei L, Tominaga H, Ohgaki R, Wiriyasermkul P, Hagiwara K, Okuda S, Kaira K, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y. Specific transport of 3-fluoro-L-methyl-tyrosine by LAT1 explains its specificity to malignant tumors in imaging. *Cancer Sci.* 2016; 107: 347-352. DOI:10.1111/cas.12878.
6. Nagamori S, Wiriyasermkul P, Guarch ME, Okuyama H, Nakagomi S, Tadagaki K, Nishinaka Y, Bodoy S, Takafuji K, Okuda S, Kurokawa J, Ohgaki R, Nunes V, Palacín 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.* 2016; 113: 775-780. DOI:10.1073/pnas.1519959113.

他 3 件

[学会発表](計 29 件)

1. 大垣隆一. 腫瘍血管新生に寄与する血管内皮細胞のアミノ酸トランスポーター. 第 1 回 がん代謝研究会・若手の会. 2018 年.
2. Pornparn Kongpracha. Non-competitive LAT1 inhibitors suppress mTORC1 signaling similar to competitive LAT1 inhibitors. 第 132 回 日本薬理学会近畿部会. 2017 年
3. Lili Quan. LAT1 in endothelial cells as a novel target of anti-angiogenic cancer therapy. 第 132 回 日本薬理学会近畿部会. 2017 年.
4. Pornparn Kongpracha. Phosphoproteomics reveals the cellular processes affected by leucine transported through LAT1, a cancer type amino acid transporter. 日本プロテオーム学会 2017 年大会 JHUP0 第 15 回大会. 2017 年.
5. 大垣隆一. アミノ酸トランスポーター LAT1 は膜融合関連因子 4F2hc の細胞膜提示による胎盤合体性栄養膜の形成に必須である. 第 12 回 トランスポーター研究会年会. 2017 年.
6. Pornparn Kongpracha. Structure-activity relationship of novel inhibitors for cancer type amino acid transporter LAT1. 第 131 回 日本薬理学会近畿部会. 2017 年.
7. 奥田傑. アミノ酸トランスポーター LAT1 によるロイシン誘導体の認識と mTORC1 シグナル活性化の関係. 第 90 回 日本薬理学会年会. 2017 年.
8. 大垣隆一. アミノ酸トランスポーター LAT1 は胎盤合体性栄養膜の形成に必須である: 膜融合関連因子 4F2hc の細胞膜提示による細胞融合への寄与. 第 39 回 日本分子生物学会年会. 2016 年.
9. 兼田加珠子. アミノ酸トランスポーター LAT1 阻害によるがん転移抑制効果の検討. 第 130 回 日本薬理学会近畿部会. 2016 年.
10. 奥田傑. アミノ酸トランスポーター LAT1 による基質認識と mTORC1 シグナル活性化に必要なロイシンの構造部位の決定. 第 130 回 日本薬理学会近畿部会. 2016 年.
11. 大垣隆一. アミノ酸トランスポーター LAT1 による膜融合関連因子 4F2hc の細胞膜提示は胎盤合体性栄養膜の形成に必須である. 大阪大学医学系研究フォーラム 第 7 回 若手研究フォーラム. 2016 年.
12. 兼田加珠子. Inhibitor of amino acid transporter is useful as a novel anti-cancer drug. 第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回 日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015). 2015 年.
13. Pornparn Kongpracha. Leucine transported by a cancer-type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular processes in pancreatic cancer cells. 第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回 日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015). 2015 年.
14. 大垣隆一. Properties of mTORC1 regulation by amino acid signaling in HEK293T cells. 第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回 日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015). 2015 年.
15. 兼田加珠子. アミノ酸トランスポーター阻害薬による抗腫瘍薬作用増強効果についての検討. 第 37 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2015 年.
16. 兼田加珠子. アミノ酸輸送体阻害薬による抗がん剤作用増強効果についての検討. 第 24 回 日本 Cell Death 学会.

2015 年.

17. Pornparn Kongpracha. 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.

他 12 件

〔その他〕

ホームページ等

1. 科学情報サイト “Atlas of Science” (<http://atlasofscience.org/>) 記事掲載 Ohgaki R, Kanai Y. Amino acid transporter chaperons its fusogenic partner: an essential role in placenta, and its implications for physiological and pathological cell fusion. 2018.
2. 日本薬学会誌“ファルマシア”解説記事掲載 大垣隆一、トピックス「ロイシンセンサーの分子実体の発見とそれによる mTORC1 活性制御」2016; 52: 696.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大垣 隆一 (OHGAKI RYUICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20467525

(2) 研究分担者

中込 咲綾 (NAKAGOMI SAYA)
大阪大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号：60423894

(3) 連携研究者

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

永森 收志 (NAGAMORI SHUSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90467572