

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18533

研究課題名(和文) グルコース欠乏環境におけるグルコース輸送体の細胞膜局在を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms that control cell-surface localization of glucose transporters under glucose-limited conditions

研究代表者

豊田 雄介 (Toyoda, Yusuke)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：10587653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：栄養環境に応じた糖輸送体の細胞表面局在制御は、細胞の増殖や、糖尿病やガン等の疾病に關与する。本研究では低グルコース環境での増殖に必須である分裂酵母六炭糖輸送体Ght5の細胞表面局在に必要な遺伝子群を探索し、小胞輸送やシグナル伝達に機能する25遺伝子はGht5-GFPの表面局在を通じて低グルコース環境での増殖に機能することを明らかにした。また、ヒト培養細胞において、GRP78等の小胞体シャペロンは高グルコース環境では糖輸送体GLUT1の表面局在に必要であったが、グルコース枯渇環境では不要であった。以上の結果から環境グルコース濃度により複数回膜貫通蛋白質の輸送機構が調節されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Proper regulations of glucose uptake via glucose transporters are not only vital for cellular proliferation but also related to human diseases including type II diabetes and cancer. This study was focused on the molecular mechanism that ensures cell-surface targeting of the fission yeast glucose transporter Ght5, which is essential for vigorous cell proliferation under glucose-limited conditions. Out of the 51 genes tested, 25 genes involved in vesicle transport or signal transduction functioned in proliferation under glucose-limited conditions by ensuring cell-surface localization of Ght5-GFP. In human cultured cells, endoplasmic reticulum chaperones such as GRP78, which were required for cell-surface localization of GLUT1 under glucose-rich conditions, became dispensable upon glucose starvation. Taken together, this study uncovered that the transport mechanism for cell-surface multi-pass transmembrane proteins is modulated by the extracellular glucose level.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低グルコース環境 Ght5 LGS変異体 グルコース輸送体 GLUT1 GRP78 シグナル伝達 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

(1) グルコースはヒトを含む真核生物の主要なエネルギー源・炭素源であり基本的なレベルで細胞機能を支えている。細胞外が常にグルコースに富むとは限らないので、栄養環境に応じてグルコースの取り込みを制御することが細胞の生存や機能に重要であるが、その分子機構は明らかではなかった。

(2) 所属研究室において、幅広いグルコース濃度で増殖できる分裂酵母が低グルコース(0.08%以下)環境で増殖するために必要な遺伝子群が約200種類同定された。なかでも、分裂酵母では8つ有るグルコース輸送体遺伝子のうち *ght5* 遺伝子を欠失する変異体だけが低グルコース環境で増殖できない低グルコース感受性(LGS)表現型を示した。さらにグルコース濃度の低減に反応して *ght5* 遺伝子の発現が誘導され、それに伴い Ght5 蛋白質が細胞膜に強く局在することが分かってきた。これは Ght5 輸送体の発現誘導と細胞表面局在が、グルコース欠乏環境に反応して細胞の増殖を支える重要な因子であることを示している。しかし、Ght5 の細胞膜局在を制御する分子機構は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、分裂酵母と哺乳類培養細胞を用いてグルコース輸送体の細胞表面局在を制御する分子機構を解明することを目的とした。分裂酵母では、Ght5 の細胞表面局在に必要な遺伝子群を明らかにし、低グルコース環境での細胞増殖に重要な細胞機能を解明することを主目的とし、また、Ght5 自体が受けうる翻訳後修飾の細胞表面局在における機能を解明することも目的とした。

(2) また、本研究においてグルコース輸送体が細胞表面へ局在する進化上普遍的な分子機構を明らかにするために、ヒト培養細胞を用いて、低グルコース環境における糖輸送体蛋白質の細胞表面局在を制御する機構を解明することも主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 所属研究室において同定された、低グルコース環境での増殖に欠損を示す分裂酵母 LGS 変異体 70 株に Ght5-GFP をゲノム上から発現させて、低グルコース環境における Ght5-GFP の蛍光強度および細胞内局在を生細胞で観察した。ここで用いた LGS 変異体の多くは高温感受性変異を持つため、低グルコース環境に移行すると同時に制限温度 36 で培養し、Ght5-GFP の観察を実施した。

(2) 細胞表面に局在するグルコース輸送体を同定することをねらい、低グルコース環境で培養したヒト培養細胞の総膜画分において発現量が增大している蛋白質を質量分析

によって同定し、低グルコース環境に対する細胞応答における当該蛋白質の分子機能を RNAi ノックダウン等により解析した。

4. 研究成果

(1)-1. 野生型細胞では低グルコース環境において Ght5 の発現が亢進し細胞表面により強く局在するようになる。本研究では、51 遺伝子に変異を有する 70 個の LGS 変異体を用いて高グルコース(2-3%)環境および低グルコース環境における Ght5-GFP の細胞内局在を観察した。この結果、51 遺伝子のうち 25 遺伝子が Ght5-GFP の細胞表面局在に必要な遺伝子であった。これらの 25 遺伝子は、蛋白質リン酸化、細胞骨格、小胞輸送、蛋白質分解に関与していた。例えば、小胞輸送に機能するアダプター蛋白質の変異体 *apm1* では、Ght5-GFP 蛋白質は、低グルコース環境においてのみ正常に細胞表面に局在せず、細胞質中で塊として観察された。このような Ght5 の局在異常は、変異体細胞のグルコース欠乏環境での増殖欠損を説明できるものと考えられる。

この一連の結果を整理すると図1のように、低グルコース環境における適切な Ght5 の細胞表面局在に必要な細胞機能は、小胞体(ER)-ゴルジ体間輸送、ゴルジ体間の輸送、ゴルジ体からの小胞の生成およびエキソサイトーシス、エンドサイトーシス、液胞輸送およびゴルジ体への後退輸送が挙げられる。つまり、12 回膜貫通蛋白質である Ght5 の細胞内輸送に関与すると考えられる蛋白質に変異を持つ細胞が、低グルコース環境における細胞増殖に欠損を示したものと考えられる。このように、Ght5 蛋白質の細胞内小胞輸送のサイクルの各ステップのいずれかに欠損があると低グルコース環境での増殖に欠損を示すことが本研究により明らかとなった。

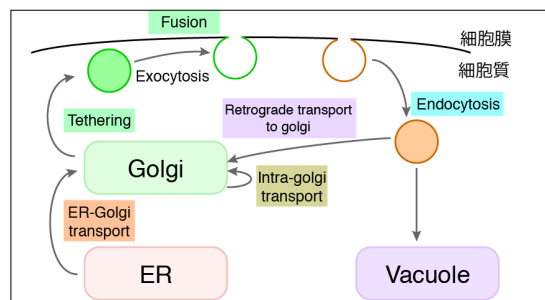


図1. 低グルコース環境におけるGht5の細胞表面局在に必要な細胞機能

とりわけ、環境中の栄養状態を感知して細胞増殖や代謝などの細胞機能を調節するキナーゼ複合体である mTORC2 (mechanistic Target of Rapamycin Complex 2)およびホスホイノシチド 3-キナーゼ(PI3K)/Akt キナーゼ経路に関与するシグナル伝達因子の変異細胞においては、低グルコース環境における Ght5-GFP の細胞表面局在は顕著に欠損を示し、GFP 蛍光の多くは細胞質中の液胞に観察された(文献)。これらの PI3K/mTORC2/Akt

経路の変異体群はいずれも低グルコース感受性を示すことから、Ght5 蛋白質の細胞表面局在は低グルコース環境への適応にとって最も重要な細胞応答の一つであると考えられる。実際、哺乳類グルコース輸送体でありエネルギー生成に必要な基礎的なグルコース取り込みに機能するとされる GLUT1 は、PI3K, Akt, mTORC2 の活性に依存して細胞表面に輸送されることが知られている(文献)。これらの知見は、分裂酵母で得られた結果と合致すると考えられる。その一方で、Ght5 蛋白質が mTORC2 経路を介して細胞表面に局在する背景にある分子制御機構は未だ明らかとはなっていない。

この不明な点を追求するために次項の実験を実施した。

(1)-2. 分裂酵母グルコース輸送体 Ght5 の発現誘導と細胞表面局在の促進は、低グルコース環境に適応して増殖するために必須である。ght5 遺伝子転写や細胞内局在の制御機構と異なり、Ght5 蛋白質自体の翻訳後修飾の細胞内局在における役割は不明であった。mTORC2 の触媒サブユニット Tor1 の欠失変異体 *tor1Δ* では、Ght5 蛋白質の泳動度が早く観察され、Ght5 がリン酸化を含めた修飾を受けていることが示唆された(文献)。また、Ght5 蛋白質のカルボキシ末端付近、536 番目のセリン残基(Ser536)がリン酸化を受けていることが過去の研究(文献)および、沖縄科学技術大学院大学・G0 ユニットの柳田充弘教授と佐二木健一博士の研究から明らかとなった。さらに Ser536 の前後のアミノ酸配列が Akt キナーゼの標的配列と相同性が観察されたため、Ser536 をアラニンやグルタミン酸残基に置換した変異 Ght5(S536A)-GFP, Ght5(S536E)-GFP 蛋白質をゲノム上で発現する細胞を作製し、その低グルコース環境での増殖や変異蛋白質の細胞内局在を観察した。Ght5(S536A)-GFP を発現する細胞は、mTORC2 経路欠損変異体が見せるような低グルコース感受性を示すものと予想されたが、しかしながら、これら Ght5(S536A)-GFP, Ght5(S536E)-GFP 変異蛋白質を発現する分裂酵母細胞は、検討した低グルコース環境(0.02 - 0.08%)のいずれでも野生型細胞と同等の増殖能を示した。また、低グルコース環境において、変異蛋白質である Ght5(S536A)-GFP および Ght5(S536E)-GFP はいずれも野生型 Ght5-GFP と同様に細胞表面に局在した。さらに、mTORC2 経路欠損変異株や分裂酵母キナーゼ欠失変異体ライブラリーの細胞における Ser536 リン酸化を、特異的なリン酸化抗体を用いて検討した。その結果、Ser536 リン酸化を欠失する変異体は見いだせなかった。これらの結果から、Ght5 Ser536 残基のリン酸化の役割のこれ以上の追求は困難と考えられた。Ght5 蛋白質の細胞内局在を制御する分子機構を理解するためには、遺伝学的手法等の異なるアプローチが

今後必要になるであろう。

(2) グルコース輸送体が細胞表面へ局在する進化上普遍的な分子機構を明らかにするために、グルコース枯渇環境においてヒト培養細胞の膜画分における発現が増大する蛋白質を二次元電気泳動法および質量分析によって同定した。質量分析は Nurhan Ozlu 博士研究室(トルコ, Koc 大学)によって行われた。その結果、当初予想していた GLUT 等の糖輸送体ではなく、小胞体(ER)シャペロンである GRP78/HSPA5, GRP94/HSP90B1, calreticulin, protein disulfide isomerase/PDI が同定された。

これらの ER シャペロンは、グルコース枯渇環境で発現が増大することが知られている glucose-regulated proteins (GRPs) に属し(文献) 翻訳により生じるポリペプチド鎖の正常な折りたたみに必要なだけでなく、グルコース枯渇や酸化ストレス等の小胞体ストレスに対する細胞応答に重要であることが知られてきている。このため、同定された ER シャペロンの 12 回膜貫通蛋白質である GLUT1 の細胞表面局在における役割を検討した。ER シャペロンの発現を RNAi 法によりノックダウンすると、高グルコース(4.5g/l)環境では GLUT1-EGFP の細胞表面局在が欠損した。その一方で、興味深いことに、ER シャペロンを RNAi ノックダウン後にグルコース枯渇環境に移行させると、GLUT1-EGFP の細胞表面局在が観察されるようになった(図 2)。

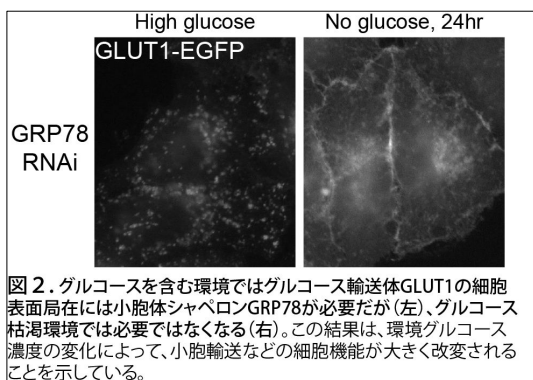


図 2. グルコースを含む環境ではグルコース輸送体 GLUT1 の細胞表面局在には小胞体シャペロン GRP78 が必要だが(左)、グルコース枯渇環境では必要ではなくなる(右)。この結果は、環境グルコース濃度の変化によって、小胞体輸送などの細胞機能が大きく改変されることを示している。

GLUT1 だけでなく、その他の細胞表面蛋白質の局在における ER シャペロンの役割を解析するために、Na⁺/K⁺ ATPase サブユニットであり 10 個の膜貫通ドメインを持つ ATP1A1 および、1 回膜貫通蛋白質である上皮成長因子受容体(EGFR)、アミノ酸輸送体サブユニット CD98 の細胞内局在を免疫染色法により観察した。HSP70 ファミリーに属する GRP78 の発現を RNAi ノックダウンにより抑制した HeLa 細胞を高グルコース環境で培養すると ATP1A1 の細胞表面局在は減退したが、グルコース枯渇環境へ移行させると細胞表面に観察された。一方、EGFR および CD98 は、GRP78 発現量や環境グルコース濃度に関わらず細胞表面に観察された。以上の結果から、細胞

は複数回膜貫通蛋白質を細胞表面に輸送する機構を複数持っており、環境グルコース濃度によって適切に切り替えることが明らかとなった。

分裂酵母は低グルコース環境にตอบสนองして遺伝子転写プロファイルやグルコース取込み能を大規模に調節することが知られている(文献、)。本研究によって、ヒトにおいても環境グルコース濃度によって細胞内輸送の ER シャペロンへの依存性が調節を受けることが明らかとなり、グルコース濃度の変化への適応における細胞機能の調節機構の一端が明らかとなった。細胞表面蛋白質は、糖輸送、イオン勾配の生成、増殖因子等を介したシグナル伝達などの細胞の生存や増殖に欠かせない。本研究で明らかとなった、グルコース枯渇環境において蛋白質が細胞表面へ輸送される新規の機構は、グルコース枯渇に近い環境にあるガン細胞が死滅せず細胞機能を保つことに貢献すると考えられるため、この機構はガン治療の良い標的となり得る。GRP78 は細胞のストレス耐性と深く関連しており、GRP78 を大量発現するガンを有する患者の予後が悪化することが知られている(文献)。一方、GRP78 発現の抑制によってガン組織や培養細胞がストレス感受性を示すようになるため、GRP78 がガン治療の標的の一つとみなされている。本研究により存在が示唆された蛋白質の GRP78 非依存的な細胞表面への輸送機構と、GRP78 を同時に抑制すれば、より効果的なガン治療を開発できるものと期待される。それゆえに、GRP78 非依存的な細胞表面への輸送機構の中心的な分子およびその分子機構の全貌の理解は、新規のガン治療法の開発の基盤となるものと期待される。

<引用文献>

Saitoh S, Mori A, Uehara L, Masuda F, Soejima S, Yanagida M., Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR., *Mol Biol Cell.*, 2015, 26 巻, pp.373-386

Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC., Cytokine Stimulation Promotes Glucose Uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Regulation of Glut1 Activity and Trafficking, *Mol Biol Cell.*, 2007, 18 巻, pp.1437-1446

Olsen JM, Sato M, Dallner OS, et al., Glucose uptake in brown fat cells is dependent on mTOR complex 2-promoted GLUT1 translocation., *J Cell Biol.*, 2014, 207 巻, pp.365-374

Kettenbach AN, Deng L, Wu Y, et al., Quantitative phosphoproteomics reveals pathways for coordination of cell growth

and division by the conserved fission yeast kinase pom1., *Mol Cell Proteomics.*, 2015, 14 巻, pp.1275-1287

Lee AS, The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications, *Trends Biochem Sci.*, 2001, 26 巻, pp.504-510

Saitoh S, Yanagida M., Does a shift to limited glucose activate checkpoint control in fission yeast?, *FEBS Lett.* 2014, 588 巻, pp.2373-2378

Lee AS., Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential., *Nat Rev Cancer.* 2014, 14 巻, pp.263-276

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 5 件)

[1] Yusuke Toyoda#, Cedric J Cattin#, Martin P Stewart#, Ina Poser, Mirko Theis, Teymuras V Kurzchalia, Frank Buchholz, Anthony A Hyman, Daniel J Muller. Genome-scale single-cell mechanical phenotyping reveals disease-related genes involved in mitotic rounding. **Nature communications**. 査読有、2017 Nov 2; 8(1): 1266-1276.

<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01147-6>

[2] Elisabeth Fischer-Friedrich, Yusuke Toyoda, Cedric J Cattin, Daniel J Muller, Anthony A Hyman, Frank Julicher. Rheology of the active cell cortex in mitosis. **Biophysical journal**. 査読有、2016 Aug 9; 111(3): 589-600.

doi: 10.1016/j.bpj.2016.06.008

[3] Yusuke Toyoda, Shigeaki Saitoh. Adaptive regulation of glucose transport, glycolysis and respiration for cell proliferation. **Bimolecular concepts**. 査読有、2015 Dec 1; 6(5-6): 423-430.

DOI:<https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0018>

[4] Barbara Sorce, Carlos Escobedo, Yusuke Toyoda, Martin P Stewart, Cedric J Cattin, Richard Newton, Indranil Banerjee, Alexander Stettler, Botond Roska, Suzanne Eaton, Anthony A Hyman, Andreas Hierlemann, Daniel J Muller. Mitotic cells contract actomyosin cortex and generate pressure to round against or escape epithelial confinement. **Nature communications**. 査読有、2015 Nov 25; 6: 8872-8883.

doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms9872>

[5] Marco Y Hein, Nina C Hubner, Ina Poser, Jurgen Cox, Nagarjuna Nagaraj, Yusuke Toyoda, Igor A Gak, Ina Weisswange, Jorg

Mansfeld, Frank Buchholz, Anthony A Hyman, Matthias Mann. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell*. 査読有、2015 Oct 22; 163(3): 712-723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.053>

〔学会発表〕(計 9件)

[1] 発表者：豊田雄介、発表標題：分裂酵母六炭糖輸送体 Ght5 の細胞内局在のリン酸化による制御機構、学会等名：ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会、2017年12月8日

[2] 発表者：豊田雄介、発表標題：TORC2 シグナル経路を介した分裂酵母六炭糖輸送体 Ght5 の細胞内局在の制御機構、学会等名：第7回 TOR 研究会(九州大学、福岡市) 2017年9月25日

[3] 発表者：豊田雄介、発表標題：Regulations of the fission yeast high-affinity hexose transporter Ght5 in response to environmental glucose levels、学会等名：The 9th International Fission Yeast Meeting (Pombe2017) (Banff Centre、カナダ) 2017年5月14日

[4] 発表者：豊田雄介、発表標題：グルコース欠失により膜画分に増量するタンパク質群はグルコース代謝に機能する、学会等名：第39回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜、横浜市) 2016年12月2日

[5] 発表者：豊田雄介、発表標題：TORC2 シグナル経路を介したエネルギー代謝調節機構の探求、学会等名：第6回 TOR 研究会(東京大学、文京区) 2015年10月16日

[6] 発表者：豊田雄介、発表標題：パーキンソン病関連グリオキサラーゼ DJ-1 の原子間力顕微鏡を用いた生物物理学的研究、学会等名：第48回分子医学入門塾(国立国際医療センター、新宿区) 2016年5月17日

[7] 発表者：豊田雄介、発表標題：Increased sensitivity of mammalian cells to mitochondrial toxins in the glucose-limited environment、学会等名：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 合同大会)(神戸ポートアイランド、神戸市) 2015年12月2日

[8] 発表者：豊田雄介、発表標題：TORC2 シグナル経路を介したエネルギー代謝調節機構の探求、学会等名：第5回 TOR 研究会(新潟大学、新潟市) 2015年10月16日

[9] 発表者：豊田雄介、発表標題：Genetic screen for mitotic cell mechanics identifies the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1、学会等名：The 26th CDB Meeting - Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization(理研 CDB、神戸市) 2015年9月8日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：Glycolic acid and/or D-lactic acid for the treatment of neurodegenerative diseases

発明者：Teymuras Kurzchalia, Anthony A Hyman, Yusuke Toyoda, PAN-MONTOJO Francisco, Cihan Erkut

権利者：Teymuras Kurzchalia, Anthony A Hyman, Yusuke Toyoda, PAN-MONTOJO Francisco, Cihan Erkut

種類：

番号：US 15532930

出願年月日：2017年11月16日

国内外の別：国外

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kurume-u.ac.jp/site/lifescience/top-page.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 雄介 (TOYODA, Yusuke)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：10587653

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

齋藤 成昭 (SAITOH, Shigeaki)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

柳田 充弘 (YANAGIDA, Mitsuhiro)

沖縄科学技術大学院大学・GOユニット・教授

佐二木 健一 (SAJIKI, Kenichi)

沖縄科学技術大学院大学・GOユニット・研究員

Nurhan Ozlu

Koc University (Turkey), Assistant Professor