

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18680

研究課題名(和文) アミノ酸による細胞内カルシウム上昇を介した情報伝達経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of cellular signal transduction by amino acids via intracellular Ca<sup>2+</sup> rise

研究代表者

高原 照直 (Takahara, Terunao)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90708059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞のアミノ酸感知機構へのCa<sup>2+</sup>の役割およびその細胞応答を明らかにすることを目的としている。アミノ酸飢餓した細胞に、アミノ酸を投与することで細胞外からCa<sup>2+</sup>が流入し、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇する。この機構に関して、種々の阻害剤を用いた解析により、Amiloride感受性の因子を介してCa<sup>2+</sup>濃度が上昇することが分かった。また、流入したCa<sup>2+</sup>により細胞内アミノ酸応答経路の主要因子mTORC1がどのように調節を受けるかを解析した結果、mTORC1活性化因子として知られるRheb GTPaseの働きにCa<sup>2+</sup>が関与することが判明し、Ca<sup>2+</sup>による新規mTORC1制御機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to clarify the role of Ca<sup>2+</sup> in the cellular mechanism of amino acids sensing and the cellular response. Addition of amino acids to the amino acid-starved cell induces the Ca<sup>2+</sup> entry from extracellular space, leading to the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. By using the several inhibitors that target particular Ca<sup>2+</sup> channels, we identified that Amiloride-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel appears to be responsible for the Ca<sup>2+</sup> entry. In addition, we also investigated how increased Ca<sup>2+</sup> levels affect the mTORC1, which is a central regulator of amino acid sensing pathway. It is known that amino acids activate mTORC1 via two distinct small GTPases, called Rag GTPases and Rheb GTPase. We found that the action of Rheb GTPase but not Rag was affected by Ca<sup>2+</sup>. These results suggest a novel regulatory mechanism of mTORC1 through the change of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in response to amino acids.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：mTOR アミノ酸 カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸などの栄養源感知に関わるプロテインキナーゼ複合体 mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) は、タンパク質合成やオートファジーなどの異化/同化作用を制御し細胞成長(大きさ)を制御する主要な因子である。種々の生理機能を担うため、mTORC1 は栄養源量(特にアミノ酸)、インスリンなどの増殖因子、また低酸素やエネルギー枯渇、酸化ストレスに高い感受性を示し、生体の恒常性維持に重要な働きをもつことが明らかにされている(Laplante and Sabatini, *Cell*, 2012, 149:274)。既に mTORC1 活性調節の破綻と糖尿病などの代謝性疾患や発がんとの因果関係が示唆されている。しかしながら、様々な状況下で mTORC1 活性が適切に制御される仕組みは分かっていない点が多く、その解明は mTORC1 経路における課題の1つである。

アミノ酸による mTORC1 活性化には、低分子量 G タンパク質の一種である Rag GTPases が関わる。Rag GTPases は mTORC1 のリソソーム膜への局在化を促進して、mTORC1 を活性化する。また最近 Rag GTPases 自体の活性制御に関わる GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) や GAP (GTPase 活性化因子) が相次いで報告されたが(Bar-Peled and Sabatini, *Trends Cell Biol.*, 2014, 24:400) その上流因子などのアミノ酸シグナル全体像は不明な点が多い。我々は最近、アミノ酸飢餓させた哺乳類培養細胞にアミノ酸を投与すると、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇すること、また  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤の前処理によりこの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を抑制すると、mTORC1 活性化が抑制されることを見出した。すなわち、アミノ酸シグナルによる mTORC1 の活性化には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

アミノ酸シグナルによる mTORC1 活性化に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の役割を明らかにする。特に、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇に関わる因子と  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを mTORC1 へと伝達する因子を同定し、それらによるアミノ酸シグナル制御の分子基盤を明らかにする。以下の2点について解析を進める。

(1) アミノ酸投与により細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が促進されるため、この  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関わる形質膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの同定を試みる。

(2)  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の1つである ALG-2 が mTORC1 活性化に関わる可能性があり、また mTORC1 活性化に関わると報告のある hVps15 と ALG-2 とが相互作用する可能性を見出していたため、これらの相互作用について検討し、 $\text{Ca}^{2+}$  の mTORC1 活性化への作用点や仲介するタンパク質の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1)  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを標的とした  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関わる因子を  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 (Fura2-AM) とマイクロプレートリーダーを用いて同定する。

(2)  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の mTORC1 への作用点を明らかにするために、 $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤で処理後、mTORC1 細胞内局在や mTORC1 活性への影響を調べる。

(3) ALG-2 と hVps15 との結合を検証する。

## 4. 研究成果

(1)  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関わる因子の同定に向けて複数の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤を使用した結果、amiloride感受性の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが当該の因子である可能性が得られた。さらに amiloride によってアミノ酸依存的な mTORC1 活性化も阻害されることや、この阻害効果が細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を除去した条件では起こらなくなることから、amiloride感受性の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが深く関

わることが判明した。そこでさらに目的の Amiloride感受性のCa<sup>2+</sup>チャネルについての情報を得るために、Amilorideが阻害する既知Ca<sup>2+</sup>チャネルの特異的阻害剤を用いて同様の解析を行ったところ、TRPチャネルが関与することが示唆された。これらの候補について、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いてノックアウトした細胞株を複数作出してmTORC1の活性化への影響を調べた。そのうち幾つかについてはmTORC1活性の低下が確認された。

(2) mTORC1の活性化機構として、低分子量Gタンパク質であるRag GTPaseとRheb GTPaseが関与することが知られている。Rag GTPaseはアミノ酸依存的にmTORC1をリソソーム膜表面にリクルートする。その後、mTORC1の活性化因子であるRheb GTPaseとmTORC1が結合することでmTORC1が活性化される(図1)。

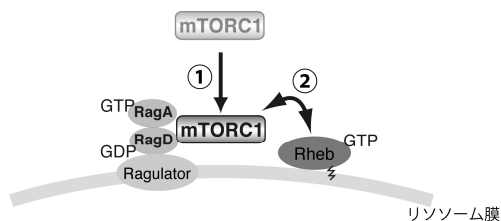


図1 mTORC1 活性化の既知ステップ

- ① mTORC1はアミノ酸依存的に低分子量Gタンパク質RagA/RagDを介して、リソソーム膜状にリクルートされる。RagulatorはRagをリソソームにアンカーするタンパク質。
- ② mTORC1は活性化因子Rheb(低分子量Gタンパク質)と相互作用することで、活性化される。

Ca<sup>2+</sup>のmTORC1経路への作用点について調べるために、Ca<sup>2+</sup>キレート剤によりアミノ酸依存的なCa<sup>2+</sup>上昇を抑制した条件において、アミノ酸依存的なmTORC1のリソソーム局在化を調べたところ、リソソームへの局在化には影響ないことが分かった。さらに1. 恒常的活性化型Rag GTPase, 2. 恒常的活性化型Rheb GTPaseにより、それぞれ人工的にmTORC1活性化状態を作った場合、1の場合にはBAPTA-AMによる細胞内Ca<sup>2+</sup>キレートによるmTORC1活性の低下がみられたが、2の場合に

は耐性を示すことが分かった。これらのことから、Ca<sup>2+</sup>がmTORC1活性化ステップの内、mTORC1-Rhebの結合を制御する可能性が示唆された。そこで、Rhebの野生型と恒常的活性化型を安定的に発現する細胞を作出して、アミノ酸による刺激時のCa<sup>2+</sup>の影響について解析したところ、mTORC1とRhebとの共局在にCa<sup>2+</sup>が関わる可能性が示唆された。また、恒常的活性化型Rheb安定発現細胞においてはCa<sup>2+</sup>キレートによるmTORC1活性の低下がみられなくなった。これらのことは、RhebによるmTORC1活性化のステップにCa<sup>2+</sup>が関わることを強く示唆している(図2)。

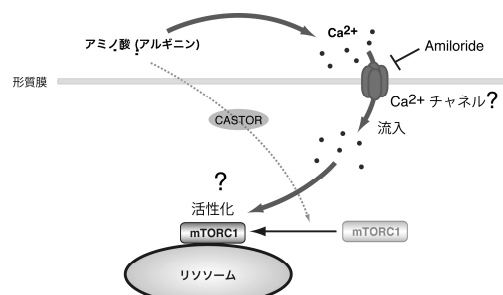


図2 アミノ酸によるCa<sup>2+</sup>上昇と新規mTORC1活性化機構のモデル  
研究により判明したCa<sup>2+</sup>を介した新しいmTORC1活性化機構のモデル。アミノ酸依存的なCa<sup>2+</sup>流入にはamiloride感受性のCa<sup>2+</sup>チャネルが関わっていると推測される。流入したCa<sup>2+</sup>によりmTORC1が活性化されると推測している。CASTORは細胞内アルギニンセンサーとして最近同定されたタンパク質。

(3)アミノ酸によるCa<sup>2+</sup>濃度上昇がCa<sup>2+</sup>結合タンパク質であるALG-2を介して制御に関わる可能性を調べるために、当初hVps15との結合に着目した。しかし細胞内でのこれらの結合は非常に弱く、詳細な解析を断念した。代わりにALG-2との結合がみられた新規相互作用因子MISSLに着目して解析を進めた。MISSLはアミノ酸刺激後の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に応じて、細胞内分泌経路の初期であるER exit site(ERES)へと集積した。またRNA干渉法によってMISSLを発現抑制した結果、MISSLがERESやゴルジ体の局在に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、分泌型アルカリフォスファターゼをモデルタンパク質として分泌過程への影響を評価したところ、MISSLと

ALG-2とが共同して分泌経路を正に制御していることが判明した。

#### 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 2件)

Takashi Kanadome, Hideki Shibata, Keiko Kuwata, Terunao Takahara and Masatoshi Maki. The calcium-binding protein ALG-2 promotes endoplasmic reticulum exit site localization and polymerization of Trk-fused gene (TFG) protein. FEBS J. (2017) 284: 55-76. 査読あり

Masatoshi Maki, Terunao Takahara, and Hideki Shibata. Multifaceted Roles of ALG-2 in Ca<sup>2+</sup>-Regulated Membrane Trafficking. Int. J. Mol. Sci. (2016) 17: E1401 (pp.1-23). 査読あり

[学会発表](計 9件)

高原照直, 中村奈央, 王悦, 渡邊穂実, 柴田秀樹, 牧正敏 アミノ酸は細胞内カルシウム濃度上昇を介して mTORC1 経路を活性化する 日本農芸化学会大会 2017 2017年3月17日~20日口頭発表 京都女子大学(京都)

中村奈央, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 アミノ酸による細胞内カルシウム上昇を介した mTORC1 活性化機構の解析 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日口頭発表、ポスター発表 パシフィコ横浜(横浜)

新居由美香, 井上国子, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 カルシウム結合タンパク質 ALG-2 は相互作用因子 MISSL と共同して分泌経路を制御する 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日 パシフィコ横浜(横浜)

高原照直 細胞内カルシウム上昇を介したアミノ酸依存的 mTORC1 活性化機構 第 6 回 TOR 研究会 2016 年 9 月 30 日~10 月 1 日 口頭発表 東京大学(東京)

中村奈央, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 細胞のアミノ酸感知メカニズムにおけるカルシウムの役割 日本農芸化学会中部支部 第 177 回例会 2016 年 9 月 24 日 名古屋大学(名古屋)

新居由美香, 井上国子, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 カルシウムシグナルを介した細胞内分泌経路制御の解析 日本農芸化

学会中部支部 第 177 回例会 2016 年 9 月 24 日 名古屋大学(名古屋)

井上国子, 新居由美香, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 MISSL はカルシウム結合タンパク質 ALG-2 と共同して初期小胞輸送を制御する 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) 2015 年 12 月 1~4 日 神戸ポートアイランド(神戸)

中村 奈央, 井上 国子, 高原 照直, 柴田 秀樹, 牧 正敏 アミノ酸による mTORC1 活性化におけるカルシウムの作用機構の解析 BMB2015 (日本分子生物学会年会・日本生化学会 合同大会) 2015 年 12 月 ~4 日 神戸ポートアイランド(神戸)

井上国子, 新居裕美香, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 カルシウム結合タンパク質 ALG-2 と相互作用する MISSL の初期小胞輸送における機能解析 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 2015 年 9 月 19 ~20 日 口頭発表 富山県立大学(富山)

[その他]

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~mcr/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高原 照直 (Terunao TAKAHARA)

名古屋大学大学院生命農学研究科・応用分子生命科学専攻・助教

研究者番号：90708059

(2)研究分担者

高原 照直 (Terunao TAKAHARA)

名古屋大学大学院生命農学研究科・応用分子生命科学専攻・助教

研究者番号：90708059

(3)連携研究者

牧 正敏 (Masatoshi MAKI)

名古屋大学大学院生命農学研究科・応用分子生命科学専攻・教授

研究者番号：40183610

柴田秀樹 (Hideki SHIBATA)

名古屋大学大学院生命農学研究科・応用分子生命科学専攻・准教授

研究者番号：30314470