

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19018

研究課題名(和文) リソソーム内アミノ酸情報のmTORへの伝達を担う新因子の探索と機能的意義の解明

研究課題名(英文) Identification of factors involved in the amino acid signaling to mTOR in lysosome and clarification of its functional significance

研究代表者

奥田 傑 (Okuda, Suguru)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50511846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸によって引き起こされる細胞成長・増殖の仕組みを明らかにするため、細胞内でその仕組みに関与する因子の探索、および細胞膜に局在しアミノ酸を細胞内に取り込む役割を持つアミノ酸輸送体の解析を行った。その結果、生体内での役割や機能が明らかになっていないアミノ酸輸送体がどの組織に存在しているかを明らかにし、またその輸送体と共に働く候補因子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸輸送体のなかにはその機能が病気に関連するものが多数存在する。例えば、がんにおいては一部のアミノ酸輸送体が正常な細胞より多く存在するため、アミノ酸の取り込みが速く、細胞の成長・増殖も早い。本研究の成果はアミノ酸による細胞成長・増殖の仕組みを解明するために重要な知見であり、将来的には本研究の成果が新たな薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of cell growth and proliferation induced by amino acids, we sought factors involved in the process, and analyzed an amino acid transporter localizing cell membrane to take amino acids into cells. We successfully determined in which tissue one of the uncharacterized transporters exist, and identified candidates that interacts with the amino acid transporter and may affect its function.

研究分野：蛋白質生化学、薬理学

キーワード：アミノ酸 トランスポーター mTOR 細胞増殖

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は、生体にとってタンパク質を構成する重要な要素であるだけでなく、細胞の多様な代謝応答や細胞機能制御に関与するシグナル因子としての役割を併せ持つ。細胞膜に局在するアミノ酸トランスポーターによって細胞内へ取り込まれたアミノ酸の情報は、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 mTOR (mechanistic target of rapamycin) へと伝達され、細胞内代謝や増殖・成長を制御する。mTOR はアミノ酸以外の栄養素や細胞へのストレスなども感知するが、アミノ酸は最も効率的に mTOR 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 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。近年、アミノ酸による mTORC1 活性化機構が徐々に明らかにされつつあり、細胞内に取り込まれたアミノ酸は、さらにリソソームに取り込まれリソソームの内側から v-ATPase の活性化を介して mTORC1 を活性化するとされているが、その詳細な分子機構は明らかになっていなかった。

2015 年にアミノ酸のなかで最も強く mTORC1 を活性化するロイシンのリソソームへの取り込みに関して、LAT1 (L-type amino acid transporter 1) が寄与していると報告された。これまで細胞膜で機能すると考えられてきた LAT1 がリソソーム膜にも存在するということから、LAT1 によってリソソームに取り込まれたロイシンの情報を感知し、リソソーム膜上に局在する mTORC1 へと伝達するロイシンセンサーがリソソーム内に存在する可能性が考えられる。また同年、リソソーム上で mTORC1 周辺因子と相互作用することで mTORC1 活性に影響を及ぼすアミノ酸トランスポーター SLC38A9 が同定された。このトランスポーターはアルギニンを中心に幅広いアミノ酸輸送活性を有し、アルギニン感知に寄与するものと考えられている。これらのように、リソソーム膜にはアミノ酸トランスポーターが数多く存在すると想定され、それらがアミノ酸依存的に mTORC1 活性に影響を及ぼすアミノ酸センサーあるいはそれを補助する因子として機能している可能性がある。

2. 研究の目的

mTOR は細胞内代謝や増殖・成長を制御し、細胞の生死を決する極めて重要な位置にあるため、その活性制御機構に関して様々な研究が進められている。なかでもアミノ酸は強く mTOR を活性化することが知られているが、その分子機構については不明な点が多い。そこで、本研究ではアミノ酸による mTORC1 活性化機構、細胞成長・増殖機構の解明を目指し、リソソーム内アミノ酸情報伝達に関与する新因子の探索を行う。また、LAT1 のように mTORC1 活性や細胞成長・増殖に強く関与し、病気と強く結びつくトランスポーターが存在する。そこで、機能の解析が進んでいないアミノ酸トランスポーターを解析することで、アミノ酸による mTORC1 活性化や細胞成長・増殖機構の全容解明につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リソソームにおけるアミノ酸情報伝達に関与する因子の探索

リソソーム膜に存在する LAT1 との相互作用因子の同定を行うため、培養細胞を物理的に破碎し、密度勾配遠心法によりリソソーム画分を単離した。その後、イムノブロッティングおよびセルフリーの実験系によって、その画分の mTORC1 活性の評価を行った。また、LAT1 の共免疫沈降実験を行うために用いる界面活性剤の選択などの条件検討を行った。

(2) LAT1 と同じファミリーに属するアミノ酸トランスポーターの解析

LAT1 と同じファミリーに属するアミノ酸トランスポーターのなかには mTOR 活性化に重要なトランスポーターが他にも存在している可能性が考えられることから、LAT1 と同じファミリーに属するアミノ酸トランスポーター SLCX (仮称) の解析を行った。まずはラットを用いて各組織における SLCX の mRNA の発現を確認した。次に SLCX の抗体の作製を試みた。また、mRNA の発現が確認された組織を用い、in situ hybridization や免疫染色を行い、SLCX の局在の確認を行った。さらに SLCX 可溶化条件を決定し、作製した抗体を用いた共免疫沈降実験を行い、質量分析によってその相互作用因子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 培養細胞をテフロンホモジナイザーで破碎し、遠心分離を行うことでリソソームが含まれるライトオルガネラ画分を調製した。その後、多用途密度勾配遠心分離媒体 OptiPrep を用いて、この画分をさらに分離し、リソソーム膜蛋白質である Lamp-1 を指標としたイムノブロッティングにより、リソソームが多く含まれる画分を単離することに成功した。さらに、これまでに確立していた mTORC1 活性を評価するセルフリーの実験系を用いて、この画分が ATP 依存的な mTORC1 の活性を保持していることを確認できたため、この画分を共免疫沈降実験に用いることとした。共免疫沈降実験に関しては、予備実験として細胞を Lysis バッファーに可溶化し、磁気ビーズに LAT1 抗体を固定化し共免疫沈降を行い、溶出画分を SDS-PAGE、銀染色後のバンドを確認したところ、LAT1 と、LAT1 とジスルフィド結合で複合体を形成する 4F2hc がメジャーなバンドとして検出された。Lysis バッファーには界面活性剤 NP-40 が含まれており、この界面活性剤は LAT1 を可溶化することは可能であるが、弱く相互作用する因子は容易に乖離することが予想される。

また、相互作用の強い因子、または一分子の LAT1 に対して多分子が相互作用している場合は銀染色で強いバンドが観察される可能性はあるが、それ以外の場合は銀染色で検出されたバンドを解析するのではなく LC-MS/MS で網羅的に解析する方が適していると考えられる。また、LAT1 を効率よく可溶化するだけではなく、蛋白質間の相互作用を壊しづらい比較的温和な条件で可溶化する必要がある。現在、そのような界面活性剤として DDM (n-Dodecyl- β -D-Maltopyranoside)、LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)、DMNG (Decyl Maltose Neopentyl Glycol) を用いて可溶化した試料を LC-MS/MS で網羅的に解析し、リソソーム内でアミノ酸感受に関与する因子の探索を継続中である。

(2) LAT1 と同じファミリーに属しているトランスポーター SLCX の解析を行うため、抗 SLCX 抗体を作製した。また、SLCX の生体内での役割や機能は明らかになっていないので、ラットを用いて各組織における SLCX の mRNA の発現を RT-PCR により確認したところ、腎臓に多くの発現がみられた(図 1)。また作製した抗体を用いたイムノブロットングにより、ラットの腎臓から回収した膜画分において SLCX の大きさと同程度の 40 kDa 付近にバンドを検出することに成功した。このバンドは SLCX を過剰発現させた細胞株でも検出されたため、作製した抗体は SLCX を認識していることが確認された。次に SLCX の生理的な機能を考察するため、in situ hybridization および免疫染色を行い、このトランスポーターの腎臓内における局在を明らかにした。また、SLCX はアミノ酸取り込みに関与していることが示唆されていることから、その mTORC1 活性化や細胞成長・増殖との関与について調べるため、抗 SLCX 抗体を用いた共免疫沈降実験を行った。その前に可溶化条件の検討を行い、最も効率よく SLCX を可溶化した界面活性剤 DMNG を用いることとした。DMNG によって可溶化したラット腎臓膜画分を抗 SLCX 抗体固定化ビーズと反応させた後、溶出し、共精製された因子を LC-MS/MS によって網羅的に解析した結果、いくつかの因子が同定された。この同定された因子のノックダウンや SLCX との共発現などによってこれらの相互作用因子がトランスポーターの機能や mTORC1 活性、および細胞成長・増殖に与える影響を解明し、本研究を締めくくる予定である。

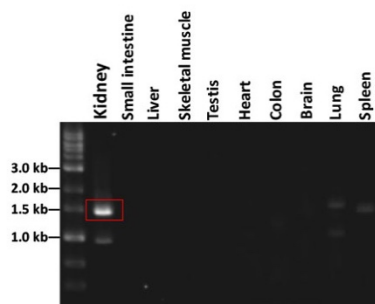


図 1 SLCX の mRNA 発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Miyabe J, Ohgaki R, Saito K, Wei L, Quan L, Jin C, Liu X, Okuda S, Nagamori S, Ohki H, Yoshino K, Inohara H, Kanai Y., “Boron delivery for boron neutron capture therapy targeting a cancer-upregulated oligopeptide transporter” *J Pharmacol Sci.* 139(3), 215-222 (2019) 査読あり
- ② Ohgaki R, Teramura Y, Hayashi D, Quan L, Okuda S, Nagamori S, Takai M, Kanai Y., “Ratiometric fluorescence imaging of cell surface pH by poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugated with fluorescein isothiocyanate” *Sci Rep.* 7(1):17484. doi: 10.1038/s41598-017-17459-y (2017) 査読あり
- ③ 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.* 37(11) pii:e00427-16 (2017) 査読あり
- ④ 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.* 133(2), 96-102 (2017) 査読あり
- ⑤ Ohgaki R, Wei L, Yamada K, Hara T, Kuriyama C, Okuda S, Ueta K, Shiotani M, Nagamori S, Kanai Y., “Interaction of the sodium/glucose cotransporter (SGLT) 2 inhibitor canagliflozin with SGLT1 and SGLT2: inhibition kinetics, sidedness of action, and transporter-associated incorporation accounting for its pharmacodynamic and pharmacokinetic features” *J Pharmacol Exp Ther.* 358(1), 94-102 (2016) 査読あり

[学会発表] (計 20 件)

- ① Identification of substrate recognition by leucine-specific binding protein
Yu Ma, Pattama Wiriyasermkul, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
第 92 回 日本薬理学会年会 2019 年 3 月
- ② アミノ酸アベイラビリティが細胞内遊離アミノ酸濃度に与える影響
西窪 航, 大垣 隆一, 岡西 広樹, 奥田 傑, 金井 好克

- 第 92 回 日本薬理学会年会 2019 年 3 月
- ③ Critical moieties of aromatic amino acids for the interaction with organic anion transporter OAT1: Implications for reducing the renal background in tumor imaging. Chunhuan Jin, Ling Wei, Ryuichi Ohgaki, Hideyuki Tominaga, Suguru Okuda, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
第 92 回 日本薬理学会年会 2019 年 3 月
- ④ Combination of amino acids necessary and sufficient for the optimal activation of mTORC1
Ryuichi Ohgaki, Chunhuan Jin, Suguru Okuda, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
18th World congress of basic and clinical pharmacology 2018 年 7 月
- ⑤ Structure-activity relations of aromatic amino acid derivatives to interact with organic anion transporter OAT1 reveal critical moieties for renal accumulation of tumor imaging probes
Chunhuan Jin, Ryuichi Ohgaki, Hideyuki Tominaga, Suguru Okuda, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
18th World congress of basic and clinical pharmacology 2018 年 7 月
- ⑥ Effect of five amino acids stimulation on mTORC1 signaling pathway in HEK293T cells
Xuhao Huang, Chunhuan Jin, Ryuichi Ohgaki, Suguru Okuda, Yoshikatsu Kanai
Campus Asia Program Faculty Meeting, Symposium and Workshop 2018 年 3 月
- ⑦ Non-competitive LAT1 inhibitors suppress mTORC1 signaling similiary to competitive LAT1 inhibitors
Pornparn Kongpracha, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Yoshikatsu Kanai, Shushi Nagamori
第 132 回 日本薬理学会近畿部会 2017 年 11 月
- ⑧ Phosphoproteomics reveals the cellular processes affected by leucine transported through LAT1, a cancer type amino acid transporter” .
Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
日本プロテオーム学会 2017 年大会 JHUP0 第 15 回大会 2017 年 7 月
- ⑨ Structure-activity relationship of novel inhibitors for cancer type amino acid transporter LAT1
Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyasermkul, Kazuko Kaneda-Nakashima, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai
第 131 回 日本薬理学会近畿部会 2017 年 6 月
- ⑩ A C-terminus mutation of SLC7A9 amino acid transporter retains substrate binding but diminishes the transport activity.
Nagamori S, Kawamoto Y, Wiriyasermkul P, Nakagomi S, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y.
Gordon Research Conference: Mechanisms of Membrane Transport 2017 年 6 月
- ⑪ 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
奥田傑、ウイリヤサムクン パッタマー、大垣隆一、永森収志、金井好克
第 90 回 日本薬理学会年会 2017 年 3 月
- ⑫ LAT1 による認識と mTORC1 シグナル活性化に必要なロイシンの構造部位の同定
奥田傑、ウイリヤサムクン パッタマー、大垣隆一、永森収志、金井好克
第 130 回 日本薬理学会近畿部会 2016 年 11 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/pharma1/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。