

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07752

研究課題名(和文) アミノ酸による細胞応答経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of intracellular signaling pathway regulated by amino acids

研究代表者

高原 照直 (Takahara, Terunao)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：90708059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、アミノ酸に反応経路として知られるmechanistic target of rapamycin complex1 (mTORC1)経路におけるカルシウムシグナルの役割について解析した。その結果、アミノ酸投与に付随して起こる細胞内カルシウム濃度の上昇が重要であることが判明した。さらに、このカルシウム濃度変動がどのようにしてmTORC1経路を調節しているかについて解析した。その結果、カルシウム濃度上昇はカルモジュリン (CaM)により感知され、CaMがmTORC1経路上流のTSC2に結合してmTORC1活性を調節するという新しい制御経路の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞はアミノ酸等の細胞内外の状況に応じて、適切な応答をすることが必要であり、細胞内ホメオスタシス維持の破綻は糖尿病などの代謝性疾患や発がんなどと密接に関わることが明らかになってきている。細胞内シグナル伝達因子であるmechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)は、細胞内の異化・同化を制御する中心因子である。本研究では、カルシウムシグナルがmTORC1活性の調節に関わること、またその仕組みの一端を明らかにした。この知見からカルシウム量に応じてmTORC1活性が厳密に制御されることが重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the role of calcium signaling in the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway, which is known as a central role in response to amino acids. Our findings revealed that the increase in intracellular calcium concentration caused by amino acids was important for mTORC1 regulation. Furthermore, we analyzed how these calcium concentration fluctuations regulate the mTORC1 pathway, Our results suggested that calmodulin binds to TSC2 acting upstream of mTORC1 pathway and regulates mTORC1 activity.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：アミノ酸 カルシウム mTOR mTORC1 TSC2

## 1. 研究開始当初の背景

生物は外部の栄養源量に併せて適切に成長や増殖を制御している。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、また各種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。実際に、mTORC1 活性調節の破綻は糖尿病などの代謝性疾患や発がんと密接に関わることが知られている。

アミノ酸による mTORC1 活性化の中心として、低分子量 G タンパク質の一種である Rag GTPase がこれまでに同定されている。Rag GTPase は mTORC1 のリソソーム膜への局在化を促進することで、mTORC1 の活性化に関わる。最近 Rag GTPase 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 (Bar-Peled and Sabatini, *Trends Cell Biol.*, 2014)。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や、個々のアミノ酸が感知される分子機構などについて依然として未解明な点が多く、それらの解明は mTORC1 経路における課題の 1 つである。

申請者は哺乳類培養細胞にアミノ酸を投与すると、細胞外から  $Ca^{2+}$  流入が起こり細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することを見出し、これがアミノ酸に応じた mTORC1 活性化に重要であることを見出してきた。また、この  $Ca^{2+}$  濃度上昇を感知してタンパク質分泌経路を制御する新しい分子機構を明らかにしていた。しかし、アミノ酸投与に付随して起こる  $Ca^{2+}$  濃度上昇がどのような因子を介して mTORC1 制御に関わるかはほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究はこれまでの申請者の研究結果を基に、アミノ酸による mTORC1 活性化機構への細胞内  $Ca^{2+}$  上昇の役割を明らかにすることを目的とした。特に、この  $Ca^{2+}$  の役割の解明に重要な 2 つの因子として、「アミノ酸投与により細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を担う因子」、および「細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を mTORC1 活性化へと伝達する因子」を想定し、これらの同定とこれらの関連因子を含めて解析することにより、 $Ca^{2+}$  を介した mTORC1 活性化の分子基盤とその意義を明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では主に、下記 2 点についての解析した。

### (1) アミノ酸投与により細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入を担う因子の同定と機能解析

これまでに、細胞外  $Ca^{2+}$  をキレートするとアミノ酸投与による細胞内  $Ca^{2+}$  上昇が起こらないことを見出している。すなわちアミノ酸投与により細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入が促進される。そこでこの  $Ca^{2+}$  流入に関わる形質膜上の  $Ca^{2+}$  チャネルを同定する。これまでに  $Ca^{2+}$  チャネルに対する阻害剤を用いたスクリーニングから、amiloride という薬剤が  $Ca^{2+}$  の上昇及び mTORC1 活性化を抑制することを見出している。この amiloride は複数の  $Ca^{2+}$  チャネルを標的にすると報告されている。そこで標的  $Ca^{2+}$  チャネルの分子実体を明らかにするため、候補  $Ca^{2+}$  チャネルの発現抑制条件や、ゲノム編集によりノックアウト細胞を作製し、 $Ca^{2+}$  流入量と mTORC1 への影響の有無を調べる。さらに、アミノ酸依存的  $Ca^{2+}$  上昇の細胞応答への意義を明らかにするために、ノックアウト細胞でのオートファジーやタンパク質分泌への影響を調べる。

### (2) 細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇を mTORC1 活性化へと伝達する因子の同定と活性化への役割

これまでの解析から、細胞内の  $Ca^{2+}$  は mTORC1 のリソソーム局在には関与しないことを明らかにしている。このことは、アミノ酸による mTORC1 活性化には、既知のリソソーム局在制御以外の新しい制御機構が存在することを強く示唆する。リソソームに局在化した mTORC1 は活性化因子 Rheb と結合することで最終的に活性化されると考えられている。そこで、このリソソーム局在化以降の活性化ステップに  $Ca^{2+}$  が介在する可能性を調べる。さらに、 $Ca^{2+}$  を介した制御の分子基盤の解明に向けて、Rheb あるいは mTORC1 の新規相互作用因子の同定を行う。同定された因子については過剰発現あるいはノックアウト細胞を用いて、mTORC1 活性への寄与を明らかにすることで、 $Ca^{2+}$  による mTORC1 制御の詳細を解明する。

## 4. 研究成果

### (1) アミノ酸依存的 $Ca^{2+}$ 流入を担う因子

amiloride の標的  $Ca^{2+}$  チャネルについて CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により、複数の  $Ca^{2+}$  チャネルについてノックアウト細胞を構築した。これらはいずれも通常状態でも特に生育異常な

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

どは示さなかった。その後、アミノ酸依存的な mTORC1 活性化への影響について解析したが、いずれのノックアウト細胞も mTORC1 の活性低下はみられなかった。このことから当該 Ca<sup>2+</sup>チャネルは複数存在する可能性が考えられた。また、amiloride 以外の Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害剤について種々の検討を行ったが、amiloride と同様に mTORC1 活性を低下させる作用を発揮する阻害剤を見出すことができなかった。そのため、アミノ酸依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入を制御する因子の実体を見出すには、複数の候補因子のノックダウン実験などが必要である可能性や、アミノ酸による Ca<sup>2+</sup>流入にはより複雑な多段階の制御を介する可能性が考えられた。

### (2)カルシウム濃度上昇依存的な mTORC1 活性化の細胞内機能への影響

mTORC1 の機能として、タンパク質の翻訳制御が知られている。そこで、アミノ酸依存的な Ca<sup>2+</sup>シグナルがタンパク質合成能に影響するかを検証した。puromycin が tyrosyl tRNA の代わりに取り込まれることを利用した puromycin ラベリング法により、タンパク質合成量を調べた。その結果、Ca<sup>2+</sup>キレート剤である EGTA の前処理により、アミノ酸依存的なタンパク質合成が抑制されたことから、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇がタンパク質合成にも影響することがわかった。また、EGTA の抑制効果は、mTOR 阻害剤である Torin1 によるタンパク質合成をさらに低下させることはなかった。これらのことからアミノ酸による細胞内カルシウム濃度上昇が mTORC1 依存的なタンパク質合成に深く関与することが示唆された。さらに mTORC1 の基質であり、リソソーム生合成の制御を司る転写因子である TFEB のリン酸化への影響を調べた。その結果、EGTA による Ca<sup>2+</sup>キレートによってアミノ酸依存的な TFEB のリン酸化が抑制される結果が得られた。これらのことから、アミノ酸依存的な Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が mTORC1 の広範な細胞機能に影響を与える重要なシグナルの一端を担うことが強く示唆された。

### (3)アミノ酸依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を感知する因子の同定

Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質に焦点を当て、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇から mTORC1 活性化へとつなげる因子の探索を行った。その結果、カルモジュリン (CaM) の阻害剤により、mTORC1 基質の 1 つである S6K1 のリン酸化が抑制されることがわかった。したがって、アミノ酸による細胞内カルシウム濃度上昇は CaM を介して mTORC1 へと伝達されることが考えられた。次に、CaM と既知 mTORC1 経路構成因子と結合する可能性について検討した。その結果、CaM は TSC2 とカルシウム依存的に結合することが明らかとなった。さらに CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集により TSC2 ノックアウト細胞を構築した。この TSC2 KO 細胞に CaM 阻害剤を処理すると、親細胞に比べて、S6K1 の脱リン酸化が抑制されており、CaM 阻害剤に耐性を示した。以上の結果から、細胞内カルシウム濃度上昇は CaM-TSC2 を介して mTORC1 を制御することが示唆された。そこで、CaM と TSC2 との結合がどのようにして行われているかを免疫沈降法により解析を進めた。その結果、CaM は TSC2 の N 末端側と C 末端側の複数箇所での結合する可能性が考えられた。このような CaM と全長 TSC2 との結合に関する報告はなく、新しい制御機構の可能性が示唆された。さらに、TSC2 の標的である Rheb GTPase 恒常的活性化型変異体発現細胞において CaM 阻害剤の効果を検証したところ、こちらも mTORC1 活性の低下が抑制された。これらのことから、CaM が TSC2 に結合することで、Rheb GTPase に対する TSC2 の抑制作用を解除することにより、mTORC1 活性化に貢献する経路の存在が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Terunao Takahara, Yumika Arai, Yuta Kono, Hideki Shibata, Masatoshi Maki	4. 巻 497
2. 論文標題 A microtubule-associated protein MAP1B binds to and regulates localization of a calcium-binding protein ALG-2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 492-498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.048">https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.048</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terunao Takahara, Kuniko Inoue, Yumika Arai, Keiko Kuwata, Hideki Shibata, Masatoshi Maki	4. 巻 292
2. 論文標題 The calcium-binding protein ALG-2 regulates protein secretion and trafficking via interactions with MISSL and MAP1B proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17057-17072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI10.1074/jbc.M117.800201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Wei, Takahara Terunao, Achiha Takuya, Shibata Hideki, Maki Masatoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Nanoluciferase Reporter Gene System Directed by Tandemly Repeated Pseudo-Palindromic NFAT-Response Elements Facilitates Analysis of Biological Endpoint Effects of Cellular Ca <sup>2+</sup> Mobilization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 605 ~ 605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms19020605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Wei, Takahara Terunao, Achiha Takuya, Shibata Hideki, Maki Masatoshi	4. 巻 1929
2. 論文標題 Cellular Ca <sup>2+</sup> -Responding Nanoluciferase Reporter Gene System Directed by Tandemly Repeated Pseudo-palindromic NFAT-Response Elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/978-1-4939-9030-6_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Wei、Matsuo Rina、Takahara Terunao、Shibata Hideki、Maki Masatoshi	4. 巻 1929
2. 論文標題 High Sensitive Quantitative Binding Assays Using a Nanoluciferase-Fused Probe for Analysis of ALG-2-Interacting Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 501 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/978-1-4939-9030-6_31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Terunao Takahara, Kuniko Inoue, Yumika Arai, Keiko Kuwata, Hideki Shibata, Masatoshi Maki
2. 発表標題 The calcium-binding protein ALG-2 binds to novel ALG-2-interacting proteins MISSL and MAP1B and regulates the secretory pathway
3. 学会等名 CaBP20 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新居 裕美香、井上 国子、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏
2. 発表標題 カルシウム結合タンパク質ALG-2はMISSL、MAP1Bと結合して分泌経路を制御する
3. 学会等名 ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野 雄太、新居 裕美香、高原 照直、柴田 秀樹、牧 正敏
2. 発表標題 微小管結合タンパク質MAP1B内のCa <sup>2+</sup> を介した新規機能領域の同定と解析
3. 学会等名 ConBio2017 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新居裕美香、井上国子、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 カルシウムシグナルによる分泌経路の新規制御メカニズム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第180回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河野雄太、新居裕美香、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 微小管結合タンパク質MAP1B内のCa <sup>2+</sup> を介した新規機能領域の同定と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第180回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高原照直
2. 発表標題 アミノ酸依存的mTORC1活性化における細胞内カルシウムの役割の解析
3. 学会等名 第8回 TOR研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野雄太、新居裕美香、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 微小管結合タンパク質MAP1Bを介したアポトーシス誘導経路の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田奈央、石井千愛、渡邊穂実、王悦、中村奈央、高原照直、柴田英樹、牧正敏
2. 発表標題 アミノ酸によるmTORC1活性調節におけるカルシウムシグナルの役割の解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高原照直、池田奈央、石井千愛、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 アミノ酸によるmTORC1活性化の新規メカニズムの解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高原照直、池田奈央、杉山理紗、石井千愛、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 アミノ酸応答性mTORC1制御におけるカルシウムシグナルの意義
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高原照直
2. 発表標題 アミノ酸依存的mTORC1活性化におけるカルシウムシグナルの意義
3. 学会等名 第9回 TOR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小倉 健輔, 河野 雄太, 柴田 秀樹, 牧 正敏, 高原 照直
2. 発表標題 Hippo経路因子Mst1による微小管結合タンパク質MAP1B制御を介した細胞機能制御の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 千愛, 池田 奈央, 桑田 啓子, 柴田 秀樹, 牧 正敏, 高原 照直
2. 発表標題 Rheb GTPaseによるmTORC1経路制御機構の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山 理紗, 池田 奈央, 石井 千愛, 柴田 秀樹, 牧 正敏, 高原 照直
2. 発表標題 mTORC1経路制御におけるアミノ酸依存的Ca <sup>2+</sup> シグナルの役割の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 奈央, 石井 千愛, 杉山 理紗, 雨宮 優奈, 柴田 秀樹, 牧 正敏, 高原 照直
2. 発表標題 TSC2のGAP活性調節におけるcalmodulinの役割の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	牧 正敏  (Maki Masatoshi)  (40183610)	名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授   (13901)	
連携研究者	柴田 秀樹  (Shibata Hideki)  (30314470)	名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授   (13901)	