

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：33939

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07806

研究課題名（和文）アミノ酸飢餓後のタンパク質異化を制御する新規分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms regulating anabolic pathways after amino acid starvation

研究代表者

井澤 一郎 (Izawa, Ichiro)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・教授

研究者番号：20311441

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）：アミノ酸飢餓に対する細胞応答において、細菌Obgタンパク質ファミリーに属するヒトObgH2が果たす役割について検討した。我々はまず、内在性のObgH2がミトコンドリアに局在することを観察した。そして、HEK293T細胞において、RNA干渉法を用いてObgH2タンパク質の発現を抑制した後、アミノ酸を欠く培地で培養して解析したところ、ObgH2はアミノ酸飢餓後の細胞応答に明らかな関与はしていないとの結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Obgファミリータンパク質は細菌からヒトまで保存されており、重要な機能を担っていることが推測される。本研究では、ヒトObgタンパク質ObgH2の機能を解析し、ObgH2がアミノ酸欠乏のシグナルには関与していないとの結果を得た。最近問題となっている薬剤耐性の克服を目指して、細菌Obgの機能を解析する研究も報告されているので、細菌とヒトのObgの機能の差異を明らかにしていくことは重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We examined the roles of ObgH2, a human homolog of the bacterial Obg family proteins, in the cellular responses to the amino acid starvation. We observed that endogenous ObgH2 localized at the mitochondria. We found that in HEK293T cells, the knockdown of ObgH2 using siRNAi did not markedly affect the cellular responses after the amino acid starvation.

研究分野：栄養生化学

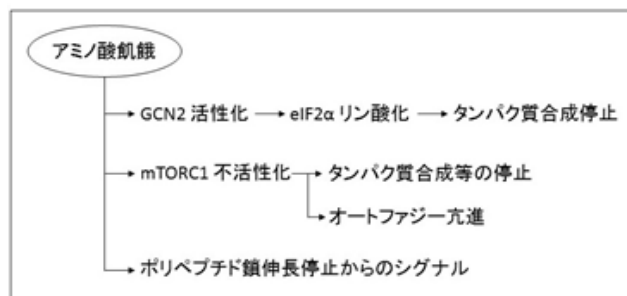
キーワード：ミトコンドリア リボソーム アミノ酸飢餓 ストレス応答

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者が筋肉量の低下をきたす病態であるサルコペニアがおきるメカニズムとして、高齢者では食後(タンパク質摂取後)に誘導される骨格筋におけるタンパク質合成が成人に比べて低下する anabolic resistance (同化抵抗性) が存在し、必須アミノ酸が十分存在しても、mTORC1 やその下流のシグナルの活性化が抑制されていてタンパク質合成が行われないことなどが考えられているが、その詳細は現在のところ明らかではない。一方、近年、慢性腎臓病 (CKD) や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの疾患や大きなストレスがかかる病態では、生体内でタンパク質異化 (catabolism) が亢進するために、患者の状態がさらに悪化する悪循環をきたすことがわかってきている。これらのアミノ酸によるタンパク質合成誘導やタンパク質異化の代謝異常を伴う病態を解明していくことは、高齢化が進む中で増加していくと推測されるさまざまな生活習慣病の予防・治療のために重要である。

(2) アミノ酸飢餓に対する細胞応答として、これまでに明らかになっている主な分子メカニズムは、(i) アミノ酸飢餓によってセリン/スレオニンキナーゼである GCN2 が活性化し、真核生物タンパク質合成開始因子 eukaryotic initiation factor (eIF) 2 $\alpha$  のセリン 51 をリン酸化して、リボソームにおけるタンパク質合成複合体の形成を阻害する、(ii) アミノ酸飢餓 (特にロイシン欠乏) によって、細胞内代謝で中心的役割を果たす mTORC1 複合体の活性化が妨げられ、リボソームでのタンパク質合成が低下するとともに、オートファジーが誘導され、自己タンパク質を分解してアミノ酸を産生する、(iii) アミノ酸が不足して、リボソームにおいてポリペプチド鎖の伸長が停止することによってシグナルが生じる、などである。



(3) Obg ファミリー蛋白質は、大腸菌からヒトまで保存されている低分子量 G 蛋白質で、ヒトでは、ObgH1 (別名 GTPBP5) および ObgH2 (別名 GTPBP10) の 2 つの遺伝子が存在する。ObgH1 は、酵母 Mtg2 タンパク質のヒトホモログであり、Mtg2 と同様に、ミトコンドリアに存在してミトコンドリアのリボソームの生合成に関与することが報告されている。一方、本研究課題で探究する ObgH2 は、これまで 1 報の論文で核小体に存在することが報告されている (Hirano et al., Genes Cells 11:1295-1304, 2006) もの、その機能等の詳細はわかっていない。一方、大腸菌 Obg は、リボソームの成熟、DNA 複製、ストレス応答などの様々な機能をもつことが報告されている (Kint et al., Crit. Rev. Microbiol. 40:207-224, 2014)。私共は、大腸菌 Obg の機能に関する報告の中に、大腸菌 Obg がアミノ酸飢餓後の応答に影響を与えているとの報告 (Persky et al., Mol. Microbiol. 73:253-266, 2009) があることに注目し、ヒト ObgH2 がアミノ酸飢餓後の応答に関与しているとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

アミノ酸飢餓に対する細胞応答において、大腸菌 Obg タンパク質ファミリーのヒトのホモログである ObgH2 が果たす役割、特に ObgH2 がアミノ酸欠乏を感知してタンパク質異化を制御しているかを解析し、新しいアミノ酸感知システムやタンパク質異化の制御機構を分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ObgH2 の性状を明らかにしていくために、ObgH2 の細胞内局在を解析した。まず、ObgH2 タンパク質の N 末端あるいは C 末端に、myc タグまたは GFP を付加したタンパク質を HEK293T 細胞に強制発現して、免疫蛍光染色を行い観察した。また、ObgH2 に対するウサギポリクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、内在性の ObgH2 の細胞内局在を確認した。

(2) HEK293T 細胞をコントロール siRNA あるいは ObgH2 siRNA (5 種類の siRNA を用いて検討) で 48 時間処理した後、10% のウシ胎児血清 (透析後) を加えた、アミノ酸含有あるいはアミノ酸不含の DMEM 培地で 1 時間および 4 時間培養し、mTORC1 経路、オートファジー、GCN2 経路の活性化状態を、各々の抗体マーカー (mTORC1 経路: 抗 phospho-p70 S6 kinase 抗体、抗 4E-BP1 抗体など、オートファジー: 抗 LC3B 抗体、GCN2 経路: 抗 phospho-eIF2 $\alpha$  抗体、など) を用いて、ウェスタンブロッティングを行って解析した。

### 4. 研究成果

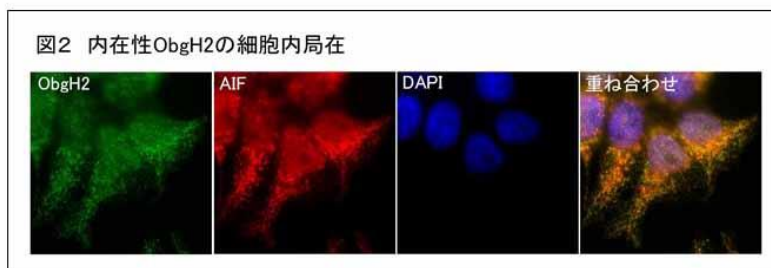
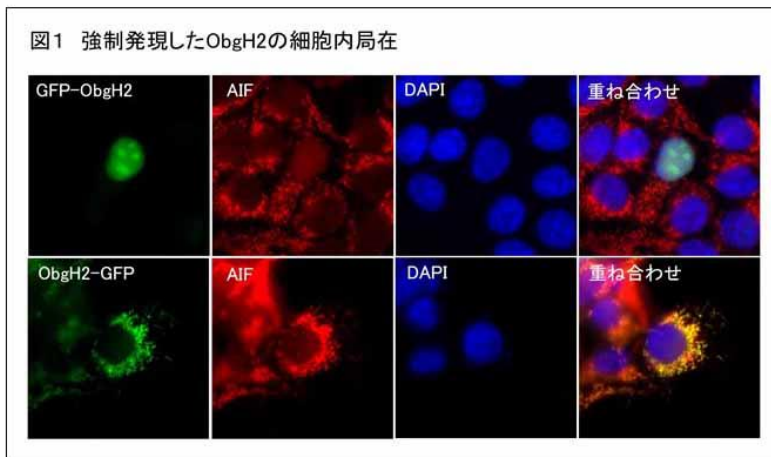
(1) ObgH2 の N 末端に myc タグを付加した myc-ObgH2 は、Hirano ら (Hirano et al., Genes Cells 11:1295-1304, 2006) が報告しているように、主に核小体に局在した。一方、C 末端に myc タグを付加した ObgH2-myc はミトコンドリアに局在した。同様に、GFP を N 末端に付加した GFP-

ObgH2 は主に核小体に局在し、GFP を C 末端に付加した ObgH2-GFP はミトコンドリアに存在した (図 1: ミトコンドリアは抗 AIF 抗体で染色し、核は DAPI で染色した)。

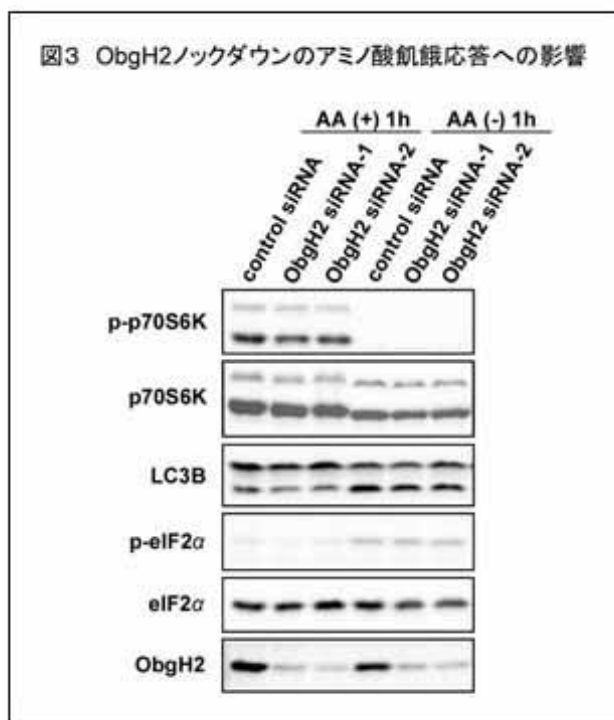
一方、ObgH2 に対するウサギポリクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色で検討したところ、内在性の ObgH2 はミトコンドリアに局在した (図 2: ミトコンドリアは抗 AIF 抗体で染色し、核は DAPI で染色した)。

2018 年に 2 グループから、GTPBP10 (ObgH2 の別名) が、ミトコンドリアのリボソームの生合成・成熟に関与しているとの報告 (Lavdovskaia et al., Nucleic Acids Res. 46:8471-8482, 2018; Maiti et al., Nucleic Acids Res.

46:11423-11437, 2018) がなされたが、その 2 つの論文では、ミトコンドリア分画に GTPBP10 が存在することをウェスタンブロッティングで示している。それらの報告の細胞分画のデータと私共の免疫細胞染色の結果から、ObgH2 はミトコンドリアに主に局在していると考えられるが、例えば、何らかのストレスシグナルにより、ObgH2 の N 末端に存在するミトコンドリア移行シグナル配列が修飾されて機能しなくなると核小体に移行するという可能性は、現時点では完全に否定できないと考えている。



(2) アミノ酸飢餓における ObgH2 の役割を検討するため、RNA 干渉を用いて ObgH2 の発現を減少させた (ノックダウンした) 後、1 時間および 4 時間、アミノ酸を欠いた培地で培養し、mTORC1 シグナルおよびオートファジーをウェスタンブロッティングで解析した。その結果、コントロールと比較して、ObgH2 のノックダウンで、アミノ酸飢餓後の mTORC1 シグナルの減弱およびオートファジーの亢進に大きな変化は検知できなかった。また、同様の実験系でリボソームでの翻訳制御に関与する eIF2 $\alpha$  のリン酸化 (GCN2 などによる) および eEF2 のリン酸化 (eEF2 kinase による) の状態を観察したが、ObgH2 のノックダウンで明らかな変化は認めなかった。得られた結果のうち、1 時間後の代表的データを図 3 に示す。これらの結果より、ObgH2 はアミノ酸飢餓後の細胞応答に大きな役割を果たしていないと考えられた。



(3) 私共が以前の別研究で行った Two-hybrid スクリーニングでクローンとして得ていた ObgH2 の部分的な cDNA、および購入した GTPBP10 の cDNA (pFN21AE2598; Promega) は両方とも、NCBI の RefSeq (GTPBP10: NM\_033107) と比較して 2 か所の塩基が異なっており (264nt:T→G; 329nt:A→G)、2 か所ともアミノ酸も変化していた (それぞれ C→W、N→S に変化) ことから、ObgH2 には遺伝子多型が存在し、多型によりタンパク質の機能に何らかの差がある可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 水口笑菜, 上村優衣, 岸田幸奈, 小池杏佳, 齋藤優里, 田中あず紗, 野々山咲来, 堀江裕子, 南ふらの, 渡邊奈々美, 秦志織, 塚原丘美, 井澤一郎	4. 巻 10
2. 論文標題 健康会席弁当箱の考案	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 名古屋学芸大学健康・栄養研究所年報	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本菜月, 伊藤有理沙, 青戸恭平, 糸川真矢, 佐藤遼, 水川優輝, 山下瑞生, 渡辺菜月, 秦志織, 塚原丘美, 井澤一郎
2. 発表標題 健康会席弁当箱の考案
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会学術総会 (富山)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋学芸大学ホームページ <a href="https://www.nuas.ac.jp/">https://www.nuas.ac.jp/</a>
--

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
---------------------------	-----------------------	----