

平成21年3月2日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790213
 研究課題名（和文） 栄養環境を感知し細胞機能を制御するmTORの新規基質PRAS40の機能解析
 研究課題名（英文） Studies of PRAS40, the novel substrate of mTOR that senses the nutritional environments and regulates cellular functions
 研究代表者
 大城 紀子（OSHIRO NORIKO）
 神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・助教
 研究者番号：70372662

研究成果の概要： mTOR は免疫抑制剤ラパマイシンの細胞内標的として同定されたプロテインキナーゼであり、アミノ酸濃度の上昇により活性化され翻訳調節因子である 4E-BP1 および S6K のリン酸化を介してタンパク合成を制御している。本研究では第3の mTOR 基質として PRAS40 を同定し、mTOR によるリン酸化残基（Ser183）を決定した。PRAS40 はタンパク合成調節以外の mTOR による細胞機能制御に関与する可能性が高く、今後、その機能解明が重要な課題である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般

キーワード： 細胞内シグナル伝達、栄養化学、アミノ酸、mTOR、ラパマイシン、
 プロテインキナーゼ、PRAS40、リン酸化部位特異的抗体

1. 研究開始当初の背景

近年、アミノ酸はタンパク質を構成する原料であるのみならず、シグナル伝達物質としてタンパク合成制御を介して細胞成長の調節に必須の役割を果たしていることが明らかとなり、栄養シグナルのセンシングから細胞応答に至る経路では生理活性物質の受容伝達と同様にタンパク質リン酸化・脱リン酸化反応が重要な役割を果たすことが示されている。すなわち、mTOR (mammalian Target

of Rapamycin) は免疫抑制剤として知られる有機化合物ラパマイシンの細胞内標的タンパク質として同定されたプロテインキナーゼであり、アミノ酸濃度の上昇により活性化され翻訳調節因子として知られる 4E-BP1 および S6K のリン酸化を介してタンパク合成・細胞成長を制御する。なお、ラパマイシンは mTOR に結合しその機能を抑制するが、臓器移植後の免疫抑制剤、抗がん剤、冠状動脈狭窄に対するステント治療後の再狭窄抑制剤と

して治療効果が注目されている。また、代表者の所属する研究室では新規 mTOR 結合タンパク質として raptor (regulatory associated protein of mTOR) を同定し、raptor には mTOR と基質 (4E-BP1、S6K) の両方に結合し、mTOR がこれらの基質を効率よくリン酸化するための足場を提供するスキファールドタンパク質として作用することを明らかにしていた。

mTOR はそのシグナリング機構から、当初示された 4E-BP1 と S6K のリン酸化を介するタンパク合成調節のみならず多彩な細胞機能制御に関わることが想定されるが、研究開始当時においてはその基質タンパク質としては上記の 2 件が報告されているのみであった。代表者は 4E-BP1 と S6K の mTOR リン酸化部位には共通な配列は存在せず、またこれらの両基質タンパク質が raptor に結合することから、mTOR の基質特異性は mTOR のキナーゼドメインではなく raptor との相互作用が基質特異性を決定していることを想定し、培養細胞に FLAG-tag を付した raptor を強発現しその結合タンパク質を探索した。その結果、raptor に特異的に結合する約 40 kDa の分子 (p40) を同定することに成功し、予備的検討により p40 が試験管内では mTOR によりリン酸化を受けることが示された。即ち、raptor 結合タンパク質の検索により、第 3 の mTOR 基質の候補となるタンパク質 p40 を見出した。

2. 研究の目的

本研究は raptor 結合タンパク質として見出された p40 の実体を明らかとするとともに、mTOR による p40 のリン酸化部位の同定しその生理的意義の検討することにより、アミノ酸/mTOR シグナル伝達系において p40 が担う生理機能の解析を分子レベルで解明することを目的とした。また、合わせて栄養状態の変化により p40 と同様にリン酸化が変動するタンパク質についても検討を行った。

3. 研究の方法

研究方法の概要は以下のとおりである。

- (1) 免疫沈降法により raptor 結合タンパク質として回収された p40 を用いて、マスマフィンガープリント法により同定を行う
- (2) mTOR による p40 のリン酸化部位を質量分析法により同定する
- (3) p40 およびリン酸化型 p40 を特異的に認識する抗体を作製し、内因性タンパク質およびリン酸化タンパク質の検出、免疫共

沈降法による結合タンパク質の解析、ならびに細胞内局在の検討を行う

- (4) p40 の cDNA をクローニングし、野生型およびリン酸化部位変異体の発現ベクターを構築し培養細胞に発現することにより、その効果を検討する
- (5) siRNA により p40 のノックダウンを行い、その効果を検討する
- (6) 細胞を栄養物の存在下・非存在下、ラバマイシン存在下で培養し、p40 はじめとするリン酸化が変動するタンパク質について検討を行う

4. 研究成果

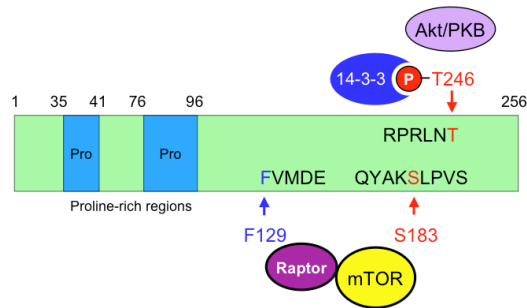
(1) p40 の実体

培養細胞に FLAG-tag を付した raptor を高発現し、その結合タンパク質として回収された p40 が、マスマフィンガープリント法により (Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa) という名称によりプロテインキナーゼ Akt の新規基質として 2003 年に報告された分子であることを明らかにした。PRAS40 はアポトーシス抑制作用を持つ Akt によりその Thr246 がリン酸化を受けることからアポトーシス制御への関与が示唆されているが、その機能の詳細は明らかになっていない。本研究では PRAS40 を特異的に認識する抗体を作製し、免疫沈降法により培養細胞においてもともと発現されている PRAS40 と raptor および mTOR との結合を確認するとともに、この複合体形成は培地からアミノ酸を除いた際に増強されることから、PRAS40 は非リン酸化状態で raptor と会合し、mTOR によりリン酸化を受けることにより解離することが示唆された。また、mTOR 基質である S6K と 4E-BP1 には raptor との結合に必須な役割を果たす TOS (TOR Signaling) motif が存在するが、PRAS40 にも TOS motif と高い相同性を示す領域が存在し、その中に含まれる Phe129 を Ala に置換した変異体は細胞内で raptor とは結合せず、また mTOR によってリン酸化を受けないことが示された。

(2) mTOR による p40 のリン酸化部位

当初、培養細胞から回収した PRAS40 のリン酸化部位について質量分析法による同定を試みたが、明瞭な結果は得られなかった。そこで、試験管内で mTOR によりリン酸化を受けた PRAS40 の解析を行ったところ、リン酸化部位として Ser183 が同定された。そこで、Ser183 を Ala に置換した変異体ならびに Ser183 がリン酸化を受けた PRAS40 を認識す

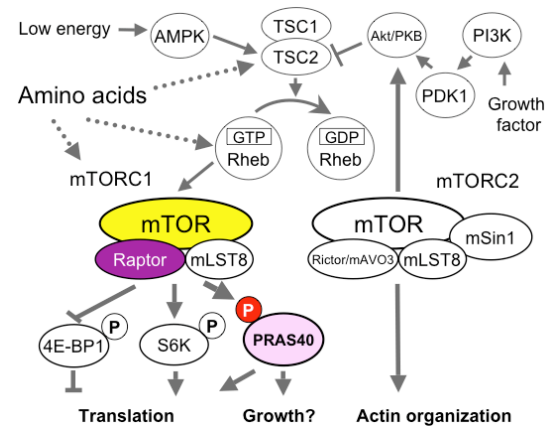
るリン酸化部位特異的抗体を作製し解析を行った。その結果、Ser183をAlaに置換した変異体は試験管内ではmTORによりリン酸化を受けず、また細胞内においてSer183のリン酸化は培地へのアミノ酸添加により増強され、ラパマイシンにより抑制を受けることが示された。従って、Ser183がmTORによるリン酸化部位であると結論された。以上のPRAS40のリン酸化に関する結果を従来の報告と合わせて下図に示す。



(3)mTORによるPRAS40の制御

mTORおよびraptorの複合体については、その上流に活性化因子として低分子量Gタンパク質Rhebが存在し、またRhebには腫瘍抑制因子として知られるTSC1/TSC2複合体がGAP (GTPase-activating protein) として作用し、TSC1/TSC2複合体のGAP活性はプロテインキナーゼAMPKによるリン酸化により増強されることが知られている(本ページ右上図参照)。PRAS40のSer183のリン酸化は、Rhebを細胞に高発現することにより培地からアミノ酸を除去した状態でも観察され、また、アミノ酸添加により誘導されるSer183のリン酸化はTSC1/TSC2複合体の高発現により抑制された。従って、mTORによるPRAS40のリン酸化反応の上流には4E-BP1およびS6Kと同じくRhebとTSC1/TSC2複合体が存在すると思われる。一方、4E-BP1あるいはS6Kを高発現した細胞においては、PRAS40のリン酸化が低下し、またsiRNA法によりPRAS40のノックダウンを行った細胞においては、4E-BP1およびS6Kのリン酸化が亢進することが示された。以上の結果から、細胞内においてPRAS40はraptorとの結合を介するmTORによるリン酸化に関して、4E-BP1ならびにS6Kと競合関係にあるといえる。なお、PRAS40は翻訳制御に直接関与せず、4E-BP1やS6Kよりもアミノ酸濃度の微細な変動に感受性が高いことも見出された。従って、PRAS40はAktを介した細胞増殖因子からのシグナルとともにmTORを介した栄養シグナルを感知する重要な分子としてタンパク合成調節以外

のmTORによる細胞機能制御に関与する可能性が高いと考えられる。



(4) 栄養状態によりリン酸化が変動するタンパク質

培養細胞内におけるPRAS40のリン酸化は培地中のアミノ酸濃度により制御されるが、この栄養状態に依存したリン酸化変動の検討の過程で、グルコース欠乏によりリン酸化が亢進する2つのタンパク質が検出された。そこで、PRAS40に並行してその同定ならびにリン酸化部位の決定を実施した。そのうち一つはGBF1 (Golgi-specific Brefeldin A resistance Factor 1) であることが判明した。GBF1は低分子量GTPaseであるARFのグアニンヌクレオチド交換因子であり、小胞体とゴルジ体との間においてARFを活性化し小胞形成を促進することによりゴルジ体の形態維持に関与することが報告されている。本研究ではGBF1のリン酸化部位ならびにそのリン酸化を担う酵素としてAMPKを同定するとともに、グルコース欠乏により誘導されるゴルジ体の形態変化にAMPKによるGBF1のリン酸化が関与していることが示された。もう一方はGFAT1 (Glutamine:Fructose-6-phosphate Amidotransferase 1) であり、やはりAMPKによりリン酸化を受けることが示された。GFAT1はヘキソサミン生合成経路の律速酵素であり、グルコース枯渇によりそのセリン残基のリン酸化を介して活性調節を受けることが明らかとなった。

mTORとAMPKはともに栄養条件の変動により活性制御を受けるプロテインキナーゼであるが、その性質は大きく異なっている。本研究ではmTORの基質タンパク質としてPRAS40の同定と解析を行い、また並行してAMPKの基質タンパク質としてGBF1ならびにGFAT1の検出に成功した。mTORは限局した基質特異性を示す酵素であることから、そのブ

ロテインキナーゼ活性を指標とした検索によってはその基質タンパク質の同定は困難である。一方、AMPKは広範な基質を認識することから、直接のリン酸化反応による検索では多くの基質候補の中から生理現象に対応する基質タンパク質の選別に多大の労力を要する。多彩な細胞内シグナリングの研究においては、それぞれのプロテインキナーゼの特性を考慮した検索方法を用いることが重要であることが、本研究においても示されている。

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6件)

- ① Oshiro, N., Takahashi, R., Yoshino, K., Tanimura, K., Nakashima, A., Eguchi, S., Miyamoto, T., Hara, K., Takehana, K., Avruch, J., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J. Biol. Chem.* 282, 20329-20339 (2007) 査読有
- ② Nakashima, A., Yoshino, K., Miyamoto, T., Eguchi, S., Oshiro, N., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 361, 218-223 (2007) 査読有
- ③ Miyamoto, T., Oshiro, N., Yoshino, K., Nakashima, A., Eguchi, S., Takahashi, M., Ono, Y., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. AMP-activated protein kinase phosphorylates Golgi-specific brefeldin A resistance factor 1 at Thr1337 to induce disassembly of Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 283, 4430-4438 (2008) 査読有
- ④ Eguchi, S., Oshiro, N., Miyamoto, T., Yoshino, K., Okamoto, S., Ono, T., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes Cells* 14, 179-189 (2009) 査読有

- ⑤ Avruch, J., Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., Oshiro, N., and Kikkawa, U. Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 223-226 (2009) 査読無
- ⑥ Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S.I., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.L., Oshiro, N., and Mizushima, N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* in press 2009 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 大城紀子、吉川 潮 Identification of PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa) as a novel substrate of mTORC1. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会 (BMB2007)、平成19年12月11日～15日
- ② 江口賢史、大城紀子、米澤一仁、吉川 潮 AMPKの新規基質GFAT1の同定と機能解析 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会 (BMB2007)、平成19年12月11日～15日
- ③ 宮本嵩史、大城紀子、米澤一仁、吉川 潮 AMPK regulates the morphology of Golgi through the phosphorylation of GBF1. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学大会合同大会 (BMB2007)、平成19年12月11日～15日
- ④ Eguchi, S., Oshiro, N., Miyamoto, T., Sasaki, T., Yonezawa, K., Kikkawa, U. The regulation of GFAT1 via AMPK signaling. 第60回日本細胞生物学会大会、平成20年6月29日～7月1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城 紀子 (OSHRO NORIKO)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環

バイオシグナル研究センター・助教

研究者番号 ; 70372662

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし