

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390081

研究課題名（和文） mTOR を介する栄養シグナリングのタンパク質ホスファターゼ PP2A による制御機構

研究課題名（英文） Regulation mechanisms of mTOR-mediated nutrient signaling by protein phosphatase PP2A

研究代表者

吉川 潮 (KIKKAWA USHIO)

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・教授

研究者番号：40150354

研究成果の概要（和文）： アミノ酸により制御を受けるプロテインキナーゼ mTOR とタンパク質脱リン酸化反応との関係に着目した検討により、哺乳類培養細胞ではプロテインホスファターゼ制御因子 mTIP41 が mTOR 基質の脱リン酸化の抑圧のみならず mTOR の上流にシグナリングに作用し mTOR の作用を促進することを見出した。この結果は栄養シグナリングの新たな側面であり、アミノ酸による細胞機能制御を明らかにする上で重要である。

研究成果の概要（英文）： We studied the involvement of the protein dephosphorylation reaction in the regulation of the protein kinase named mTOR, that senses the intracellular concentrations of amino acids to control cell proliferation. It was revealed that mTIP41, a regulator of the protein dephosphorylation reaction, enhances the mTOR signaling pathway by not only suppressing the dephosphorylation of mTOR substrates but also playing a role in the upstream of the mTOR protein kinase. These results of nutrient signaling are important to elucidate the cellular regulation mechanisms by amino acids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：シグナル伝達、mTOR、栄養、ホスファターゼ、ラパマイシン、AMPK、mTIP41

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細胞成長の調節に必須な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

るが、アミノ酸濃度の上昇により活性化され翻訳調節因子 4E-BP1 および S6K のリン酸化を介してタンパク合成・細胞成長を制御している。また、mTOR による基質タンパク質のリン酸化反応において足場を提供するスキャフォールドタンパク質として raptor (regulatory associated protein of mTOR) が同定され、raptor を含む mTOR 複合体は mTORC1 と呼ばれている。

一方、TORは元々、出芽酵母においてラパマイシンがもたらす致死効果に対して抵抗性を示す変異遺伝子として見い出された。出芽酵母においては栄養枯渇条件により飢餓応答に必要な遺伝子群の発現が誘導されるが、その栄養シグナリングの過程にはTORならびにタンパク質ホスファターゼ SIT4 (suppressors of initiation of transcription 4, protein phosphatase type 2A (PP2A) 触媒サブユニットに対応するオルソログ) の関与が提唱されている。すなわち SIT4 には TAP42 (type 2A-phosphatase associated protein of 42kDa) と呼ばれる抑制分子が存在し、TAP42 の SIT4 への結合には TOR による TAP42 のリン酸化が必要であることが報告されている。さらに富栄養条件下では SIT4 は TOR によりリン酸化を受けた TAP42 と結合しホスファターゼ活性を發揮しない状態に保たれており、栄養枯渇やラパマイシン処理により TOR が不活性化されると、SIT4 は TAP42 から解離し、この脱リン酸化活性の増幅により転写因子 GLN3 などを活性化し、その結果、飢餓応答に関わる遺伝子群の発現がもたらされると考えられている。また TAP42 と相互作用を示すタンパク質として TIP41 (TAP42-interacting protein of 41kDa) が見い出されており、TIP41 は TAP42 と結合することにより TAP42 と SIT4 を解離させその結果 SIT4 を活性化するが、TIP41 についても TOR によるリン酸化制御を受ける可能性が示されリン酸化状態では TAP42 と結合しないと推定されている。以上のように、出芽酵母においては TOR による脱リン酸化反応の調節が示されているが、哺乳類では mTOR を介する栄養シグナリングにおけるタンパク質ホスファターゼの役割に関してはほとんど研究が行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は哺乳類ではほとんど検討が行われていなかった栄養シグナリングにおけるプロテインキナーゼ mTOR とタンパク質脱リン酸化反応との関係に着目し、アミノ酸により活性制御を受けるプロテインキナーゼ mTOR を中心として、これまでに知られていなかった栄養シグナリングにおける機能制御を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究方法の概要は以下のとおりである。

- (1) 培養細胞中において栄養条件の変化によりリン酸化状態が変動するタンパク質、ならびに mTOR との関係が示唆されるタンパク質脱リン酸化反応について生化学的に解析する。
- (2) 酵母 two-hybrid 法により mTIP41 (本研究の予備的検討により得られた mammalian TIP41) に結合タンパク質を探索し、得られたクローンの発現ベクターを構築する。
- (3) mTIP41 およびその結合タンパク質および mTOR の結合を、培養細胞に発現したタグ付組み換え体ならびにその変異体の免疫沈降法により検討する。
- (4) mTIP41 および alpha4 (本研究の予備的検討により得られた TAP42 の哺乳類オルソログ) をはじめとする対象タンパク質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。
- (5) siRNA により対象タンパク質を特異的にノックダウンし、その効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 栄養条件とタンパク質脱リン酸化反応の検討

研究開始にあたり広い視野から栄養条件とタンパク質脱リン酸化反応について検討した。その結果、mTOR の上流に位置する AMPK (AMP-activated protein kinase) の新規リン酸化基質が複数、同定された。これらのうち、GBF1 は低分子量 GTPase である ARF のグアニ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たが、GBF1 は富栄養条件では脱リン酸化状態にあり、グルコース欠乏により AMPK によるリン酸化が亢進することが判明した。そこで、そのリン酸化部位を同定しリン酸化部位変異体を持った解析により、栄養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。GBF1 の脱リン酸化反応と mTOR との関係については検討を継続している。またタンパク質分解酵素であるカスパーゼと栄養シグナリングを介する細胞増殖との関連を示唆する結果が得られた。

(2) mTIP41 結合タンパク質の検討

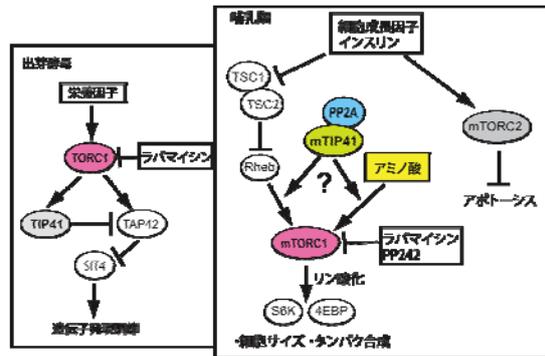
本研究の予備的検討により得られた TIP41 哺乳類オルソログである mTIP41 への結合タンパク質を、酵母 two-hybrid 法により検索した。その結果、PP2A 触媒サブユニットに対

応するオルソログ (PP2Ac) が同定された。そこで、ヒト培養細胞を用いて細胞内での分子間の相互作用の検討を行った。まず内在性の mTIP41 と PP2Ac との結合との結合を検討し、その相互作用を確認することができた。なお、PP2Ac はカルボキシ末端のロイシン残基がメチル化されることが知られているが、解析の過程で mTIP41 はメチル化された PP2Ac と高い結合親和性を示すことが明らかとなった。また、メチル化を受けない PP2Ac の変異型、PP2AcY307A では mTIP41 との結合が著しく低下しており、PP2Ac メチル化が mTIP41 との結合に関与する可能性が見い出された。これに対して、mTIP41 と同様に PP2Ac と結合する alpha4 (TAP42 の哺乳類オルソログ) はメチル化されていない PP2Ac と優先的に結合していることが示された。出芽酵母では PP2Ac ホモログ SIT4 の点変異体 SIT4 (E38A) は TAP42 との結合が低下することが知られている。ヒト培養細胞を用いた実験において PP2Ac における相同アミノ酸変異体 PP2Ac (E42A) は alpha4 との結合に大きな影響はなかったが、mTIP41 との結合では著しい低下がみられた。以上の結果から、mTIP41 と alpha4 とは同時に PP2Ac へ結合するというよりは、状態の異なる PP2Ac 分子を認識していると考えられる。一方、非メチル化型の PP2Ac 量はアミノ酸枯渇および、アミノ酸またはアミノ酸と血清による刺激によって変化は見られなかった。また、mTIP41 と PP2Ac の結合もこれら刺激によって変化は観察されなかった。従って、PP2Ac のメチル化反応は栄養刺激により直接の制御機構というよりも、刺激を分別する作用に貢献している可能性が高い。

(3)mTIP41 の mTOR シグナリングにおける機能

従来、出芽酵母では TIP41 は TOR の下流で働く SIT4 を活性化することにより TOR シグナリングを抑制することが知られていた。しかし、本研究により哺乳類培養細胞では mTIP41 は mTORC1 シグナリングに対して正の役割を果たすことが明らかとなった。すなわち HEK293T 細胞に mTIP41 を高発現させるとアミノ酸枯渇時にみられる mTORC1 基質のリン酸化の減少が抑圧され、さらに、PP2Ac との結合が著しく低下する mTIP41 変異型 mTIP41D71L の過剰発現では野生型の mTIP41 発現時に見られるアミノ酸枯渇時の mTORC1 基質の脱リン酸化の抑圧がみられなかった。したがって mTIP41 は PP2Ac との結合を介して mTORC1 シグナリングに作用している可能性が高い。これに対して、U2-OS 細胞においてアミノ酸飢餓後のアミノ酸再添加による mTORC1 基質のリン酸化の増加は、2種類の異なる mTIP41 特異的 siRNA を用いたノックダウンにより有意に抑制され、mTIP41 タンパク

量の減少が mTORC1 の活性化を抑制していることが示された。また、新規 mTOR 阻害剤 PP242 によりアミノ酸枯渇時の TIP41 過剰発現による mTOR 活性の維持が阻害されることを見出した。これらの成果は TIP41 の mTOR シグナリングにおける作用点が、これまで考えられてきた PP2Ac を介した mTORC1 基質の脱リン酸化の抑制だけではなく、新たに mTORC1 の上流シグナル機構に存在する可能性を示している。



(4)mTIP41 の細胞内局在

HEK293T および U2-OS 細胞に蛍光タンパク質 mCherry を付加した mTIP41 を発現し蛍光顕微鏡下に生細胞での挙動を観察し、また U2-OS 細胞および HeLa 細胞における HA タグを付加した mTIP41 の局在を間接蛍光抗体法により検討した結果、共に mTIP41 は核を含む細胞全体に分布が見られた。今後は内在性 mTIP41 の局在およびアミノ酸刺激など、細胞環境変化に伴う局在を検討することが必要である。

(5)PP2Ac と mTORC1 との結合

PP2Ac と mTORC1 特異的構成タンパク質 raptor がそれぞれの過剰発現で結合することが明らかとなった。また、試験管内で mTOR は PP2Ac をリン酸化することも確かめられた。PP2Ac の mTORC1 への結合に対する mTIP41 および alpha4 の影響は単純ではなく、これらの分子の相互作用ならびに PP2Ac のリン酸化反応の生理的意義については、今後、さらに検討が必要である。

本研究では哺乳類細胞における栄養シグナルリングにおけるタンパク質脱リン酸化反応の機能を検討し、ことに mTORC1 を介する栄養シグナリングに対するプロテインホスファターゼ PP2Ac の役割に着目した解析を行った。その結果、mTIP41 は出芽酵母における役割とは異なり、栄養-mTORC1 シグナルに対して正の作用を持つことが見い出された。哺乳類細胞における mTIP41 の作用機序として最も有力な可能性は、PP2Ac と直接結合してその活性を阻害し、mTORC1 の基質の脱リン

酸化を抑制することである。しかし、どのようにして mTIP41 が PP2A の活性を抑制するのかはまだ完全には明らかとなっておらず、また、mTIP41 と PP2Ac による mTORC1 シグナルへの作用点はどこであるのかも明確ではない。本研究でのラパマイシンや PP242 の mTOR 阻害剤を用いた実験の結果は、プロテインホスファターゼは mTORC1 基質の脱リン酸化反応のみならず、mTORC1 の上流に作用点が存在することを示している。一方で、mTIP41 が PP2Ac とは異なるタンパク質と協調的に mTORC1 シグナルに関与することも可能である。栄養シグナリングに関して、今後、様々な観点からの解析を行うことにより、細胞増殖・成長に関わり各種の疾患との関する知識が得られることが期待される。

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 9 件)

- ① 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 (7), 4430-4438 (2008) 査読有
- ② Huang, C.C, Wang, J.M., Kikkawa, U., Mukai, H., Shen, M.R., Morita, I., Chen, B.K., and Chang, W.C. Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun protein stability and cell transformation. *Oncogene* 27 (17), 2422-2429 (2008) 査読有
- ③ Hashimoto, T., Yamauchi, L., Hunter, T., Kikkawa, U., and Kamada, S. Possible involvement of caspase-7 in cell cycle progression at mitosis. *Genes Cells* 13 (6), 609-621 (2008) 査読有
- ④ Nakashima, A., Maruki, Y., Imamura, Y., Kondo, C., Kawamata, T., Kawanishi, I., Takata, H., Matsuura, A., Lee, K.S., Kikkawa, U., Ohsumi, Y., Yonezawa, K., and Kamada, Y. The yeast Tor signaling pathway is involved in G2/M transition via polo-kinase. *PLoS ONE* 3 (5), e2223 (2008) 査読有
- ⑤ 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 (2), 179-189 (2009) 査読有

- ⑥ 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 (1), 223-226 (2009) 査読無
- ⑦ Oka, M., Sakaguchi, M., Okada, T., Nagai, H., Ozaki, M., Yoshioka, T., Inoue, H., Mukaida, N., Kikkawa, U., and Nishigori, C. Signal transducer and activator of transcription 3 upregulates interleukin-8 expression at the level of transcription in human melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 19 (8), e50-e55 (2010) 査読有
- ⑧ Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S.I., Natsume, T., and Mizushima, N. Mammalian Ttil and Tel2 are critical factors in mTOR complex assembly. *J. Biol. Chem.* 285 (26), 20109-20116 (2010) 査読有
- ⑨ Hashimoto, T., Kikkawa, U., and Kamada, S. Contribution of caspase(s) to the cell cycle regulation at mitotic phase. *PLoS ONE* 6 (3), e18449 (2011) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① Eguchi, S., Oshiro, N., Miyamoto, T., Sasaki, T., Yonezawa, K., and 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、パシフィコ横浜
- ② Kikkawa, U. Identification of phosphoproteins in nutritional signaling by the combination of the immunoprecipitation using the phosphorylation-site specific antibody and mass fingerprinting analysis. 2008 International Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, November 15~16, 2008
- ③ Kikkawa, U. The signaling mechanisms through the protein phosphorylation reaction. 2009 Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Kobe International Conference Center, Kobe, Japan,

November 11-12, 2009

- ④ 橋本季明、吉田茂生、澤崎達也、遠藤弥重太、吉川潮、鎌田真司 Screening of novel caspase substrates functioning at mitotic phase. 第32回日本分子生物学会年会 (BMB2009)、平成21年12月9日～12日、パシフィコ横浜
- ⑤ 橋本季明、吉川 潮、鎌田真司 カスパーゼの活性化阻害による細胞増殖の異常 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、平成22年12月7日～10日、神戸ポートアイランド
- ⑥ Kikkawa, U. Organization and closing remarks. 2011 International Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, February 19-20, 2011

[その他]

ホームページ

<http://www.biosig.kobe-u.ac.jp/>

http://www.biosig.kobe-u.ac.jp/lab_2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 潮 (KIKKAWA USHIO)
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・教授
研究者番号：40150354

(2) 研究分担者

鎌田 真司 (KAMADA SHINJI)
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・准教授
研究者番号：20243214
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
中嶋 昭雄 (NAKASHIMA AKIO)
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：70397818

(3) 連携研究者

該当なし