

機関番号：32607

研究種目：若手研究スタートアップ

研究期間：2009～2010

課題番号：21890244

研究課題名（和文） AMPK-mTOR シグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文） The analysis of AMPK-mTOR signaling pathway

研究代表者

佐藤 龍洋 (TATSUHIRO SATO)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：70547893

研究成果の概要（和文）：

AMPK-mTOR シグナル伝達経路は細胞内のエネルギー調節に重要な役割を果たしている。多くのがん細胞では mTOR 異常な活性化が観察されているが、mTOR の活性調節機構についてはいまだ不明な点が多い。そこで私たちは培養細胞を用いて AMPK-mTOR シグナル伝達経路に関与するたんぱく質を網羅的に解析し、その結果、新規因子を同定することに成功した。本研究成果は、AMPK-mTOR シグナル伝達の新しい経路を示唆し、さらなる解析によってさまざまな疾患に対する新規治療薬の可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

AMPK-mTOR signaling pathway plays an important role in the regulation of cellular energy. Although dysregulation of mTOR activity is observed in many types of cancer cells, the precise mechanism remains unclear. In this research, we performed a comprehensive analysis of the proteins expressed in cultured cells and found novel proteins involved in AMPK-mTOR signaling pathway. Our studies provide a new mechanism of AMPK-mTOR signaling pathway and will contribute to the development of new anti-cancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：シグナル伝達, mTOR, AMPK, プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

AMPK は細胞内エネルギー量の減少に応じて活性化されるたんぱく質であり、インスリンの分泌やグルコースの取り込み、脂肪酸やコレステロール合成など様々な代謝を制御する。mTOR はこの AMPK の働きを仲介し、さまざまなシグナルを伝達することで細

胞内機能を注目するたんぱく質で、その働きが注目されている。近年、mTOR の異常活性が細胞のがん化と深い関係があることが示唆されており、mTOR の特異的阻害剤が抗がん剤として作用することが明らかになってきていた。一方、mTOR はその阻害剤ラパマイシンを用いてシグナル伝達経路の研究が

進められていたが、近年になりラパマイシンが mTOR の一部の機能しか阻害しないことがわかり始めた。その後の研究により、mTOR は異なる二つの複合体 mTORC1、mTORC2 を形成し、異なるシグナル伝達を行うことが明らかになってきたが、いまだ十分な分子機構の理解にはいたっていない。

2. 研究の目的

本研究では新規抗がん剤のターゲットとなる因子を同定するため、AMPK-mTOR に結合するたんぱく質の網羅的同定を行い、AMPK、mTOR を制御する分子機構の解析を行う。また、mTOR が受け取ったシグナルを下流に伝達し、細胞の各種機能を制御する因子の網羅的解析を行う。これらの結果をあわせ、AMPK-mTOR シグナル伝達経路における詳細な解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

AMPK-mTOR 結合たんぱく質の同定と解析

まず、AMPK を構成するサブユニット AMPK α 、 β 、 γ それぞれの遺伝子をクローニングして哺乳動物発現用プラスミドを作成する。これらのプラスミドに加えて、mTOR キナーゼ活性に必要な複合体構成因子 mTOR、Raptor、Rictor を挿入したプラスミドをそれぞれ細胞内に強制発現させて免疫沈降を行う。免疫沈降により共沈してきたたんぱく質は SDS-PAGE により展開させ、銀染色で可視化する。特定のたんぱく質バンドはゲルから切り出してトリプシン消化し、切断されたペプチド断片をゲルより溶出する。最後にこの溶出ペプチドを液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて解析し、元のたんぱく質を同定する。同定したたんぱく質はその cDNA を単離し、結合した AMPK サブユニットもしくは mTOR 複合体との結合を共沈降実験により確かめる。また、抗体を用いて細胞内発現レベルでの結合の確認や細胞内局在部位の同定、インスリン刺激時のたんぱく質局在の変化を蛍光染色によって観察する。これらの結果から、結合たんぱく質の AMPK-mTOR シグナル伝達における役割について検討を行う。

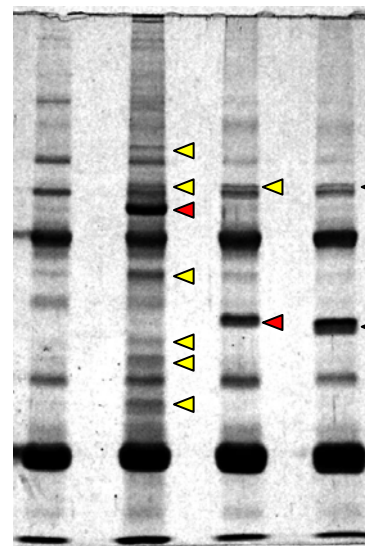
mTOR 下流因子の網羅的解析

培養細胞を血清なしの培地で 24 時間培養後、それぞれ DMSO、ラパマイシン、Torin1 存在下さらに 1 時間培養する。これらの細胞を溶解した後リン酸化たんぱく質を精製し、脱塩処理を行う。その後それぞれの精製たんぱく質を異なる蛍光色素で標識し、等電

点電気泳動、SDS-PAGE によって 2 次元にたんぱく質を展開する。蛍光標識されたたんぱく質の画像解析を行い、リン酸化量に変化のあるスポットをコンピュータ解析および肉眼により同定する。2 次元電気泳動後のゲルは銀染色によりたんぱく質を可視化し、目的のスポットについてはゲルから切り出した後、上記と同様にして LC-MS/MS 解析によるたんぱく質同定を行う。同定したたんぱく質についてはその cDNA を単離し、細胞内に発現させて 2 次元電気泳動を行い、リン酸化によるたんぱく質移動度の変化を検出する。これらの結果から mTOR シグナル伝達経路について考察をおこなう。

4. 研究成果

① AMPK の構成サブユニットをそれぞれ細胞内に発現させて免疫沈降を行ったところ、複数のたんぱく質を銀染色で確認した。そこで LC-MS/MS 解析を行い、これらのたんぱく質を同定したところ、新規結合たんぱく質候補を複数同定した。

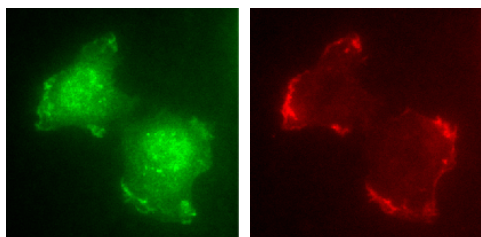


赤矢印はそれぞれ左のレーンから AMPK α 、 β 、 γ 。黄矢印は AMPK の免疫沈降によって共に沈降してきたたんぱく質のバンドを表す。

これらをさらに解析した結果、AMPK に結合するたんぱく質として FK506 結合たんぱく質 (FKBP) を同定した。これを AMPK サブユニットと共発現させて実験を行い、AMPK と FKBP の結合を証明した。さらに AMPK を強制発現させて実験を行い、細胞内に発現している FKBP と結合することを見出した。FKBP は mTOR を制御するたんぱく質として知られており、本研究成果により、AMPK による mTOR 制御の新しい機構が期待できる。

②次に mTOR 複合体に結合するたんぱく質の解析を行った。その結果、mTORC2 複合体の構成因子である Rictor に結合するたんぱく質として、分子量約 250kDa のたんぱく質を

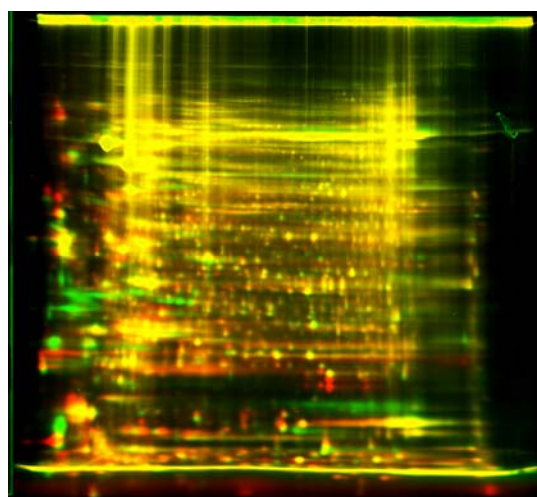
見出した。LC-MS/MS 解析によりこのたんぱく質の同定を試みたところ、アクチン結合たんぱく質 Filamin A であることを見出した。さらに、ヒト子宮頸癌細胞である HeLa 細胞において Rictor と Filamin A の結合を確認した。また、この結合には mTOR を必要としないことがわかった。この結合が細胞内でどのような働きをするのか調べるため、これらの分子の細胞内局在を蛍光染色により観察した。この結果、両たんぱく質は細胞の運動先端に共局在することがわかった（下図、緑が Rictor、赤が Filamin A）。



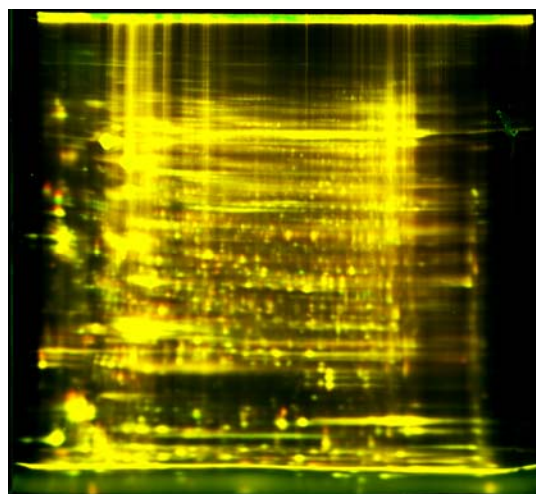
これらの局在はインスリン非存在化では観察されず、インスリンを添加したときのみ観察された。そこでインスリンの下流シグナル経路をさらに調べた結果、インスリンの刺激に応じて活性化された PI3 キナーゼによって Rictor-Filamin A が共局在することを見出した。最後に、Rictor が構成する mTORC2 の役割を解析するため、mTOR が Rictor と結合して Filamin A をリン酸化するか検討した。その結果、アクチン細胞骨格の制御に重要な役割を果たす Filamin A のセリン 2152 番を mTOR がリン酸化することを見出した。また、このリン酸化はインスリンシグナルに依存した。これらの結果から、Rictor を結合した mTORC2 はインスリン刺激に応じて活性化され、Filamin A と結合してこれをリン酸化することでアクチン細胞骨格の再編成を行うことが強く示唆された。

これらの研究成果は、2010 年第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 合同大会にて発表した（学会発表 3）。また、さらなる解析とその確認を行い、その結果を論文にて報告する準備を進めている。

③さらに mTOR が調節制御を行う下流シグナルについてリン酸化プロテオームアッセイ法を用いて詳細に調べた。インスリンで刺激して mTOR を十分に活性化させた細胞を用い、それを mTORC1 阻害剤であるラパマイシンを処理した細胞と比較した結果、mTOR によりリン酸化量が変化すると考えられるたんぱく質スポットを約 60 個同定した（右上図、黄色がリン酸化量に変化のないスポット、緑・赤がそれぞれ mTOR によりリン酸化量が上昇・下降するスポットと考えられる）。



これらのスポットについて、さらにコンピュータ解析を行いリン酸化量の変化を定量化した後、LC-MS/MS 解析によりリン酸化量に優位な差のあったスポットについて、たんぱく質の同定を試みた。その結果、mTOR の基質としてすでに知られている eIF4B や ribosomal protein S6 の他に、新規のたんぱく質を複数同定した。その中で特にリン酸化量に変化の大きかった 10 個の因子について cDNA のクローニングを行い、さらなる解析をおこなった。その結果、mTOR によりリン酸化制御されると考えられる因子を新しく 3 つ同定した。また、ラパマイシンを処理した細胞と比較して、近年はじめて報告された mTORC1, 2 の両阻害剤である Torin1 を用いた細胞のリン酸化たんぱく質をプロテオーム解析したところ、上記で同定した 3 つのたんぱく質すべてにおいてリン酸化量の変化がみられなかった。このことから、上記で検出した 3 つのたんぱく質が mTORC1 によりリン酸化制御されることが明らかとなった。また、Torin1 処理細胞においてのみリン酸化が減少スポットを少数発見した（下図）。



これらのスポットは mTORC2 によりリン酸化制御されると考えられる。また、これらのスポットについて LC-MS/MS 解析を行った結果、DEPTOR たんぱく質を同定した。

本研究の成果については、第 82 回日本生化学会大会、および第 32 回日本分子生物学会年会にて報告している（学会発表 1、2）。

本研究による新規 AMPK 結合たんぱく質、mTORC2 結合たんぱく質、そして新規 mTOR 基質の同定は、AMPK-mTOR シグナル伝達機構の解明に大きく役立つと考えられる。また、これらの因子をさらに解析することにより、mTOR が関与する疾患（がん、糖尿病など）の原因の追究、そしてそれらの治療薬の開発への応用が期待できる。

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）

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 佐藤龍洋、mTOR 活性変異体の同定および Rheb-mTOR シグナル伝達の解析、第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 24、神戸
2. 佐藤龍洋、mTOR 活性化型変異体の同定と解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009. 12. 12、横浜
3. 佐藤龍洋、mTOR シグナル伝達因子のプロテオーム解析、第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 合同大会、2010. 12. 10、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 龍洋 (TATSUHIRO SATO)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号：70547893

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし