

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687031

研究課題名(和文)アミノ酸シグナル伝達経路の解析

研究課題名(英文)Analysis of amino acid signaling in mammals and Drosophila

研究代表者

西村 隆史(NISHIMURA, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90568099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円、(間接経費) 5,550,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の生合成は、細胞が生きていく上で必要不可欠なプロセスである。一方、アミノ酸は受動的なマテリアルとして要求されるだけでなく、能動的なシグナルとしても働きうる。本研究は、アミノ酸シグナル伝達という普遍的な分子基盤を理解することを目的とした。

生化学的手法とショウジョウバエを用いた遺伝学的手法を組み合わせる研究を行い、解糖系の代謝酵素GAPDHがアミノ酸シグナルに関わることを示唆する結果を得た。また、栄養摂取により誘導されるインスリン様ペプチドの遺伝子発現を調節する転写因子を明らかにした。さらに、個体成長を制御する新規の分泌性“おとり”インスリン受容体(SDR)を同定した。

研究成果の概要(英文)：The multi-protein complex TORC1 is a key regulator of cell growth and size control in both Drosophila and mammals. To better understand amino acid signaling, we took a biochemical approach to identify the binding proteins of small GTPase RagA/C. We identified the glycolytic enzyme GAPDH and found that GAPDH likely regulates the TORC1 localization and activity through RagA/C.

In addition, to understand how Drosophila recognizes nutrition to control body growth, we focused on the molecular mechanism underlying the nutrient-dependent expression of Drosophila Insulin-like peptide (dilp). We identified the responsible transcription factors that cooperatively control dilp5 gene expression. We also conducted in vivo RNAi screening to identify novel players for the regulation of body growth. We identified a gene that we named SDR. SDR is a new class of secreted Dilp-binding proteins that negatively regulate the function of Dilps and thereby body growth.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 アミノ酸 個体成長 インスリン様成長因子 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

細胞は、mRNA から蛋白質を合成する際、原料として 20 種類のアミノ酸を必要とする。一方、アミノ酸はマテリアルとして要求されるだけでなく、シグナル伝達因子としても機能し、細胞内で TOR 複合体 (TORC1) の活性化を引き起こす。TOR 複合体は、細胞の成長 (大きさ) や増殖、オートファジーなどを制御する多機能蛋白質複合体である。TOR 複合体は、インスリン、グルコース、アミノ酸などの栄養・増殖因子のみならず、ストレスや DNA 損傷といった様々な要因により制御されている。

低分子量 GTP 結合蛋白質の Rheb は、mTOR を直接活性化する。インスリンなどの増殖因子は、受容体を介した PI3 キナーゼ、Akt のシグナル伝達により TOR 複合体を活性化する。グルコースのシグナルも、ATP 産生レベルに応じて活性化する AMP キナーゼにより、TOR 複合体は制御を受ける。一方、細胞はインスリンやグルコースとは独立した経路にて、アミノ酸の存在を認識し、TOR 複合体の活性化を制御している。

2. 研究の目的

近年、アミノ酸シグナルには、Rheb とは別に Rag と呼ばれる低分子量 GTP 結合蛋白質が関与することが報告された。RagA/C 複合体は、アミノ酸の刺激により活性化されて、TOR 複合体をリソソーム膜上へ運び、Rheb による活性化を誘導する。しかしながら、アミノ酸から Rag を活性化させるシグナル伝達経路および Rheb の機能調節機構には、不明な点が多く残されている。

また、個体の成長発育過程において蛋白質は重要な栄養源になる。ショウジョウバエにおいて、個体成長を促す内分泌ホルモンであるインスリン様ペプチドは、栄養摂取により生産される。しかしながら、栄養源がどのように個体レベルで認識されインスリン様ペプチドが合成・分泌されるのか、不明な点が残されている。

そこで本研究は、生化学的手法とショウジョウバエを用いた遺伝学的手法を組み合わせることで、アミノ酸シグナル伝達経路の解明とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、アミノ酸シグナル伝達という普遍的な分子基盤を理解するために、生化学的手法と遺伝学的手法を組み合わせ研究を

展開した。具体的には、(1) 生化学的な手法により新規アミノ酸シグナル関連蛋白質の同定を行った。さらに、哺乳類培養細胞とショウジョウバエ遺伝学を利用し、新規因子の生理的機能解析を行い、生物種間で保存されたシグナル伝達経路を細胞レベルで解析した。(2) ショウジョウバエ個体におけるアミノ酸シグナルの生理的意義を明らかにする目的で、栄養摂取により誘導されるインスリン様ペプチドの発現調節機構を解析した。(3) アミノ酸シグナルと個体成長の関係性を理解する目的で、ショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを行い、新規の成長制御因子の探索と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) アミノ酸シグナルに関わる新規蛋白質の同定と機能解析

アミノ酸シグナルおよび mTOR 活性化には、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rheb および Rag が重要な役割を果たす。そこで、これら低分子量 GTP 結合蛋白質の制御因子を同定する目的で、結合蛋白質の探索を行った。RagA/C の結合蛋白質を免疫沈降法により単離し、質量分析法により新規の結合蛋白質 GAPDH を同定した。GAPDH は、解糖系の代謝酵素であるが、GTP 結合蛋白質 Rheb に結合することが報告されており、RagA/C と GAPDH の相互作用は、何らかの生理的意義があると推察された。

生化学的解析を進めた結果、この結合は Rag GTPase の GTP・GDP 依存性があることを見いだした。また、哺乳類培養細胞を用いた解析から、GAPDH の発現抑制により TOR 複合体を介したアミノ酸シグナルが減弱することが明らかになった。さらに、GAPDH の発現抑制は、アミノ酸存在化におけるリソソーム膜上への TOR 複合体の局在異常を引き起こした。よって、Rag と GAPDH の結合は、TOR 複合体の局在および活性化に関与することが示唆された。

さらに、ショウジョウバエの分子遺伝学を利用して、アミノ酸シグナル伝達経路における Rag と GAPDH 相互作用の生理的意義を解析した。アミノ酸センサーとして働き個体成長に重要な役割を果たす内分泌器官の脂肪体に着目し、遺伝学的相互作用を解析した。Rag と GAPDH の遺伝子発現を RNAi 法により抑制することで、栄養依存的な個体成長における抑制効果が相乗的に観察された (未発表データ)。

これらの結果は、解糖系の代謝酵素 GAPDH がアミノ酸シグナルに関わることを示唆し

ており、アミノ酸シグナル伝達経路の新たな理解につながるものと考えられる。

(2) ショウジョウバエ個体におけるアミノ酸シグナルの生理的意義の解析

脳インスリン産生細胞(IPC)で発現するインスリン様ペプチド(Dilp)のうち、Dilp5は栄養摂取に応じて発現誘導される。よって、栄養依存的なDilp5遺伝子発現の制御機構を解明することで、個体がどのように栄養状態を認識して成長や代謝を調節しているのか、理解することが出来ると考えた。そこで、まずDilp5の遺伝子発現を調節する転写因子を明らかにする目的でRNAiスクリーニングを行った。その結果、DacとEyの二つの転写因子が複合体を形成し、相乗的にdilp5遺伝子を正に制御していることを明らかにした。また、これら転写因子の哺乳類ホモログは、ラットインスリン遺伝子の発現にも関与することを見いだした(岡本ら、PNAS、2012)。

栄養シグナルとdilp5発現調節の間を理解する目的でさらに研究を進めた。その結果、餌由来の栄養分として蛋白源が重要であること、栄養依存的な発現調節には転写因子Foxoが関与すること、Foxoの局在機能はチロシンリン酸化型膜貫通蛋白質Aikが重要であることを明らかにした。さらに、Dilp5を発現する神経内分泌細胞がどのように栄養シグナル、特にアミノ酸シグナルを受容認識しているのか解析した。組織特異的なGal4システムを用いて、TOR複合体およびRag GTPaseの発現をRNAi法により抑制し、dilp5の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、Dilp5を発現している神経内分泌細胞自身が細胞自立的にアミノ酸を認識しているわけではなく、脳グリア細胞がアミノ酸シグナルの認識に重要な役割を果たすことが明らかになった(未発表データ)。

これらの結果は、組織特異的なアミノ酸シグナル伝達経路の働きと個体成長の関係を理解する上で重要な知見になるものと考えられる。さらに研究を進めることで、個体レベルでのアミノ酸認識機構と個体成長の間をつなぐ細胞間相互作用とその分子基盤の理解が深まるものと考えられる。

(3) ショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを用いた新規成長制御因子の探索

発育過程における個体成長を制御する新規の制御因子を同定する目的で、分泌性因子に着目したRNAiスクリーニングを行った。その結果、インスリン受容体様の構造を持つが細

胞膜貫通領域および細胞内領域を持たない新規の分泌性“おとり”インスリン受容体(SDR)を同定した。SDRは中枢脳の表面に位置するグリア細胞で産生分泌され、体液中にてDilpと結合し、末梢組織でのインスリンシグナルを抑制することを明らかにした。この結果は、IGF結合蛋白質(IGFBP)以外の分子が、ILPの作用を直接制御しうることを意味している。この蛋白質は、栄養状態やアミノ酸シグナル伝達経路により、発現分泌は影響を受けず、恒常的な成長制御因子であることが明らかになった。しかしながら、SDR変異体は、通常の餌では致死性を示さないものの、希釈された餌では蛹期における致死性を示した。これらの結果により、栄養レベルに応じた個体成長および代謝の調節機構が重要であることが示唆された(岡本ら、Gene Dev、2013)。この結果はプレス発表を行い、複数の新聞メディアに取り上げられた(2013年1月3日神戸新聞、同1月15日読売新聞)。

様々な栄養状態下におけるSDR変異体の解析を進めることで、アミノ酸シグナル応答と成長調節機構の分子基盤がさらに解明するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Okamoto N, Nakamori R, Murai T, Yamauchi Y, Masuda A, Nishimura T. A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in Drosophila. *Genes Dev* (2013). 27 : 87-97. 査読有 DOI:10.1101/gad.204479.112.

Okamoto N, Nishimori Y, Nishimura T. Conserved role for the Dachshund protein with Drosophila Pax6 homolog Eyeless in insulin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2012). 109 : 2406-2411. 査読有 DOI:10.1073/pnas.1116050109.

[学会発表](計12件)

岡本直樹、西村隆史 : Regulatory mechanism of the Drosophila insulin-like peptide gene expression 2014 Annual Drosophila Research Conference (2014年03月26日~30日)

岡本直樹、西村隆史 : A secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to

restrict body growth in *Drosophila*
Insect hormone meeting (2013年07月22日～26日)

岡本直樹、西村隆史 : A secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*
第46回日本発生生物学会年会(2013年05月28日～31日)

岡本直樹、西村隆史 : A secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*
第2回アジア太平洋ショウジョウバエ研究会(APDRC)(2013年05月13日～16日)

岡本直樹、西村隆史 : A secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*
第35回日本分子生物学会年会(2012年12月11日～14日)

岡本直樹、西村隆史 : Regulatory mechanism of the *Drosophila* insulin-like peptide gene expression in insulin-producing cells

第10回日本ショウジョウバエ研究会(2012年10月13日～15日)

西村隆史 : Secreted decoy of InR antagonizes insulin signaling to restrict body growth in *Drosophila*
第10回日本ショウジョウバエ研究会(2012年10月13日～15日)

岡本直樹、西村隆史 : Conserved role for the Dachshund protein with *Drosophila* Pax6 homolog Eyeless in insulin expression.

Joint Meeting of JSDB 45th & JSCB 64th
(2012年05月29日～31日)

西村隆史 : Regulation of the systemic growth by insulin-like peptides during *Drosophila* development

Joint Meeting of JSDB 45th & JSCB 64th
(2012年05月29日～31日)

岡本直樹、西森由佳、西村隆史 : An Evolutionarily Conserved Function of Dachshund/DACH to Regulate Insulin Expression Together with Eyeless/PAX6
第34回日本分子生物学会年会(2011年12月13日～16日)

岡本直樹、西村隆史 : 昆虫と哺乳類で保存された Dachshund / DACH によるインスリン様ペプチド発現制御機構

昆虫ワークショップ 2011(2011年10月12日～14日)

岡本直樹、西村隆史 : A transgenic RNA

interference screen for regulators of nutrient-dependent growth in the fruit fly *Drosophila melanogaster*

第44回日本発生生物学会年会(2011年05月19日～21日)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.cdb.riken.jp/gcs/>

理研 CDB-科学ニュース

インスリンの「おとり」受容体が体の成長を調節する

http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/13/130109_secreteddecoy.html

理化学研究所_報道発表資料

体の成長を制御するホルモンの新受容体を発見

http://www.riken.go.jp/pr/press/2013/20130101_1/

応用動物昆虫学会電子広報委員会

“おとり”受容体が体の成長を調節する
むしむしコラム・おーどーこん

-近くて不思議な虫の世界-

http://column.odokon.org/2013/0227_145316.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 隆史 (NISHIMURA, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号 : 90568099