

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659116

研究課題名(和文)細胞膜ロイシン受容体の提唱とその分子同定およびmTOR系へのリンクの解明

研究課題名(英文) Identification of plasma membrane leucine receptor and elucidation of its link to mTOR signaling pathway

研究代表者

金井 好克 (Kanai, Yoshikatsu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60204533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜型ロイシン受容体の活性が見られる細胞と、見られない細胞の細胞膜画分を用いた網羅的比較定量プロテオミクスにより、細胞膜型ロイシン受容体の候補因子群を見出した。機能解析の結果、増殖因子の受容体を介したシグナル伝達に関与しており、アミノ酸シグナル系と協調的にmTORC1の活性化に寄与する因子を見出した。また、サンプル調製法と測定法に改良を加えて膜タンパク質に特化した比較定量プロテオミクスの測定系を確立したほか、比較定量リン酸化プロテオミクスの測定系を確立した。細胞膜型ロイシン受容体の分子同定とそのシグナル系とのリンクの網羅的解析に向けて、十分な基盤技術を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：By comparative quantitative proteomics using mass spectrometry, several candidates for the plasma membrane leucine receptor were identified. Functional analysis of these candidates revealed that one protein plays a role in mTORC1 pathway downstream of growth factor receptors and thereby regulates the activity of mTORC1 cooperatively with amino acids. We also developed a new analytical procedure of mass spectrometry suitable for integral membrane proteins by improving the sample preparation process and mass spectrometric measurement, because the detection and identification of integral membrane proteins were difficult in general. Additionally, to reveal the overall signaling events downstream of leucine receptor, we established a method for quantitative phosphoproteomics. The technical basis fundamentally important for the identification of leucine receptor has been established in this study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：受容体 チャンネル 輸送系 シグナル情報伝達系 比較定量プロテオミクス リン酸化プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

栄養供給量に応じて適切にタンパク質合成を進行させることは、細胞の生存にとって必須の要請である。そのためには、使用し得るアミノ酸量を検知して、転写・翻訳を制御するフィードフォワード機構が必要となる。そのようなアミノ酸に対する代謝応答は、セリン/スレオニンキナーゼである mTOR (mammalian target of rapamycin) を中心に据えたシグナル系が担っている。mTOR が細胞内で形成している 2 つのタンパク質複合体 mTORC1 と mTORC2 のうち、特に mTORC1 がアミノ酸応答を担い、細胞成長や増殖を司る。最近の国内外の研究により、mTOR 系のシグナル分子が数多く同定されたが、細胞がアミノ酸を検知する分子機構は未だ不明であり、当該分野における最重要課題の一つとなっている。

mTORC1 は、アミノ酸のうち特にロイシンにより強く活性化される。多くの哺乳類培養細胞株では、ロイシンは細胞内に取り込まれ、以前から存在が想定されている細胞内のアミノ酸センサーによって感知される。そのため、mTORC1 下流の p70S6K (p70 S6 kinase) のリン酸化は、アミノ酸取り込み阻害薬である BCH

(2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid) によって抑制される。しかし、研究代表者は一部の培養細胞株においては、BCH がロイシンによる p70S6K のリン酸化を抑制しないことを見いだした。これはロイシンが細胞内に取り込まれずに感知されることを意味しており、細胞膜におけるロイシン受容体の存在を示唆している。

### 2. 研究の目的

細胞のアミノ酸応答機構は、その細胞内シグナル伝達を担う mTOR 系の研究が先行しているが、アミノ酸濃度情報を検知し、リン酸化シグナルへと変換する分子が未だ同定されていない。本研究は、アミノ酸応答の起点として、従来想定されていた細胞内アミノ酸センサーとは別の今まで知られていなかった細胞膜ロイシン受容体が存在することを見だし、その分子同定と mTOR シグナル系へのリンクを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞膜タンパク質の網羅的比較定量プロテオミクスによるロイシン受容体の探索

細胞膜型ロイシン受容体の活性が見られる細胞と、細胞内センサーの活性が見られる細胞の間で、細胞膜タンパク質の網羅的な比較定量プロテオミクス解析を実施した。培養細胞の細胞膜表面タンパク質をビオチン標識試薬でラベルし、ビオチン-アビジン系を利用したアフィニティー精製により回収した後、トリプシンでペプチド化した。得られたペプチドは、安定同位体標識を用いて定量する iTRAQ (Isobaric tags for relative and

absolute quantitation) 法により解析した。2 種類の細胞間で細胞膜タンパク質発現量の網羅的比較定量をおこない、細胞膜型ロイシン受容体活性を示す細胞において特に高い発現を示す受容体様因子および受容体結合能を有している可能性が高い因子の絞り込みをおこなった。また、サンプル調製法と質量分析計による測定法の改善にも取り組み、細胞膜画分調製法に改良を加えて膜貫通型タンパク質の同定数を向上させることを試みた。

(2) アミノ酸-mTORC1 シグナル系におけるロイシン受容体候補因子の機能解析

細胞膜型ロイシン受容体活性を示す細胞において選択的に高い発現が見られた候補因子のそれぞれについて、RNA 干渉法による遺伝子ノックダウンを実施してアミノ酸-mTORC1 系における機能解析をおこなった。候補因子の発現を抑制した細胞に対してアミノ酸飢餓処理をおこなった後、ロイシンを含むアミノ酸を添加して mTORC1 活性化に対する影響の有無を検討した。mTORC1 の活性化は、既知の mTORC1 下流因子である p70S6K および 4EBP1 のリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットングにより評価した。また、mTORC1 系への入力が入力アミノ酸とは異なるとされる、増殖因子を介した mTORC1 シグナル伝達系への影響も併せて解析を実施した。

(3) アミノ酸シグナル伝達系解析のための比較定量リン酸化プロテオミクス

アミノ酸を起点とした細胞内のシグナル伝達系の全体像を明らかにするため、リン酸化プロテオミクスの測定系確立をおこなった。細胞破砕液をトリプシン処理後、金属イオンとリン酸基の親和性を利用した iMAC (Immobilized metal affinity chromatography) 法によりリン酸化ペプチドを精製し、iTRAQ 法を組み合わせる比較定量を試みた。細胞内センサーを発現している細胞株をモデルに用いて、BCH の存在下と非存在下でリン酸化の網羅的変動解析を実施した。

### 4. 研究成果

細胞膜タンパク質の網羅的比較定量プロテオミクスの系を確立した。得られた定量値から、細胞膜型受容体の活性を示す細胞と、細胞内センサーの活性を示す細胞間での発現量の比を算出し、その中でも特に前者での発現量が高い因子を絞り込んだ。さらに、その中から受容体様因子および受容体に結合する可能性が高いと考えられる 7 つの因子を候補因子として選別した。また、質量分析のサンプル調製法と測定法にも改良を加えた。特に、より低シグナルのデータについても高い定量性を発揮する非標識法による比較定量プロテオミクスの導入により、一般に同定が困難とされている、受容体や膜輸送体など

の複数回膜貫通型タンパク質の同定数を大幅に増やすことに成功した。細胞膜型ロイシン受容体の分子同定に向けて充分な技術的基盤を立ち上げることが出来た。

上記7つのロイシン受容体およびその関連分子の候補因子について、遺伝子ノックダウンによる機能解析を実施した。その結果、ノックダウンによってアミノ酸添加時のmTORC1活性化が著しき減弱する因子を見出した。その後の解析により、同因子がインスリンやIGF-1などの増殖因子受容体を介したMAPキナーゼ、Akt、TSC2などの多くの因子の活性化に関与しており、アミノ酸シグナルと協調的にmTORC1の活性化に関与していることを明らかにした。

IMAC法とiTRAQ法を組み合わせた比較定量リン酸化プロテオミクス解析では、アミノ酸刺激にตอบสนองしてリン酸化が上昇する約400種類のタンパク質を見出すことができた。受容体分子の特定後は、この手法により受容体下流の細胞内シグナル伝達系の網羅的な解析に取り組む予定である。

細胞のアミノ酸感知機構は、従来、細胞内に存在するものと考えられてきた。本研究は、細胞膜型ロイシン受容体が存在し、それからmTOR系へのシグナルが入ることを提唱するものである。さらに、当該受容体の作用薬の開発は、mTORシグナル系の破綻が関与する糖尿病、癌、肥満、メタボリック症候群等の疾患の治療薬開発へと繋がる可能性がある。細胞膜ロイシン受容体の分子同定は、アミノ酸シグナル研究に革新的な進展をもたらすとともに、新しいカテゴリーの受容体を提唱することになり、情報受容・伝達の薬理学に新たな領域を拓くものと考えている。

## 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23件)

Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, McDonald TJ, Wu G, Kanai Y, Powell TL, Nathanielsz PW, Jansson T. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon.、FASEB J.、査読有、Vol.28、2014、pp.1294-1305. DOI: 10.1096/fj.13-242271.

Kaira K, Sunose Y, Ohshima Y, Ishioka NS, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Yamaguchi A, Segawa A, Ide M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I. Clinical significance of L-type amino acid transporter 1 expression as a prognostic marker and potential of new targeting therapy in biliary tract cancer.、BMC

Cancer.、査読有、Vol.13、2013、pp.482. DOI: 10.1186/1471-2407-13-482.

Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters.、Mol Aspects Med.、査読有、Vol.34、2013、pp.139-158. DOI: 10.1016/j.mam.2012.10.007.

Bodoy S, Fotiadis D, Stoeger C, Kanai Y, Palacin M. The small SLC43 family: facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1.、Mol Aspects Med.、査読有、Vol.34、2013、pp.638-645. DOI: 10.1016/j.mam.2012.12.006.

Kanai Y, Clemenson B, Simonin A, Leuenberger M, Lochner M, Weisstanner M, Hediger MA. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family.、Mol Aspects Med.、査読有、Vol.34、2013、pp.108-120. DOI: 10.1016/j.mam.2013.01.001.

Segawa A, Nagamori S, Kanai Y, Masawa N, Oyama T. L-type amino acid transporter 1 expression is highly correlated with Gleason score in prostate cancer.、Mol Clin Onc.、査読有、Vol.1、2013、pp.274-280. DOI: 10.3892/mco.2012.54

Hagiwara K, Nagamori S, Umemura YM, Ohgaki R, Tanaka H, Murata D, Nakagomi S, Nomura KH, Kage-Nakadai E, Mitani S, Nomura K, Kanai Y. NRFL-1, the C. elegans NHERF orthologue, interacts with amino acid transporter 6 (AAT-6) for age-dependent maintenance of AAT-6 on the membrane.、PLoS One.、査読有、Vol.7、2012、e43050. DOI: 10.1371/journal.pone.0043050

Khunweeraphong N, Nagamori S, Wiriyaerkmul P, Nishinaka Y, Wongthai P, Ohgaki R, Tanaka H, Tominaga H, Sakurai H, Kanai Y. Establishment of stable cell lines with high expression of heterodimers of human 4F2hc and human amino acid transporter LAT1 or LAT2 and delineation of their differential interaction with -alkyl moieties.、J Pharmacol Sci.、査読有、Vol.119、2012、pp.368-380. DOI: 10.1254/jphs.12124FP

Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Segawa A, Furuya M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I. Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in



大阪大学・薬学研究科・特任准教授  
研究者番号：50347423