



Title	細胞はアミノ酸をどのように感知し、増殖を促すのか？
Author(s)	河村, 峻介
Citation	平成30年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2019
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/71946
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

平成 30 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	カワムラ リョウスケ 河村 嶽介	学部 学科	歯学部歯学科	学年	4 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	キタタニ タクミ 北谷 匠	学部 学科	歯学部歯学科	学年	4 年
	サワダ リョウヘイ 澤田 嶽平		歯学部歯学科		4 年
					年
アドバイザー教員 氏名	アラキ ヤスヒロ 荒木 保弘	所属	口腔科学フロンティアセンター		
研究課題名	細胞はアミノ酸をどのように感知し、増殖を促すのか？				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

(問題点)

増殖・成長に必要不可欠である栄養素は、細胞により厳密に感知され巨大なタンパク質複合体 TORC1 に情報伝達される。TORC1 はそのリン酸化酵素活性を介して細胞成長と代謝を制御する。十分な栄養源存在化で TORC1 は活性化し、分解過程であるオートファジーを介した異化作用を抑制すると同時に、リン酸化を介して同化作用（生体内高分子化合物の合成）を亢進する。逆に栄養源がないと不活化し、基質の脱リン酸化を介して、同化作用の抑制、異化作用の亢進を誘導する。こうした栄養源に応じた増殖・成長制御因子としての TORC1 の機能は真核生物において進化的に保存されていることが明らかとなった。一方で 栄養素がどのように TORC1 を活性化するのか、TORC1 が何をリン酸化しているのか、という TORC1 の上流と下流に位置する因子の同定とその制御機構の解明が最も重要な課題として残っている。

(仮説)

TORC1 に物理的相互作用するタンパク質を生化学的に単離・同定する。これらの中には TORC1 を制御する上流因子だけでなく、TORC1 の基質となる下流因子が含まれると考えられる。さらに TORC1 と細胞内で挙動を共にするものを、顕微鏡を用いた細胞生物学的解析により選別する。この二段階の判定基準を設けることにより、真の TORC1 の関連因子を見いだすことができる。

(方法)

実験 1. ゲノム上の遺伝子改変が容易な酵母を用いて TORC1 にアフィニティ精製用タグを付加した細胞を作製する。免疫沈降法による精製と質量解析を組み合わせることによって TORC1 と物理的に相互作用するタンパク質を同定する。

実験 2. 野生株では TORC1 は液胞膜上に一様に局在するのに対して、*gtr1* 破壊株では液胞膜上的一点に集積し GFP の輝点を形成することが知られている。実験 1 で同定したタンパク質

の遺伝子にゲノム上で GFP タグを付加する。*gtr1*破壊株では液胞膜上に輝点を形成するもののうち、野生型 *GTR1* 存在下では輝点が消失するものを選別する。また輝点が TORC1 と共に局在することを検証する。

実験 3. 実験 2 で陽性であった因子が TORC1 の上流または下流のどちらで機能するのかを明らかにする。上流因子であればその機能欠損株では TORC1 のリン酸化活性が低下することが予想される。下流因子機能欠損株で活性低下は観察されず、かつ TORC1 に依存してリン酸化されるものを下流因子と判断する。

実験 4. セリン合成経路の第一段階を触媒する酵素を新規 TORC1 関連因子として同定した。実験 3 の結果からこの酵素は TORC1 の下流で機能することが予想された。セリン合成経路は連続した三つ酵素反応からなることから他の段階に関与する酵素も TORC1 の基質となりうるかを検証する。また、TORC1 がセリン合成経路を直接活性化し、細胞内のセリン濃度を制御していることを TORC1 特異的阻害剤であるラパマイシンを用いて検討する。

(結果)

実験 1. 上流で活性化因子として機能する Pib2 は、TORC1 に直接相互作用することが知られている。アフィニティ精製用タグを付加した Pib2 を免疫沈降し、共沈するタンパク質を質量解析で同定した。この中には TORC1 の構成因子や既知の相互作用因子に加え、これまで TORC1 との関連が未知の因子が含まれていた。

実験 2. TORC1 との関連未知因子のうち 20 に GFP を付加し細胞内局在を検証したところ、Ser3 と Ser33 が *gtr1* 破壊株でのみ液胞膜上に GFP の輝点を形成した(Fig1)。これらはパラログであり、セリン合成経路の第一段階を触媒する酵素である。両者の輝点は TORC1 の局在指標である Ego3 と共に局在する(Fig2)ことから Ser3 と Ser33 は新規 TORC1 関連因子であると判断した。

実験 3. 基質である Pib2 のリン酸化状態を指標として TORC1 のリン酸化酵素活性を測定した結果、野生株と *ser3 ser33* 二重欠損株で TORC1 活性に差異は見られなかった(Fig3)。よって Ser3 と Ser33 は上流因子ではないと判断した。また、ゲル上に見られる Ser3 の 2 本のバンドのうち、移動度が遅いリン酸化型がラパマイシン処理により移動度が速い脱リン酸化型に変換された(Fig4-1)。さらに精製標品を用いた試験管内リン酸化実験により、Ser3 は TORC1 により直接リン酸化された。以上より、Ser3 と Ser33 は TORC1 によりリン酸化される下流因子であることが明らかとなった。

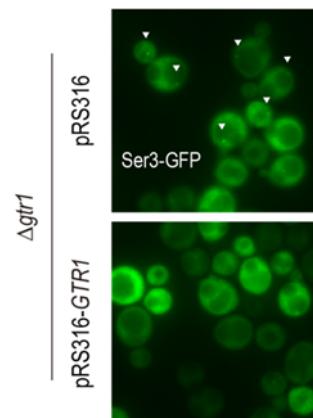


Fig 1. *gtr1* Δ では Ser3 は液胞膜上に輝点を形成する

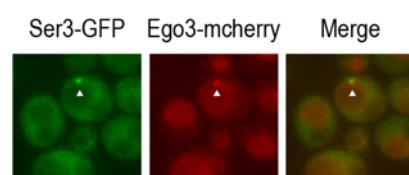


Fig 2. Ser3 は TORC1 と共に局在する

実験 4. セリン合成経路は連続した三つ段階からなる。
Ser3 と Ser33 の下流に位置する Ser1 と Ser2 も TORC1 により直接制御されるのか検証した。Ser1 と Ser2 は *gtr1* 破壊株で GFP 輝点が観察されなかったことから、Ser3 と Ser33 のみが TORC1 の下流因子であることが判明した。また、*ser3 ser33* 二重欠損株がラバマイシンに感受性を示し、この感受性は培地にセリンを添加することで抑圧されることを見出した(Fig5)。この結果は TORC1 の阻害により増殖に必要な細胞内のセリン濃度を維持できないことを示唆する。

実験 4. セリン合成経路は連続した三つ段階からなる。Ser3 と Ser33 の下流に位置する Ser1 と Ser2 も TORC1 により直接制御されるのか検証した。Ser1 と Ser2 は *gtr1* 破壊株で GFP 輝点が観察されなかったことから、Ser3 と Ser33 のみが TORC1 の下流因子であることが判明した。また、*ser3 ser33* 二重欠損株がラバマイシンに感受性を示し、この感受性は培地にセリンを添加することで抑圧されることを見出した(Fig5)。この結果は TORC1 の阻害により増殖に必要な細胞内のセリン濃度を維持できないことを示唆する。

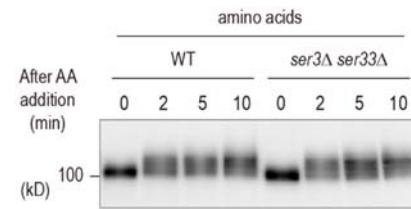
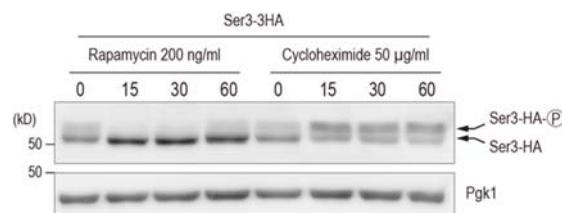
Fig 3. *ser3Δ ser33Δ* でも TORC1 は活性化する

Fig 4-1. 生体内で Ser3 は TORC1 によりリン酸化される。

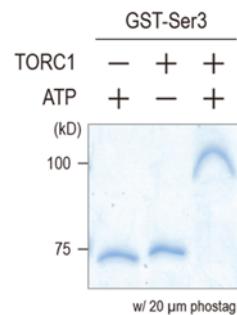
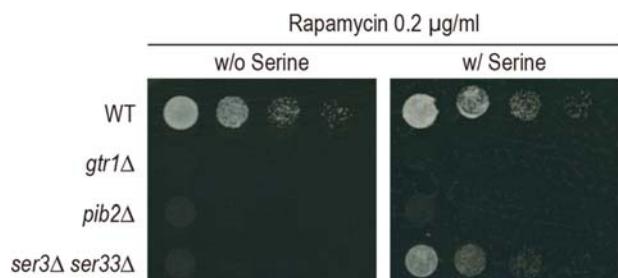


Fig 4-2. TORC1 は Ser3 を直接リン酸化する

実験 5. TORC1 を阻害した時の細胞内アミノ酸濃度を測定した(Fig6)。ラバマイシン処理によりセリンとセリンから作られるグリシンの細胞内濃度が顕著に減少していた。この結果は TORC1 の活性が細胞内のセリン濃度を維持するのに必要であることを意味する。

Fig 5. *ser3Δ ser33Δ* のラバマイシン感受性はセリンの添加により抑圧される

(結論)

TORC1 は最も初期段階である Ser3 と Ser33 を基質とすることでセリン合成経路を制御していることが明らかとなった。TORC1 によりリシン酸化型に変換された Ser3 と Ser33 は機能が亢進し、細胞内のセリン合成量が促進すると考えられる。セリンはタンパク質の材料としてだけでなく、他のアミノ酸、脂質、糖、核酸へと代謝され、生体内代謝において大変広範な役割を担う。悪性度の高いある種のがん細胞では Ser3 と Ser33 のヒトホモログの遺伝子コピー数が増加し、セリン合成が活性化していることが報告されている。将来的に、酵母を用いた本研究の知見は単なる生命現象のメカニズムの理解に留まらず、がん治療法の開発の基盤となることが期待される。

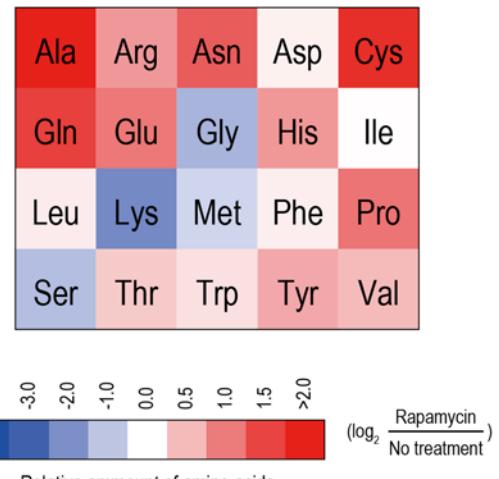


Fig 6. TORC1活性は細胞内セリン濃度の維持に必須である