

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ロイシン - mTORシグナル経路を制御するユビキチンリガーゼ UBR1,UBR2の解析
Title(English)	
著者(和文)	久米華奈子
Author(English)	Kanako Kume
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7899号, 授与年月日:2010年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:半田 宏,山口 雄輝
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7899号, Conferred date:2010/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 21 年度 学位論文

ロイシン-mTOR シグナル経路を制御する ユビキチンリガーゼ UBR1, UBR2 の解析

東京工業大学 大学院生命理工学研究科

生命情報専攻

平成 19 年度入学

学籍番号 07D23028

久米 華奈子

指導教官 半田 宏

山口 雄輝

[目次]

第 1 章	序論	5
1 - 1	緒言	5
1 - 2	本研究の背景	7
1 - 2 - 1	ロイシン	7
1 - 2 - 2	ロイシンのタンパク質合成促進作用	8
1 - 2 - 3	mTOR シグナル経路	9
1 - 2 - 4	mTOR シグナル経路を活性化する因子	11
1 - 2 - 5	ユビキチンリガーゼ UBR1、UBR2	14
1 - 2 - 6	UBR1、UBR2 が持つドメイン構造	16
1 - 3	本研究の目的	18
第 2 章	ロイシンに結合するタンパク質の探索	25
2 - 1	緒言	25
2 - 2	材料及び方法	27
2 - 2 - 1	試薬・培地・抗体	27
2 - 2 - 2	細胞培養・細胞抽出液の調製	29
2 - 2 - 3	ロイシンによる S6K1 リン酸化	31
2 - 2 - 4	ロイシン固定化粒子の作製	32
2 - 2 - 5	アフィニティ精製	33
2 - 2 - 6	SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)	34

2 - 2 - 7	銀染色	35
2 - 2 - 8	ウェスタンブロッティング	35
2 - 2 - 9	結合タンパク質の同定、質量分析	36
2 - 3	結果	37
2 - 3 - 1	H4IIE 細胞株におけるロイシンの S6K1 リン酸化	37
2 - 3 - 2	H4IIE 細胞株におけるロイシン誘導体の S6K1 のリン酸化	37
2 - 3 - 3	ロイシン固定化粒子の作製	38
2 - 3 - 4	アフィニティ精製によるロイシン結合タンパク質の探索	38
2 - 4	考察	40
2 - 4 - 1	各アミノ酸の mTOR シグナル経路への関与	40
2 - 4 - 2	UBR1、UBR2 以外でロイシン固定化粒子に結合した因子	41
2 - 4 - 3	アフィニティ精製の条件検討	41

第3章 UBR1、UBR2 の mTOR シグナル経路への影響

	(培養細胞株を用いた解析)	52
3 - 1	緒言	52
3 - 2	材料及び方法	53
3 - 2 - 1	試薬・抗体	53
3 - 2 - 2	細胞培養	54
3 - 2 - 3	プラスミドベクターの構築	55
3 - 2 - 4	shRNA 発現レンチウイルスの作製	56
3 - 2 - 5	培養細胞株への遺伝子導入	57

3 - 2 - 6	ロイシンによる S6K1 リン酸化	58
3 - 2 - 7	UBR1、UBR2 の結合因子の探索	59
3 - 2 - 8	SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 銀染色、ウェスタン ブロットティング	60
3 - 3	結果	61
3 - 3 - 1	UBR1 と UBR2 の過剰発現による S6K1 リン酸化への影響	61
3 - 3 - 2	UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化への影響	61
3 - 3 - 3	ロイシン添加が UBR1 と UBR2 の過剰発現に与える影響	62
3 - 3 - 4	UBR1 と UBR2 の過剰発現における mTOR 関連因子群の量変化 ..	63
3 - 4	考察	64
3 - 4 - 1	UBR1 と UBR2 は同程度の mTOR 抑制効果	64
3 - 4 - 2	UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化の増加度合 ..	64
3 - 4 - 3	UBR1 と UBR2 のユビキチン化活性と S6K1 リン酸化	65

第4章 ロイシンが UBR1、UBR2 の活性に与える影響

	(<i>in vitro</i> 解析)	72
4 - 1	緒言	72
4 - 2	材料及び方法	74
4 - 2 - 1	試薬	74
4 - 2 - 2	プラスミドベクターの構築	74
4 - 2 - 3	N-end rule に沿った <i>in vitro</i> タンパク質分解系	75
4 - 2 - 4	UBR2 全長及び部分欠損変異体の発現、ロイシンとの結合評価	76

4 - 2 - 5	SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) ウェスタンブロッ ティング	77
4 - 3	結果	78
4 - 3 - 1	ロイシンが N-end rule タンパク質分解に与える影響	78
4 - 3 - 2	UBR2 のロイシン結合部位の決定	78
4 - 4	考察	80
4 - 4 - 1	ウサギ網状赤血球抽出液を用いた評価系	80
4 - 4 - 2	部分欠損変異体の発現量	80
第 5 章 総括		83
5 - 1	本研究のまとめ	83
5 - 2	考察	84
5 - 2 - 1	UBR1 と UBR2 が mTOR 活性を抑制する機構	84
5 - 2 - 2	ロイシンが UBR1 と UBR2 の活性を阻害する機構	86
5 - 2 - 3	UBR1 と UBR2 を介したロイシン-mTOR シグナル経路の重要性..	87
5 - 3	今後の展望	88

参考文献

謝辞

第 1 章 序論

1 - 1 緒言

アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物を指し、生物は 500 種類以上のアミノ酸を合成すると考えられている。その中で、タンパク質を構成する基本的なアミノ酸は 20 種である。グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、システイン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸。本研究で注目したロイシンはこの中の 1 つである。タンパク質は、心臓、筋肉、皮膚など体内のあらゆる組織や臓器に存在し、代謝や遺伝子発現制御などあらゆる生体反応を担っており、タンパク質及びその構成成分であるアミノ酸は、生物には不可欠である。

近年、栄養素であるアミノ酸は、栄養素とは異なる“特別な機能”を持つことで注目されるようになった。機能性食品という言葉が生まれたのも、私たちの生活が飽食の時代に移ったためであると考えられる。すなわち、栄養目的の食事から病気の予防という付加価値が加えられた食事に関心が高まったためと考えられる。アミノ酸の栄養素以外の高機能として、ロイシンのタンパク質合成促進作用、アルギニンの内分泌系に成長ホルモン分泌を促す作用、グルタミンの消化管の修復作用などが知られている。しかし、現在までにこれらの作用のメカニズムは解明されていない。

本研究では、ロイシンが細胞内のタンパク質合成を促進する作用に注目した。ロイシンのタンパク質合成促進の作用メカニズムとして、mTOR シグナル経路の活性化が考えられている。しかし、詳細な活性化メカニズムはまだ解明されていない。そこで、本研究では、アフィニティ精製に適した当研究室で開発した粒子を用いて、ロイシンの標的タンパク質を探索するという画期的な手法により、活性化機構の解明に取

り組んだ。

ロイシンによるタンパク質合成促進作用のメカニズムが明らかになることによって、タンパク質代謝のバランスの崩れた状態を改善する薬剤や高機能性食品の開発が可能になる。例えば、入院時や疾病時に見られる、臓器の機能低下や筋力低下を改善することを想定した。これは、私たちの生活の質（Quality of Life）の向上や健康につながる研究であると期待される。

1 - 2 本研究の背景

1 - 2 - 1 ロイシン

ロイシン (leucine, 三文字表記 Leu) は、タンパク質を構成する標準アミノ酸の 1 つである。側鎖に分岐アルキル鎖を持つため、イソロイシン、バリンと 3 つ合わせて分岐鎖アミノ酸と呼ばれる (図 1-1)。3 つの分岐鎖アミノ酸は、ヒト体内では合成できないため、必須アミノ酸に分類されている。

ロイシンの分解は、他の分岐鎖アミノ酸と共通している。まず、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素によるアミノ基転移反応を受ける。反応後に残った炭素骨格は、不可逆的な段階を含む複数の段階を経て、脂質の原料であるアセチル-CoA になる (イソロイシンとバリンはクエン酸回路に入って糖新生に寄与する点は異なる)。一方、アミノ基はグルタミン酸の一部になり、尿素回路によりアンモニアに変換され、さらに尿素に変換されて体外に排出される。分岐鎖アミノ酸以外の標準アミノ酸が肝臓で分解されるのに対し、分岐鎖アミノ酸は肝臓では分解されず筋肉で主に分解される。これは、代謝の第一段階であるアミノ基転移反応を触媒する分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素の活性が、筋肉では肝臓の約 60 倍も存在することによる。代謝酵素は全てミトコンドリアに存在している。

タンパク質を含む食事を摂取すると、血液中のアミノ酸濃度は増加する。細胞へのロイシンの取り込みは、細胞膜上にある中性アミノ酸トランスポーターによって行われている。中性トランスポーターとして代表的なものの 1 つが、LAT1 (別名 SLC7A5) / 4F2hc (別名 SLC3A2) ヘテロダイマーである。LAT1 は 12 回膜貫通タンパク質と考えられており、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ヒスチジンなどを通す広い選択性を示す。4F2hc は 1 回膜貫通タンパク質で、LAT1 とジスルフィド結合を形成し、LAT1 が機能するため

に必要とされている (Kanai *et al.* 1998; Yanagida *et al.* 2001)。このほか、ロイシンを通すトランスポーターとして、ヒトでは、y⁺LAT-1 (SLC7A7) / 4F2hc ヘテロダイマー、y⁺LAT-2 / rBAT ヘテロダイマー、LAT3 などが報告されている (Torrents *et al.* 1998; Pfeiffer *et al.* 1999; Babu *et al.* 2003)。

1 - 2 - 2 ロイシンのタンパク質合成促進作用

ロイシンにタンパク質合成を促進する作用があることは、今から 35 年前に報告された (Buse & Reid 1975)。ラットから単離した横隔膜 (筋組織の一種) にロイシンを前処理すると、放射能ラベルした [¹⁴C]-リジンの組織タンパク質への取り込みが増加し、タンパク質合成促進、分解抑制の効果があることが示された。そして、現在に至るまでに、ラットを用いた実験や各種培養細胞株を用いて、ロイシンの作用が確認されている。

一晩絶食したラットにロイシンを経口投与し、[³H]-フェニルアラニンを注射し各組織におけるタンパク質への取り込み量を調べると、心臓は例外として骨格筋・肝臓・腎臓・脂肪組織など各組織においてタンパク質合成が増加するという報告がある (Kimball & Jefferson 2004)。特に、骨格筋でのロイシンの効果は強く、ロイシンを経口投与すると通常の食事を与えた時と同程度のタンパク合成が増加するという報告もある。これらの実験は、1 日の食事で摂取するロイシンの量を 1 回で、水に溶かして与えている。絶食後の血液中のロイシンの濃度は約 0.1 mM だが、ロイシン投与後 1 時間で約 2 mM までに増加する (Anthony *et al.* 2000)。

このような作用を持つロイシンは、臨床の間でも使われている。例えば、術後の体内の低タンパク質状態を改善するため、分岐鎖アミノ酸を多く含むアミノ酸輸液が使われている。また、肝硬変患者は肝機能が低下しており、肝臓で作られる血清アルブミン量が低下している。肝硬変患者の低アルブミン血症を改善する薬剤として、分岐

鎖アミノ酸が使われている。

タンパク質の材料であるアミノ酸が豊富に存在すれば、タンパク質合成が促進することは想像に難くないが、ロイシンによるタンパク質合成促進作用は、タンパク質の材料として以外の関与があると考えられている。

1 - 2 - 3 mTOR シグナル経路

ロイシンのタンパク質合成促進作用は、mTOR(mammalian target of rapamycin) 経路というシグナル伝達経路を活性化して、翻訳開始を促進するためと考えられている。

mTOR シグナル経路は、mTOR という約 290 kDa の巨大なセリン / スレオニン キナーゼを中心とした細胞内シグナル伝達経路である (図 1-2)。酵母で免疫抑制剤 ラパマイシンの標的因子として TOR が同定され、mTOR は TOR の哺乳類ホモログ である。この mTOR シグナル経路は、細胞内外の栄養状態を感知して、翻訳促進や 細胞成長 (細胞の大きさを大きくする) をもたらす経路として知られている (Wullschleger *et al.* 2006)。mTOR は、Raptor・GβL と三者複合体 TOR complex 1 を形成している。この TOR complex 1 は、翻訳調節因子である S6K1 や 4E-BP1 をリン酸化することにより、翻訳を促進する。TOR complex 1 を活性化する上流因子としては、アミノ酸 (特にロイシン)、増殖因子やホルモン、グルコースが知られている (これらの因子が TOR complex 1 を活性化する機構については、1 - 2 - 4 で記述する)。

S6K1 (ribosomal protein S6 kinase 1、別名 p70^{S6k}) は、リボソーム S6 をリン酸化するキナーゼとして見つかったが、現在までに S6 以外にリン酸化する基質が報告されている。S6K1 がリン酸化する基質に、翻訳伸長に関与する eEF2k、翻訳開始因子 eIF4B、スプライシングに関わる SKAR などが報告されている。これらの因子が

リン酸化されることによって翻訳は促進する (Wang *et al.* 2001; Raught *et al.* 2004; Ma *et al.* 2008)。S6K1 は、多数のリン酸化部位を持っており、Thr229、Thr367、Thr371、Thr389、Ser404、Ser411、Ser418、Ser421、Ser424、Thr447 が知られている。Thr371 は、TOR complex 1 が直接リン酸化する部位として報告されており、他のリン酸化部位よりも上位にあると考えられている (Saitoh *et al.* 2002)。Thr389 のリン酸化状態も TOR complex 1 の制御下にあり、S6K1 活性と強い相関関係にある。よって、TOR complex 1 活性化の指標としてよく用いられている (Brown *et al.* 1995; Isotani *et al.* 1999)。

4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) は、mRNA の 5' 末端キャップ構造 (m⁷GpppX) に結合する翻訳開始因子 eIF4E に結合することによって、翻訳開始複合体の形成を阻害している。4E-BP1 (117 アミノ酸残基) のリン酸化部位として、Thr37、Thr46、Ser65、Thr70、Ser83、Ser112 の 6 箇所がある。さらに、TOR complex 1 により Thr37/46 → Thr70 → Ser65 という順序でリン酸化されることが知られている。4E-BP1 は、この 4 箇所でリン酸化を受けると eIF4E から離れる。その結果、eIF4E を含む開始複合体が 5' 末端キャップ構造付近に形成され、キャップ依存的な翻訳が促進する (Brunn *et al.* 1997; Gingras *et al.* 2001; Mothe-Satney *et al.* 2000)。

TOR complex 1 による S6K1 や 4E-BP1 のリン酸化は、特定の mRNA の翻訳を促進すると考えられている。TOR complex 1 阻害剤のラパマイシンによって、全体的なタンパク質合成全体が 10~15% 程度抑えられるが、その中でも特に 5'UTR にオリゴピリミジン配列を持つ遺伝子 (翻訳伸長因子 eEF-1a、eEF2、リボソーム S6 など) の翻訳が強く阻害される (Jefferies *et al.* 1994)。ただし、このようなオリゴピリミジン配列を持つ因子の翻訳は、S6K1 非存在下でも行われ、S6K1 を補完する因子が存在すると考えられている (Jefferies *et al.* 1997; Stolovich *et al.* 2002; Pende *et al.* 2004)。4E-BP1 に関しては、4E-BP1 ノックダウン実験 (癌細胞の運動性に関わる因子の翻訳が増加) や 4E-BP1 の結合因子 eIF4E の過剰発現実験 (cyclin D1、c-Myc

などの細胞周期・細胞成長に関わる因子の翻訳が減少)から、特定の mRNA の翻訳に関与していると考えられている (Benedetti *et al.* 1999; Magagnin *et al.* 2008)。しかし、TOR complex 1 が特定の mRNA の翻訳を促進させる機構は、今後解明すべき課題である。

1 - 2 - 4 mTOR シグナル経路を活性化する因子

mTOR (特に mTOR・Raptor・GβL から成る三者複合体 TOR complex 1) を活性化する因子としては、

増殖因子 (例: IGF-I、VEGF) やホルモン (例: インスリン)

グルコース

アミノ酸 (特にロイシンは強く mTOR を活性化することが知られている)

が知られている。

増殖因子やホルモン、グルコース、が mTOR を活性化する経路についてはよく調べられている一方で、ロイシンが mTOR を活性化する経路はまだ明らかになっていない (以下、ロイシンが mTOR を活性化する経路を「ロイシン-mTOR シグナル経路」と呼ぶ) (図 1-2)。

増殖因子やホルモンの活性化経路 (総説は Lindsley *et al.* 2004)

増殖因子やホルモンが、細胞膜上のそれぞれの受容体に結合することによって、細胞内のシグナル伝達が引き起こされる。以下、インスリンについて例を挙げる。インスリンが細胞膜上のインスリン受容体に結合すると、IRS (insulin receptor substrate) が受容体へリクルートされ IRS リン酸化が起こる。次に、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) が IRS へリクルートされ、PI3K は細胞膜上のリン脂質であるホスファチジルイノシトールのイノシトール環 3 位をリン酸化する

(PI (4,5) P から PI (3,4,5) P を産生する)

PI (3,4,5) P の存在する膜は、タンパク質が結合する足場となる。キナーゼである PDK1 や Akt が、PI (3,4,5) P の存在する細胞膜へリクルートされて、PDK1 は Akt をリン酸化・活性化する。この PI3K-Akt pathway は癌に關与する経路としてよく知られている。

PI3K-Akt pathway と mTOR をつなぐのが、TSC1/TSC2 ヘテロダイマーと Rheb である。Rheb は GTP 結合タンパク質であり、TSC1/TSC2 は Rheb の GTP 分解を促進する。増殖因子やホルモンによって上述のように活性化された Akt は、TSC2 をリン酸化 (不活性化) して TSC1/TSC2 の活性を阻害する。その結果、Rheb は GTP 結合型で維持される。Rheb GTP 結合型は、mTOR の触媒ドメインに直接結合し、mTOR 活性を増加させる。

グルコース

グルコース代謝で生じる ATP や代謝酵素を通して、mTOR は活性化される。現在 3 つの互いに独立な経路が知られている。

AMP/ATP 比の増加は AMPK (AMP-activated protein kinase) によって感知され、AMPK は活性化する。グルコースの増加によって、逆に AMP/ATP 比が減少すると、AMPK は不活性化する。1 つ目の経路は、AMPK のリン酸化基質である TSC2 を介した経路である。グルコースの増加によって AMPK が不活性化し、TSC2 の脱リン酸化 (不活性化、Akt によるリン酸化と逆の作用) が誘導される。TSC2 以降は増殖因子やホルモンの経路に入り、Rheb GTP 結合型が増加し、mTOR が活性化する (Inoki *et al.* 2003)

2 つ目の経路は、AMPK のリン酸化基質である Raptor を介した経路である。Raptor は mTOR と複合体を形成する因子である。リン酸化結合タンパク質 14-3-3 はリン酸化された Raptor に結合することで、mTOR と Raptor の結合を阻害してい

る。グルコース存在下では、これと逆のことが起きる (Gwinn *et al.* 2008)。

3 つ目の経路は、グルコース代謝酵素 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を介した経路である。グルコースが減少すると、GAPDH は代謝経路における基質 glyceraldehyde-3-phosphate と結合する必要がなくなり、その代わりに Rheb と結合し、mTOR の活性を阻害する。グルコース存在下では、GAPDH は代謝に関与し、Rheb から離れる。その結果、Rheb は mTOR を活性化する (Lee *et al.* 2009)。

アミノ酸、特にロイシン

標準アミノ酸の中でも、ロイシンは mTOR を活性化することができる (Dann *et al.* 2006)。現在までに、ロイシンあるいは標準アミノ酸混合物による mTOR 活性化に関わる因子として以下のものが報告されている (図 1-3) (総説は Dunlop *et al.* 2009)。これらの因子が独立に働くのか協調的に働くのかは、今後検証が必要である。また、ロイシンが第一段階で感知される機構は、現在までに報告されていない。

・ Rheb (Ras superfamily GTPase)

アミノ酸は、Rheb と mTOR の直接的な結合を増加させることで mTOR を活性化し、Rheb に結合する GTP 量には影響を与えない (増殖因子やホルモンは、GTP 結合型の Rheb を増加させる。)(Long *et al.* 2005)。

・ Rag (Ras superfamily GTPase)

ロイシンやアミノ酸が存在する時、Rag は mTOR の局在を後期エンドソームへと移行させるのに関与する (Sancak *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008)。

・ hVps34 (Class III ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ)

アミノ酸により hVps34 は活性化され、ホスファチジルイノシトール (PI) の 3 位をリン酸化し、PI(3)P を産生する。産生した PI(3)P が存在する膜は、他のタンパク

質の結合部位になると考えられる (増殖因子やホルモンの活性化経路は、Class I ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼが関与する。Class I は、PI、PI (4) P、PI (4,5) P を基質とするが、Class II は PI のみを基質とする)(Byfield *et al.* 2005; Nobukuni *et al.* 2005)

このほかにも以下の因子がロイシン (アミノ酸) -mTOR シグナル経路に関与すると報告されている。

- ・ RalA (Ras superfamily GTPase)(Maehama *et al.* 2008)
- ・ MAPK4K3 (セリン / スレオニンキナーゼ)(Findlay *et al.* 2007)
- ・ Npr2/Npr3 ヘテロダイマー (スクリーニングで得られた酵母の因子)(Neklesa *et al.* 2009)
- ・ Raptor (mTOR と複合体を形成する因子。アミノ酸は、mTOR と Raptor の結合を減少させ、特に Raptor の mTOR に対して阻害に働いている部分が外れるというモデルが考えられている)(Kim *et al.* 2002)

ロイシンを感知する機構は明らかになっていないが、ロイシンは細胞膜上にあるトランスポーターによって細胞内に取り込まれること (1 - 2 - 1) タンパク質合成阻害剤を用いて細胞内アミノ酸濃度を増加させたときに mTOR シグナル経路の活性化が見られることから (Beugnet *et al.* 2003) ロイシンの標的因子は細胞内部にあると考えられる。

1 - 2 - 5 ユビキチンリガーゼ UBR1、UBR2

UBR1 と UBR2 はそれぞれ、ユビキチン依存的タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼ (E3) として働いている (図 1-4)。酵素 E1、E2 によって活性化したユビキチンを、E3 である UBR1 あるいは UBR2 がタンパク質に付加する。ポリユビキ

チン鎖が付加されたタンパク質は 2.5 MDa の巨大なプロテアソームによって分解される。

UBR1 と UBR2 は、タンパク質半減期の法則である N-end rule に関与する因子として同定された。N-end rule とは、タンパク質の N 末端アミノ酸残基によってそのタンパク質の半減期が変わるという法則である。N-end rule は、タンパク質の N 末端を様々なアミノ酸残基にした人工的なモデル基質を用い、酵母やウサギ網状赤血球抽出液中で調べられた (Gonda *et al.* 1989; Varshavsky 1996)。

UBR1 と UBR2 は、タンパク質の N 末端が、塩基性アミノ酸 (Arg、Lys、His : type 1) または疎水性アミノ酸かさ高い側鎖を持つアミノ酸 (Leu、Phe、Trp、Tyr、Ile : type 2) であるものを認識してユビキチンを付加する。さらに、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys も Arg の付加を受けて UBR1 と UBR2 に認識されるようになる。UBR1 と UBR2 は、同様に type 1 と type 2 の基質を認識する。(図 1-5A) (Kwon *et al.* 2001, 2003; Tasaki *et al.* 2005)。

UBR1 と UBR2 は、このように Met 以外のアミノ酸残基を認識するため、プロテアーゼによって切断されたものや、メチオニンアミノペプチダーゼによって開始メチオニンが切断されたものを認識する。UBR1・UBR2 の基質や、N-end rule に沿って分解される基質として、以下のようなものが報告されている。染色体分離における yeast SCC1 fragment (セパレーズによる切断後; Rao *et al.* 2001)、アポトーシスの制御における Drosophila inhibitor of apoptosis (DIAP) 1 (カスパーズによる切断後; Ditzel *et al.* 2003)、心臓血管の発生に重要な G タンパク質調節因子 mouse RGS4、RGS5、RGS16 (メチオニンアミノペプチダーゼによる開始 Met の切断及びその後の Cys 酸化修飾後; Lee *et al.* 2005; An *et al.* 2006) などがある。

このような UBR1 と UBR2 の基質認識の性質から、type 1 や type 2 のアミノ酸残基を N 末端に持つジペプチドは、それぞれ対応する基質のユビキチン化を阻害する (例 : Arg-Ala (type 1 ジペプチド)、Leu-Ala、Trp-Ala (type 2 ジペプチド))。こ

これは、ジペプチドが UBR1 や UBR2 と基質の結合を競合的に阻害するためである。この阻害剤であるジペプチドを用いた実験により、以下のような現象にも N-end rule が関与していると考えられている。筋タンパク質の分解 (Solomon *et al.* 1998)、ラット培養細胞株 PC12 における神経突起の伸長 (Hondermarck *et al.* 1992; Obin *et al.* 1999)、神経発生に関連して両生類の肢の再生 (Taban *et al.* 1996) などの現象にも N-end rule の関与が示唆されている。

一方、上記のような基質認識に合わない例外の基質 (yeast CUP9) も報告されている。転写抑制因子 yeast CUP9 は、type 1 と type 2 のジペプチド存在下でユビキチン化が促進する。これは、両ジペプチドが存在する時、UBR1 や UBR2 のコンフォメーションが変化し、CUP9 を認識する部位が露出するためと考えられている。両ジペプチドが存在すると CUP9 はユビキチン化され、ペプチドトランスポーターの発現が促進し、ポジティブフィードバックがもたらされる (Turner *et al.* 2000; Du *et al.* 2002; Xia *et al.* 2008)。

UBR1 と UBR2 は、相同性が高く、同じ基質の認識機構であるが、それぞれのノックアウトマウスの表現型は異なっている。UBR1^{-/-}マウスは、生存可能だが体重が顕著に少なく、特に骨格筋と脂肪組織の重量が減少している (Kwon *et al.* 2001)。UBR2^{-/-}マウスは、雄は生存しているが不妊、雌は胎生致死である (Kwon *et al.* 2003)。ノックアウトマウスの表現が異なることから、それぞれの特異的な基質の存在が示唆されている。

1 - 2 - 6 UBR1、UBR2 が持つドメイン構造

UBR1 と UBR2 は、相同性が 66% と高く (ヒト、ラット) 機能ドメインは共通している (図 1-5B)。N 末端側から、基質認識ドメイン、E2 との結合部位 (basic residue-rich (BRR) domain)、ユビキチンリガーゼ活性を担う部位 (RING-H2 finger

motif) 種間で保存されている自己阻害領域 (UBR autoinhibitory domain (UAIN) / region VI) が知られている (Tasaki *et al.* 2009; Zenker *et al.* 2005)。基質認識ドメインは、type 1 基質を認識する部位 (UBR box、UBR2 では 99-163 aa) と、type 2 基質を認識する部位 (N-domain、UBR2 では 226-303 aa) に分かれている。近年の報告で、type 2 基質は UBR box より N 末端側の 1-99 aa も関与することが示唆されている (Tasaki *et al.* 2009)。また、自己阻害領域は、基質の 1 つとして知られている yeast CUP9 を認識する領域 (type 1 や type 2 の基質認識部位とは異なる領域) を覆い、CUP9 のユビキチン化を阻害している。ジペプチド存在下で、自己阻害が解除され、CUP9 はユビキチン化される (1 - 2 - 5)。

UBR1 や UBR2 の type 1 基質を認識するドメイン (UBR box) は、Cys と His を持つ約 70 アミノ酸からなる配列である。この UBR box を共通して持つものは、UBR family (UBR1~7) として報告されている (Tasaki *et al.* 2005)。N-end rule には、UBR1、UBR2 に加えて、UBR3、UBR4 の関与が示唆されている (Tasaki *et al.* 2005, 2007)。

1 - 3 本研究の目的

現在までに、ロイシンが mTOR キナーゼを活性化する機構は明確になっていない。特に、ロイシンがどのような標的因子に作用しているのかは明らかにされていない。そこで、私は、ロイシンの細胞内標的を探索し、ロイシンが mTOR キナーゼを活性化する機構の解明を目的とした。

ロイシンという細胞内に存在する化合物が、どのような因子と標的としているかは興味深い。ロイシンの標的因子を明らかにすることによって、低タンパク質状態を改善する化合物の開発につながる可能性がある。また、ロイシンによる mTOR シグナル経路活性化機構を明らかにすることによって、mTOR シグナル経路が関与している他の作用（オートファジー抑制や細胞周期制御、癌の形成など）に対する新しい知見を得られることが期待される。

本研究論文の構成は以下の通りである。

第 1 章「序論」では、本研究の背景を述べ、全体の導入部とした。

第 2 章「ロイシンに結合するタンパク質の探索」では、アフィニティ精製により、ロイシン結合タンパク質の探索を行った。その結果、ロイシン結合タンパク質としてユビキチン依存的タンパク質分解に関わる UBR1 及び UBR2 を同定した。

第 3 章「UBR1、UBR2 の mTOR シグナル経路への影響（培養細胞株を用いた解析）」では、哺乳類培養細胞株を用いて UBR1 と UBR2 の過剰発現実験と発現抑制実験を行うことにより、UBR1 と UBR2 がロイシン-mTOR シグナル経路に関与するかを解析した。その結果、UBR1 と UBR2 は mTOR 活性を抑制する因子であることが示された。また、ロイシンは細胞において UBR1、UBR2 を阻害することによって mTOR を活性化することが示唆された。

第 4 章「ロイシンが UBR1、UBR2 活性に与える影響（*in vitro* 解析）」では、N-end rule 基質の分解が見られる *in vitro* 評価系を用いて、ロイシンが UBR1 と UBR2 の

活性に与える影響を検証した。その結果、ロイシンは、N 末端にロイシンを持つモデル基質の分解を阻害することが明らかになった。さらに、ロイシンが UBR1 と UBR2 のモデル基質への結合を競合的に阻害する可能性が考えられたため、部分欠損変異体を用いて UBR2 のロイシン結合部位の探索を行った。その結果、ロイシンは UBR2 の基質認識ドメインに結合することを明らかにした。

第 5 章「総括」で、本研究によって得られた結果をまとめた。そして、ロイシンが UBR1、UBR2 を通して mTOR を活性化する機構について考察した。

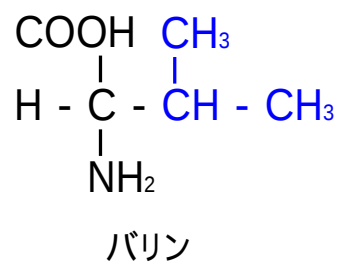
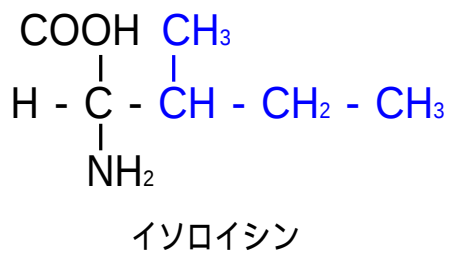
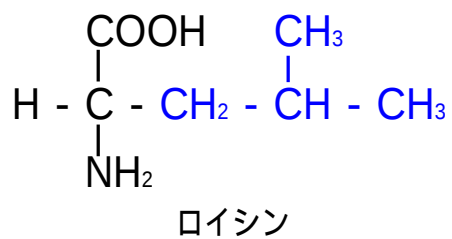


図 1-1 分岐鎖アミノ酸

ロイシン、イソロイシン、バリンは、側鎖が分岐炭素鎖であるため、分岐鎖アミノ酸と呼ばれている。

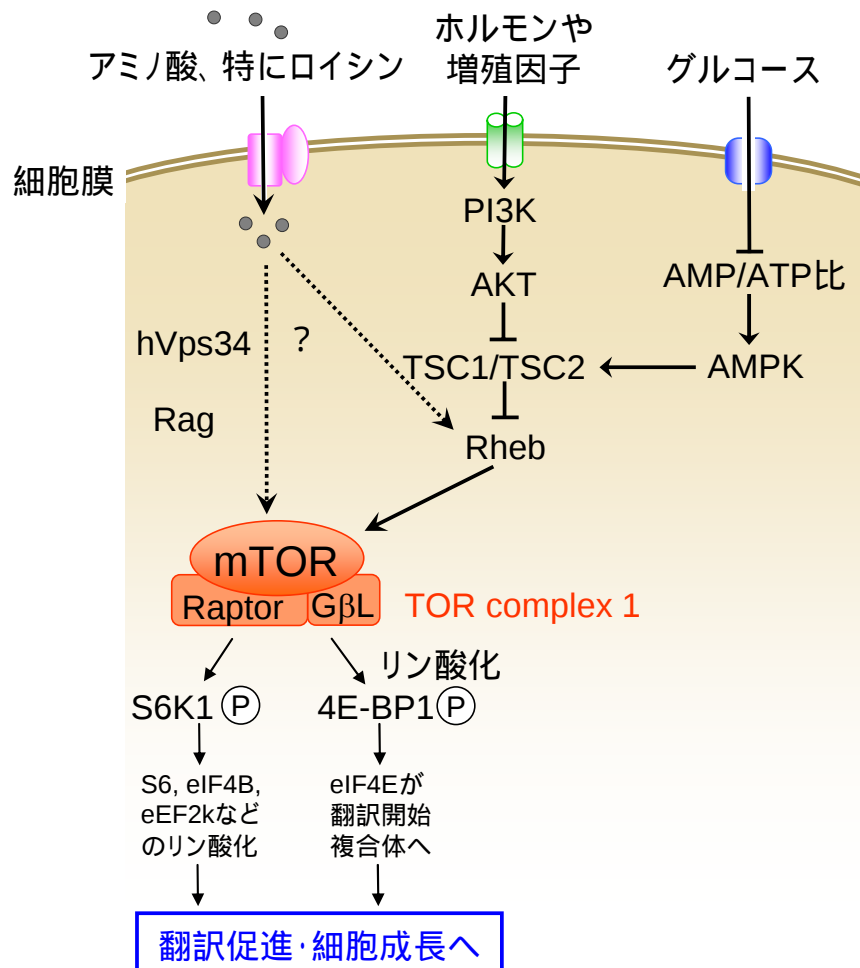


図 1-2 mTOR シグナル経路の全体像

約 290 kDa の mTOR を中心とし、細胞内外の栄養状態を感知して、翻訳促進や細胞成長をもたらす経路として知られている。mTOR は、Raptor、GβL とともに複合体 TOR complex 1 を形成している。TOR complex 1 は、翻訳を制御する S6K1 や 4E-BP1 のリン酸化を通して、翻訳や細胞の大きさを制御する。ホルモンや増殖因子やグルコースが TOR complex 1 を活性化する経路はよく調べられているが、ロイシンが TOR complex 1 を活性化する経路はまだ明らかになっていない。

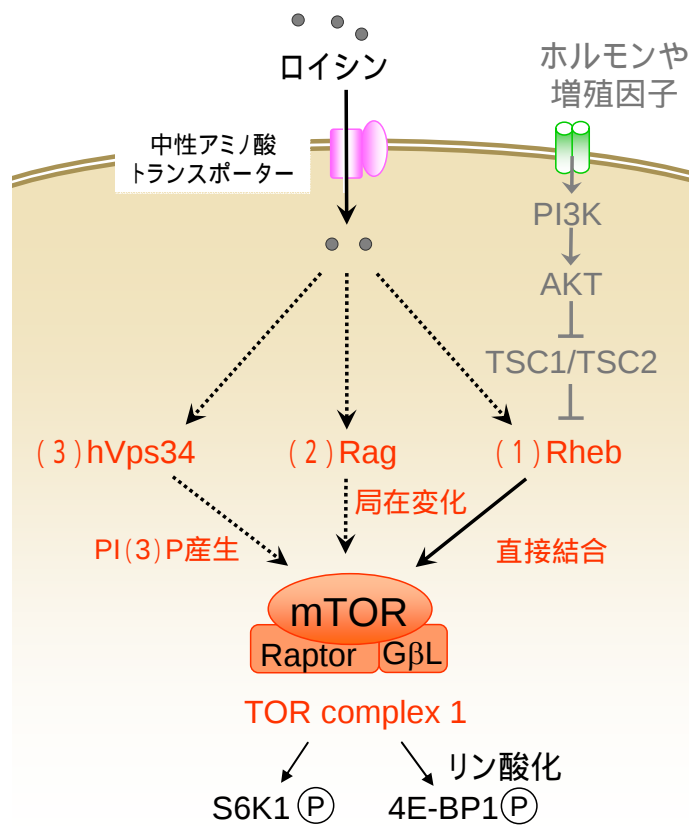


図 1-3 ロイシン-mTOR シグナル経路に関わる因子

ロイシンあるいはアミノ酸による mTOR 活性化に関与する因子。(1) Rheb (GTPase) : ホルモンや増殖因子の経路にも関与している因子で、アミノ酸が存在すると mTOR との結合量が増加する。(2) Rag (GTPase) : ロイシンやアミノ酸による mTOR の局在変化に関与している。(3) hVps34 (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ) : アミノ酸によって活性化し、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸(PI(3) P) を産生する。

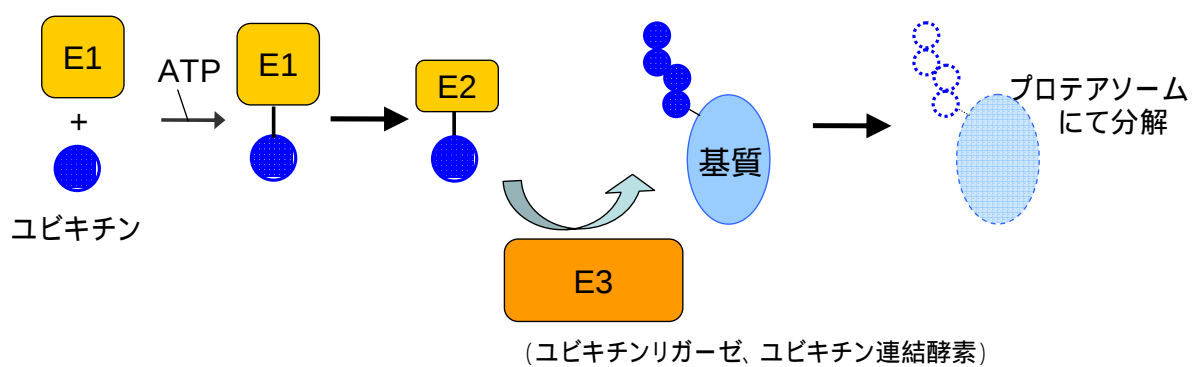
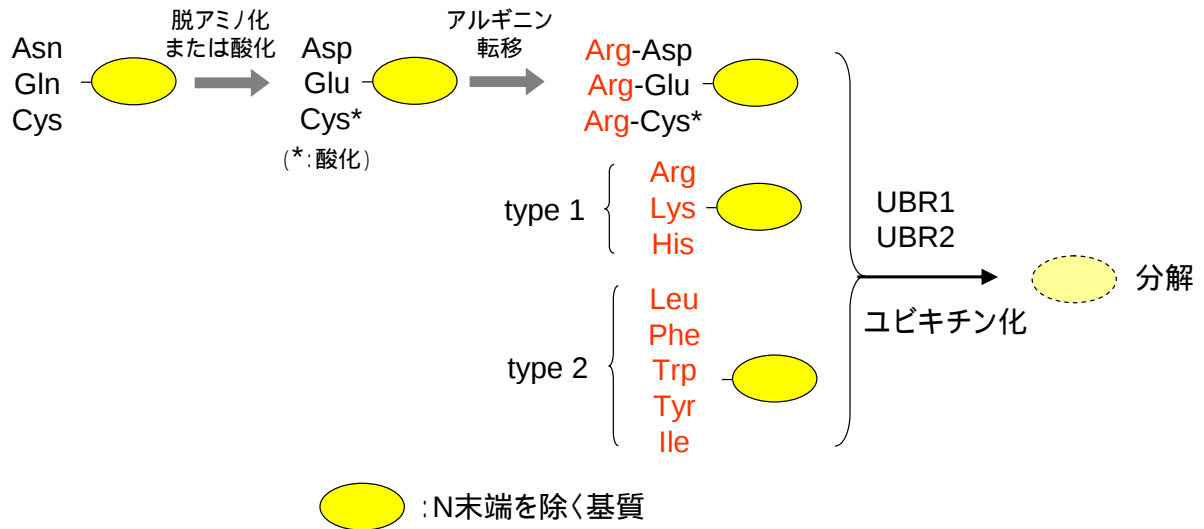


図 1-4 ユビキチン-プロテアソーム経路

E1、E2 によって活性化されたユビキチンを、E3 (ユビキチンリガーゼ) が基質に付加する。ポリユビキチン化された基質は、プロテアソームによって分解される。本研究で注目した UBR1 及び UBR2 は、それぞれユビキチン依存的タンパク質分解に関わる E3 (ユビキチンリガーゼ) である。

(A)



(B)

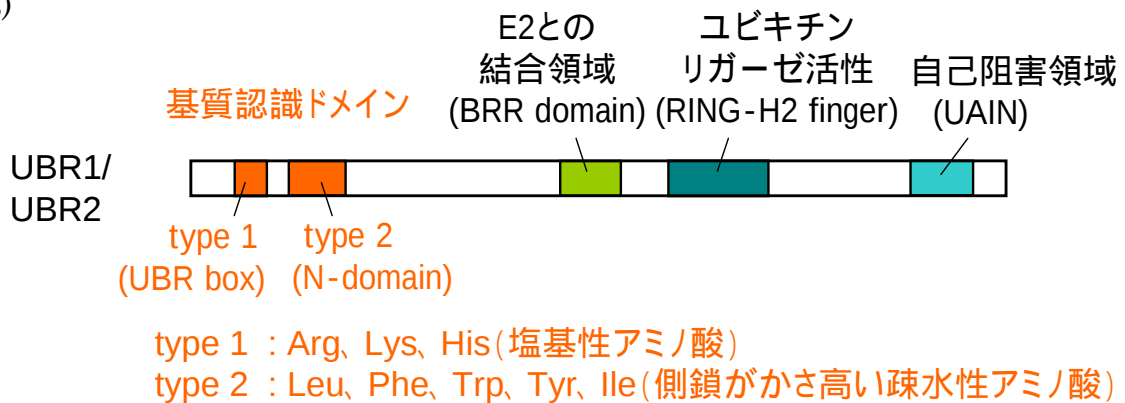


図 1-5 N-end rule に関与する UBR1、UBR2

(A) N-end rule の概要。UBR1 と UBR2 は、タンパク質の N 末端アミノ酸残基が type 1 (Arg、Lys、His) type 2 (Leu、Phe、Trp、Tyr、Ile) であるものを認識し、ユビキチン化を付加することが知られている。また、Asp、Glu は Arg 付加を受けて、Asn、Gln、Cys は脱アミノ化や酸化後に、Arg の付加を受けて、UBR1 と UBR2 に認識されるようになる。

(B) UBR1 と UBR2 の共通した機能ドメイン。基質認識ドメイン(type 1 : UBR box、type2 : N-domain)、E2 との結合領域 : BRR domain、ユビキチンリガーゼ活性を担う部位 : RING-H2 finger、自己阻害領域 : UAIN、が知られている。

第2章 ロイシンに結合するタンパク質の探索

2 - 1 緒言

ロイシンが mTOR キナーゼを活性化する機構において、ロイシンがどのような標的因子に作用しているかを明らかにするため、アフィニティ精製を行った。アフィニティ精製は、リガンドと生物学的親和性（アフィニティ）の高いものを選択的に得る方法であり、リガンドの標的タンパク質候補を得るのに適した方法である。

当研究室ではアフィニティ精製用担体を独自に開発し、現在までに様々な薬剤の標的タンパク質を同定してきた(Sakamoto *et al.* 2009; Shimizu *et al.* 2000; Uga *et al.* 2006; Azuma *et al.* 2008; Kuramori *et al.* 2009)。このアフィニティ精製用担体・SG 粒子あるいは FG 粒子は、スチレン（St）を芯にグリシジルメタクリレート（GMA）で表面を覆った粒径約 200 nm の粒子である。この粒子には以下のような長所がある。

安定性に優れ、有機溶媒など様々な溶媒中で固定化反応を行うことができる。

粒径が約 200 nm と市販アガロース担体の数 μm に比べて小さく、同じ体積で大きな表面積を持つため、リガンドが多く固定化でき、効率よく精製できる。

GMA と表面リンカー EGDE が適度な親水性を持つため、タンパク質の非特異的吸着が少ない。

表面官能基を改変することができ（例：アミノ基、カルボキシル基）、多種のリガンドが固定可能である。

微粒子ではあるが遠心（SG）や磁気（FG）によって溶液との分離が可能で、1.5 ml のチューブという小スケールで、また短時間で精製を行うことができる。

以上のような長所から、ロイシン結合タンパク質の探索に適した担体と考え、本研究で用いた。

アフィニティ精製を行うにあたって、本章では、まずロイシンによる mTOR シグナル経路活性化を哺乳類培養細胞株で確認した。また、ロイシンの誘導体を用いて、ロイシンのカルボキシル基が活性に必須でないことを示唆した。カルボキシル基を介してロイシンを固定化した粒子を作製し、培養細胞抽出液を用いて、アフィニティ精製を行った。本章では、ロイシンに特異的に結合するタンパク質として、ユビキチンリガーゼ UBR1 及び UBR2 を同定した。

2 - 2 材料及び方法

2 - 2 - 1 試薬・培地・抗体

ロイシン固定化粒子の作製に用いた試薬

- ・ Fmoc-Leu-OH (Wako、 - 20 保存) ロイシンのアミノ基に Fmoc 基が付いたもの。固定化直前に最終濃度 100 mM となるように DMF に溶かした。
- ・ HOBt (1-hydroxybenzotriazole)(ペプチド研究所、室温保存)
固定化直前に最終濃度 100 mM となるように DMF に溶かした。
- ・ EDC / WSCD (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide / 別名 Water soluble carbodiimide)(ペプチド研究所、 - 20 保存)
- ・ DMF (N,N'-dimethylformamide) 無水酢酸、ピペリジン (以上ナカライ、室温保存)

培養関連試薬の試薬

- ・ ロイシン (Wako) ロイシン以外の標準アミノ酸 (ナカライテスク) Ac-Leu-OH、H-Leu-NH₂ (Sigma)

それぞれ DMEM (血清なし・アミノ酸なし)(後述) に溶解させた。pH が大きく変化するものについては、1 N HCl または 7.5% NaHCO₃ を加え、フェノールレッドの色によって pH 調整した。

- ・ NaF (ナカライテスク) milliQ (蒸留水) に 500 mM の濃度で溶かして、 - 20 保存。ホスファターゼ阻害剤。
- ・ Na₃VO₄ (Sigma)
milliQ に 200 mM の濃度で溶かして、 - 20 保存。ホスファターゼ阻害剤。
- ・ DTT (dithiothreitol)(ナカライテスク)
milliQ に 1 M の濃度で溶かして、 - 20 保存。

・ DMEM の培地

DMEM(Invitrogen #12100) 10% 牛胎仔血清(Invitrogen、非働化処理(56 、30 分間) 済みを使用) 抗生物質として、200 μ g/ml ストレプトマイシン硫酸塩 (明治製菓) 200 単位/ml ペニシリン G カリウム (明治製菓) を混合したもの。

・ DMEM (血清なし) の培地

DMEM の血清の代わりに milliQ を加えた。

・ DMEM (血清なし・アミノ酸なし) の培地

DMEM (Invitrogen #12100、構成成分は表 2-1) の組成に合わせて作製した。
まず、NaCl、D-Glucose、Choline chloride、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、アミノ酸以外の成分 10 l 分を、乳鉢で均一な大きさにまですりつぶして混合し、DMEM mixture として 4 で保存した(試薬は全てナカライテスク)。そして、以下に示す手順で、DMEM (血清なし・アミノ酸なし) の培地 500 ml を作製した。

milliQ (300 ml 程度) に NaCl 3.2 g、D-Glucose 2.25 g、DMEM mixture 0.4428 g を溶かす

↓

Choline chloride 1000 倍溶液 (0.04 g/10 ml) を 500 μ l 加える

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 10000 倍溶液 (0.01 g/10 ml) を 50 μ l 加える

(Choline chloride は吸湿性があるため DMEM mixture に含めなかった。

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ の水溶液は紫外線により硝酸鉄()と酸素に分解されるため、直前に水溶液を作製した。)

↓

ストレプトマイシン硫酸塩を最終濃度 200 μ g/ml、ペニシリン G カリウムを最終 200 単位/ml になるように溶かす

↓

450 ml までメスアップ

フィルトレーション (Millipore、 GP Express Membrane (0.22 μm))

↓

オートクレーブ済み 7.5% NaHCO_3 25 ml を加える

1N HCl を適量 (約 5 ml) 加えて pH 調整する

抗体

- anti-S6K1 (Santa Cruz sc-8418): 1/1000 (以下希釈倍率)
- anti-phospho-S6K1 (Thr389) (Cell Signaling 9205): 1/300
- anti-Actin (Chemicon MAB1501): 1/5000
- anti-Nucleolin (Novus NB600-241): 1/1000

anti-Actin は、5% skim milk / TBS / 0.02% NaN_3 溶液で希釈。anti-S6K1、anti-phospho-S6K1 (Thr389) anti-Nucleolin は Can Get Signal (TOYOBO) で希釈。

2 - 2 - 2 細胞培養・細胞抽出液の調製

ラット肝臓癌由来細胞株 H4IIE (ATCC から購入) は、 α MEM (Invitrogen #11900-024) 10% 牛胎仔血清 (Invitrogen、非働化处理済みを使用) 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (明治製菓) 200 単位 ペニシリン G カリウム (明治製菓) の培地中で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

細胞抽出液を調製するにあたっては、H4IIE を 15-cm tissue culture dish 100 枚培養し、Dignam 法による細胞質画分抽出液の調製を行った (Dignam *et al.* 1983)。Dignam 法の原理は、低張液により細胞をふくらませた後、ホモジェナイザーにより核を残したまま細胞を壊し、細胞質抽出液を得る。その後、核を高張液中で壊し核抽

出液を得る、という方法である。操作は全て 4℃で行った。

細胞を、PBS 5 ml で 2 回洗浄した後、PBS 2 ml を加えてスクレーパーにより細胞を回収した。細胞は、 $780 \times g$ (2,000 rpm) 10 分間遠心した (TOMY、AX-310)。遠心後の細胞の体積(Packed cell volume、PCV)を測り、PCV 5 倍量の Buffer A (10 mM HEPES-NaOH (pH7.9) 10 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.5 mM DTT) に懸濁した。氷上で 10 分間静置した後、 $780 \times g$ (2,000 rpm) 5 分間遠心した (TOMY、AX-310)。上清を取り除き、PCV 2 倍量の Buffer A で懸濁した後、Dounce homogenizer (15 ml / typeB tight) で 20 回ホモジナイズした。ここで細胞が破碎され、核が流出しているのを顕微鏡で確認した (核は黒い粒として見えた)。この細胞破碎液を 2,500 rpm、10 分間遠心し (遠心機 : TOMY、GRX-220) 上層を細胞質抽出液として回収した。

得られた細胞質抽出液を、透析バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH7.9) 10% Glycerol、50 mM KCl、0.2 mM EDTA (pH8.0) 0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF) 2 ℓ 中で、2 時間 30 分の透析を 3 回行った。ただし、NP-40 は透析膜を透過できないと考えられたため、透析前に細胞質抽出液に NP-40 を最終 0.1% になるように加えた。透析により細胞内のアミノ酸が除かれることが予想され、競合阻害実験を行うことを考慮すると透析は重要と考えられる。透析後、34,000 rpm、1 時間、超遠心を行い (遠心機 : BECKMAN XL-100、ローター : Sw40Ti) 上清を回収し分注して -80℃ に保存した。アフィニティ精製に用いる時は、凍結溶解による凝集体を除くため、15,000rpm、20 分間、4℃で遠心した後の上清を用いた。

2 - 2 - 3 ロイシンによる S6K1 リン酸化

H4IIE 細胞株でロイシンによる S6K1 リン酸化を見る実験は、以下のように行った。

前夜に 12-well tissue culture plate に H4IIE 2×10^5 cells/well をまき、37℃、5% CO₂ 条件下で約 12 時間インキュベート、培地は α MEM を使用

- ↓ DMEM (血清なし) 1 ml に変えて、37℃、5% CO₂ 条件下でインキュベート 24 時間
- ↓ DMEM (血清なし・アミノ酸なし) で 1 回洗った後、同培地 900 μ l を加えて、6 時間
- ↓ 各アミノ酸あるいは各ロイシン誘導体溶液 (目的の 10 倍濃度) を 100 μ l 加えて 1 時間
- ↓ PBS (10 mM NaF / 1 mM Na₃VO₄ を直前に加えたもの) で洗浄 2 回、同 PBS を加えてスクレーパーにより細胞回収
- ↓ 遠心 (1,500 rpm (200 $\times$ g) 5 分間、4℃)
- ↓ NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0) / 150 mM NaCl / 1% NP-40 / 10mM NaF / 1 mM Na₃VO₄ / 1 mM DTT) 50 μ l を加えて、ピペッティングで細胞をほぐした後、10 分間、on ice に置く。2、3 分置きにタッピングなどで転倒攪拌する。
- ↓ 遠心 (15,000 rpm (20,000 $\times$ g) 20 分間、4℃) 上清をサンプルとして回収
- ↓ 上清のうち 1 μ l をタンパク質濃度測定に用いる (Bradford 法、ナカライテスク)。上清の残りに 3 分の 1 量の 4 $\times$ SDS sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8) / 500 mM 2-mercaptoethanol / 8% SDS / 0.4% BPB / 40% (v/v) glycerol) を加え、98℃で 5 分加熱。
- ↓ タンパク質の量をそろえて SDS-PAGE に流し、ウェスタンブロッティングを行った。

2 - 2 - 4 ロイシン固定化粒子の作製

固定化の流れは図 2-3 の通り。固相ペプチド合成で用いられる Fmoc 法(アミノ酸のアミノ基の保護基として Fmoc 基を用い、C 末端側から N 末端側にアミノ酸をつなげていく方法)により、ロイシンを SG 粒子あるいは FG 粒子に固定化した。Fmoc 法を用いることによって、固定化されていない粒子アミノ基をマスキングすることができる。また、脱保護反応で脱離した Fmoc-ピペリジンの量から、ロイシン固定化量を算出することができる。脱保護反応に用いるピペリジンは弱塩基であるため、ロイシンのラセミ化を引き起こさず、固定化されたロイシンは L 体で維持される。

担体には、SG 粒子あるいは FG 粒子の表面に、リンカーとしてエチレングリコール・ジグリシジルエーテル(EGDE)を付け、さらにアンモニアを反応させて、リガンド固定化に用いる官能基としてアミノ基を保持した粒子を用いた(SGNEG DEN 粒子あるいは FGNEG DEN 粒子)。

SGNEG DEN 粒子あるいは FGNEG DEN 粒子 5 mg (表面アミノ基 約 3 μmol /mg) を、1.5 ml tube に分取し、DMF による洗浄を 3 回行った。これは、粒子に DMF 500 μl を加え、ボルテックス後遠心して(15,000 rpm、5 分間、室温) 上清を除くという操作を計 3 回行った。次に、Fmoc-Leu-OH : HOBt : EDC のモル比が 1 : 1 : 1 で最終濃度 1 または 10 mM になるように反応溶液 1 ml を加え、27 °C で一晩反応させた(Fmoc-ロイシンの固定化)。

その後、DMF で 4 回洗浄し、DMF で 10 倍に希釈した無水酢酸 70 μl / DMF 500 μl 中で 30 分間振とうした(無水酢酸によるマスキング)。この無水酢酸の量は、SGNEG DEN 粒子あるいは FGNEG DEN 粒子の表面にあるアミノ基(約 3 μmol /mg) の 50 等量であり十分量加えている。

DMF で 4 回洗浄後、50% ピペリジン / DMF 1 ml を加えて 1 分間振とうし、遠心し(15,000 rpm、5 分間、室温) 上清を回収した。再び 50% ピペリジン/DMF 1 ml を加えて 30 分間振とうし、この上清も回収した(脱保護)。脱保護反応を 2 回行

うのは、粒子の内部まで 50% ピペリジン/DMF を行き渡らせるためである。脱保護反応 2 回分の上清と、その後 DMF による洗浄 3 回分の上清を回収して混合し、301 nm における吸光度測定 (Beckman DU 640) に用いた。ロイシン固定化粒子はさらに DMF で 1 回洗浄、50% DMF / 50% MeOH で 1 回洗浄、50% MeOH で 3 回洗浄し、50% MeOH 500 μ l を加えて、5 mg / 500 μ l で粒子を保存した。

ロイシン固定化量は、ピペリジンによる脱保護反応の上清 2 回分と DMF 洗浄 3 回分を回収して混合し、吸光度測定を行って算出した。脱保護反応によって生じる Fmoc-ピペリジン (Fmoc 基とピペリジンが結合した形の化合物) は吸光を持つ (301 nm において DMF 中でモル吸光定数 7800 [L/mol $\cdot$ cm])。第 1 反応における Fmoc-Leu-OH 濃度を 0、1、10 mM とした時、ロイシンはそれぞれ約 0、20、50 nmol/mg 固定化された (図 2-4)。ロイシン固定化量が多い時、表面のアミノ基による静電的な結合と考えられる多数のタンパク質の結合が見られたため、本研究では 0 (コントロール) と 20 nmol/mg の粒子を用いた。

脱保護反応で Fmoc 基がほぼ 100%脱離していることは、粒子を定沸点塩酸で処理して、固定化したロイシンまたは Fmoc-ロイシンを遊離させ、HPLC 解析により確認した (定沸点塩酸処理では Fmoc-ロイシンの Fmoc 基切断は少量しか起きない)。

2 - 2 - 5 アフィニティ精製

アフィニティ精製の流れは図 2-5 の通り。まず、ロイシン固定化粒子 0.25 mg を 1.5 ml チューブにとり、Wash Buffer(20 mM HEPES-NaOH(pH7.9) 10% Glycerol、150 mM KCl、0.2 mM EDTA (pH8.0) 1 mM DTT、0.2 mM PMSF、0.1% NP-40) 500 μ l で洗浄を 3 回行った。操作としては、Wash Buffer 500 μ l を加えた後、十分にビーズをほぐし、遠心 (15,000 rpm (20,000 $\times$ g) 5 分間、4 $^{\circ}$ C、以下同様) を行った。次に、H4IIE 細胞抽出液 1 mg/ml、200 μ l を加えて、4 $^{\circ}$ C で 4 時間回転撹拌した (この時、細胞抽出液に 2.5 M KCl を適宜加えて 150 mM KCl になるように調節

した)(ロイシンへのタンパク質の結合)。その後、Wash Buffer 500 μ l で 3 回洗浄を行った。洗浄後、再度遠心して完全に上清を除いた後、1 $\times$ SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8) / 125 mM 2-mercaptoethanol / 2% SDS / 0.1% BPB / 10% (v/v) glycerol)) 40 μ l を加え、98 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、粒子に結合したタンパク質を全て溶出した。遠心 (15,000 rpm、5 分間、室温) して上清を回収し、このうち 10 μ l を SDS-PAGE に用いた。

競合阻害条件下でのアフィニティ精製は、タンパク質濃度 5 mg/ml の細胞抽出液に 100 mM ロイシンを適宜加えて、タンパク質濃度 1 mg/ml、ロイシン濃度 0、15、30、60 mM に調製した。4 $^{\circ}$ C で 1 時間回転攪拌を行った後 (プレインキュベーション) ロイシン固定化粒子を加えて 4 $^{\circ}$ C で 4 時間回転攪拌を行った。これらは全て 150 mM KCl の条件下で行った。洗浄、溶出は、前述のように行った。

2 - 2 - 6 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

分離ゲル : Solution A (30% acrylamide / 0.8% N,N'-methylenebisacrylamide)、Solution B (1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) / 0.4% SDS)、milliQ (蒸留水) を適宜混合し、10% APS (ammonium persulfate) 40 μ l と TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) 10 μ l を加えて重合させた。milliQ をゲルの上に重層して重合するのを待った。S6K1 のリン酸化を見る時は 7.5% アクリルアミドゲルを作製した (Sol. A 1.5 ml + Sol. B 1.5 ml + milliQ 3 ml)。

濃縮ゲル : 分離ゲルが固まったことを確認し、重層しておいた milliQ を除いて、Solution A 0.45 ml、Solution C (0.5M Tris-HCl (pH6.8) / 0.4% SDS) 0.75 ml、milliQ 1.8 ml、10% APS 21 μ l、TEMED 8 μ l を混合した溶液を注入し、速やかにコームを差し込み重合させた。

コームを抜いて泳動装置を組み立て、泳動バッファー (154 mM glycine / 20 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethane / 0.1% SDS)を入れた。サンプルをアプライし、

濃縮ゲル中は 20 mA / 枚、分離ゲル中は 30 mA / 枚で泳動した。

2 - 2 - 7 銀染色

銀染色は、銀染色 キットワコー（和光純薬）を用い、方法は添付のマニュアルに従った。

2 - 2 - 8 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 後、Mini trans-blot module kit (BIO-RAD) を用いて、タンパク質をポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜 (immobilon transfer membrane、Millipore) にトランスファーした。この時使用した PVDF 膜は、あらかじめ 1 分間メタノールに浸した後、トランスファーバッファーに 5 分間以上浸した。トランスファーバッファー (154 mM glycine / 20% Methanol / 20 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethane) はあらかじめ作製しておき 4℃ で冷却したものを使用した。トランスファーは 100V、60 分間、4℃ で行った。

トランスファー終了後、抗体の非特異的な吸着を抑えるため、PVDF 膜をブロッキングバッファー (5% skim milk / TBS / 0.02% NaN₃、TBS は 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 150 mM NaCl) 中で室温で 60 分間振とうした。ブロッキングバッファーを捨てた後、一次抗体と HRP 結合二次抗体に順に浸けた。一次抗体後の洗浄は、TBS-T (TBS / 0.1% Tween-20) で 5 分間 3 回、二次抗体後の洗浄は、TBS-T で 5 分間 5 回行った。Can Get Signal (TOYOBO) を用いた場合は、一次抗体後の洗浄は TBS-T で 10 分間 3 回、二次抗体後の洗浄は TBS-T で 10 分間 3 回行った。目的タンパク質の検出は、Chemi-Lumi One L (ナカライテスク) により行った。使用法は製品添付マニュアルに従った。

2 - 2 - 9 結合タンパク質の同定、質量分析

結合タンパク質を同定するため、ロイシン固定化量 20 nmol / mg のロイシン固定化粒子を用いて、1.5 ml tube 20 本の精製を行った。最後の洗浄で 1 本にまとめ、SDS sample buffer 40 μ l を加え、濃縮して溶出した。一部を銀染色に、残りの全てを CBB 染色して切り出した。ゲルに含まれるアクリルアミド単量体が後の解析に影響を与えるため、ゲルはプレキャストゲル Perfect NT gel (DRC) を使用した。CBB 染色後 (ナカライテスク) ゲルからバンドを切り出した。切り出したバンドは、50 mM NH_4HCO_3 / 50% MeOH の溶液により脱色を行った後、真空乾燥させて - 80 で保存した。

その後、還元アルキル化 (DTT によりジスルフィド結合を SH 基にしてヨードアセトアミドによりマスク) トリプシンによるペプチド分解 (25 mM NH_4HCO_3 中で 37 、24 時間) ペプチド抽出 (5% ギ酸 / 50% アセトニトリル中で行い、最後に濃縮) の処理を順に行った。LC-ESI-Q-TOF MS を用い、得られたデータは MASCOT で解析した。

2 - 3 結果

2 - 3 - 1 H4IIE 細胞株におけるロイシンの S6K1 リン酸化

ラットの肝臓由来細胞株 H4IIE において、ロイシンは mTOR の活性化を引き起こすことを確認した。mTOR 活性化の指標として、S6K1 Thr389 のリン酸化を観察した (1 - 2 - 3)。H4IIE 細胞株は、ロイシンによる mTOR 活性化が見られると報告されている (Shigemitsu *et al.* 1999)。細胞を、血清を除いた培地中に 24 時間置き、その後血清とアミノ酸を除いた培地に 6 時間置いた後 (S6K1 のリン酸化を十分低下させた)、標準アミノ酸 20 種をそれぞれ最終濃度 1 mM で加えた。その結果、ロイシンは、標準アミノ酸 20 種の中で、最も強く S6K1 Thr389 のリン酸化を引き起こした (図 2-1B)。ロイシンほどのリン酸化を引き起こさなかったが、メチオニンも S6K1 リン酸化を引き起こした。イソロイシン・バリンやその他のアミノ酸による S6K1 リン酸化は、ロイシンと比較するとわずかであった。また、タンパク質に主に含まれる L 体の光学異性体・D 体ロイシンは、S6K1 リン酸化を引き起こさなかったことから、ロイシンによって引き起こされる S6K1 リン酸化は L 体に特異的に見られる現象であることが示された。過去の報告でもロイシンは S6K1 活性化を引き起こすことが示されているが各アミノ酸の濃度が異なっていた (Shigemitsu *et al.* 1999)。本実験は 20 種のアミノ酸の影響を同じ濃度で評価し、ロイシンが単独で最も S6K1 リン酸化を引き起こすことを示した。アフィニティ精製に用いる細胞抽出液は、H4IIE 細胞株から調製した。

2 - 3 - 2 H4IIE 細胞株におけるロイシン誘導体の S6K1 のリン酸化

アフィニティ精製に用いる粒子を作製する上で、ロイシンのアミノ基及びカルボキシル基が S6K1 リン酸化活性に重要であるか否かを、ロイシンの誘導体を用いて検証した。2 - 3 - 1 のロイシンの代わりに、アミノ基がアセチル化された誘導体

(Ac-Leu-OH) と、カルボキシル基がアミド化された誘導体 (H-Leu-NH₂) を用いて、実験を行った。この結果、アミノ基が修飾された誘導体 Ac-Leu-OH では S6K1 リン酸化はほとんど引き起こさなかった一方で、カルボキシル基が修飾された誘導体 H-Leu-NH₂ はロイシンと同程度以上に S6K1 リン酸化を引き起こした (図 2-2)。本実験により、ロイシンによる S6K1 リン酸化すなわち mTOR 活性化において、カルボキシル基は必須ではないことが示唆された。この結果は、ロイシン誘導体による S6K1 活性を見た過去の報告と一致している (Shigemitsu *et al.* 1999)。

2 - 3 - 3 ロイシン固定化粒子の作製

ロイシンをカルボキシル基を介して、当研究室で開発されたアフィニティ精製用粒子に固定化した。固定化方法は Fmoc 法を用い、以下の 3 つのステップで行った。

Fmoc-ロイシンのアミノ基粒子への固定化反応、 未反応の粒子アミノ基のマスキング反応、 Fmoc 基の脱離反応、という流れで行った (図 2-3)。 マスキング反応は、タンパク質の非特異的な吸着を防止するために行った。

Fmoc 基の脱離反応によって産生される Fmoc-ピペリジンの量は、反応溶液の上清の吸光度測定により算出できる。これは、ロイシン固定化量と一致する。反応開始時の Fmoc-ロイシンの量に応じて、ロイシン固定化量約 0、20、50 nmol/mg の粒子が作製できた (図 2-4)。以下のアフィニティ精製においては、約 20 nmol/mg の粒子を用いた。

2 - 3 - 4 アフィニティ精製によるロイシン結合タンパク質の探索

ロイシン固定化粒子 (2 - 3 - 3 参照) と H4IIE 細胞株から調製した細胞質画分 (2 - 3 - 1 参照) を用いて、アフィニティ精製を行った。アフィニティ精製のスキームは図 2-5 に示す。粒子 (ロイシン固定化量約 20 nmol/mg) と細胞抽出液 (タンパク質濃度 1 mg/ml (全タンパク質量 0.2 mg)) を混合して、4 で 4 時間結合反応

を行った。結合時や洗浄時の KCl 濃度は 150 mM で生体内に近い条件で行った。粒子に結合したタンパク質を銀染色によって検出した結果、14 本のバンドが得られた (図 2-6A)。

この 14 本のバンドの中で、ロイシンに特異的に結合しているタンパク質を選別するため、細胞抽出液中に遊離のロイシンを加える実験を行った (スキームは図 2-5B)。この競合阻害条件下でのアフィニティ精製では、ロイシン特異的結合タンパク質は、遊離のロイシンに結合し、粒子への結合量が減少する。その結果、特に 180 kDa 付近のバンドが、遊離のロイシンを加えることで競合的に減少していることが観察された (図 2-6B、銀染色)。このバンドは、質量分析による分析の結果、UBR2 というユビキチンリガーゼであった。UBR2 及び、UBR2 と相同性が高い UBR1 の抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った結果、UBR1 と UBR2 の両方で、遊離ロイシン濃度の増加にともなって粒子への結合量が減少するのが観察された (図 2-6C、ウェスタンブロッティング)。一方、Nucleolin の粒子への結合量は、銀染色及びウェスタンブロッティングで、競合阻害条件下で変化は見られなかった。銀染色では UBR2 のみが減少が見られた理由としては、バンドに他のタンパク質が混在していたことが考えられる (質量分析では、UBR1 のバンドには中間径フィラメント・ネスチンに類似した因子、UBR2 のバンド中には機能未知因子 XP_237926 が検出されている)。以上より、UBR1 及び UBR2 が、ロイシン特異的に結合するタンパク質として得られた。

2 - 4 考察

2 - 4 - 1 各アミノ酸の mTOR シグナル経路への関与

H4IIE 肝臓由来細胞株において、S6K1 Thr389 リン酸化 (mTOR シグナル経路活性化の指標) を観察すると、標準アミノ酸 20 種の中でロイシンは顕著な作用を示した。ロイシン以外のアミノ酸では、メチオニンや、さらに程度は低くなるがイソロイシン・バリン・アラニン・アスパラギン・グルタミンが S6K1 のリン酸化を引き起こした (図 2-1)。以上より、ロイシン以外のアミノ酸も、別の機構を通して mTOR を活性化することが考えられる。

ロイシン以外のアミノ酸として、グルタミンはロイシンの細胞への取り込みを増加させることが報告されている (Nicklin *et al.* 2009)。これは、グルタミントランスポーター SLC1A5 が、ロイシンを取り込む中性アミノ酸トランスポーターである LAT1/4F2hc (別名 SLC7A5/SLC3A2) (1 - 2 - 1 参照) と共役しているため、細胞外のグルタミンはロイシンの細胞への取り込みを促進させ、mTOR 活性化を促進すると考えられる。

また、システイン、プロリン、トリプトファンなどは、アミノ酸を加えないものよりリン酸化の程度が低下した。mTOR シグナル経路を不活性化するアミノ酸が存在すると考えられる。細胞種は異なるがマウス乳腺上皮細胞株で、リジン、ヒスチジン、トレオニンは S6K1 リン酸化を抑制することが報告されている (Prizant & Barash 2008)。本研究での H4IIE 細胞株においても、リジン、ヒスチジン、トレオニンは、S6K1 リン酸化を引き起こさなかった。mTOR シグナル経路を抑制するアミノ酸は、今後決定する必要がある。そして、通常の培養条件においては、複数のアミノ酸の混合物であるため、各アミノ酸の効果が足し合わされていると考えられる。

2 - 4 - 2 UBR1、UBR2 以外でロイシン固定化粒子に結合した因子

競合阻害条件下でアフィニティ精製を行うことにより、UBR1 及び UBR2 をロイシンに特異的に結合する因子として選別した。2 つの因子以外にも、図 2-6A に示すように、様々な因子が粒子に結合した。その 1 つである Nucleolin は、競合阻害条件下のアフィニティ精製で、粒子への結合量は変化が見られなかった(図 2-6C)。また、イソロイシン固定化粒子や表面にアミノ基が存在する SGNEGDE/FGNEGDE N 粒子のアフィニティ精製にも、銀染色による検出ではあるが、Nucleolin と考えられるタンパク質が結合していた。よって、Nucleolin はアミノ基に静電的に結合する因子であると考えられる。

本章でのアフィニティ精製において、現在までにロイシンと結合することが知られているロイシルアミノアシル tRNA 合成酵素(tRNA にロイシンを付加する酵素)(約 130 kDa) と中性アミノ酸トランスポーター (LAT1 など、1 - 2 - 1)(約 55 kDa) は同定できなかった。ロイシルアミノアシル tRNA 合成酵素はロイシンのアミノ基側を認識すると考えられており、固定化位置が大きな原因とは考えられない。同定できなかった原因として考えられるのは、結合が弱いことと、結合量が少なく検出できなかったことの 2 点である。中性アミノ酸トランスポーターを同定できなかった原因は上記 2 点に加えて、細胞質画分を用いており細胞膜にあるタンパク質は可溶化していないことが挙げられる。界面活性剤により可溶化した抽出液を用いることで精製できると考えられる。

2 - 4 - 3 アフィニティ精製の条件検討

アフィニティ精製を行うにあたって、粒子のロイシン固定化量、結合時と洗浄時の KCl 濃度、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有無、の条件検討を行った。は、ロイシンのアミノ基が表面に出ており、多数のタンパク質が静電的に結合することが予想されたためである。は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 要求性のタンパク質の結合に影響を与える可能性がある

ためである。

粒子のロイシンの固定化量

ロイシンの固定化量が多いと、バンドが判別できないほど多くのタンパク質が粒子に結合し、表面にアミノ基を持つ SGNEGDEN/FGNEGDEN 粒子と同じようなバンドパターンが見られた (図 2-7A)。そこで、ロイシン固定化量が約 20 nmol/mg の粒子を用いた。

結合時と洗浄時の KCl 濃度

KCl 濃度を増加させるほど結合タンパク質の量が減少し、特に 100 mM から 150 mM に上げた時に急減した (図 2-7B)。また、洗浄時のみで KCl 濃度を増加させるよりも、結合時と洗浄時の両方の KCl 濃度を上げることで、効率よく非特異的吸着を防ぐことができた。そこで、バンドが判別できる KCl 濃度 150 mM で、アフィニティ精製を行った。

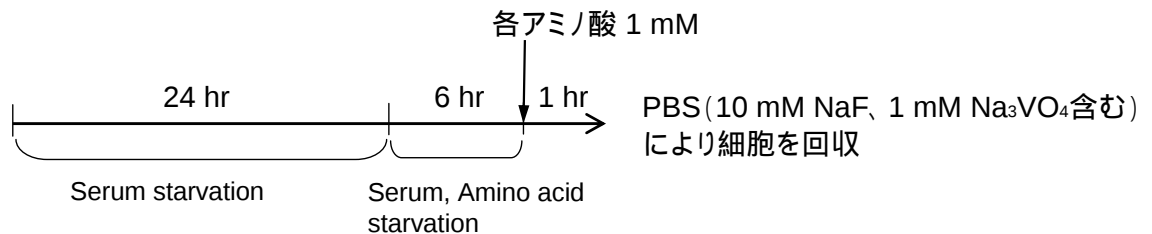
Ca²⁺、Mg²⁺有無

Ca²⁺ (0.2 mM)、Mg²⁺ (1 mM) の有無によって、結合タンパク質の種類は変化がなかったが、量は全体的に Ca²⁺、Mg²⁺無の条件で増加した (図 2-8)。よりタンパク質の結合量の多い、Ca²⁺、Mg²⁺無の条件でアフィニティ精製を行った。

表 2-1 DMEM の組成 (Invitrogen #12100)

	Component	mg/L	mM
Inorganic Salts	CaCl ₂	200.0	
	Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0.10	
	KCl	400.00	
	MgSO ₄	97.67	
	NaCl	6400.00	
	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	125.00	
Other Components	D-Glucose	4500.00	
	Phenol Red	15.00	
Amino Acids	L-Arginine• HCl	84.00	0.40
	L-Cystine• HCl	63.00	0.23
	L-Glutamine	584.00	4.00
	Glycine	30.00	0.40
	L-Histidine HCl• H ₂ O	42.00	0.20
	L-Isoleucine	105.00	0.80
	L-Leucine	105.00	0.80
	L-Lysine• HCl	146.00	0.80
	L-Methionine	30.00	0.20
	L-Phenylalanine	66.00	0.40
	L-Serine	42.00	0.40
	L-Threonine	95.00	0.80
	L-Tryptophan	16.00	0.08
	L-Tyrosine• 2Na• 2H ₂ O	104.00	0.42
	L-Valine	94.00	0.80
Vitamines	D-Ca pantothenate	4.00	
	Choline Chloride	4.00	
	Folic Acid	4.00	
	i-Inositol	7.20	
	Niacinamide	4.00	
	Riboflavin	0.40	
	Thiamine HCl	4.00	
	Pyridoxine	4.00	

(A)



(B)

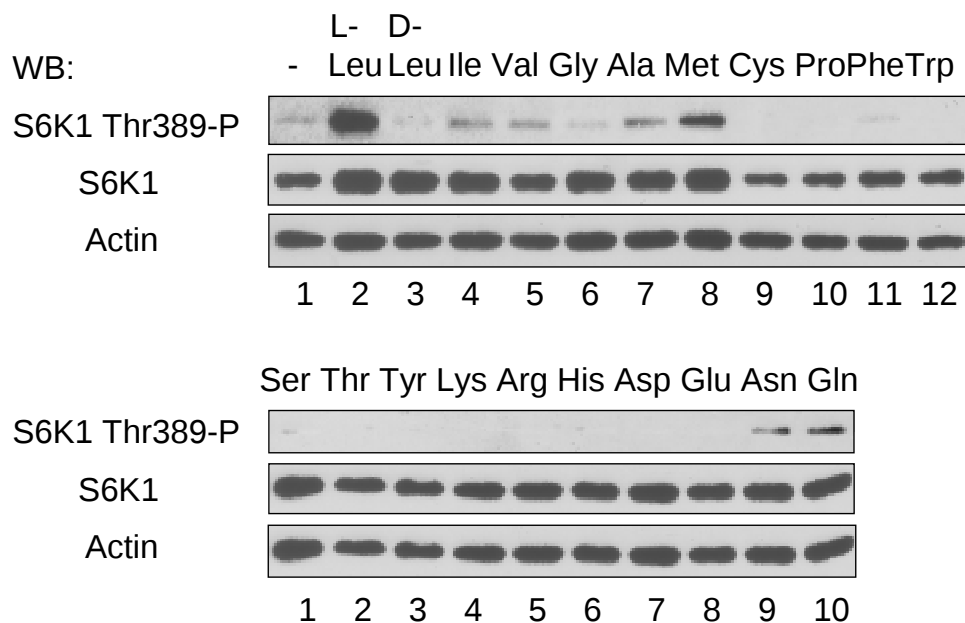


図 2-1 20 種のアミノ酸による S6K1 リン酸化

(A) ラット肝臓由来細胞株 H4IIE を、血清・アミノ酸枯渇状態にした後、各アミノ酸を最終濃度 1 mM で加えて 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートし、細胞を回収した。

(B) 各サンプルを SDS-PAGE 後、各抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。20 種の標準アミノ酸の中でロイシンは最も強く S6K1 Thr389 リン酸化を引き起こした。また、D 体ロイシンは S6K1 Thr389 リン酸化を引き起こさなかった。

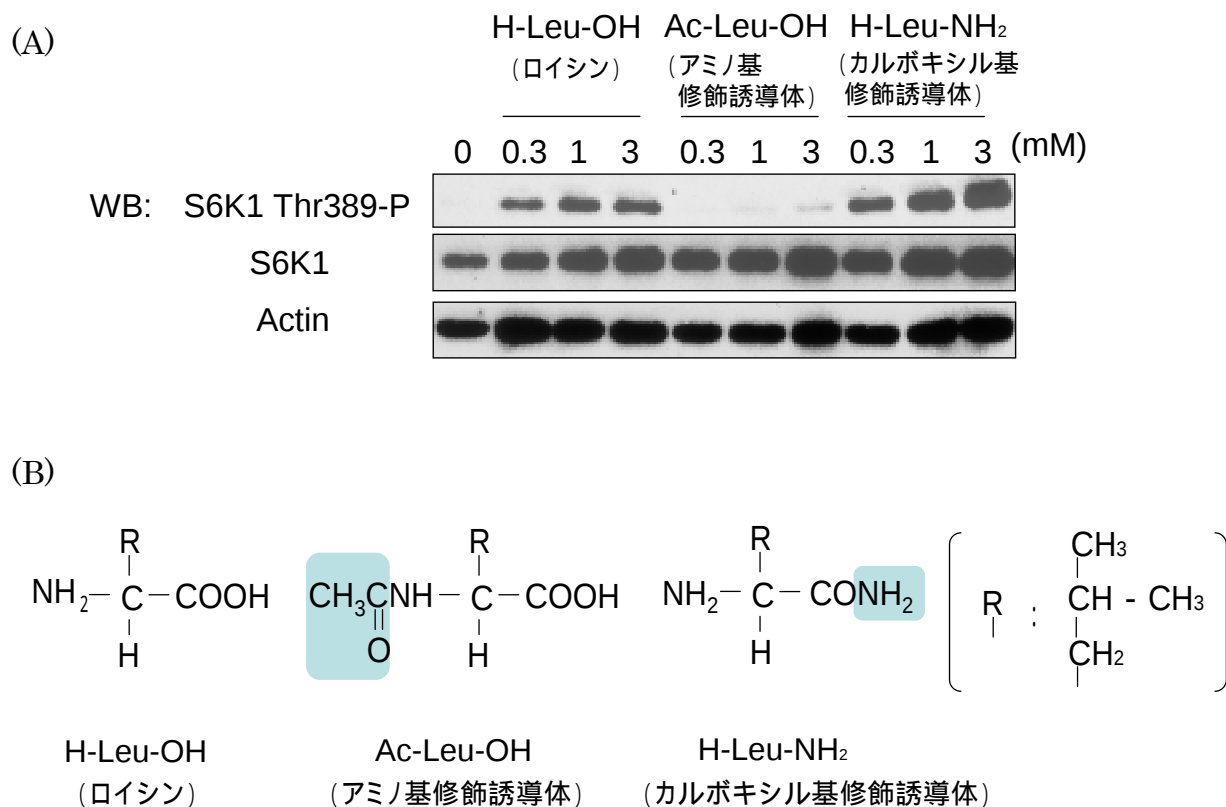


図 2-2 H4IIE 細胞株におけるロイシン誘導体の S6K1 リン酸化

(A) ロイシン及びロイシン誘導体による S6K1 リン酸化。ロイシンのアミノ基がアセチル化された誘導体 (Ac-Leu-OH) では、ロイシンに比べて S6K1 リン酸化がほとんど見られなかった。一方、ロイシンのカルボキシル基がアミド化された誘導体 (H-Leu-NH₂) では S6K1 リン酸化が見られた。

(B) (A)で用いたロイシン及びロイシン誘導体の構造式。

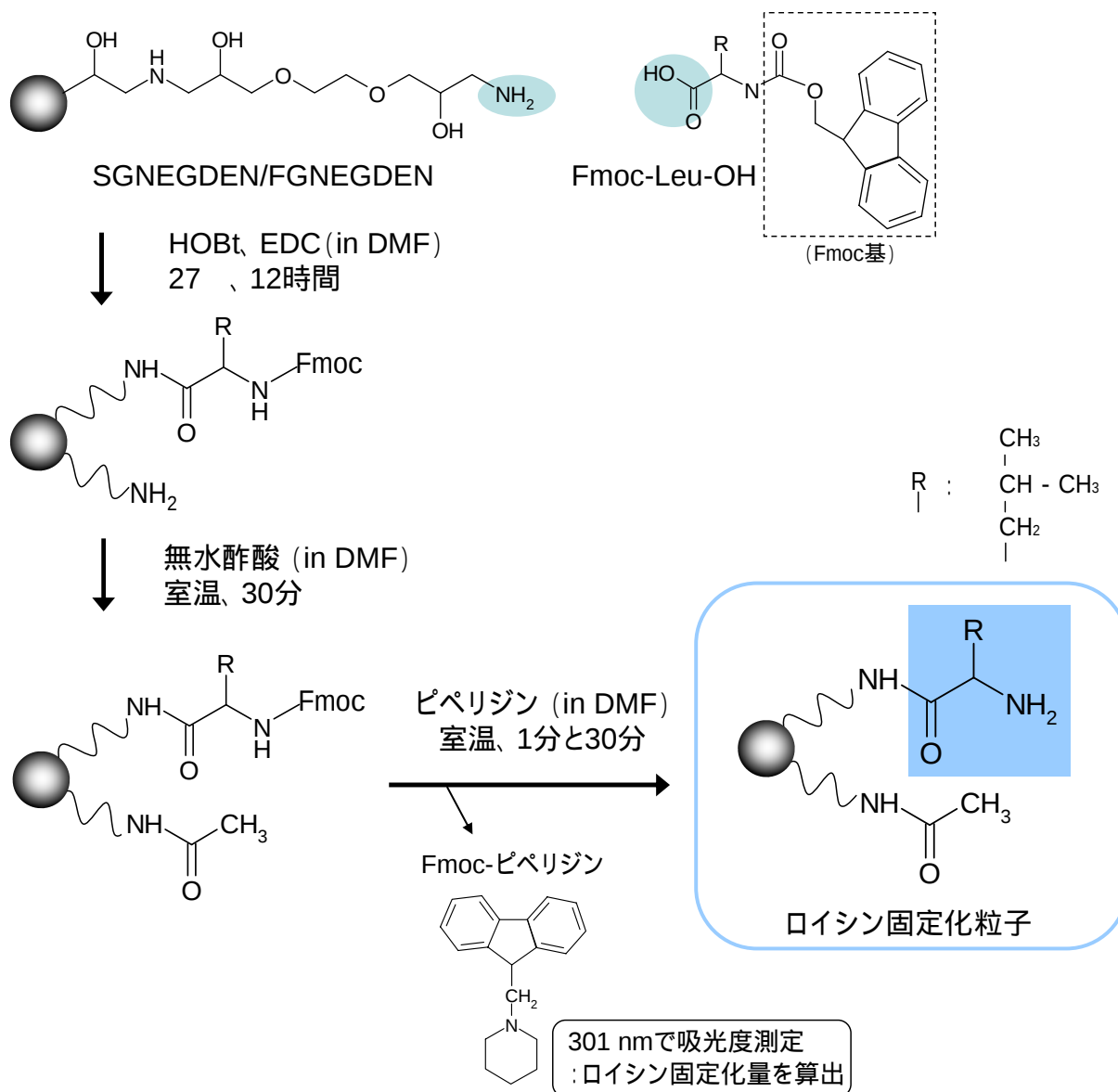


図 2-3 ロイシン固定化粒子の作製方法

カルボキシル基を介して、ロイシンを粒子に固定化した。Fmoc-ロイシンの固定化反応、未反応の粒子表面アミノ基のマスキング反応、Fmoc基の脱離反応、という流れでロイシンを固定化した。脱保護反応において生じるFmoc-ピペリジンの量から、ロイシンの固定化量を算出した。以降、粒子表面のアミノ基のみを示した。

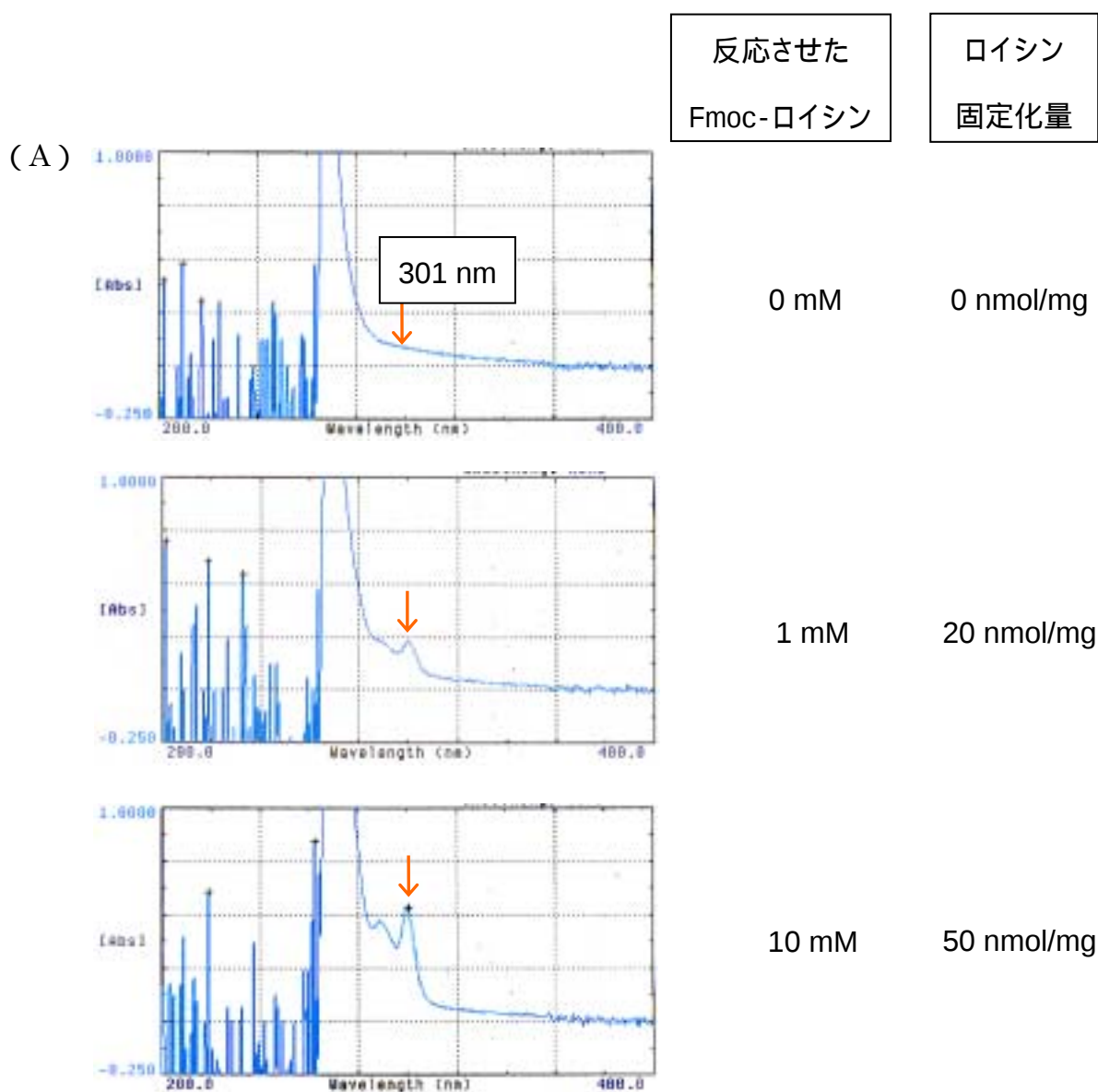


図 2-4 ロイシン固定化量の算出方法

脱保護反応において Fmoc-ピペリジンの量から、ロイシンの固定化量を算出した。301 nm における吸光度測定を行い、301 nm におけるモル吸光定数 7800 [L/mol・cm] から、ロイシンの固定化量は約 0、20、50 nmol/mg と算出された。Fmoc-ピペリジンは上に示すように 3 つのピークを示し、301 nm 付近に短波長側から 3 つ目のピークが見られる。

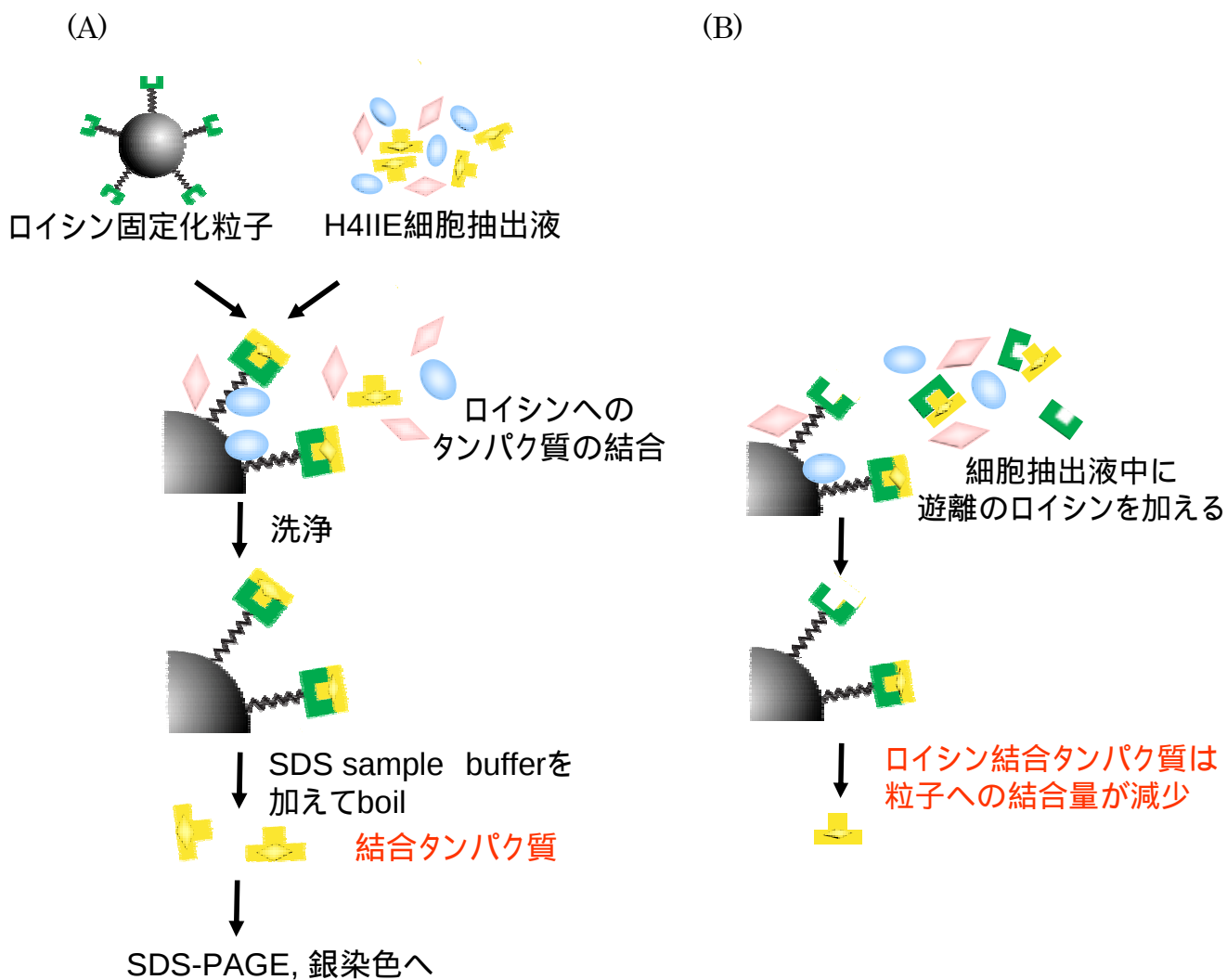


図 2-5 アフィニティ精製のスキーム

(A) 通常のアフィニティ精製。ロイシン固定化粒子と肝臓由来細胞株 H4IIE の抽出液を混合し、ロイシン結合タンパク質を精製した。SDS sample buffer を加えて 98 で煮沸することにより、結合タンパク質を全て溶出した。

(B) 競合阻害条件下でのアフィニティ精製。細胞抽出液中に遊離のロイシンを加えると、ロイシン特異的結合タンパク質は遊離のロイシンと結合するため、粒子への結合量が減少する。

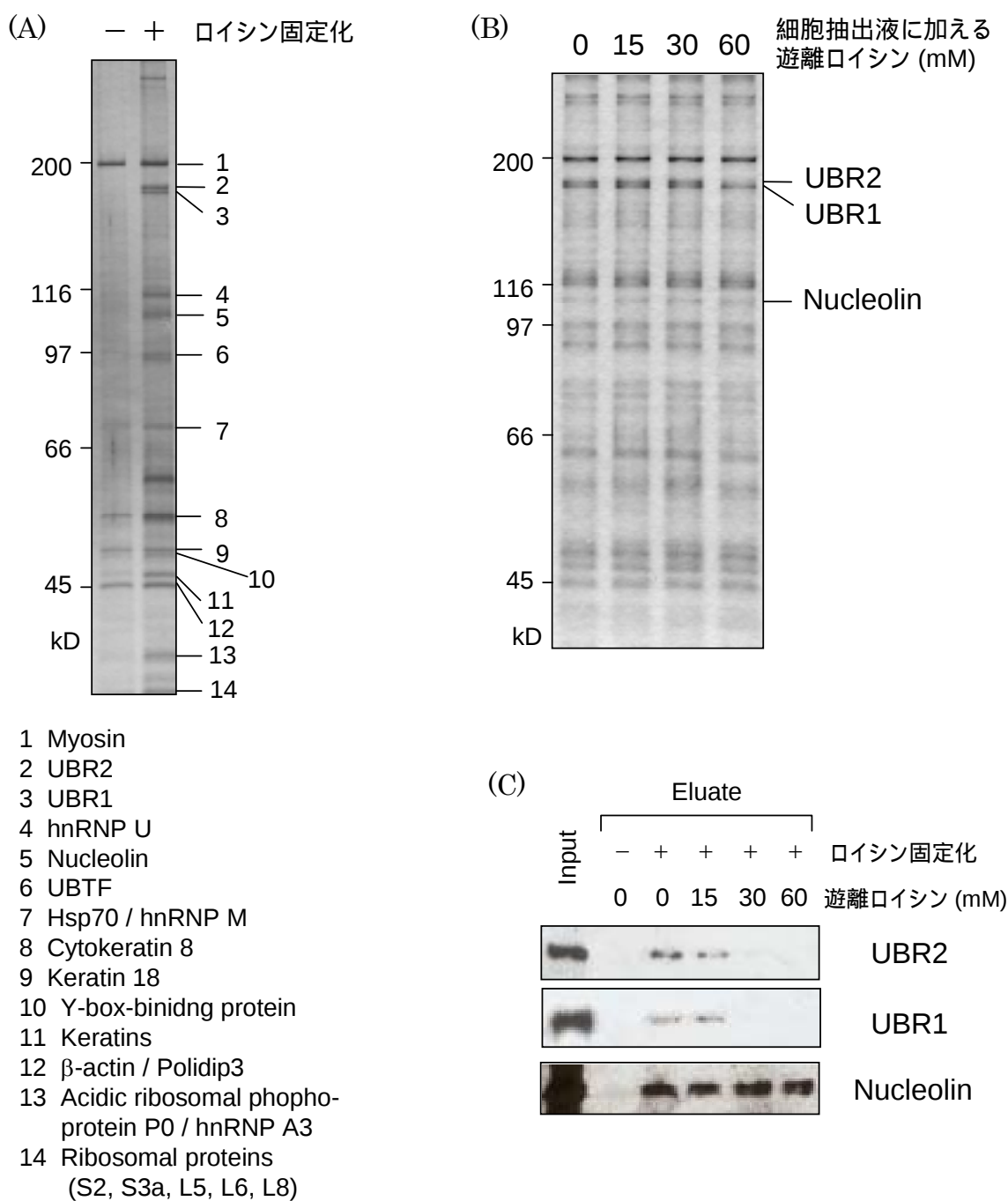


図 2-6 アフィニティ精製

(A) ロイシンを固定化していない粒子 (-) 及び固定化した粒子 (+) と、H4IIE 細胞質画分を用いてアフィニティ精製を行った。粒子に結合したタンパク質を銀染色により検出した。そして、一連のバンドを質量分析により同定した。

(B) 競合阻害条件下において、粒子に結合したタンパク質を銀染色により検出した。

(C) (B)のサンプルでウェスタンブロッティングを行った (Input は 10%流した)。

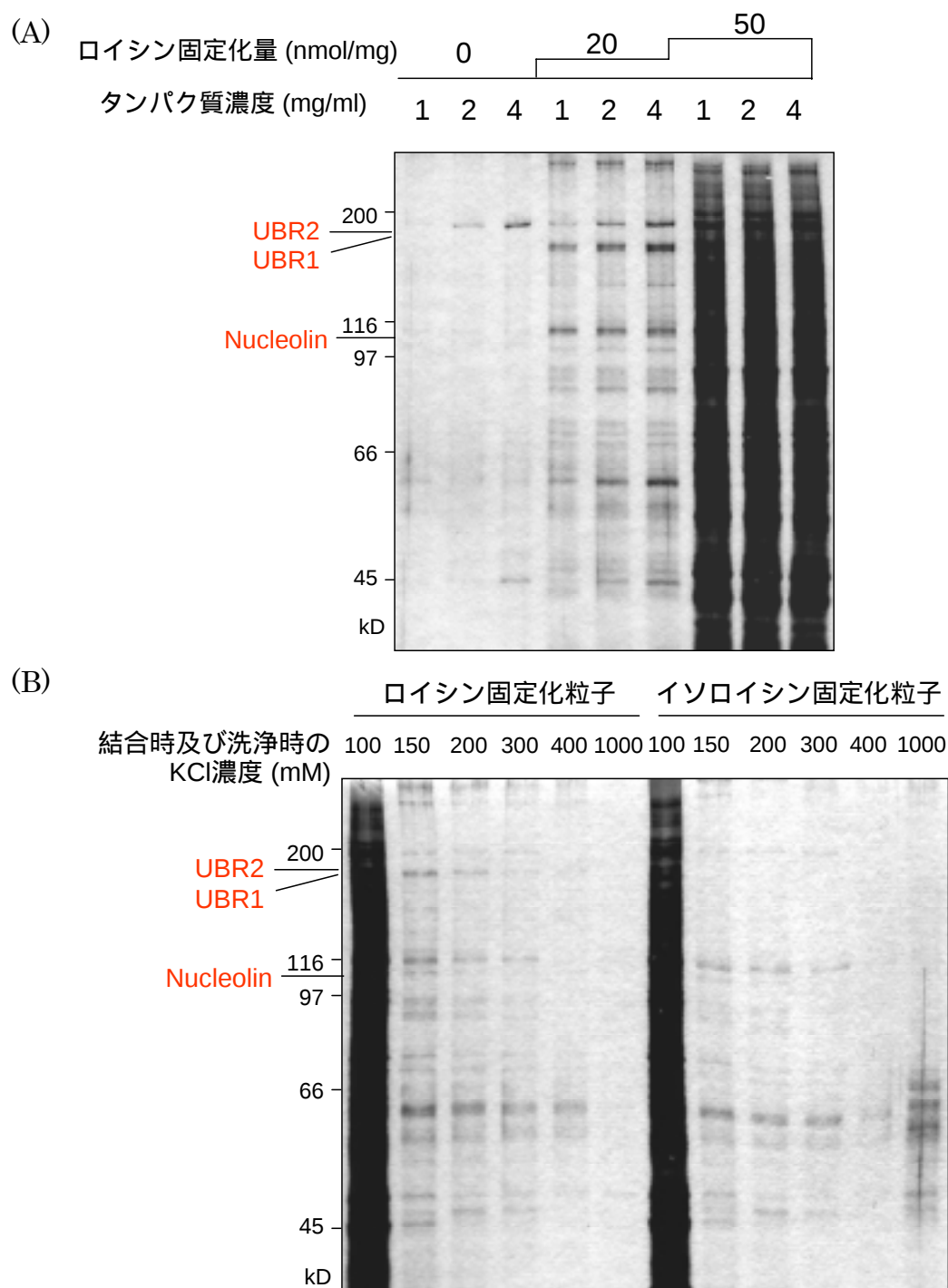


図 2-7 アフィニティ精製の条件検討 (1)

(A) 固定化量と細胞抽出液タンパク質濃度。

(B) ロイシン固定化粒子とイソロイシン固定化粒子を用いた。結合時及び洗浄時の KCl 濃度を変化させた。

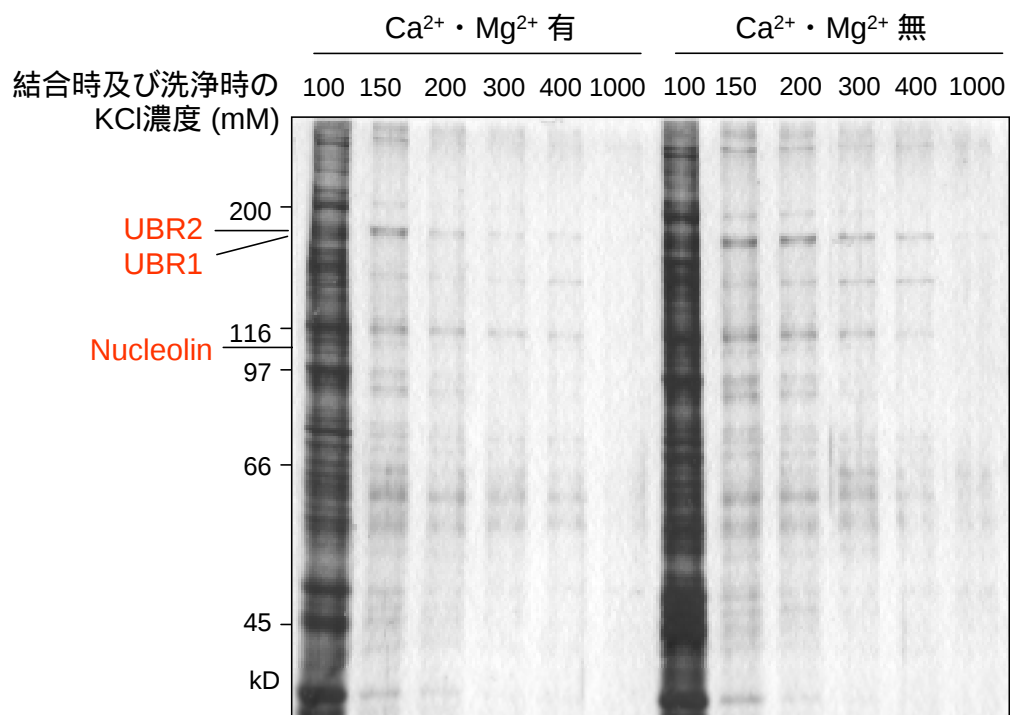


図 2-8 アフィニティ精製の条件検討 (2)

Ca^{2+} (0.2 mM)・ Mg^{2+} (1 mM) の有と無の条件検討。結合タンパク質の種類は変化しなかったが、量は全体的に Ca^{2+} ・ Mg^{2+} 無の条件で増加した。

第3章 UBR1、UBR2 の mTOR シグナル経路への影響 (培養細胞株を用いた解析)

3 - 1 緒言

本章では、第2章でロイシンに結合するタンパク質として得られたユビキチンリガーゼ UBR1 及び UBR2 が、ロイシン-mTOR シグナル経路に関与しているかを培養細胞株を用いて検証した。UBR1、UBR2 がロイシン-mTOR シグナル経路に関与しているのであれば、UBR1 や UBR2 を培養細胞株で過剰発現させたり発現抑制（以下ノックダウンと呼ぶ）させた時、ロイシンによる S6K1 リン酸化に影響が見られるはずである。

本章では、第2章で用いたラット肝臓由来細胞株 H4IIE の代わりにヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293T を用いた。その理由は、HEK293T 細胞株が H4IIE 細胞株同様にロイシンによって S6K1 リン酸化が見られ、かつ遺伝子導入効率が高いためである。

mTOR 活性化の指標として下流因子 S6K1 Thr389 のリン酸化を観察し、UBR1 及び UBR2 の過剰発現ではリン酸化が減少し、ノックダウンではロイシンを加えない状態でリン酸化が増加した。これらの結果から、UBR1 及び UBR2 は、mTOR 活性を抑制する因子であることが示唆された。

3 - 2 材料及び方法

3 - 2 - 1 試薬・抗体

試薬

- ・ラパマイシン (Calbiochem #553210)

最終濃度 1 mM になるように DMSO に溶かし、 - 20 で保存。

- ・ NaF (ナカライテスク)

最終濃度 500 mM の濃度になるように milliQ で溶かし、 - 20 保存。

- ・ Na₃VO₄ (Sigma)

最終濃度 200 mM の濃度になるように milliQ で溶かし、 - 20 保存。

- ・ DTT (dithiothreitol)(ナカライテスク)

最終濃度 1 M の濃度になるように milliQ にで溶かし、 - 20 保存。

- ・ DMEM、DMEM (血清なし)、DMEM (血清なし・アミノ酸なし) の培地は、2 - 2 - 1 を参照。

- ・ ラクタシスチン (ペプチド研) 最終濃度 1 mM になるように milliQ に溶かし、 - 20 保存した。

抗体

以下の抗体を使用した。

- ・ anti-S6K1 (sc-8418、以下希釈倍率 1/1000) anti-UBR1 (sc-100626、1/200) anti-TSC2 (sc-893、1/1000)(以上 Santa Cruz) anti-phospho-S6K1 (Thr389) (9205、1/300) anti-mTOR(2972、1/1000) anti-Raptor(4978・2280、1/500) anti-GβL(3227、1/1000) anti-PRAS40(2610、1/1000)(以上 Cell Signaling) anti-Rheb(GenWay 18-661-15237、1/1000) anti-TSC1(Zymed 37-0400、1/500) anti-nucleolin (Novus NB600-241、1/1000) anti-Actin (Chemicon MAB1501、

1/5000) anti-FLAG M2 (Sigma、 1/1000)

ただし、anti-TSC1、anti-TSC2、anti-Actin、anti-FLAG は、5% skim milk / TBS / 0.02% NaN₃ 溶液で希釈。その他の抗体は、Can Get Signal (TOYOBO) で希釈。

・ anti-UBR2 ポリクローナル抗体

ヒト UBR2 C 末端 163 アミノ酸のゲル切り出し抗原をラットに投与することによって作製した (Operon に作製を依頼)。抗原の作製方法は、GST 融合ヒト UBR2 部分欠損変異体を、チオレドキシン発現の大腸菌にて発現し、GST 精製そして PreScission Protease (GE Healthcare) によって GST タグを切断した。上清を SDS-PAGE 後、CBB 染色し、目的のバンドを切り出して抗原とした。ヒト UBR1、UBR2 の組換えタンパク質を用いて、作製したポリクローナル抗体は、UBR1 を認識せず、UBR2 を特異的に認識することを確認した。

3 - 2 - 2 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293T は、DMEM (Invitrogen) 10% 牛胎仔血清 (Invitrogen)、200 µg/ml ストレプトマイシン (明治製菓) 200 単位/ml ペニシリン G カリウム (明治製菓) で、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。また、実験時以外は T 抗原の発現維持のため、G418 硫酸塩 (ナカライテスク) 500 µg/ml を加えて培養を行った。

3 - 2 - 3 プラスミドベクターの構築

pCMV-FLAG-UBR1、pCMV-FLAG-UBR2

(N 末 FLAG タグ融合 UBR1 プラスミド、N 末 FLAG タグ融合 UBR2 プラスミド)

ラット UBR1 及びラット UBR2 をコードする遺伝子は、H4IIE 細胞株の cDNA library より PCR 法を用いて作製した。UBR1、UBR2 はそれぞれ下記の rUBR1/F/SmaI と rUBR1/R/XhoI、rUBR2/F/EcoRV と rUBR2/R/XhoI のプライマーを用いて PCR した。

rUBR1/F/SmaI 5'-gggatggcggacgaagagatggacg-3'

rUBR1/R/XhoI 5'-ttttctcgagtcagagtaactgccagttgaatcc-3'

rUBR2/F/EcoRV 5'-atcatggcgctcggagatggagccc-3'

rUBR2/R/XhoI 5'-ttttctcgagttacaaatgctgccagtcgatgcc-3'

PCR によって得られた UBR1 遺伝子は、5'末端は T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TOYOBO) 処理を行い、3'末端は Xho I で切断した。次に、FLAG タグ融合タンパク質発現ベクター-pCMV tag2B を EcoR V、Xho I で切断した。pCMV tag2B に UBR1 断片を組み込んだプラスミドを pCMV-FLAG-UBR1 とした。(参考：ヒト UBR1 のクローニングは、大腸菌に毒性があると考えられ、成功しなかった。)

PCR によって得られた UBR2 遺伝子は、5'末端は T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TOYOBO) 処理を行い、3'末端は Xho I で切断した。次に、FLAG タグ融合タンパク質発現ベクター-pCMV tag2B を EcoR V、Xho I で切断した。pCMV tag2B に UBR2 断片を組み込んだプラスミドを pCMV-FLAG-UBR2 とした。

pLenti-shUBR1 (#1、#2)、pLenti-shUBR2 (#1、#2、#3)(UBR1 または UBR2 の short hairpin RNA を発現するプラスミド)

ノックダウンの標的配列は BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen) を用いてデザインした。

UBR1 #1	5'-gcuuucagcaaagugauuaac-3' (human UBR1、 2620-2640)
UBR1 #2	5'-gcagcauaauggucugaaagc-3' (human UBR1、 4050-4070)
UBR2 #1	5'-gcucauagugaauugguaaag-3' (human UBR2、 2374-2394)
UBR2 #2	5'-gcguuugcagagugauuaugu-3' (human UBR2、 1191-1211)
UBR2 #3	5'-gctgcuuccuccaagaaauau-3' (human UBR2、 3669-3689)

上記標的配列(相補配列)と標的配列(逆向き配列)の間にループ配列(ttcaagaga)を加え、shRNA 配列とした。shRNA 配列末端に BseRI、Bgl II を加えたセンス鎖とアンチセンス鎖をアニールし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ処理を行った。次に、マウス U6 プロモーター (-315 ~ +5)を組み込んだ pBS-U6 ベクターを BseR I、Bgl II で切断し、shRNA 配列を挿入した。作製した pBS-U6-shUBR1、pBS-U6-shUBR2 を Xba I、Cla I で切断した。次に、pLenti6/V5-GW/LacZ を Xba I、Cla I で切断した。pLenti6/V5-GW/LacZ に U6-shUBR1 断片または U6-shUBR2 断片を組み込んだプラスミドをそれぞれ pLenti-shUBR1、pLenti-shUBR2 とした。

3 - 2 - 4 shRNA 発現レンチウイルスの作製

293FT 細胞株に、ViraPower Lentiviral Packaging mix (Invitrogen) と、pLenti-shUBR1 あるいは pLenti-shUBR2 を同時導入し、組換えレンチウイルスを作製した。細胞導入後 24 時間後に培地交換を行い、72 時間後にレンチウイルスを含む培養上清を回収した。上清は、3,000 rpm、4℃、15 分間で遠心した後 (TOMY、AX-310) 0.45 μm のフィルターを通すことにより、細胞断片を取り除いた。次に、12.5 krpm、6 時間、4℃で、超遠心を行った (Beckman、Sw41Ti)。上清をデカンとで除き、新たな DMEM 500 μl に懸濁することによって、レンチウイルスを濃縮した。HEK293T で MOI (multiplicity of infection) の算出が困難だったため、HeLa において MOI を算出した。MOI 10 (HeLa) で、HEK293T に shUBR1 あるいは shUBR2 発現レンチウイルスを感染した。感染 2 日後から、10 μg/ml プラストサイ

ジン (Invitrogen) による感染細胞の選択を行い、感染 7 日後の細胞を S6K1 リン酸化の実験 (3 - 2 - 6) に用いた。

3 - 2 - 5 培養細胞株への遺伝子導入

前夜に 10-cm collagen-coated dish に HEK293T を 5.0×10^6 cells でまき、37°C、5% CO₂ 条件下で約 12 時間インキュベートした。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、pCMV-FLAG-UBR1 または pCMV-FLAG-UBR2 を細胞導入した。細胞導入 4 時間後に培地交換を行った。細胞導入 24 時間後に、細胞を 5.0×10^5 cells/12-well collagen-coated plate でまき直し、S6K1 リン酸化の実験 (3 - 2 - 6) に用いた。また、細胞導入 24 時間後に、細胞を 7.5×10^6 cells/10-cm collagen-coated dish でまき直し、UBR1 や UBR2 の結合因子の探索 (3 - 2 - 7) に用いた。

3 - 2 - 6 ロイシンによる S6K1 リン酸化

ロイシンによる S6K1 リン酸化を見る実験は、以下のように行った。

HEK293T を 12-well collagen-coated plate に 5×10^5 cells/well でまき、37℃、5% CO₂ 条件下で約 9 時間インキュベート

- ↓ DMEM (血清なし) 1 ml に変えて、37℃、5% CO₂ 条件下でインキュベート 12 時間
- ↓ DMEM (血清なし・アミノ酸なし) で 1 回洗った後、同培地 900 μ l を加えて、2 時間
- ↓ DMEM (血清なし・アミノ酸なし) にロイシンを溶解したもの (目的の 10 倍濃度) を 100 μ l 加えて 30 分間
- ↓ PBS (10 mM NaF / 1 mM Na₃VO₄ を直前に加えたもの) で洗浄 2 回、同 PBS を加えてスクレーパーにより細胞回収
- ↓ 遠心 (1,500 rpm (200 $\times$ g) 5 分間、4℃)
- ↓ NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0) / 150 mM NaCl / 1% NP-40 / 10mM NaF / 1 mM Na₃VO₄ / 1 mM DTT) 50 μ l を加えて、ピペッティングで細胞をほぐした後、10 分間、on ice に置く。2、3 分置きにタッピングなどで転倒攪拌する。
- ↓ 遠心 (15,000 rpm (20,000 $\times$ g) 20 分間、4℃) 上清をサンプルとして回収
- ↓ 上清のうち 1 μ l をタンパク質濃度測定に用いる (Bradford 法、ナカライテスク) 上清の残りに 3 分の 1 量の 4 $\times$ SDS sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8) / 500 mM 2-mercaptoethanol / 8% SDS / 0.4% BPB / 40% (v/v) glycerol) を加え、98℃で分加熱。
- ↓ タンパク質の量をそろえて SDS-PAGE に流し、ウェスタンブロッティングを行った。

H4IIE を用いた 2 - 2 - 3 とは、血清枯渴時間、血清・アミノ酸枯渴時間、ロイ

シンを加える時間が異なる。

ラパマイシンを加える実験では、ロイシンを加える 1 時間前にラパマイシンを最終濃度 20 nM になるように加えた。

3 - 2 - 7 UBR1、UBR2 の結合因子の探索

UBR1、UBR2 の結合因子の探索実験は、以下のように行った。

HEK293T を 12-well collagen-coated plate に 7.5×10^6 cells/well でまき、37 °C、5% CO₂ 条件下で約 9 時間インキュベート

↓ DMEM (血清なし) 10 ml に変えて、37 °C、5% CO₂ 条件下でインキュベート 12 時間

↓ DMEM (血清なし・アミノ酸なし) で 1 回洗った後、同培地 9 ml を加えて、2 時間

また、プロテアソーム阻害剤ラクタシスチン 1 mM 90 µl を加えた

↓ PBS (10 mM NaF / 1 mM Na₃VO₄ を直前に加えたもの) で洗淨 2 回、同 PBS を加えてスクレーパーにより細胞回収

↓ 遠心 (1,500 rpm (200 × g) 5 分間、4 °C)

↓ NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0) / 150 mM NaCl / 1% NP-40 / 10mM NaF / 1 mM Na₃VO₄ / 1 mM DTT) 320 µl を加えて、ピペティングで細胞をほぐした後、10 分間、on ice に置く。2、3 分置きにタッピングなどで転倒攪拌する。

↓ 遠心 (15,000 rpm (20,000 × g) 20 分間、4 °C) 上清をサンプルとして回収

↓ 上清に Anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) 20 µl を加え、4 °C、1 時間転倒攪拌を行った。そして、0.1% NP-40 Wash Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8) 100 mM NaCl、0.1% NP-40) 500 µl で 3 回洗淨後、0.1 mg/ml FLAG を含む 0.1% NP-40 Wash Buffer 50 µl により精製タンパク質を溶出した。3 分の 1 量の 4 ×

SDS sample buffer (200 mM Tris-HCl (pH 6.8) / 500 mM 2-mercaptoethanol / 8% SDS / 0.4% BPB / 40% (v/v) glycerol) を加え、98 ℃ で分加熱。

SDS-PAGE 後、銀染色と各抗体によるウェスタンブロッティングを行った

3 - 2 - 8 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 銀染色、ウェスタンブロッティング

2 - 2 - 6、2 - 2 - 7、2 - 2 - 8を参照。

3 - 3 結果

3 - 3 - 1 UBR1 と UBR2 の過剰発現による S6K1 リン酸化への影響

第2章でロイシン結合タンパク質として得られたユビキチンリガーゼ UBR1 と UBR2 が、ロイシン-mTOR シグナル経路に関与するのかを、HEK293T で UBR1 または UBR2 を過剰発現させることによって検証した。HEK293T は、遺伝子 (プラスミド) 導入効率が高く、さらに SV40 ウィルス large T 抗原を発現しているために SV40 ori を持つプラスミド (例: pCMV) の細胞内コピー数を増やすことができる。このため、導入した遺伝子を効率よく高発現させることができる。N 末端に FLAG タグを融合した UBR1 (あるいは UBR2) の発現プラスミドをリポフェクション法により細胞に導入したところ、これらのプラスミドを導入していない細胞と比較して、UBR1 (あるいは UBR2) の発現量は約 30 倍に上昇した (図 3-1C)。HEK293T においても、ロイシンは (mTOR シグナル経路の活性化の指標である) S6K1 Thr389 のリン酸化を引き起こした (図 3-1B lane 1、4)。ここで、UBR1 あるいは UBR2 を発現させると、ロイシンによる S6K1 リン酸化は減少した (図 3-1B lane 4-6)。また、ロイシンを加えない状態でわずかに見られる S6K1 Thr389 のリン酸化も、UBR1 あるいは UBR2 の発現によって減少した (図 3-1B lane 1-3)。以上の結果から、UBR1 と UBR2 は、S6K1 のリン酸化の負の制御因子であることが示唆された。

3 - 3 - 2 UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化への影響

もし UBR1 と UBR2 が S6K1 リン酸化を抑制する因子であるならば、逆に UBR1 と UBR2 をノックダウンすることによって、S6K1 リン酸化は増加するはずである。そこで、UBR1 あるいは UBR2 をノックダウンするための shRNA 発現レンチウイルスを HEK293T に感染させた (UBR1 shRNA は #1、#2 の 2 種類、UBR2 shRNA は #1、#2、#3 の 3 種類)。それぞれの感染細胞で、UBR1 あるいは UBR2 の発現量

が 70 - 90%低下した (図 3-2A)。この時、ロイシン刺激無しでも S6K1 リン酸化の増加が見られた (図 3-2B)。特に強く発現抑制が見られた UBR1 shRNA #2 と UBR2 shRNA #1 で、S6K1 リン酸化は強く増加するのが観察できた。過剰発現とノックダウンのの実験結果から、UBR1 と UBR2 は、S6K1 リン酸化を抑制する因子と考えられる。

UBR1 と UBR2 のノックダウンに伴う S6K1 Thr389 リン酸化の増加は、TOR complex 1 を介していることを示すため、TOR complex 1 の阻害剤であるラパマイシンを加えた。その結果、UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化の増加は、完全に抑えられた (図 3-3)。したがって、UBR1 と UBR2 は、TOR complex 1 を抑制し S6K1 リン酸化を抑制していることが示された。

3 - 3 - 3 ロイシン添加が UBR1 と UBR2 の過剰発現に与える影響

UBR1 と UBR2 は mTOR 活性を抑制する因子であることが、3 - 3 - 1 と 3 - 3 - 2 によって示された。次に、ロイシンの経路に UBR1 及び UBR2 が関与しているかを検証した。もし、UBR1 及び UBR2 がロイシンの経路に関与しているのであれば、UBR1 や UBR2 の過剰発現による S6K1 リン酸化抑制は、ロイシンを多量に加えることで解除することができるかもしれない。解除されなければ、UBR1 や UBR2 はロイシン経路には関与せずに mTOR の活性を抑制する因子である可能性がある。そこで、ロイシンの濃度を 1 mM から、3、10 mM に増加させ、あるいは DMEM 培地に含まれるアミノ酸 (15 種) を加えた (図 3-4)。その結果、10 mM ロイシンを加えた時や DMEM 培地に含まれるアミノ酸を加えた時、UBR1 や UBR2 による S6K1 リン酸化抑制効果が消失する傾向が見られた。したがって、UBR1 と UBR2 はロイシン-mTOR シグナル経路に関与していると考えられた。また、ロイシンは、UBR1 や UBR2 を阻害することによって mTOR を活性化していると考えられる。

3 - 3 - 4 UBR1 と UBR2 の過剰発現における mTOR 関連因子群の量変化

UBR1 と UBR2 は、ユビキチンリガーゼであるため、UBR1 と UBR 2 は mTOR の活性化因子をユビキチン化してプロテアソームによる分解に導くことで、mTOR 活性を抑制していることが予想された。そこで、UBR1 や UBR2 を過剰発現させて、既知の mTOR の活性化因子の量が変化するか、各因子の抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。mTOR の活性化因子としては、mTOR 自身、mTOR と複合体を構成する Raptor、GβL、また mTOR に直接結合して活性化することが知られている Rheb について検証したところ、これらの因子の量は変化が見られなかった（図 3-5）。その他の mTOR 周辺因子（PRAS40、TSC1、TSC2）の量の変化も見られなかった。

また、プロテアソームによる分解に導かないユビキチン修飾があることから、UBR の結合因子として上記の因子が得られるかを検証した。HEK293T における UBR1 及び UBR2 の過剰発現を行った条件で（3 - 3 - 1、3 - 3 - 3）FLAG 精製を行った。ユビキチン化した因子は UBR1 や UBR2 から物理的に離れると考えられ、そこでプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチン存在下でも行ったが、UBR1/UBR2 の結合因子として mTOR 周辺因子は検出されなかった（図 3-6）。

したがって、UBR1 と UBR2 は、本章で検証した因子以外を基質にしていると考えられた。

3 - 4 考察

3 - 4 - 1 UBR1 と UBR2 は同程度の mTOR 抑制効果

ユビキチンリガーゼである UBR1 と UBR2 は、ともに N-end rule タンパク質分解で働き、認識する基質の特徴も共通している一方で、それぞれのノックアウトマウスの表現型は異なり生体内における機能の違いが示唆されている (Kwon *et al.* 2001, 2003、1 - 2 - 5 参照)。本章で検証した S6K1 のリン酸化 (mTOR 活性化) に対しては、UBR1 と UBR2 は同程度の抑制効果が観察された (過剰発現及びノックダウンの実験)。したがって、mTOR 活性抑制に関して、UBR1 と UBR2 の両方が関与し、互いに補完していると考えられる。

3 - 4 - 2 UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化の増加度合

UBR1 と UBR2 のノックダウンにより、アミノ酸枯渇条件下において S6K1 リン酸化の増加が見られた。ロイシンが UBR1/UBR2 を介して mTOR を抑制しているのであれば、UBR1/UBR2 ノックダウンによってロイシンと同じ効果が期待される。しかし、ロイシンを加えた時ほどの増加が見られなかった。これは以下のような原因が考えられる。

ノックダウン効率が十分ではなかった。

例えば UBR1 をノックダウンしても UBR2 が残っており、残りの UBR による mTOR 抑制効果が見られる。

UBR1 と UBR2 を介さない経路が存在する。

については、UBR1 と UBR2 の両方をノックダウンするため、2 種類のレンチウイルスを同時に感染させたがノックダウンの効率が低下し、両方を十分ノックダウンすることができなかった。

については、UBR1、UBR2 と type 1 基質認識ドメイン (別名 UBR box) を持

つファミリーが報告されており、UBR3 や UBR4 などが関与する可能性が考えられる (Tasaki *et al.* 2005)。

3 - 4 - 3 UBR1 と UBR2 のユビキチン化活性と S6K1 リン酸化

UBR1、UBR2 の今までに知られている活性はユビキチン付加のみで、mTOR 活性の抑制にユビキチン化が関わっている可能性は高い。ユビキチン化活性が必要であることを確認するため、3 - 3 - 1 において UBR1 全長または UBR2 全長の過剰発現の代わりに、ユビキチン化活性のない点変異体 (Xie & Varshavsky 1999) や部分欠損変異体 (4 - 3 - 2) を発現させて S6K1 リン酸化に影響を与えないことを検証したいと考えた。しかし、これらの変異体の発現量は、全長の発現量と比較して極端に少なく、比較することができなかった。これらの変異体は、構造的に不安定であることが考えられる。安定に発現できる変異体を用いて、ユビキチン化活性が重要であることを示す必要がある。

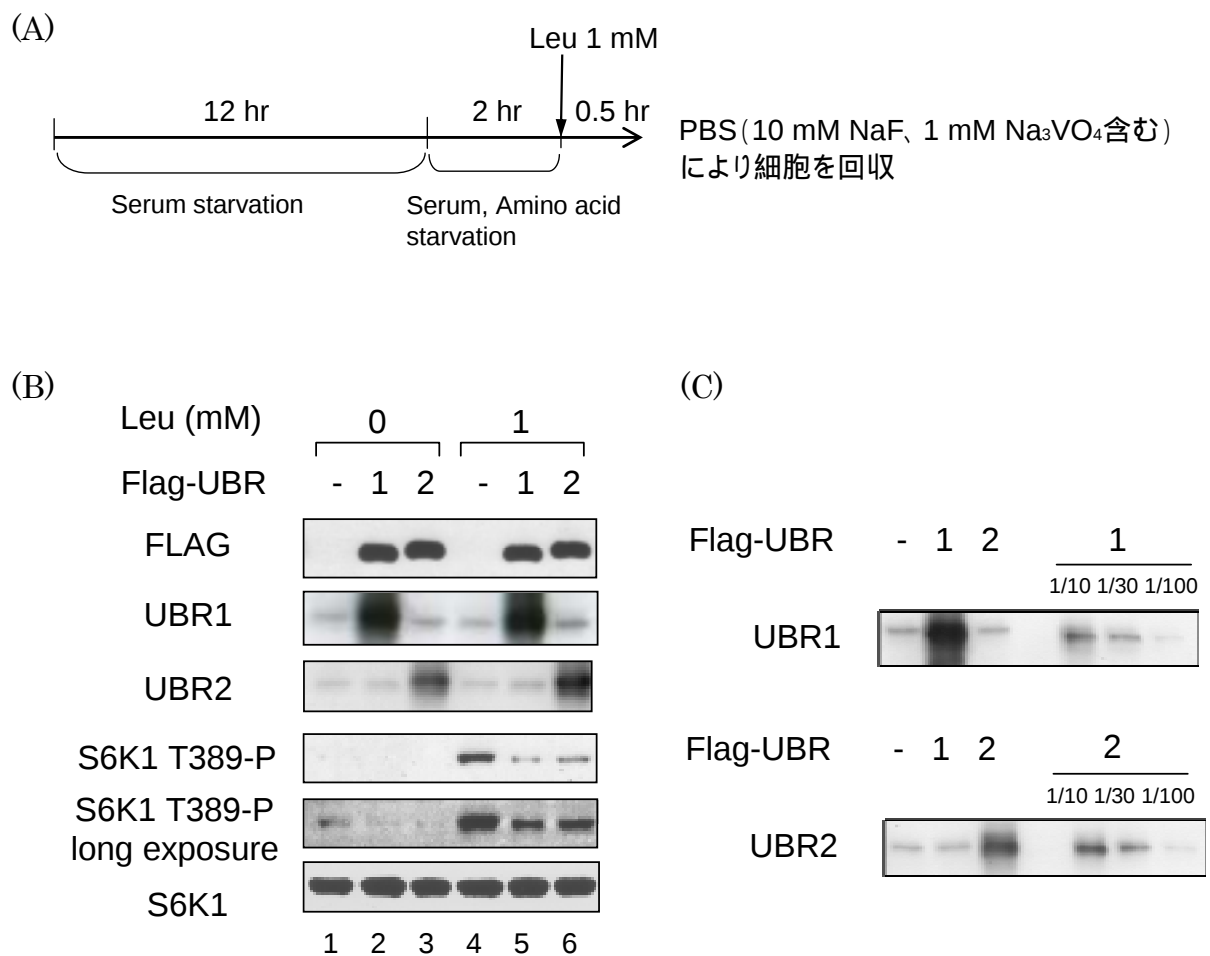


図 3-1 UBR1 と UBR2 の過剰発現による S6K1 リン酸化への影響

(A) FLAG タグ融合 UBR1、UBR2 を HEK293T 細胞株に導入した。細胞導入して約 32 時間後、血清・アミノ酸枯渇状態にして、1 mM のロイシンを加えて 30 分後に細胞を回収した。

(B) HEK293T において、ロイシンは S6K1 リン酸化を引き起こした (lane 1、4)。UBR1 あるいは UBR2 を過剰発現させると、S6K1 リン酸化は減少した (lane 4-6)。ロイシン刺激無し状態でわずかに見られる S6K1 リン酸化も UBR1、UBR2 の過剰発現で検出できなくなった (lane 1-3)。

(C) UBR1、UBR2 それぞれを認識する抗体でウェスタンブロッティングを行い、過剰発現の程度を調べた。

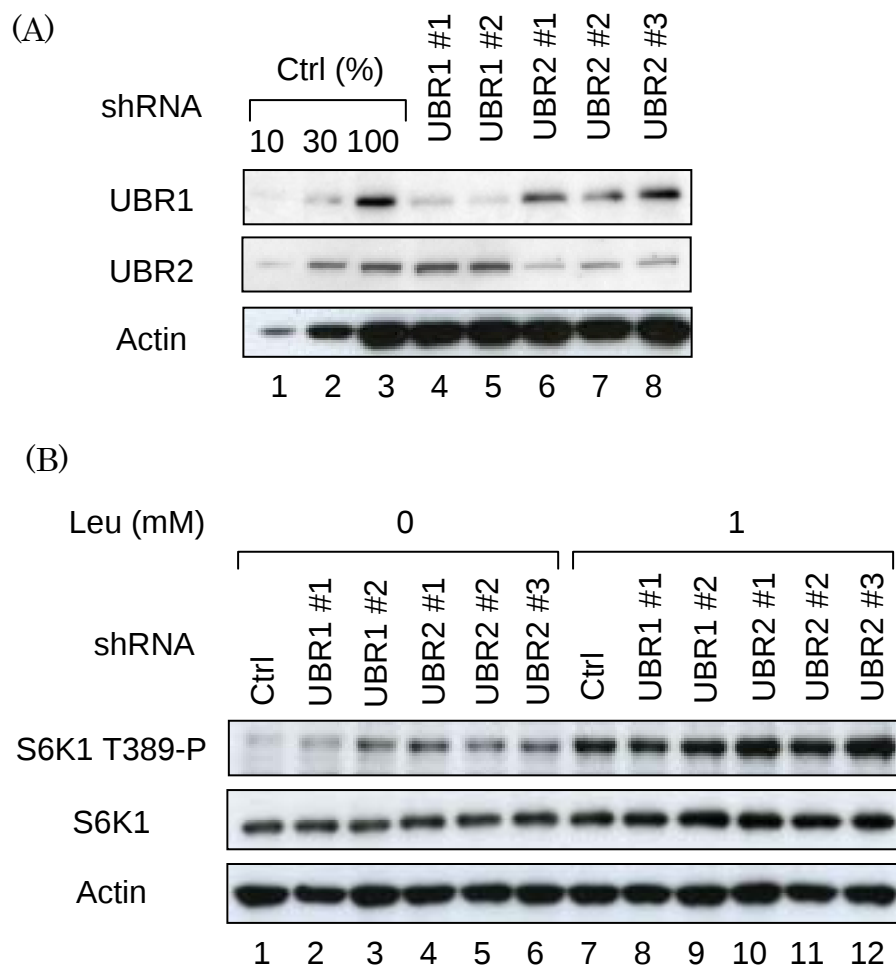


図 3-2 UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化への影響

(A) HEK293T 細胞株に、UBR1 または UBR2 shRNA を発現するレンチウイルスを感染させた (UBR1 は #1・#2、UBR2 は #1・#2・#3)。抗生物質によって感染した細胞を選別し、感染から 7 日後に UBR1、UBR2 のノックダウンの程度をそれぞれの抗体で確認した。

(B) 血清・アミノ酸枯渇状態にした後、1 mM ロイシンを加えて、各抗体でウェスタンブロッティングを行った。UBR1 あるいは UBR2 のノックダウンにより、ロイシンを加えない状態で、S6K1 リン酸化の増加が見られた。

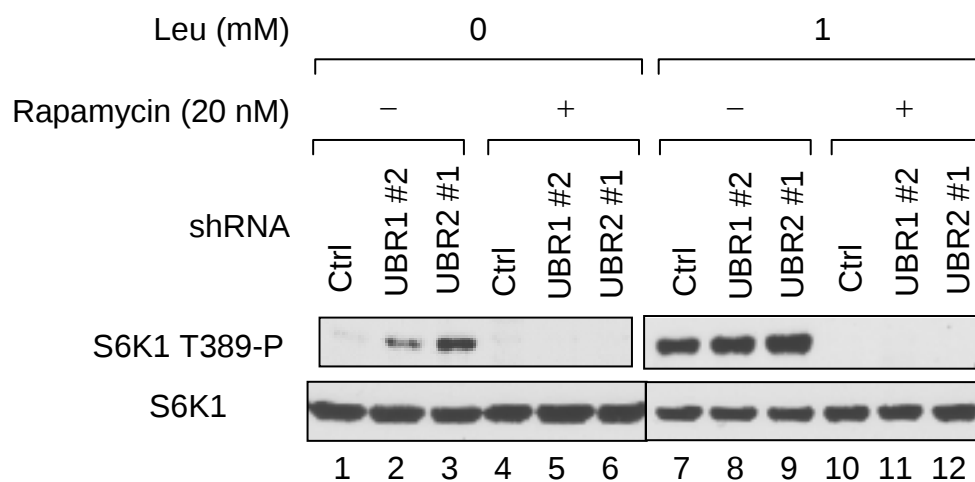


図 3-3 UBR1 と UBR2 のノックダウンによる S6K1 リン酸化増加は TOR complex 1 を介している

図 3-2 と同様に実験を行い、ロイシンの刺激 1 時間前に、TOR complex 1 阻害剤ラパマイシンを 20 nM で加えた。ラパマイシンを加えた結果、UBR1 や UBR2 のノックダウンによって増加した S6K1 リン酸化は完全に見られなくなった。

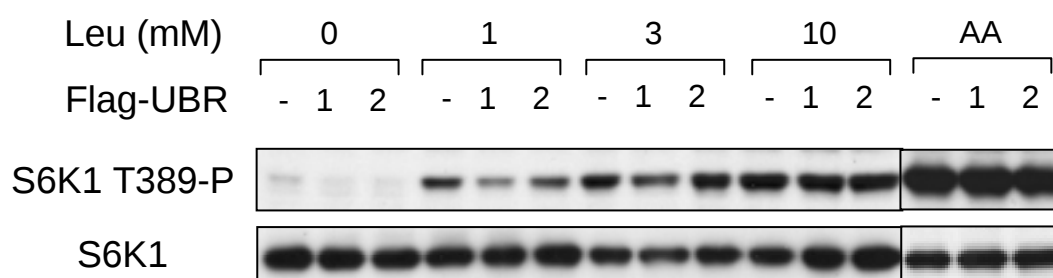


図 3-4 高濃度のロイシンを加えると、UBR1 と UBR2 の過剰発現による S6K1 リン酸化抑制効果は弱まる

ロイシンの濃度を 1 mM から、3、10 mM に増加させたり、DMEM アミノ酸 (15 種) を加えた時、UBR1 や UBR2 による S6K1 リン酸化の抑制効果は弱まる傾向が見られた。よって、UBR1 と UBR2 は、ロイシン-mTOR シグナル経路に関与することが示唆された。

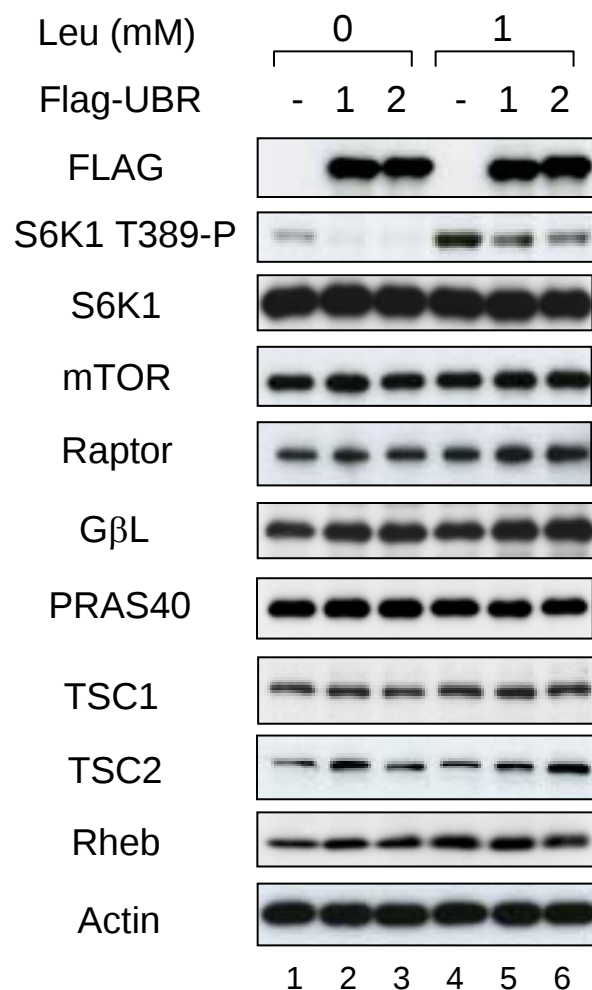


図 3-5 UBR1 と UBR2 を過剰発現させた時の mTOR シグナル経路の因子の量変化

UBR1 と UBR2 を過剰発現させたとき、既知の mTOR シグナル経路の因子の量が変化するかを、それぞれの抗体でウェスタンブロッティングを行うことにより観察した。mTOR 複合体 (TOR complex 1) の構成因子 (mTOR、Raptor、GβL)、TOR complex 1 に結合する因子 (PRAS40、Rheb)、TOR complex 1 の上流で働く因子 (Rheb、TSC1、TSC2) は、いずれも量の減少が見られなかった。

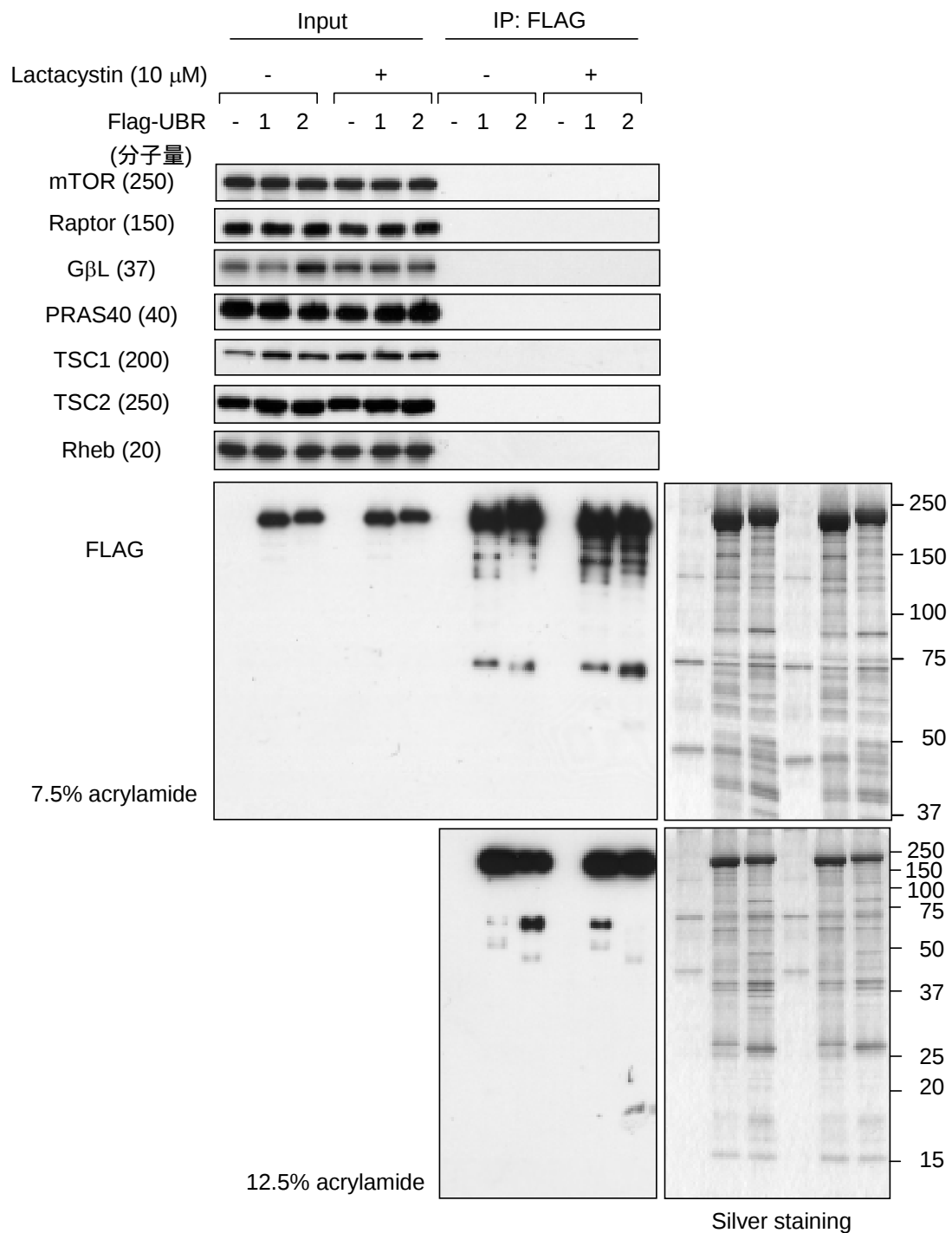


図 3-6 UBR1/UBR2 の結合因子

HEK293T に FLAG タグ融合 UBR1/UBR2 を発現させ、FLAG タグにより精製した。UBR1/UBR2 結合因子として、既知の mTOR 周辺因子は得られなかった。銀染色で検出されたものの一部は、UBR1/UBR2 の分解産物と考えられる。血清・アミノ酸枯渇状態に置き、さらにプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを加えた。

第4章 ロイシンが UBR1、UBR2 の活性に与える影響 (*in vitro* 解析)

4 - 1 緒言

第3章 (3 - 3 - 3) では、細胞において、ロイシンは UBR1/UBR2 の活性を阻害していることが示唆された。本章では、*in vitro* 評価系を用いて、ロイシンが UBR1/UBR2 の活性に与える影響を検証した。UBR1/UBR2 は、N 末端アミノ酸残基を認識してユビキチン化し、N 末端アミノ酸残基によって半減期が異なるという N-end rule を担っている。UBR1/UBR2 が認識してユビキチン化するアミノ酸残基は、type 1 (Arg、Lys、His) と type2 (Leu、Phe、Trp、Tyr、Ile) である。*in vitro* 転写・翻訳系で使われるウサギ網状赤血球抽出液では、UBR1/UBR2 を含む酵素群の存在により、哺乳類細胞における N-end rule タンパク質分解を観察することができる (Gonda *et al.* 1989)。

ウサギ網状赤血球抽出液での N-end rule を見るモデル基質として、Sindbis virus RNA polymerase の nsP4 というタンパク質が知られている (Tasaki *et al.* 2005)。このタンパク質は、自然界においては、他の因子 (nsP3) との融合タンパク質として発現した後プロテアーゼで切断されることにより N 末端に Tyr 残基を露出し、速やかに分解されている (Groot *et al.* 1991)。nsP4 の N 末端にある Tyr (type 2) 残基を、Arg (type 1)、Leu (type 2)、Met (type 1/2 に当てはまらない) に置換したモデル基質は N-end rule に沿って分解され、type 1 と type 2 の基質は速やかに分解されるが、type 1/2 に当てはまらない Met は安定に存在する。本章では、Arg、Leu、Tyr、Met を N 末端に持つモデル基質の、ウサギ網状赤血球抽出液における分解に対するロイシンの影響を検証した。

また、本章の後半では、UBR2 の部分欠損変異体を作製し、ロイシンが結合する部

位を決定した。ロイシンは UBR2 の基質認識ドメインに結合した。ロイシンは、UBR2 の基質認識ドメインに結合し活性を阻害していることが示唆された。

4 - 2 材料及び方法

4 - 2 - 1 試薬

- ・ Leu (Wako) Leu-Ala (Sigma) Arg-Ala (Bachem)

それぞれ最終濃度 50 mM になるように milliQ に溶かした。

- ・ Bestatin (ナカライテスク)

最終濃度 1 mM になるようにエタノールに溶かし、 - 20 で保存した。

- ・ TNT Quick coupled transcription/translation system (Promega)

4 - 2 - 2 プラスミドベクターの構築

pcDNA3-flagDHFR^{ha}-Ub^{R48}-X-nsP4^{flag} (X: Arg、Leu、Tyr、Met)

(N-end rule のモデル基質発現プラスミド)

X: Arg、Tyr、Met のプラスミドは、University of Pittsburgh の Dr. Yong Tae Kwon に頂いた。X: Leu のプラスミドは、X: Leu から QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて作製した。

pCMV-FLAG-UBR2 全長、pCMV-FLAG-UBR2 部分欠損変異体

(N 末 FLAG タグ融合、UBR2 全長または部分欠損変異体を発現するプラスミド)

pCMV-FLAG-UBR2 全長は、3 - 2 - 3 参照。

pCMV-FLAG-UBR2 部分欠損変異体(1-1294、1-871、1-482、872-1755、483-1755、483-871) は以下のように作製した。ラット UBR2 部分欠損変異体の遺伝子は、pCMV-FLAG-UBR2 全長を鋳型とし、下記のプライマーを用いて PCR を行った。

1-1294 rUBR2/F/EcoRV 5'-atcatggcgctcggagatggagccc-3'

 rUBR2 d1/R/XhoI 5'-ttttctcgagttaccgaggataaaaatcaggcc-3'

1-871	rUBR2/F/EcoRV	(上に同じ)
	rUBR2 d2/R/XhoI	5'-ttttctcgagttatgtatcttctttattttctctttcaac-3'
1-482	rUBR2/F/EcoRV	(上に同じ)
	rUBR2 d6/R/XhoI	5'-ttttctcgagttacttgagatctaagataaggctc-3'
872-1755	rUBR2 d3/F/EcoRV	5'-atcgcacttcctcctccggct-3'
	rUBR2 /R/XhoI	5'-ttttctcgagttacaaatgctgccagtcgatgcc-3'
483-1755	rUBR2 d4/F/EcoRV	5'-atctatgtgttgatcagcaaaccac-3'
	rUBR2 /R/XhoI	(上に同じ)
483-871	rUBR2 d4/F/EcoRV	(上に同じ)
	rUBR2 d2/R/XhoI	(上に同じ)

PCR によって得られた DNA 断片は、5'末端は T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TOYOBO) で処理を行い、3'末端を Xho I で切断した。次に、FLAG タグ融合タンパク質発現ベクター pCMV tag2B を EcoR V、Xho I で切断した。pCMV tag2B に各 UBR2 部分欠損変異体断片を組み込んだプラスミドを、pCMV-FLAG-UBR2 1-1294、1-871、1-482、872-1755、483-1755、483-871 とした。

4 - 2 - 3 N-end rule に沿った *in vitro* タンパク質分解系

ウサギ網状赤血球抽出液 TNT Quick coupled transcription/translation system は、モデル基質の発現と、モデル基質の分解で用いた。ウサギ網状赤血球抽出液は、メチオニン以外のアミノ酸が補充されており、DNA を添加すると *in vitro* 転写・翻訳を行うことができる。また、脱ユビキチン化酵素が含まれているため、^{flag}DHFR^{ha}-Ub^{R48} 及び X-nsP4^{flag} の融合タンパク質を発現させると、Ub の直後で切断されて ^{flag}DHFR^{ha}-Ub^{R48} と X-nsP4^{flag} ができる (今回 DHFR に続く Ub は K48R の変異体を用いている) (Tasaki *et al.* 2005)。

まず、準備実験として、モデル基質の発現・精製を行った。TNT Quick coupled

transcription/translation system 40 μ l に、 $[^{35}\text{S}]$ methionine (Parkin Elmer) 2 μ l、2 mM ジペプチド、0.15 mM Bestatin (ジペプチドの分解を防ぐためのアミノペプチダーゼ阻害剤)、pcDNA3-flagDHFR^{ha}-Ub^{R48}-X-nsP4^{flag} (X: Arg、Leu、Tyr、Met) 1 μ g を加え (反応溶液計 50 μ l) を加えて、30 ° で 1 時間発現させた。添加するジペプチドは、Arg-Ala (X: Arg の時)、Leu-Ala (X: Leu の時)、Trp-Ala (X: Tyr の時) を用いた (これらは UBR1/UBR2 の競合的阻害剤であり、X-nsP4 の分解を防ぐことができる)。発現させた後、Anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) 20 μ l を加え、4 ° 、1 時間転倒攪拌を行った。そして、0.1% NP-40 Wash Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8)、100 mM NaCl、0.1% NP-40) 500 μ l で 3 回洗浄後、0.1 mg/ml FLAG を含む 0.1% NP-40 Wash Buffer 50 μ l により精製タンパク質を溶出した。その結果、flagDHFR^{ha}-Ub^{R48} と X-nsP4^{flag} (X: Arg、Leu、Tyr、Met) が得られた。

次に、新しい TNT Quick coupled transcription/translation system 20 μ l に、アミノ酸またはジペプチド (0、2、4 mM Leu、2 mM Leu-Ala + 0.15 mM Bestatin、2 mM Arg-Ala + 0.15 mM Bestatin) を加えて、on ice で 20 分間静置した。その後、精製混合物 flagDHFR^{ha}-Ub^{R48} 及び X-nsP4^{flag} 5 μ l を加えて、30 ° でインキュベートし、0、3 分後のサンプルを回収した (反応溶液計 30 μ l)。回収したサンプルはすぐ 4 $\times$ SDS sample buffer (組成は 2 - 2 - 5 参照) を 10 μ l 量加えて、98 ° で 5 分間加熱した。SDS-PAGE 後、オートラジオグラフィーによって検出した (Storm 860 (Molecular Dynamics)、ImageQuant)。

4 - 2 - 4 UBR2 全長及び部分欠損変異体の発現、ロイシンとの結合評価

前夜に 10-cm collagen-coated dish に HEK293T を 5.0×10^6 cells でまき、37°C、5% CO₂ 条件下で約 12 時間インキュベートした。そして、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、pCMV-FLAG-UBR2 全長または部分欠損変異体を細胞導入した。細胞導入 4 時間後に培地交換を行った。細胞導入 24 時間後に、PBS による洗浄

2 回後、PBS によって回収した。そして、NP-40/HEPES lysis Buffer(20 mM HEPES (pH 7.9)、10% Glycerol、150 mM KCl、0.2 mM EDTA、1% NP-40、1 mM DTT) で溶解させた。Anti-FLAG M2 Affinity Gel(Sigma)を用いて精製した。SDS-PAGE 後、CBC 染色を行い、BSA (Fraction V、ナカライテスク) の検量線との比較により定量した。

精製した UBR2 部分欠損変異体 100 ng / sample を、ロイシン固定化粒子と混合し、4 時間の転倒攪拌を行った。次に、Wash Buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH7.9)、10% Glycerol、150 mM KCl、0.2 mM EDTA(pH8.0)、1 mM DTT、0.2 mM PMSF、0.1% NP-40) で洗浄し、1 × SDS sample buffer により溶出した。

4 - 2 - 5 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) ウェスタンブロッティング

2 - 2 - 6、2 - 2 - 8 を参照。

4 - 3 結果

4 - 3 - 1 ロイシンが N-end rule タンパク質分解に与える影響

まず、ウサギ網状赤血球抽出液において、N 末端アミノ酸残基によって半減期が異なる N-end rule が見られることを確認した。Arg(type 1)、Leu、Tyr(以上 type2)、Met(type 1/2 に当てはまらない)を N 末端に持つモデル基質の分解を観察した結果、Arg、Leu、Tyr のモデル基質は 3 分で速やかに分解されたが、Met のモデル基質やコントロールの DHFR-Ub は安定に存在した(図 4-1 lane 1、2、7、8、13、14、19、20)。また、ジペプチドを加えることによって対応する基質分解が阻害されるかを観察することによっても、N-end rule が見られることを確認した。type 1 基質の分解を阻害するジペプチド Arg-Ala を加えた時、type 1 基質の分解は阻害され、type 2 基質の分解は阻害されない(lane 6、12、18)。type 1 基質の分解を阻害するジペプチド Leu-Ala を加えた時は、逆に、type 1 基質の分解は阻害されないが type 2 の基質の分解は阻害された(lane 5、11、17)。これらの結果は、今までの報告と一致している(Groot *et al.* 1991; Tasaki *et al.* 2005)。

ここで、ロイシンを加えることにより、モデル基質の分解に影響を与えるかを検証した。その結果、ロイシンは、Arg、Tyr のモデル基質の分解に対してはほとんど影響を与えなかった。一方、ロイシンは、Leu-Ala ジペプチドよりは弱いですが、Leu のモデル基質の分解を濃度依存的に阻害した(図 4-1 lane 8-10)。Met のモデル基質の分解には、ロイシンの影響は見られなかった。以上の結果から、ロイシンは、特に N 末端にロイシンを持つモデル基質の分解を阻害することが分かった。ロイシンは、競合的に type 2 基質の分解を阻害している可能性が考えられた。

4 - 3 - 2 UBR2 のロイシン結合部位の決定

ロイシンはどのように N-end rule を阻害するのかを考察するため、UBR2 におけ

るロイシン結合部位を決定した。UBR1 と UBR2 は、相同性が 66% と高く（ヒト、ラット）、機能ドメインが共通している。各機能ドメインの説明は 1 - 2 - 6 で述べた。図 4-2 のように UBR2 全長及び部分欠損変異体 6 種類を哺乳類培養細胞で発現・精製し、ロイシン固定化粒子との結合を評価した。その結果、C 末端領域を欠失した変異体でも、全長と同程度ロイシンと結合した（1-1294、1-871）。さらに短くした変異体（1-482）でも、回収率は若干低下したがロイシンと結合した。一方で、1-482 を含まない変異体（871-1755、483-1755、483-871）ではロイシンとの結合は見られなかった。以上の結果から、ロイシンは UBR2 の基質認識ドメインに結合することが示唆された。type 1 と type 2 のいずれに結合するかの検討を試みたが、1-482 より短い変異体はコンフォメーションが維持できないと考えられ、どの変異体もロイシンとの結合が減少したため、さらに細かい結合領域を決定することはできなかった。

4 - 4 考察

4 - 4 - 1 ウサギ網状赤血球抽出液を用いた評価系

ウサギ網状赤血球に UBR1、UBR2 が含まれており、N-end rule が観察できることから、UBR1/UBR2 の評価系として用いた。しかし、E1、E2、プロテアソームへの影響も含めた評価となるため、ユビキチン化活性のみを見るには、精製された E1、E2、E3、基質、ユビキチン、ATP を加える再構成系が適している。

再構成系で実験するには、基質をある程度多く調製する必要がある。しかし、UBR1/UBR2 の基質となるような、Met 以外の N 末端アミノ酸残基の基質を大量調製できる系が確立していないため、UBR1/UBR2 を用いた報告でほとんど再構成系が用いられていない (UBR1/UBR2 を E3 とする再構成系を用いた報告は、type 1、type2 アミノ酸残基によらない特殊な基質 CUP9 のみ (Turner *et al.* 2000))。そこで、本章で精製したモデル基質を再構成系に加えたところ、少量での検出が求められるが、UBR1/UBR2 によりユビキチン化することが確認できた。また、ロイシンでユビキチン化が阻害される様子も観察された。今後、基質を大量に調製する方法を確立することにより、UBR1/UBR2 の再構成系の活性評価が可能である。

4 - 4 - 2 部分欠損変異体の発現量

HEK293T で UBR2 部分欠損変異体を発現させた時、全長と比べて発現量は少なかった。UBR2 は、一部でも欠失すると不安定になる構造であると考えられる。また、リガーゼ活性のない点変異体でも発現量はわずかであった (Xie & Varshavsky 1999、3 - 4 - 3)。このリガーゼ活性のない点変異体の細胞内結合因子として、シャペロンタンパク質が同定されたため、部分欠損変異体や点変異体は構造的に不安定であることが示唆された。

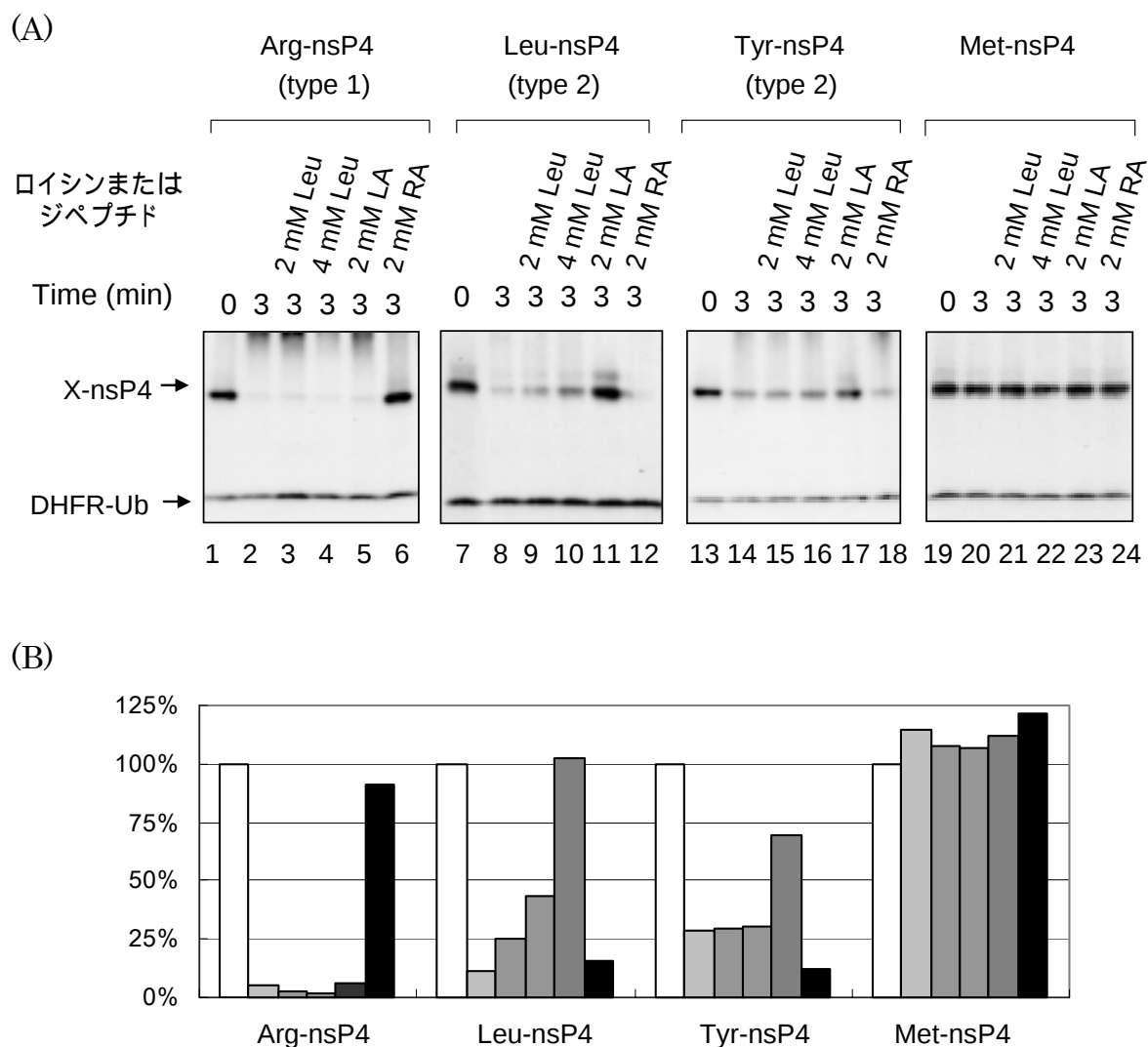


図 4-1 ロイシンは N-end rule 基質の分解を阻害する

(A) ^{35}S で放射性ラベルしたモデル基質 X-nsP4 (X: Arg、Leu、Tyr、Met) 及びコントロール DHFR-Ub を、ウサギ網状赤血球抽出液に加えた。Arg、Leu、Tyr は 3 分で速やかに分解された。この時、Leu、Leu-Ala (図中の LA)、Arg-Ala (図中の RA) を加えた。回収したサンプルは、SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーによって検出した。

(B) (A)の結果を Image J を用いてグラフ化した。X-nsP4 量を DHFR-Ub 量で補正し、0 分での X-nsP4 を 100%とした。

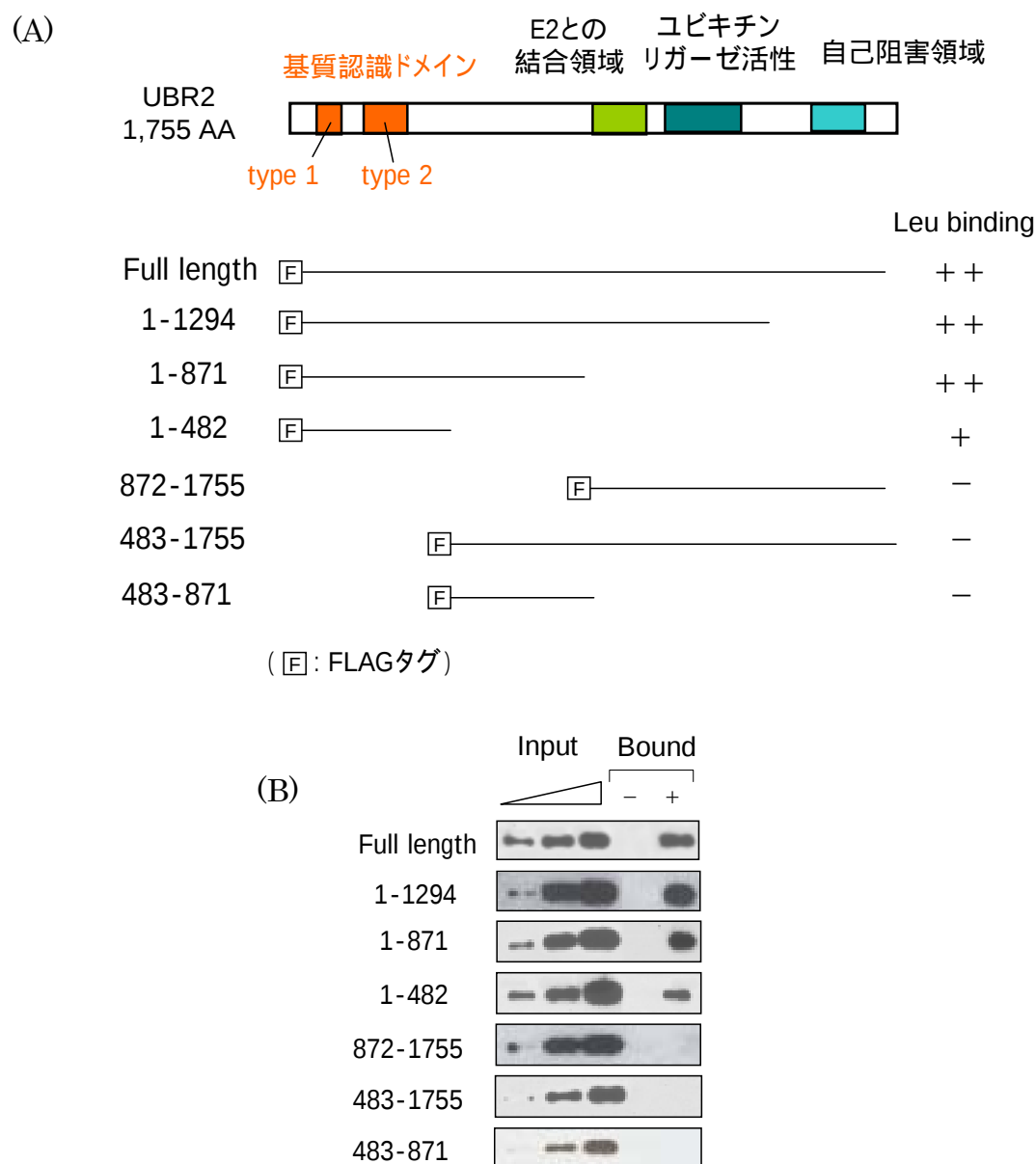


図 4-2 ロイシンは UBR2 の基質認識ドメインに結合する

(A) 結合評価に用いた UBR2 の部分欠損変異体。UBR2 は、type 1 基質と type 2 基質が結合する基質認識ドメイン、E2 の結合領域、ユビキチンリガーゼ活性を担うドメイン、自己阻害領域（種間で保存されている領域）からなる。

(B) FLAG タグ融合の UBR2 全長及び部分欠損変異体を HEK293T 細胞株で発現・精製した。ロイシンを固定化していない粒子（-）またはロイシン固定化粒子（+）との結合を検証した。SDS-PAGE 後、FLAG 抗体によりウェスタンブロッティングを行った。

第5章 総括

5 - 1 本研究のまとめ

本研究では、ユビキチンリガーゼ UBR1、UBR2 が細胞内のロイシンの標的として働き、ロイシン-mTOR シグナル経路を制御することが示唆された。以下、本研究で得られた結果をまとめる。

ロイシンは UBR1、UBR2 に直接結合した

(第2章：アフィニティ精製、第4章：ロイシン結合部位の決定)

UBR1、UBR2 は、mTOR 活性を抑制する因子であった

(第3章：培養細胞における過剰発現・ノックダウンの実験)

ロイシンは、UBR1、UBR2 を阻害することによって、mTOR を活性化することが示唆された

(第3章：培養細胞における解析、UBR1、UBR2 過剰発現時に高濃度のロイシンを加える実験)

ロイシンは UBR1、UBR2 の活性を阻害した

特に N 末端がロイシンである基質に対して阻害活性が見られた

(第4章：*in vitro* 評価系)

ロイシンは UBR2 の基質認識ドメインに結合した

(第4章：ロイシン結合部位の決定)

以上の結果から、ロイシンが mTOR を活性化する機構について、図 5-1 のようなモデルが考えられる。細胞膜にある中性アミノ酸トランスポーター(1 - 2 - 1)によってロイシンは細胞内に取り込まれ、細胞内で UBR1 や UBR2 と結合し、UBR1 や UBR2 の活性を阻害することにより、mTOR を活性化するというものである。

5 - 2 考察

本研究で得られた結果をもとに、以下の3点について考察する。1つ目は、第3章の結果を受けて、UBR1とUBR2がどのようにmTOR活性を抑制しているのかという点である。2つ目は、第4章の結果を受けて、ロイシンがUBR1とUBR2の活性を阻害する機構はどのように考えられるかという点である。そして、最後に、細胞におけるUBR1及びUBR2を介したロイシン-mTORシグナル経路活性化機構の重要性を考える。

5 - 2 - 1 UBR1とUBR2がmTOR活性を抑制する機構

UBR1とUBR2の既知の機能はユビキチン付加であることから、UBR1とUBR2はmTORシグナル経路の制御に關与する基質の候補を挙げる。

mTOR周辺の活性化因子

mTOR活性化因子をユビキチン化して分解に導くことによってmTOR活性が抑制されることから、既知のmTORシグナル経路活性化因子が基質の候補である。

ロイシン-mTORシグナル経路における活性化因子としては、mTOR、Raptor、GβL、Rheb、Rag、hVps34が知られている。mTOR、Raptor、GβLは複合体TOR complex 1を形成し、Rheb、Rag、hVps34はロイシン-mTORシグナル経路において活性化因子と考えられている。抗体を入手した各因子の量は、UBR1またはUBR2を過剰発現した時に減少しなかった(3 - 3 - 4)。これは、以下のような3つの理由が考えられる。第一に、ユビキチン化されている量が検出限界以下であることがある。第二に、ユビキチン化されても分解されないために量の変化が見られないことがある。そこで、UBR1、UBR2に上記の活性化因子が結合するかを検証したが、見られなかった(3 - 3 - 4)。第三に、他の因子がUBR1やUBR2の基質であると考えられる。

本研究で未検証の Rag、hVps34 やこれから明らかにされるかもしれない mTOR シグナル経路の新規因子が、UBR1 や UBR2 の基質となる可能性がある。

酵母 UBR1 の既知の基質（その 1）

UBR1/UBR2 の酵母ホモログ UBR1 の基質のうち、mTOR シグナル経路と関連する可能性があるものを と で挙げる。まず、ヘテロ三量体 G タンパク質の α サブユニットである Gpa1p である。

Gpa1p は、UBR1 による N-end rule 分解経路に関与することが示されている (Madura & Varshavsky 1994)。さらに Leu-Ala によって分解が阻害されることから、ロイシンによっても分解が阻害される可能性がある。一方、Gpa1p は、Vps34p (ロイシン-mTOR シグナル経路に関わる hVps34 の酵母ホモログ) に結合し、活性化することが報告されている (Slessareva *et al.* 2006)。よって、ロイシンは UBR1 による Gpa1p 分解を阻害し、Vps34p の活性化に関与する可能性はある。

Gpa1p の哺乳類ホモログは多くのファミリーが存在するため、どれが mTOR シグナル経路に関与し、また UBR1、UBR2 の基質になるのか、という点はまだ分からない。また、UBR1 による Gpa1p の認識機構についてもまだ解析が必要である。

酵母 UBR1 の既知の基質（その 2）

酵母 UBR1 の既知の基質として、ペプチドトランスポーターの発現を調節する転写抑制因子 CUP9 が知られている。

CUP9 は、type 1 と type 2 の両ジペプチド存在下でユビキチン化される (Turner *et al.* 2000; Du *et al.* 2002; Xia *et al.* 2008)。両ジペプチドが必要であるが、type 2 のジペプチドがユビキチン化促進に関わっていることから、ロイシンも CUP9 のユビキチン化を促進する可能性がある。その結果、細胞内のアミノ酸濃度を上げ、mTOR 活性化に関与する可能性がある。

CUP9 及びペプチドトランスポーターPTR2 の哺乳類ホモログは、データベースからの検索から PBX / knotted 1 homeobox 2 及び SLC15A2 であると考えられるが、これらの哺乳類ホモログについて詳細な解析は行われていない。ロイシンが CUP9 のユビキチン化を阻害するかは検討が必要である。

本研究においては、ロイシン-mTOR シグナル経路に關与する UBR1/UBR2 の基質を同定することができなかった。UBR1 や UBR2 の細胞内結合因子の探索を試みた結果、多くの因子が UBR1 や UBR2 に結合していることが分かった (3 - 3 - 4)。今後、UBR1 や UBR2 の基質を明らかにすることが課題である。

5 - 2 - 2 ロイシンが UBR1 と UBR2 の活性を阻害する機構

第 4 章の *in vitro* N-end rule タンパク質分解において、ロイシンは、N 末端がロイシンであるモデル基質の分解を阻害した。また、第 4 章で、ロイシンの結合部位は、type 2 基質の部位に限定することはできなかったものの基質認識ドメインであることが明らかになった。以上の結果から、ロイシンは、UBR1/UBR2 と基質との結合を競合的に阻害していることが考えられる。

ロイシンによる N-end rule 基質の分解阻害は、2 つの特徴があった。1 つ目は、ロイシンが阻害活性を示すには、Leu-Ala よりも高濃度のロイシンを加える必要があった (4 - 3 - 1)。2 つ目は、ロイシンは全ての type 2 基質に対して阻害活性を示すのではなく、特に N 末端がロイシンの基質に対して阻害活性を示した。Leu-Ala よりも阻害活性は弱い、基質の特異性は高くなったと言える。

1 つのアミノ酸が阻害活性を示すことから、他のアミノ酸も阻害活性を示す可能性がある。今後検証していく必要がある。

5 - 2 - 3 UBR1 と UBR2 を介したロイシン-mTOR シグナル経路の重要性

本研究において、UBR1/UBR2 のノックダウン実験結果、及び過剰発現させてロイシンを多量に加える実験結果から、ロイシン-mTOR シグナル経路における UBR1 と UBR2 の重要性が示唆された。また、ロイシンは、UBR1 と UBR2 に結合し、活性を阻害することから、ロイシンを細胞内で感知する因子であることが示唆された。ロイシン-mTOR シグナル経路におけるロイシンの標的が初めて得られたことは意義深い。

ロイシンが mTOR シグナル経路を活性化するにあたって、ロイシンが感知される機構として考えられるものは、細胞内で感知されて、細胞膜で感知されて、代謝物を通して、というものがある。本研究では UBR1 と UBR2 が の機構として示唆された。その他、 や という可能性についても触れたい。

：細胞膜で感知するという可能性は、酵母において、細胞外のアミノ酸濃度を感知して細胞内の転写制御を行う細胞膜上の因子が見つかったことから、推測されている (permease-like membrane protein Ssy1p、Forsberg & Ljungdahl 2001)。哺乳類細胞においても細胞膜にアミノ酸センサーがある可能性がある。

：ロイシンよりも高濃度必要であるが、ロイシンの代謝産物である α -ketoisocaproate が mTOR シグナル経路を活性化するという報告がある (Fox *et al.* 1998)。また、ロイシンが代謝される中で ATP が産生され、AMP / ATP 比の低下で AMPK 活性が低下し、mTOR シグナル経路を活性化することが考えられる (Tokunaga *et al.* 2004)。このように、ロイシンの代謝産物が mTOR 活性化をもたらす可能性がある。

5 - 3 今後の展望

UBR1 と UBR2 を通したロイシン-mTOR シグナル経路について、さらに詳細な解析を行うことにより、ロイシン-mTOR 活性化機構の解明が期待される。

また、本研究で、UBR1 と UBR2 がロイシン-mTOR シグナル経路に関与することが示されたことによって、mTOR シグナル経路が関与する他の作用（オートファジー抑制や細胞周期制御、癌の形成など）に対しても、UBR1 と UBR2 が関与する可能性がある。

また、ロイシンの結合因子を発見したことで、ロイシンよりも効果の高い化合物を探索することが可能になった。臨床の場で使われているアミノ酸輸液や低アルブミン血症改善薬のより効果のある薬剤を作ることができるかもしれない。また、ロイシンと同じ効果を持つ天然物や機能性ペプチドの探索が可能である。タンパク質の減少が見られる場面として術後や入院による筋力の低下があり、特に高齢者の寝たきり防止に役立つことを期待している。

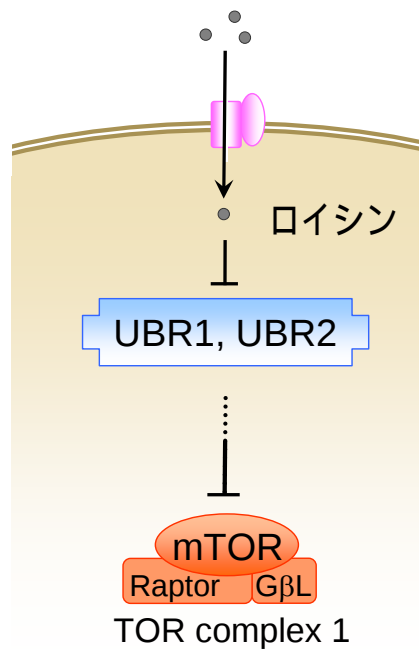


図 5-1 本研究から得られたモデル図

ロイシンは UBR1 及び UBR2 に結合して、その機能を阻害している。ロイシンは UBR の基質認識ドメインに結合する。

UBR1 及び UBR2 は、mTOR 活性を抑制する因子である。

ロイシンは、UBR1 及び UBR2 に結合して、その活性を阻害することによって、mTOR を活性化していると考えられる。

参考文献

- An, J.Y., Seo, J.W., Tasaki, T., Lee, M.J., Varshavsky, A. & Kwon, Y.T. (2006) Impaired neurogenesis and cardiovascular development in mice lacking the E3 ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6212-6217.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Vary, T.C. & Jefferson, L.S. (2000) Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J. Nutr.* **130**, 139-145.
- Azuma, M., Kabe, Y., Kuramori, C., Kondo, M., Yamaguchi, Y. & Handa, H. (2008) Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria. *PLoS One* **3**, e3070.
- Babu, E., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Iribe, Y., Tangtrongsup, S., Jutabha, P., Li, Y., Ahmed, N., Sakamoto, S., Anzai, N., Nagamori, S. & Endou, H. (2003) Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* **278**, 43838-43845.
- Beugnet, A., Tee, A.R., Taylor, P.M. & Proud, C.G. (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem. J.* **372**, 555-566.

- Brown, E.J., Beal, P.A., Keith, C.T., Chen, J., Shin, T.B. & Schreiber, S.L. (1995) Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP *in vivo*. *Nature* **377**, 441-446.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C. Jr. & Abraham, R.T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* **277**, 99-101.
- Buse, M.G. & Reid, S.S. (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J. Clin. Invest.* **56**, 1250-1261.
- Byfield, M.P., Murray, J.T. & Backer, J.M. (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 33076-33082.
- Dann, S.G. & Thomas, G. (2006) The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.* **580**, 2821-2829.
- de Groot, R.J., Rumenapf, T., Kuhn, R.J., Strauss, E.G. & Strauss, J.H. (1991) Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8967-8971.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. & Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1489.

Ditzel, M., Wilson, R., Tenev, T., Zachariou, A., Paul, A., Deas, E. & Meier, P. (2003) Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 467-473.

Du, F., Navarro-Garcia, F., Xia, Z., Tasaki, T. & Varshavsky, A. (2002) Pairs of dipeptides synergistically activate the binding of substrate by ubiquitin ligase through dissociation of its autoinhibitory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14110-14115.

Dunlop, E.A. & Tee, A.R. (2009) Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal.* **21**, 827-835.

Findlay, G.M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V. & Lamb, R.F. (2007) A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem. J.* **403**, 13-20.

Forsberg, H. & Ljungdahl, P.O. (2001) Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 814-826.

Fox, H.L., Pham, P.T., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. & Lynch, C.J. (1998) Amino acid effects on translational repressor 4E-BP1 are mediated primarily by L-leucine in isolated adipocytes. *Am. J. Physiol.* **275**, C1232-C1238.

Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszyńska, A., Aebersold, R. & Sonenberg, N. (2001) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev.* **15**, 2852-2864.

Gonda, D.K., Bachmair, A., Wunning, I., Tobias, J.W., Lane, W.S. & Varshavsky, A. (1989) Universality and structure of the N-end rule. *J. Biol. Chem.* **264**, 16700-16712.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214-226.

Hondermarck, H., Sy, J., Bradshaw, R.A. & Arfin, S.M. (1992) Dipeptide inhibitors of ubiquitin-mediated protein turnover prevent growth factor-induced neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 280-288.

Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.L. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590.

Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J. & Yonezawa, K. (1999) Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase α in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**, 34493-34498.

Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B. & Thomas, G. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* **16**, 3693-3704.

Jefferies, H.B., Reinhard, C., Kozma, S.C. & Thomas, G. (1994) Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4441-4445.

Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. & Endou, H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* **273**, 23629-23632.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163-175.

Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P. & Guan, K.L. (2008) Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* **10**, 935-945.

Kimball, S.R. & Jefferson, L.S. (2004) Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 423-427.

Kimball, S.R., Shantz, L.M., Horetsky, R.L. & Jefferson, L.S. (1999) Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* **274**, 11647-11652.

Kuramori, C., Azuma, M., Kume, K., Kaneko, Y., Inoue, A., Yamaguchi, Y., Kabe, Y., Hosoya, T., Kizaki, M., Suematsu, M. & Handa, H. (2009) Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 519-525.

Kwon, Y.T., Xia, Z., An, J.Y., Tasaki, T., Davydov, I.V., Seo, J.W., Sheng, J., Xie, Y. & Varshavsky, A. (2003) Female lethality and apoptosis of spermatocytes in mice lacking the UBR2 ubiquitin ligase of the N-end rule pathway. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8255-8271.

Kwon, Y.T., Xia, Z., Davydov, I.V., Lecker, S.H. & Varshavsky, A. (2001) Construction and analysis of mouse strains lacking the ubiquitin ligase UBR1 (E3alpha) of the N-end rule pathway. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8007-8021.

Lee, M.J., Tasaki, T., Moroi, K., An, J.Y., Kimura, S., Davydov, I.V. & Kwon, Y.T. (2005) RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15030-15035.

Lee, M.N., Ha, S.H., Kim, J., Koh, A., Lee, C.S., Kim, J.H., Jeon, H., Kim, D.H., Suh, P.G. & Ryu, S.H. (2009) Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol.*

Cell. Biol. 29, 3991-4001.

Lindsley, J.E. & Rutter, J. (2004) Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **139**, 543-559.

Ma, X.M., Yoon, S.O., Richardson, C.J., Julich, K. & Blenis, J. (2008) SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* **133**, 303-313.

Madura, K. & Varshavsky, A. (1994) Degradation of G alpha by the N-end rule pathway. *Science* **265**, 1454-1458.

Maehama, T., Tanaka, M., Nishina, H., Murakami, M., Kanaho, Y. & Hanada, K. (2008) RalA functions as an indispensable signal mediator for the nutrient-sensing system. *J. Biol. Chem.* **283**, 35053-35059.

Magagnin, M.G., van den Beucken, T., Sergeant, K., Lambin, P., Koritzinsky, M., Devreese, B. & Wouters, B.G. (2008) The mTOR target 4E-BP1 contributes to differential protein expression during normoxia and hypoxia through changes in mRNA translation efficiency. *Proteomics*. **8**, 1019-1028.

Mothe-Satney, I., Yang, D., Fadden, P., Haystead, T.A. & Lawrence, J.C. Jr. (2000) Multiple mechanisms control phosphorylation of PHAS-I in five (S/T)P sites that govern translational repression. *Mol Cell Biol.* **20**, 3558-3567.

Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y. & Avruch, J. (2005) Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J. Biol. Chem.* **280**, 23433-23436.

Neklesa, T.K. & Davis, R.W. (2009) A genome-wide screen for regulators of TORC1 in response to amino acid starvation reveals a conserved Npr2/3 complex. *PLoS Genet.* **5**, e1000515.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M. & Murphy, L.O. (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**, 521-534.

Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., Zwartkruis, F.J. & Thomas, G. (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14238-14243.

Obin, M., Mesco, E., Gong, X., Haas, A.L., Joseph, J. & Taylor, A. (1999) Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 11789-11795.

Pende, M., Um, S.H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V.L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S.C. & Thomas, G. (2004) S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA

translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3112-3124.

Pfeiffer, R., Loffing, J., Rossier, G., Bauch, C., Meier, C., Eggermann, T., Loffing-Cueni, D., Kühn, L.C. & Verrey, F. (1999) Luminal heterodimeric amino acid transporter defective in cystinuria. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 4135-4147.

Prizant, R.L. & Barash, I. (2008) Negative effects of the amino acids Lys, His, and Thr on S6K1 phosphorylation in mammary epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* **105**, 1038-1047.

Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K. & Varshavsky, A. (2001) Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* **410**, 955-959.

Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N. & Hershey, J.W. (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* **23**, 1761-1769.

Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P.B. & Thomas, G. (2002) Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* **277**, 20104-20112.

Sakamoto, S., Kabe, Y., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y. & Handa, H. (2009)

Development and application of high-performance affinity beads: toward chemical biology and drug discovery. *Chem. Rec.* **9**, 66-85.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L. & Sabatini, D.M. (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496-1501.

Shigemitsu, K., Tsujishita, Y., Miyake, H., Hidayat, S., Tanaka, N., Hara, K. & Yonezawa, K. (1999) Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* **447**, 303-306.

Shimizu, N., Sugimoto, K., Tang, J., *et al.* (2000) High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat. Biotechnol.* **18**, 877-881.

Slessareva, J.E., Routt, S.M., Temple, B., Bankaitis, V.A. & Dohlman, H.G. (2006) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* **126**, 191-203.

Solomon, V., Lecker, S.H. & Goldberg, A.L. (1998) The N-end rule pathway catalyzes a major fraction of the protein degradation in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **273**, 25216-25222.

Stolovich, M., Tang, H., Hornstein, E., Levy, G., Cohen, R., Bae, S.S., Birnbaum, M.J. & Meyuhas, O. (2002) Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the

phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8101-8113.

Taban, C.H., Hondermarck, H., Bradshaw, R.A. & Biolly, B. (1996) Effect of a dipeptide inhibiting ubiquitin-mediated protein degradation nerve-dependent limb regeneration in the newt. *Experientia* **52**, 865-870.

Tasaki, T., Mulder, L.C., Iwamatsu, A., Lee, M.J., Davydov, I.V., Varshavsky, A., Muesing, M. & Kwon, Y.T. (2005) A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7120-7136.

Tasaki, T., Sohr, R., Xia, Z., Hellweg, R., Hortnagl, H., Varshavsky, A. & Kwon, Y.T. (2007) Biochemical and genetic studies of UBR3, a ubiquitin ligase with a function in olfactory and other sensory systems. *J. Biol. Chem.* **282**, 18510-18520.

Tasaki, T., Zakrzewska, A., Dudgeon, D.D., Jiang, Y., Lazo, J.S. & Kwon, Y.T. (2009) The substrate recognition domains of the N-end rule pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 1884-1895.

Tokunaga, C., Yoshino, K. & Yonezawa, K. (2004) mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 443-446.

Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y.B., Zorzano, A. & Palacín, M. (1998) Identification and characterization of a

membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J. Biol. Chem.* **273**, 32437-32445.

Turner, G.C., Du, F. & Varshavsky, A. (2000) Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* **405**, 579-583.

Uga, H., Kuramori, C., Ohta, A., Tsuboi, Y., Tanaka, H., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y., Takahashi, T., Kizaki, M. & Handa, H. (2006) A new mechanism of methotrexate action revealed by target screening with affinity beads. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1832-1839.

Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12142-12149. Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R. & Proud, C.G. (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* **20**, 4370-4379.

Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471-484.

Xia, Z., Turner, G.C., Hwang, C.S., Byrd, C. & Varshavsky, A. (2008) Amino acids induce peptide uptake via accelerated degradation of CUP9, the transcriptional repressor of the PTR2 peptide transporter. *J. Biol. Chem.* **283**, 28958-28968.

Xie, Y. & Varshavsky, A. (1999) The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway:

the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain.
EMBO J. **18**, 6832-6844.

Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J.Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. & Endou, H. (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.* **1514**, 291-302.

Zenker, M., Mayerle, J., Lerch, M.M., *et al.* (2005) Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat. Genet.* **37**, 1345-1350.

半田宏、川口春馬 (2003)「ナノアフィニティピースのすべて」中山書店

日本必須アミノ酸協会編 (2003)「アミノ酸セミナー」工業調査会

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京工業大学生命理工学研究科、半田宏教授に心から篤くお礼を申し上げます。終始御懇篤なる御指導をいただきました東京工業大学生命理工学研究科、山口雄輝准教授に心から篤くお礼申し上げます。また、貴重な御助言をいただきました東京工業大学坂本聡助教、岸努助教、和田忠士准教授、安藤秀樹助教に深く感謝いたします。

固定化方法について非常に有益な助言をいただきました、東京工業大学生命理工学研究科、三原友和教授、高橋剛博士、富崎欣也博士に深く感謝いたします。

実験試料を快く分与して下さった University of Pittsburgh の Professor Yong Tae Kwon、Dr. Jee Young An に深く感謝いたします。

実験試料を快く分与して下さり、また貴重な御助言をいただきました University of California の玉野井冬彦教授、佐藤龍彦博士に深く感謝いたします。

半田・山口研究室を卒業された、小倉裕次博士、飯泉陽介博士、東基記博士、同じ研究グループに所属する、伊藤拓水氏、嶋田正志氏、伊藤雄気氏、堀田健太郎氏、梨本明宏氏、宮本洋輔氏、唐澤慧記氏、劉舒捷氏には、研究に関して貴重な助言と意見をいただきました。心より感謝いたします。

全員の名前は書き切れませんが、半田・山口研究室の皆様に、心から感謝しています。

そして、いつも温かく見守ってしてくれた家族に心から感謝いたします。