



Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a leucine derivative induces G1 arrest in Jurkat cells

Hidayat, Sujuti

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2827

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002827>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 113 】

氏名・(本籍) HIDAYAT SUJUTI (インドネシア)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1508号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

“Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a Leucine derivative induces G1 arrest in Jurkat cells”

(アミノ酸-mTOR シグナル伝達経路は、ロイシン デリバティブによって阻害され、Jurkat 細胞において G1 期での停止を引き起こす)

審査委員

主査教授 松尾 雅文

教 授 米澤 一仁

教 授 山村 博平

INTRODUCTION

The mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates signal transduction pathways such as nutrients sensing which linked to the cell growth and cell cycle progression. It has been shown that two major downstream effectors of mTOR which important for protein translation, p70^{S6k} and 4E-BP1, is regulated by amino acid availability.

Among 20 amino acids, branched-chain amino acids (BCAA) play a critical role in the stimulation of protein translation. BCAA, especially leucine, has been reported to be required for the amino acid-induced p70^{S6k} activation. The precise structure of leucine is important for its ability to induce both the activation of p70^{S6k} and the phosphorylation of 4E-BP1. We found that leucine derivative, *N*-acetylleucine amide (Ac-Leu-NH₂), which have a modified amino and carboxyl groups, inhibit leucine-induced p70^{S6k} activation.

It was reported that rapamycin inhibits cell cycle progression at the G1 stage, suggesting that amino acid-mTOR signaling pathway plays a pivotal role in cell cycle progression. However, investigation of the effects of amino acids on cell cycle progression is difficult, as amino acid withdrawal for a long period causes cell death. Thus, in the present study, we explored the possibility of Ac-Leu-NH₂ as an inhibitor of cell cycle progression in the presence of amino acids and serum in the culture medium.

METHODS

Cell Culture and Treatments. Human T-lymphoblastoid Jurkat cells were grown in RPMI with 10% FBS on 25-cm² culture flask. For amino acid starvation, cells were first incubated in RPMI without FBS for 24 h, washed twice with RPMI lacking amino acids, and incubated in the same medium for the times indicated for up to 2 h. Then re-addition of amino acids similar to the concentration of those found in complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (complete or lacking single amino acid), or addition of Ac-Leu-NH₂ was performed as indicated in each experiment.

Immunoprecipitation and p70^{S6k} Assays. p70^{S6k} activity was determined by immunocomplex assay using 40 S ribosomal subunits as substrates.

Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) analysis. Jurkat cells grown in RPMI with 10% FBS were serum-starved for 48 h to synchronize the cells, and then incubated in half RPMI medium with 10% dialyzed FBS containing amino acid derivatives as indicated in each experiment. The cells were pelleted down by centrifugation, washed twice with PBS, resuspended in 500 µl of 70% ethanol and incubated on ice for 1h. They were then rewashed twice with PBS, resuspended in 100 µl of PBS containing 50 µg/ml RNase and incubated at 37 °C for 20 min. After treatment with RNase, cell were incubated in 500 µl of PBS containing 50 µg/ml Propidium Iodide for 30 min at room temperature, and then FACS analysis was performed.

Immunoblot analysis. For immunoblotting of p27, RB and α tubulin, cells were lysed with ice-cold standard lysis buffer and aliquots of the supernatants containing 25 µg of protein were separated by SDS-PAGE on 15% polyacrylamide gels, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane and immunoblotted with the appropriate antibody.

RESULTS

Leucine is Indispensable for p70^{S6k} Activation. After 2 h amino acids starvation, stimulation with the complete amino acid mixture at a concentration similar to DMEM caused 25-fold activation of p70^{S6k} activity. Stimulation with the mixture of amino acids but lacking arginine or leucine induced only weak activation of p70^{S6k}. In contrast with the strong inhibition caused by rapamycin, Ac-Leu-NH₂ only moderately inhibited p70^{S6k} activity.

Ac-Leu-NH₂ Inhibits Proliferation of Jurkat Cells and Induces G1 Arrest.

We observed that Ac-Leu-NH₂ at 20mM inhibits the proliferation of Jurkat cells. Ac-Leu-NH₂ inhibited Jurkat cells proliferation as potently as rapamycin. FACS analysis showed that this derivative inhibits cell cycle at the G1 phase similar to rapamycin. Other amino acid derivatives, Ac-Gln-NH₂, Ac-Gly-NHMe, Ac-His-NHMe, Ac-Ile-NH₂, Ac-Lys-NH₂ and Ac-Pro-NH₂, when tested at the same concentration (20 mM) of Ac-Leu-NH₂, did not cause significant inhibition of cell proliferation. So, the inhibitory effect of amino acid derivatives in this study is not due to the high concentration of the derivatives used, but due to the specific effect of Ac-Leu-NH₂.

Inhibition of Serum-induced p27 Degradation and Down Regulation of RB Phosphorylation by Ac-Leu-NH₂. Ac-Leu-NH₂ inhibits serum-induced p27 degradation and RB phosphorylation at threonine 373 and serine 807/811, similar to rapamycin.

Ac-Ala-NH₂, Ac-Met-NH₂, and Ac-Val-NH₂ also induce G1 arrest through the inhibition of p27 Degradation and RB Phosphorylation. Among several kinds of amino acid derivatives, we observed that similar to the effects of Ac-Leu-NH₂, the derivatives Ac-Ala-NH₂, Ac-Met-NH₂, and Ac-Val-NH₂ also inhibited Jurkat cell proliferation. These derivatives caused G1 and inhibited both p27 degradation and phosphorylation of RB.

DISCUSSION

In the present study, we found that the effects of Ac-Leu-NH₂ on cell cycle progression, even in the presence of medium amino acids and serum, are similar to those of rapamycin. Evidence supporting the fact that Ac-Leu-NH₂ acts on cell cycle progression as a rapamycin-like reagent is provided by the following arguments. First, Ac-Leu-NH₂ inhibits cell cycle at the G1 phase. Second, Ac-Leu-NH₂ inhibits serum-induced p27 degradation. Third, Ac-Leu-NH₂ inhibits serum-induced RB phosphorylation at threonine 373 and serine 807/811. All of these biological properties, which overlap with those of rapamycin, suggest that Ac-Leu-NH₂ appears to mediate these cellular outputs through amino acid-mTOR signaling pathways.

There are four possible targets of Ac-Leu-NH₂. First, Ac-Leu-NH₂ might act through a membrane-bound receptor. Second, Ac-Leu-NH₂ might compete with leucine for incorporation into an intracellular compartment at the level of a System L amino acid transporter. Third, recent findings using oocytes of *Xenopus laevis* have provided evidence for an intracellular location for the putative amino acid sensor in animal cells that signals increased amino acid availability to mTOR/ p70^{S6k}. Fourth, results have indicated that suppression of tRNA amino acylation is able to inhibit p70^{S6k} activity and that deacylated tRNA may act as a negative regulator of p70^{S6k}.

Finally, we found that Ac-Ala-NH₂, Ac-Met-NH₂, and Ac-Val-NH₂ inhibits cell cycle progression in the presence of medium amino acids as does Ac-Leu-NH₂. This might imply the importance of alanine, methionine, and valine for the cell cycle progression of Jurkat cells.

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1500号	氏名	Hidayat Sujuti
論文題目	Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a Leucine derivative induces G1 arrest in Jurkat cells.		
審査委員	アミノ酸-mTOR シグナル伝達経路は、ロイシンデリバティブによって阻害され、Jurkat 細胞において G1 期での停止を引き起こす		
主査	松尾雅文		
副査	米澤一仁		
副査	山下洋平		
審査終了日	平成 15年 2月 19日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

有機化合物ラパマイシンは、生体において免疫抑制作用や抗癌作用を示すことが知られている。このラパマイシンの細胞内標的蛋白質は、mTOR (mammalian target of rapamycin) という 290 kDa の巨大セリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素である。mTOR を介するシグナル伝達系は、蛋白合成、蛋白分解、細胞増殖、細胞周期などの細胞機能を制御している。mTOR が直接リン酸化し制御する下流分子としては、蛋白合成に関与する p70S6 キナーゼや eIF4E 結合蛋白質などが知られている。一方、mTOR への上流からのインプットとしては、細胞増殖因子とともに細胞環境中のアミノ酸濃度バランスが重要な働きをしている。即ち、mTOR シグナル伝達系は細胞環境中のアミノ酸濃度のセンサー的役割を果たしているといえる。

我々は、アミノ酸の中でも、ロイシンが重要な役割を果たしていることや、ラット肝癌細胞を用いた実験ではロイシンの誘導体である、アセチルロイシンアミド (Ac-Leu-NH₂) がロイシンによる p70S6 キナーゼの活性化を阻害することを報告してきた。

アミノ酸は、mTOR シグナル伝達系を活性化する一方、ラパマイシンは mTOR シグナル伝達系で活性化されるシグナル伝達系を阻害する。p70S6 キナーゼの活性化など、短時間で活性化される系においては、アミノ酸の効果を判定するのは容易であるが、細胞周期など長時間の細胞処理を要する実験系では、アミノ酸を除去するといった処理は細胞死を惹起するため、アミノ酸の効果を判定する系を確立することができていなかった。

そこで、本申請者は、アミノ酸からのインプットを上記の Ac-Leu-NH₂ で阻害し、アミノ酸の細胞増殖、細胞周期に対する効果の判定に用いることができるか検討を行なった。細胞としては、ラパマイシン感受性に細胞増殖、細胞周期が阻害されるヒト T 細胞株である Jurkat 細胞を選択した。以下に得られた結果を要約すると、

- (1) アミノ酸の混合液（培養液 DMEM に相当するアミノ酸の種類と濃度）は Jurkat 細胞において、p70S6 キナーゼを活性化し、この混合液よりロイシンあるいはアルギニンを除去すると、アミノ酸混合液の p70S6 キナーゼ活性化能は激減した。
- (2) ラパマイシンは、上記のアミノ酸混合液による p70S6 キナーゼ活性化を強力に阻害したが、Ac-Leu-NH₂ は中等度の阻害効果をみせた。
- (3) ウシ胎児血清、かつアミノ酸混合液 (DMEM の 1/2 に相当するアミノ酸濃度) 存在下で、Jurkat 細胞は増殖し、ラパマイシンあるいは Ac-Leu-NH₂ の培養液への添加は細胞増殖を同程度に強力に抑制した。
- (4) FACS を用いた細胞周期に対する効果を測定したところ、Ac-Leu-NH₂ は、ラパマイシンと同様、G1 期で細胞周期を停止させた。
- (5) 細胞周期の進行を阻害する分子 p27 の分解、逆に細胞周期の進行を促進する RB 蛋白のリン酸化、特に Thr 373 と Ser 807, 808 のリン酸化は、

アミノ酸存在下で血清により促進される。ラパマイシンはこの p27 の分解と RB のリン酸化の双方を抑制するが、Ac-Leu-NH₂ も同様の効果を示した。

以上の研究結果より、申請者は、Ac-Leu-NH₂ というロイシンの誘導体が、mTOR シグナル伝達系の阻害剤であるラパマイシンと同程度に、細胞増殖阻害・細胞周期 G1 での停止を引き起こすことを発見した。また、これら作用の分子メカニズムに関しても、Ac-Leu-NH₂ はラパマイシンと同様のメカニズムを介している可能性を示した。これらの結果は、このロイシン誘導体が長時間を要する mTOR を介した細胞機能発現におけるアミノ酸の役割を検討するとき、重要なツールとなりうることを示した。

本研究は、mTOR シグナル伝達系について、そのロイシン誘導体による調節を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつたロイシン誘導体の阻害について重要な知見を得たものであり、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。