

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06668

研究課題名(和文)細胞内アミノ酸センシング機構の研究

研究課題名(英文)Study of amino acid sensing

研究代表者

鎌田 芳彰(Kamada, Yoshiaki)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：20291891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トア複合体1(TORC1)がアミノ酸情報を感知し活性制御を受ける分子メカニズムの解明を目標に研究を行った。本研究の最大の目的は、tRNAをアミノ酸飢餓シグナルとした新規TORC1制御モデルの検証である。

私はTor1のFRBドメインがtRNAと結合することを見出した。FRBドメインはTORC1の阻害剤rapamycinが結合する部位として知られる。よって、tRNAはrapamycinと同様の作用機作によりTORC1を制御することが示唆された。そこで、tRNAとFRBドメインの結合様式の構造生物学的解析とそれを基にしたFRBドメインに変異を導入する、この2つの手法によって上記のモデルを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TORC1によるアミノ酸センシング研究において、Sabatiniが提唱する低分子量GTPase Ragを介したTORC1制御モデルが、多くの矛盾点を抱えつつも広く受け入れられている(Bar-Peled, 2013)。しかし、最近多くの疑問が国内外のTOR研究者により呈され、再考を余儀なくされている。本研究により提唱・検証された新規モデルは、TOR研究分野にパラダイムシフトを起こすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study I investigated the mechanism of Tor complex1 regulation by amino acid signaling. The goal of this study is to establish the novel model of TORC1 regulation by tRNA as an amino acid-starvation signal.

I found that tRNA binds to FRB domain of Tor1 protein. Since FRB domain is known as a rapamycin (a TORC1 specific inhibitor)- binding site, tRNA is supposed to regulate TORC1 activity in a same manner with rapamycin.

Therefore, I analyzed the tRNA-FRB binding using structural biological methods, and molecular biological methods to examine the above model.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：酵母 アミノ酸 シグナル伝達 トア複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

TORC1 によるアミノ酸センシング研究において、Sabatini が提唱する低分子量 GTPase Rag を介した TORC1 制御モデルが、多くの矛盾点を抱えつつも広く受け入れられている (Bar-Peled, 2013)。しかし、最近多くの疑問が国内外の TOR 研究者により呈され、再考を余儀なくされている。Sabatini モデルの最大の欠陥は、アミノ酸を感知するのが Leu, Arg センサーだけで、多岐に亘るアミノ酸の個別的センシングが全く説明できないことである (鎌田 2016, 鎌田 2017)。本研究はこの従来モデルに挑戦し、TOR 研究分野にパラダイムシフトを起こして矛盾のない新規モデルを世に問うべく計画された。

#### 2. 研究の目的

本研究において、私はアミノ酸センシングの中核であるプロテインキナーゼ、トア複合体 1 (TORC1) がアミノ酸情報を感知し活性制御を受ける分子メカニズムの解明を目標に研究を行っている。本研究の最大の目的は、現在提唱している tRNA をアミノ酸飢餓シグナルとした新規 TORC1 制御モデルの検証である。

#### 3. 研究の方法

私は Tor1 の FRB ドメインが tRNA と結合することを見出した。FRB ドメインは TORC1 の阻害剤 rapamycin が結合する部位として知られる。よって、tRNA は rapamycin と同様の作用機作により TORC1 キナーゼ活性をブロックしていることが示唆された。そこで、(1)tRNA と FRB ドメインの結合様式の構造生物学的解析と(2)それを基にした FRB ドメインおよびその近傍に変異を導入する、この 2 つの手法によって tRNA が結合しにくい TORC1 を作製し、それをもって上記のモデルを実証することとした。

#### 4. 研究成果

(1)微生物化学研究所・野田展生博士との共同研究により、tRNA-FRB 結合の構造生物学的解析を行い、tRNA は FRB に結合することが確認された。加えて、tRNA-FRB 結合様式は rapamycin-FRB 結合とほぼ同様であることも判明した。これにより、上記の仮説、tRNA は rapamycin と同様の作用機作により TORC1 キナーゼ活性をブロックしていること、人工的な阻害剤 rapamycin と違い、tRNA は細胞にとって生理的な TORC1 活性制御因子であることが強く示唆された。また、哺乳動物 FRB をもちいた実験においてもゲルシフトアッセイにより tRNA-FRB 結合が確認されたため、tRNA による TORC1 制御機構が真核生物に広く保存されることが推測される。更に、rapamycin-m(mammalian)TORC1 の構造はクライオ電顕によって解かれており、rapamycin は FRB と TORC1 コンポーネントの 1

つ raptor によりできたポケット様構造に嵌まるように結合している。それを tRNA-TORC1 結合に当てはめてみると、rapamycin 同様、tRNA も FRB と Kog1 (酵母 raptor ホモログ) のポケットに嵌まるように結合することが推測された。

(2) 続いて、(1) から得られた tRNA-TORC1 結合想像図を基に、tRNA 結合に必要であると推測される正の電荷を持つアミノ酸残基 (K, R, H) に変異を入れた。4 カ所のアミノ酸残基に変異を入れた FRB ドメインはゲルシフトアッセイにより tRNA 結合能が失われていることが解った。さらに Kog1 の tRNA 結合に関与すると推測される 3 カ所のアミノ酸残基にも変異を入れ、変異 TORC1 を作製した。これを酵母細胞で発現させその表現型を観察したところ、窒素源飢餓に応答した TORC1 不活性化に著しい遅延が見られた。これは、tRNA をアミノ酸飢餓シグナルとした TORC1 制御モデルを大きく支持する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsubo Yoko, Kamada Yoshiaki, Yamashita Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Links between TORC1 and Traditional Non-Coding RNA, tRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 956 ~ 956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11090956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekiguchi Takeshi, Ishii Takashi, Kamada Yoshiaki, Funakoshi Minoru, Kobayashi Hideki, Furuno Nobuaki	4. 巻 598
2. 論文標題 Involvement of Gtr1p in the oxidative stress response in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 107 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.016	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鎌田芳彰
2. 発表標題 出芽酵母トA複合体1とtRNAの相互作用の解析
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田芳彰
2. 発表標題 トA複合体1によるアミノ酸センシングの新規モデル
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌田芳彰
2. 発表標題 tRNAによるトア複合体1の制御機構解明の試み
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田芳彰
2. 発表標題 トア複合体1を介したアミノ酸センシング機構の新規モデル
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松浦 彰  (Matsuura Akira)  (10272692)	千葉大学・大学院理学研究院・教授    (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------