

令和 6 年 4 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06555

研究課題名(和文)細胞内グルタミンセンサーは“特異的で弱い結合”をどのように達成しているのか

研究課題名(英文)How does an intracellular glutamine sensor achieve "specific and weak binding to glutamine?"

研究代表者

谷川 美頼 (Tanigawa, Mirai)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：50553658

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)：本研究により、Pib2が細胞内のグルタミン濃度を検知して代謝制御のマスターレギュレーターであるTORC1の活性をコントロールする分子メカニズムの詳細を明らかにすることができた。Pib2の、グルタミン検知、TORC1結合、TORC1の活性化、を担う領域をそれぞれ明らかにし、さらに、Pib2はグルタミンと結合することでわずかにフォールディング状態を変化させることを見出した。これらの結果からPib2のグルタミンと結合したことで引き起こされるわずかなフォールディング状態の変化によりPib2-TORC1結合が誘導され、TORC1が活性化されるというモデルを提唱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により「天然変性タンパク質が高濃度の細胞内メタボライトを特異的に検知し、代謝制御のハブとなる因子を直接に制御する」という新たな代謝制御機構のモデルを提示することができた。Pib2がTORC1を活性化するメカニズムを利用して、人為的にTORC1活性を制御し、代謝をコントロールする方法開発の新たな基盤を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：This study provides molecular mechanism of how Pib2 senses intracellular glutamine levels and controls the activity of TORC1, a master regulator of metabolic control. We elucidated the regions of Pib2 responsible for glutamine sensing, TORC1 binding, and TORC1 activation, respectively. Furthermore, we found that Pib2 does not undergo major conformational changes in the presence of high concentrations of glutamine, although, folding state of Pib2 changes slightly in a glutamine-specific manner. These results suggest a model in which Pib2-TORC1 binding is induced by a slight change in the folding state of Pib2 induced by glutamine binding.

研究分野：細胞生物学

キーワード：TORC1 アミノ酸 センサー 代謝制御 ラパマイシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ複合体である TORC1 は、栄養によって活性化され、同化反応の促進と異化反応の抑制を行う代謝のマスターレギュレーターである。TORC1 下流の代謝制御機構の理解が進んできた一方で、TORC1 上流の栄養センサーについては十分にわかっていない。我々は酵母を用いた研究で、細胞内グルタミン特異的に TORC1 を活性化する経路が存在すること、さらにこの活性化に必須な因子が、液胞膜タンパク質 Pib2 のみであることを見出した。このことより、Pib2 が TORC1 を直接活性化する細胞内グルタミンセンサーであることが示唆されていたが Pib2 がどのようにグルタミンを検知して TORC1 の活性化を導くのかについては不明であった。

2. 研究の目的

グルタミンの細胞内濃度は数 mM ~ 数十 mM と非常に高い。そのため、細胞内グルタミン濃度の増減を検知し、適切に応答するためには、グルタミンセンサーの解離定数は mM オーダーでなければならない。一方、Pib2 による TORC1 の活性化はグルタミンに特異的で、他のアミノ酸では活性化できない。したがって、Pib2 がグルタミンセンサーであるならば、Pib2 とグルタミンの結合は「特異的でありながら弱い」はずである。本研究は、Pib2 がグルタミンに対してどのように「特異的でありながら弱い」結合を達成するのか、さらにグルタミンと結合したことによりどのように TORC1 を活性化するのか、その分子メカニズムの解明を目指した。そのために以下を明らかにすることを目的とした。

Pib2-グルタミン結合の物理的特性
Pib2 のグルタミン結合による構造変化
Pib2 と TORC1 結合の、両者の結合部位
Pib2 が持つ天然変性領域 (IDR) の役割

3. 研究の方法

Pib2 とグルタミンの物理的相互作用の検出

Pib2 とグルタミンの結合の解離定数は mM オーダーであることが予想され、実際に一般的な相互作用検出法によるその検出は困難であった。そこで、DSC (示差走査熱量計) による熱安定性の評価や、CD (円偏光二色性) スペクトルの測定により、Pib2 のグルタミン結合時におこる変化を検出した。また、Pib2 の欠失変異体を作成して上記の実験を行い、グルタミン結合領域の同定を試みた。

Pib2 のグルタミン結合による構造変化

グルタミンとの結合により Pib2 がどのような構造変化を起こすのかを明らかにするために大腸菌より組換えタンパク質として Pib2 を精製することを試みた。しかし Pib2 が天然変性タンパク質であることから、容易に沈殿、分解されてしまい Pib2 単体での精製は困難であった。そこで TORC1 の構成因子の一つ Kog1 に Pib2 を融合させた Kog1-Pib2 キメラ分子を酵母内で発現させることで TORC1-Pib2 キメラ分子の精製を試みた。

Pib2-TORC1 結合部位の同定

すでにグルタミンに応答した Pib2-TORC1 結合の検出に成功していたので、Pib2 変異体 (切断変異、点変異) と TORC1 の結合を観察し、Pib2 側の TORC1 結合部位を同定することを試みた。

Pib2 の活性化型変異体の単離

PIB2 遺伝子にランダムに変異を導入し、ラパマイシン耐性を示す酵母をスクリーニングすることで活性化型 *PIB2* の単離を行った。

Pib2 の天然変性領域 (IDR) 欠失変異体の解析

Pib2 とグルタミンの結合が弱いことの原因が、IDR による Pib2 の構造のゆらぎにあるのであれば、Pib2 の IDR を欠失させればグルタミンとの結合が強まるはずである。IDR の段階的欠失変異体を作成し、Pib2 が持つ IDR の長さ、Pib2 による TORC1 の活性化の強度に相関がみられるのか観察した。

4. 研究成果

Pib2 とグルタミンの物理的相互作用の検出と Pib2 のグルタミン結合による構造変化

CD 解析により、グルタミンが高濃度に存在しても Pib2 の構造は大きく変化しなかった。一方で DSC 解析の結果より、Pib2 のフォールディング状態はグルタミン特異的にわずかに変化することを明らかにした。つまり Pib2 はグルタミンと結合すること、またその結合によりわずかに構造変化を起こすことが明らかになった。さらに Pib2 のグルタミンとの結合に必要な領域は Pib2 中央の E モチーフから FYVE ドメインまでの領域であることを明らかにすることに成功した。この領域は菌類のオルソログで保存されているだけでなく、植物 FYVE1 にも保存されていることを見出した。そこでシロイヌナズナを用いた解析を行い、FYVE1 と TORC1 の結合がグルタミンによって誘導されることを明らかにした。このことはグルタミン検知機構が進化的に保存された機構であることを示唆している。

また構造解析に供する試料をえるために Kog1-Pib2 キメラ分子を酵母内で発現させて TORC1-Pib2 キメラ分子の精製に成功した。この精製 TORC1 キメラは試験管内でグルタミンにより活性化されたことから、精製キメラは Pib2、TORC1 とともに活性を有することが証明された。TORC1 キメラ分子でおこる Pib2 及び TORC1 の構造変化を観察するために、現在 Prof.Loewith(ジュネーブ大学)との共同研究によりクライオ電子顕微鏡による構造解析を進めている。

Pib2-TORC1 結合部位の同定と Pib2 の活性化型変異体の単離

Pib2 の TORC1 結合領域は Pib2 内の E モチーフと tail モチーフであることを明らかにした。E モチーフはグルタミンに応答した TORC1 との結合を担っていた。tail モチーフはグルタミン依存的な TORC1 との結合には必要でないが TORC1 の活性化に必須であった。

さらにスクリーニングで得られた活性化型 *PIB2* の責任変異は tail モチーフ内の変異であった。実際に試験管内で tail モチーフに変異をもつ活性化型 Pib2 は TORC1 活性化能が亢進していた。これらの結果より tail モチーフが TORC1 の活性化を担うことを明らかにした。

Pib2 の天然変性領域 (IDR) 欠失変異体の解析

Pib2 の主に IDR よりなる N 末端側を大きく欠いた変異体においても、野生型 Pib2 と同様のグルタミン検知能を有することが明らかとなった。一方でこの変異体は野生型 Pib2 より強い TORC1 活性化能を有していた。よって IDR はグルタミン検知ではなく Pib2 活性を抑制する機能があることが示された。

本研究により、Pib2 がグルタミンと結合すること、その結合により引き起されるわずかな構造変化により Pib2 が E モチーフを介して TORC1 と結合し、tail モチーフによる TORC1 の活性化を引き起こすという、グルタミンセンシングから TORC1 の活性化に至るまでの詳細なメカニズムを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Tanigawa Mirai, Yamamoto Katsuyoshi, Nagatoishi Satoru, Nagata Koji, Noshiro Daisuke, Noda Nobuo N., Tsumoto Kouhei, Maeda Tatsuya	4. 巻 4
2. 論文標題 A glutamine sensor that directly activates TORC1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02625-w	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷川美頼、磯野江利香、前田達哉
2. 発表標題 FYVE1 is involved in glutamine-responsive TORC1 activation in Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷川美頼
2. 発表標題 細胞内の栄養、どうやって感じてる？
3. 学会等名 第24回酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷川美頼
2. 発表標題 The GATOR2 activity is essential for release from the Gtr complex mediated TORC1 suppression under respiratory conditions.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川美頼
2. 発表標題 酵母グルタミンセンサーは、TORC1を直接活性化する
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷川美頼、山本 勝良、長門石 暁、津本 浩平、能代 大輔、野田 展生、永田 宏次、前田 達哉
2. 発表標題 Pib2 is a glutamine sensor that directly activates TORC1 that directly activates TORC1
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川美頼、外山美奈、前田達哉
2. 発表標題 TORC1-Gtr経路の新規上流因子の同定を目指したスクリーニング
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川美頼、亀井理恵、館川宏之、前田達哉
2. 発表標題 RNAヘリカーゼDed1, Dbp1によるTORC1活性制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川美頼、山本 勝良、長門石 暁、津本 浩平、能代 大輔、野田 展生、永田 宏次、前田 達哉
2. 発表標題 Pib2 is a glutamine sensor that directly activates TORC1
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷川美頼、山本 勝良、長門石 暁、津本 浩平、能代 大輔、野田 展生、永田 宏次、前田 達哉
2. 発表標題 Pib2は TORC1 を直接活性化する細胞内グルタミンセンサーである
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷川美頼、外山美奈、前田達哉
2. 発表標題 Gtr経路を介してTORC1を活性化するアミノ酸センサーのスクリーニング
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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			
スイス	ジュネーブ大学			