

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19067

研究課題名（和文）セリン代謝の化学遺伝学的解析

研究課題名（英文）Chemical genetics for understanding serine metabolism

研究代表者

西村 慎一（Nishimura, Shinichi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・講師

研究者番号：30415260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは分裂酵母をモデルとして用いた実験系において免疫抑制剤がセリン資化を抑制することを見出しており、本研究ではこの現象を分子レベルで明らかにすることを目的として行った。その結果（1）放射性同位体標識アミノ酸を用いたアミノ酸取り込みの解析とメタボローム解析によりFKBP12阻害がセリンやスレオニンの代謝を抑制すること、（2）遺伝学的スクリーニングによりFKBP12の下流因子がスレオニンデアミナーゼであること、（3）生化学的試験によりFKBP12がスレオニンデアミナーゼを抑制することなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スレオニンデアミナーゼはスレオニンを基質として脱アミノ化を行い、生成した α -ケト酪酸はイソロイシンの原料として用いられる。本酵素は最終産物であるイソロイシンによりフィードバック阻害を受けることは古くから知られていたが、そのほかの抑制機構は知られていなかった。本研究ではスレオニンデアミナーゼが免疫抑制剤の細胞内標的でもあるFKBP12により抑制されることを世界で初めて明らかにしており、学術的に重要な結果が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We previously found that immunosuppressants, whose cellular target is FKBP12, inhibit the growth of the fission yeast in a medium supplemented with serine as a sole nitrogen source. The purpose of this research is to unveil the molecular mechanism of the action of immunosuppressants regarding the serine catabolism in the fission yeast. In this study we unveiled (1) FKBP12 inhibits catabolism of serine or threonine; (2) genetic screening suggested that threonine deaminase is the downstream factor of FKBP12; and (3) biochemical analyses showed that FKBP12 suppresses threonine deaminase. It is well known that threonine deaminase is inhibited by isoleucine, the end product of the biosynthetic pathway, which is called feedback regulation. This study unveiled that FKBP12 is a new factor that suppresses threonine deaminase.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アミノ酸 セリン 化学遺伝学 免疫抑制剤 ケミカルバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を構成するアミノ酸の一つであるセリンは様々な代謝を受ける。脂質の原料となり、脱アミノ化によりピルビン酸に変換されると TCA 回路に入り、一炭素代謝によりメチル基やホルミル基を提供し、プリン塩基の合成にも用いられる。このようなマルチプレーヤーであるセリン代謝は、近年にはがんや病原性細菌の増殖においても重要な役割を持つことが示され、その代謝機構の理解と制御手法の開発が期待されている。

申請者らはセリン代謝経路の解明と化合物による制御方法の開発を目的として、分裂酵母をモデル生物としたセリンの資化を抑制する化合物のスクリーニングを行い、免疫抑制剤 FK506 と抗腫瘍化合物としても用いられる rapamycin がセリンの資化を選択的に抑制することを見出した。免疫抑制剤として広く使われている FK506 は、FKBP12 タンパク質と結合して複合体を作り、それがカルシニューリンの機能を抑制することでサイトカインの発現を抑制する。Rapamycin も FKBP12 に結合するが、その複合体は mTORC1 に結合・阻害することで T 細胞やがん細胞の増殖を阻害する。そこで FKBP12 に結合するが細胞増殖抑制や免疫抑制を示さない合成リガンド SLF の作用を検討したところ、期待通り、しかし驚くべきことに、SLF はセリンの資化を特異的に阻害した。重要なことに、FKBP12 の欠損株はセリン資化能が著しく低下した。FKBP12 によるセリン代謝の制御に関する報告はなく、その分子メカニズムに興味をもたれた。

2. 研究の目的

本研究は、FK506 や Rapamycin、SLF の標的分子である FKBP12 が制御するセリン資化の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。細胞増殖に重要な因子セリンの新しい代謝制御機構を明らかにし、同時に、世界中で使用されている免疫抑制剤および抗がん剤の新しい作用メカニズムの解明につなげたい。

3. 研究の方法

(1) セリン資化関連遺伝子の探索：FKBP12 をコードする遺伝子の破壊株は、セリンの資化能が劇的に低下する。FKBP12 の下流因子の破壊株も、FKBP12 破壊株と同じ表現型を示すと考えられる。そこで分裂酵母の遺伝子破壊株コレクションを用い、セリン資化能が低下する遺伝子破壊株を探索する。ここでは KEGG パスウェイでセリン代謝経路にアサインされている遺伝子群を対象にする。

(2) セリン代謝の生化学・細胞生物学的解析：セリンの資化は活性酸素種 (ROS) の発生を招き、それがアクチン繊維を損傷する。そこでセリン資化による ROS の産生、ミトコンドリアの活性、アクチン繊維などの細胞骨格の形態を生化学的・形態学的に解析する。次にこの表現型が FKBP12 や (1) で同定される遺伝子の破壊により受ける影響を評価する。

(3) FKBP12 阻害剤によるセリン代謝阻害機構の解析：(1) および (2) で明らかになるセリン代謝機構への FKBP12 阻害剤の影響を試験する。遺伝子破壊株では代償経路が働く可能性が十分にあるため、化合物処理による FKBP12 の基質タンパク質や下流タンパク質の活性や発現量、細胞内局在を慎重に精査し、FKBP12i によるセリン資化抑制メカニズムを解明する。

4. 研究成果

FKBP12 の下流で働く分子を明らかにするために、遺伝子破壊株や遺伝子発現低下株を用いた遺

伝学スクリーニングと、細胞内の代謝物を一斉検出するメタボローム解析を行った。するとスレオニンデアミナーゼをコードする *tda1* 遺伝子の発現抑制によりセリン培地で特に細胞増殖が抑制されること、FKBP12 の阻害剤により細胞内のスレオニンの蓄積量が変化することが明らかとなり、Tda1 タンパク質が FKBP12 によって調節されるタンパク質である可能性が示唆された。Tda1 はイソロイシンの生合成経路で最初に働く酵素で、*tda1* 遺伝子の発現を強力に抑制するとイソロイシンを合成できず、通常の培地でもイソロイシンがないと細胞が増殖できなくなる。ところが、*tda1* 遺伝子の発現を抑制しても FKBP12 のノックアウトや FKBP12 阻害剤の処理により細胞増殖抑制があまり見られなくなること、FKBP12 をノックアウトした細胞では Tda1 の酵素活性が上昇することが明らかとなり、FKBP12 が Tda1 の酵素活性を抑えていることが示された。

Tda1 はスレオニンを基質として α -ケト酪酸を合成し、それがイソロイシン合成の基質になる。これまでにイソロイシンが Tda1 タンパク質の活性をフィードバック阻害することや、イソロイシンと似たアミノ酸であるバリンがこのフィードバック阻害を解除することが知られていたが、本研究により Tda1 はさらに FKBP12 によってブレーキが掛けられていることが明らかになった（図 1、図 2）。FKBP12 による Tda1 の抑制に関して、その分子機構の解明は次の課題である。他の真菌類でもスレオニンデアミナーゼが FKBP12 により同様の機能抑制が行われているのかも興味深い点である。これらを解明することによって、ヒトには存在しない Tda1 が真菌の増殖を特異的に抑制するための新たな治療薬ターゲットになることが期待できる。

ところで本研究はセリン代謝の解明を目的に開始し、結果的にはスレオニンやイソロイシンの代謝経路の制御機構の解明に至った。セリンに関しては実は矛盾した結果が得られている。すなわち、FKBP12 はセリンの脱アミノ化も行うことが出来る Tda1 を抑制することから、FKBP12 が阻害されれば、細胞はよりセリンを資化できるはずである。しかし実際には、FKBP12 を阻害するとセリンの資化も阻害されている。これには代謝に関する予想しない分子機構が関与しているはずであり、この機構の解明も次の興味深い課題である。

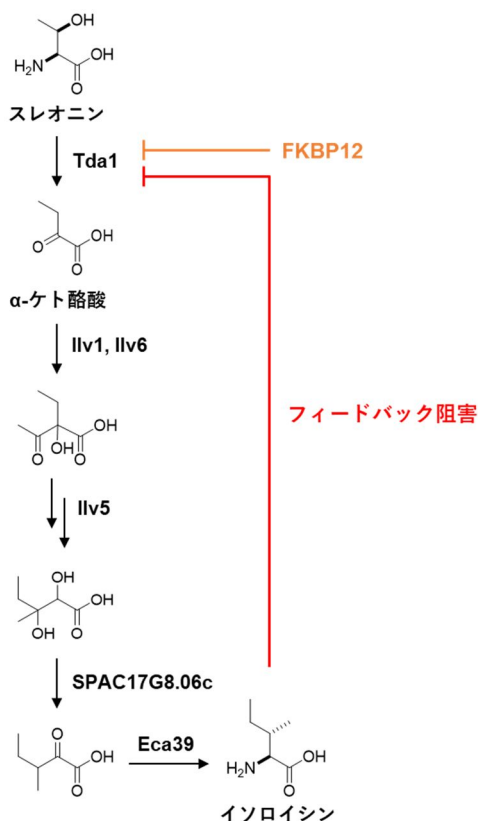


図 1. イソロイシンの生合成経路。スレオニンを出発原料として合成され、最初にはたらく酵素であるスレオニンデアミナーゼ Tda1 は最終産物であるイソロイシンによりフィードバック阻害を受ける（赤）。本研究では Tda1 がさらに FKBP12 により抑制されることを見出した（橙）。

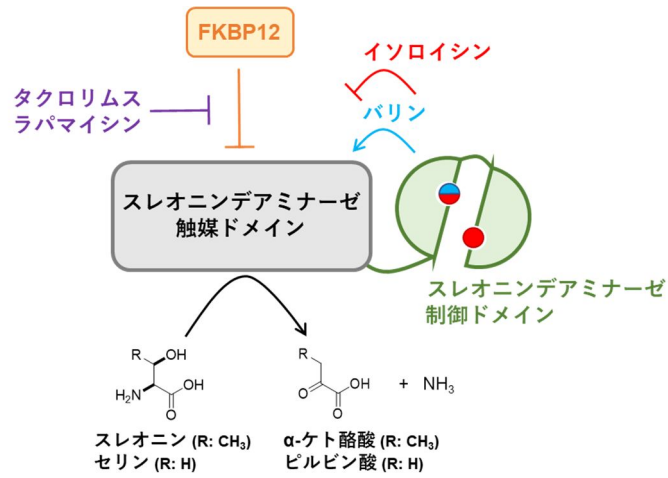


図2. スレオニンデアミナーゼ Tda1 の機能制御。スレオニンデアミナーゼ Tda1 は触媒ドメイン（グレー）と制御ドメイン（緑）から構成され、触媒ドメインがスレオニンやセリンの脱アミノ化反応を担う。制御ドメインにはイソロイシンやバリンが結合し、触媒活性の阻害や促進を行う。FKBP12（橙）は本研究によって新たに見いだされた抑制因子である。その阻害様式は未解明であり、今後の検討課題である。

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 Sasaki Mayuki, Nishimura Shinichi, Yashiroda Yoko, Matsuyama Akihisa, Kakeya Hideaki, Yoshida Minoru	4. 巻 25
2. 論文標題 FK506-binding protein, FKBP12, promotes serine utilization and negatively regulates threonine deaminase in fission yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105659 ~ 105659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.105659	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木舞雪、西村慎一、松山晃久、八代田陽子、掛谷秀昭、吉田稔。
2. 発表標題 FKBP12によるセリン・スレオニン代謝制御の化学遺伝学的解析。
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 佐々木舞雪、西村慎一、松山晃久、八代田陽子、掛谷秀昭、吉田稔。
2. 発表標題 分裂酵母におけるセリン代謝制御機構の化学遺伝学的解析。
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

〔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
---------	---------