

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20731

研究課題名（和文）タンパク質飢餓への適応を可能とするチロシンセンシングの分子機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of tyrosine sensing for adaptation to protein scarcity

研究代表者

小坂元 陽奈（Kosakamoto, Hina）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50962908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アミノ酸の一つであるチロシンをショウジョウバエが認識し、その欠乏に適応するメカニズムの解明を目指した。未知のチロシン感知機構の解明のため、チロシンに結合することが予測された核内受容体に着目し、リガンド結合解析や生理的機能の解析を介して、チロシン応答に対する寄与を明らかにした。また、哺乳類細胞を用いたスクリーニングにより、新たにスプライシングファクターがチロシン感知に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでほとんど知られてこなかった生体内でのアミノ酸認識から端を発する栄養応答機構について、新たな知見を得ることができた。栄養応答の破綻は代謝疾患やがんの悪性度、老化といった広範な生理状態あるいは病態に影響を及ぼす。重要性が見過こされていたチロシンという非必須アミノ酸が持つ、隠れた生理作用やその作用機序の解明は、健康長寿社会の実現に資する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to elucidate the mechanism by which *Drosophila melanogaster* recognizes tyrosine, one of the amino acids, and adapts to its deficiency. To unravel the unknown tyrosine-sensing mechanism, I focused on a nuclear receptor predicted to bind to tyrosine and elucidated its contribution to tyrosine response through ligand binding assay and analysis of physiological functions. Furthermore, screening using mammalian cells revealed the potential involvement of a splicing factor in tyrosine sensing.

研究分野：分子栄養学

キーワード：栄養応答 アミノ酸感知 チロシン ショウジョウバエ 核内受容体 スプライシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は生命の根元であり、その感知は生存のために必要不可欠である。アミノ酸の摂取制限（すなわち食餌中タンパク質制限）は細胞に飢餓応答を引き起こし、同化・異化バランスを大きく異化の方へと傾ける。しかしそれは、単に身体を構成する原料（building block）としてのアミノ酸の減少によるものではなく、アミノ酸の不足を「感知し、伝達し、応答する」一連の「アミノ酸センシング」機構が発動し、栄養シグナルを惹起することによる。異なる物性を持つ 20 種類のアミノ酸は、それぞれ異なる生体応答をもたらす。すなわち、タンパク質制限で見られるような身体の飢餓応答は、実際には個々のアミノ酸が組織ごとに異なる栄養シグナルを誘導した結果の統合であると考えられる。しかし、どのアミノ酸が、どの組織に、どのようなセンシング機構を介して、栄養欠乏シグナルを惹起するかは全容は不明である。中でも食餌から摂取しなければならない必須アミノ酸に比べて、体内での生合成が十分可能だとされている「非必須アミノ酸」はその必要性が見過ごされており、生体にもたらす効果とそのメカニズムの解明は大きく立ち遅れている。当研究室でのこれまでの研究から、ショウジョウバエにおいて非必須アミノ酸であるチロシンが体内で欠乏すると、不利な栄養環境での適応的成長に重要な種々の飢餓応答が誘導されることを見出していた。チロシン制限が惹起する飢餓応答を制御する転写因子として ATF4 を同定しているが、その活性化は古典的経路を介さないことが明らかとなった。

2. 研究の目的

チロシン欠乏による ATF4 の活性化は哺乳類細胞でも共通してみられることから、チロシンセンシングは生物種を超えて保存された新規の栄養応答機構である可能性が高い。本研究課題では、ショウジョウバエと哺乳類培養細胞を用いて、センサー候補因子の機能解析や、網羅的スクリーニングを介して、チロシンセンシングに端を発する適応的飢餓応答の新規の分子機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究での戦略は、チロシンセンサーとしての可能性を見出した核内受容体の ATF4 活性化への寄与を検証し、機能解析を行うとともに、チロシンセンシングに関与する因子をスクリーニングによって網羅的に探索するというものである。核内受容体の関与の検証にはショウジョウバエ遺伝学に加え、生化学的手法を融合させることで詳細な機能解析を試みた。また、ノンバイアスに哺乳類細胞を用いた siRNA スクリーニングも行い、チロシンがもたらす栄養応答メカニズムの全貌解明を目指した。

(1) チロシンセンシングにおける核内受容体の寄与の検討

チロシン制限時のトランスクリプトーム解析に対する転写因子予測解析から、ATF4 の他に一つの核内受容体もチロシンセンシングへの関与が示唆された。このリガンドが不明なオーファン受容体をノックダウンするだけで ATF4 の活性化が見られたため、これが抑制性の ATF4 制御因子である可能性が浮上した。さらに *in silico* での解析により、当該核内受容体がチロシンと結合しうることも見出していた。しかしこの受容体が実際にチロシンと結合し、かつ ATF4 活性を制御しうるかは定かではなかった。そこで、核内受容体-ATF4 相互作用について、蛍光レポーターを用いて検証するとともに、マイケルスケール熱運動の変化を指標とした生化学的なチロシン結合アッセイを行い、当該核内受容体を介したチロシンセンシングの可能性について詳細に解析した。また、*in silico* で予測された核内受容体のチロシン結合部位に CRISPR-Cas9 法を用いて点変異を導入し、チロシンの結合が栄養シグナル制御に必要であるかを検証した。さらに、当該核内受容体のノックダウンや点変異導入個体を使用することにより ATF4 活性化時に見られるような表現型（翻訳抑制・mTOR シグナル抑制・摂食量増加）が再現するか検討した。

(2) 3T3-L1 細胞での siRNA スクリーニングと、ショウジョウバエ相同遺伝子の機能解析

一方で当該核内受容体の関与が明確に示されない場合も想定し、網羅的に ATF4 制御因子を探索するため、ATF4 応答性レポーターを導入したマウス 3T3-L1 細胞を用いて全遺伝子に対する siRNA スクリーニングを実施した。本スクリーニングでは、チロシン制限しているにも関わらず ATF4 応答性レポーターの蛍光が上昇しなくなる siRNA 標的遺伝子を探索していった。これらの候補因子を二次スクリーニング再び別の siRNA でノックダウンし、ロイシン制限や ER ストレス誘導との比較を行い、チロシン制限に特異的な感知機構に関与するかを検証した。また、哺乳類細胞で同定した新規 ATF4 活性化候補因子については、その相同遺伝子をショウジョウバエ脂肪体で遺伝学的に操作し、ATF4 レポーターや飢餓耐性の変化を検証することで、速やかに *in vivo* での機能解析を行った。

4. 研究成果

着目している核内受容体のリガンド結合部位に点変異を導入、あるいは脂肪体特異的にノックアウトしたショウジョウバエを用いて、チロシン制限に関係する表現型の変化を捉えるため、成虫の寿命、摂食応答、飢餓耐性、代謝制御、生殖能力などを解析した。予想に反して、変異体においてチロシン欠乏の表現型が大きく回復することはなかった。ただし、ATF4 レポーター蛍光については、点変異導入やノックアウトにより低タンパク質餌へのチロシン添加における ATF4 活性抑制効果が弱まることを見出された (図 1)。したがって、当該受容体がチロシン存在下での ATF4 抑制に関与していることが示唆された。また、本受容体は、*in vitro* におけるチロシンとの結合アッセイ (マイクロスケール熱運動を用いた手法) においては、ゆるやかに結合すること、*m*-チロシンに対しては結合しないこと、点変異を入れると結合しないことなどが明らかとなった (図 2)。これらの結果から、当該核内受容体は *L*-チロシンと結合することで ATF4 に対して抑制性の作用を持つ因子であることが予想された。

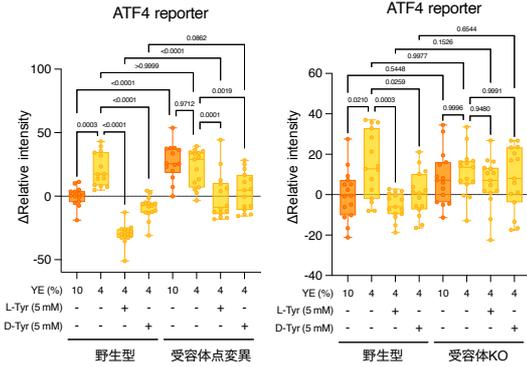


図1 受容体への点変異やノックアウトによるATF4レポーター活性の変化

核内受容体と ATF4 が直接的に相互作用するかを検証するため、ATF4 に緑色蛍光タンパク質 (Venus) の N 末端側、核内受容体に C 末端側のタグを結合させたものを脂肪体で過剰発現し、Venus タンパク質の再構築による蛍光が生じるか検証した。しかしこの実験では蛍光は観察されなかったため、核内受容体は ATF4 に直接結合するのではなく、間接的な機構によって ATF4 活性を制御することが推定された。

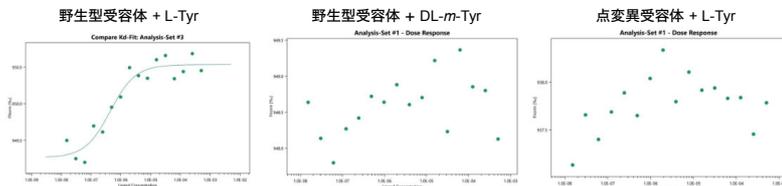


図2 リガンド-受容体結合アッセイ (マイクロスケール熱運動アッセイ)

哺乳類細胞 (マウス前脂肪細胞 3T3-L1) を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングでは、チロシン制限によって活性化される ATF4 活性が siRNA 処理によって抑制されるものを探索した。一次スクリーニングの結果、いくつかのスプライシングファクターのノックダウンによって ATF4 活性が抑制されることが見出された (図 3)。また、同細胞を用いた RNA シーケンシング解析の結果、チロシン制限有無によって、イントロン保持といったスプライシングイベントに変化があることが見出された。スプライシングファクターの一つをノックダウンするだけでチロシン制限での mRNA 発現の変化が大幅に抑制されたことなどを合わせて考えると、スプライシングファクターによる転写制御がチロシン制限感知に主要な役割を果たしていることが示唆された。

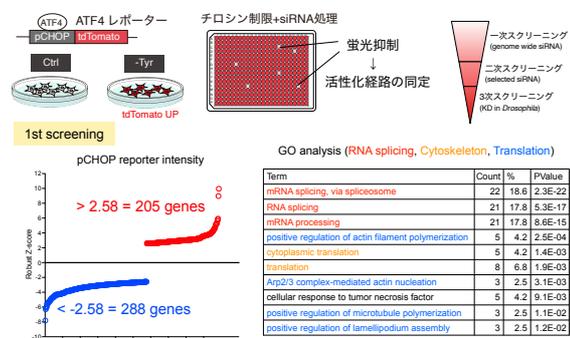


図3 哺乳類細胞でのATF4活性化機構解明戦略と一次スクリーニング結果

一方で、二次スクリーニングでロイシン制限や ER ストレスにおけるスプライシングファクターの寄与を検証したところ、これらのストレス応答による ATF4 活性化にもスプライシングファクターが重要であることが見出された。したがって、チロシン特異的なセンサーとは言えないものの、新たな ATF4 活性化機構としてスプライシングファクターの寄与を明らかにすることができた。スプライシングファクターは ATF4 自体の発現には大きく影響しなかったことから、翻訳後の ATF4 活性を変化させるような因子であることが想定される。またショウジョウバエにおいても、スプライシングファクターのノックダウンで ATF4 レポーター蛍光が抑制されること (図 4) や、チロシン制限による表現型の一つである飢餓耐性の向上が抑制されることがわかった。

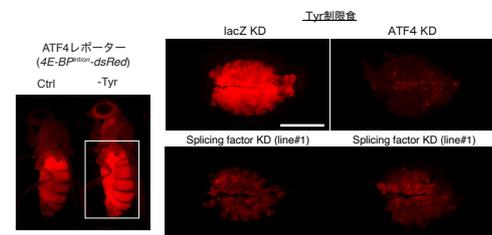


図4 ショウジョウバエでのスプライシングファクターKDによるATF4活性抑制

以上の結果から、アミノ酸欠乏時において、核内受容体やスプライシングファクターを介した新たなストレス応答機構が存在する可能性が見出された。

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 0件）

1. 著者名 Kosakamoto Hina, Okamoto Naoki, Aikawa Hide, Sugiura Yuki, Suematsu Makoto, Niwa Ryusuke, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to protein restriction in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 944 ~ 959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42255-022-00608-7	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kosakamoto Hina, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Epidermal tyrosine catabolism is critical for metabolic homeostasis and survival against high-protein diets in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.04.20.537645	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hina Kosakamoto, Naoki Okamoto, Ryusuke Niwa, Masayuki Miura, and Fumiaki Obata
2. 発表標題 Adaptive responses to protein restriction governed by nonessential amino acid tyrosine in <i>Drosophila</i> larvae
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hina Kosakamoto, Naoki Okamoto, Ryusuke Niwa, Masayuki Miura, and Fumiaki Obata
2. 発表標題 Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to dietary protein intake in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hina Kosakamoto, Naoki Okamoto, Ryusuke Niwa, Masayuki Miura, and Fumiaki Obata
2. 発表標題 Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to dietary protein intake in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 Sensing of the non19th International Congress of Developmental Biology-essential amino acid tyrosine governs the response to dietary protein intake in <i>Drosophila</i> (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小坂元 陽奈
2. 発表標題 チロシン感知が可能とするタンパク質飢餓をしのぐ適応応答
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 Hina Kosakamoto, Naoki Okamoto, Ryusuke Niwa, Masayuki Miura, and Fumiaki Obata
2. 発表標題 Tyrosine sensing regulates adaptation to changing protein environments in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 Mechanisms of Metabolic Signaling (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小坂元 陽奈
2. 発表標題 非必須アミノ酸チロシンの感知による栄養シグナル制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------