様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ２７ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：１８Ｋ０６１１１

研究課題名（和文）細胞成長を司るTORC1の活性化を誘導するアミノ酸感知システムの包括的理解

研究課題名（英文）Towards a comprehensive understanding of the amino acid-sensing system that induces activation of TORC1 that controls cell growth

研究代表者
荒木　保弘（Araki, Yasuhiro）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：６０３４５２５４

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）：栄養源に応じた増殖と成長の制御因子としてのTORC1の機能は真核生物において進化的に保存されている。一方で栄養素によるTORC1の活性化機構、リン酸化酵素TORC1の基質の同定、という最も重要な課題が残っている。生化学的解析と細胞生物学的解析を組み合わせることにより、セリン合成経路の第一段階を触媒する酵素をTORC1相互作用因子として同定した。さらにTORC1が増殖に必要な細胞内セリン濃度の維持に必要であること、この酵素は活性化経路特異的なTORC1の基質であることを見出した。本研究により既知の生体内高分子に加え、TORC1がアミノ酸の生合成を直接制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
二つのTORC1活性化経路の上流に位置するアミノ酸の分類、経路特異的なTORC1の基質の単離といった本研究の成果は、TORC1活性化の分子機構、特に多様なアミノ酸センシング機構の解明の礎になると考える。またTORC1の特異的阻害剤であるラパマイシンは免疫抑制効果、抗がん剤効果、寿命延長効果などの薬理作用があり、様々な疾患の治療薬として用いられているがその副作用が問題となっている。将来的に、本研究はこれら生命現象のメカニズムの理解に留まらず、更なる精緻な治療法の開発の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The function of TORC1 as the critical regulator of growth and metabolism is universally conserved amongst eukaryotes. However, the identification of upstream and downstream factors of TORC1 for cell proliferation and growth remains to be investigated. A combination of biochemical and microscopic approaches demonstrated that an enzyme that catalyzes the first step of the serine synthesis pathway physically interacts with TORC1 and co-localizes with the TORC1 complex in vivo. We also found that TORC1 activity is required to maintain intracellular serine at levels sufficient for growth and that the enzyme is phosphorylated by TORC1 in a manner dependent on the Pib2 pathway. This study revealed that TORC1 directly controls an amino acid synthesis pathway in addition to other macromolecule syntheses.

研究分野：栄養源に依存した細胞応答とその制御機構

キーワード：酵母　TORC1　アミノ酸　細胞成長　栄養増殖　リン酸化修飾

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

増殖・成長に必要不可欠であるアミノ酸は細胞により厳密に感知され、巨大なタンパク質複合体 TORC1 に情報伝達される。TORC1 はそのリン酸化酵素活性を介して細胞成長と代謝を制御する。栄養源存在化で TORC1 は活性化し、リン酸化を介して同化作用を亢進し、異化作用を抑制する。逆に十分な栄養源がないと不活化し、基質の脱リン酸化を介して、同化作用の抑制、異化作用の亢進を誘導する。こうした栄養源に応じた増殖・成長制御因子としての TORC1 の機能は真核生物において進化的に保存されていることが明らかとなった。一方で“20 種のアミノ酸がどのように TORC1 を活性化するのか”という分子機構の解明が最も重要な課題として残っている。

栄養源依存的な TORC1 活性化には TORC1 の液胞膜局在化が必須である。この局在化は、低分子量 GTP 結合蛋白質である Gtr1-Gtr2 二量体との相互作用による。Gtr 二量体は Ego 複合体を介して液胞膜上に恒常的に局在する。Gtr ヘテロ二量体が GTP-GDP 結合状態に応じて TORC1 と結合・解離することで TORC1 の局在が制御される。この機構は酵母からヒトまで種を超えて保存されており、現時点で Gtr/Ego 経路が広く認知されている唯一の TORC1 活性化経路である。しかし、酵母において TORC1 は生育に必須である一方、Gtr/Ego 経路の因子は全て生育に非必須である。さらに Gtr/Ego 欠失変異体で、TORC1 が液胞膜局在を示すことが報告された。これらは Gtr/Ego 経路以外に TORC1 活性化経路が他にも存在する可能性を強く示唆するが、その詳細は明らかにされていなかった。

２．研究の目的

申請者は新規活性化経路を見出すことを試み、出芽酵母で TORC1 が生育に必須であるにもかかわらず全ての Gtr/Ego 関連因子が生育に非必須であることにまず注目した。新規経路と Gtr/Ego 経路を同時に遮断すると TORC1 が不活化し、酵母は致死となると予想される。gtr1 遺伝子欠損と合成致死を示す因子の探索から液胞膜上に局在する機能未知因子 Pib2 を見出し、Pib2 は TORC1 と複合体を形成し、この複合体には Gtr/Ego 関連因子を含まれないことから、Gtr/Ego 経路とは独立かつ並列に機能する新規 TORC1 活性化経路に Pib2 が介在すると結論した。加えて Gtr/Ego 経路と Pib2 を同時にノックダウンすると TORC1 は液胞膜状から乖離し、活性が完全に失われた。以上から出芽酵母における TORC1 活性化経路は、Gtr/Ego 経路と Pib2 が介在する経路（Pib2 経路）の二つのみであることが明らかとなった。これによって初めて、“20 種のアミノ酸がどのように TORC1 を活性化するのか”について網羅的に検証できる段階に至ったと考える。本研究では Pib2 が介在する新規 TORC1 活性化経路（Pib2 経路）の以下に挙げる点を明らかにしつつ、最終的に細胞のアミノ酸感知機構の全貌解明を目指す。

⑴ Gtr/Ego 経路と Pib2 経路が各々どのアミノ酸を感知するのか。
⑵ Pib2 経路はどのように TORC1 を活性化するのか。
⑶ Pib2 の活性はどのように制御されているのか。
⑷ Gtr/Ego 経路または Pib2 経路はどのようにアミノ酸を感知するのか。

３．研究の方法

⑴ Gtr/Ego 経路と Pib2 経路が各々どのアミノ酸を感知するのか。
窒素源飢餓にさらした *pib2* 破壊株に各アミノ酸を添加して、基質である Sch9 のリン酸化状態を指標に TORC1 の活性化状態を検証する。これにより Pib2 経路が感知するアミノ酸を同定する。同時に Gtr/Ego 経路についても検討し、全 20 種類のアミノ酸をどちらの経路で酵母が感知しているかを明らかにする。

⑵ Pib2 経路はどのように TORC1 を活性化するのか。
⑶ Pib2 の活性はどのように制御されているのか。
上記二つは共通の研究方法を用いる。

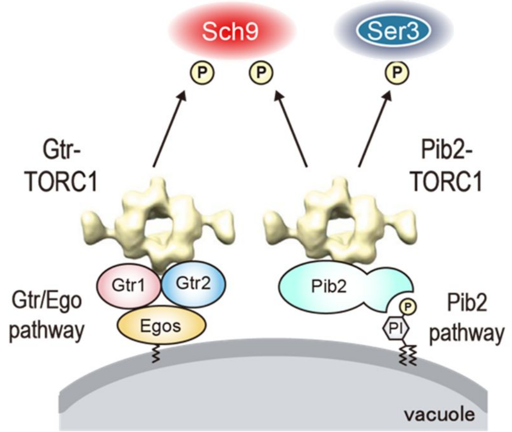
アミノ酸の感知から TORC1 の活性化と Pib2 経路が担う役割は多岐に渡る。従ってこの経路には複数のタンパク質の参画が予想され、これらを Pib2 の物理的・遺伝学的相互作用因子を単離・同定することにより、Pib2 経路の全貌を明らかにする。
①物理的相互作用因子：富栄養条件下並びに飢餓条件下で培養した酵母から Pib2 の物理的相互作用因子を免疫沈降・質量分析を用いて単離・同定する。
②遺伝学的相互作用因子：*PIB2* 欠損が Gtr/Ego 経路因子の破壊株と合成致死を示すことを利用し、*gtr1* 破壊株の *PIB2* 遺伝子にランダム変異を導入することで、*pib2* の温度感受性株を作製し、この変異株の多コピーサプレッサーを探索・単離する。これにより物理的相互作用因子とは

異なる Pib2 経路の関連因子が同定できる。

⑷ Gtr/Ego 経路または Pib2 経路はどのようにアミノ酸を感知するのか。
Gtr/Ego 経路及び Pib2 経路関連因子の中から、アミノ酸に直接結合し、TORC1 に情報を伝達するアミノ酸感知タンパク質（アミノ酸センサー）を単離･同定する。特に、アイソトープラベルしたアミノ酸への個々のタンパク質の直接結合能を指標に、アミノ酸感知を司る因子の同定を試みる。

４．研究成果
⑴ 二つの TORC1 活性化経路、Gtr/Ego 経路と Pib2 経路の上流に位置するアミノ酸の同定
出芽酵母において TORC1 活性化経路は Gtr/Ego 経路（哺乳類における Rag/Ragulator 経路）と Pib2 が介在する経路（Pib2 経路）の独立した二経路のみであることを見出され、各々のアミノ酸の認識は二経路の周辺因子によりなされていると考えられる。しかし、20 種のアミノ酸がどちらの TORC1 活性化経路を経由するか、その詳細は明らかにされていない。TORC1 のよく知られた基質である Sch9 は Gtr/Ego 経路または Pib2 経路を欠損するとリン酸化が半減する。これは両経路によって活性化された TORC1 が Sch9 を基質とすることを意味する。Sch9 のリン酸化状態を TORC1 活性の指標に用い、20 種のアミノ酸を Gtr/Ego 経路と Pib2 経路のどちらを介して TORC1 を活性化するのかを検証した。その結果、Gtr/Ego 経路に強く依存するアミノ酸（9 種類）、Pib2 経路に強く依存するアミノ酸（6 種類）、両方の経路が関与するアミノ酸（5 種類）の 3 つに分類され、二つの経路は応答するアミノ酸に違いがあることが明らかとなった。Gtr/Ego 経路と Pib2 経路の同時遮断が合成致死となるという遺伝学的解析から“機能重複”が予見されていたが、両経路には上流（アミノ酸）に明確な差異が存在しているようである。アミノ酸センサーは哺乳細胞において少数のアミノ酸について先駆的研究がなされているが、これらは種間で保存されておらず、酵母において決定的なアミノ酸センサーの存在に関しては大いに議論の余地がある。本研究は、酵母における TORC1 活性化の分子機構、特に多様なアミノ酸センシング機構の解明の礎になると考える。

⑵ TORC1 によるセリン生合成制御
生化学的解析と細胞生物学的解析を組み合わせることにより酵母 TORC1 関連因子を探索した。その結果、セリン合成経路の最も初期段階を触媒する酵素を TORC1 に相互作用･共局在する因子として同定した。この酵素のリン酸化は Gtr/Ego 経路欠損株では変化しないものの、Pib2 経路欠損株では消失した。すなわちこの酵素は Pib2 経路のみに依存してリン酸化される TORC1 の基質であり、同じ TORC1 でも経路ごとに基質特異性を有することが初めて明らかとなった。さらに機能欠損株は TORC1 阻害剤であるラパマイシンに感受性を示し、この感受性は培地にセリンを添加することで抑圧される。この結果は、TORC1 を阻害すると増殖に必要な細胞内のセリン濃度を維持できなくなることを意味する。セリン合成経路は連続した三つ段階からなるが、第二、第三段階の酵素は TORC1 と挙動をともにしないことも合わせて、TORC1 は最も初期段階である酵素を基質とすることでセリン合成経路を制御していることが明らかとなった。TORC1 によりリン酸化型に変換された酵素は機能が亢進し、細胞内のセリン合成量が促進すると考えられる。他のアミノ酸と異なりセリンはタンパク質の材料としてだけでなく、他のアミノ酸、脂質、糖、核酸へと代謝され、生体内代謝において大変広範な役割を担うことが知られている。TORC1 は２０種のアミノ酸、なかでもセリン合成を促進することにより、細胞増殖と成長を促しているのであろう。

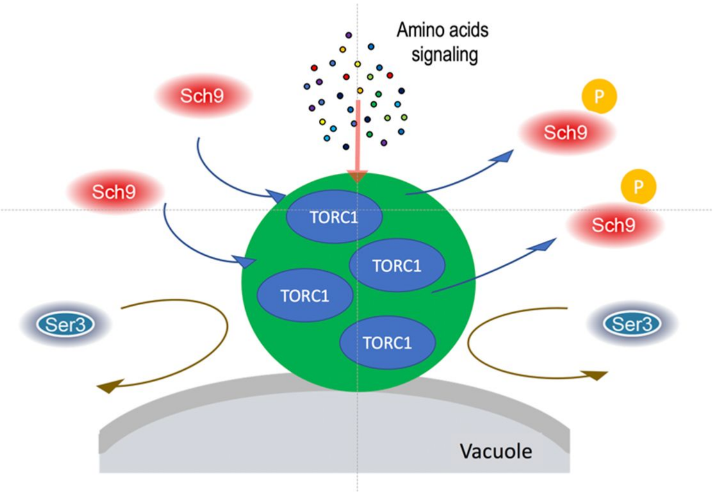


⑶ tRNA の硫黄修飾を介した新規 Pib2 制御
Pib2 経路には複数の構成因子制御因子が存在していると考え、Pib2 経路に関与する因子を遺伝学的に単離し、その機能を解析した。実験には、Gtr/Ego 経路を欠損し、Pib2 タンパク質の機能が減弱した温度感受性 *pib2* 変異株を用い、過剰発現により温度感受性を抑圧する酵母遺伝子を探索した。その結果、tRNA の硫黄修飾に必須な酵素を単離した。全ての生物において、３種類の tRNA（tK^{UUU}、tE^{UUC}、tQ^{UUG}）は硫黄修飾される。この修飾によりアンチコドンとコドンの３文字目の間に安定した塩基対が形成されることで翻訳時の揺らぎが減少し、コドンが正確に解読される。加えて *pib2* 変異株において、硫黄修飾される３種類の tRNA を同時に過剰発現することにより温度感受性が抑圧された。これより、tRNA の硫黄修飾が Pib2 経路に深く関与することが強く示唆された。さらに tRNA 硫黄修飾関連因子の過剰発現は細胞内の Pib2 タンパク質の発現

量も増加させることから、過剰発現は *PIB2* 遺伝子の翻訳を促進することで Pib2 経路を活性化させた結果、*pib2* 変異株の温度感受性が抑圧されたと考えられる。*PIB2* 遺伝子の塩基配列において、硫黄修飾される３種類の tRNA を指定するコドンが四つ連続した領域が存在する。アミノ酸配列を変化することなく翻訳時に硫黄修飾を必要としない他のコドンに置換すると、Pib2 タンパク質の発現量が減少したことから、硫黄修飾によって成熟化した３種類の tRNA によるコドンによる解読が Pib2 タンパク質の翻訳に必要であるという新規の TORC1 活性化機構が明らかとなった。

⑷ <u>二つの TORC1 活性化経路と独立したアミノ酸感知機構</u>

Gtr/Ego 経路と Pib2 経路を同時に欠失する二重欠失酵母の致死性を抑圧する TORC1 変異体を作出した。これにより、二経路の TORC1 の活性化への必要性が厳密に検証することが可能となった。この変異体では TORC1 は液胞上に局在することができないにも関わらず、20 種のアミノ酸を含む混合物により TORC1 は活性化した。この結果は Gtr/Ego 経路と Pib2 経路を介さずに、TORC1 を直接の標的とする活性化機構が存在することを示唆する。近年の高等真核生物における知見により、アミノ酸センサーは TORC1 を液胞膜上に係留する Gtr/Ego 経路と Pib2 経路の機能制御を介して TORC1 活性制御を遂行していると考えられていた。しかし本研究により TORC1 を直接の標的とするアミノ酸センサーが存在することが初めて示唆された。また、Gtr/Ego 経路と Pib2 経路の二重欠失酵母では、TORC1 が液―液相分離によって生じる液滴の性状を有する大きな構造体を細胞内に形成することを見出した。液滴は細胞内で特定の分子を一過的に濃縮させることで生体内反応を促進させる場として機能することが知られている。TORC1 が液滴を形成することでアミノ酸に対する応答をより鋭敏化している可能性が窺えた。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 Shintaro Kira , Masafumi Noguchi , Yasuhiro Araki , Yu Oikawa , Tamotsu Yoshimori , Aiko Miyahara , Takeshi Noda	４．巻 134
２．論文標題 Vacuolar protein Tag1 and Atg1-Atg13 regulate autophagy termination during persistent starvation in S. cerevisiae	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Cell Science	６．最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.253682	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 Ikari Sumiko、Lu Shiou-Ling、Hao Feike、Imai Kenta、Araki Yasuhiro、Yamamoto Yo-hei、Tsai Chao-Yuan、Nishiyama Yumi、Shitan Nobukazu、Yoshimori Tamotsu、Otomo Takanobu、Noda Takeshi	４．巻 15
２．論文標題 Starvation-induced autophagy via calcium-dependent TFEB dephosphorylation is suppressed by Shigyakusan	５．発行年 2020年
３．雑誌名 PLOS ONE	６．最初と最後の頁 0230156～0230156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0230156	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 荒木保弘　野田健司	４．巻 71
２．論文標題 栄養を感知して細胞成長を促すTORC1の制御機構	５．発行年 2019年
３．雑誌名 生産と技術	６．最初と最後の頁 77～80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Hirofumi Ukai, Yasuhiro Araki, Shintaro Kira, Yu Oikawa, Alexander I. May, Takeshi Noda	４．巻 April
２．論文標題 Gtr/Ego-independent TORC1 activation is achieved through a glutamine-sensitive interaction with Pib2 on the vacuolar membrane	５．発行年 2018年
３．雑誌名 PLOS Genetics	６．最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2018.07.002	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 Klionsky Daniel J.、・・・、Araki Yasuhiro、et al.	４．巻 17
２．論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Autophagy	６．最初と最後の頁 1～382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2020.1797280	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 該当する

１．著者名 Kozu Fumi、Shirahama‐Noda Kanae、Araki Yasuhiro、Kira Shintaro、Niwa Hitoshi、Noda Takeshi	４．巻 11
２．論文標題 Isoflurane induces Art2‐Rsp5‐dependent endocytosis of Bap2 in yeast	５．発行年 2021年
３．雑誌名 FEBS Open Bio	６．最初と最後の頁 3090～3100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13302	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9件（うち招待講演　3件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 荒木保弘
２．発表標題 TORC1が活性化経路を二つ有する意義
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 荒木 保弘，鈴木清太郎，田中信武，野田 健司
２．発表標題 二つのTORC1活性化経路を失った酵母変異株からわかったこと
３．学会等名 第９回TOR研究会
４．発表年 2019年

１．発表者名 荒木 保弘，野田 健司
２．発表標題 TORC1 の液滴形成による活性維持機構
３．学会等名 大阪大学蛋白研セミナー/第 3 回 LLPS 研究会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 荒木 保弘，野田 健司
２．発表標題 細胞内二大分解系を司るTORC1の液滴形成による活性制御
３．学会等名 第92回日本生化学会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 荒木 保弘，河村 崚介，北谷 匠，澤田 崚平，野田 健司
２．発表標題 TORC1はセリン合成経路の促進を介して細胞増殖を司る
３．学会等名 第８回TOR研究会
４．発表年 2018年

１．発表者名 荒木保弘
２．発表標題 酵母はいかにして栄養を感知するか
３．学会等名 第22回酵母合同シンポジウム（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名
Araki Y, Ukai H, Kira S, Noda T

２．発表標題
Gtr/Ego-independent TORC1 activation is achieved through a glutamine-sensitive interaction with Pib2 on the vacuolar membrane

３．学会等名
Nutrient signaling, Cold Spring Habor meeting（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
荒木保弘，野田健司

２．発表標題
TORC1 はアミノ酸合成を直接制御する

３．学会等名
第11回オートファジー研究会

４．発表年
2018年

１．発表者名
Qingzhong Zeng、荒木 保弘、野田 健司

２．発表標題
二つのTORC1活性化経路の上流に位置するアミノ酸の同定

３．学会等名
第 11 回 TOR 研究会

４．発表年
2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

オートファジー調節の鍵であるアミノ酸の一種 グルタミンが細胞成長を活性化する仕組みの発見
https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/tag_view?tag=%E9%87%8E%E7%94%B0%E5%81%A5%E5%8F%B8

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