

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14432

研究課題名（和文）過剰なトリプトファンに特異的な細胞応答システムの解析

研究課題名（英文）Study of cellular response to excess Tryptophan

研究代表者

大橋 一登 (Ohashi, Kazuto)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：30775862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：トリプトファン (Trp) は、生体に必須のアミノ酸であるが、過剰なTrpの蓄積は有害であり、様々な病態との関連が示唆されている。しかし、過剰なTrpによる毒性の原因は不明であった。本研究では、過剰なTrpの毒性の原因が細胞内情報伝達の阻害であることを示す結果を得た。さらに、過剰なTrpへの耐性にTrpの分解系とその反応に必要な有機酸の生合成系が必要であったことから、過剰なTrpの蓄積を解消する応答機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプトファン (Trp) の蓄積やTrpの過剰摂取が有害であることは古くから知られていたが、その原因はよく分かっていなかった。本研究では、過剰なTrpによる細胞毒性の原因を明らかにした。この知見を発展させることにより、Trpの蓄積を伴う病態の理解が深まり、その治療にも貢献することが期待される。さらに、補助的な栄養素としてのTrpの安全な利用にも貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Tryptophan (Trp) is an essential amino acid for living organisms, but excessive accumulation of Trp can be toxic. Also, it has been suggested that excessive accumulation of Trp is associated with various pathological conditions. However, the cause of toxicity due to excess Trp was unknown. In this study, we obtained the results showing that the cause of excessive Trp toxicity is inhibition of an intracellular signal transduction. Furthermore, it was suggested that the existence of a cellular response mechanism that eliminates excess Trp accumulation since degradation pathway of Trp and biosynthesis of organic acids which is necessary for the Trp degradation were required for tolerance to excess Trp.

研究分野：農芸化学

キーワード：トリプトファン アミノ酸 出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

Trp はヒトでは必須アミノ酸の一つで、生理活性化合物であるセロトニンやメラトニンの原料になることも知られている。その一方で、Trp 代謝異常は高 Trp 血症や好酸球増加筋肉痛症候群のみならず、肥満、糖尿病、うつ病などの疾患との関連も示唆されている。これらの病態の治療のためにも、Trp 代謝の理解が求められている。

真核細胞のモデル生物である出芽酵母において、Trp は必須アミノ酸の中でもその合成に多くの ATP を要する。そのため、細胞内の Trp の生合成は厳密に制御されている。しかし、過剰な Trp が及ぼす影響と応答は意外にもよく分かっていない。

これまでの研究で、申請者は過剰な Trp そのものが細胞の増殖を阻害することを出芽酵母で見出した。本研究では過剰な Trp への細胞応答を分子レベルで理解し、Trp 生合成が厳密に制御される意義を明らかにする。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、申請者らは過剰な Trp が細胞増殖を阻害することを見出し、Trp の分解経路の重要性を報告した (Ohashi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017)。研究を進めたところ、過剰な Trp への耐性にいくつかのオートファジー遺伝子が必要であることが分かった。オートファジーは細胞内のタンパク質を分解する機構の一つで、アミノ酸の再利用にも重要な分子機構であるが、過剰な Trp との関連は不明である。また、メタボロミクス解析では Trp 代謝物の増加にもなった代謝変動が明らかになってきた。本研究では、生化学および遺伝学的手法に加え、メタボロミクス解析を駆使しながら、過剰な Trp への耐性にオートファジーが必要であることを明らかにし、過剰な Trp への細胞応答を理解する。

## 3. 研究の方法

申請者は高濃度 Trp 培地において、いくつかのオートファジー関連分子の遺伝子欠損株が生育遅延を示すことを見出した。この結果から、過剰な Trp への耐性にオートファジーが必要であると考えられ、過剰な Trp 存在下ではオートファジーが活性化されていると予想した。そこで、オートファジーの活性を生化学的に検出する。オートファジーの活性は、GFP-Atg8 が切断されて生じる GFP のシグナルを用いて評価される。そこで、過剰な Trp を加えて数時間で、GFP-Atg8 の切断シグナルをウエスタンブロットで検出する。

これまで、オートファジーはアミノ酸の欠乏によって活性化されることが知られている。そのため、過剰な Trp によってオートファジーの活性化が認められた場合、全く新規の分子機構が存在すると考えられる。そこで、過剰な Trp への応答に必要な分子を特定するために、過剰な Trp によってどのような遺伝子変動しているのかを RNA シーケンスによる発現解析で調べる。また、得られた結果に基づき、変動した遺伝子の発現を制御する分子の特定を試みる。

さらに、出芽酵母の非必須遺伝子欠損株 (約 4800 株) および必須遺伝子発現低下株 (DAmP 株, 約 800 株; Breslow *et al.*, 2008) のライブラリを用いて、過剰な Trp への耐性に必要な遺伝子群を網羅的に探索する。RNA シーケンスによる発現解析と遺伝子変異株のスクリーニングの結果を統合し、過剰な Trp への応答を担う分子を特定する。また、これらの遺伝子変異株に過剰な Trp を作用させた時のオートファジーの活性を測定し、これらの過剰な Trp への応答を担う分子がオートファジーの制御に関わっていることを明らかにする。

なお、過剰な Trp を認識する分子は、過剰な Trp への応答に必要な分子に含まれているはずである。そこで、オートファジーの活性や遺伝子変動など適切な応答を指標に用いて、過剰な Trp を感知する分子を探索する。

以上の実験により、過剰な Trp への細胞応答を明らかにし、過剰な Trp への耐性にオートファジーが必要である理由を明らかにする。また、スクリーニングの表現型から得られる知見は、過剰な Trp への細胞応答の包括的な理解にも貢献する。

## 4. 研究成果

当初期待していた過剰な Trp によるオートファジーの活性化はほとんど認められなかったが、過剰な Trp への耐性にいくつかのオートファジー遺伝子が必要であった。オートファジーはタンパク質を分解し、アミノ酸を再利用する機構であることを考えると、過剰な Trp への耐性にはアミノ酸代謝が重要であることが予想された。次に、過剰な Trp により誘導される遺伝子を明らかにするために、RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を行った。その結果、過剰な Trp 処理によって、Trp の分解酵素やアミノ酸生合成酵素の発現が変動していることが明らかになり、過剰な Trp への耐性にアミノ酸代謝が重要であることが改めて確認された。また、この結果から、過

剰な Trp の分解反応とその反応に必要な有機酸の供給が活性化していると考えられた。すなわち、これらの結果は、過剰な Trp の蓄積を解消する機構の存在を示唆している。そこで、過剰な Trp への細胞応答の仕組みを明らかにするために、簡便な真核生物のモデル細胞である出芽酵母を用いて、過剰な Trp への応答に必要な遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、一部のアミノ酸代謝系が過剰な Trp への耐性に必要であることが明らかになった。さらに、遺伝子スクリーニングと RNA シーケンスの結果を統合的に解析し、Trp への応答に必要な細胞内シグナル伝達を担うタンパク質の同定にも成功した。実際、過剰な Trp によって、このシグナルタンパク質のリン酸化が変化していることも生化学的に明らかにした。

しかし、このリン酸化シグナル伝達の上流で過剰な Trp がどのように認識されているかは不明である。過剰な Trp を感知する分子の遺伝子欠損株は、過剰な Trp 存在下で抑制される細胞内シグナルが抑制されず、高濃度 Trp に耐性を示すはずである。上記の遺伝子欠損株のスクリーニングと同様の方法で、過剰な Trp に耐性を示す遺伝子欠損株を 147 株見出した。さらに、この 147 株の中から、過剰な Trp で抑制されるはずの細胞内シグナルが抑制されない遺伝子欠損株をいくつか同定することに成功した。これらの遺伝子にコードされた分子は過剰な Trp の感知に関わる分子であると予想され、これらの分子の解析により、過剰な Trp の認識機構が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Chaleckis R, Ohashi K, Meister I, Naz S, Wheelock CE	4. 巻 2049
2. 論文標題 Metabolomic Analysis of Yeast and Human Cells: Latest Advances and Challenges.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 233 - 245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/978-1-4939-9736-7_14	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋一登、高稲正勝、吉田知史
2. 発表標題 出芽酵母における高濃度トリプトファン毒性の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋一登、高稲正勝、吉田知史
2. 発表標題 出芽酵母を用いた高濃度トリプトファンによるアミノ酸インバランスの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋一登
2. 発表標題 出芽酵母における高濃度トリプトファンによるアミノ酸インバランスの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----