

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06170

研究課題名（和文）成長と増殖を司るTORC1のタンパク質分解システムを介した活性制御機構の解明

研究課題名（英文）The elucidation of the protein degradation system controlling TORC1, which governs growth and proliferation.

研究代表者

荒木 保弘（Araki, Yasuhiro）

大阪大学・大学院歯学研究科・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）：TORC1はアミノ酸を感知し細胞の増殖と成長を厳密に制御する。一方で、TORC1がどのように20種類のアミノ酸を感知しているのか、という最も重要な課題が残っている。本研究において出芽酵母ではTORC1活性化経路は、Gtr経路とPib2経路のみであること、20種類のアミノ酸ごとに活性化経路が異なることを明らかにした。更にシステインがPib2とTORC1間の相互作用を促進し、TORC1を活性化すること、システイン結合能を欠くPib2変異体ではTORC1がシステイン添加に呼応しないことから、Pib2はシステインを直接感知しTORC1を活性化する、システインセンサーであると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TORC1阻害剤であるラパマイシンは様々な薬理作用を有し、TORC1の応用研究も熾烈を極めている。哺乳類細胞においてもGtr/Ego経路以外にTORC1活性化経路の存在が示唆されているが分子の実体は不明である。TORC1関連因子は進化上高度に保存されており、Pib2経路及び制御機構も進化上保存されていると想定される。アミノ酸センサーは哺乳類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、酵母においてアミノ酸センサーの知見は皆無であった。本研究により、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理解が種を超えて大きく進むものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：TORC1 is a master regulator that monitors the availability of various amino acids to promote cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. It is activated via two distinct upstream pathways, the Gtr pathway, which corresponds to mammalian Rag, and the Pib2 pathway. This study showed that Ser3 was phosphorylated exclusively in a Pib2-dependent manner. Using Ser3 as an indicator of TORC1 activity, together with the established TORC1 substrate Sch9, we investigated which pathways were employed by individual amino acids. Different amino acids exhibited different dependencies on the Gtr and Pib2 pathways. Cysteine was most dependent on the Pib2 pathway, and increased the interaction between TORC1 and Pib2 in vivo and in vitro. Moreover, cysteine directly bound to Pib2 via W632 and F635, two critical residues in the T(ail) motif that are necessary to activate TORC1. These results indicate that Pib2 functions as a sensor for cysteine in TORC1 regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：栄養感知 細胞成長 増殖 酵母 アミノ酸 TORC1

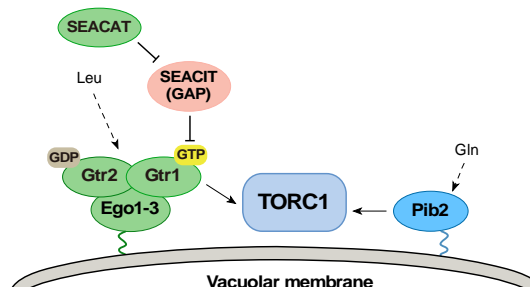
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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。栄養源存在化では TORC1 は活性化し、リン酸化を介して同化作用(タンパク質、脂質、核酸合成)を亢進し、分解過程であるオートファジーを介した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。

栄養源依存的な活性化には 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、Gtr/Ego 経路が広く認知されている唯一の TORC1 活性化経路であった。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だけでなく、アミノ酸に応答することが報告された。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。

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 *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、更に Pib2 は TORC1 と複合体を形成するがこの複合体には Gtr/Ego 関連因子を含まれないこと、TORC1 活性化のアミノ酸嗜好性が *gtr1* 破壊株と *pib2* 破壊株では異なることから、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、“アミノ酸がどのように TORC1 を活性化するのか”という最も重要な課題を検証できる段階に至った。



### 2. 研究の目的

これまでの研究により、TORC1 の活性化機構に関して多くの知見が蓄積している。近年になって、哺乳類でロイシン、アルギニン、メチオニンを直接感知する因子が同定され、哺乳類 Gtr/Ego 経路を介して TORC1 を活性化していることが報告された。しかし TORC1 を巡る最大の課題である“細胞は全 20 種のアミノ酸をどのように感知し、どのように TORC1 を活性化するのか”は完全な理解からはほど遠いと言える。この要因は、これまで TORC1 活性化経路として Gtr/Ego 経路のみが研究対象となっていることに他ならない。Gtr/Ego 経路の一経路では、感知しなければならない 20 種ものアミノ酸の多様性に対応しうるとは考えにくい。申請者は新規に Pib2 経路を見出し、更に TORC1 活性化経路は Gtr/Ego、Pib2 の二経路のみであること明らかにした。従って全てのアミノ酸による活性化は二経路のどちらかを經由すると考えられる。実際にロイシンが Gtr 経路を介して、グルタミンが Pib2 経路を介して TORC1 を活性化することから、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。さらに TORC1 のよく知られた基質である Sch9 や Atg13 と異なり、Pib2 経路のみに依存してリン酸化される TORC1 の新奇基質 Ser3 を見出しており、同じ TORC1 でも経路ごとに基質特異性を有すると考えられる。合成致死という遺伝学的解析から予見された“機能重複”を完全にしているわけではなく、両経路には差異が存在しているようである。以上の知見をもとに、“アミノ酸がどのように TORC1 を活性化するのか”を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Gtr/Ego 経路と Pib2 経路が各々どのアミノ酸を感知するのか。

(研究目的) Gtr/Ego 経路または Pib2 経路に依存した TORC1 の活性化を誘導するアミノ酸を同定する。

(研究方法) 窒素源飢餓にさらした *pib2* 破壊株または *gtr1* 破壊株に各アミノ酸を一つずつ添加して、Gtr/Ego、Pib2 両経路に依存する基質である Sch9 と、Pib2 経路のみに依存する Ser3 のリン酸化状態を指標に TORC1 の活性化状態を検証する。両基質のリン酸化を本研究で確立した

リン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットで定量的に解析する。これにより全 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。

(2) Pib2 経路はどのようにアミノ酸を感知するのか。

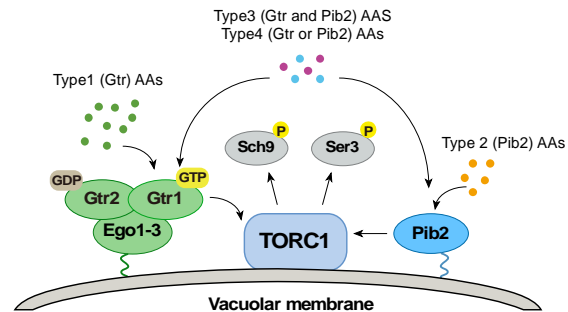
(目的) Pib2 自身、生化学的 (免疫沈降と質量分析器を駆使した解析) 遺伝学的 (*pib2* 変異酵母株を用いたスクリーニング) に単離した Pib2 経路関連因子の中から、アミノ酸に直接結合し、TORC1 に情報を伝達するアミノ酸感知タンパク質 (アミノ酸センサー) を単離・同定する。

(方法) Pib2 経路関連因子に関する知見を用い、各アミノ酸の TORC1 活性化の分子機構を明らかにする。特に、上記 1 から同定した Pib2 経路に依存する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。直接結合能は Pib2 及び候補因子のリコンビナントタンパク質を調製し、アイソトープラベルしたアミノ酸を用いた結合実験を行う。

#### 4. 研究成果

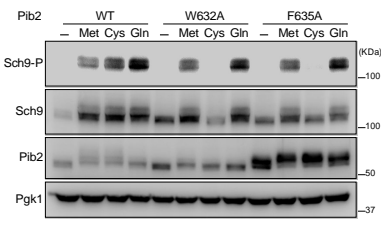
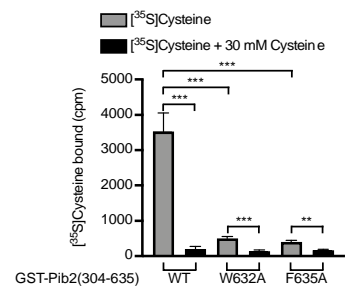
(1) 二つの TORC1 活性化経路、Gtr/Ego 経路と Pib2 経路の上流に位置するアミノ酸の同定

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が見出され、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。一方、新規 TORC1 基質である Ser3 は Pib2 欠損時のみ脱リン酸化状態になることから、Pib2 経路に活性化された TORC1 にのみ依存してリン酸化される。Sch9 と Ser3 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リン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットで定量的に検証した。その結果、Gtr/Ego 経路に強く依存するアミノ酸としてロイシン、メチオニン、ヒスチジン、グルタミン酸、チロシン、アスパラギン酸、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンの 9 種類、Pib2 経路に強く依存するアミノ酸としてグルタミン、システイン、バリン、グリシン、アラニンの 6 種類、両方の経路が関与するアミノ酸としてセリン、アスパラギン、トレオニン、アルギニン、プロリン、リシンの 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、両経路には上流のアミノ酸に明確な差異が存在している。

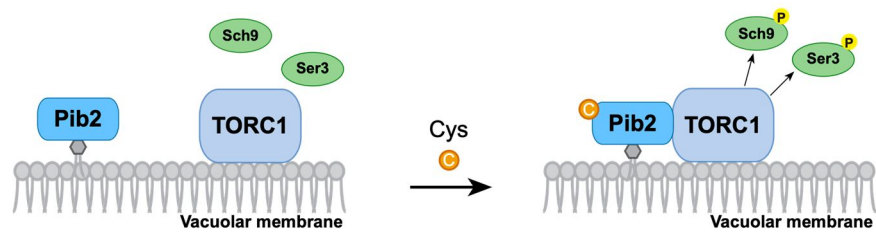


(2) Pib2 はシステインセンサーとして機能する

Pib2 経路に強く依存するアミノ酸のなかでシステインが最も強く TORC1 を活性化する。そこで、培養液にシステインを添加し、酵母内での TORC1 と Gtr1 または Pib2 間相互作用の変化を免疫沈降法で検証した。システインの添加は Pib2-TORC1 間相互作用のみを濃度依存的に亢進した。この亢進は細胞抽出液にシステインを添加することでも観察できることから、システインが Pib2 自身または Pib2 経路周辺因子に作用することが考えられた。次にシステインの作用点として Pib2 自身であることを検証した。酵母から単離した TORC1 精製標品と大腸菌から調製した Pib2 リコンビナントタンパク質を混合すると両者の相互作用がシステイン存在下で濃度依存的に亢進した。この亢進は L-システインでみられるが D-システインでは見られないことから生体内で怒る現象であると考えられた。以上より、システインが Pib2 に直接作用すると推察された。Pib2 リコンビナントタンパク質はアイソトープで標識したシステインに結合し、この結合は過剰の非標識システインにより喪失することからシステインが Pib2 に直接結合することを示す。Pib2 の欠失変異体を用いた解析から C 末端に存在する 15 アミノ酸から成る T モチーフが必要であること、さらにアラニンスキャニングにより 632 番目のトリプトファン残基または 635 番目のフェニルアラニン残基をアラニンに置換した Pib2 がシステインへの結合能を喪失することを見出した。これらの変異を有する酵母変異株はシステインを添加しても TORC1 を活性化しない一方でグルタミン、バリン、グリシン、アラニンその他の Pib2 経路に強く依存するアミノ酸の添加に呼応し TORC1 活性を増強した。この結果は、Pib2 がシステイ



ンに結合することがシステインによる TORC1 の活性化に必要であることを意味する。以上より、Pib2 はシステインと直接結合して、システインの存在を TORC1 に伝えるシステインセンサーであると結論づけた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kozu F, Shirahama-Noda K, Araki Y, Kira S, Niwa H, Noda T	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 -

1. 著者名 Zeng Qingzhong, Araki Yasuhiro, Noda Takeshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Pib2 is a cysteine sensor involved in TORC1 activation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113599 - 113599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.113599	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 荒木保弘
2. 発表標題 Sar1 は酵母においてもアミノ酸センサーとして機能するのか
3. 学会等名 第12回TOR 研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qingzhong Zeng, Yasuhiro Araki, Takeshi Noda
2. 発表標題 TORC1 senses amino acids through distinct upstream pathways to inhibit autophagy
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qingzhong Zeng, Yasuhiro Araki, Takeshi Noda
2. 発表標題 Cysteine-activated TORC1 is dependent on the Pib2 pathway
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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

1. 発表者名 荒木 保弘
2. 発表標題 Pib2 is a cysteine sensor for TORC1 activation
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会（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
---------	---------