

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01811

研究課題名(和文) SREBP-1活性化を制御する新奇プロテアーゼによる新たな脂質代謝機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of SREBP-1 activation and lipid metabolism by novel protease

研究代表者

韓松伊 (Han, Song-lee)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：80729541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SREBP-1活性化を制御するプロテアーゼXによる新たな脂質代謝制御機構を解明し、脂質代謝異常を改善する分子基盤を構築することを目的とした。プロテアーゼXの過剰発現やノックアウトによるSREBP-1活性化制御機構をin vitro及びin vivoにおいて解析した。プロテアーゼXはER上でSREBP-1と共局在し、SREBP-1-SCAP-Insig複合体と相互作用した。プロテアーゼXがSREBP-1を切断活性化すること、SREBP-1の標的である脂質合成遺伝子を制御することを見出した。本研究により、プロテアーゼXが生体内過栄養時にSREBP-1を切断活性化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂質合成のマスターレギュレーターであるSREBP-1の活性化制御に新たな因子を介した経路が存在することを示すことができた。脂質異常症などにおける過度なSREBPの活性化を抑制することは、生活習慣病の改善に繋がることから、異常なSREBPの活性を低下させる研究はとても重要であると考えられる。本研究では、プロテアーゼXが高脂肪食負荷時にSREBP-1を活性化し脂質合成酵素群の発現を誘導すること、この活性化が多価不飽和脂肪酸により抑制されることを示した。従って、脂質異常症におけるSREBP-1活性化機構の一旦を明らかにし、その活性化抑制機構を提案することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：SREBP-1 is the master regulator of lipid synthesis, and recently we identified a novel protease (proteaseX) that activates SREBP-1. In this study, we aimed to clarify the mechanisms of SREBP-1 activation and lipid metabolism by proteaseX. We analyzed the mechanisms of SREBP-1 activation by overexpression or knockout of proteaseX in vitro and in vivo. We found that proteaseX activates SREBP-1 and its target lipogenic genes expressions by cleavage of SREBP-1. ProteaseX and SREBP-1 were co-localized in the ER, and proteaseX interacted with SREBP-1-SCAP-Insig complex. In mouse experiments, activated SREBP-1 and lipid synthesis genes expressions were decreased in proteaseX knockout mice on western diet (WD) compared with wild-type mice on WD. These results suggest that proteaseX is required for activating SREBP-1 and lipid metabolism in response to nutrient overload.

研究分野：分子生物学

キーワード：SREBP-1 プロテアーゼ 脂質代謝

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、深刻な社会問題となっている生活習慣病の発症には遺伝子の発現レベルでの調節が大きく寄与し、様々な転写因子による代謝系遺伝子発現の破綻により代謝の異常が引き起こされる。これら転写因子の中でも、SREBP (sterol regulatory element-binding protein) は脂質代謝のマスターレギュレーターとして知られている。膜タンパクとして小胞体上に存在する SREBP は、小胞体からゴルジ体に輸送されて切断を受け、活性化型となった SREBP は核に移行、標的の遺伝子発現制御を行う。これまでの SREBP の切断制御に関する研究により、ゴルジ体で SREBP を切断するプロテアーゼ (S1P, S2P)、及び SCAP (SREBP cleavage-activating protein) や Insig (insulin inducing gene) などの活性化制御因子が同定されてきた。最近、SREBP の小胞体からゴルジ体への移行に関わる因子が相次いで報告され、SREBP の切断に関わる因子やメカニズムの研究が注目されている。

SREBP は肥満モデルマウスやヒト脂肪症研究において活性化型の亢進が認められており、脂質異常症などにおける過度な SREBP の活性化を抑制することは、生活習慣病の改善に繋がることから、異常な SREBP の活性を低下させる研究はとても重要であると考えられる。しかし、脂質代謝異常の病態における SREBP 活性化の分子機構は未だ不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

転写因子 SREBP は脂質代謝を制御するマスターレギュレーターである。異常な SREBP の活性化による脂質代謝制御不全は、肥満や脂肪肝、インスリン抵抗性などの生活習慣病の増悪化に関与していることが知られている。多価不飽和脂肪酸により SREBP-1 の活性化が抑制されることが知られているが、その詳細な分子機構は未だ明らかになっていない。我々は、多価不飽和脂肪酸による SREBP-1 の活性化制御因子として、新しいプロテアーゼ X を同定することができた。本研究では、SREBP-1 活性化を制御するプロテアーゼ X による新たな脂質代謝制御機構を解明し、脂質代謝異常を改善する分子基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

プロテアーゼ X による SREBP-1 活性化制御に焦点を当て、生体材料(マウス)を用いて解析を行い、より生理的な機能の解析を行った。

#### (1) プロテアーゼ X ノックアウトマウスの解析

筑波大学生命科学動物資源センターとの共同研究で CRISPR/Cas9 system にて短期間で効率的にマウスを作製する技術を使い、プロテアーゼ X のノックアウトマウスを作製した。SREBP-1 は多様な条件により活性化されるため、長期では普通食とウェスタンダイエット負荷の比較検討、短期では絶食と再摂食による影響、及びインスリンによる影響を検討した。それぞれの条件で、プロテアーゼ X ノックアウトマウスと野生型マウスを比較し、プロテアーゼ X による SREBP-1 切断と転写活性化への影響を検討した。

#### (2) 細胞系を用いた実験

培養細胞での過剰発現実験により、プロテアーゼ X と SREBP-1 との相互作用を検討した。さらに SREBP-1 と complex を形成する SCAP、Insig、Ubx8 などの因子との相互作用も検討した。タンパク質間相互作用は共免疫沈降実験を用いて行い、細胞内局在を可視化できる蛍光タンパク質との融合ベクターを用いた解析により局在変動を確認した。プロテアーゼ X による SREBP-1 の切断部位を同定するため、様々な部分欠損変異体および点変異体を作製し、検討を行なった。

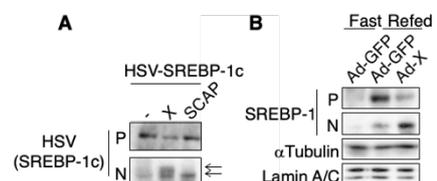
#### (3) プロテアーゼ X による遺伝子発現の網羅的解析

プロテアーゼ X による生理的意義を探るため、普通食とウェスタンダイエット負荷時における、野生型とプロテアーゼ X のノックアウトマウスの肝臓から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) プロテアーゼ X による SREBP-1 切断活性化の検討

培養細胞、及びマウス肝臓にプロテアーゼ X を過剰発現させ、SREBP-1 タンパク質の解析を行なった。培養細胞においては、既存の SREBP-1 活性化因子である SCAP をコントロールとした。また、マウス実験においては SREBP-1 が活性化される再摂食 (Refed) 条件での検討を行なった。その結果、SREBP-1 タンパク質の活性化型 (核型 N) が、プロテアーゼ X の過剰発現により増加していることが明らかになった。このことにより、プロテアーゼ X が SREBP-1 を切断活性化する新規のプロテアーゼであることを示すことができた。

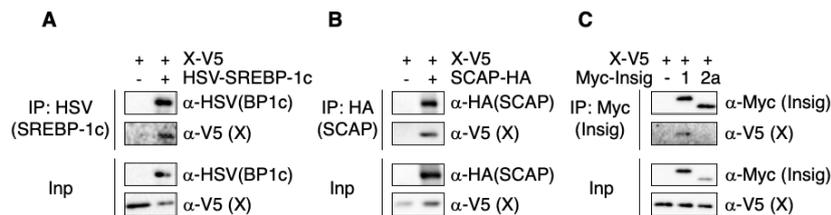


## (2) プロテアーゼ X と SREBP-1-SCAP-Insig complex との相互作用

培養細胞に蛍光タンパク質 GFP と融合したプロテアーゼ X と Ds-Red 融合 ER 及び mCherry 融合 SREBP-1c を共発現させ細胞内局在を観察した。その結果、プロテアーゼ X が ER 上で SREBP-1 タンパク質と共局在することが見出された。この結果により、これまで Golgi へ移行され切断を受けることが知られている SREBP-1 が ER 上で切断される可能性が示唆され、従来とは異なる新規切断活性化パスイグが存在することが示唆された。

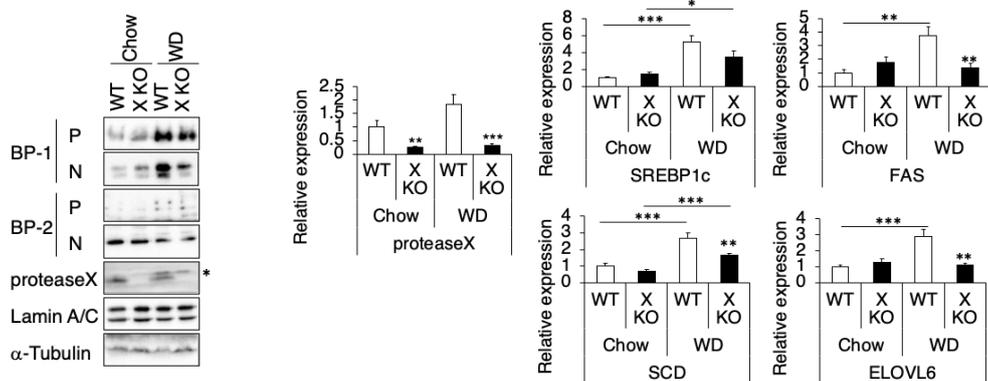
SREBP-1 は ER 上で SCAP、Insig とタンパク質間で相互作用し、複合体を形成することが知られている。そこで、プロテアーゼ X とこれらタンパク質との相互作用について、免疫沈降法を用いた実験により検討した。その結果、プロテアーゼ X が SREBP-1、SCAP、Insig とそれぞれ相互作用することが明らかになった。このことから、SREBP-1-SCAP-Insig 複合体にプロテアーゼ X が含まれている可能性が示唆された。

これらの相互作用には細胞内脂質（コレステロールや脂肪酸など）により制御されていることが明らかになりつつあり、現在詳細な機構を解析中である。

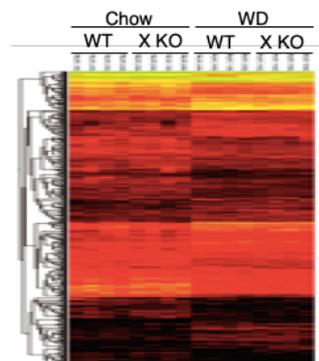


## (3) プロテアーゼ X ノックアウトマウスの解析

CRISPR/Cas9 system を用いてプロテアーゼ X のノックアウトマウス (KO) を作製し、解析を行った。SREBP-1 を活性化させる様々な条件検討を行なった結果、ウェスタンダイエット (WD) 負荷時における野生型とプロテアーゼ X KO の顕著な差を見出すことができた。野生型とプロテアーゼ X KO に普通食とウェスタンダイエットを負荷し、SREBP-1 の切断活性化型と SREBP-1 標的遺伝子発現変動の検討を行なった。その結果、ウェスタンダイエット負荷条件において、プロテアーゼ X KO の肝臓では、野生型に比べて、SREBP-1 活性化型タンパク質、及びに標的遺伝子の発現低下が見られた。従って、プロテアーゼ X が生体内の過栄養条件において SREBP-1 を切断活性化し、下流の脂肪酸合成酵素群の発現を増加させていることが示唆された。また、野生型マウスに多価不飽和脂肪酸を摂取させると SREBP-1 の活性化型や標的遺伝子の著しい低下が見られるが、プロテアーゼ X KO ではその効果が減弱しており、プロテアーゼ X が多価不飽和脂肪酸による SREBP-1 パスイグの抑制に影響を及ぼすことが示唆された。



さらに、プロテアーゼ X による遺伝子発現変動を網羅的に検討するため、RNA-seq 解析を行なった。野生型とプロテアーゼ X KO に普通食とウェスタンダイエットを負荷し、マウス肝臓から RNA を抽出し解析を行なった。その結果、プロテアーゼ X により低下した遺伝子は 148 あり、その中でウェスタンダイエット負荷により増加した遺伝子と共通する遺伝子は 47 あった。リアクトームを用いたパスウェイ解析を行なった結果、プロテアーゼ X ノックアウトマウスで低下している多くの遺伝子が SREBP-1 パスイグに関わっていることが示された。このことにより、プロテアーゼ X が SREBP-1 パスイグに深く関与していることが示唆された。今後は、プロテアーゼ X による SREBP-1 パスイグ制御の詳細な分子機構を探るとともに、SREBP-1 以外のパスウェイに関しても興味深い結果が得られたので、さらなる解析を進めていく予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 20 件)

(1) Sharma R, Matsuzaka T, Kaushik MK, Sugasawa T, Ohno H, Wang Y, Motomura K, Shimura T, Okajima Y, Mizunoe Y, Ma Y, Saber ZM, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Aita Y, Han SI, Takeuchi Y, Yahagi N, Miyamoto T, Sekiya M, Nakagawa Y, Shimano H.

Octacosanol and policosanol prevent high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism.

*Sci Rep.* 2019, Mar 26;9(1):5169. doi: 10.1038/s41598-019-41631-1. 査読有

(2) Araki M, Nakagawa Y, Oishi A, Han SI, Wang Y, Kumagai K, Ohno H, Mizunoe Y, Iwasaki H, Sekiya M, Matsuzaka T, Shimano H.

The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) Agonist Pemafibrate Protects against Diet-Induced Obesity in Mice.

*Int J Mol Sci.* 2018, Jul 23;19(7). pii: E2148. doi: 10.3390/ijms19072148. 査読有

(3) Takei K, Han SI, Murayama Y, Satoh A, Oikawa F, Ohno H, Osaki Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Yamada N, Nakagawa Y, Shimano H.

Selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  modulator K-877 efficiently activates the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  pathway and improves lipid metabolism in mice.

*J Diabetes Investig.* 2017, Jul;8(4):446-452. doi: 10.1111/jdi.12621. 査読有

(4) Nakagawa Y, Satoh A, Tezuka H, Han SI, Takei K, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Iwasaki Y, Sone H, Matsuzaka T, Yamada N, Shimano H.

CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPAR $\alpha$ .

*Sci Rep.* 2016, Dec 16;6:39182. doi: 10.1038/srep39182. 査読有

(5) Han SI, Tsunekage Y, Kataoka K.

Phosphorylation of MafA enhances interaction with Beta2/NeuroD1.

*Acta Diabetol.* 2016, Aug;53(4):651-60. doi: 10.1007/s00592-016-0853-1. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.u-tsukuba-endocrinology.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：中川 嘉

ローマ字氏名：Nakagawa Yoshimi

所属研究機関名：筑波大学

部局名：国際統合睡眠医科学研究機構

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 80361351

※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、研究者個人に帰属されます。