

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09016

研究課題名(和文) 脂肪酸合成を支配する転写因子SREBP-1cの新たな制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Dephosphorylation of SREBP1c by protein phosphatase PPM1L

研究代表者

小林 孝安 (Kobayashi, Takayasu)

東北大学・動物・遺伝子実験支援センター・准教授

研究者番号：10221970

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)：プロテインホスファターゼ PPM1Lに関して、肥満症の原因遺伝子であるとの報告があるが、その分子メカニズムは不明である。PPM1Lは脂質合成系で機能する転写因子であるSREBP1cの機能制御に関わるリン酸化部位を脱リン酸化することができた。一方、KO細胞の解析から、PPM1LがTGFβ/Smad2経路の制御を介してインテグリンの発現制御に関わり、細胞接着を調節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

肥満は、糖尿病や脂質異常症、高血圧症、心血管疾患などの多くの疾患の原因となるため、その予防は健康な生活を送る上で重要である。本研究では、脂質代謝に関わる重要な因子であるSREBP1cの調節にタンパク質脱リン酸化酵素であるPPM1Lが関わる可能性を示すことができ、生活習慣病の予防に資することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a significant risk factor for diabetes and cardiovascular diseases. In an earlier study using quantitative trait loci (QTL) analysis in mice, protein phosphatase PPM1L was identified as a gene related to obesity and other metabolic syndrome traits (Chen et al., 2008), but the underlying mechanism remains unclear. In this study, Thr402 of SREBP1c, which is involved in the ubiquitin-dependent degradation of SREBP, was efficiently dephosphorylated by PPM1L in vitro. In addition, PPM1L KO cells showed enhanced attachment to the culture dish. This is probably due to the enhanced expression of integrins. In PPM1L KO cells, phosphorylation of Smad2 was enhanced, suggesting that PPM1L is involved in regulating TGFβ/Smad pathway.

研究分野：生化学

キーワード：protein phosphatase

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代謝性疾患や肥満症は、1つの形質が複数の遺伝子座によって支配されている多因子性の疾患である。その原因遺伝子を同定するため、マウスの肥満、糖尿病およびアテローム性動脈硬化症に関連する代謝形質と遺伝子発現データを用いた量的形質遺伝子座(QTL)解析が行われ、3種類の遺伝子、リポプロテインリパーゼ、ラクタマーゼ およびプロテインホスファターゼ PPM1Lが、代謝異常と肥満に関わる新規の遺伝子として報告された(Chen et al. Nature, 452, 429-435, 2008)。

これら関連遺伝子のうち、プロテインホスファターゼ PPM1L (protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺-dependent 1L)は、ストレス応答シグナル伝達経路の制御因子として我々が初めて同定したものである (Li et al. 2003)。その後、N末端に膜貫通ドメインを持つ小胞体膜タンパク質であることを見出し、小胞体・ゴルジ間の脂質輸送に関与することを報告した(Saito et al. 2008)。さらに PPM1L 遺伝子欠損マウスを作製し、脳神経系の正常な発生分化に必要なことを見出した(Kusano et al. 2016)。

2. 研究の目的

以上の学術的背景を踏まえ、本研究ではプロテインホスファターゼ PPM1L の肥満形成における役割を検証し、その分子基盤を脂質合成系の重要な転写因子である SREBP1c に着目して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母 2-ハイブリッド(HYB)法による PPM1L の相互作用タンパク質のスクリーニング

細胞内で PPM1L と相互作用するタンパク質を探索するため、GAL4DBD と融合させたマウス PPM1L を bait として、ヒト脳由来の cDNA ライブラリーを用いて 2-ハイブリッドスクリーニングを実施した。

(2) SREBP1c の *in vitro* におけるリン酸化/脱リン酸化系の構築

プロテインキナーゼ CK1, CK2, DYRK2 およびプロテインホスファターゼ PPM1L は大腸菌で発現させた場合、十分な比活性を得られなかったため、バキュロウイルスの系を用いて昆虫細胞での発現を試みた。

(3) PPM1L ノックアウト細胞株の樹立

PPM1L の細胞における機能を明らかにすることを目的として、CRISPR/Cas9 法を用いて培養細胞株におけるノックアウト (KO) 細胞を作製した。

4. 研究成果

(1) PPM1L による SREBP1c の機能制御に重要なリン酸化部位の脱リン酸化

酵母 2HYB スクリーニングで PPM1L と会合すると考えられる部位(ヒト SREBP1c の 341-535 残基)には、AMPK によりリン酸化され活性抑制に関与する Ser 残基(Ser372)と、GSK3 beta 依存性にリン酸化され、タンパク質安定性に関与する Thr および Ser 残基 (Thr402 および Ser406) が含まれている。通常、GSK3beta によるリン酸化には 4 残基 C 末側の Ser または Thr 残基がリン酸化されることが必要であるが、これまでそれを担うプロテインキナーゼについては不明であった。今回、大腸菌で発現した SREBP1c タンパク質を基質として検討したところ、SREBP1c においては、DYRK2 が GSK3beta 依存性リン酸化に必要な C 末側のリン酸化を担っていることが明らかとなった。PPM1L は以上の方法で調製した SREBP1c のリン酸化部位を *in vitro* で効率良く脱リン酸化することができた(図 1)。

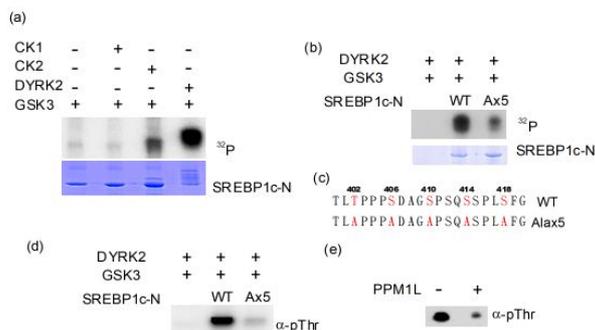


図1 SREBP1cの*in vitro*リン酸化とPPM1Lによる脱リン酸化

(a) ビーズに結合したSREBP1cのN末端領域を非標識のATPを用いてCK1、CK2またはDYRK2によりリン酸化させた後、ビーズをバッファーで洗浄した。続いてGSK3と[γ³²P]ATPとインキュベートすることによりGSK3依存性のリン酸基の取込みをオートラジオグラフで検出した。(b)GSK3によるリン酸化はThrおよびSer残基をAlaに変換した変異体(c)では観察されなかった。(d)SREBP1cのThr402のリン酸化は市販のリン酸化Thr特異的抗体で検出することが可能で、このリン酸基はPPM1Lにより効率よく脱リン酸化された。

(2) PPM1L KO 細胞の樹立とその解析

PPM1L の細胞における機能を明らかにする一端として、ノックアウト (KO) 培養細胞株を作製し、遺伝子破壊の影響を検討した。その結果、HEK293 KO 細胞株の培養ディッシュへの接着性が野生株と比較して亢進していることを見出した (図 2)。

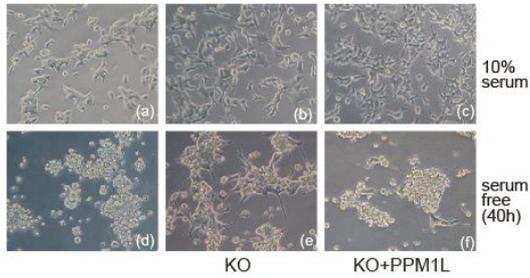


図 2 PPM1L KO 細胞は無血清条件下で培養 dish への付着性が亢進している

HEK293 細胞 (wt) を無血清培地で培養すると、24-48h で培養 dish から剥がれ丸い形態を示す (d)。PPM1L 遺伝子を破壊した細胞株 (KO) では、無血清条件下でも dish への付着性を維持している (e)。KO 細胞株に PPM1L を安定的に発現させた細胞株 (KO+PPM1L) では無血清条件下での dish への付着性が消失した (f)。

ウェスタンブロッティング法にて細胞と細胞外マトリックスの結合に関わる接着因子であるインテグリンの発現を調べたところ、KO 細胞において複数のインテグリン分子の発現が亢進していることが明らかとなった。この発現上昇は KO 細胞に PPM1L を発現させると消失した (図 3)。

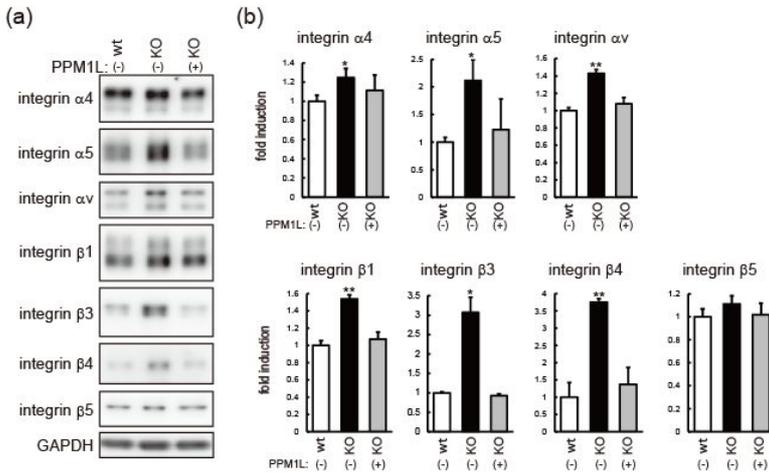


図 3 PPM1L KO 細胞における integrin 分子種の動態

(a) PPM1L KO 細胞では各 integrin 分子種のタンパク量が増加しているが、PPM1L の安定発現により野生型のレベルに戻っている。(b) 各 integrin 分子種のタンパク量の亢進は、転写の亢進によるものと考えられる (real time PCR)。

QIAGEN 社のネットワーク/パスウェイ解析ソフトウェアである Ingenuity Pathway Analysis (IPA) システムで発現上昇が見られたインテグリン分子種の上流調節因子を検索したところ、ERK MAPK 経路、TGF β /Smad2/3 経路、AKT 経路、NF- κ B 経路などが候補としてあげられた。これらの分子情報を元に解析を行ったところ KO 細胞では TGF β 依存性の Smad2 のリン酸化が亢進し、PPM1L タンパクの強制発現でその亢進が抑制されたことから、そのメカニズムとして Smad2 経路の活性化が関与することが示唆された (図 4)。

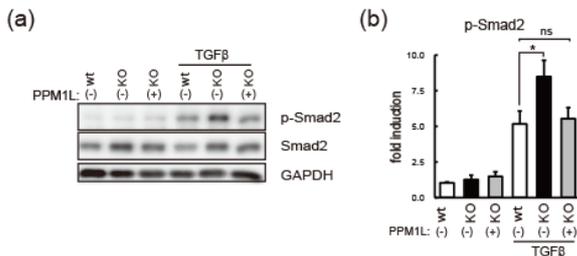


図 4 PPM1L KO 細胞における Smad2 のリン酸化の動態

PPM1L KO 細胞では TGF β 依存性の Smad2 のリン酸化が亢進しており、PPM1L の安定発現により野生型と同程度のレベルにまで戻っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakizaki, I., Kobayashi, T., Tamura, S., Akagi, H., Takagaki, K.	4. 巻 570
2. 論文標題 Effect of glycosaminoglycan structure on all-trans-retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Comm.	6. 最初と最後の頁 169-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.07.012	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 Goto, S., Ichihara, G., Katsumata, Y., Ko, S., Anzai, A., Shirakawa, K., Endo, J., Kataoka, M., Moriyama, H., Hiraide, T., Kitakata, H., Kobayashi, T., Fukuda, K., Sano, M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Time-Series Transcriptome Analysis Reveals the miR-27a-5p-Ppm1l Axis as a New Pathway Regulating Macrophage Alternative Polarization After Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J	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） 10.1253/circj.CJ-20-0783	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 Ishii, N., Homma, T., Watanabe, R., Kimura, N., Ohnishi, M., Kobayashi, T., Fujii, J.	4. 巻 19
2. 論文標題 A heterozygous deficiency in protein phosphatase Ppm1b results in an altered ovulation number in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Med. Rep.	6. 最初と最後の頁 5353-5360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2019.10194	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 孝安, 菅野 新一郎, 安井 明
2. 発表標題 BioID(近位依存性ピオチン標識)法を用いたプロテインホスファターゼPPMファミリーの相互作用タンパク質探索の試み
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 孝安, 菅野 新一郎, 安井 明
2. 発表標題 近位依存性ピオチン標識 (BioID)法を用いたプロテインホスファターゼPPMファミリーの相互作用タンパク質探索の試み
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakizaki, I., Kobayashi, T., Tamura, S., Takagaki, K.
2. 発表標題 Effect of glycosaminoglycans on retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019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