

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20592

研究課題名（和文）核内脂質代謝系は核内受容体のリガンドのin situ合成場として機能するか？

研究課題名（英文）Nuclear in situ metabolisms and nuclear receptors.

研究代表者

小椋 利彦（Ogura, Toshihiko）

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞に力刺激を加えてどんな反応が起こるかを解析し、力刺激で細胞質から核内に移行する因子を同定し、早い核内移行を示す脂質代謝酵素があることを見つけた。そして、核内にグリセロリン脂質代謝系があり、エネルギー代謝に関与することがわかった。すなわち、複数の核内脂質代謝系が核内受容体のリガンドをin situ合成して代謝を制御している。さまざまな核内脂質代謝系を構成する核内酵素を数多く同定し、また、核内脂質を質量分析で半網羅的に解析した。その結果、核内には、独自の脂質代謝系、脂質が存在し、核内受容体内在リガンドをin situ生成して代謝を調節するユニークなシステムがあることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内受容体のリガンドは、ホルモンとして異なる組織で生成され、血流で運ばれて標的組織の受容体を活性化すると考えられてきた。しかし、基本的に水溶性の低い脂質様リガンドが、このようなステップで動いているのか、多くの疑問があった。今回の研究成果から、核内にも脂質代謝系が存在し、核内受容体リガンドとなる脂質を生成できること、核と細胞質の脂質に大きな違いがあることがわかり、肥満、糖尿病の発症にも関与する核内リガンドの見解に新しい局面を開いた。核内にユニークな脂質代謝系があること自体、大きな発見であり、この学術的意義はきわめて大きく、内在性核内受容体リガンドの研究に大きな一石を投じることとなった。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we found and analyzed several factors that rapidly shuttle from cytoplasm into nucleus in response to mechanical stimuli. Interestingly, some of these factors are lipid metabolizing enzymes, suggesting that even in the nucleus, these enzymes constitute unique metabolic systems, by which ligands of nuclear receptors are synthesized in situ to regulate cellular energy metabolism. To uncover the nuclear lipid metabolism, we have identified many nuclear enzymes extensively. In addition, we analyzed nuclear lipids by MASS spectrometry in a semi-comprehensive way and made detailed lists of the cytoplasmic and nuclear lipids, which provide important information and insights on the nuclear lipids and their unique metabolic pathways. Our research opened a new direction and made a novel concept on the nuclear lipids, which has never been described.

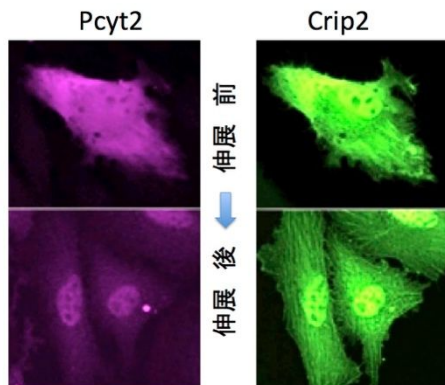
研究分野：分子生物学

キーワード：核内受容体 リガンド 核内脂質 核内脂質代謝系 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、細胞に伸展や張り応力などの力学刺激を加えた時に、どのような反応（特に、遺伝子発現の変化）が起こるかを研究してきた。その結果、力学刺激によって細胞質から核内に速やかにシャトルする因子を複数同定することができた。これらの因子は、主に転写調節因子であり、転写活性化能を有していた。しかし、転写とは全く無関係な代謝酵素にも、速やかな核内シャトルを起こすものがあることを明らかにした。

Phosphatidylethanolamine (PE) 合成系の律速酵素 Pcyt2 (Phosphate Cytidyltransferase 2, Ethanolamine) は、細胞伸展によって速やかに核内に移行する(左図)。Pcyt2 遺伝子は、すでにマウスで海外のグループによって KO されており、骨格筋での KO では、骨格筋の脂質蓄積、細胞膜リン脂質組成の変化に加え、ミトコンドリアの活性上昇(ミトコンドリアの増加と脂肪酸分解能力: oxidative capacity 増加) これに伴う運動能力/運動耐性の増加が認められる(Cell Metabolism 21, 718, 2015)。



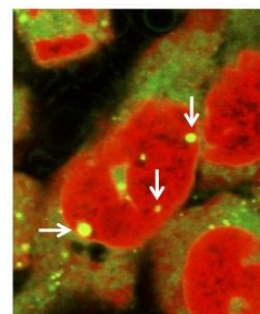
我々は、Pcyt2 の解析を進めるうちに、Pcyt2 に結合するタンパク質 Crip2 の同定に成功した。Crip2 は、LIM domain を 2 つ持つだけの小さなタンパク質であるが、この因子も伸展刺激によって Pcyt2 と共に速やかに核内に移行する(左図)。我々は、Crip2 遺伝子を KO したが、このマウスも、骨格筋が著しく赤く、そして隆々としている。皮下脂肪はほとんどなく、運動耐性も上昇していた(走行距離で約 1.5 倍走る)。

これらの知見から、核内にも脂質(とくに、Glycerophospholipid、以下 GP)代謝系が成立し、この代謝経路は力学刺激の影響を受け、骨格筋の運動能力/エネルギー代謝、とくに脂質をリガンドとする核内受容体を介する代謝調節に関与する、という仮説を立てることができる。本研究は、このような知見を背景に企画したものである。

これらの知見から、核内にも脂質(とくに、Glycerophospholipid、以下 GP)代謝系が成立し、この代謝経路は力学刺激の影響を受け、骨格筋の運動能力/エネルギー代謝、とくに脂質をリガンドとする核内受容体を介する代謝調節に関与する、という仮説を立てることができる。本研究は、このような知見を背景に企画したものである。

2. 研究の目的

では、本当に核内に脂質が存在し、その代謝系は生理的意義を持つのだろうか? まず、プロジェクトの前段階として、GP 代謝を KEGG で検索し、それぞれの酵素遺伝子を単離したり(EGFP-fusion 遺伝子を作製して細胞へ導入し、局在を調べる)、Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) で細胞内局在を検索した。その結果、GP 代謝系酵素の多くが核内にも局在することがわかった。また、脂質を Bodipy で染色したところ、核内に小さな lipid droplet が確認できた(右図)。この結果は Fujimoto らの報告と一致している。また、Fujimoto らは、核内 lipid droplet が、核内受容体の転写にも関与する PML タンパク質で被覆されていることを報告している(JCB 212, 29, 2016)。加えて、GP の一つ Phosphatidylcholine (PC) は、脂質代謝、エネルギー代謝に中心的な役割を持つ核内受容体 PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor α) の agonist であると報告されている(Cell 138, 476, 2009, Nature 502, 550, 2013)。

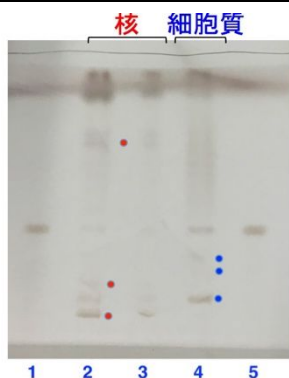


このような背景から、本申請研究では、**核内脂質の存在を証明し、とくに核内受容体による転写調節に注目してその機能的意義を解明する。**加えて、**核内脂質を質量分析で同定し、リスト化する。**

これまで、核内に lipid droplet が存在することは、少数の論文で報告されてきたが、その生理的意義は、全く不明であり、実験上の artifact であると断言する研究者までいる。加えて、核内に脂質代謝系が存在することを想定する研究者も、まずいない。この意味で、本研究は、このような先入観を打破するものである。しかも、運動などの力学刺激が核内脂質代謝系を動かし、核内で核内受容体の agonist リガンドを in situ で合成してエネルギー代謝を制御するという、全く新しいコンセプトを本研究は提唱し、実証する。本研究がもたらす帰結は、医学的にも重要であり、新しい概念を開拓するものである。

3. 研究の方法

1) 核内脂質の分析、リストアップ



我々はすでに C2C12 細胞 (Pcyt2、Crip2 などの核内シヤトルを確認した細胞) を細胞質と核に分画し、それぞれから Bligh-Dyer 法 (BD 法) を用いて脂質成分を抽出し、TLC (Thin Layer Chromatography) で解析してきた (左図)。Lane 2、3 (核成分) の赤点、lane 4 (細胞質成分) の青点に見るように、核と細胞質で、TLC 上、脂質組成に明確な差がある (lane 1、5 の spot はコントロール PE)。この差が何に起因するか、本研究で詳細な質量分析を行い、PC、PE、lysoPC、lysoPE を含む PG 以外に、Sphingomyelin、Ceramide etc まで拡大し、核脂質成分を同定し、リスト化、データベース化する。

2) 細胞の変化による脂質成分変動の把握

C2C12 細胞は、力学刺激によって骨格筋細胞に分化し (興味深いことに、力学刺激では oxidative で運動耐性 / 持久性の高い Type IIa、化学刺激では glycolytic な Type IIb が分化する; 申請者未発表データ)、誘導条件によっては脂肪細胞にも分化する。未分化 C2C12、分化させた Type IIa/IIb 細胞、脂肪細胞の 4 種について、細胞質 / 核脂質の質量分析を行い、1) に得られる脂質リストを参照しながら、変動する脂質を特定する。このデータも、リスト化、データベース化する。

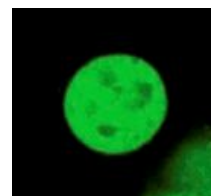
3) 生理的意義の解明 (とくに、核内受容体との関連)

a) 申請者の研究室は、すべての核内受容体 cDNA を保有している。この中から、骨格筋のエネルギー代謝、脂肪細胞分化に關与する核内受容体 (PPARs、ERRs、NR4A1-3、RXRs) について、細胞質 / 核内脂質が agonist 活性を持つかを検証する。

まず、各種 C2C12 分化細胞に各種核内受容体の ligand binding domain と GAL4 DNA 結合ドメインを融合させた effector (GAL4-NRs/LBD) と UAS-luciferase (UAS-luc) reporter を co-transfect し、dual Luciferase assay を行って、各種核内受容体の転写活性化を検証し、分化状態で変動が起こるかを見る。また、一般的に核内受容体活性測定に汎用される CV1 細胞に GAL4-NRs/LBD、UAS-luc を co-transfect して、各種分化細胞の細胞質、核から脂質を培養液に転化して、luc assay を行う。

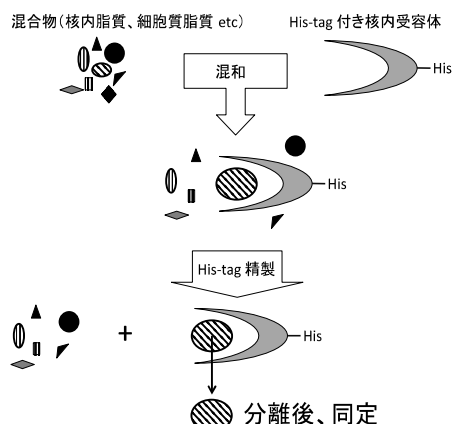
これらの実験では、PPAR α agonist である PC(34:1)、PC(36:1)、各種核内受容体の合成 agonist を positive control とする (すでに、PC を混ぜた核内脂質が PPAR α を活性化することは確認済み。これら agonist を CV1 に添加し、細胞質、核から BD 法で抽出して luc assay を行うことで、正確な positive control になる)。

b) 核局在シグナル (NLS) を付与した Pcyt2 を C2C12 細胞に発現させ、核内脂質の GP 組成に変動が起こるかを確認すると同時に、核内受容体 agonist 活性にも変化が出るかを a) の方法で検証する。これについては、PC 合成系の酵素 Pcyt1a についても行うが、Pcyt1a は、NLS を付加しなくても核に局在することをすでに確認している (右図)。また、必要に応じてノックダウン実験も行う。さらに、これまでに核内に局在することが確認された脂質代謝酵素も強制発現させて各種核内受容体活性化を見る。



c) 前述の核脂質分析で明らかとなる核特異的 / 核優位脂質について、購入可能なものについては購入して CV1 を用いた luciferase assay によるスクリーニング (a) の方法) を行い、どの核内受容体を活性化できるかを検証する。

d) Type IIa/IIb 骨格筋、脂肪細胞に分化した C2C12 細胞から細胞質 / 核脂質を調整し、これを未分化 C2C12 細胞に加えることによって、分化誘導、エネルギー代謝転換が起こるかを、



遺伝子発現、Seahorse Flux Analyzer で検証する。

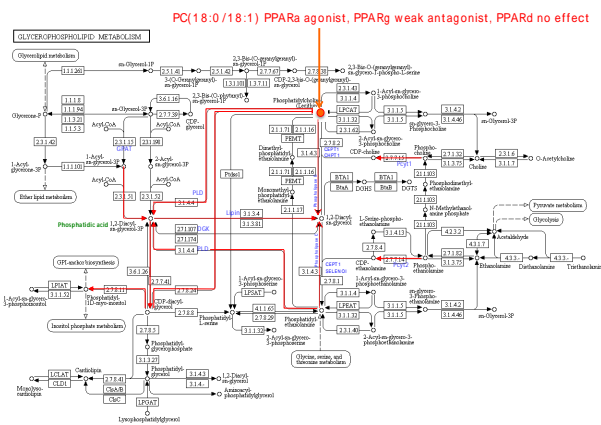
e) すでに大腸菌で各種核内受容体タンパク質を His-tag 付き発現させ、精製できるようになっている。この精製タンパク質を、抽出脂質と混ぜ、ligand 結合ドメインに結合した物質を受容体と共に再度 His-tag 精製する。BD 法で受容体に結合している脂質成分を分離、濃縮して質量分析で同定する。

f) Crip2 や Pcyt2 KO マウスの表現型からわかるように、核内脂質は骨格筋のエネルギー代謝と密接に関連しており、運動耐性 / 持久力の強化に結びつく。Oxidative で活発な代謝を有する骨格筋を持てば、もちろん健康の維持に役立つし、肥満、II 型糖尿病の予防、治療にも効果的である。また、寝たきり老人の廃

用性萎縮、老化に伴う筋萎縮にも関連する。このような視点から、本研究で同定される核脂質で核内受容体を活性化できるものについては、マウス個体への投与や骨格筋への注入によって、どのような変化が起こるかを検討する必要がある、同定された脂質は、逐次、マウス個体に用いる実験に応用する。また、tail suspension (すでに実績あり)などで廃用性萎縮に陥った骨格筋と正常細胞の核脂質の組成差、若いマウスと老齢マウスの組成差など、マウス個体を用いた実験も展開する。

4. 研究成果

1) Glycerophospholipid (GP) 代謝系



KEGG に登録されている酵素情報をもとに、GP 代謝を構成する酵素遺伝子をできるだけ多数単離し、EGFP-fusion を作製、これを培養細胞に導入した。これによって、核内にも顕著な局在をもつ酵素を同定した。核内受容体 PPAR agonist となる Phosphatidylcholine を中心とした代謝酵素が核内にも局在することがわかった (左図)。

また、脂肪酸合成系の酵素 Acetyl-CoA carboxylase beta (ACACB: Acetyl-CoA を Carboxyl 化して Maronyl-CoA を合成する酵素)の局在は興味深く、細胞

周期によって細胞質 (ミトコンドリア) とら核膜の間をシャトルする (右図)。

このような蓄積事実から、核内にも脂質代謝系が存在し得ると考えている。

2) 脂質のリストアップ, データベース化

C2C12 細胞 (Pcyt2、Crip2 などの核内シャトルを確認した細胞) を細胞質と核に分画し、それぞれから Bligh-Dyer 法 (BD 法) を用いて脂質成分を抽出し、質量分析にかけてできるだけ網羅的に検索した。分析した脂質は、Ceramide, Monohexosylceramide, Sphingomyeline, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamine, Lysophosphatidylethanolamine, Lysophosphatidylcholine, Triglyceride, Diglyceride, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserine, Acylcarnitin である。これによって、核に含まれる脂質を細胞質に含まれる脂質を分類することができた。また、C2C12 細胞の筋分化に伴う脂質変化も検出することができた。

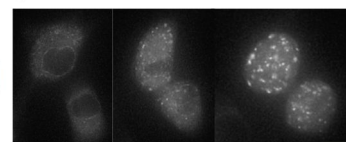
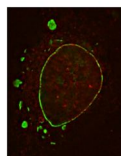
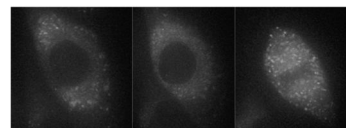
これらの膨大なデータは、のちにデータベースとして公開予定である。

3) 未知の核内受容体リガンドを書かない脂質から同定する

核内受容体として、そのリガンドに不明な点が残る PPARdelta を用いることにした。大腸菌で pET vector を用いてタンパク質を発現させ、HIS tag を用いて精製した。これを PPARdelta を活性化することがわかっているある動物種の血清とまぜ、もう一度 PPARdelta タンパク質を精製し、BD 方によって脂質成分を抽出した。抽出したサンプルを質量分析にかけ、PPARdelta に結合する脂質を同定した。

この技法をセットアップするのに時間を要した。まず、通常の実験で用いるサンプルカップを用いると、微量の脂質様成分がプラスチックから溶出して、質量分析を見にくくしている問題が確認できた。プラスチックサンプルカップの処理の仕方などを検討したが、最終的には洗浄処理したガラス試験管が最も成績が良いとわかった。

複数回、実験をトライし、網羅的な脂質解析から、PPARdelta によって濃縮する脂質があることがわかった (2 倍から 73 倍)。この中に、PPARdelta を活性化する内在性リガンドが含まれる可能性が高いが、詳細な分子同定までは到達できなかった。ただ、手法としては確立したので、将来、この方法を発展させて、新規内在性リガンド同定までできると思われる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 Al-Habsi M, Chamoto K, Matsumoto K, Nomura N, Zhang B, Sugiura Y, Sonomura K, Maharani A, Nakajima Y, Wu Y, Nomura Y, Menzies R, Tajima M, Kitaoka K, Haku Y, Delghandi S, Yurimoto K, Matsuda F, Iwata S, Ogura T, Fagarasan S, Honjo T.	4. 巻 378
2. 論文標題 Spermidine activates mitochondrial trifunctional protein and improves antitumor immunity in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eabj3510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abj3510	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 Atsushi Higashitani et al	4. 巻 1
2. 論文標題 Findings from recent studies by the Japan Aerospace Exploration Agency examining musculoskeletal atrophy in space and on Earth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj microgravity	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 Kim Sun-Yong, Mori Tomoyuki, Chek Min Fey, Furuya Shunji, Matsumoto Ken, Yajima Taisei, Ogura Toshihiko, Hakoshima Toshio	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insights into vesicle amine transport-1 (VAT-1) as a member of the NADPH-dependent quinone oxidoreductase family	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 on line
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81409-y	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 Atsushi Kubo, Keisuke Hitachi, Ryutaro Shirakawa, Toshihiko Ogura	4. 巻 8
2. 論文標題 Protective effects of Mkl1/2 against lipodystrophy and muscle atrophy via PI3K/AKT-independent FoxO repression.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv 2023.08.09.552644	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.08.09.552644	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 小椋利彦	4. 巻 4
2. 論文標題 メカニカルストレス-疾患の理解と治療法開発の新視点-	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio Clinica (監修)	6. 最初と最後の頁 1-90
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 野村 M. 慎一郎, 齋藤 明, 田中敦, 小椋利彦	4. 巻 4
2. 論文標題 人工細胞をコンテナとして用いる培養細胞操作	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 40-46
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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 筋萎縮の治療薬、及びスクリーニング方法	発明者 久保純、小椋利彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-077063	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------