

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02480

研究課題名(和文) 栄養状態によって変化するsyntaxin17の機能と機能変換機構

研究課題名(英文) Mechanism of how Stx17 changes its functions in response to nutrition status

研究代表者

多賀谷 光男 (TAGAYA, MITSUO)

東京歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：30179569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Syntaxin 17 (Stx17) は小胞体とミトコンドリアの接触領域に局在し、栄養状態に応じて局在や結合パートナーを変えることで多様な機能を発揮する。本研究では以下のことを明らかにした。(1) Stx17の局在化に重要なアミノ酸領域を同定した。(2) 富栄養状態においてStx17のSer134はリン酸化されており、飢餓によって脱リン酸化が起こるとオートファゴソームや脂肪滴の形成に働く。(3) 飢餓においてもACSL3はStx17によって活性化されて脂肪滴形成に働く。ACSL3はオートファゴソーム形成にも関与する。(4) CPT1AはStx17やACSL3のリザーバーとして働く。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体とミトコンドリアの接触領域は脂質合成に留まらず、ミトコンドリアのダイナミクス、オートファジー、インフラソームの形成などを司り、Stx17はこれらの生命現象に関与する。本研究によって、Stx17が多様な機能を発揮することができる分子的基盤の一端が明らかとなった。小胞体とミトコンドリアの接触領域は、パーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病の発症とも密接に関係しており、本研究はこれらの病気の発症機序の解明にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Syntaxin 17 (Stx17) is localized in the MAM (mitochondria-associated membrane) and mitochondria, and exhibits various functions in response to nutrient situation by binding to different partners. In this study, we obtained the following observations. (1) The localization and function of Stx17 depend on the structure of the C-terminal tail that largely varies in organisms. Lys254, the C-terminal long hydrophobic region (CHD), and its precedent positively charged residues also contribute to the determination of Stx17 localization. (2) In fed state, Stx17 at Ser134 is phosphorylated and its dephosphorylation upon starvation causes Stx17 to function in formation of autophagosomes and lipid droplets. (3) As seen in energy excess conditions, ACSL3 is activated by Stx17 to form lipid droplets upon starvation. ACSL3 also plays a role in autophagosome formation. (4) CPT1A functions as a reservoir for Stx17 and ACSL3.

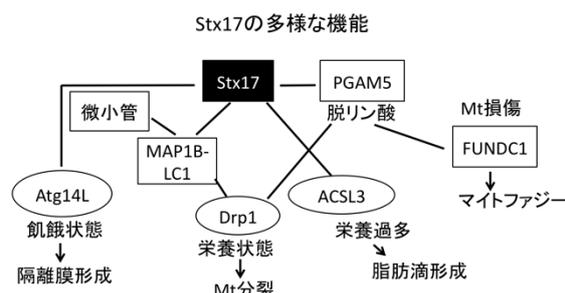
研究分野：細胞生物学

キーワード：syntaxin 17 小胞体 ミトコンドリア オートファジー 脂肪滴 リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

オルガネラは互いに連携し、栄養状態、細胞内シグナル伝達、細胞の分化・老化等に伴う環境の変化に対応している。近年、オルガネラは膜接触（近接）を介してコミュニケーションしていることが明らかとなり注目されている。接触を介しては物質は拡散希釈されず、また他の経路の基質となることが防止されて効率よく物質が輸送される。オルガネラ接触の研究は、物質代謝に空間（局所）的な視点を加え、またオルガネラ膜のダイナミズム（形態や局在）を代謝につなげて理解することを可能にする。オルガネラ間コミュニケーションの破綻は神経変性疾患等の様々な疾患を引き起こすと考えられており、膜接触の機構を解明することは基礎医学的な観点からも重要である。

オルガネラ接触の中心を成すのは、様々なオルガネラと接触している小胞体である。我々は小胞体のミトコンドリア接触領域（MAM: mitochondria-associated membrane）およびミトコンドリアに局在する SNARE タンパク質である syntaxin 17 (Stx17) が、小胞体とミトコンドリアの接触領域において、膜融合活性とは関係なく、足場タンパク質として多様な機能を発揮することを明らかにしてきた（右図、Mt: ミトコンドリア）。Stx17 は、栄養時には微小管結合タンパク質である MAP1B-LC1 との結合を介して Drp1（ミトコンドリア分裂因子）と結合し、またプロテインホスファターゼである PGAM5 とも相互作用して Drp1 の脱リン酸化・活性化を行うことでミトコンドリアの分裂を促進させている（Arasaki et al. (2015) Dev. Cell 32, 304; Sugo et al. (2018) EMBO J. 37, e98899）。一方、飢餓時には MAP1B-LC1 から解離（MAP1B-LC1 の Thr217 の脱リン酸化）して Atg14L（ホスファチジルイノシトール (PI) 3-キナーゼのサブユニット）と結合し、オートファゴソームの形成に働く（Hamasaki et al. (2013) Nature 495, 389; Arasaki et al. (2018) EMBO Rep. 19, e45584）。またオートファゴソームへと移行し、SNARE として機能してオートファゴソームとリソソームの融合を触媒する（Itakura et al. (2012) Cell 151, 1256）。栄養過多（オレイン酸添加）時には、ACSL3 (acyl-CoA synthetase 3) と結合して脂肪滴の形成を促進する（Kimura et al. (2018) J. Lipid Res. 59, 805）。すなわち、Stx17 は一種の栄養センサーであり、栄養状態に応じてその局在と結合パートナーを変えることで環境変化へ対応している。また、Stx17 がこれらの機能を発揮するためには、スフィンゴ脂質とコレステロールに富む膜の微小ドメイン（ラフト構造）が重要であることも明らかにしている（Arasaki et al. (2015) Dev. Cell 32, 304; Kimura et al. (2019) Contact 10.1177/2515256419838719）。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、栄養状態によって変化する Stx17 の機能の変換機構の解明である。Stx17 が多様な機能を発揮することができるのは、栄養状態によってその局在と結合するパートナーを変えるためであるが、その分子機構はまだ部分的（MAP1B-LC1 の関与のみ）にしかわかっていない。本研究では以下の3点について解析を進めた。

### (1) Stx17 の局在化機構

Stx17 はユニークな膜結合ドメインとそれに続く C 末端テイルを有しており、それらの構造が Stx17 の局在化にどのように貢献しているかを解明する。

### (2) Stx17 のリン酸化による機能の調節

予備実験から、Stx17 は複数箇所でもリン酸化を受けることが判明しており、リン酸化と結合パートナーの変化および機能変換について解明する。

### (3) Stx17 結合タンパク質の機能

Stx17 結合タンパク質としては数十の候補を同定しているが、脂肪酸  $\beta$  酸化の律速酵素である CPT1A (carnitine palmitoyltransferase 1A) と Stx17 との結合は栄養依存的であることは既に予備実験から判明しており、この結合と解離の意義を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 生化学的手法

脂質結合実験に用いた Stx17 は、マルトース結合タンパク質 (MBP) のタグを付加し、組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、アミロース樹脂を用いて精製した。脂質との結合は PIP ストリップおよびリポソームを用いたフローテーション法を用いて調べた。タンパク質の結合実験は、主に FLAG タグを結合させたタンパク質を 293T 細胞に発現させ、抗 FLAG M2 ビーズを用いて免疫沈降を行った。結合解析には proximity ligation assay (PLA) も用いた。Stx17 結合タンパク質および Stx17 のリン酸化部位の同定は理化学研究所の堂前直博士に行っていた。

#### (2) 細胞生物学手法

培養細胞としては主に HeLa 細胞を用いた。RNAi は合成オリゴ RNA を用いて行い、その特異性は複数のオリゴ RNA を用いるか、あるいはオリゴ RNA 耐性の cDNA を発現させて、発現抑制の効果が特異的であることを確認した。

#### (3) 個体レベルの解析

ショウジョウバエを用いた解析は順天堂大学医学部の今居譲博士、井下強博士、服部信孝博士に行っていた。線虫を用いた解析は群馬大学生体調節研究所の佐々木妙子博士、佐藤美由紀博士に行っていた。

#### (4) 顕微鏡による解析

蛍光顕微鏡解析には主にオリンパス FluoView 1200 を用いた。電子顕微鏡解析 (CLEM) は福島県立医科大学の植村武文博士、和栗聡博士に行っていた。

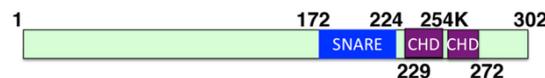
### 4. 研究成果

#### (1) Stx17 の局在化機構

##### ① 異生物種 Stx17 を用いた解析

SNARE である syntaxin は II 型の膜タンパク質であり、通常、C 末端領域に 60~70 アミノ酸からなる SNARE モチーフとそれに引き続く 1 つの膜貫通ドメイン (17~24 アミノ酸) を有する。しかしながら、哺乳類 Stx17 には膜貫通ドメインはなく、代わりにヘアピン構造を有し、Lys254 で分断される Gly に富んだ疎水性領域 (CHD: C-terminal hydrophobic domain) が存在する。

Stx17 のドメイン構造



ヒト Stx17 は、CHD に続いて塩基性アミノ酸に富んだ長い C 末端テイルを有するが、線虫 Stx17 の C 末端テイルは短く、ハエ Stx17 は酸性アミノ酸に富む長い C 末端テイルを有する。

種々の生物の Stx17 の SNARE モチーフと CHD および C 末端テイル (C)

SNARE motif		157	224		
<i>H. sapiens</i>	YALPEIPQDQ-NAAESWETLEADLIELSQLVTFPSLLVNSQQEKIDSIADHVNSAAVNVEEGTKNLGKA				
<i>C. elegans</i>	NELRQLADDMKERAEATVKIEKDMADLEKIFQELGRIVHEQHDVVDSEEQVERATEDVKRGNENLKKA				
<i>D. melanogaster</i>	LEEHQLAQRQ-ACLDQMENLQQEIIYDLHGFMFQGMRLTAEQSVAVEKIADNAEEALENVQQGELNLRRA				
	: : : : : *	: : : *	: : : *		
CHD + C		229	254	272	302
<i>H. Sapiens</i>	LAALPVAGALIGGMVGGPIGLLAGFKVAGIAAALGGVGLGFTGGKLIQRKKQKMEKLTSSCPDLPSQTDKRC				
<i>C. elegans</i>	AKAPLYAGVVGGLAVGGPVGGLAAGSAIAGIAAGVGGGLVATIIYTGKFFKRSATSD				
<i>D. melanogaster</i>	KAMYPVVGALLGTCVGGPIGLVAGMKAGGLAA-VGCGILGFTGGSVLKANPNVMHGNIEE EQVPEPDESTERLELKEKPE				
	.*: * ****:* * :.*** : * : * : : *				

塩基性アミノ酸 (赤)、酸性アミノ酸 (青)、保存されたアミノ酸 (緑)

HeLa 細胞に発現させると、ヒト Stx17 は内在性タンパク質と同様に MAM およびミトコンドリアに局在したが、線虫 Stx17 はミトコンドリアのみに、ハエ Stx17 はもっぱらサイトゾルに局在した。異生物のキメラタンパク質やヒト Stx17 の欠失変異体を用いて解析したところ、C 末端テイルが主に局在を決定していることが判明した。ヒト Stx17 はミトコンドリア分裂、オートファゴソーム形成、脂肪滴形成に関与しており、RNAi 法によって HeLa 細胞から Stx17 を除去するとこれらの活性は失われる。Stx17 ノックダウン細胞に線虫およびハエ Stx17 を発現させると、ミトコンドリアの分裂は線虫 Stx17 の発現によって回復し、またオートファゴソーム形成はハエ Stx17 の発現によって回復した。これらの結果と一致して、線虫 Stx17 はミトコンドリア分裂因子 Drp1 と、ハエ Stx17 はオートファゴソーム形成因子 Atg14L と相互作用した。一方、線虫 Stx17 の発現によってオートファゴソームは形成されず、ハエ Stx17 の発現によってミトコンドリアは分裂しなかった。脂肪滴は両方の生物種の Stx17 の発現によって形成された。個体を用いた実験からも、線虫 Stx17 はオートファジーに関与しないことが示された。ハエ由来の S2 細胞を用いた実験から、ハエ Stx17 は飢餓となるとサイトゾルから膜へと移行し、また個体を用いた実験からハエ Stx17 はミトコンドリアの分裂には関与していないことが示された。

以上の結果は既に論文として公表されている (Kato et al. (2021) J. Cell Sci. 134, jcs258699)

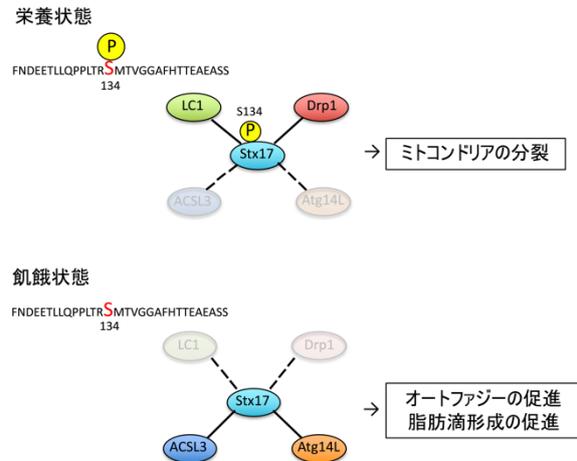
## ②精製タンパク質を用いた Stx17 と脂質の相互作用

精製タンパク質と PIP ストリップを用いた実験から、Stx17 はミトコンドリアに局在するカルジオリピンおよび PI4-リン酸に結合する可能性が示唆された。そこで精製タンパク質とリポソームを混合し、ショ糖濃度勾配を用いた遠心分離でリポソームを浮遊させた（リポソームフローテーションアッセイ）。Stx17 はホスファチジルコリン (PC) /ホスファチジルエタノールアミン (PE) から成るリポソーム (PC/PE リポソーム) には結合しなかったが、これにカルジオリピン、その前駆体のホスファチジン酸、または PI4-リン酸を加えると結合した。Lys254 は Stx17 の MAM 局在において重要であるが (Arasaki et al. (2015) Dev. Cell 32, 304)、Lys254 を Cys に変えた変異体ではカルジオリピン/ホスファチジン酸含有リポソームとの結合は減弱した。CHD ドメインのみの変異体は PC/PE リポソームとも結合し、CHD は非特異的に膜に結合することが示唆された。CHD の領域に C 末端テイルを付け加えた変異体 (CHD+C) を用いて結合実験を行ったところ、PC/PE リポソームへの結合は見られず、C 末端テイルが脂質結合の特異性を決めている領域の一つであることが判明した。また、SNARE モチーフと CHD の間に存在する Lys223、226、228 もカルジオリピンおよびホスファチジン酸との結合に関与していることも判明した。

以上の結果から、これらの脂質との結合によって Stx17 の局在が調節されている可能性が考えられた。

### (2) Stx17 のリン酸化による機能の調節

Stx17 は SDS-PAGE において複数のバンドで検出されることからリン酸化されていることが推測されていたが、Deretic のグループは TBK1 によって Ser202 がリン酸化されてオートファジーに関与することを報告した (Kumar et al. (2019) Dev. Cell 49, 130)。また Ser2 (Saleeb et al. (2019) J. Biol. Chem. 294, 4188) や Ser289 (PhosphoSitePlus データベース) のリン酸化も報告されていた (Ser289 のリン酸化については、本研究中に報告された (Wang et al. (2023) J. Cell Biol. 222, e202211025))。リン酸化 Stx17 を質量分析法で解析したところ、Ser2、Ser134、Thr136、Ser202、Ser289 がリン酸化されていることが推定された。これらの部位に関して擬似リン酸化変異体 (Ser/Thr を Asp/Glu に置換) および非リン酸化変異体 (Ser/Thr を Ala に置換) を作製して HeLa 細胞に発現させた。野生型 Stx17 はミトコンドリア/小胞体様の局在を示すが、S134A 変異体は野生型とは異なりドット状の構造を形成し、そのドット構造にはオートファゴソームマーカーである LC3 が含まれていた。この結果は、S134A 変異体の発現によって飢餓状態でないにもかかわらずオートファゴソームが形成されたことを示唆している。S134A 変異体と Stx17 結合タンパク質の相互作用を PLA で調べたところ、飢餓時と同様に MAP1B-LC1 (Drp1 と Stx17 を繋ぐタンパク質) との近接は減少し、一方、Atg14L との近接は増加しており、オートファゴソーム形成の結果と合致した。また S134A 変異体を発現させると脂肪滴が形成され、ACSL3 との近接も増加していた。富栄養状態で Ser134 がリン酸化されていることは、Ser134 リン酸化ペプチドを認識する抗体で確認され、リン酸化の程度は飢餓によって減少した。以上の結果から右図のようなモデルが考えられた。



Stx17 をリン酸化するキナーゼの候補としては Stx17 結合タンパク質として同定された NDR1 (別名 STK38) が考えられた。その過剰発現で Ser134 のリン酸化は亢進し、一方、発現抑制するとリン酸化の程度は減少した。NDR1 が直接的に Stx17 のリン酸化に関与しているかどうかは、精製タンパク質を用いたリン酸化実験によって明らかとなると思われる。

### (3) Stx17 結合タンパク質の機能

#### ①飢餓時における ACSL3 の活性化

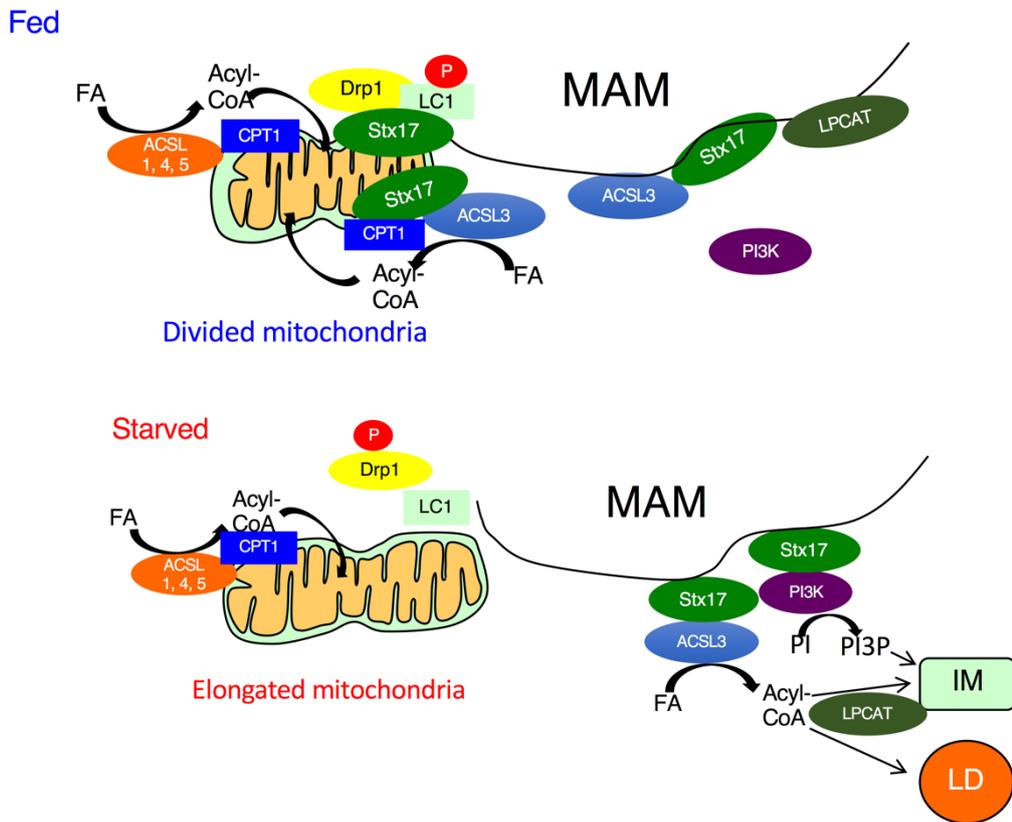
上述したように、Stx17 は栄養過多 (培養細胞ではオレイン酸の添加) 時のみならず、飢餓時においても ACSL3 と相互作用して脂肪滴形成を司る。飢餓時に脂肪滴が形成される理由は、オートファジーによって生成した過剰な脂肪酸がミトコンドリア内でアシルカルニチンへと変換されると細胞毒性を示すために、脂肪酸を脂肪滴に保存しておくためと考えられている (Nguyen et al. (2017) Dev. Cell 42, 9)。

ACSL3 が飢餓時にも活性化されることから、ACSL3 のオートファジーにおける役割を解析した。先行研究によって、ACSL3 のアイソザイムである ACSL4/酵母 Faa1 がリン脂質の de novo 合成を行うことでオートファゴソーム形成に関与することが報告されていた (Schutter et al. (2020) Cell 180, 135)。解析の結果、ACSL3 も融合可能なオートファゴソームの形成に関与するが、その段階は ACSL4 とは異なることが判明した。また、ACSL4 は LC3 の脂質化 (PE 付加) に関与していることも明らかとなった。

②Stx17 と CPT1A の相互作用

Stx17 結合タンパク質として見い出されていた CPT1A について解析を進めた。CPT1A は N 末端側に 2 つの膜貫通ドメインを有するミトコンドリア外膜タンパク質であり、脂肪酸をアシルカルニチンへと変換する酵素である。結合実験から、両者の結合には Stx17 の CHD と CPT1A の膜貫通ドメインが関与することがわかった。この結合は飢餓状態においては消失することから、飢餓における Stx17 と CPT1A の解離の意義を調べた。CPT1A を RNAi 法によって発現抑制すると、富栄養状態にもかかわらずオートファジーが亢進し、脂肪滴が形成された。この効果が CPT1A の酵素活性に依存するかどうかを、阻害剤である etomoxir で調べたところ、オートファジーの亢進は酵素活性には依存していないことが判明した。オートファゴソームおよび脂肪滴の形成と合致して、CPT1A の発現抑制によって Stx17 と Atg14L、VAMP8 (Stx17 と共にオートファゴソームとリソソームの融合に関与する SNARE)、ACSL3 との近接が増加していた。また、CPT1A の発現抑制によって Stx17 と ACSL3 の近接も上昇した。一方、発現抑制とは反対に、CPT1A を過剰発現させると飢餓によるオートファゴソーム形成は抑制された。ACSL3 も CPT1A と結合しており、飢餓によって両者は解離した。ACSL1、4、5 も CPT1A との結合が認められたが、その結合は飢餓によって影響されなかった。以上の結果から、富栄養時には CPT1A は Stx17 や ACSL3 のリザーバーとして働いており、飢餓時にはそれらを遊離させてオートファジーと脂肪滴の形成を促進しているというモデルが考えられた (下図)。

CPT1A の Stx17 および ACSL3 のリザーバーとしての役割



FA (脂肪酸)、IM (隔離膜)、LC1 (MAP1B-LC1)、LD (脂肪滴)、PI3K (PI3-キナーゼ)、LPCAT (リゾ PC アシルトランスフェラーゼ)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kato, S., et al.	4. 巻 134
2. 論文標題 Syntaxin 17, an ancient SNARE paralog, plays different and conserved roles in different organism.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs258699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258699	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kato, S., Arasaki, K., and Tagaya, M.
2. 発表標題 Different roles of ACSL3 and ACSL4 in autophagosome formation
3. 学会等名 EMBO Workshop "The endoplasmic reticulum: The master regulator of membrane trafficking" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wakana, Y., Campelo, F., and Tagaya, M.
2. 発表標題 The ER cholesterol sensor SCAP promotes CARTS biogenesis from the TGN through ER-Golgi membrane contact sites
3. 学会等名 EMBO Workshop "The endoplasmic reticulum: The master regulator of membrane trafficking" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤駿、新崎恒平、多賀谷光男
2. 発表標題 Acyl-CoA合成酵素ACSL3のオートファゴソーム形成への関与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤駿、新崎恒平、多賀谷光男
2. 発表標題 Acyl-CoA合成酵素ACSL3のオートファゴソーム形成への関与
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
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
研究分担者	井上 弘樹  (INOUE HIROKI)  (10294448)	東京薬科大学・生命科学部・講師   (32659)	
研究分担者	若菜 裕一  (YUICHI WAKANA)  (90635187)	東京薬科大学・生命科学部・助教   (32659)	

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
---------	---------