

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460060

研究課題名(和文) 膜リン脂質 飽和脂肪酸鎖による小胞体ストレス応答活性化機構の解明

研究課題名(英文) Activation mechanism of unfolded protein response by membrane lipid saturation

研究代表者

河野 望 (Kono, Nozomu)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：50451852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜リン脂質中の飽和脂肪酸の増加(膜リン脂質飽和化)によりIRE1、PERKが活性化する一方で、ATF6は活性化しないことが明らかとなった。さらに異常タンパク質蓄積時には、IRE1が高度に多量体化(クラスター化)し活性化するのに対し、膜リン脂質飽和化時にはクラスター化せずに活性化することを見出した。すなわち、膜リン脂質飽和化によるIRE1の活性化は異常タンパク質の蓄積によるものと質的に異なることが示唆された。また膜リン脂質飽和化によるUPR活性化に関わる小胞体膜タンパク質の解析から、膜リン脂質飽和化に対する恒常性維持機構の存在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Increased levels of saturated fatty acids in membrane phospholipids (membrane lipid saturation) activated IRE1 and PERK, but did not activate ATF6. A conventional ER stressor induced clustering of fluorescently tagged IRE1 fusion protein, but membrane lipid saturation did not. These results suggest membrane lipid saturation and unfolded proteins activate the UPR through different mechanisms. Analysis of an ER membrane protein involved in the UPR activation upon membrane lipid saturation revealed a homeostatic mechanism against membrane lipid saturation.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リン脂質 脂肪酸 小胞体ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

肥満の進行に伴い、高血圧症、インスリン抵抗性、糖尿病および冠動脈性心疾患の危険性が高くなることが知られており、肥満はいわゆるメタボリックシンドロームの発症と密接に関係している。肥満の進行により脂肪組織に過剰に蓄積した脂肪は、その分解により多量の遊離脂肪酸を血中に放出し、高脂肪酸血症を呈する。高濃度の血中遊離脂肪酸は脂肪組織以外の細胞に取り込まれることにより、細胞障害や細胞死を引き起こす。この現象は脂肪毒性 (Lipotoxicity) と呼ばれ、膵臓、肝臓、心臓および骨格筋など様々な臓器で起こり、インスリン抵抗性、メタボリックシンドロームと密接に関わっている。近年、培養細胞を用いた解析から、脂肪毒性は遊離脂肪酸の中でもパルミチン酸などの飽和脂肪酸によって引き起こされること、飽和脂肪酸は細胞死のみならず、小胞体ストレス応答 (UPR: Unfolded Protein Response) を引き起こすことが明らかとなっており、脂肪毒性が引き起こす病態において、飽和脂肪酸により誘導される UPR の関与が非常に注目されている。しかし、飽和脂肪酸によってどのように UPR 経路が活性化するのか、その詳細は不明であった。研究開始当初、研究代表者は、リン脂質中の飽和脂肪酸鎖の増加 (膜リン脂質飽和化) により、UPR のセンサータンパク質である IRE1、PERK の活性化がおこることを見いだしていた。また膜リン脂質飽和化による UPR 活性化に関わる小胞体膜タンパク質として ERUMS (ER-membrane protein required for UPR induced by membrane lipid saturation) を同定していた。

2. 研究の目的

本研究では、ERUMS の作用機構を詳細に解析するとともに、膜リン脂質飽和化による UPR 活性化に関わる IRE1、PERK の相互作用分子をさらに同定することにより、脂肪毒性発症の分子メカニズムに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

HeLa 細胞、もしくはマウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) に対して飽和脂肪酸、もしくは SCD (stearoyl-CoA desaturase) 阻害剤を培地中に添加することにより、膜リン脂質飽和化を誘導した。UPR の活性化は、CHOP や DNAJB9 などの UPR 下流遺伝子の定量 PCR や UPR センサータンパク質のウェスタンブロットによりおこなった。IRE1 のクラスター化は、蛍光タンパク質を付加した IRE1 を HeLa 細胞に発現させ、共焦点顕微鏡下で観察した。キナーゼ阻害剤のスクリーニングは、購入可能な約 100 種類のキナーゼ阻害剤の効果を定量 PCR により評価することでおこなった。IRE1 相互作用タンパク質の同定は、IRE1 欠損 MEF 細胞にレトロウ

イルスで TAP (tandem affinity purification) タグを付加した IRE1 を導入し、安定発現細胞を樹立した後、その細胞から IRE1 をタンデムアフィニティー精製し、共沈降物を LC-MS/MS で解析することによりおこなった。

4. 研究成果

(1) 膜リン脂質飽和化による UPR 活性化の性状解析

膜リン脂質飽和化と異常タンパク質の蓄積による UPR 活性化の比較解析をおこなった。その結果、膜リン脂質飽和化時には IRE1、PERK が活性化する一方で、ATF6 は活性化しないことが明らかとなった (異常タンパク質の蓄積時には IRE1、PERK、ATF6 すべてが活性化)。さらに異常タンパク質蓄積時には、IRE1 が高度に多量体化 (クラスター化) し活性化するのに対し、膜リン脂質飽和化時にはクラスター化せずに活性化することを見出した。すなわち、膜リン脂質飽和化による IRE1 の活性化は異常タンパク質の蓄積によるものと質的に異なることが示唆された。さらにキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた IRE1 の活性化に関わるキナーゼのスクリーニングを行ったところ、PKC の阻害剤が膜リン脂質飽和化による IRE1 の活性化を選択的に抑制することを見出した。

(2) ERUMS の機能解析

ERUMS 欠損 MEF を樹立し、解析したところ、ERUMS 欠損 MEF では膜リン脂質飽和化による UPR の活性化が著しく抑制されていた。一方、ツニカマイシンによる UPR には ERUMS 欠損の影響はなかった。この ERUMS 欠損 MEF に、レトロウイルスにより ERUMS を安定発現させたところ、膜リン脂質飽和化による UPR の活性化が野生型 MEF と同様にみられた。このことから、ERUMS が膜リン脂質飽和化による UPR の活性化に関与する分子であることが明らかとなった。

この ERUMS 欠損 MEF、ERUMS 発現抑制細胞の性状解析をおこなったところ、脂肪滴の形成が亢進していることを見出した。そこでトリグリセリド合成酵素を発現抑制したところ、ERUMS の発現抑制細胞でみられた膜リン脂質飽和化による UPR 活性化の抑制が解除された。このことから、ERUMS の発現抑制により、飽和脂肪酸のトリグリセリドへの取り込みが亢進し、膜リン脂質飽和化が抑制された結果、UPR が抑制されたことが示唆された。すなわち、飽和脂肪酸による UPR の活性化が膜リン脂質飽和化によって起こることがさらに支持された。ERUMS に対するモノクローナル抗体を樹立し、ERUMS のタンパク質を検出したところ、膜リン脂質飽和化時に ERUMS タンパク質がユビキチン・プロテアソーム系により分解されることが明らかとなった。このことから、

膜リン脂質飽和化時に ERUMS が分解され、トリグリセリド合成を制御することで膜リン脂質の飽和化を抑制するという恒常性維持機構が示唆された。

(3) IRE1 相互作用タンパク質の同定・解析

UPR センサータンパク質のうち、真核生物に高度に保存された IRE1 に着目し、相互作用タンパク質の探索を行った。まず、IRE1 欠損 MEF 細胞にレトロウイルスで TAP (tandem affinity purification) タグを付加した IRE を導入し、刺激依存的な活性化がみられる細胞株を確立した。この細胞株においても、異常タンパク質の蓄積により IRE1 のクラスター化がみられる一方、膜脂肪酸の飽和化時には IRE1 のクラスター化はみられなかった。この細胞株から IRE1 を TAP 法により精製し、共沈降物を LC-MS/MS により解析した結果、複数の IRE1 結合分子を同定した。同定した結合タンパク質のうちの 1 つである ANXA2 を発現抑制したところ、膜リン脂質の飽和化 IRE1 依存的な遺伝子発現誘導が抑制された。一方、ANXA2 の発現抑制はツニカマイシンによる IRE1 依存的な遺伝子発現誘導には影響しなかった。このことから、ANXA2 が膜リン脂質の飽和化 IRE1 の活性化に関わることが示唆された。

以上のように、本研究から膜リン脂質飽和化による UPR 活性化が、異常タンパク質蓄積によるものと質的に異なることが明らかとなり、膜リン脂質飽和化による UPR 活性化に選択的に関わる分子の候補を見出した。また膜リン脂質飽和化に対する恒常性維持機構の存在が明らかとなった。本研究の成果を基盤に今後膜リン脂質飽和化による UPR 活性化の分子機構とその生理学的・病態生理学的意義が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. Akagi S, Kono N, Ariyama H, Shindou H, Shimizu T, Arai H, Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protects against cytotoxicity induced by polyunsaturated fatty acids, *FASEB J*, 査読あり, 30 巻, 2016, 1-13
DOI: 10.1096/fj.201500149
2. 河野 望, 新井 洋由, 飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答の活性化, *BIO Clinica*, 査読なし, 30 巻, 2015, 737-741
3. 大場 陽介 河野 望, 新井 洋由, リン脂質脂肪酸鎖メタボロームと代謝疾患、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読なし、41 巻、2015、341-346
4. 大場 陽介, 河野 望, 脂質異常とオルガネラストレス、医学のあゆみ、査読なし、254 巻、2015、382-388
5. Kono N, Arai H、Intracellular Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Type II: A Unique Cellular Phospholipase A2 That Hydrolyzes Oxidatively Modified Phospholipids, *Enzymes*, 査読あり、38 巻、2015、43-54
DOI: 10.1016/bs.enz.2015.09.008.
6. 河野 望, 新井 洋由, 脂質輸送タンパク質による細胞内脂質輸送機構の最前線、*ファルマシア*, 査読あり、134 巻、2014、290-294
7. 河野 望, 新井 洋由, 膜脂質飽和化による小胞体ストレス応答の活性化、*実験医学*, 査読なし、32 巻、2014、2208-2213
8. Kono N, Arai H、Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E, *Traffic*, 査読あり、16 巻、2014、19-34
DOI: 10.1111/tra.12231
9. Ogasawara Y, Itakura E, Kono N, Mizushima N, Arai H, Nara A, Mizukami T, Yamamoto A、Stearoyl-CoA desaturase 1 activity is required for autophagosome formation, *J Biol Chem*, 査読あり、289 巻、2014、23938-23950
DOI: 10.1074/jbc.M114.591065
10. 河野 望, 新井 洋由, 飽和脂肪酸と小胞体ストレス応答、*医学のあゆみ*、査読なし、248 巻、2014、1178-1183
11. 河野 望, 新井 洋由, 生体膜リン脂質脂肪酸鎖の多様性形成・維持機構とその破綻、*内分泌・糖尿病・代謝内科*、査読なし、36 巻、2013、479-484
12. Shen H, Eguchi K, Kono N, Fujiu K, Matsumoto S, Shibata M, Oishi-Tanaka Y, Komuro I, Arai H, Nagai R, Manabe I, Saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promoting smooth muscle phenotypic modulation、*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読あり、33 巻、2013、2596-2607
DOI: 10.1161/ATVBAHA."
13. Kitai Y, Ariyama H, Kono N, Oikawa D, Iwawaki T, Arai H、Membrane lipid saturation activates IRE1 without inducing clustering、*Genes Cells*, 査読あり、18 巻、2013、798-809
DOI: 10.1111/gtc.12074.
14. Kono N, Ohto U, Hiramatsu T, Urabe M, Uchida Y, Satow Y, Arai H、Impaired -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency, *Science*, 査読あり、340 巻、2013、1106-1110

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 北井 祐人、IRE1 の活性化依存的に結合・解離する IRE1 結合タンパク質の同定、BMB2015、2015 年 12 月 01 日～04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
2. 菅原 礼、SREBP 経路を介した飽和脂肪酸毒性の防御機構、BMB2015、2015 年 12 月 01 日～04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
3. 大場 陽介、小胞体ストレス応答分子 IRE1 を介した膜脂肪酸ストレス応答機構の解明、BMB2015、2015 年 12 月 01 日～04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
4. 赤木 聡介、LPCAT1 は PUFA による細胞毒性を抑制する、BMB2015、2015 年 12 月 01 日～04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
5. 栗原 大輔、飽和脂肪酸含有リン脂質による炎症・ストレス応答の誘導、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 09 月 17 日～18 日、神戸学院大学(兵庫県神戸市)
6. 赤木 聡介、LPCAT1 は PUFA による細胞毒性を抑制する、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 09 月 17 日～18 日、神戸学院大学(兵庫県神戸市)
7. 菅原 礼、飽和脂肪酸毒性の新規抑制因子の同定、第 14 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015、2015 年 09 月 12 日～13 日、千葉大学(千葉県千葉市)
8. 栗原 大輔、飽和脂肪酸含有リン脂質による炎症・ストレス応答の誘導、第 15 回 東京大学 生命科学シンポジウム、42162、東京大学(東京都文京区)
9. 赤木 聡介、Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protects against cytotoxicity induced by polyunsaturated fatty acids、第 15 回 東京大学 生命科学シンポジウム、42162、東京大学(東京都文京区)
10. 大場 陽介、小胞体ストレス応答分子 IRE1 を介した膜脂肪酸ストレス応答機構、第 57 回日本脂質生化学会、2015 年 05 月 28 日～29 日、一橋講堂(東京都千代田区)
11. Yuto Kitai、Unfolded protein response is differently activated by membrane lipid saturation and unfolded proteins in the endoplasmic reticulum、Keystone Symposia meeting The Crossroads of Lipid Metabolism and Diabetes、2015 年 04 月 19 日～23 日、Copenhagen (Denmark)
12. Yuto Kitai、Unfolded protein response is differently activated by membrane lipid saturation and unfolded proteins in the endoplasmic reticulum、6th International Conference Phospholipase A2 and Lipid Mediators、2015 年 02 月 10 日～15 日、京王プラザ(東京都新宿区)
13. 中村 将吾、飽和脂肪酸毒性に關与する新規因子の同定、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～18 日、国立京都国際会館(京都府京都市)
14. Nozomu Kono、Unfolded protein response is differently activated by membrane lipid saturation and unfolded proteins in the endoplasmic reticulum、2014 FASEB Summer Research Conference: Phospholipid Cell Signaling and Metabolism in Inflammation and Cancer、2014 年 06 月 01 日～06 日、Niagara falls (USA)
15. 中村 将吾、膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い、フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013 年 09 月 13 日～14 日、九州大学(福岡県福岡市)
16. 北井 祐人、膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い、第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 09 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
17. 河野 望、小胞体ストレス応答タンパク質 IRE-1 を介した飽和脂肪酸代謝制御、第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 09 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
18. 北井 祐人、膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い、平成 25 年度 日本生化学会関東支部例会、41440、山梨大学(山梨県中央市)
19. 北井 祐人、膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い、第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、41433、東京大学(東京都文京区)
20. 北井 祐人、膜脂肪酸飽和化と異常タンパク質蓄積による小胞体ストレス応答の違い、第 55 回 日本脂質生化学会、2013 年 06 月 06 日～07 日、大観荘(宮城県松島町)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 望 (KONO, Nozomu)
東京大学・大学院薬学系研究科・講師
研究者番号：50451852

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：