

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460086

研究課題名(和文) CERTとVAPの相互作用制御に関する研究 ～もたらす因子、もたらされる結果～

研究課題名(英文) Research of the regulatory mechanism of CERT-VAP interaction, from the causing factors to the caused effects.

研究代表者

熊谷 圭悟 (KUMAGAI, KEIGO)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：40443105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、キナーゼに対するsiRNAライブラリーを用いてその発現を抑制した際に、セラミド輸送タンパク質(CERT)の315番目のセリン残基(S315)に変化をもたらす因子の探索を目指した。解析の結果、ある種のストレス応答性キナーゼの発現を抑制すると、CERT S315のリン酸化が低下することを明らかにした。また、当該キナーゼのシグナル伝達経路から推測し、CERT S315のリン酸化を大きく亢進させる環境要因について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, I tried to identify a kinase that changes the phosphorylation state of serine 315 (S315) of ceramide transport protein (CERT) when its expression level is suppressed by transfection of siRNA library. As a result, I showed that suppressed expression of a certain stress-responsive kinase decreased the phosphorylation state of CERT S315. From the information about the kinase, I speculated that an environmental factor might be involved in phospho-regulation of CERT and experimentally showed that the factor critically up-regulated the phosphorylation state of CERT S315.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂質輸送 セラミド スフィンゴリエリン FFATモチーフ リン酸化 メンブレンコンタクトサイト
クラミジア

1. 研究開始当初の背景

セラミド輸送タンパク質 (CERT) はセラミドを小胞体 (ER) からゴルジ体へ輸送するタンパク質である。セラミドは ER で合成されたのち、CERT によってゴルジ体のトランス領域へと輸送され、そこに局在するスフィンゴミエリン合成酵素によってスフィンゴミエリンに変換される。

CERT によるセラミド輸送は、セラミド輸送能力を有するドメイン (START) と、対象オルガネラを特定するドメイン (PH, FFAT) の協調的作用によって実現する。CERT の C 末にはセラミドの膜間輸送を行う START ドメインが存在するが、このドメイン単独では ER からゴルジ体へのセラミド輸送はほとんど起こらない。CERT が効率的にセラミド輸送を行うためには、PH ドメインと FFAT モチーフが必要となる。PH ドメインはゴルジ体に多く存在する PI4P との結合を介して CERT をゴルジ体に局在化させる。また、FFAT モチーフは ER の膜タンパク質である VAP によって認識されるため、FFAT モチーフと VAP との結合を介して CERT は ER 膜と相互作用する。PH ドメインと FFAT モチーフの機能により相互作用するオルガネラが ER とゴルジ体に限定された結果、CERT による ER からゴルジ体へのセラミド輸送効率は著しく向上する。更に、CERT は PH ドメインと FFAT モチーフを同一分子上に有するため、ER 膜とゴルジ体膜の間に弱い架橋構造を作り出し、メンブレンコンタクトサイトの形成・維持に関与すると考えられている。また、クラミジア・トラコマティスに感染した際に形成される封入体膜では、クラミジアの IncD タンパク質の作用により CERT が封入体膜にリクルートされ、それによって封入体膜と ER 膜との間でメンブレンコンタクトサイトが形成される、という例も知られている。メンブレンコンタクトサイトは脂質、イオンなどの低分子化合物をオルガネラ間で輸送する際の効率を高めている。CERT のように異なる二つのオルガネラ間を弱く架橋する脂質輸送タンパク質が他にも複数知られており、これらの因子もそれぞれの場所でメンブレンコンタクトサイトの形成と維持に関わっていることが報告されている。しかし、メンブレンコンタクトサイトの形成がどのように制御されているのかは、未だ不明な点が多い。

CERT の PH ドメインや FFAT モチーフはリン酸化による活性の制御を受けている。我々は以前、セリンリピートモチーフ (SR モチーフ) と呼ばれる領域がリン酸化されると PH ドメインや START ドメインの機能が抑制され (FFAT モチーフの機能に対しては、当時は不変と結論付けた) セラミド輸送が抑制されることを明らかにした。通常の細胞培養条件下では、SR モチーフはリン酸化修飾を受けて CERT の活性は抑制されている。しかし、培養細胞に対して、コレステロールを引き抜く処理やスフィンゴミエリンを減少させる

処理を行うと、SR モチーフは脱リン酸化され、CERT によるセラミド輸送の抑制が解除される (J. Biol. Chem. 282. 17758-17766 (2007))。一方、SR モチーフとは異なる位置にも CERT の活性を制御するリン酸化サイトがあることが分かっていた。CERT の 315 番目のセリン (S315) がリン酸化されると、FFAT モチーフの担う機能、即ち、CERT と VAP-A との相互作用が増強する。S315 のリン酸化は PH ドメインや START ドメインの担う機能にはほとんど影響を与えない。

上述のように CERT には SR モチーフと S315 という 2 つの制御機構が存在するが、本研究課題を開始する時点では、SR モチーフのリン酸化と S315 のリン酸化との関係性についての統一的な理解はなかった。また、S315 のリン酸化を担うキナーゼについても全く分かっていなかった。S315 のリン酸化を変動させる要因として、細胞のコレステロールやスフィンゴミエリンの量的変動などが分っていたが、その変動率が小さいことから、本当の変動要因は別にあるのだらうと予測されていた。

2. 研究の目的

現在メンブレンコンタクトサイトの形成因子が多数同定されつつあるが、メンブレンコンタクトサイトの形成制御機構についてはあまりよく分かっていない。少し想像してみると、細胞がメンブレンコンタクトサイトを制御する際に、PI4P や VAP 等の多岐にわたって役割を果たす分子を変動させてしまえば、様々な事象が波及的に起きてしまい大変不都合であろう。一方、脂質輸送タンパク質の活性制御をメンブレンコンタクトサイトの形成制御に利用すれば、脂質の輸送が必要もしくは不必要となった時に限ってメンブレンコンタクトサイトを調節することが可能となり、好都合であろう。我々が過去に報告した、SR モチーフのリン酸化による CERT の活性制御に関する研究結果は、メンブレンコンタクトサイトの制御機構を理解する上での好例となるかもしれない。現在我々は CERT を突破口として研究を進めているが、将来的には、CERT 以外の様々な分子についてもリン酸化によるメンブレンコンタクトサイトの形成制御が行われているか否か検証していく予定である。

メンブレンコンタクトサイトの形成制御の解明という大きな目的の前に、我々はまず、突破口となる CERT のリン酸化による制御についてしっかりと理解しておく必要がある。本研究課題開始時点で、我々は SR モチーフと S315 のリン酸化について個々に検討を行っていたが、両者の関係性についての統一的な理解には至っていなかった。これらの情報を得ることで、CERT のリン酸化とメンブレンコンタクトサイトの形成との関係性についてより深い議論ができるようになる。また、CERT S315 のリン酸化を担

うキナーゼを同定することも、メンブレンコンタクトサイトの制御を理解する上で重要となってくる。最終的には、S315 のリン酸化状態の変動が、スフィンゴミエリン合成やメンブレンコンタクトサイトの形成にどのような影響を与えるのかを明らかにできるだろう。上記のように、本研究課題は CERT S315 のリン酸化によって引き起こされる現象と、それをもたらす因子(キナーゼ)の同定という、二つの方向性からのアプローチを目指している。

3. 研究の方法

キナーゼ全般に関する情報量は比較的多いので、S315 をリン酸化するキナーゼを文献的に絞り込めるのであれば、効率よく研究を進めることができる。しかし、CERT S315 の周辺配列は既知のキナーゼの基質認識配列に該当せず、既存の情報をもとに候補キナーゼを絞り込むことができなかった。そのため、絞り込みのための情報収集を継続しつつ、特定の候補に的を絞らずに以下に記すようなランダムスクリーニングを行おうと考えた。ヒトのキナーゼは約 800 種類程度と見積もられ、そのほとんどを網羅する siRNA のライブラリーが SIGMA 社から販売されている。タグの付いた CERT を安定的に発現する HeLa 細胞に上述 siRNA を一つずつトランスフェクションし、その細胞のライゼートをマグネティックビーズで免沈する。タグ抗体と抗 S315 リン酸化抗体とで二色標識し、両者の比を算出することで、変化をもたらすキナーゼを同定することが可能であろう。しかしながら、後述するように、有益な新規の情報に接した事を転換点としてこのスクリーニングのステップは回避されることとなった。

候補となるキナーゼが見出された場合には、target 配列を変えたり、発現を戻したりして、更なる検証を加える。また、多くの候補が同時に見つかった場合には、どのようなシグナル経路が動いているのかが推定できる。キナーゼが同定された場合には、その活性変化が細胞に意味のある変化をもたらすか否か、具体的には、スフィンゴミエリン生成量とメンブレンコンタクトサイトの面積という二つの指標に変化がないか検討を行う。

4. 研究成果

本研究課題開始前後から、候補キナーゼの絞り込みを期待して、阻害剤を用いたり CERT のコンストラクトを改変したりする方法で実験を行った。S315 のリン酸化を担うキナーゼは、広範なキナーゼに対して阻害活性を持つスタウロスポリンによって抑制されず、むしろ逆に活性化するという興味深い結果が得られた。これは候補の絞り込みにおいて有益な情報であった。改変した CERT

コンストラクトを用いた実験結果は、キナーゼの絞り込みに対してはあまり有益な情報をもたらさなかったが、長らく懸案であった SR モチーフと S315 の関係性を明示することが可能となった。即ち、CERT の SR モチーフが脱リン酸化された状態は S315 のリン酸化が起こり易いこと、SR モチーフの脱リン酸化と S315 のリン酸化は相加的に CERT を活性化すること等を明らかにした。SR モチーフと S315 のリン酸化についての統一的な理解については、2014 年に発表した論文(J. Biol. Chem. 289. 10748-10760 (2014))の中で詳述した。

研究開始から間もない頃、我々がマグネティックビーズによる免疫沈降の条件を検討していた時期に、ゲハイン シャルロットらが興味深い報告をした。彼女らは 800 種類のキナーゼそれぞれについて、siRNA ライブラリーを用いて発現を抑制し、変動する脂質をリピドミクスによって網羅的に解析した。データは慎重に評価されており、十分に信頼できるだけでなく、本研究課題において考えていたスクリーニングよりも緻密に研究を進めていた。その中に、発現を抑制することでスフィンゴミエリンの量が減少するキナーゼが 12 種類リストアップされていた。CERT S315 のリン酸化が抑制されればスフィンゴミエリンの量が低下することが強く推測される。このような観点から先の 12 種類のキナーゼの中に CERT S315 を直接リン酸化しているものが含まれている可能性が高いと判断し、スクリーニングに優先して検討することとした。

HeLa 細胞に siRNA を導入し、先述の 12 種類のキナーゼの発現を抑制したところ、CERT S315 のリン酸化状態がわずかに変化したキナーゼが 2 つ見つかった。そのうちの 1 つはカルモジュリンキナーゼであったが、これはスタウロスポリンによって強く阻害されることが知られていたため、以後の解析対象から外した。もう一方はストレス応答性の Kinase X (後日論文として発表することを考慮し、現段階では明記することを避けています)であり、このキナーゼはある種の刺激に応答して活性化されることが知られていた。HeLa 細胞にその刺激を加えたところ、我々が知っていた如何なる条件よりも強く S315 のリン酸化が亢進していた。これらの情報を得たことにより、網羅的スクリーニングを行う計画を見直して、Kinase X と当該刺激による CERT S315 の応答性に焦点を合わせて解析を進めた。本研究課題を遂行する中で分かってきたことだが、通常の培養条件下では CERT S315 はあまりリン酸化されていない(多く見積もっても 10%、或いはそれ以下)。また、siRNA を用いた手法では発現を完全に落とすことが難しい。当初計画のように、この手法を用いて S315 のリン酸化状態を更に低下させる因子を探し出すのは、実験的にかなりの精度が要求される難しい方法であっ

ただろうと現段階では考えている。シグナル伝達に関する経験が浅いために、研究の進展に想定以上の時間を要しているが、我々は今後、更に検討を行った上でこれらの結果を論文投稿する予定である。そのため、現段階で委細について公式に発表することは控えたい。詳細の報告は後日発表する論文を以て代えさせて頂きたく存じます。

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 1 件)

- (1) Kumagai K, Kawano-Kwada M, Hanada K.:
“ Phosphoregulation of the ceramide transport protein CERT at serine 315 in the interaction with VAMP-associated protein (VAP) for inter-organelle trafficking of ceramide in mammalian cells. ” J. Biol. Chem. 289. 10748-10760 (2014), (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M113.528380.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 熊谷圭悟、花田賢太郎: セラミド輸送タンパク質 CERT のリン酸化による機能制御、第 56 回日本脂質生化学会大会、2014.6.6-7、大阪 .
- (2) 花田賢太郎、熊谷圭悟: CERT-VAP 間の相互作用調節を介したセラミド輸送の制御、第 9 回スフィンゴテラピー研究会、2014.7.18-19、加賀 .
- (3) 熊谷圭悟、山地俊之、山本章嗣、安藤秀二、花田賢太郎: 宿主細胞因子 CERT が Chlamydia trachomatis 感染に果たす役割、第 33 回日本クラミジア研究会、2015.10.24-25、岡山
- (4) 熊谷圭悟、山地俊之、山本章嗣、花田賢太郎: クラミジア・トラコマティスによってハイジャックされる宿主セラミド輸送機構、BMB2015、2015.12.1-4、神戸

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 熊谷圭悟、花田賢太郎
効率的な細胞内セラミド輸送の仕組みとその制御
医学のあゆみ、248(13)、1125-1131 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 圭悟 (KUMAGAI KEIGO)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：40443105

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

花田 賢太郎 (HANADA KENTARO)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701

(4) 研究協力者

該当者なし