

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860202

研究課題名(和文)新規脂質輸送タンパク質Sec14L3の機能解析

研究課題名(英文)Characterization of the novel lipid transporter, Sec14L3

研究代表者

菱川 大介 (HISHIKAWA, Daisuke)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：10569966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は呼吸に必須の生理活性物質である肺サーファクタントの輸送、分泌、リサイクルのメカニズムを明らかにする事を目的として行った。我々は、肺に高発現し肺胞中に分泌される脂質輸送ドメインを有する機能未知のタンパク質であるSec14L3に着目しその機能を解析した。解析の結果Sec14L3は肺サーファクタント脂質の輸送に関与しないが、肺の炎症を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although pulmonary surfactant is implicated in the various lung functions, molecular mechanisms how the amount of pulmonary surfactant in alveoli is maintained and regulated are still unclear. The aim of this study is to clarify the molecular mechanisms of pulmonary surfactant phospholipid trafficking, secretion, and recycling. To uncover these mechanisms, I focused on the Sec14L3 and Sec14L4, which is the function unknown lipid transporters, highly expressed in the lung. In this study, I used Sec14L3 and Sec14L4 double knockout (dKO) mice to characterize the functions of these genes in vivo. There are no significant difference in the surfactant phospholipid amount and compositions between control and dKO mice, suggest that they are not critical for the basal lung function. However, I also found that the mRNA expressions of several cytokines were increased in dKO mice than that of control mice after intratracheal administration of lipopolysaccharide.

研究分野：脂質生物学

キーワード：脂質輸送タンパク質 肺サーファクタント

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺サーファクタントは、リン脂質を主成分とする生理活性物質であり、肺胞腔内の表面張力を下げる事により、肺を虚脱から守っている。その他にも肺サーファクタントは、炎症を制御する事により生体防御にも寄与している事が知られている。肺サーファクタント中のリン脂質は肺胞 2 型上皮細胞の小胞体で合成され、その後ラメラ小体という器官に蓄えられ、肺胞腔中に放出される事が知られているが、合成されたリン脂質がどのようにしてラメラ小体に運ばれるのかは不明である。また、一度分泌された肺サーファクタントはリサイクルされる事が知られているが、その分子機構は明らかになっていない。

(2) Sec14 ドメイン(脂質結合ドメイン)を有する Sec14 タンパク質は、酵母の分泌経路に重要なリン脂質輸送タンパク質である。Sec14 ドメインを有するタンパク質は、酵母では 6 種類しか存在しないが、ほ乳類においては 50 種類近くのタンパク質が存在する。Sec14 ドメインのリガンドとなる脂質は多様であり、リン脂質、脂溶性ビタミン等が報告されているが、多くはまだリガンドが未同定である。その中で Sec14-like (Sec14L)タンパク質ファミリーは Sec14L1 から L5 まで 5 種類が報告されており、なかでも Sec14L2、L3、L4 はアミノ酸レベルで 80%近い相同性を有する。Sec14L2 はこれまでの研究から肝臓に多く発現し、コレステロー

ル合成を促進する因子である事が知られているが、Sec14L3、L4 は肺に多く発現する事は報告されているが、その機能に関しては未だ不明である。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、肺サーファクタント脂質の輸送やリサイクリングに關与する候補遺伝子として Sec14L3 を同定した。Sec14L3 は肺に高発現し、マウスやラットにおいてその出生前にその発現が著しく誘導される。また、Sec14L3 は肺胞腔内に分泌されるタンパク質であり、喘息やウイルス感染などの肺障害時にその発現が抑制される事が知られているため、申請者は Sec14L3 がその脂質結合ドメインを介して、肺サーファクタントの輸送やリサイクルに何らかの役割を果たすと考え、その機能を明らかにする事を研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Sec14L3 および Sec14L4 タンパク質の肺組織における局在を明らかにするため、免疫組織染色および免疫電顕法を用いて行った。

(2) Sec14L3 のリガンド脂質の同定を目的として、リコンビナントの Sec14L3 を大腸菌に発現させ、GSTrap カラムを用いた方法で精製を行った。さらに、精製したタンパク質はサイズ排除クロマトグラフィー法を用いてさらに精製を行った。精製したタンパク質のリガンド探索には LC-MS/MS を用い、様々な脂質との結合

の解析にはニトロセルロース膜に固定化した脂質と精製タンパク質との結合を解析する事によって行った。

- (3) 申請者や他のグループにより、Sec14L3 や Sec14L4 の脂質との結合は報告されているが、in vivo における機能は不明である。そこで、本研究では Sec14L3 遺伝子を欠損した Sec14L3 ノックアウト(KO) マウスを用いた解析を行った。また、Sec14L3 とアミノ酸レベルで約 80%の相同性を有する Sec14L4 が Sec14L3 KO マウスにおいて相補的に機能している可能性を考慮し、Sec14L3/Sec14L4 の二重欠損(dKO)マウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて作出し、解析に用いた。
- (4) それぞれのマウスの肺サーファクタント中のリン脂質組成の解析には LC-MS/MS を用い、その主成分であるホスファチジルコリンの定量には酵素反応を用いる方法を使用した。
- (5) 急性肺障害時における Sec14L3 および Sec14L4 の機能を解析するため、グラム陰性菌の細胞壁の成分であるリポ多糖(LPS)を気管内に投与する、マウスの急性肺障害モデルを行った。肺障害時における遺伝子発現は定量PCR法を用いて定量し、気管支肺胞洗浄液中の浸潤細胞の定量はサイトスピン法とディフ・クイック染色を合わせて用いて行った。

#### 4. 研究の成果

- (1) Sec14L3 の肺組織における局在  
我々の研究室で所有する、C 末端を抗原

とする Sec14L3 特異的抗体を使用し、マウスの肺組織における Sec14L3 の局在を、免疫組織染色および免疫電顕法を用いて解析した。結果、Sec14L3 は気管支、細気管支、肺胞の上皮細胞に高発現し、血管内皮細胞などには発現しない事が明らかとなった。単離した 2 型肺胞上皮細胞を用いた解析では、in vitro において 2 型肺胞上皮細胞が 1 型肺胞上皮細胞様の細胞に分化する際に、その発現が低下する事を我々は見いだしているが、組織染色においては 1 型肺胞上皮細胞にも発現が見られた。しかしながら、Sec14L3 は肺胞中に分泌されるタンパク質であるため、一度肺胞腔中に分泌された Sec14L3 タンパク質が様々な上皮細胞に取り込まれた可能性も考えられた。

- (2) Sec14L3 の in vitro におけるリガンド脂質  
大腸菌を用い、リコンビナントの Sec14L3 の精製を行った。GSTrap を用いた精製を行った精製タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー法により再度精製を行った結果、最初に精製したリコンビナントの Sec14L3 はその一部が大腸菌の膜成分とともに凝集している事が明らかになった。そのため凝集していない、単量体の Sec14L3 画分から脂質を抽出し、LC-MS/MS を用いて、大腸菌におけるリガンド脂質の同定を試みたが、残念な事に特異的に結合するリガンドの脂質を同定する事は出来なかった。また、イノシトールリン脂質を始めとした様々な脂質

が固定されたニトロセルロース膜を用いて、リコンビナントの Sec14L3 と結合する脂質を解析したところ、過去にも報告されているようにホスファチジルイノシトールリン酸(PIPs)やホスファチジルセリンなどの極性基に負電荷をもつリン脂質との結合が見られた。このことから、Sec14L3 は生体膜上の電荷により、その標的膜を認識している可能性が示唆された。

- (3) 生体内における Sec14L3 の機能を解析するため、Sec14L3 KO マウスを用いた解析を行った。Sec14L3 KO マウスの気管支肺胞洗浄液中の肺サーファクタント脂質組成を解析したところ、野生型のマウスと大きな違いは認められなかった。BioGPS などの発現データベースによると、マウスの肺においては Sec14L3 に加えて Sec14L4 も高発現している。Sec14L3 と Sec14L4 はともに機能トリガンド脂質の不明なタンパク質であり、アミノ酸レベルで約 80%の相同性を有する事から、Sec14L3 KO マウスにおいて Sec14L4 がその機能を補っている可能性が考えられた。Sec14L3 と Sec14L4 は染色体上の距離が 50kb と非常に近接しており、それぞれの単独欠損マウスの掛け合わせにより dKO マウスを得る事はほとんど不可能である。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて、Sec14L3 / Sec14L4 の dKO マウスを作成した。それぞれの遺伝子に対するガイド RNA を同時にマウスの胚にインジェク

ションする事により、Sec14L3 と Sec14L4 それぞれにフレームシフト変異を持つ Sec14L3 / Sec14L4 dKO マウスを得る事に成功した。

- (4) 上記の方法により Sec14L3 / Sec14L4 dKO マウスの気管支肺胞洗浄液中のリン脂質組成およびホスファチジルコリンの量を測定した。その結果、Sec14L3 KO と同様、dKO においても野生型のマウスと大きな違いは認められなかった。これらの結果から、Sec14L3 と Sec14L4 は肺サーファクタントリン脂質の合成や輸送に必須の分子でない事が明らかとなった。
- (5) これまでの報告から肺における Sec14L3 の発現や、気管支肺胞洗浄液中の Sec14L3 のタンパク量はウイルス感染時や喘息など、肺の炎症時に減少する事が報告されている。そこで、肺障害時における Sec14L3 および Sec14L4 の機能を明らかにするため、dKO および野生型マウスの気管内にリポ多糖を投与する肺障害モデルにおける違いを解析した。結果、dKO マウスにおいて、いくつかの炎症性遺伝子の発現が誘導されていることが明らかとなった。これらの結果から Sec14L3 と Sec14L4 は定常状態の肺において必須の役割は持たないが、急性肺障害時などにおける生体防御に關与する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hashidate-Yoshida T, Harayama T,

Hishikawa D, Morimoto R, Hamano F, Tokuoka SM, Eto M, Tamura-Nakano M, Yanobu-Takanashi R, Mukumoto Y, Kiyonari H, Okamura T, Kita Y, Shindou H, Shimizu T. Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport. *Elife*. 査読あり 2015 Apr 21;4. doi: 10.7554/eLife.06328.

Harayama T, Eto M, Shindou H, Kita Y, Otsubo E, Hishikawa D, Ishii S, Sakimura K, Mishina M, Shimizu T. Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo. *Cell Metab*. 査読あり 2014 Aug 5;20(2):295-305. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.019. Epub 2014 Jun 26

Hishikawa D, Hashidate T, Shimizu T, Shindou H. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res*. 査読あり 2014 May;55(5):799-807. doi: 10.1194/jlr.R046094. Review.

Hishikawa D, Shindou H, Harayama T, Ogasawara R, Suwabe A, Shimizu T. Identification of Sec14-like 3 as a novel lipid-packing sensor in the lung. *FASEB J*. 査読あり 2013 Dec;27(12):5131-40. doi:

10.1096/fj.13-237941.

菱川大介、進藤英雄、原山武士、小笠原理恵、諏訪部章、清水孝雄 新規肺胞腔内分泌タンパク質 Sec14-like 3 の生化学的機能解析 分子呼吸器病 査読なし 2014 19(1) 122-125

〔学会発表〕(計 3 件)

菱川大介 新規肺胞腔内分泌タンパク質 Sec14-like 3 の生化学的機能解析 肺サーファクタント分子病態研究会 2014 年 6 月 21 日 札幌医科大学

Daisuke Hishikawa. Identification of novel pulmonary surfactant lipid-related protein, Sec14-like 3. 2014 年 7 月 27 日～2014 年 8 月 1 日 Vermont Academy, Saxtons river, VT

菱川大介 新規肺胞腔内脂質結合タンパク質 Sec14-like 3 の生化学的機能解析 2014 年 10 月 15 日～2014 年 10 月 18 日 日本生化学会 国立京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.ncgmlipidsp.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱川 大介 (HISHIKAWA, Daisuke)

国立国際医療研究センター・脂質シグナリン

プロジェクト・上級研究員

研究者番号: 10569966