

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：25503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23832

研究課題名（和文）機能性分子の土台「足場タンパク質」の発現リズムから迫る膜タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）Evaluation of circadian scaffold protein for diurnal localization of membrane transporter

研究代表者

鶴留 優也（Tsurudome, Yuya）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：80846254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞は膜タンパク質を介して外部からの情報や栄養素の交換を行っている。これら膜タンパク質の一部には、膜タンパク質の膜局在には、それを下支えする「足場タンパク質」が不可欠であるが、足場タンパク質NHERF1の発現リズムによって支えられるトランスポーターの膜局在に24時間周期の変動が生じていた。

NHERF1の発現リズムは時計遺伝子の制御を受けており、時計遺伝子改変マウスや時計遺伝子の破綻モデルマウスにおいてはNHERF1の発現リズムと、制御下にある膜タンパク質の発現リズムが変容していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能性分子の発現リズムは時計遺伝子を主体とする転写・翻訳過程か、ユビキチン化によるタンパク質の分解過程に着目して生体機能。しかしながら申請者の研究は、機能性分子の局在過程に着目することで、足場タンパク質の発現リズムによる膜タンパク質の発現リズム制御機構という新たな概念を提示するものである。この制御機構のより詳細な解析を行うことで、膜タンパク質を介した生理機能の概日リズムのより深い解明につながるほか、生体リズム変容によって生じる膜タンパク質の発現変化やその生理機能への影響を明らかとし、膜タンパク質の発現変容を介した代謝性疾患の新たな発症機序解明につながる研究となる。

研究成果の概要（英文）：For some of the membrane proteins expressed in cells, "scaffold protein" that supports the membrane localization of the membrane protein is indispensable. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 (NHERF1), functions as a scaffold protein, which is implicated in the regulation of circadian membrane expression of various cell-surface proteins.

We found that the diurnal expression of NHERF1 is regulated by the clock gene. In some clock gene disruption model mice, the circadian expression of NHERF1 was abolished by clock gene mutation, and the expression rhythm of the membrane protein which controlled by NHERF1 are altered. In this study, we suggest that changes in the expression rhythm of scaffold proteins are associated with the risk of developing metabolic diseases.

研究分野：時間生物学

キーワード：時間生物学 薬物動態学 細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜におけるトランスポーター、受容体、チャネルなどの機能膜タンパク質の発現が正常時から逸脱すると様々な疾患の原因になると考えられている。特に、栄養素の輸送トランスポーターの発現が変化することは、細胞中の栄養素バランスの変化につながり、栄養成分と関連した生理機能の変化によって代謝性疾患が発症し易くなる<sup>1)</sup>。

生体は、様々な生理機能を外界と同調させるために体内時計を保有しており、各々の細胞にも概日性のリズムを保持させている。栄養素を輸送するトランスポーターの発現や輸送活性も概日リズムを示し、効率よく栄養素の取り込みや老廃物の排泄を行っている<sup>2)</sup>。これらトランスポーターの発現には、発現を安定化する足場タンパク質が不可欠であり、その発現変化はトランスポーターの発現に影響を及ぼす。足場を構成するタンパクのひとつ Membrane scaffolding protein (仮称: MSP) の細胞膜の局在が概日リズムを示し、下支えされるトランスポーターの機能にも概日リズムが生じることが報告されたが、足場タンパク質の発現リズム変調が及ぼす代謝性疾患の発症リスクに関しては報告されていない。

## 2. 研究の目的

膜タンパク質の発現リズム変調は様々な疾患を誘発することは知られているが、その原因はいまだ不明な点が多い。MSP の発現変化が及ぼす影響を明らかとするために、本研究では、足場タンパク質の発現リズムに基づいた栄養素トランスポーターの発現リズムとその疾患との関連性を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### MSP の発現変化が及ぼす脂肪酸の蓄積評価

野生型マウスから肝臓を摘出し、初代培養肝細胞を作成した。MSP 発現ベクターを用いてトランスフェクションし、MSP 過剰発現細胞を樹立した。その後 MSP 発現細胞における脂肪酸およびコレステロールの含有量を評価した。

### 時計遺伝子変容モデルマウスを用いた解析

本研究では体内時計の変調モデルマウスとして制限摂食モデルマウスを用いた。マウスに対し、自由節水、明暗周期(明期; 7:00~19:00) 環境下で、時間制限給餌を 12 週間実施した。その後、マウスから血漿および肝臓を 7:00、13:00、19:00、1:00 に採取し、脂質の含量(胆汁酸、コレステロール、脂肪酸)を HPLC および LC-MS を用いて測定した。

### 制限摂食モデルマウスにおける足場タンパク質の発現リズム変容機構の解析

制限摂食モデルマウスを用いて、肝臓組織から mRNA およびタンパク質の抽出を行い、足場タンパク質や時計遺伝子の発現量、脂質輸送トランスポーターの発現量を RT-PCR 法、ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。また、脂質トランスポーター FATP5 および FATP2、FABP4 と足場タンパク質 MSP の相互作用に関して免疫沈降法を用いて解析を行った。

### 脂肪酸が及ぼす時計遺伝子の発現への影響

時計遺伝子の発現リズムが変容した機構として、肝臓中に蓄積した脂肪酸が原因であると想定された。そこで、本研究では生体に存在する不飽和脂肪酸が時計遺伝子の発現リズムを変容させた原因であるとして細胞を用いた解析をおこなった。野生型マウスから肝臓を摘出し、初代培養肝細胞を作成した。その後、不飽和脂肪酸として、オレイン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸(終濃度 10nM)を添加し、24 時間後の時計遺伝子の発現量を RT-PCR によって評価した。

### 統計解析

多群間比較解析には分散分析、Post-hoc test には Tukey 法を用いた。有意水準は 5%とした。

## 4. 研究成果

### MSP 発現細胞における脂肪酸の蓄積上昇

MSP は脂肪酸取り込みトランスポーターと相互作用することが報告されている。そのため MSP 過剰発現細胞においては脂肪酸の蓄積が増加することが想定された。MSP 安定発現細胞株を樹立後、MSP 発現細胞における遊離脂肪酸および、コレステロール、リン脂質、トリグリセリドの含有量を測定したところ、対照細胞と比較していずれの値も高値を示した。また、MSP 安定発現細胞においては脂肪酸取り込みトランスポーターの発現量が増加していることを明らかとした。さらに MSP とこれらトランスポーターが相互作用し、共局在していることも明らかとした。このことから、MSP の発現増加に伴い脂肪酸や脂質因子の細胞蓄積量が増加することが明らかとなった。

## 時計遺伝子変容モデルマウスを用いた検討

MSP の発現には概日リズムが認められている。さらにその制御機構は時計遺伝子による制御を受けることが報告されている。そこで、本研究では時計遺伝子の発現パターンが変化したマウスを用いて MSP の発現リズムとこれに関連した脂肪酸取り込みトランスポーターの発現量を解析した。作成したモデルマウスにおいて、MSP の発現リズムを評価したところ、対照マウスと比較して MSP mRNA の発現量はいずれの時刻も高値を示した。さらにタンパク質の発現量を比較したところ、mRNA と同様にいずれの時刻も高い発現量を示した。一方で、NHERF1 と相互作用することが知られている FATP5 の発現量を測定した。その結果 *Fatp5* mRNA の発現には概日変動が認められない一方、膜の発現リズムは MSP の発現と同位相の周期が存在していた。さらに MSP との相互作用を比較したところ、本モデルマウスにおいては MSP と FATP5 の相互作用が強く観察された。

また、時間制限給餌後の肝臓内における脂肪酸の含有量を評価したところ、本モデルマウスにおいて脂肪酸の蓄積量が多いことを明らかとした。一方で、血漿中の脂肪酸の濃度は対照マウスと差がないことも明らかとなった。これは肝臓における脂肪酸の蓄積上昇は摂食量や外部の脂質上昇に伴うものではないことを意味している。これらのことから、時間制限給餌を行った際に MSP の発現リズムが変調することを明らかとし、脂肪酸の取り込みが上昇することを見出した。

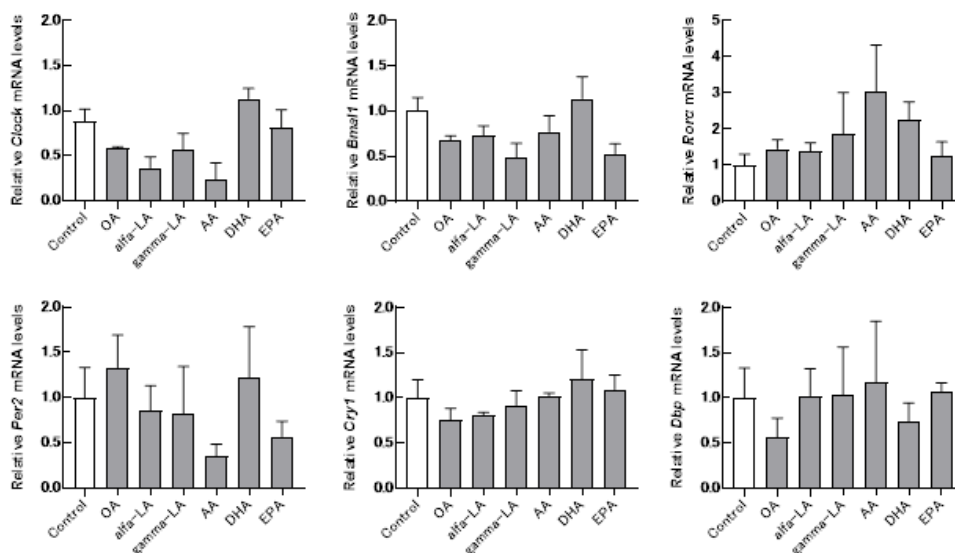


図1 マウス肝細胞の時計遺伝子発現に及ぼす各種脂肪酸の影響

マウス初代培養肝細胞を単離培養後、脂肪酸を添加。24 時間後に mRNA を抽出後、逆転写し時計遺伝子の発現量を Real-Time PCR にて測定した。

OA : オレイン酸、alpha-LA :  $\alpha$ -リノレン酸、gamma-LA :  $\gamma$ -リノレン酸、AA : アラキドン酸  
DHA : ドコサヘキサエン酸、EPA : エイコサペンタエン酸 (Mean $\pm$ S.E., n=3-6)

## マウス肝細胞における時計遺伝子の発現に及ぼす脂肪酸添加の影響

本モデルマウスにおいて肝臓中における脂肪酸の蓄積量が増大することを明らかとしている。脂肪酸は細胞中において PPAR を含む転写因子のリガンドとなることが報告されており、種々の遺伝子の発現を調節する生理活性物質である。本モデルマウスでは時計遺伝子の発現の変化が観察されたが、その一端に NHERF1 の発現変動に伴う脂質の蓄積が考えられる。つまり脂肪酸が本来暴露されるべき時間に肝臓に作用しないことで引き起こされているのではないかと想定した。そこで、マウスの肝臓から作成した初代培養細胞を用いて、各種脂肪酸を添加した際の時計遺伝子の発現に及ぼす影響を評価した。

マウスの初代培養肝細胞を単離・培養後、脂肪酸除去済みの BSA を添加した培養液に置換し、各種脂肪酸を 10nM 添加した。添加後 24 時間の細胞を回収し、mRNA を抽出後に時計遺伝子の mRNA 発現量を測定した。いくつかの脂肪酸でそれぞれの時計遺伝子の発現が変動していたが、顕著に変化が観察されたのはアラキドン酸であった。また、アラキドン酸の添加によって、時計出力遺伝子の 1 つである *Rora* mRNA の発現は約 3 倍に上昇していた。一方で、*Bmal1*, *Cry1*, *Dbp* mRNA の発現変動は大きなものは観察されなかった。これらのことから、脂肪酸の蓄積上昇が時計遺伝子の発現変動を引き起こすことが示唆された。

以上のことから、MSP の発現変動は脂肪酸の取り込みリズムを変化させることで、肝臓内に脂肪酸を蓄積させたことが明らかとなった。また、これに伴い肝臓における脂質沈着症のような代謝性疾患の発症リスクを上昇させていた。また、MSP の発現変化によって蓄積した脂肪酸が体内時計の発現変動にも影響を及ぼしていることが示唆された。

#### 足場タンパク質の発現リズム変容と代謝性疾患

従来までの研究は、機能性分子の発現リズムは時計遺伝子を主体とする転写・翻訳過程か、ユビキチン化によるタンパク質の分解過程に着目して生体機能の概日リズム変容に伴う代謝性疾患の研究が進められてきた<sup>3,4)</sup>。本研究は、機能性分子の局在過程に着目することで、足場タンパク質の発現リズム変容に伴う膜タンパク質の発現リズム制御機構から疾患の発症リスクを評価した。その結果、生体リズム変容によって生じる膜タンパク質の発現変化や、膜タンパク質の発現変容を介した代謝性疾患の新たな発症機序の可能性が見出された。今後、生体リズム破綻に伴う疾患の詳細な発症機序の解明や治療法の確立につながると考えられる。

#### 引用文献

1. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*. 434:113-8. (2005)
2. Iwasaki M, Koyanagi S, Suzuki N, Katamune C, Matsunaga N, Watanabe N et al., Circadian modulation in the intestinal absorption of P-glycoprotein substrates in monkeys. *Mol Pharmacol*. 88:29-37. (2015)
3. Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*. 338:349-54. (2012)
4. Wang S, Lin Y, Yuan X, Li F, Guo L, Wu B. REV-ERB $\alpha$  integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- $\kappa$ B/NLRP3 axis. *Nat Commun*. 9:4246. (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 鶴留優也	4. 巻 36
2. 論文標題 足場タンパク質が形成するトランスポーターの細胞膜局在の日内変動.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DMPK_News Letter.	6. 最初と最後の頁 2
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 Tsurudome Yuya, Morita Nao, Horiguchi Michiko, Ushijima Kentaro	4. 巻 49
2. 論文標題 Decreased ZO1 expression causes loss of time-dependent tight junction function in the liver of ob/ob mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 11881 ~ 11890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-07940-x	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 Jaballah Nour, Tsurudome Yuya, Murakami Chiho, Matsunaga Naoya, Ushijima Kentaro, Koyanagi Satoru, Ohdo Shigehiro	4. 巻 174
2. 論文標題 The scaffold protein PDZK1 governs diurnal localization of CNT2 on the plasma membrane in mouse intestinal epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 193 ~ 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad035	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴留 優也、堀口 道子、藤村 昭夫、牛島 健太郎
2. 発表標題 不適切な食事タイミングが引き起こす肝臓脂質異常症の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴留優也
2. 発表標題 長期休息期摂食が引き起こす栄養バランス異常
3. 学会等名 第11回九州山口沖縄リズム研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田菜央, 鶴留優也, 堀口道子, 牛島健太郎
2. 発表標題 糖尿病モデルob/obマウスにおける血管障害性合併症発症に寄与する原因因子の臓器間比較
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴留優也, 堀口道子, 牛島健太郎
2. 発表標題 高血糖時における肝細胞の細胞接着機能不全の要因解明
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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