

令和元年5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19377

研究課題名(和文) 巨大リポタンパク質粒子の生合成・分泌機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the biogenesis and secretion of large lipoprotein particles

研究代表者

佐藤 健 (Sato, Ken)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30311343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：私達は線虫 *C. elegans* を動物モデルとして用いることにより、線虫の腸細胞から分泌されるリポタンパク質が小胞体から輸出される際にSFT-4 という分子が積み荷受容体として働くことを見出しました。このSFT-4 は小胞体輸出部位と呼ばれる場所に多く存在し、リポタンパク質等を集合させることによって次の目的地であるゴルジ体への輸送を促進していることが判明しました。また、ヒトにもSFT-4とよく似たタンパク質・Surf4が存在するため、ヒトの肝細胞において詳しく解析をしたところ、ヒトの肝細胞においてもリポタンパク質の分泌において同様の働きを担っていることが明らかとなりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であったリポタンパク質の分泌における新たな仕組みが明らかになるとともに、カイロミクロン停滞症のような脂質異常症の病因の解明にもつながることが期待されます。また、ヒトのSurf4は体内のコレステロール量を調節する新規薬剤のターゲットになる可能性があります。さらに、本研究により線虫がリポタンパク質の生合成及び分泌のメカニズムの解明やこれらを調節する薬剤探索をするのに有効なツールとして活用できることが明らかとなりました。

研究成果の概要(英文)：We found that SFT-4/Surf4 family proteins are required for endoplasmic reticulum (ER) exit of soluble cargo proteins including apolipoproteins in *C. elegans* and mammalian cultured cells. SFT-4/Surf4 family proteins localize to the ER exit sites and interact with apolipoproteins. These results suggest that SFT-4/Surf4 family proteins function as cargo receptors for soluble proteins in animals.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リポタンパク質 分泌 小胞体 積み荷受容体 線虫

1. 研究開始当初の背景

リポタンパク質は小胞体において合成される脂質-タンパク質複合体の巨大粒子(直径100-500nm)であり、哺乳類では超低密度リポタンパク質(VLDL)、カイロミクロン(CM)等がそれぞれ肝臓および小腸から分泌され、脂質成分の循環・供給・代謝のキープレイヤーとして動物個体全体の脂質恒常性の維持に重要な役割を担っている。しかしながら、その生合成・分泌の分子機構に関しては不明な点が多い。例えば、アポリポタンパク質が小胞体内腔においてどのようにして大量の脂質成分を取り込み、輸送小胞に選択的に濃縮されるのか、また一般的な輸送小胞(直径50nm-100nm)よりもかなり大きな粒子がどのような輸送小胞を介して輸送されるのかについてはほとんど明らかとなっていない。一方、脂質の供給源として脂肪滴の関与が示唆されているが、実際にどのように作用するのか不明である。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではこの卵黄成分の生合成・分泌過程をモデルとして線虫の遺伝学的利点を駆使することにより、リポタンパク質に対する積み荷受容体、リポタンパク質を輸送する輸送小胞、リポタンパク質の生合成・分泌に関与する新規因子を同定し、機能解析を行う。また、リポタンパク質の生合成における脂肪滴の役割についても解析する。さらに線虫研究で得られた知見を活かし、哺乳類においても解析を行う。このようにモデル動物の利点を存分に活かすことによって、動物個体におけるリポタンパク質の生合成・分泌機構を解明することを目指す。

3. 研究の方法

線虫を用いた卵黄成分に対する積み荷受容体の探索と解析:すでに卵黄成分に対する積み荷受容体候補として膜4回貫通タンパク質であるSFT-4を同定している。まずこの因子が卵黄成分を特異的に認識するか生化学的に検討する。また、定法に従いSFT-4の生理機能を解析する。

小胞体から卵黄成分を輸送する輸送小胞の同定とその関連因子の探索:まず電子顕微鏡により卵黄輸送小胞を同定する。また、卵黄成分が小胞体から形成される一般的な小胞であるCOPII小胞を介して輸送されるかについて検討する。さらに、RNAi等によるスクリーニングにより関連因子の同定、解析を試みる。

脂肪滴モニター線虫の作製と解析:線虫の脂肪滴タンパク質であるPLIN-1と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現する脂肪滴モニター線虫を作製し、動物個体における脂肪滴の生合成や動態解析を行う。また、卵黄成分の生合成と脂肪滴の関連性について検討する。

SFT-4の哺乳類ホモログSurf4の機能解析:まずSurf4の細胞内局在性について解析する。また、Surf4欠損株を樹立し、VLDLの輸送への影響について解析する。さらに、Surf4とVLDLとの相互作用の特異性について共免疫沈降法等によって検討する。このようにしてSFT-4/Surf4ファミリータンパク質が種を超えてリポタンパク質に対する特異的な積み荷受容体として機能するか検証する。

4. 研究成果

線虫*C. elegans*の卵黄成分はVIT-2等のコアタンパク質とトリグリセリド、コレステロール、リン脂質等の脂質成分からなる巨大なリポタンパク質粒子として腸細胞において合成され、

偽体腔へと分泌される。これらの卵黄成分はその後、卵黄受容体を介したエンドサイトーシスにより卵母細胞に取り込まれる。そこで、我々はこの卵黄成分である VIT-2 と GFP の融合タンパク質 (VIT-2::GFP) を発現する線虫株を用いることにより、リポタンパク質の生合成、分泌に関わる新規因子の探索とその生理機能の解析を行った。まず小胞体から形成される COPII 小胞の被覆タンパク質の発現を抑制したところ VIT-2::GFP が小胞体に蓄積したことから、卵黄成分の小胞体からの輸送には COPII 被覆小胞が働くことが判明した。次に、RNAi 法により卵黄成分の小胞体からの輸送に関与する因子を探索したところ、*sft-4* 遺伝子を発現抑制すると卵黄成分が顕著に小胞体に蓄積することが判明した。*sft-4* 遺伝子を成虫において発現抑制すると胚性致死となることから、この因子は個体発生に必須であることが判明した。SFT-4 は出芽酵母の積み荷輸送体である Erv29p と相同性を持つ膜タンパク質であり、線虫の腸細胞において小胞体および小胞体出芽部位に局在化していた。興味深いことに、*sft-4* 遺伝子を発現抑制すると細胞質中に電子密度の高い構造と脂肪滴様構造が隣接したダルマ型の巨大顆粒が蓄積することが明らかとなった。そこで、この顆粒が脂肪滴である可能性について検討するために、線虫の脂肪滴タンパク質である PLIN-1 と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現する脂肪滴モニター線虫を作製し解析したところ、この顆粒は脂肪滴そのものではなく小胞体内腔にタンパク質が過剰蓄積した結果、形成されていることが判明した。また、SFT-4 を発現抑制しても脂肪滴の形態等に顕著な変化は観察されなかったことから、少なくとも線虫腸細胞においては卵黄成分の生合成が阻害されても脂肪滴の形態等に大きく影響しないことが示唆された。続いて、SFT-4 が Erv29p ホモログであることからリポタンパク質の積み荷受容体として機能する可能性を考え、共免疫沈降法により解析したところ、SFT-4 と VIT-2 が物理的に相互作用することが明らかとなった。さらに、SFT-4 のヒトホモログである Surf4 についても肝細胞由来である HepG2 を用いて解析を行った。その結果、Surf4 の発現抑制により apolipoprotein B (ApoB) の小胞体からの輸出が顕著に抑制されること、Surf4 と ApoB が相互作用することなどが明らかとなった。以上の結果から、SFT-4/Surf4 は動物においてリポタンパク質の小胞体からの輸出を制御する積み荷受容体として働くことが明らかとなった。

一方で、Surf4 は小胞体輸出处に局在することから、小胞体輸出处形成における Surf4 の役割についても検討した。その結果、哺乳類培養細胞において Surf4 をノックダウンすると COPII タンパク質でラベルされる小胞体輸出处のサイズが顕著に低下することが判明した。また、小胞体輸出处に局在するその他の膜タンパク質の分布も大きく変化することが明らかとなってきた。以上のことから、SFT-4/Surf4 ファミリータンパク質はリポタンパク質などの大量分泌タンパク質の小胞体からの輸送にも働くとともに、小胞体輸出处の形成にも関与することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hara T, Maejima I, Akuzawa T, Hirai R, Kobayashi H, Tsukamoto S, Tsunoda M, Ono A, Yamakoshi S, Oikawa S, Sato K. Rer1-mediated quality control system is required for neural stem cell maintenance during cerebral cortex development. PLoS Genet. 査読有. Vol. 14, e1007647. 2018. doi: 10.1371/journal.pgen.1007647.

Saegusa K, Sato M, Morooka N, Hara T, Sato K. SFT-4/Surf4 control ER export of soluble cargo proteins and participate in ER exit site organization. J. Cell Biol. 査読有. Vol. 217. pp. 2073-2085. 2018. doi: 10.1083/jcb.201708115.

〔学会発表〕(計 3 件)

Keiko Saegusa, Miyuki Sato, Katsuya Sato, Nobukatsu Morooka, Taichi Hara, Ken Sato. SFT-4, a cargo receptor homolog, is required for ER exit of soluble proteins including lipoproteins. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th. 2018.

三枝慶子, 佐藤美由紀, 原太一, 佐藤健. リポタンパク質の生合成および分泌を制御する新規因子 SFT-4/Surf4 の機能解析. 第 69 回日本細胞生物学会大会. 2017.

三枝慶子, 佐藤美由紀, 原太一, 佐藤健. リポタンパク質の生合成および分泌を制御する新規因子 SFT-4/Surf4 の機能解析. 第 90 回日本内分泌学会学術総会. 2017.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

2018 年 4 月に国際学術誌 Journal of Cell Biology に論文が掲載され、プレスリリースを行った。その結果、産経新聞、日本経済新聞、上毛新聞等に掲載され、テレビ、ラジオ、インターネットでも報道された。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三枝慶子

ローマ字氏名：Keiko Saegusa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。