

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14698

研究課題名（和文）脂肪酸代謝を介した小胞体の形態形成機構

研究課題名（英文）Regulation of ER morphogenesis via fatty acid metabolism

研究代表者

内田 安則（Uchida, Yasunori）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：80793603

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：小胞体はチューブルやシートなどの形態的に極めて異なる膜ドメインで構成される。小胞体の機能の一つとして脂肪酸の代謝反応があるが、脂肪酸代謝の小胞体形態形成における機能はよく分かっていない。本研究では、小胞体において脂肪酸を伸ばす酵素の一つ（TER）がCa<sup>2+</sup>ポンプ（SERCA2b）と直接結合すること、TERがSERCA2bの活性を抑制して小胞体内のCa<sup>2+</sup>量を減少させること、TERが細胞質のCa<sup>2+</sup>シグナルを持続させることを見出した。Ca<sup>2+</sup>は小胞体チューブル形態の制御因子であることから、TERがCa<sup>2+</sup>を介して小胞体チューブルの形態形成に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪酸代謝酵素の個体レベルでの機能はノックアウト動物などを用いて解明が進んでいるが、分子レベルでの機能については不明な点が多い。本研究はTERがSERCA2bを介してCa<sup>2+</sup>動態を制御することを示すものであり、分子レベルで脂肪酸代謝酵素の機能を解明したという点で学術的な意義は大きいと考えている。また、SERCA2bの機能不全は表皮角化異常症（ダリ工病）を引き起こす。本研究の結果はTERがSERCA2b活性を抑制することでダリ工病の病態形成に関わる可能性を示しており、社会的な意義も大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The endoplasmic reticulum (ER) has distinct morphological domains, such as tubules and sheets. Although fatty acid metabolism is the one of the functions of the ER, its role in ER morphogenesis is unclear. In this study, we found that TER, an ER membrane enzyme catalyzing fatty acid elongation, directly bound to the ER Ca<sup>2+</sup> pump SERCA2b. We then showed that TER limits the ER Ca<sup>2+</sup> content by inhibiting SERCA2b activity. We further demonstrated that TER sustains cytosolic Ca<sup>2+</sup> signaling. Given that Ca<sup>2+</sup> regulates ER tubule morphology, these results suggest a possibility that TER regulates the ER tubule morphology by controlling cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪酸伸長酵素 小胞体 カルシウム カルシウムシグナル SERCA NFAT

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体には、核膜、扁平なシート、曲率の高いチューブルといった形態的に異なるドメインが存在する。小胞体の形態形成には、膜に埋め込まれて特定の形態を安定化する膜変形タンパク質が必要である。近年、チューブル膜を安定化する膜変形タンパク質が神経変性疾患（痙性対麻痺）と関連することが報告され、小胞体形態と機能の関連に大きな注目が集まっている。

小胞体は脂肪酸の伸長や不飽和化などの代謝反応が起きるオルガネラである。脂肪酸は導入された脂質分子の性質を規定するため、脂肪酸代謝は膜の物性や形態に大きな影響を与えると予想される。しかし小胞体の形態形成が起こる際に、脂肪酸代謝がどのように制御されるのか、脂肪酸代謝がどのような機能を持つのかは解析が進んでいない。

### 2. 研究の目的

本研究では小胞体に存在する脂肪酸代謝酵素に着目し、小胞体形態形成における機能を分子レベルで解明する。具体的には、「膜変形タンパク質による脂肪酸代謝酵素の制御」または「脂肪酸代謝酵素による膜変形タンパク質の制御」という双方向の観点から検討を行う。また、脂肪酸を介した膜形態制御のリポソームでの再構成を行い、人工的に細胞内で見られる小胞体の形態を再現する。これらの解析から、小胞体の形態形成において膜脂質の特性を含めた新たなモデルを提唱する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂肪酸伸長酵素 *trans*-enoyl-CoA reductase (TER) の結合タンパク質の同定

HEK293 細胞に N 末端に Strep タグを付加した TER (Strep-TER) を恒常的に発現させ、適当な発現量の細胞クローンを樹立した。この細胞クローンの抽出液を Strep-Tactin Sepharose ビーズと混合し、Strep-TER とその相互作用タンパク質をプルダウンした。ビーズに結合したタンパク質を desthiobiotin によって溶出し、電気泳動で分離後、銀染色によってタンパク質のバンドを可視化した。再現よくプルダウンされるタンパク質のバンドを切り出し、質量分析で同定した。

#### (2) 共焦点顕微鏡を用いた細胞内局在の解析

HEK293 細胞をパラホルムアルデヒドで固定後、ジギトニンで膜透過を行った。TER 及び SERCA2b に対する抗体を用いて免疫染色を行なった後、共焦点レーザー顕微鏡により両者の局在性を観察した。HEK293 細胞に siControl または siTER をトランスフェクションした後、NFAT4-GFP プラスミドをトランスフェクションした。細胞を内在性の G タンパク質共役型受容体リガンド (ATP) で 5 分間刺激した後に固定し、核を DAPI で染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡により NFAT4-GFP の核への移行を評価した。

#### (3) 細胞内での相互作用の解析

FLAG タグを付けた TER と 3xHA タグを付けた SERCA2b を HEK293 細胞に共発現させ、FLAG 抗体を用いて共免疫沈降実験を行なった。また HEK293 細胞、HuH-7 細胞、ヒト初代培養表皮角化細胞において、TER 抗体を用いて内在性の TER と SERCA2b の共免疫沈降実験を行なった。

#### (4) 組換えタンパク質を用いた結合実験

FLAG-TER と PA タグを付加した SERCA2b をバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を使用して発現させ、FLAG 抗体または PA 抗体を付加した agarose ビーズを用いてアフィニティー精製した。125 pmol の FLAG-TER を固相化したビーズと、50 pmol の PA-SERCA2b を 1% (w/v) ドデシルマルトシドを含むバッファー中で 2 時間、4°C で混合した。その後ビーズを洗浄し、SDS サンプルバッファーでビーズに結合したタンパク質を溶出した。GST タグをつけた TER の C 末領域を大腸菌に発現させ、グルタチオン Sepharose ビーズを用いてアフィニティー精製した。2.8 nmol の GST-TER (C 末) を固相化したビーズに 3xHA-SERCA2b を発現した HEK293 細胞の細胞抽出液を加え、上記と同様に 2 時間、4°C で混合した後に結合タンパク質を溶出した。

#### (5) ミクロソーム膜を用いた ATPase アッセイ

FLAG-TER を過剰発現した HEK293 細胞を低張液バッファーで懸濁したのち、ポッター型のホモジナイザーを用いて破碎した。得られた破碎液を 1,000 x g, 6,000 x g で遠心した後、上清を 100,000 x g で遠心して得られた沈降物をミクロソーム膜とした。30 µg のミクロソーム膜に 37°C で 1 mM の ATP を添加し、ATP の加水分解によって得られる無機リン酸を市販のキットを用いて定量した。SERCA2b 依存的な無機リン酸の生成は、SERCA 阻害剤 (タプシガルジン, Tg) の存在下で生成される無機リン酸の量を、阻害剤がない場合で生成される無機リン酸の量から差し引くことで決定した。

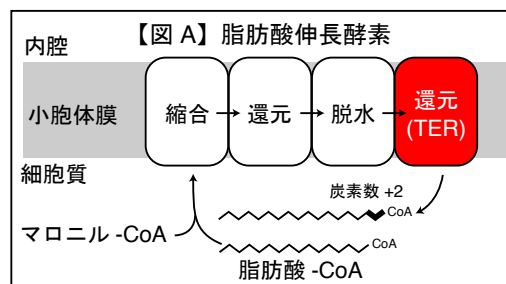
#### (6) 蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬を用いた細胞質 Ca<sup>2+</sup>の測定

siControl または siTER をトランスフェクションした HEK293 細胞に蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬 (Fluo-4 AM) を添加し、37°C 1 時間培養することで取り込ませた。小胞体内の Ca<sup>2+</sup>量を測定する実験では、Ca<sup>2+</sup>を含まない培地を使用し、プレートリーダーで Fluo-4 の蛍光を測定しながら 37°C で培養した。蛍光の基底値が得られた後、Tg を添加して小胞体の Ca<sup>2+</sup>を細胞質に放出させ、細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃

度の上昇に伴う蛍光強度の上昇を測定した。受容体活性化による細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を測定する実験では、 $\text{Ca}^{2+}$  を含む培地を使用し、Fluo-4 蛍光の基底値が得られた後に ATP を添加して細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の継時的な変化を測定した。

#### 4. 研究成果

本研究では、小胞体に存在する脂肪酸代謝酵素のうち、脂肪酸を伸ばす（炭素数を増やす）酵素である脂肪酸伸長酵素に着目した。小胞体での脂肪酸伸長反応は、脂肪酸 CoA と炭素供与体（マロニル CoA）の縮合、その後の還元（1回目）、脱水、還元（2回目）の4ステップからなり、各ステップは別の酵素によって触媒される（図A）。当初は脂肪酸伸長酵素と膜変形タンパク質の関連に着目していたが、最後の還元反応を担う酵素 *trans*-2-enoyl-CoA reductase (TER) の結合タンパク質の



解析から、TERが小胞体に  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込むポンプタンパク質である sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2b (SERCA2b) と直接結合することが分かった。小胞体は細胞内で最大の  $\text{Ca}^{2+}$  ストアであり、 $\text{Ca}^{2+}$  欠乏時には小胞体チューブルの形態変化が起こる。このことから、TERがSERCA2bを介して  $\text{Ca}^{2+}$  動態を制御することで、小胞体形態に関わる可能性が考えられた。そこで本研究ではTERと  $\text{Ca}^{2+}$  動態の関連について解析を進め、以下の結果を得た。

##### ① TER 結合タンパク質の同定

Strep-TER を恒常的に発現する HEK293 細胞株を樹立し、その抽出液から Strep-TER 及びその相互作用タンパク質をプルダウンした。プルダウンしたサンプルを質量分析で解析したところ、SERCA2b が同定された。

##### ② TER と SERCA2b の細胞内結合

TER と SERCA2b の結合を共免疫沈降実験により検討した。その結果、HEK293 細胞に過剰発現した FLAG-TER は 3xHA-SERCA2b と共沈降した。さらに、HEK293 細胞、HuH-7 細胞、ヒト初代培養表皮角化細胞で内在性の TER と SERCA2b が共沈降した。以上の結果から、TER と SERCA2b が細胞内で結合することが分かった。

##### ③ TER と SERCA2b の直接結合

バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて、全長の TER (FLAG タグ) と SERCA2b (PA タグ) の組換えタンパク質を発現・精製した。精製 FLAG-TER を固相化したビーズにより、PA-SERCA2b がプルダウンされたことから、TER と SERCA2b が直接結合することが判明した。

SERCA2b は  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞質から内腔側に輸送する過程でその構造を変化させる。SERCA2b の構造は大きく E1（細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  と結合する  $\text{Ca}^{2+}$  高親和性の状態）と E2（内腔側に  $\text{Ca}^{2+}$  を放出する  $\text{Ca}^{2+}$  低親和性の状態）に分けられる。SERCA2b の特異的阻害剤であるタブシガリジン (Tg) は SERCA2b の構造を E2 状態に固定する。PA-SERCA2b を Tg で前処理すると、FLAG-TER による PA-SERCA2b のプルダウンが減少した。このことから、TER は E1 状態の SERCA2b に対して選択的に結合すると考えられた。

##### ④ TER の SERCA2b 結合領域

TER は 6 回膜貫通型のタンパク質であり、N 末端および C 末端が細胞質を向いている。FLAG-TER と 3xHA-SERCA2b の共免疫沈降実験から、TER の C 末端の細胞質領域を削ると、SERCA2b との共沈降が減弱することが明らかになった。次に、C 末端領域のみを GST と融合した組換えタンパク質を用いたプルダウン実験を行った。その結果、C 末端領域のみで HEK293 細胞に発現させた 3xHA-SERCA2b がプルダウンされた。以上の結果から、TER が C 末端領域を介して SERCA2b と結合することが分かった。

##### ⑤ TER による SERCA2b 活性の抑制

HEK293 細胞に FLAG-TER（全長または C 末端領域を欠いた変異体）を過剰発現し、ミクロソーム画分における SERCA2b の ATPase 活性を測定した。その結果、全長の FLAG-TER の過剰発現により、SERCA2b の ATPase 活性が有意に減少することが分かった。一方で、C 末端領域を欠いた変異体（SERCA2b との結合が弱い）の過剰発現では、SERCA2b の ATPase 活性はほとんど変化しなかった。以上の結果から、TER が SERCA2b との結合を介して SERCA2b 活性を抑制していると考えられた。

##### ⑥ TER による小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 量の減少

HEK293 細胞に TER を標的とする siRNA (siTER #1 または #2) をトランスフェクションし、TER の発現抑制を行った。その後、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 (Fluo-4) を用いて小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  量を測定した。その結果、小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  量が siTER #1 または #2 を処理した細胞で、siControl を処理した細胞と

比較して増加していた。siTER #1 処理細胞に siRNA 耐性の TER を発現させると、小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  量は siControl 処理細胞と同程度になることから、siTER 処理細胞で見られる小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  量の増加が、確かに TER の発現抑制の影響であると考えられる。以上の結果から、TER が小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  量を減少させる因子であることが分かった。

#### ⑦ TER による $\text{Ca}^{2+}$ 応答の持続化

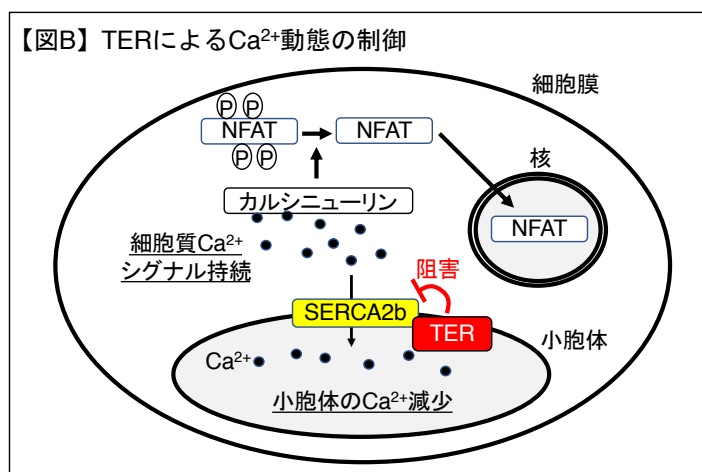
SERCA2b は細胞質に放出された  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込むことで、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を終結させる。そこで次に、TER が細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  応答の持続時間に影響を与えるか検討した。前項と同様に siTER を用いて TER の発現抑制を行った。その後、細胞表面の内在性 G タンパク質共役型受容体 (P2Y 受容体) をリガンド (ATP) で刺激し、Fluo-4 を用いて細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を測定した。その結果、TER の発現抑制によって  $\text{Ca}^{2+}$  応答の持続時間が短縮した。また、SERCA2b を Tg によって阻害すると、TER の発現抑制は  $\text{Ca}^{2+}$  応答の持続時間に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、TER が SERCA2b を阻害することで、 $\text{Ca}^{2+}$  応答を持続させることが分かった。

#### ⑧ TER による転写因子 NFAT の核移行の促進

持続的な細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは、カルシニューリンによる転写因子 NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) の脱リン酸化を引き起こす。脱リン酸化された NFAT は核へと移行して、細胞分化などに関わる多様な遺伝子の転写を誘導する。そこで、TER による  $\text{Ca}^{2+}$  応答の持続化が NFAT の核移行を促進するか検討した。NFAT4 の  $\text{Ca}^{2+}$  応答領域 (N 末端の 407 アミノ酸の領域) に GFP を付けたレポータータンパク質 (NFAT4-GFP) を HEK293 細胞に発現させ、ATP 処理後 5 分で NFAT4-GFP の細胞内局在を観察した。その結果、TER の発現抑制によって NFAT4-GFP の核移行が抑制された。このことから、TER による  $\text{Ca}^{2+}$  応答の持続化が、NFAT4 の核移行を促進すると考えられた。

以上の成果から、脂肪酸伸長酵素である TER が SERCA2b に直接結合し、その活性を阻害することで小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  量を減少させること、TER が細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを持続させ、転写因子 NFAT の核移行を促進することが判明した (図 B)。これらの結果は TER が脂肪酸代謝のみならず、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  動態を直接制御することを示している。今後、TER・SERCA2b 複合体の小胞体形態における機能を解析することで、脂肪酸伸長酵素と  $\text{Ca}^{2+}$  に立脚した、新たな小胞体形態制御機構を示すことができるかと期待している。

脂肪酸伸長酵素の研究は、試験管内での基質特異性の解析や、ノックアウト動物を用いた個体レベルでの機能の解析が先行して行われており、分子レベルでの機能については不明な点が多い。本研究の成果は、分子レベルで脂肪酸伸長酵素 (TER) の機能を示した点で学術的な意義が大きいと考えている。また、SERCA2b の機能不全は表皮角化異常症 (ダリエ病) を引き起こす。本研究の結果は TER が SERCA2b 活性を抑制することでダリエ病の病態形成に関わる可能性を示しており、社会的な意義も大きいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Uchida Yasunori, Yamamoto Yasunori, Sakisaka Toshiaki	4. 巻 296
2. 論文標題 Trans-2-enoyl-CoA reductase limits Ca <sup>2+</sup> accumulation in the endoplasmic reticulum by inhibiting the Ca <sup>2+</sup> pump SERCA2b	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100310 ~ 100310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100310	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0件

〔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
---------	---------