

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11713

研究課題名（和文）新規SREBP-1プロテアーゼR4によるlipid-sensing分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of lipid-sensing by the novel SREBP-1 protease R4

研究代表者

韓 松伊（Han, Song-iee）

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・研究員

研究者番号：80729541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：SREBPは脂肪酸とコレステロール合成のマスターレギュレーターであり、その活性制御の破綻により脂質異常症病態を引き起こす。小胞体膜上に存在するSREBPは、栄養をsensingすることで切断活性化される。活性化型となったSREBPは核に移行し、標的遺伝子の発現制御を行う。本研究では、新規にSREBP-1を切断活性化するプロテアーゼR4を見出し、その作用メカニズムを明らかにした。R4-SREBP-1活性化経路は、脂肪酸をsensingすることで、脂質合成・多価不飽和脂肪酸合成・リポタンパク質分泌を促進し、生体内脂質の蓄積や恒常性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質代謝異常の病態におけるSREBP-1活性化の分子機構は不明な点が多く残されており、既存の経路では説明できない新たなメカニズムの解明が必要とされていた。本研究により、新規プロテアーゼR4によるSREBP-1活性化制御機構を明らかにしたこと、また脂肪酸によるsensing機構を明らかにしたことから、R4-SREBP-1経路が新たな脂質異常症治療戦略に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：SREBPs are the master regulators of fatty acid and cholesterol synthesis, and their dysregulation of activity leads to dyslipidemia pathology. SREBPs on the endoplasmic reticulum membrane are cleaved and activated by nutrient sensing. The activated SREBPs translocate to the nucleus and regulate the expression of target genes. In this study, we identified a novel protease R4 that cleaves and activates SREBP-1 and elucidated its molecular mechanism. The R4-SREBP-1 pathway promotes lipid synthesis, polyunsaturated fatty acid synthesis, and lipoprotein secretion by sensing fatty acids, and plays an important role in lipid accumulation and homeostasis in the body.

研究分野：分子生物学

キーワード：SREBP-1 protease 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

SREBPは脂肪酸とコレステロール合成のマスターレギュレーターであり、その活性制御の破綻により生活習慣病(肥満、脂肪肝、インスリン抵抗性、糖尿病など)病態を引き起こす。小胞体膜上に存在するSREBPは、栄養をsensingすることによって、小胞体からゴルジ体に輸送されて切断を受け活性化される。活性化型となったSREBPは核に移行し、標的遺伝子の発現制御を行う。コレステロールによるSREBPの活性化は、既知の制御因子であるSCAPやINSIG、SREBPを切断するプロテアーゼ(S1P, S2P)により綿密に制御されていることが知られている。しかし、脂質代謝異常の病態におけるSREBP-1活性化の分子機構は不明な点が多く残されており、既存の経路では説明できない新たなメカニズムの解明が必要とされていた。

これまでに我々は、多価不飽和脂肪酸によるSREBP-1の活性化抑制に関する論文を報告し(Yahagi N *et al. JBC.* 1999, Yoshikawa T *et al. JBC.* 2002, Sekiya M *et al. Hepatology.* 2003, Nakakuki M *et al. J. Biochem.* 2014)、脂肪酸によるSREBP活性化制御機構にいち早く着目してきた。さらに研究を進めてきた結果、多価不飽和脂肪酸によるSREBP-1特異的な活性化制御に関わる新たなプロテアーゼの候補、R4を見出すことができた。

2. 研究の目的

本研究では、新規SREBP-1プロテアーゼ(R4)が担うSREBP-1活性化制御に関わるlipid-sensing分子機構を解明し、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。

これまでのSREBP切断機構の解析は、小胞体からゴルジ体への移行による機序が注目され、それらに関連する因子の同定や分子機構の解析が進められていた。また、lipid-sensingに関しても、コレステロールによるnegative feedback機構の解析は進んでいるが、脂肪酸による詳細な制御機構は明らかになっていなかった。R4によるSREBP-1切断は、小胞体上で行われおり、小胞体からゴルジ体へと移行を介する既存の切断経路とは異なる、新たなSREBP-1活性化経路を示唆するものであった。さらに、R4によるSREBP-1の切断には飽和脂肪酸による活性化、多価不飽和脂肪酸による抑制が見られており、これまでに明らかになっていない脂肪酸によるSREBP-1活性化制御の新たなメカニズムを提唱することができると考えた。

3. 研究の方法

(1) 新技術として開発された*in vitro*タンパク質発現システムを用いて、膜タンパク質あるSREBP-1、R4の全長タンパク質を合成・精製し、リボソームと混合することによりcell-freeの再構築系を確立し、解析を行った。

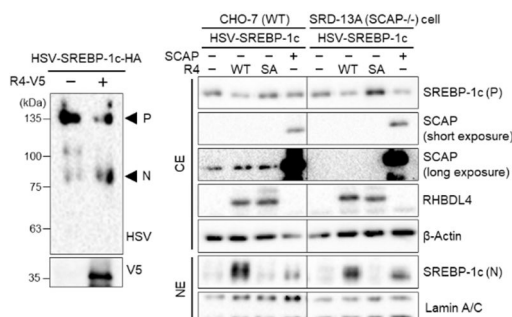
(2) これまでに明らかになっているR4やSREBP-1cの構造解析をベースに*in silico*解析を用いて、R4の相互作用点を明らかにし、既知の経路との比較検討を行った。

(3) 培養細胞を用いて、ERAD関連分子によるR4-SREBP-1経路の活性化制御や、脂質による制御機構を解析した。また、既知の因子のノックアウト細胞を用いて、R4-SREBP-1経路の新規性を検討した。

(4) 野生型およびR4ノックアウトマウスを用いて、ウェスタンダイエット負荷による肝臓中の脂肪酸組成を解析し、脂質代謝への影響を検討した。また、スタチンとエゼチミブ負荷によるコレステロール合成系の活性化による作用を解析した。

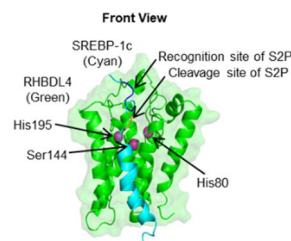
4. 研究成果

(1) 膜タンパク質であるSREBP-1やR4は、その発現や精製の効率が悪いことが問題点であったが、コムギ無細胞系を用いて簡便に発現・精製できる系を確立した。精製したタンパク質をリボソームと混合し、*in vitro*でR4によるSREBP-1の切断を示すことができた。この結果は、R4がSREBP-1cを直接切断することを示唆するものであった。また、R4が既存の経路に依存しない切断系であることを証明するために、SREBP-1cの切断に大きく寄与するSCAPのノックアウト細胞を用いた検討を行った。その結果、SCAPノックアウト細胞でもR4の酵素活性依存的にSREBP-1cが切断されることを見出すことができた。

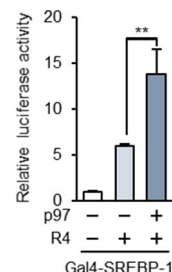


(2) Molecular Operating Environment (MOE) プログラムを用いた*in silico*分子可視化により、R4とSREBP-1複合体の相互作用点を示すことができた。MOE解析の結果、R4の活性化中心(histidine 80, serine 144, histidine 195)が既知のプロテアーゼであるS2Pで認識・切断をつけることが知られているSREBP-1cの第一膜貫通領域近傍に位置することが示された。この領域にはR4が属するロンボイドプロテアーゼファミリーのコンセンサス認識配列である

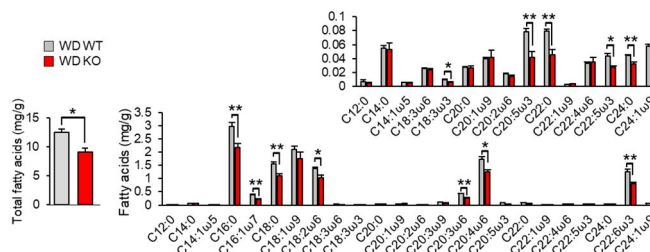
Arg-(X)n-Arg に該当する「LDRSRL」配列が存在することを見出した。そこで、serine 462 を phenylalanine に置換した SREBP-1c の点変異体を用いた実験により、この第一膜貫通領域の serine 462 が R4 による SREBP-1c の切断認識の一部を担っていることを示すことができた。この結果により、R4 による SREBP-1c の切断は、これまでの報告通り膜貫通領域で行われ、切断された SREBP-1c が転写活性化されることが示唆された。



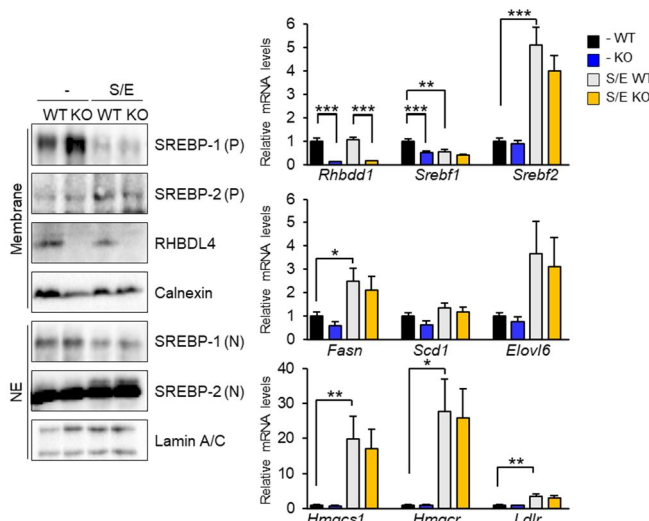
(3) これまでの報告から R4 による基質の認識、切断にはユビキチンを介した ERAD 系との関連性が示唆されてきた。ERAD 関連因子である ATPase p97 は、R4 と結合することやユビキチンを介した基質との相互作用に働いていることが報告されている。そこで、培養細胞に p97 を過剰発現させ、SREBP-1c の切断活性化に関わる機能を Gal4-VP16-SREBP-1c レポーターアッセイを用いて検討を行った。その結果、R4 により SREBP-1c の切断活性化が増加し、さらに p97 を発現させることにより活性化が亢進することを示すことができた。この結果は、R4 は ERAD 関連因子である p97 を介して、SREBP-1c の転写活性化を増加させることを示唆するものであった。さらに、R4 KO マウスの肝臓を用いた我々の RNA-seq の結果により、ER stress や UPR 関連遺伝子の発現が変動していることから、R4-SREBP-1 経路と ERAD の関連性が示唆された。



(4) マウスにウェスタンダイエットを負荷し、野生型と R4 KO マウスの血液や肝臓の脂質を測定した結果、R4 KO マウスでは脂質蓄積が減少していることが示された。さらに、肝臓での脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで解析した結果、遊離脂肪酸の総量の減少と共に、アラキドン酸、EPA、DPA、DHA などの多価不飽和脂肪酸の低下が見られた。これらを合成する関連酵素の発現低下も RNA-seq や qPCR により確認できたことから、R4-SREBP-1 経路が多価不飽和脂肪酸の合成に機能することを示唆することができた。さらに、培養細胞に多価不飽和脂肪酸を添加すると R4 による SREBP-1c の切断が抑制されることや、野生型に対して R4 KO マウスでは多価不飽和脂肪酸による SREBP-1c の切断活性化抑制が減衰することが示された。これらの結果により、R4-SREBP-1 経路で合成された多価不飽和脂肪酸はこの新規経路に対してネガティブフィードバック制御を行うことが示唆された。



(5) マウスにウェスタンダイエットを負荷した実験により、過剰な飽和脂肪酸が R4 による SREBP-1 の切断活性化や脂肪酸合成を亢進していることを見出した。脂質による R4-SREBP-1 活性化能の差別化を検討するため、マウスにスタチンとエゼチミブを負荷し、コレステロール合成系を亢進させる実験を行った。その結果、R4 KO マウス肝臓では野生型と同様に、コレステロール合成の責任因子である SREBP-2 の発現や切断が増加し、下流のコレステロール合成系遺伝子の発現に大きな差は見られなかった。このことから、R4 による SREBP の切断は、脂肪酸を介した SREBP-1 に特異的であり、コレステロールを介した SREBP-2 の切断活性化機構とは異なることが示唆された。



本研究により、新規 R4-SREBP-1 活性化経路は、脂肪酸を sensing することによって、脂質合成、多価不飽和脂肪酸合成、リポタンパク質分泌を制御し、生体内脂質の蓄積や恒常性の維持に働くことを見出すことができた。今後は、細胞内脂質の量や組成変化による膜の流動性変動と R4-SREBP-1 経路の制御機構を明らかにすることで、脂質代謝異常における新たなメカニズムを提唱し、脂質異常症の治療基盤を構築できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 14件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Miyamoto Takafumi, Uosaki Hideki, Mizunoe Yuhei, Han Song-lee, Goto Sato, Yamanaka Daisuke, Masuda Masato, Yoneyama Yosuke, Nakamura Hideki, Hattori Naoko, Takeuchi Yoshinori, Ohno Hiroshi, Sekiya Motohiro, Matsuzaka Takashi, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Yahagi Naoya, Ito Koichi, Shimano Hitoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Rapid manipulation of mitochondrial morphology in a living cell with iCMM	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100052 ~ 100052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100052	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 該当する

1. 著者名 Okajima Yuka, Matsuzaka Takashi, Miyazaki Shun, Motomura Kaori, Ohno Hiroshi, Sharma Rahul, Shimura Takuya, Istiqamah Nurani, Han Song-lee, Nakagawa Yoshimi, Tomita Tsutomu, Shimano Hitoshi	4. 巻 1868
2. 論文標題 Morphological and functional adaptation of pancreatic islet blood vessels to insulin resistance is impaired in diabetic db/db mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166339 ~ 166339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2022.166339	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 該当する

1. 著者名 Nakagawa Yoshimi, Araki Masaya, Han Song-lee, Mizunoe Yuhei, Shimano Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 CREBH Systemically Regulates Lipid Metabolism by Modulating and Integrating Cellular Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3204 ~ 3204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13093204	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 該当する

1. 著者名 Miyamoto Takafumi, Han Song-lee, Shimano Hitoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for rapid manipulation of mitochondrial morphology in living cells using inducible counter mitochondrial morphology (iCMM)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100721 ~ 100721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100721	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 該当する

1. 著者名 Nakagawa Yoshimi, Kumagai Kae, Han Song iee, Mizunoe Yuhei, Araki Masaya, Mizuno Seiya, Ohno Hiroshi, Matsuo Kazuya, Yamada Yasunari, Kim Jun dal, Miyamoto Takafumi, Sekiya Motohiro, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Takahashi Satoru, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Starvation induced transcription factor CREBH negatively governs body growth by controlling GH signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002784RR	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 該当する

1. 著者名 Nakagawa Yoshimi, Wang Yunong, Han Song-iee, Okuda Kanako, Oishi Asayo, Yagishita Yuka, Kumagai Kae, Ohno Hiroshi, Osaki Yoshinori, Mizunoe Yuhei, Araki Masaya, Murayama Yuki, Iwasaki Hitoshi, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Yamada Nobuhiro, Shimano Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Enterohepatic Transcription Factor CREB3L3 Protects Atherosclerosis via SREBP Competitive Inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 949 ~ 971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2020.11.004	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 該当する

1. 著者名 Satoh Aoi, Han Song-iee, Araki Masaya, Nakagawa Yoshimi, Ohno Hiroshi, Mizunoe Yuhei, Kumagai Kae, Murayama Yuki, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Sekiya Motohiro, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 CREBH Improves Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Metabolic Disturbances by FGF21-Dependent and FGF21-Independent Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100930 ~ 100930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100930	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 該当する

1. 著者名 Matsuzaka Takashi, Kuba Motoko, Koyasu Saori, Yamamoto Yuta, Motomura Kaori, Arulmozhiraja Sundaram, Ohno Hiroshi, Sharma Rahul, Shimura Takuya, Okajima Yuka, Han Song iee, Shimano Hitoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Hepatocyte ELOVL Fatty Acid Elongase 6 Determines Ceramide Acyl Chain Length and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1609 ~ 1625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30953	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 該当する

1. 著者名 Sato Aoi, Han Song-lee, Araki Masaya, Nakagawa Yoshimi, Ohno Hiroshi, Mizunoe Yuhei, Kumagai Kae, Murayama Yuki, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Sekiya Motohiro, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 CREBH Improves Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Metabolic Disturbances by FGF21-Dependent and FGF21-Independent Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100930 ~ 100930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100930	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 該当する
1. 著者名 Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Hoshino Shunsuke, Tagawa Ryoma, Itagawa Rei, Hoshino Ayana, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Cathepsin B overexpression induces degradation of perilipin 1 to cause lipid metabolism dysfunction in adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57428-6	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 該当する
1. 著者名 Kawasaki Mayu, Kambe Akira, Yamamoto Yuta, Arulmozhiraja Sundaram, Ito Sohei, Nakagawa Yoshimi, Tokiwa Hiroaki, Nakano Shogo, Shimano Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Elucidation of Molecular Mechanism of a Selective PPAR Modulator, Pemafibrate, through Combinational Approaches of X-ray Crystallography, Thermodynamic Analysis, and First-Principle Calculations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 361 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010361	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 該当する
1. 著者名 Ma Yang, Sekiya Motohiro, Kainoh Kenta, Matsuda Takaaki, Iwasaki Hitoshi, Osaki Yoshinori, Sugano Yoko, Suzuki Hiroaki, Takeuchi Yoshinori, Miyamoto Takafumi, Yahagi Naoya, Nakagawa Yoshimi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 523
2. 論文標題 Transcriptional co-repressor CtBP2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition through a novel transcriptional holocomplex with OCT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 354 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.070	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 該当する

1. 著者名 Matsuzaka Takashi, Kuba Motoko, Koyasu Saori, Yamamoto Yuta, Motomura Kaori, Arulmozhiraja Sundaram, Ohno Hiroshi, Sharma Rahul, Shimura Takuya, Okajima Yuka, Han Song iee, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Hepatocyte EloVL Fatty Acid Elongase 6 Determines Ceramide Acyl Chain Length and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1609 ~ 1625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30953	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 該当する

1. 著者名 Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Tagawa Ryoma, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Association between Lysosomal Dysfunction and Obesity-Related Pathology: A Key Knowledge to Prevent Metabolic Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3688 ~ 3688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153688	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 韓 松伊、中川嘉、宮本崇史、松坂賢、関谷元博、島野仁
2. 発表標題 新規プロテアーゼによるSREBP-1活性化制御機構の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 韓松伊、水之江雄平、中川嘉、関谷元博、松坂賢、島野仁
2. 発表標題 新規プロテアーゼによるSREBP-1活性化制御機構の解明
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	中川 嘉 (Nakagawa Yoshimi) (80361351)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

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