

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06067

研究課題名(和文)小胞体の形態変化を起点とする代謝リプログラミングに関する研究

研究課題名(英文) Study on molecular mechanisms of the interplay between endoplasmic reticulum dynamics and metabolic reprogramming

研究代表者

山本 泰憲 (Yamamoto, Yasunori)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30467659

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)：細胞はストレスにさらされると代謝をリプログラミングして対処し、恒常性を維持する。小胞体は生命の恒常性維持の中心的役割を担う細胞内小器官であるが、小胞体が代謝リプログラミングに対して能動的な役割を持つかどうかについては不明である。本研究では、小胞体膜タンパク質TMCC3が代謝リプログラミングに關与するアダプター分子と結合し、小胞体の膜形態を調節することを明らかにした。小胞体ストレスによるTMCC3の存在量の低下が小胞体の形態変化を誘導することを明らかにした。TMCC3が代謝リプログラミングを推進するシグナル分子の活性化と小胞体の形態変化を連結す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

小胞体と代謝リプログラミングとの機能関係は不明であったが、本研究により、小胞体の形態変化がTMCC3を介して代謝リプログラミング調節分子と物理的にも機能的にも連結していることを示した点で学術的意義が大きい。TMCC3の発現上昇はがんの悪性度と密接に関わることが知られている。したがって、本研究で明らかにしたTMCC3による小胞体の形態変化と代謝リプログラミング制御ががんの悪性化を推進している可能性が考えられ、本研究成果は社会的にも意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Cells cope with various stresses through metabolic reprogramming. While the endoplasmic reticulum (ER) is an organelle that plays central roles in regulation of cellular homeostasis, it remains unclear whether the ER is involved in metabolic reprogramming. In this study, we revealed TMCC3, an ER membrane protein, bound to the adaptor protein that mediated metabolic reprogramming, thereby regulating the ER morphology. We found that the protein level of TMCC3 was reduced in response to ER stress, leading to morphological change of the ER. We furthermore revealed that TMCC3 physically and functionally connect activation of the signaling molecule that drove metabolic reprogramming to morphological change of the ER.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体 Three-way junction リン酸化 TMCC3 14-3-3 小胞体ストレス Akt

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は代謝における異化と同化の動的平衡を保つことで生命の恒常性を維持している。細胞が外的及び内的なストレスにさらされると、代謝流束を変化させて代謝ネットワークを別の動的平衡状態へと大きく切り替える(代謝リプログラミング)ことでストレスに対処する。他方、小胞体は生命の恒常性維持の中心的役割を担う細胞内小器官であり、タンパク質合成、脂質合成、膜輸送、カルシウム貯蔵などの機能を有し、代謝における同化経路と密接な関わりをもつ。しかしながら、小胞体が代謝リプログラミングに対して能動的な役割を持つかどうかについては不明である。

小胞体はチューブ構造とシート構造の脂質膜が組み合わさってできており、チューブが three-way junction と呼ばれる三叉構造で連結することで網目状のネットワークを細胞質全体に構築する。これらの膜構造は膜変形タンパク質の働きにより形成、維持されている。網目状ネットワークは静的なものではなく、外的及び内的なストレスに応答してネットワーク構造を意図的に切り替える。しかしながら、小胞体の形態変化を誘導する分子機構と小胞体形態変化の生理的意義は未解明のままである。

私どもは three-way junction に局在する新しい小胞体膜形態調節タンパク質として TMCC3 を独自に同定している。TMCC3 は自身に膜変形作用は無いものの、小胞体全体のネットワーク構造を調節する活性を有する。また、TMCC3 は代謝リプログラミングに関わるシグナル伝達制御分子 14-3-3 と結合する。これらのことから、TMCC3 の活性制御が上述の未解明の小胞体の形態変化を誘導する分子機構に関与する可能性および、TMCC3 による小胞体の形態調節が細胞全体の代謝リプログラミングと密接に関わる可能性が考えられる。しかしながら、TMCC3 の活性を制御する分子機構および、TMCC3 による小胞体の形態調節と代謝リプログラミングの機能関係は不明のままである。

2. 研究の目的

本研究は、独自に同定した小胞体膜形態調節タンパク質 TMCC3 をツールにすることで、小胞体の形態変化を誘導する分子機構、小胞体の形態変化を起点とする代謝リプログラミング経路、小胞体の形態変化の生理的意義、の3つの未解決問題を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降

HEK293 細胞に適切な組み合わせの plasmid を polyethylenimine または Effectene (Qiagen) でトランスフェクションし、24 時間後に回収した。細胞を 1% TritonX-100 で可溶化した後、可溶性画分に抗 FLAG 抗体または抗 HA 抗体を加え、Protein G-sepharose レジンで免疫沈降した。サンプルを電気泳動後、抗 HA 抗体と抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットした。

(2) TMCC3 安定発現細胞株の樹立

U2OS 細胞に pCAGIpuro-GFP-TMCC3 および PCAGI-puro-GFP-TMCC3-S216A を Effectene (Qiagen) でトランスフェクションした。トランスフェクション翌日に細胞を希釈し、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ピューロマイシンを含む培地 (DMEM/10% FBS) に播種した。数日おきに培地を交換しながら培養をつづけ、ピューロマイシン耐性のコロニーをピックアップした。コロニー由来の細胞の培養をつづけ、GFP-TMCC3 または GFP-TMCC3-S216A を発現していることを抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットで確認し、GFP-TMCC3 または GFP-TMCC3-S216A を安定に発現する U2OS 細胞株を得た。

(3) 免疫染色

U2OS 細胞に plasmid を Effectene でトランスフェクションし、4% PFA/PBS で固定した後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ digitonin または 0.2% TritonX-100 で透過処理を行った。1% BSA/PBS でブロッキング後、一次抗体、蛍光色素標識された二次抗体をそれぞれ反応させ、共焦点レーザー顕微鏡または蛍光顕微鏡で観察した。

(4) 小胞体のシート構造の定量

U2OS 細胞を CLIMP-63 と α -tubulin に対する抗体で免疫染色した。画像解析ソフト Fiji を用い、CLIMP-63 の染色面積をピクセル単位で測定した。 α -tubulin の染色像から細胞の輪郭を決定し、同様に細胞全体の面積をピクセル単位で測定した。面積比 (CLIMP-63 の面積/細胞の全面積) を算出することで小胞体シートの量を定量した。

(5) 小胞体ストレスの誘導

U2OS 細胞を 1 μM Thapsigargin を添加した培地 (DMEM/10% FBS) で 24 時間培養することで小胞体ストレスを誘導した。

(6) Akt の活性化の検出

308 番目のスレオニンがリン酸化された Akt および、473 番目のセリンがリン酸化された Akt をそれぞれ特異的に認識する抗体でウェスタンブロットすることで、活性化した Akt を検出した。

4. 研究成果

(1) 14-3-3 タンパク質による TMCC3 の活性制御と小胞体の形態変化誘導機構

TMCC3 と 14-3-3 の結合領域を免疫沈降法で調べた。HA タグをつけた TMCC3 の N 末細胞質領域の様々なフラグメントと FLAG タグをつけた 14-3-3 γ を HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。その結果、90-210 番目のアミノ酸を含む細胞質領域が 14-3-3 γ との共沈降に必要であった。14-3-3 はコンセンサス配列中のリン酸化されたセリンを特異的に認識する。そこで、この 90-210 番目のアミノ酸を含む細胞質領域 (14-3-3 結合領域) の中にコンセンサス配列があるかを配列予測ツールで調べたところ、3ヶ所ヒットし、15 番目、25 番目、46 番目のセリンがそれぞれ結合サイトの候補として挙げられた。そこで、これらのセリンをアラニンに置換して、リン酸化されないようにした 14-3-3 結合領域の変異体を作成し、免疫沈降で 14-3-3 γ との結合を解析した結果、15 番目のセリンが 14-3-3 γ との強い結合に必須であった。また、コンセンサス配列中のリン酸化されたセリンを特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロットしたところ、野生型の 14-3-3 結合領域は認識されたが、15 番目のセリンをアラニンに置換した変異体は認識されなかった。以上の結果から、TMCC3 は細胞質領域の 15 番目のセリンがリン酸化されること、リン酸化依存的に 14-3-3 が結合することが明らかとなった。

次に、14-3-3 の結合と TMCC3 の細胞内局在との機能関係について調べた。そのために、GFP タグをつけた野生型 TMCC3 および 15 番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (TMCC3-S15A 変異体) を安定に発現する U2OS 細胞をそれぞれ樹立した。これらの細胞を小胞体のマーカータンパク質である PDI で免疫染色したところ、GFP-TMCC3 および GFP-TMCC3-S15A 変異体ともに小胞体の three-way junction に特異的に局在していた。このことから、TMCC3 の 15 番目のセリンのリン酸化は three-way junction への局在には必須ではないことが明らかとなった。次に、これらの細胞に HA タグをつけた 14-3-3 γ をトランスフェクションし、抗 HA 抗体で免疫染色し、HA-14-3-3 γ を発現している細胞を観察した。その結果、14-3-3 γ を過剰発現している細胞では、GFP-TMCC3 の three-way junction への局在が障害されていた。これに対し、GFP-TMCC3-S15A 変異体は 14-3-3 γ を過剰発現している細胞においても three-way junction に局在していた。以上のことから、TMCC3 のリン酸化依存的な 14-3-3 の結合は、TMCC3 の three-way junction への局在を抑制することが明らかとなった。

14-3-3 による TMCC3 の抑制が小胞体の形態形成に与える影響について解析した。そのために、U2OS 細胞を小胞体のシート構造のマーカータンパク質である CLIMP-63 に対する抗体で免疫染色し、CLIMP-63 の染色領域にもとづいて細胞全体のシート構造の量を定量化し、評価した。内在性の TMCC3 を siRNA ノックダウンした U2OS 細胞 (TMCC3 ノックダウン細胞) では、コントロール細胞に比べてシート構造の量が顕著に増大した。この TMCC3 ノックダウン細胞に外来性の TMCC3 を発現させると、シート構造の量がコントロール細胞と同程度まで減少し、TMCC3 ノックダウンによる小胞体シートの増大が完全にレスキューされた。これに対し、TMCC3 ノックダウン細胞に外来性の TMCC3-S15A 変異体を発現させても、野生型 TMCC3 ほどにはシート構造の量を減少させることができず、TMCC3 ノックダウンによる小胞体シートの増大を部分的にしかレスキューできなかった。以上のことから、14-3-3 による TMCC3 の抑制は小胞体の形態形成に必須の役割をしていることが明らかとなった。

TMCC3 は膜融合タンパク質 atlastin に結合し、atlastin の働きを促進することで three-way junction の形成を促進する。このことと本研究で明らかにした 14-3-3 による TMCC3 の抑制性調節を合わせると、three-way junction の形成を調節するメカニズムとして以下のモデル (図) が考えられる。TMCC3 と atlastin はチューブとチューブが連結する部位 (膜融合部位) へそれぞれ独立してリクルートされる。その後、TMCC3 は atlastin と結合し、atlastin の膜融合活性を促進することで three-way junction が形成される。これに対し、TMCC3 の 15 番目のセリンがリン酸化されると 14-3-3 が結合する。14-3-3 の結合は TMCC3 の膜融合部位へのリクルートを阻害する。その結果、atlastin は十分に機能することができなくなり、three-way junction の形成が抑制される。

14-3-3 による TMCC3 の抑制が小胞体の形態形成に必須であることを考えると、このような抑制性の調節は atlastin の活性を適切なレベルに保持することで three-way junction の過度の形成を防ぎ、小胞体の網目構造を適切に保つためのブレーキとして機能している可能性がある。14-3-3 はシグナル伝達におけるアダプタータンパク質であり、ストレス応答における代謝リプログラミングに関与することが知られている。したがって、このような 14-3-3 による TMCC3 の抑制性調節は、外的及び内的なストレスに応答した小胞体の形態変化と細胞全体の代謝の変容を機能的に連結させている可能性がある。この機能的連結の実体に迫るためには、TMCC3 の 15 番目のセリンをリン酸化するキナーゼの同定および、リン酸化状態の調節機構を解明することが重要であり、今後の課題である。

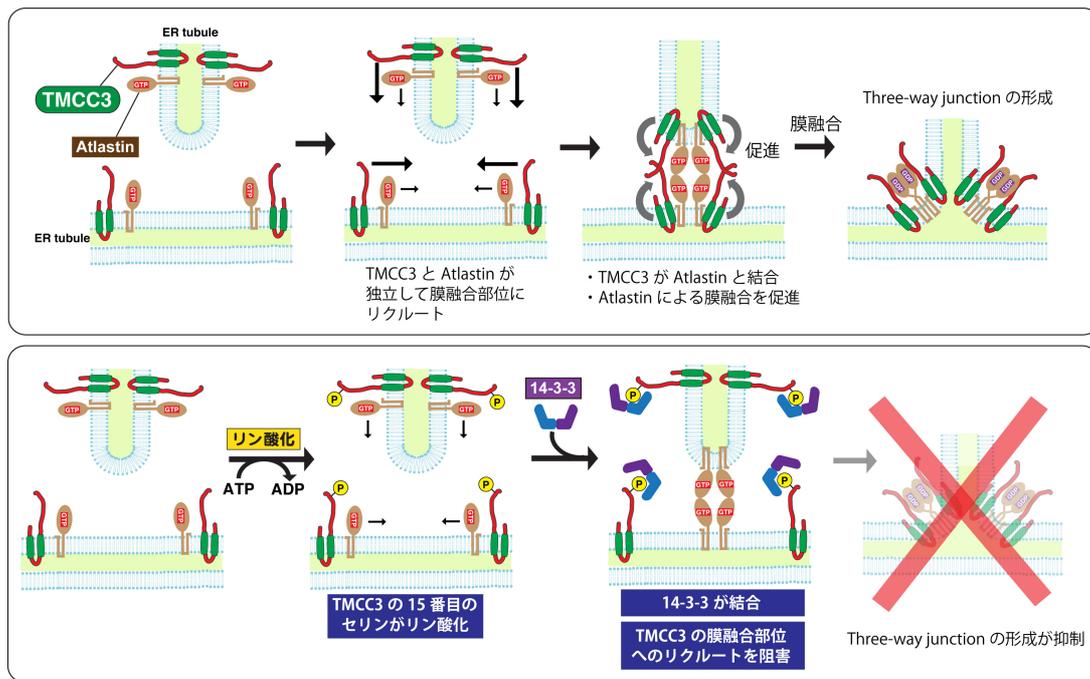


図 TMCC3 による Three-way junction 形成調節のモデル

(上段) TMCC3 は atlastin と結合することで three-way junction 形成を促進
 (下段) TMCC3 はリン酸化依存的に 14-3-3 と結合することで three-way junction 形成を抑制
 詳細は本文参照

(2) 小胞体ストレスによる小胞体の形態変化の分子機構

小胞体にフォールディング異常のタンパク質が蓄積(小胞体ストレス)すると、小胞体の形態が変化することが知られているが、その分子機構については不明な点が多い。U2OS 細胞を小胞体カルシウムポンプの阻害剤である Thapsigargin(Tg)で処理し、人工的に小胞体ストレスを誘導した。この細胞を CLIMP-63 で免疫染色すると、コントロール細胞に比べて小胞体のシート構造が顕著に増大していた。観察した小胞体シートの増大は TMCC3 ノックダウン細胞の表現型と酷似していた。そこで、three-way junction に特異的に局在する 3 つの小胞体膜タンパク質 TMCC3、atlastin-2、lunarapik の発現量をウェスタンブロットで調べたところ、Tg 処理した細胞において TMCC3 の発現量が有為に減少していた。他方、atlastin-2 と lunarapik の発現量には変化がなかった。

U2OS 細胞に control vector または外来性の TMCC3 をトランスフェクションし、Tg 処理して小胞体ストレスを誘導した。これら細胞を免疫染色して小胞体シートの量を定量したところ、TMCC3 をトランスフェクションした細胞では control vector に比べて小胞体シートの量が顕著に減少した。したがって、TMCC3 のトランスフェクションは小胞体ストレスによるシートの増大をレスキューした。

TMCC3 は atlastin の働きを促進することで、three-way junction の形成を調節する。Tg 処理した細胞では TMCC3 の発現量が減少するため、内在性の atlastin の活性が低下していると予想された。そこで、U2OS 細胞に control vector または外来性の atlastin-2 をトランスフェクションし、Tg 処理して小胞体ストレスを誘導した結果、atlastin-2 のトランスフェクションは小胞体ストレスによるシートの増大をレスキューすることを確認した。

以上の結果から、小胞体ストレスによる小胞体の形態変化の分子機構の一つとして、小胞体ストレス依存性の TMCC3 の選択的ダウンレギュレーションとそれに伴う atlastin の活性が考えられた。

(3) TMCC3 による代謝を調節するシグナル伝達の制御機構

TMCC3 は代謝の同化経路を推進するシグナル伝達分子 Akt と結合し、活性化する。しかしながら TMCC3 による Akt 活性化と小胞体の形態調節の機能関係は不明である。TMCC3 の 216 番目のセリンが高頻度でリン酸化されていることに着目し、Akt 活性化と小胞体の形態調節の機能関係の解明に取り組んだ。

216 番目のセリンをアラニンに置換したリン酸化されない TMCC3 変異体(TMCC3-S126A 変異体)を作成した。HEK293 細胞に野生型 TMCC3 を過剰発現すると Akt を活性化したが、TMCC3-S216A 変異体の過剰発現は Akt を十分に活性化することができなかった。TMCC3 と Akt の結合を免疫沈降法により検討した。HA タグをつけた TMCC3 の N 末細胞質領域(TMCC3-N)またはその S216A 変異体(TMCC3-N-S216A)と FLAG タグをつけた Akt1 を HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 HA 抗体で免疫沈降したところ、HA-TMCC3-N および HA-TMCC3-N-S216A のどちらも FLAG-Akt1 と共沈降した。したがって、TMCC3 の 216 番目のセリンのリン酸化は Akt の活性化に必要であ

るが、Akt との結合には影響しないことが明らかとなった。

次に、216 番目のセリンのリン酸化が小胞体の形態調節に関与するかを調べた。U2OS 細胞の内在性 TMCC3 を siRNA ノックダウンすると小胞体の網目状のネットワーク構造が減少した。TMCC3 ノックダウン細胞に野生型 TMCC3 のトランスフェクションをすると、網目状のネットワーク構造が回復した。これに対し、TMCC3 変異体のトランスフェクションでは、核周辺で bleb 状の異常な小胞体膜構造が誘導され、網目状のネットワーク構造を十分に回復することができなかった。したがって、TMCC3 の 216 番目のセリンのリン酸化が核周辺の小胞体の膜形態の調節に重要であることが明らかとなった。

以上のことから、TMCC3 はリン酸化依存的に Akt を活性化すること、TMCC3 による Akt 活性化が核周辺の小胞体の膜形態の調節に重要であると考えられた。Akt の活性化は代謝の同化経路を推進することから、小胞体が TMCC3-Akt 系を介して積極的に代謝リプログラミングを推進し、核周辺の小胞体をリモデリングしている可能性が考えられた。がん細胞で TMCC3 の発現と 216 番目のセリンのリン酸化が亢進していることから、がん細胞では TMCC3-Akt 系が活発化していることが推察される。しかしながら、核周辺の小胞体のリモデリングががん細胞の生存や増殖にとってどのような利点があるのかは不明であり、これを明らかにすることは今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Suhda Saihas, Yamamoto Yasunori, Wisesa Sindhu, Sada Risa, Sakisaka Toshiaki	4. 巻 299
2. 論文標題 The 14-3-3 isoform binds to and regulates the localization of endoplasmic reticulum (ER) membrane protein TMCC3 for the reticular network of the ER	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102813	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 -

1. 著者名 Angrandariyanny Putri Chynthia, Kajiho Hiroaki, Yamamoto Yasunori, Sakisaka Toshiaki	4. 巻 172
2. 論文標題 Lunapark ubiquitinates atlastin-2 for the tubular network formation of the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 245 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac060	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 泰憲, Sindhu Wisesa, 匂坂 敏朗
2. 発表標題 小胞体膜タンパク質TMCC3による小胞体の網目状ネットワークの形成調節機構
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学医学研究科膜動態学ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

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