

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780348

研究課題名(和文)ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの活性化制御機構と分泌系機能調整の解析

研究課題名(英文)Dephosphorylation of CCTbeta is required for the efficient secretory cargo export from the endoplasmic reticulum

研究代表者

荒井 斉祐 (Arai, seisuke)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30528261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物において細胞内Phosphatidylcholine量は厳密に制御されているが、詳細は不明である。この制御機構を解明する為、PC合成経路における律速酵素Phosphocholine cytidylyltransferase(CCT)の活性化制御を解析した。その結果、CCTは小胞体膜上においてプロテインホスファターゼ2Cにより脱リン酸化される事が示された。

また、CCT発現抑制は、分泌系タンパク質の輸送異常を引き起こした。この表現型を解析し、分泌系でのカーゴ輸送における律速過程である小胞体からゴルジ体への輸送過程、また、直接的な関与が示されていなかったCCTとカーゴの関係を示した。

研究成果の概要(英文)：Phosphocholine cytidylyltransferase (CCT), the rate-limiting enzyme in the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine (PC) synthesis, is activated by its translocation to membranes for efficient PC production. CCTbeta is translocated onto the ER membranes upon oleate addition. We found that knockdown of CCTbeta caused slowed export of secretory cargo. To understand the mechanism, we studied the oleate-induced translocation and then the CCTbeta was dephosphorylated in the membranes. We identified PP2Cepsilon as the protein responsible for the dephosphorylation of CCTbeta. Detailed analysis showed that exchange of Sec13 of the ERES with the cytoplasmic pool was markedly inhibited by knockdown of either CCTbeta or PP2Cepsilon to similar extent while the diffusibility of Sec13 in the cytoplasm remained unchanged. We propose that dephosphorylation of CCTbeta directly regulates COPII-mediated export of secretory cargo.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ 小胞輸送 ホスファチジルコリン

1. 研究開始当初の背景

リン脂質である PC の合成には 2 つの経路が存在し、1 つは Phosphatidylethanolamine (PE) のメチル化経路であり、もう 1 つは、CDP-Choline 経路である。後者は、真核生物における主経路であり、CDP-Choline が Diacylglycerol (DG) に転移され PC が生合成される。CDP-Choline 経路の律速段階は、CCT による Phosphocholine の CCT 由来 CMP への転移反応であり、律速酵素は CCT と考えられている (*JBC* (2005) 280:853)。PC は、真核生物の細胞膜を構成する主要なリン脂質であり、また、細胞内 PC 量は、細胞の増殖や分化に深く関わっている。このことから、PC 合成・分解を制御する代謝経路の詳細を理解する事は重要であるが、律速酵素 CCT の酵素レベルの活性制御機構でさえ詳細な解明に至っていないかった。

2. 研究の目的

PC は、真核生物の細胞膜を構成する主要なリン脂質であり、生理活性脂質の原料、エネルギー源としての 3 大生理機能を有するだけでなく、膜輸送、膜融合、細胞情報の受容と発信、細胞分裂、細胞の大きさ、細胞極性の発生など膜系で生じる様々な生命現象に関与している。また、細胞内の PC 量は、細胞の増殖や分化に関わっており、PC 関連の脂質合成や分解制御に異常をきたす遺伝子変異の幾つかは癌や糖尿病を引き起こす事が分かっている (*PNAS* (2003) 100: 9867)。従って、PC 合成や分解を制御する代謝経路を明らかにする事は極めて重要と考えられる。しかし、律速酵素 CCT の酵素レベルの活性制御機構でさえ詳細な解明に至っていないのが実状である (*BBA* (1997) 1348:79)。おそらくこれは、CCT に α 、 β のアイソフォームが存在する事や、それぞれの細胞内局在の違いが活性化制御や酵素学機能の理解を困難にしていると思われる。そこで本研究では、CCT β に着目しその活性化制御機構の解明を行う事とした。

また、CCT β の発現抑制は、分泌系タンパク質 (カーゴ) の輸送異常という予想

外の表現型をもたらした。この表現型の解析を更に進め、これまで考えられていなかった PC 合成経路とカーゴの輸送経路とのクロストークを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

CCT 活性化制御機構の解明

CCT の活性化には、CCT に存在する脂質結合ドメイン及びリン酸化ドメインの必要性が報告されている (*JBC* (1999) 274:26240)。そこで、各ドメインの変異体を作製し CCT 活性化制御機構について検討した。まず、CCT β の N 末端に GFP タグを付加し COS-7 細胞に安定発現させた細胞を単離し、CCT β の細胞内局在を検討した。不飽和脂肪酸であるオレイン酸を細胞へ添加すると CCT 活性と PC 合成量が增大する事が報告されている (*MBC* (2008) 19: 237)。そこで、オレイン酸添加により CCT β を活性化させ、その時の CCT β 動態を検討した。既報のリン酸化サイト (*Mol Cell* (2008) 31:438) に変異を導入する等、様々な CCT β 変異体を作製した。また、予想される脂質結合ドメインに種々の変異を導入し、膜局在出来ない様な変異体を作製した。これら変異体を用いた解析を行い、CCT のリン酸化・脱リン酸化と膜への結合にどのような相互関係 (脱リン酸化により膜局在するのか、膜局在してから脱リン酸化されるのか、など) があるのか明らかにした。また、それぞれの変異体を導入した細胞において PC 合成量を測定比較することでリン酸化状態や膜局在と活性化との関連を明らかにした。以上の実験により、細胞内 PC 合成に関する CCT 活性化制御機構の全容を明らかにする事を試みた。

PC 合成系とタンパク質輸送系のクロストークの解明

水疱性口内炎ウイルスの細胞膜タンパク質 VSV-G の温度感受性変異体 (tsO45) は、フォールディングに異常があり、39 °C で細胞に発現させると小胞体に蓄積し、この細胞を 32 °C にシフトすると一斉に小胞体からゴルジ体へ向かって輸送される。この VSV-G^{tsO45} に tagRFP タグを付加し、小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送の

動態について生細胞を用いたライブイメージングにより解析した。また、Endoglycosidase H (Endo-H) 耐性を指標に pulse-chase による免疫沈降実験で小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送の動態解析を行った。他のカーゴ分子においても同様の表現型が生じるのか、代表的な可溶性基質 α 1-アンチトリプシン (α 1-AT) の細胞外への分泌などにより検討した。

CCT 発現抑制により律速となる過程を同定する為に、小胞体膜上の輸送部位 (ERES) と小胞体 - ゴルジ体の中間領域 (ERGIC) のそれぞれのマーカー分子とカーゴに異なる蛍光タンパク質を付加したものをそれぞれ発現し観察した。更に、ERES における COPII 小胞の構成因子である Sec23-Sec24、Sec13-Sec31 の交換反応について、FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) や FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) を用いた分子イメージング技術により解析した。

CCT 活性化制御機構解明の過程で得られた種々の CCT β 変異体を用いたレスキュー実験により、CCT が必要とされるカーゴの輸送ステップを同定し、PC 合成系とタンパク質輸送系のクロストークを解明する事を試みた。

4. 研究成果

1) CCT 活性化制御機構の解明

CCT β アイソフォームの細胞内局在は、前小胞体と報告されていた (*JBC* (1999) 274: 26992)。これを検証する為に GFP-CCT β の局在を観察した結果、CCT β は予想に反し小胞体局在ではなく細胞質に見られた。この局在パターンは、PC 合成が小胞体膜上で起こる事実とは一致しない。そこで、オレイン酸添加により CCT を強制的に活性化させた細胞において GFP-CCT β の局在を観察した結果、CCT β は小胞体に局在し、その局在が劇的に変化する事を見出した (図 1)。

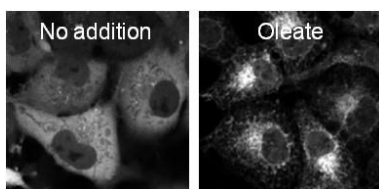


図1. GFP-CCT β の局在

オレイン酸を添加した細胞において、GFP-CCT β の分子量変化を調べた結果、定常状態に比べ下方にバンドシフトが見られた。このバンドシフトは定常状態に脱リン酸化酵素処理した GFP-CCT β の分子量と良く一致する事から、オレイン酸処理により脱リン酸化された事、また定常状態で GFP-CCT β はリン酸化されている事が分かった。これらの結果は、CCT の活性化には脂質結合領域を介した膜への移行が重要で、リン酸化ドメインが必要であるという報告 (*JBC* (1999) 274:26240) を強く支持するものであった。また、小胞体に局在できない CCT β 変異体では、オレイン酸処理による脱リン酸化が確認できなかった。

予想されるリン酸化サイトにアミノ酸置換を施し、オレイン酸により脱リン酸化されるサイトを探し、327 番目・335 番目・349 番目のセリン、及び 337 番目のスレオニンと同定した。更に、プロテインホスファターゼ阻害剤や siRNA を用いた検討により、CCT β の脱リン酸化酵素として小胞体に局在する PP2C ϵ が機能する事を見出した。

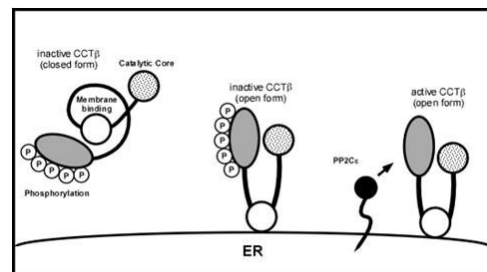


図2. CCT β の活性化制御機構

以上の結果から、PC 合成経路において CCT β は、不活性型リン酸化状態として細胞質に存在し、脂質結合ドメインを介して小胞体に局在した後、PP2C ϵ により脱リン酸化される事で活性化される事が示唆された。

2) PC 合成系とタンパク質輸送系のクロストークの解明

小胞体からゴルジ体への生細胞内におけるタンパク質輸送の動態解析を行った (図 3)。コントロール細胞では、許容温度にシフトした後、VSV-G^{tsO45} の速やかな輸送が観測されたが (図 3 上)、CCT発現抑制細胞ではこの現象は殆ど観察されず (図 3 下)、生化学的な手法でも同様の結果を得

た。また、代表的な可溶性基質 $\alpha 1$ -アンチトリプシン ($\alpha 1$ -AT) の細胞外への分泌を pulse-chase による免疫沈降実験で検討した結果、その分泌に遅れは生じなかった。これらの結果は、CCT β が膜タンパク質の成熟あるいは輸送に関わる事を示唆するものであった。

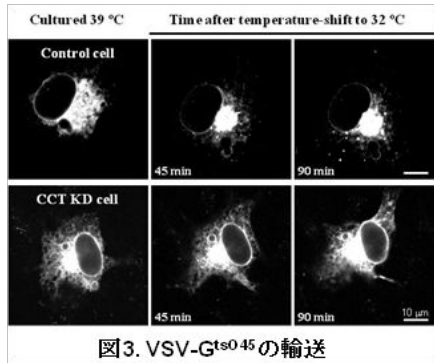


図3. VSV-G^{ts045}の輸送

COPII (coat protein complex II) 小胞は、細胞質中にある 3 種類の成分 (コート形成を開始させる Sar1-GTP、カーゴの選択を行う Sec23/24、コートの重合と膜の変形を引き起こす Sec13/31) が小胞体へと順番に移行し、小胞体膜上で形成される (*Nature* (2002) 419: 271)。これら構成成分の小胞体膜上に形成された ERES と細胞質プールとの交換反応について、FRAP と FLIP を用いて計測し COPII 小胞の維持や形成効率、また、各構成成分の交換反応に及ぼす CCT の機能を検討した。FRAP を用いた解析により、CCT β 発現抑制した細胞で Sec23 に変化は生じないが、Sec13 において最大回復率の顕著な減少が確認され (図 3)、FLIP を用いた解析から、CCT β 発現抑制により、ERES における Sec13 の交換反応が著しく低下している事を見出した。

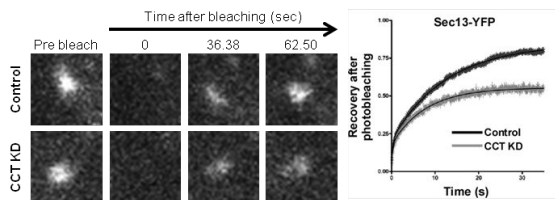


図4. Sec13のExchange rate

CCT β 発現抑制により生じた Sec13 の exchange rate の減少は、CCT β の脱リン酸化酵素である PP2C ϵ を発現抑制した細胞でも確認された。また、CCT β を発現抑制した細胞に、リン酸化フォームに固定した

CCT β 変異体、脱リン酸化フォームに固定した CCT β 変異体をそれぞれ導入したレスキュー実験を行った。その結果、脱リン酸化 CCT β を導入した細胞において、Sec13 の exchange rate がコントロール細胞と同程度まで回復し、VSV-G^{ts045} の表現型も回復させる事を確認した。

以上の結果から、CCT β 発現抑制による輸送異常は、Sec13 の ERES と細胞質プールでの交換反応の低下である事が示された。

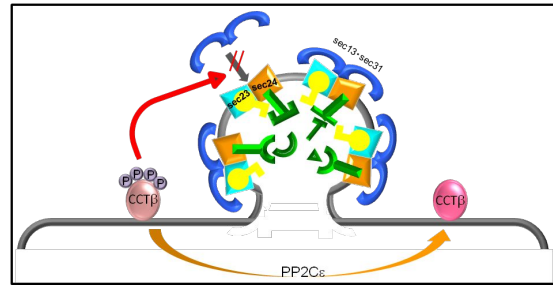


図5. CCT β によるERESでのSEC13の制御

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Stepwise Assembly of Fibrinogen Is Assisted by the Endoplasmic Reticulum Lectin-Chaperone System in HepG2 Cells
Tamura T, Arai S, Nagaya H, Mizuguchi J, Wada I.

PLoS ONE. 8(9), e745802013 (2013)

2) SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages
Sakurai C, Hashimoto H, Nakanishi H, Arai S, Wada Y, Sun-Wada GH, Wada I, Hatsuzawa K.

Mol Biol Cell (2012) 23 4849-4863

3) Development of cysteine-free fluorescent proteins for the oxidative environment.

Suzuki T, Arai S, Takeuchi M, Sakurai C, Ebana H, Higashi T, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Wada I.

PLoS ONE. 7 (5), e37551(2012)

4) Autofluorescence of the cells in human subretinal fluid.

Seikiryu T, Oguchi Y, Arai S, Wada I, Iida T.
Investigative ophthalmology & visual science. 52, 8534-8541(2011)

[学会発表](計4件)

1) Analyses on the translocation of CCT β 2 to the endoplasmic membranes

Seisuke Arai, Atsushi Yamashita, Ikuo Wada
第65回日本細胞生物学会大会 6月21日
(2013) 名古屋

2) Dephosphorylation of CCT β is required for the efficient secretory cargo export from the endoplasmic reticulum

Seisuke Arai, Atsushi Yamashita, Ikuo Wada
第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 5月30日 (2012)
神戸

3) Oleate-induced dephosphorylation of CCT β is mediated by protein phosphatase 2C ϵ upon translocation to the ER membranes

Seisuke Arai, Atsushi Yamashita, Ikuo Wada
第34回日本分子生物学会 12月15日
(2011) 横浜

4) Oleate-induced dephosphorylation of CCT β is mediated by protein phosphatase 2C ϵ upon translocation to the ER membranes

Seisuke Arai, Atsushi Yamashita, Ikuo Wada
第63回日本細胞生物学会大会 6月27日
(2011) 札幌

[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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 斉祐 (ARAI SEISUKE)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30528261

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: