

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年06月21日現在

機関番号：82603  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790118  
 研究課題名（和文）CERTとVAPの相互作用を制御するメカニズム  
 研究課題名（英文）The regulatory mechanism for the CERT-VAP interaction

## 研究代表者

熊谷 圭悟 (KUMAGAI KEIGO)  
 国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官  
 研究者番号：40443105

## 研究成果の概要（和文）：

セラミド輸送タンパク質（CERT）はセラミドを小胞体膜からゴルジ体膜へ輸送するタンパク質である。CERTは小胞体膜に局在する膜タンパク質であるVAP-Aと相互作用することにより、輸送効率を高めている。本研究では、CERT上の特定の部位がリン酸化修飾を受けることで、CERTとVAP-Aとの相互作用が強まり、その結果として小胞体膜からゴルジ体膜へのセラミド輸送が促進されることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

CERT is a cytosolic protein that transports ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. The CERT-mediated transport of ceramide is accelerated by interaction between CERT and ER-resident membrane protein, VAP-A, but a regulatory mechanism for the interaction has not been determined. In this study, we demonstrated that phosphorylation at certain residue of CERT strengthened the interaction between CERT and VAP-A to facilitate ER-to-Golgi ceramide trafficking by CERT.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費 | 合計        |
|-------|-----------|------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 0    | 3,300,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生化学

キーワード：セラミド、スフィンゴミエリン、CERT、VAP、FFATモチーフ、リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

セラミド輸送タンパク質（CERT）はセラミドを小胞体（ER）からゴルジ体へ輸送するタンパク質である。セラミドはERで合成されたのち、CERTによってゴルジ体のトランス領域へと輸送され、そこに局在するスフィンゴミエリン合成酵素によってスフィンゴミエリンに変換される。CERTのC末にはセラミドを認識し、膜間輸送する能力を持つSTARTドメインが存在しているが、STARTド

メイン単独ではERからゴルジ体へのセラミド輸送はほとんど起こらない。CERTがER-ゴルジ体間のセラミド輸送を効率的に行うためには、STARTドメインの機能の他に、輸送をサポートする幾つかのサポート機能も必要である。CERTのN末にはPI4Pと結合するPHドメインが存在しており、PI4Pとの結合を介してCERTはゴルジ体に局在することが可能である。また、CERTにはFFATモチーフと呼ばれる領域も存在しており、この領

域をERの膜タンパク質の一つ、VAP-Aが認識し結合することにより、CERTはERにアクセスすることが可能である。これらの機能ドメイン・モチーフの他に、我々はCERTのセリンリピートモチーフ(SRモチーフ)と呼ばれる領域が高度にリン酸化修飾を受けていること、そのリン酸化修飾によってCERTが不活性化されることを明らかにしていた。SRモチーフは細胞膜のコレステロールやスフィンゴミエリンを減少させる刺激によって脱リン酸化され、その結果、CERTが活性化される(J. Biol. Chem. 282. 17758-17766 (2007))。SRモチーフの脱リン酸化は、PHドメインのPI4Pに対する親和性を高めるとともに、STARTドメインの膜間セラミド輸送活性を高めることによってCERTを活性化していた。しかしながら、SRモチーフの脱リン酸化はCERTとVAP-Aとの相互作用には影響を及ぼさなかった。本研究を始める段階において、CERTとVAP-Aとの相互作用が制御されているのか否か、もし制御されているとすればどのようなメカニズムによって制御されているのかは明らかになっていなかった。我々は2008年度~2009年度にわたり科学研究費助成事業によって支援を受けた研究課題”ラフトの構成成分の減少がCERTの脱リン酸化を引き起こすメカニズムの解析”を進める中で、SRモチーフとは異なるある特定の部位(セリンX)がリン酸化修飾を受けていることを明らかにした。CERTとVAP-Aとの相互作用は細胞内におけるセラミド輸送効率を著しく上昇させるので(J. Biol. Chem. 281. 30279-30288 (2006))、両者の相互作用を制御することは、スフィンゴミエリン合成を調節する上で好都合であろう。我々はセリンXのリン酸化がCERTとVAP-Aの相互作用を調節しているのではないかと着想し、このセリン残基のリン酸化によるCERT-VAP間の相互作用の変化について解析を行うことにした。

## 2. 研究の目的

CERTとVAP-Aの相互作用を制御することは、スフィンゴミエリン合成の調節という点で重要であるが、別の視点からも重要な意味を有している。これまでに電子顕微鏡を用いた解析から、ER膜がゴルジ体膜に近接して存在する像が多数得られており、この近接領域はER-ゴルジ間メンブレンコンタクトサイトと呼ばれている。ER-ゴルジ間メンブレンコンタクトサイトは双方のオルガネラ間で脂質等の低分子化合物を効率よく輸送するための構造であるが、その形成メカニズムについては不明な点が多い。CERTはERとゴルジ体双方のオルガネラにアフィニティーを有する分子であるため、メンブレンコン

タクトサイトに移行し易い性質を有するとともに、双方のオルガネラをつなぎ止めることによってメンブレンコンタクトサイトの形成・維持に関わっていると考えられている。一方、免疫染色による局在解析や免疫沈降実験などから、CERTとVAP-Aの相互作用は微弱であることが示唆されており、メンブレンコンタクトサイトの形成・維持を担うだけの結合力があるか、という問題点が残されていた。CERTとVAP-Aの相互作用が強化された状態があるとすれば、その状態はメンブレンコンタクトサイトの安定化に大きく寄与するはずである。このように、CERTとVAP-Aの相互作用制御を解明することは、ER-ゴルジ間メンブレンコンタクトサイトの形成と調節メカニズムの解明へと発展していく可能性を秘めている。

これらの予想を検証するために、一つ一つ実験的な証拠を積み上げて行くことが必要である。すなわち本研究では、最初にセリンXのリン酸化によってCERTとVAP-Aの相互作用がどのような影響を受けるのかを解明する。また、そのリン酸化によって、細胞内のセラミド輸送に変化が起きているのかどうかについても解明する。その先に、メンブレンコンタクトサイトの形態観察や、セリンXのリン酸化を担うキナーゼの同定といった方面へと研究を展開していく。こうしたアプローチを経て、本研究はメンブレンコンタクトサイトと脂質輸送に関する理解を深めることを目指す。

## 3. 研究の方法

まず、該当するリン酸化部位に対するペプチド抗体を作製する。CERTを過剰発現させた細胞からlysateを調製し、ウェスタンブロットティングによってセリンXがリン酸化されていることを確認する。

次に、セリンXをアラニン、アスパラギン酸、及び、グルタミン酸に置換した変異体CERTを作製し、これらの変異体CERTについての生化学的解析を進める。変異体CERTとVAP-Aを細胞内に共発現させ、免疫沈降実験を行う。VAP-Aと共沈してくる各種CERTの量をウェスタンブロットティング等で定量することにより、CERTとVAP-Aとの相互作用の強さについて調べる。

変異体CERTの細胞内におけるセラミド輸送活性を調べる為に、セミインタクト細胞を用いた再構成系アッセイにより活性を測定する。この系では、小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送を測ることが可能である。同時に、in vitroにおけるPI4Pプルダウンアッセイやリポソーム膜間セラミドトランスファーアッセイ等も用いて、PHドメインやSTARTドメインへの影響についても検証する。

セリン X の周辺配列から想定されるキナーゼを文献的に探し、特に可能性が高いと思われるものについては siRNA を用いて細胞内のキナーゼをノックダウンする。ノックダウンを定量 PCR もしくはウェスタンブロッティングによって確認したのち、CERT のセリン X のリン酸化状態に変化があるか否か検討する。ノックダウンによって変化がなかった場合には、スクリーニング系の構築を進める。

更に、変異体 CERT の細胞内局在について、免疫蛍光染色を用いて解析する。様々なオルガネラマーカールとの二重染色を行い、細胞内局在に変化がないか調べる。

#### 4. 研究成果

該当するリン酸化部位に対するペプチド抗体を用いて解析した結果、セリン X は確かにリン酸化修飾を受けていることが確認された。

免疫沈降実験を行い VAP-A と共沈してくる CERT の量を比較した。その結果、セリン X をグルタミン酸、及び、アスパラギン酸に置換した変異体 CERT では、wild type CERT と比べて著しく多量の CERT が共沈された。これは、セリン X のリン酸化によって CERT と VAP-A との相互作用が強まる事を意味している。

セミインタクト細胞を用いた再構成系アッセイにより、細胞内における ER からゴルジへのセラミド輸送活性を測定した。その結果、セリン X のリン酸化によって上述の活性が wild type CERT と比較して著しく上昇することが明らかになった。上昇の一因として、既に CERT-VAP 間相互作用が強まっていることが明らかになっていたが、更に、PH ドメインに由来する PI4P の結合能に変化があるのかも調べた。PI4P プルダウンアッセイでは、wild type CERT と変異体 CERT の間に大きな違いは認められなかった。また、START ドメインに由来するセラミド輸送能の変化についても調べた。リポソーム膜間のセラミドトランスファーアッセイを行ったが、PI4P プルダウンアッセイと同じく、wild type CERT と変異体 CERT の間に大きな違いは認められなかった。

セリン X の周辺配列から判断して、関与する可能性が高いキナーゼを選び出し、siRNA によるノックダウン実験を行った。ウェスタンブロッティングによって、タンパク質レベルでのキナーゼの減少を確認したのち、セリン X のリン酸化状態を調べたが、リン酸化状態に変化は認められなかった。この結果を受け、現在我々はキナーゼを同定するためのスクリーニング系の構築を進めている。

変異体 CERT の細胞内局在を調べると、ゴルジ体への局在が見られた。光学顕微鏡に

よる分解能では十分に議論する事ができないと判断されたため、現在、電子顕微鏡を用いて微細な膜構造の変化について検討を進めている。

本研究によって、CERT と VAP-A との相互作用が制御されていること、その制御は CERT の特定のセリン残基がリン酸化されることによって行われていることが示された。セリン X のリン酸化が ER-ゴルジ間メンブレンコンタクトサイトの形成に与える影響が確認されれば、リン酸化修飾によってメンブレンコンタクトサイトが制御されていることを示す最初の例となる。我々の研究を起点として、メンブレンコンタクトサイトに関する研究は動的な制御へとその関心を拡大していくものと予想される。また、そのような状況下では、該当部位のリン酸化を担うキナーゼへの関心もますます高まることが予想される。我々の研究は、このリン酸化が単に CERT の活性制御を通じてスフィンゴミエリン生合成の調節を行っているだけでなく、二次的効果としてメンブレンコンタクトサイトのダイナミックな変化をも動員しながら生合成の調節を実現しているとのモデルを提唱する。

#### 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 2 件)

- (1) Sugiki T, Takeuchi K, Yamaji T, Takano T, Tokunaga Y, Kumagai K, Hanada K, Takahashi H, Shimada I.: "Structural basis for the Golgi association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein (CERT)." *J. Biol. Chem.* 287. 33706-33718 (2012), (査読有) DOI: 10.1074/jbc.M112.367730
- (2) Kumagai K, Nishijima M, Hanada K.: "Reconstitution assay system for ceramide transport with semi-intact cells." *Methods Cell Biol.* 108. 117-129 (2012), (査読有) DOI: 10.1016/B978-0-12-386487-1.00006-7

[学会発表] (計 2 件)

- ① 熊谷圭悟: "セラミド輸送タンパク質 CERT と小胞体膜タンパク質 VAP との相互作用制御" 第 84 回日本生化学会大会. (20121216). 福岡県福岡市
- ② 花田賢太郎: "セラミド輸送タンパク

質 CERT のプレクストリン相同ドメイン  
によるホスファチジルイノシトール4-  
リン酸認識の構造基盤” 第 84 回日本生  
化学会大会. (20121216). 福岡県福岡市

[その他]

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biochem/912-4th.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊谷 圭悟 (KUMAGAI KEIGO)

国立感染症研究所・細胞化学部・主任研究官

研究者番号：40443105

### (2) 研究分担者

該当せず

### (3) 連携研究者

花田 賢太郎 (HANADA KENTARO)

国立感染症研究所・細胞化学部・部長

研究者番号：30192701