

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870346

研究課題名(和文)代謝調節因子Lipin1の細胞内局在を制御する因子の探索

研究課題名(英文)The search of novel factors that control the subcellular localization of Lipin1

研究代表者

石本 憲司 (Ishimoto, Kenji)

東京大学・先端科学技術研究センター・研究員

研究者番号：00572984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂質代謝調節因子Lipin1の細胞内局在を制御する新たな因子を同定するために、細部内光クロスリンク法を用いて解析した。まず、Lipin1の核移行シグナル付近に非天然型アミノ酸を導入した変異型Lipin1を複製し、この変異型を細胞内に発現させ、光クロスリンクを行った。その後、免疫沈降でLipin1複合体を精製後、質量分析を行った。その結果、Lipin1のNLS付近に作用する因子として、リン酸化修飾部位を認識するタンパク質が同定できた。これらのことから、Lipin1の局在制御に関わる可能性がある新たな因子を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We set out to search for novel factors that control the subcellular localization of Lipin1 by using in cell protein photo-cross-linking technique. As a result, we have identified the phosphorylated binding protein as novel Lipin1 interacting factor.

研究分野：代謝制御学

キーワード：Lipin1 細胞内光クロスリンク法 脂質代謝 細胞内局在 脂肪酸酸化 トリグリセリド合成 核移行シグナル(NLS) 肥満

1. 研究開始当初の背景

Lipin1 は細胞内脂質代謝の恒常性を維持する鍵因子である。この因子のユニークな点として、細胞内局在を変化させることで、対極的な2つの脂質代謝機能を使い分けることである(図1)。具体的には、細胞質において、脂質合成過程における酵素であるホスファチジン酸ホスファターゼ(PAP)として働くことで、脂質貯蓄(A)を行う。一方核において、脂肪酸酸化に関連する遺伝子の発現を活性化する転写共役因子として働くことで、脂質分解を行う(B)。

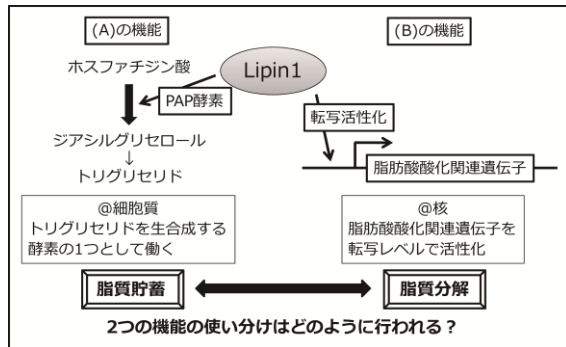


図1 細胞内局在の違いによる Lipin1 の機能

このように Lipin1 は、「脂質を貯蓄する役割と脂質を分解する役割」をもつ従来にない代謝調節因子であり、創薬標的としても注目されている。しかしながら、Lipin1 がどのような条件で細胞質から核(あるいは核から細胞質)に移動しながら、2つの機能を使い分けているのかほとんどわかっていない。

Lipin1 タンパク質の細胞内局在について、その一次構造内に核局在シグナル(NLS)を有していることから、Lipin1 タンパク質の発現量が増加すれば、一定の割合で核に移行すると予想される。研究代表者はこれまでに、Lipin1 遺伝子の発現制御メカニズムを解明し、Lipin1 発現量を効果的に増加する方法を見出した(Ishimoto et al. J Biol Chem 2009, Ishimoto. Yakugaku Zasshi 2011)。この方法を用いて細胞内の Lipin1 タンパク質量を増加させたところ、Lipin1 は核に移行せず、細胞質の Lipin1 量のみが増加するという結果が得られた。すなわち、Lipin1 の NLS は単独で機能することはできないと考えられる。また最近の報告では、Lipin1 がリン酸化修飾や SUMO 化修飾を受けると、Lipin1 の細胞内局在を変化させるという知見がある。これらのことから、Lipin1 の細胞内局在の決定には、それをサポートする別の因子が必要であると予測される。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果を

もとに、本研究は Lipin1 の細胞内局在を制御する Lipin1 結合因子を同定する。そして、細胞質に存在する Lipin1 を核へ移行させることで、細胞内の脂質を減少させる方法を確立する。本研究の達成は、肥満解消に対する新たな治療戦略の提唱につながると考えられる。

3. 研究の方法

「細胞内光クロスリンク法」を用いた Lipin1 相互作用因子の探索を行う。「細胞内光クロスリンク法」は、①細胞内で、光クロスリンカーとして働く「非天然型アミノ酸」を、研究対象とするタンパク質に対して部位特異的に導入し、②細胞に光を照射することで相互作用しているタンパク質との間に共有結合を形成させ、③安定化した複合体を細胞より抽出・精製し、その構成成分を Western Blot もしくは質量分析により解析する手法である(Nat Methods 2005, J Mol Biol 2011)。

本研究においては、哺乳類細胞内で実際に形成されている Lipin1 複合体を共有結合によって繋ぎ止めることで、細胞内の生理条件を反映した相互作用タンパク質を探索する。そして、探索した因子と Lipin1 との結合を検証後、Lipin1 の細胞内局在変化について考察する。

4. 研究成果

(1) 光クロスリンカーとして非天然型アミノ酸の部位特異的な導入

「細胞内光クロスリンク法」では、細胞内で非天然型アミノ酸をタンパク質の望みの箇所に導入することが可能になっている(Nat Protocols 2007, Methods Mol Biol 2012)。終止コドンの1つである UAG コドンと対合するように設計された tRNA と、それに非天然型アミノ酸を特異的に付加するように設計されたアミノアシル合成酵素変異体を細胞内に発現させておき、培地中に非天然型アミノ酸を加えると、目的遺伝子内にあらかじめ導入しておいた UAG コドンに対して非天然型アミノ酸が導入される仕組みである。

本研究では、Lipin1 のもつ機能ドメインのうち、細胞内局在に関与する NLS に対してクロスリンカーを導入することを試みた。具体的には、Lipin1 の持つ NLS の周辺部位に UAG コドンを導入した変異体を 8 種類作製した。次に、これらのプラスミドを 293 c18 細胞株に一過的に導入し、非天然型アミノ酸存在下で 20 時間培養後、細胞を回収した。細胞抽出液を調製後、Lipin1 に付加している FLAG タグを利用した Western Blot を行ったところ、全ての変異型 Lipin1 が発現していた。これらのことから、全ての変異型 Lipin1 に非天然型アミノ酸が導入できていることがわかった。

(2) Lipin1 結合因子の細胞内光クロスリンク法による同定

次に作製した変異型 Lipin1 のうち、未知の Lipin1 相互作用因子と光クロスリンク可能な変異型を探索した。(1)と同様に、293 c18 細胞に非天然型アミノ酸を導入した変異型 Lipin1 を発現させた後、光を照射した。そして、その細胞を回収し、抗 FLAG 抗体による免疫沈降後、WesternBlot を行った。その結果、クロスリンクが成立すると観察させるシフトバンドが、複数の変異型 Lipin1 において存在することが分かった(図2)。これらのことから、作製した変異型 Lipin1 と細胞内在性の因子がクロスリンクしていること、そしてその内在性因子は Lipin1 の NLS 付近で特異的に結合していることが示された。

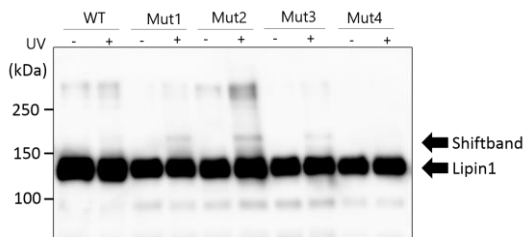


図2 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降後の Western Blot 解析

次に、観察されたシフトバンド量と高い再現性という点から Mut2 を選別し、このサンプルが銀染色法で観察できるか調べた(図3)。その結果、銀染色のレベルでもシフトバンドが観察できたため、このバンドを切り出して質量分析を行った。その結果、リン酸化を認識して結合するタンパク質が同定された。この同定されたリン酸化結合因子について文献検索を行ったところ、細胞内局在と関連する複数の報告がある。従って、Lipin1 の細胞内局在とも深く関与する可能性が高いと予想された。

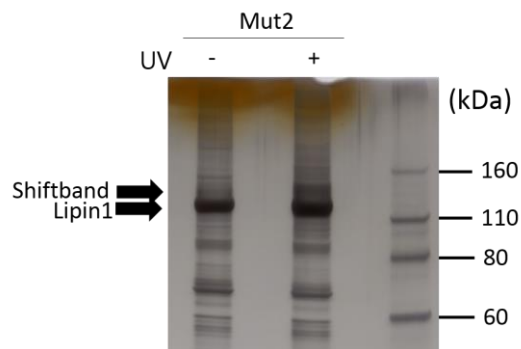


図3 抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降後の銀染色

(3) Lipin1 とリン酸化結合因子との相互作用解析

Lipin1 と候補因子が実際に結合しているか、また光クロスリンクが可能か否かについて

解析を試みた。候補因子の遺伝子を HeLa 細胞由来の cDNA からクローニング後、哺乳類細胞で発現できるプラスミドを作製した。そして、Lipin1 と候補因子を 293 c18 細胞株に共発現後、光クロスリンク、FLAG タグを利用した免疫沈降を行った。その結果、Lipin1 と候補因子が確実に結合していること、そして光クロスリンクによるシフトバンドが可能であることが明らかとなった(図4)。今後は、Lipin1 とその結合因子による細胞内局在制御を解明していく。

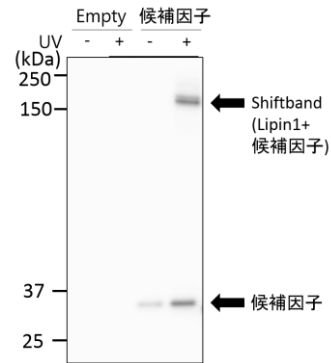


図4 Lipin1 と候補因子の結合解析
免疫沈降後、候補因子に融合した V5 タグに対する抗体を用いて Western Blot 解析を行った。

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3件)

① Okada Y, Naruse H, Tanaka T, Funahashi N, Regan ER, Yamakawa K, Hino N, Ishimoto K, Doi T, Aird WC. Expression of the Robo4 receptor in endothelial cells is regulated by two AP-1 protein complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 467(4), 987-991, 2015.

② Tachibana K, Gotoh E, Kawamata N, Ishimoto K, Uchihara Y, Iwanari H, Sugiyama A, Kawamura T, Mochizuki Y, Tanaka T, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T. Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 465(4), 725-731, 2015.

③ Okada Y, Funahashi N, Tanaka T, Nishiyama Y, Yuan L, Shirakura K, Turjman AS, Kano Y, Naruse H, Suzuki A, Sakai M, Zhixia J, Kitajima K, Ishimoto K, Hino N, Kondoh M, Mukai Y, Nakagawa S, García-Cardena G, Aird WC, Doi T. A Endothelial cell-specific expression of

roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 査読有, 34(7), 1531-1538, 2014.

〔学会発表〕(計2件)

① 奥野絃子, 石本憲司, 熊谷文子, 早瀬絢香, 樋野展正, 橘敬祐, 川村猛, 田中十志也, 児玉龍彦, 土井健史, 脂質代謝制御因子 Lipin1 と分解メカニズムの解明, 第16回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2015年6月13日, 日本薬学会・長井記念ホール(東京)

② 早瀬絢香, 石本憲司, 熊谷文子, 橘敬祐, 川村猛, 田中十志也, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史, ユビキチンリガーゼによる脂質代謝調節因子 Lipin1 の分解機構の解析, 第64回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014年10月11日, 京都薬科大学(京都)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 憲司 (ISHIMOTO, Kenji)

東京大学・先端科学技術研究センター・研究員

研究者番号: 00572984