

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08152

研究課題名(和文) 核内における脂肪滴の生理的意義

研究課題名(英文) Physiological meanings of nuclear lipid droplets

研究代表者

大崎 雄樹 (Ohsaki, Yuki)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00378027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中性脂質のコアをリン脂質一重膜が覆うオルガネラである脂肪滴は通常細胞質で形成されるが、肝由来細胞などでは核内にも多く形成される。本計画では核内脂肪滴の形成機序と機能の解明を目指した。

形態学的解析の結果、核内脂肪滴は小胞体内腔で形成されるリポプロテイン前駆体が核膜陥入構造を經由して核質に遊離したものであることが示唆された。

一方核内脂肪滴はホスファチジルコリン(PC)新規合成経路の律速酵素CCTalphaが集積して活性化する場である可能性が示唆された。CCTalphaの核内脂肪滴局在を増加させることによりPC合成と小胞体ストレスに対する細胞保護効果を増強できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplets (LD) are composed of a neutral lipids core and phospholipids monolayer. In hepatic cells, LDs are formed not only in the cytoplasm but in the nucleus. The aim of this research is to clarify biogenesis and physiological roles of nucleoplasmic LDs.

Morphological analyses showed that lipoprotein precursors in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) can be delivered to the lumen of nucleoplasmic reticulum (NR), an invagination of inner nuclear membrane, then finally transferred to become nucleoplasmic LDs. Moreover, CCTalpha, the rate-limiting enzyme of de novo synthetic pathway of phosphatidylcholine (PC), was recruited to nucleoplasmic LDs, which correlated to increase of PC synthetic activity. These data suggested that nucleoplasmic LDs function as a site of CCTalpha activation, which can regulate cellular PC synthesis and ameliorate ER stress.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪滴 トリアシルグリセロール 核膜陥入構造 PML小体

## 1. 研究開始当初の背景

動物細胞の多くは磷脂質一重膜と中性脂質のコアから成る脂肪滴 (Lipid droplet: LD) を保持しており、脂肪滴は小胞体(ER)膜で合成された中性脂質のコアが次第に大きくなり、小胞体膜の細胞質側葉を外皮として細胞質側に遊離して形成されると考えられている。細胞質脂肪滴 (cLD)には多数の機能的分子が存在し、エネルギー貯蔵、熱産生、タンパク質分解など多くの生理滴意義が明らかとなってきた(引用文献)。一方研究代表者は肝癌由来細胞やマウス肝細胞においてLDが核内にも豊富に存在することを見出した(nLDとする)。また応募者はnLDが脂肪細胞やステロイド産生細胞などcLDを豊富に持つ細胞では形成されず、肝由来細胞など一部の細胞種に限局して形成されることを把握していた。予備的知見として、代表者は肝癌由来細胞においてnLDが核内構造体の一つであるPML小体と共局在することを見出していた。PML小体は転写因子および修飾酵素などを積載し、遺伝子転写調節やタンパク質修飾・分解などの機能を持つとされている(引用文献)。さらに肝癌由来細胞では核膜陥入構造(Nucleoplasmic reticulum: NR)が発達し、nLDはNRと近接して存在していた。複数存在するPML分子の転写 isoformのうち、PML-IIが最もnLDと共局在し、PML-IIの発現量操作とnLD形成量およびNR形成量が正に相関したことから、PML-IIがnLD形成に何らかの関与を持つことが強く示唆された。他方、LD-PML複合体の形成からnLDが細胞種特異的な遺伝子転写調節・タンパク質修飾に関与する可能性が示唆された。しかしながら依然としてnLDの形成機序や機能は不明であった。

## 2. 研究の目的

上記の背景を元に、本研究課題では以下の3点を到達目標とした。

### (1)核内LDの形成機序を明らかにする

PML-IIがNR構造形成とnLD形成に関わる機序を主に形態学的手法により調べる。

### (2)核内LDが転写調節・タンパク質修飾の場として働く可能性を検証する

生化学的に単離したnLDに結合するタンパク質を質量分析により網羅的に検索・同定し、cLDとの組成の違いを比較する。nLDと結合するDNA配列を検索し、nLDが遺伝子転写調節の場として機能するか調べる。LD-PML複合体がそこに局在する転写因子等のSUMO化・ユビキチン化等の修飾に関与する可能性を検証する。

### (3)核内LDとウイルス増殖の関連を検索する

HCVやアデノウイルスなどではウイルスゲノム由来タンパク質がPML小体を標的としてその機能を抑制し、宿主細胞においてウイルス増殖に有利な条件を誘導するとされていた(引用文献)。PML小体-ウイルスゲノム由来タンパク質間の結合と、PML-LD間の

結合が競合的に行われるのであれば、LD-PML複合体の増加によりウイルスゲノム由来タンパク質によるPML小体の機能破壊が抑制され、HCV-Coreの局在・HCV増殖およびアデノウイルス初期翻訳タンパク質の局在・アデノウイルス増殖に影響を及ぼし得る可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) PML isoform IIがどのようにNR構造の伸長に寄与しnLDと会合するのかを電顕画像立体構築技術などにより解析し、nLDとPML、核膜、NR構造、核ラミナとの立体的位置関係を詳細に調べることにより、nLDの形成機序を明らかにする。

(2) Huh7細胞及びマウス肝組織の核画分からnLDを生化学的に単離し、含まれる分子を質量分析により網羅的に検索する。FLAG-TEV-PML-II安定発現Huh7細胞から抗FLAGを用いたpull downおよびChIP assayによりLD-PML複合体に特異的に結合するタンパク質・DNA配列を検索する。同定された分子のタンパク質修飾・遺伝子発現への影響を検討する。

(3) LD-PML複合体を増加させる条件(脂肪酸投与など)と減少させる条件(脂質除去培地培養、中性脂質合成酵素阻害剤投与など)を行い、HCV-Coreあるいはアデノウイルス初期翻訳タンパク質とPML小体との結合を競合的阻害することにより、nLDがウイルス増殖に影響を及ぼす可能性について、蛍光顕微鏡レベルおよび生化学的解析により検討する。

## 4. 研究成果

### (1)核内LDの形成機序の解明:

肝癌由来培養細胞Huh7の核内では内核膜から核質に延びる膜構造(核膜陥入構造: NR)がnLDと接していることを電子顕微鏡解析により確認した。CLEMおよび免疫電顕解析により、nLDの周囲にPML小体が配位するのではなく、nLDをコアとしてPML分子および他のタンパク質がその表面を覆うLD-PML複合体が形成されることが判明した。様々な変異体作成によりPML-IIのC末isoform特異的配列が、nLDとの結合、ならびに内核膜に結合シラミンなどを排除した領域(PML-II patch)を形成するために必須であることが判明した。PML-II patchの形成能を持つ細胞種とnLD形成能との間には相関がみられた。PML-IIは細胞分裂期にNR構造の形成を抑制する働きを持つSUNおよびREEPに対して拮抗し、NRとnLD形成の両方を促進する機能を持つことが判明した。NR膜には中性脂質合成酵素が存在した。薬剤処理により細胞分裂を阻害したHuh7においても、nLDは形成された。これらの結果からHuh7細胞では、PML-IIの働きにより分裂期を通じて増加したNR構造から、間期においてnLDが新規に形成される機構が備わることが示唆された。以上の知見は海外学術誌にて発表した(発表論文、

さらにライブイメージング等を用いた解析により、nLD が肝由来細胞で多く形成される原因が肝由来細胞の持つ特異的生理機能である VLDL(超低密度リポタンパク質)合成能と関連することが示唆された。肝由来細胞ではcLDに蓄積された脂質が小胞体内腔に供給されてリポタンパク質前駆体となり、前駆体が Apolipoprotein B と結合して VLDL の合成・分泌が行われる。リポタンパク質合成に関与する分子 X の機能抑制により nLD 形成が阻害されたこと、NR 構造の内腔に蓄積したリポタンパク質前駆体が核質へ移動する様子が確認されたことなどから、肝由来細胞で形成される nLD の由来はリポタンパク質前駆体である可能性が示唆された。現在まで得られた知見から推定される nLD 形成機序は以下の通りである。 内核膜から NR 構造が形成される 脂肪酸過剰投与、VLDL 合成阻害などの環境下ではリポタンパク質前駆体が小胞体と連続した核膜、NR 膜の内腔に逆流・蓄積する。 NR 膜が何らかの分子機構により崩壊し、リポタンパク質前駆体が核質に移行して nLD となる。 nLD は NR 構造と近接して中性脂質供給を受けて成長する。以上の知見は現在学術誌投稿準備中である。また本研究課題遂行中に得られた解析技術の一部を用いて共著として参加した研究内容は、発表論文として学術誌に報告した。

#### (2)核内 LD の転写調節・タンパク質修飾の場としての機能の検証：

当初予定していた nLD の生化学的な単離は、特に cLD の混入が想定以上に避けられず技術的に難航した。また PML-11 にタグをつけて過剰発現させ、これをアフィニティーカラムにより精製して LD-PML 複合体を単離する方法も、精製過程で LD を維持することに難があり、実用レベルに到達しなかった。別のアプローチとして APEX タグを融合した nLD 結合タンパク質プローブあるいは PML-11 を発現させた Huh7 細胞を用いて、nLD/PML 小体/LD-PML 複合体に近接して存在するタンパク質、および DNA 配列の検出法を開発中であるが、期間内での実用化には至らなかった。

網羅的検索に代わり、既知の情報などから個別に想定した nLD/LD-PML 複合体局在分子候補についての解析を進めた。まず PML 小体に局在して活性化あるいは分解を受けることが既知である転写因子 TP53 は、特定残基のリン酸化特異的抗体を用いた免疫染色により LD-PML 小体に限局して検出されたことから、TP53 は LD-PML 複合体上で活性化している事が示唆された。また LD-PML 複合体周囲にはユビキチン化、SUMO 化を受けたタンパク質群が集積することも示唆された。これらのことから LD-PML 複合体は PML 小体の亜種としてタンパク質の活性化や分解の場として機能することが示唆された。

一方 nLD 周囲にはホスファチジルコリン

(PC)の新規合成経路の律速酵素 CCTalpha が集積することが明らかとなった。CCTalpha の膜結合ドメイン M が nLD への局在にも必須であった。CCT alpha の nLD への局在は nLD 局在が既知である別の分子 Y と競合的であり、分子 Y の発現抑制により CCTalpha の nLD 局在頻度と PC 合成活性は共に亢進した。またこの時、小胞体ストレス誘導薬剤に対する小胞体ストレス応答シグナルの亢進が緩和された。CCTalpha は核質に非活性型として遊離し、核膜に集積して活性化されると従来報告されていたが、本研究課題の結果から肝癌由来細胞など nLD を豊富に持つ細胞種では、nLD 表面が CCTalpha の活性化と PC 合成に関与する場として機能することが示唆された。以上の知見は現在学術誌投稿準備中である。

#### (3)核内 LD とウイルス増殖の関連の検索：

アデノウイルス株 Ad5 の初期翻訳タンパク群 (Orf3, E1A, E1B など)をそれぞれプラスミド導入により Huh7 細胞に一過性発現させ、これらと PML 小体との結合率と、LD-PML 複合体形成の増減との間の相関を検討したが、有意な差は得られなかった。しかしながら、E1B に関しては PML 非依存性に LD への結合能を持つことが新たに判明した。一方、HCV の Core タンパク質は cLD 周囲に結合してウイルス粒子産生の場を形成する役割を持つが、核質内にも存在して PML 小体に局在すると報告されていた。アデノウイルスと同様に、一過性に Huh7 細胞に発現させた HCV-Core と PML 小体との結合率が LD-PML 複合体の増減に影響を受けるかを蛍光免疫染色により解析したが、有意な差は得られなかった。しかし HCV-Core も PML に依存しない nLD に一部直接結合することが判明した。ウイルスタンパク質と nLD とが直接結合する知見から、ウイルスタンパク質が nLD 周囲で分解を受ける可能性、逆に例えば CCTalpha 活性化といった nLD の機能に影響を及ぼす可能性が示唆され、今後さらに検討していく。

#### <引用文献>

- Ohsaki Y et al., Chem Biol, Vol. 21, 2014, pp.86-96.  
Lallemant-Breitenbach V and de The H, Cold Spring Harb Perspect Biol, Vol. 2, 2010, a000661.  
Herzer K et al., Cancer Res, Vol. 65, 2005, pp.10830-18037.  
Leppard KN et al., J Gen Virol, Vol. 90, 2009, pp.95-104.

#### 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5件)

Kimura H, Arasaki K, Ohsaki Y, Fujimoto

T, Ohtomo T, Yamada J, Tagaya M, Syntaxin 17 promotes lipid droplet formation by regulating the distribution of acyl-CoA synthetase 3, *The Journal of Lipid Research*, 査読有, 2018, in press, DOI: 10.1194/jlr.M081679.

Aktar S, Takatori S, Tsuji T, Orii M, Ohsaki Y, Cheng J, Fujimoto T, A New Electron Microscopic Method to Observe the Distribution of Phosphatidyl inositol 3,4-bisphosphate, *Acta Histochemica et Cytochemica*, 査読有, Vol.50, 2017, pp.141-147, DOI: 10.1267/ahc.17025.

Ohsaki Y, Soltysik K, Fujimoto T, The Lipid Droplet and the Endoplasmic Reticulum, *Advance in Experimental medicine and Biology*, 査読無, Vol.997, 2017, pp.111-120, DOI:10.1007/978-981-10-4567-7\_8.

藤本 豊土, 大崎 雄樹, 辻 琢磨, 電子顕微鏡による脂肪滴と膜脂質の探索, *Proceedings of Clinical Electron Microscopy*, 査読無, Vol.35, 2017, pp.1-3, DOI:無  
論文アクセスページ:  
<https://ci.nii.ac.jp/ncid/AN10503661>

Ohsaki Y, Kawai T, Yoshikawa Y, Cheng J, Jokitalo E, Fujimoto T, PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation, *Journal of Cell Biology*, 査読有, Vol.212, 2016, pp. 29-38, DOI: 10.1083/jcb.201507122.

#### [学会発表](計8件)

大崎 雄樹, ソウティシク カミル, 程 晶磊, 藤本 豊土, 肝由来細胞における核内脂肪滴の形成と機能, 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演), 2018年3月30日, 日本医科大学武蔵境校舎(東京都武蔵野市)

大崎 雄樹, ソウティシク カミル, 程 晶磊, 藤本 豊土, 核内脂肪滴の phosphatidylcholine 合成への関与, 第90回日本生化学会大会・Conbio2017, 2017年12月6日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

大崎 雄樹, ソウティシク カミル, 程 晶磊, 藤本 豊土, 肝由来細胞における核内脂肪滴の動体, 第77回日本解剖学会中部学術集会, 2017年10月7日, 藤田保健衛生大学(愛知県豊明市)

大崎 雄樹, ソウティシク カミル, 藤本 豊

土, CCTalpha の核内脂肪滴局在と Perilipin タンパク質, 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017年3月28日, 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

大崎 雄樹, 程 晶磊, 河合 毅, 藤本 豊土, 核内に存在する脂肪滴の意義, 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演), 2016年3月30日, ビッグパレット福島(福島県郡山市)

大崎 雄樹, 程 晶磊, 河合 毅, 藤本 豊土, 核質内脂肪滴とPML, *BMB2015*, 2015年12月3日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

大崎 雄樹, 程 晶磊, 河合 毅, 藤本 豊土, 核内における脂肪滴形成メカニズム, 第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2015年10月3日, 関西医科大学枚方新キャンパス(大阪府枚方市)

大崎 雄樹, 程 晶磊, 河合 毅, 藤本 豊土, 核内脂肪滴の脂質代謝への寄与, 第67回日本細胞生物学会, 2015年7月1日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大崎 雄樹 (OHSAKI, Yuki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00378027

##### (2) 研究協力者

ヨキタロ エイヤ (JOKITALO, Eija)  
ヘルシンキ大学・電顕ユニット・教授