

平成21年 3 月 31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590072

研究課題名（和文） 脂肪滴特異的脂質代謝酵素に着目した脂肪滴形成機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of lipid-droplet-formation mechanisms related with lipid-metabolic enzymes in lipid droplets.

研究代表者

藤本 康之 (FUJIMOTO YASUYUKI)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60317724

研究成果の概要：本研究によって、哺乳類細胞の脂肪滴上で中性脂質合成が行われている可能性が提示され、その際脂肪滴上のアシル CoA 合成酵素が重要な役割を果たすことが示唆された。ヒト肝由来培養細胞をモデルとした場合、細胞の周縁部に存在する脂肪滴で中性脂質合成が盛んであるとの状況証拠が得られた。また、脂肪滴特異的脂質代謝酵素に緑色蛍光蛋白を融合させた蛋白は、生細胞中で発現させると脂肪滴表面に蛍光が観察されることから、脂肪滴の動態観察に有効と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂肪滴、アシル CoA 合成酵素、中性脂質、脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

中性脂質は生物における主要なエネルギー貯蔵物質として位置付けられている。真核細胞の細胞内では、中性脂質の大部分は脂肪滴と呼ばれる細胞内構造体に蓄えられている。脂肪滴は、中心的な構成成分である中性脂質（主に、triacylglycerol と cholesteryl ester）がリン脂質と遊離コレステロールからなる脂質 1 重膜によって覆われた構造をしている。しかし、脂肪滴に存在する脂質以

外の成分、特に蛋白についてはごく最近に至るまでほとんど研究がなされていなかった。そのため、脂肪滴における中性脂質の貯蔵に関わる分子メカニズムが十分に解明されてはいなかった。

そこで筆者は、「脂肪滴に特異的に存在する蛋白が脂肪滴の形成や退縮などに機能しているのではないか」との仮説に基づき、脂肪滴を構成する蛋白の解析に取り組んできた。そのために脂肪滴の大量高純度調製方法を確立し、プロテオミクス解析によって脂肪

滴構成蛋白の包括的な同定を行った。その結果、脂肪滴は脂質代謝酵素に富んだ特異な蛋白組成をしていることが明らかとなり、他のオルガネラとは異なるユニークな細胞内構造体であると考えられた。このように、蛋白という観点で捉え直すことによって、脂肪滴は新規なオルガネラとして再認識されつつあった。

2. 研究の目的

本研究では、これらの成果に基づき、脂肪滴に特異的に存在する蛋白に着目することによって、脂肪滴の形成ならびに退縮の機構を明らかにしていくことを目的としている。脂肪滴の形成は肥満、脂肪肝、動脈硬化症などの疾患の発症と深く関係している。さらには、それらの疾患のベースとも言えるメタボリックシンドロームの発症に、脂肪滴を中心とした中性脂質代謝の異常が関与することも近年報告されている。したがって、脂肪滴形成の分子メカニズムを明らかにしていくことによって、脂質蓄積性疾患の発症に関わる基盤的情報が得られることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および染色

脂肪滴に関連した細胞内脂質代謝を解析するためのモデル系として、ヒト肝由来培養細胞である HuH7 を用いた。細胞培養には、終濃度 10% の牛胎児血清 (FCS) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地を用いた。脂肪滴形成を誘導する実験では、培地に終濃度 0.6mM のオレイン酸を添加して培養を行った。脂肪滴の検出は、細胞を 10%ホルマリンにて固定後、Oil red O およびヘマトキシリンにて染色することによりおこなった。細胞内での中性脂質合成を検出する目的の実験では、培地に蛍光標識脂肪酸を添加して培養し、培養後に細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

(2) HuH7 細胞の分画、および脂肪滴の単離

HuH7 細胞の分画は以下に記すように、ショ糖密度勾配遠心によって行った。培養後に回収した細胞をガラス-テフロンホモジナイザーにより破碎した後、1000×g で 5 分間遠心して脱核後上清を調製した。この脱核後上清に終濃度 26% のショ糖を添加した。これを 51%、43%、35% ショ糖溶液からなる段階的ショ糖密度勾配層の上に重層し、さらにその上に 18%、10%、2% のショ糖溶液を順次重層した。この段階的ショ糖密度勾配を超速心し (10 万×g、3 時間)、チューブ上端に浮上してくる脂

肪滴を得た。

(3) 脂肪滴画分の中性脂質合成酵素活性の測定

① アシル CoA を基質とする中性脂質合成活性の検出

細胞から単離した脂肪滴を ¹⁴C 標識 oleoyl-CoA と 30°C、30 分間反応させた。反応液中の中性脂質を抽出するために、反応後の溶液をクロロホルム/メタノール=1/2 と混和し、遠心分離による 2 層分配をおこなって有機溶媒層を得た。これをアルゴンガス気流下にて濃縮し、シリカゲル TLC プレートにスポットし、クロロホルム/メタノール/酢酸 (=98/2/1) の展開溶媒にて展開した。展開後、TLC プレートを風乾し、BAS-1500 イメージアナライザー (Fujifilm) を用いて放射活性シグナルの検出と定量を行った。TLC プレート上には、非標識の triolein および cholesteryl oleate 等の標品も同時に展開した。標品を展開したレーンを切り出し、3% 酢酸銅/8% リン酸溶液浸漬後に 130°C で加熱することによって中性脂質標品のスポットを検出した。これと対照することによって放射標識シグナルの帰属を行った。

② オレイン酸を基質とする中性脂質合成活性の検出

細胞から単離した脂肪滴を ¹⁴C 標識オレイン酸と 37°C、30 分間反応させた。反応系には適宜 ATP (終濃度 10mM) および CoA (終濃度 0.5mM) も添加した。反応後、前述と同様の手法によって反応液から脂質を抽出し、TLC によって反応産物を検出・定量した。

(3) 17β HSD11-GFP 融合蛋白の発現

遺伝子工学的手法によって、17β-hydroxysteroid dehydrogenase 11 (17β HSD11) のカルボキシ末端側に EGFP を連結した plasmid を調製し、リポフェクション法によって HuH7 細胞に導入した。EGFP に起因する蛍光を蛍光顕微鏡により観察した。

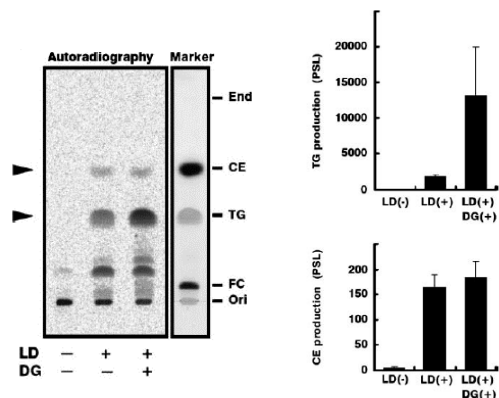
4. 研究成果

本研究では、脂肪滴上に見出されてきた蛋白のうち、脂肪滴における含有量が高く、脂肪滴への分布特異性の高い 2 つの脂質代謝酵素 long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3) および 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 11 に着目して研究を行った。その結果、以下のような研究結果が得られた。

(1) 脂肪滴における中性脂質の合成と分解

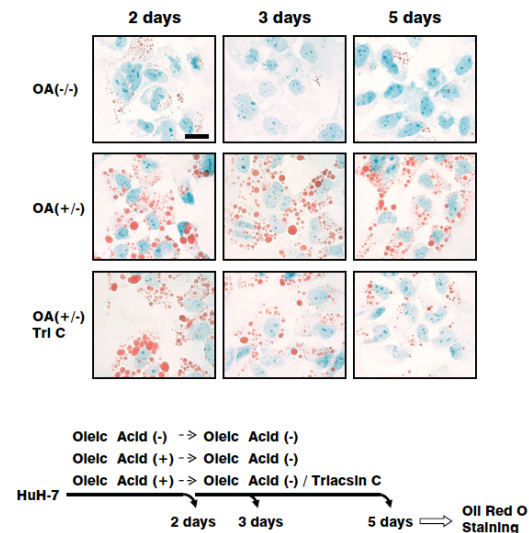
アシル CoA 合成酵素は脂肪酸と co-enzyme A (CoA) からアシル CoA を合成する酵素で

ある。アシル CoA はリン脂質や中性脂質の生合成の際の基質となる。本研究課題の代表者は、アシル CoA 合成酵素の 1 種である ACSL3 が脂肪滴に多く存在することを見出していた。本研究ではこの事実に基づき、脂肪滴において中性脂質の生合成が行われているのではないかと仮説を立て、その検証をおこなった。HuH7 細胞から単離精製した脂肪滴を ^{14}C 標識 oleoyl-CoA と反応させ、反応産物を薄層クロマトグラフィーで解析した結果、放射標識された triacylglycerol (TG) と cholesteryl ester (CE) の産生が検出された。この反応系では、中性脂質生合成の際の基質となる diacylglycerol (DG) を添加した場合に、活性の顕著な増強が見られた。また、 ^{14}C 標識オレイン酸を用いた場合にも triacylglycerol への放射活性の取り込みが検出された。したがって、脂肪滴自体が中性脂質合成能を有していることが明らかとなった。これらの結果から、脂肪滴上のアシル CoA 合成酵素は脂肪酸を材料としてアシル CoA を産生・供給することによって、中性脂質合成を促進するものと考えられた。このような脂肪滴上での中性脂質合成能は、脂肪滴の成長・発達に寄与するものと考えている (図 1、および発表論文⑤、⑥)。



一方、脂肪滴の退縮および消失の過程に脂質代謝酵素が機能する可能性も調べた。長鎖脂肪酸の一種であるオレイン酸は中性脂質を構成する成分の 1 つであり、実際、細胞にオレイン酸を投与すると脂肪滴の発達が見られる。オレイン酸投与によって細胞内に脂肪滴を一旦形成させた後、アシル CoA 合成酵素の阻害剤である triacsin C を添加してさらに培養を続けると、脂肪滴の消失がみられ

た (図 2、および発表論文⑥、⑧)。この結果は、アシル CoA 合成酵素によるアシル CoA の供給が絶たれた場合に、脂肪滴が退縮することを示しており、脂肪滴の存在は中性脂質の合成と分解のバランスの上に成り立っていることを示唆していた。そこで、triacsin C の添加と同時にリパーゼ阻害剤も同時添加したところ、脂肪滴の消失は強く抑制された。このことから、脂肪滴の消失過程にはリパーゼ様の何らかの脂質加水分解酵素が関与するものと考えられた。



(2) 細胞内中性脂質合成部位の検出

次に、細胞内における中性脂質合成部位の可視化を試みた。そのために、蛍光標識脂肪酸を細胞に投与し、生細胞中での脂質分子への蛍光の取り込みを解析した。その結果、細胞周縁部に顆粒状の蛍光が検出され、細胞周縁部の脂肪滴で中性脂質合成が盛んなことが示唆された。一方、脂肪滴は細胞の中央部分には少量しか検出されないことから、細胞中央付近の脂肪滴の分布について、他のオルガネラの分布との比較を行った。その結果、脂肪滴は核の存在する領域には検出されず、また、ゴルジ体特異的蛍光染色との比較から、ゴルジ体の分布する領域にも脂肪滴は殆ど存在しないことがわかった。これらの結果から、中性脂質合成とそれに引き続く脂肪滴の

形成は細胞の周縁部分からはじまり、脂肪滴形成の進展にともなって細胞の中心方向へと進行していくことが考えられた。

(3) 17 β HSD11-GFP 融合蛋白の発現

脂肪滴は細胞の栄養状態に応じて成長や退縮などの逐次的な変化を遂げるため、その生理機能を解析していく上で、生細胞中における脂肪滴の動態観察が有効となる。そこで、脂肪滴の動態観察を可能とする系の確立を試みた。ここでは、脂肪滴に特異的に存在する脂質代謝酵素として見出されてきた 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 11 (17 β HSD11) に着目し、17 β HSD11 の C 末端側に green fluorescent protein (GFP) を融合させた蛋白の細胞内発現を行った。17 β HSD11-GFP 発現ベクターを作成し、ヒト肝由来培養細胞株 HuH7 にトランスフェクトして細胞内分布を観察した結果、脂肪滴と考えられる球状の細胞内顆粒の表面に緑色蛍光が観察された。細胞にオレイン酸を投与して脂肪滴の発達を促進させたところ、蛍光を発する顆粒の大きさも増大していた。また、同様の手法によって、ATP-binding cassette トランスポーターの一種である ABCB9 の C 末端に GFP を融合させたコンストラクトについても細胞内分布を調べた。この場合にも、球状の細胞内顆粒の表面に蛍光が観察されたが、この蛍光は蛍光標識デキストランを貪食させた場合の蛍光シグナルやリソソームマーカと局在が一致することから、ABCB9-GFP はリソソームに局在しており(発表論文②)、脂肪滴とは分布が異なっていた。これらの結果から、17 β HSD11-GFP は確かに脂肪滴に特異的に分布しているものと考えられた。今後は、17 β HSD11-GFP の安定発現株を樹立することが重要である。

(4) 研究結果のまとめ

以上の結果をまとめると、哺乳類細胞では脂肪滴上で中性脂質合成が行われている可能性が考えられ、その際脂肪滴に存在するアシル CoA 合成酵素 ACSL3 が重要な役割を果たすものと思われた。ヒト肝由来培養細胞 HuH7 をモデルとした場合、細胞の周縁部に存在する脂肪滴で中性脂質合成が盛んであるとの状況証拠が得られた。また、脂肪滴特異的脂質代謝酵素である 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 11 に GFP を融合させた蛋白は生細胞中で脂肪滴表面に蛍光を発することから、脂肪滴の動態観察に適していると言える。

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 9 件)

- ① Takano T., Itabe H., Mori M., Kimura J., Nakagami K., Sato R., Hashita R., Yagyu Y., Mineo C., Amanuma K., Imanaka T., Higashi Y., Fujimoto Y. and Fujita E. Molecular pathology in atherosclerosis: the mechanism how cholesteryl ester accumulates in atheromatous aorta. (2008) Yakugaku Zasshi. 128, 1383-1401. 査読無し
- ② Kamakura A, Fujimoto Y., Motohashi Y., Ohashi K., Ohashi-Kobayashi A. and Maeda M. Functional dissection of transmembrane domains of human TAP-like (ABCB9) (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun. 377(3), 847-851. 査読有り
- ③ Yamaguchi S., Fujii-Taira I., Murakami A., Hirose N., Aoki N., Izawa E., Fujimoto Y., Takano T., Matsushima T. and Homma K. J. Up-regulation of microtubule-associated protein 2 accompanying the filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*). (2008) Brain Res. Bulletin 76 (3), 282-288. 査読有り
- ④ Yamaguchi S., Fujii-Taira I., Katagiri S., Izawa E., Fujimoto Y., Takeuchi H., Takano T., Matsushima T. and Homma K. J. Gene expression profile in cerebrum in the filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*). (2008) Brain Res. Bulletin 76 (3), 275-281. 査読有り
- ⑤ 藤本康之 アシル-CoA合成酵素に着目した細胞内中性脂質蓄積機構の研究 (2008) 医科学応用研究財団研究報告 : 25, 308-311. 査読無し
- ⑥ Fujimoto Y., Itabe H., Kinoshita T., Homma K. J., Onoduka J., Mori M., Yamaguchi S., Makita M., Higashi Y., Yamashita A. and Takano T. Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. (2007) J. Lipid Res. 48 (6), 1280-1292. 査読有り
- ⑦ Yamaguchi S., Katagiri S., Hirose N., Fujimoto Y., Mori M., Fujii-Taira I., Takano T., Matsushima T. and Homma K. J. In vivo gene transfer into newly-hatched chick brain by electroporation. (2007) NeuroReport 18 (8), 735-739. 査読有り

- ⑧ Fujimoto Y., Onoduka J., Homma K. J., Yamaguchi S., Mori M., Higashi Y., Makita M., Kinoshita T., Noda J., Itabe H., and Takano T. Long-chain Fatty Acids Induce Lipid Droplet Formation in a Cultured Human Hepatocyte in a Manner Dependent of Acyl-CoA Synthetase. (2006) Biol. Pharm. Bull. 29 (11), 2174-2180. 査読有り
- ⑨ Pasternak O., Bujacz G. D., Fujimoto Y., Hashimoto Y., Jelen F., Otlewski J., Sikorski M. M., and Jaskolski M. Crystal structure of Vigna radiata cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. (2006) Plant Cell 18, 1-13. 査読有り

〔学会発表〕(計7件)

- ① 藤本康之、前田正知 ABC輸送体TAPL (ABCB9)のlysosome局在 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008年12月12日 神戸
- ② 石橋拓也、大橋一晶、牛島弘雅、藤本康之、前田正知 心筋細胞分化系におけるgata-4遺伝子の発現制御 第47回日本薬学会東北支部大会 2008年10月26日 岩手医科大学薬学部
- ③ 藤本康之、板部洋之、木下哲昭、本間光一、山口真二、小野塚潤、山下純、前田正知、高野達哉 脂肪滴のアシルCoA合成酵素 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 2007年12月11-15日 パシフィコ横浜
- ④ 松井隆剛、村上明男、山口真二、藤本康之、松島俊也、高野達哉、本間光一 MAP2(Microtubule-Associated Protein 2)の遺伝子発現と鳥類記憶学習の相関 日本薬学会第127年会 2007年3月28日 富山国際会議場
- ⑤ 片桐幸子、廣瀬直樹、山口真二、藤本康之、松島俊也、高野達哉、本間光一 In vivoエレクトロポレーション法を用いたニワトリ雛大脳領域への遺伝子導入 日本薬学会第127年会 2007年3月28日 富山国際会議場
- ⑥ Sasabe N., Takano T., Fujimoto Y., Itabe H., and Arai H. PROTEASOME-DEPENDENT PATHWAY IS INVOLVED IN RAPID DEGRADATION OF ADIPOSE DIFFERENTIATION-RELATED PROTEIN DURING REGRESSION OF INTRACELLULAR LIPID DROPLETS. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and molecular Biology, June 18-23, 2006, Kyoto

- ⑦ Itabe H., Masuda Y., Mori M., Fujimoto Y., Arai H. and Takano T. ADIPOSE DIFFERENTIATION-RELATED PROTEIN (ADRP) IS A KEY COMPONENT OF LIPID STORAGE AND MOBILIZATION IN MACROPHAGE FOAM CELLS. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and molecular Biology, June 18-23, 2006, Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 康之(FUJIMOTO YASUYUKI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60317724

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者