

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06829

研究課題名(和文)核内脂肪滴と核膜陥入構造の機能的関連

研究課題名(英文)Functional interaction of nuclear lipid droplets and invagination of nuclear membrane

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中性脂質をリン脂質一重膜が覆う脂肪滴は、細胞質のみならず、肝由来細胞および一部の非肝由来細胞では核内にも形成される。本研究では、肝由来細胞においては小胞体内腔で形成されたリポ蛋白前駆体脂質顆粒が核膜陥入構造を経由し、核膜陥入構造膜の崩壊により内腔から核質に移行して核内脂肪滴となる機序を明らかにした。さらに核内脂肪滴は特に小胞体ストレス誘導時に増加し、その表層でホスファチジルコリン合成酵素CCT alphaを活性化させ、細胞のリン脂質合成を増強させる場となること、脂肪滴分子PLIN3がCCT alphaと競合的に核内脂肪滴に結合し、リン脂質合成の内在性阻害因子となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、肝細胞には種々のストレス下に晒された際に核内脂肪滴を用いてリン脂質合成・生体膜形成を増強させ、小胞体機能を回復し細胞障害を軽減する機構が備わること示唆する。肝障害や肝再生時には核内脂肪滴を増強してリン脂質合成を促すことにより、あるいは肝がん細胞においては核内脂肪滴でのリン脂質合成と細胞増殖を抑制することにより、それぞれの新たな治療法に繋がる基礎的知見となった。また本研究の成果は、脂肪滴が蛋白質代謝や遺伝子発現制御など様々な反応の場となる新たな核内構造体である可能性を、医学生物学および生物物理学など複合的な学術領域に提示したといえ、学術的価値は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplets (LD), composed of neutral lipids and a phospholipid monolayer, are formed not only in the cytoplasm but in the nucleoplasm in some types of cells. The purpose of this research is to clarify biogenesis mechanism and functions of nuclear LD. We found in hepatic cells, lipoprotein precursors excessively formed in the ER lumen can be spread through the continues luminal space of nuclear membrane as well as nucleoplasmic reticulum (NR), an invagination of inner nuclear membrane, then the luminal precursors become nucleoplasmic LDs after partial rupture of NR membrane. We also found that nuclear LDs are more formed particularly under ER stress, and the surface of nuclear LDs function as a platform in which CCTalpha, a rate-limiting enzyme of de novo phosphatidylcholine (PC) synthesis, is activated and cellular PC synthesis is upregulated. Further, we identified that PLIN3 can bind to nuclear LDs competitively with CCTalpha and work as an endogenous inhibitor of PC synthesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪滴 中性脂質 核内構造体 PML

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴 (Lipid droplet; 以下 LD とする)は中性脂質 (トリアシルグリセロール; TAG, コレステロールエステル; CE)のコアを燐脂質一重膜が被う、通常は細胞質のオルガネラで、中性脂質合成酵素が存在する小胞体 (ER)膜から形成される。細胞質 LD は蛋白質分解の足場となる等、多くの生理機能を持つ事が代表者らにより明らかになった。

代表者らは肝由来細胞では LD が核内でも形成され、内核膜(INM)から核質へ陥入する核膜陥入構造 (Nucleoplasmic reticulum; NR, 図 3)と近接していることを見出した(文献 1, 2)。核内 LD は脂肪細胞など他の細胞種にはほとんど見られない。本研究課題では核内 LD が肝細胞特異的な生理機能とリンクして形成されると仮説を立て、核内 LD の形成機構と生理的意義について明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

肝細胞の特異的な生理機能である VLDL (超低密度リポ蛋白)合成過程では、ER 内腔の酵素 MTP によって、脂質顆粒 (リポ蛋白前駆体) と Apolipoprotein B100 (ApoB) との融合、および前駆体同士の融合が起こる。本研究では第一の目的として VLDL 合成に関連した核内 LD 形成機序の詳細を検討することとした。

一方、核内 LD にはホスファチジルコリン(PC)新規合成経路の律速酵素である CCTalpha が特異的に局在していたことから(文献 1)、核内 LD が CCTalpha 活性化と PC 新規合成経路の起点として機能する仮説を第二の目的として追求することとした。他方、核内 LD は蛋白質修飾と転写調節に関与する PML 小体と複合体を形成することから (文献 1)、LD-PML 複合体が遺伝子発現調節に関与する可能性を第三の目的として検証することとした。

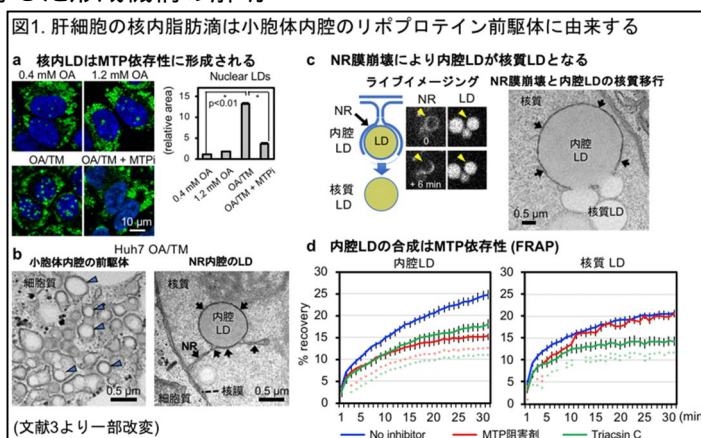
3. 研究の方法

- FRAP (光退色後蛍光回復法)アッセイは、LD を蛍光標識脂肪酸により代謝的に標識し、蛍光標識内核膜蛋白質により NR 内腔に存在する内腔 LD と核質の LD とを区別し行なった。
- PC 合成活性は³H]-コリンによる標識法、およびプロパギルコリンと蛍光標識アジドによるクリック反応を用いた蛍光画像検出法により解析した。
- MTP 阻害剤として BAY13-9952, CP-346086、広範な LD 合成阻害剤として Triacsin C (Acyl-CoA transferase 阻害剤)を用いた。
- マウス肝細胞解析は、野生型の C57BL6 に 60%高脂肪食 (HFD-32, オリエンタル工業)を 6 週間投与し脂肪肝を形成させ、屠殺前 2 日間に TM を腹腔投与して行なった。

4. 研究成果

(1) 核内 LD の核膜陥入構造に依存した形成機構の解明

ER ストレス誘導剤ツニカマイシン(TM)により VLDL の分泌が抑制され、リポ蛋白前駆体が増加する。ヒト肝癌由来細胞 Huh7 にオレイン酸 (OA)および TM を投与すると核内 LD が増加するが、これは阻害剤または RNA 干渉法による MTP 活性の抑制により減少したことから、核内 LD は小胞体内腔のリポ蛋白前駆体由来であることが確認された (図 1a)。電子顕微鏡観察では核質に遊離した LD 以外に、小胞体内腔、核膜槽内腔、NR 構造の内腔に、リポ蛋白前駆体 (内腔 LD) が高頻度に蓄積していた (図 1b)。高脂肪食餌および TM 投与したマウス肝細胞でも、同様であった。つまり肝細胞の核内 LD のなかには「NR 内腔 LD」と核質に遊離した「核質 LD」が混在していた。次に内



腔 LD と核質 LD の関係性を調べたところ、ライブイメージングおよび電子顕微鏡観察により、NR 膜が崩壊し内腔 LD が直接核質 LD となることが判明した(図 1c)。FRAP アッセイを行ったところ内腔 LD 形成は MTP に依存し、リポタンパク質前駆体由来であることが再確認された(図 1d)。以上の結果は国際雑誌に発表し(文献 3, 4)、さらに NR 形成と崩壊を支配する分子機構について解析を進めている。

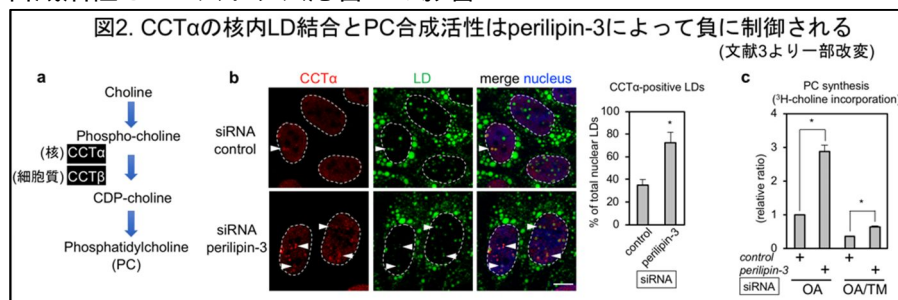
他方、非肝由来細胞では、TAG 合成経路の複数の酵素蛋白質および中間脂質が小胞体だけでなく内核膜にも存在していることが判明し、内核膜で直接 TAG 合成および核内 LD 形成が起こり得ることが示された。これらの成果は国際雑誌に発表した(文献 5)。

(2) 核内 LD の PC 合成活性と ER ストレス応答への影響

核内 LD 局在が既知の perlipin-3 と CCT alpha は競合的に核内 LD に局在した。perlipin-3 の発現抑制により CCT alpha の

核内 LD 局在が増加し、かつ細胞の PC 合成活性が亢進した。(図 2, 文献 3)。このとき perlipin-3 の発現量と複数種の小胞体ストレスマーカーの mRNA 発現量が逆相関した(未発表データ)。

これらの結果から、肝細胞において核内 LD は PC 合成を活性化させることにより、小胞体ストレスを軽減させる装置として機能し得ること、また内在性の perlipin-3 がこれらの現象の制御因子となることが示唆された(図 3)。



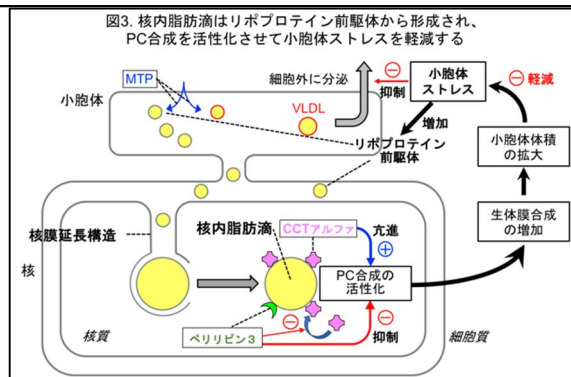
核内 LD 局在が増加し、かつ細胞の PC 合成活性が亢進した。(図 2, 文献 3)。このとき perlipin-3 の発現量と複数種の小胞体ストレスマーカーの mRNA 発現量が逆相関した(未発表データ)。

(3) 核内 LD の遺伝子発現調節への関与

核内 LD は高頻度に PML 小体と会合し、転写因子 p53, SREBP などが表面に局在したことから(文献 1, 未発表データ)、LD ないし LD-PML 複合体は遺伝子発現調節への関与が示唆されていたが、本研究により p53 遺伝子座と LD 蛋白質の隣接(FISH 法)、核内 LD の表層へのクロマチン結合(電顕解析)が確認され(論文準備中)、さらにその仮説が補強された。核内 LD とクロマチンの接近は様々なストレスにより増加することが判明し、現在この因果関係および特定のストレス下で発現が増減することが既知の分子の転写制御が実際に核内 LD 有無により変動するか検討中である。

<引用文献>

1. Y.Ohsaki, T.Kawai, Y.Yoshikawa, J.Cheng, E.Jokitalo, T.Fujimoto. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation, *J Cell Biol*, 2016, 212, 29-38
2. Y.Ohsaki, K.Soltysik, T.Fujimoto, The lipid droplet and the endoplasmic reticulum, *Adv Exp Med Biol*, 2017, 997, 111-120
3. Soltysik K, Ohsaki Y (Co-first author, co-corresponding author), T.Tatematsu, J.Cheng, T.Fujimoto, Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis, *Nature Communications*, 2019, 10, e4473
4. K.Soltysik, Y.Ohsaki, T.Fujimoto, Duo in a Mystical Realm—Nuclear Lipid Droplets and the Inner Nuclear Membrane, *Contact*, 2, 1-11
5. K.Soltysik, Y.Ohsaki, T.Tatematsu, J.Cheng, A.Maeda, S.Y.Morita, T.Fujimoto, Nuclear lipid droplets form in the inner nuclear membrane in a seipin-independent manner, *J Cell Biol*, 2021, 220, e202005026



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimobayashi SF and Ohsaki Y	4. 巻 116
2. 論文標題 Universal phase behaviors of intracellular lipid droplets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 25440-25445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1916248116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Soltysik Kamil, Ohsaki Yuki, Tatematsu Tsuyako, Cheng Jinglei, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08411-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takir Gizem Gulevin, Ohsaki Yuki, Morotomi-Yano Keiko, Yano Ken-ichi, Saitoh Hisato	4. 巻 504
2. 論文標題 Linkage between lipid droplet formation and nuclear deformation in HeLa human cervical cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 485 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大崎 雄樹	4. 巻 69
2. 論文標題 細胞質および核質での脂肪滴の形成	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 208-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大崎 雄樹	4. 巻 269
2. 論文標題 脂肪滴の制御と疾患の関わり	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1122-1128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下林 俊典、大崎 雄樹	4. 巻 60
2. 論文標題 液液相分離が駆動する細胞内オルガネラ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 267-271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Soltysik K, Ohsaki Y, Fujimoto T	4. 巻 2
2. 論文標題 Duo in a Mystical Realm-Nuclear Lipid Droplets and the Inner Nuclear Membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Contact	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2515256419896965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara Y, Cheng J, Tatematsu T, Uchida M, Murase O, Yoshikawa S, Ohsaki Y, Fujimoto T	4. 巻 11
2. 論文標題 Long-term autophagy is sustained by activation of CCTb3 on lipid droplets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 e4480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18153-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Soltysik K, Ohsaki Y, Tatematsu T, Cheng J, Maeda A, Morita SY, Fujimoto T	4. 巻 220
2. 論文標題 Nuclear lipid droplets form in the inner nuclear membrane in a seipin-independent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202005026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202005026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大崎 雄樹、ソウティシク カミル、程 晶磊、藤本 豊士
2. 発表標題 核内脂肪滴の動態を制御する分子の探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大崎 雄樹、ソウティシクカミル、程晶磊
2. 発表標題 脂肪滴の核内における動態
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大崎 雄樹、ソウティシク カミル、程 晶磊、藤本 豊士
2. 発表標題 脂肪滴の核内における意義
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大崎 雄樹, Kamil Soltysik, 高橋 和加菜, 藤本豊士
2. 発表標題 核内脂肪滴形成に関する新規分子の探索
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大崎 雄樹, ソウティシク カミル, 程 晶磊, 藤本 豊士
2. 発表標題 核内脂肪滴の成り立ちと意義
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大崎 雄樹, ソウティシク カミル, 程 晶磊, 藤本 豊士
2. 発表標題 脂肪滴の核内での動態と機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Ohsaki, Kamil Soltysik, Jingeli Cheng, Toyoshi Fujimoto
2. 発表標題 Lipid droplets dynamics in the nucleus
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大崎 雄樹、藤本 豊土	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 The Lipid (特集 生体制御にかかわる多彩なりボクオリティ 基礎から臨床まで) 担当章「見る脂質のページ: 核内脂肪滴の形成機序と機能の解明」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>肝細胞の核内脂肪滴はストレスに対抗する機能を持つことが判明 - 名大インターネットメディア (医療ニュース: QLifePro) 2019年1月31日公開 http://www.qlifepro.com/news/20190131/nuclear-lipid-droplet-of-liver.html</p> <p>核内脂肪滴が形成されるメカニズムは細胞質内脂肪滴と異なることを発見 - 順大ほかインターネットメディア (医療ニュース: QLifePro) 2020年12月16日公開 http://www.qlifepro.com/news/20201216/lipid-droplet.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	辻 琢磨 (Tsuji Takuma)		超微形態学的解析の技術協力
研究協力者	ソウティシク カミル (Soltysik Kamil)		生化学的解析協力
研究協力者	宮成 悠介 (Miyanari Yusuke)		核内蛋白質核酸局在可視化法の技術的助言

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ヨキタロ エイヤ (Jokitalo Eija)		超微形態学的解析の技術的助言

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関