

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770166

研究課題名（和文） 脂質滴－ER複合体の蛋白質分解系への関与の立証

研究課題名（英文） Proteins degradation pathways exist around lipid droplets

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・助教

研究者番号：00378027

研究成果の概要：

肝細胞では脂質滴(Lipid droplet: LD)由来の脂質と Apolipoprotein B (ApoB)とが小胞体で結合して超低比重リポ蛋白質(VLDL)が合成される. 本研究は (1)脂肪滴と小胞体の一部(ApoB が貯留する)が融合した構造(ApoB-crescent)がプロテアソーム阻害剤処理時に増加する事, (2)脂質滴画分には多くのプロテアソーム分解系関連因子が存在する事を肝癌由来培養細胞を用いて明らかにし, 脂質滴周辺での ApoB 代謝機構の存在を示唆した.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：脂質滴、Apolipoprotein B、VLDL、プロテアソーム

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質滴 (Lipid droplet: LD)を保持している. その表層には多様な蛋白質の存在が明らかになりつつあり, 脂質滴に蓄えられた脂質は, 膜形成, β 酸化によるエネルギー産生, 肝細胞での超低比重リポ蛋白質 (VLDL)形成などへの動員が示唆される. 一方, 肥満における白色脂肪細胞や脂肪肝, 粥状硬化に見られる泡沫細胞などでは過剰な脂質滴形成が病態の中心となり, 脂質滴形成

機序及び ApoB-VLDL の細胞内代謝機序の解明は重要である.

肝細胞では脂質滴は小胞体(ER)での VLDL 形成に動員される脂質の供給源であり, また脂質滴自身の形成も ER 近傍で起こると考えられている. さらに caveolin の変異体や Rab18 は ER 由来の膜と脂質滴が密着した構造 (LAM)の形成を誘導する. 研究代表者らは肝細胞の脂質滴外周に沿って見られる ApoB の特異な集積構造 (ApoB-crescent) を見出した [Ohsaki. et. al., Mol. Biol. Cell. (2006). 17:2674].

同構造は、ApoB のような脂質親和性の強い蛋白質がプロテアソーム、オートファジーの分解系で安全に処理されるために重要な役割を担うと考えられる。予備的観察により、ApoB-crescent が ER の一部または ER に由来する構造であることが明らかになってきた。このような実験事実から、我々は脂質滴と ER の関連の解析が ApoB-crescent を含む脂質滴の機能を明らかにするために必須であり、脂質滴形成を制御する機構の解明にも直結すると考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) 脂質滴と ER の構造的関連を明らかにする。

ApoB-crescent は当初、脂質滴表層の細胞質側に ApoB が小型脂質粒子と共に結合した構造として想定された。しかし ApoB は単独で脂質滴を覆う例の他に、ER シャペロン (ER 側マーカー) と一致、ないしは ADRP/TIP47 (細胞質側マーカー) と相補的に同一脂質滴上で共存する等バリエーションが高く、少なくとも一部の ApoB-crescent は ER 膜/内腔あるいは LAM 領域に集積した ApoB に相当する可能性がでてきた。脂質滴の生成過程、次の (2) に挙げる機能を解明する上で基盤となる情報を得るため、生化学的、形態学的手法により以下の二点を目的とする。

① ApoB-脂質滴-ER 間のトポロジーを決定する。

② ApoB-crescent を形成する脂質滴の蛋白質組成を決定し、脂質滴-ER の接合・解離を司る分子を同定する。

(2) 脂質滴-ER 複合体と ApoB のプロテアソーム分解系との機能的関連を明らかにする。

脂質滴周囲には活性のあるプロテアソームが存在し、脂質滴分画の ApoB はプロテアソーム阻害剤に応じてユビキチン化される。細胞内の過剰な ApoB の大半がプロテアソームによる分解を受ける際には、ApoB は Translocon と長時間結合したまま ER 膜上から直接プロテアソームへ運ばれるとされるが [Fisher. et. al., J. Biol. Chem. (2002). 277:17377], その詳細は不明である。

一方 ER における一般的な蛋白質品質管理機構 (ERAD) についても、翻訳後の遊離性蛋白質が ER 内腔から細胞質に逆輸送される仕組み (retro-translocation) はコレラトキシンサブユニット A などの一部例を除き未解明である [Forster. et. al., J. Cell Biol., (2006). 173:853].

ER には機能的、構造的に異なるサブドメインの存在が示されているが [Sprocati. et. al.,

J. Cell Sci. (2006). 119:3249], 脂質滴-ER 複合体の間に形成される LAM 領域の特殊な蛋白質、脂質構成はこの場所が蛋白質分解に特化した ER サブドメインである可能性を示唆する。項目 (1) で得られた情報を基に、以下を目的とする。

細胞内脂質動態や脂質滴蛋白質、ER シャペロン群、脂質滴-ER 接合調節分子の発現・機能を操作し、脂質滴-ER 複合体が ApoB のレトロトランスロケーション並びにプロテアソーム分解系に必須であることを立証する。

3. 研究の方法

(1) セミインタクト細胞構築法 [Kano. et. al., J. Cell Biol. (2000). 149:357] を応用し、コレステロールに対する特異性が異なる 4 つの薬剤 [特異性の高いものから順に Streptolysin O (SLO), filipin, digitonin, Triton X-100] を用いて細胞膜の穿孔 (透過性処理) を生細胞ないしは化学固定後細胞に対して行い、下記の実験を行う。なお SLO は低温下で細胞に結合させ、非結合のものを洗浄除去した後に加温することにより、形質膜だけを選択的に穿孔し、細胞内膜系を無傷に維持することができる。

① ApoB, ER シャペロン (PDI, BiP, ERp72, calreticulin), ER 膜蛋白質 (calnexin, translocon 構成分子), 細胞質蛋白質 (actin, tubulin, Hsp70; 陽性コントロール) などに対する抗体を用いて、異なる透過性処理での標識の可否を免疫組織化学的に検索し、ApoB-crescent とそれぞれの分子のトポロジカルな関係を明らかにする。

② 異なる透過性処理ののち、細胞をトリプシンで処理し、ApoB, ER シャペロン, ER 膜蛋白質, 細胞質蛋白質の分解の有無をウェスタンブロッティングで解析する。

③ SLO で形質膜だけを穿孔して第一の抗体で標識したのち、異なる透過性処理を行って第二の抗体で標識する。この方法により細胞質に露出した分子と何らかの膜で被われた分子の分別、異なるコンパートメントに分かれて存在する分子の定量的分布検索を行う。

④ 蔗糖密度勾配遠心で脂質滴分画を精製し、異なる透過性処理ののち (または無処理で)、トリプシン消化を行う。免疫沈降及びウェスタンブロッティングにより諸分子の ApoB との結合の有無と脂質滴表面への露出度、分子を被っている膜の性質を明らかにする。

(2) ApoB-crescent 形成量の異なる細胞を用い

て、脂質滴と ER の構造的連関について超微形態学的に解析する。

①上記(1)-①の結果をもとに選択的透過性処理を行い、ApoB, ER シャペロンなどの超微局在を Nanogold 銀増感法による免疫電顕で詳細に解析する。

② 液体ヘリウムを用いたメタルコンタクト法で細胞を急速凍結し、凍結置換法による純形態観察、SDS 処理凍結レプリカ標識法による ApoB, ADRP, ER 膜蛋白質の免疫電顕標識などを行う。ApoB-crescent を含む精製脂質滴の急速凍結試料についても同様に検索する。

(3) ApoB-crescent を被う膜についての解析を以下のように行う。

① 細胞を filipin で処理し、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で ApoB-crescent を被う膜のコレステロール量の多寡を定性的に解析する。

② VLDL 合成の際に ApoB-VLDL 会合に重要な MTP を阻害すると ApoB-crescent は消失する。MTP 阻害細胞、並びに ApoB-crescent 増加細胞 (プロテアソーム阻害) 双方から ApoB-crescent が濃縮する分画を集め、LC/MS での蛋白質成分同定・differential proteomics を試みる。

(4) ApoB-crescent を増加させる下記①~④の処理を行い、(1)(2)(3)の方法により各条件での ApoB-crescent・ER 膜の性質を半定量的に比較、検索する。

① プロテアソーム阻害剤 (ALLN, MG132)

② マクロオートファジー阻害剤 (3-methyladenine, LY290042, wortmannin)

③ ER-ゴルジ間小胞輸送阻害 (brefeldin A)

④ コレステロール欠乏 (lipoprotein 除去血清 + statin)

(5) (3)-③で同定された ApoB-crescent の成分について、脂質滴-ER 接合調節分子を検索する。

(6) 脂質滴蛋白質 (ADRP, TIP47, Rab18, caveolin), ER シャペロン, 脂質滴-ER 接合調節分子の発現抑制 (RNAi), 発現増強 (トランスフェクション) を行い、ApoB-crescent の形成, ApoB の蛋白質寿命, ApoB 分泌量, 脂質滴分画中のプロテアソーム活性に対する影響を検索する。

(7) コレステロール欠乏食 +statin 投与, 高脂肪食, コリン欠乏食 (脂肪肝モデル) マウス肝組織における ApoB-crescent の増減と上記関連分子の共存の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) ApoB-crescent 構造の詳細を明らかにした。(研究成果; 雑誌論文 (5)として発表)

① 肝癌由来細胞株 Huh7 をプロテアソーム阻害剤あるいは DHA を処理し、ApoB 及び種々の ER 蛋白質 (膜貫通分子, ER 内腔 シャペロン群, 分泌蛋白質) に対する抗体を用いた多重蛍光免疫染色により、ApoB は LD に密着した ER 領域に共存していた。

② 化学固定および瞬間凍結した Huh7 細胞の電顕観察では LD と密着した薄い膜構造 (一部はリボゾームが付着) が確認された。ER 特異的酵素 G6Pase に対する組織化学法及び ER 分子と ApoB に対する免疫電顕により、ApoB-crescent とは LD-ER 密着構造であり、ER 側内腔に ApoB が貯留する事が判明した。

③ ApoB への脂質付加を触媒する酵素 MTP を薬理的ないしは siRNA 導入により機能阻害すると、ApoB-crescent 形成はプロテアソーム阻害時でも誘導されず、LD-ER 密着構造に集積する ApoB 分子は脂質付加を受けたもの、すなわち ApoB-lipoprotein であることが判明した。

④ 生化学的に精製した脂質滴分画をアルカリ処理し再度超遠心法により分画すると、ApoB は脂質滴に留まり非イオン性結合により LD-ER 密着構造膜に強く結合していた。様々な可溶化処理に対する感受性検査の結果、LD に密着する ER 膜はコレステロールに富む特異な亜領域である事が分かった。

(2) ApoB-crescent 形成機序の考察と脂質滴-ER 間の機能的連関を示唆する結果を得た。(研究成果; 雑誌論文 (1), (3), (5), (6), 及び発表準備中の成果)

① ApoB-crescent の詳細な電顕観察から、同構造部において脂肪滴は ER の脂質二重膜の間に含まれている事が判明した。

② 脂質滴形成の亢進機能が推測される ADRP, TIP47 の発現量と ApoB-crescent 形成頻度とは逆相関を示した。

③ ApoB-crescent は脂肪酸負荷, 小胞輸送障害等の pre-VLDL が ER 内に蓄積する条件で増加した。

④ ADP-リボシル化阻害剤処理により ApoB-crescent の形成が抑制された。

⑤ ADP-リボシル化阻害剤処理により ApoB の分泌が他の分泌蛋白質に比べて特異的に減少した。

(1) (2)の成果から ApoB-crescent 構造は通常時も一過性に形成されて、脂質付加を受け

た ApoB- lipoprotein を分解する ER 亜領域として機能している事が示唆された。また ApoB-lipoprotein が脂質滴周囲に過剰に蓄積すると脂質滴の ER からの解離が阻害されて、大型の ApoB-crescent が形成され得る事が示唆された。

(3) 脂質滴周囲での ApoB 分解機構を明らかにするために ApoB-crescent が増加する条件で培養した Huh7 細胞から脂質滴画分を精製し、含まれる蛋白質を網羅的に解析した所、複数のユビキチン化関連分子が同定された。(発表準備中)

- ① 脂質滴局在ユビキチン化関連分子の一部の発現量を RNAi により抑制すると ApoB 発現量が減少した。
- ② 一部の分子は ApoB と結合した。

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 7 件)

(1) Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y, Fujita A, Fujimoto T. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* 2008; 印刷中, 査読有り.

(2) Urahama Y, Ohsaki Y, Fujita Y, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Fujimoto T. Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis. *The American Journal of Pathology* 2008;173(5):1286-1294. 査読有り.

(3) Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol* 2008;130(2):263-279. 査読有り.

(4) Kurahashi M, Niwa Y, Cheng J, Ohsaki Y, Fujita A., Goto H, Fujimoto Y, Torihashi S. Platelet-derived growth factor signals play critical roles in differentiation of longitudinal smooth muscle cells in mouse embryonic gut. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20(5):521-531. 査読有り.

(5) Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Fujita A, Fujimoto T. Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100. *J Cell Sci* 2008;121(14):2415-2422. 査読有り.

(6) 藤本 豊士, 大崎 雄樹, 鈴木 倫毅. 脂肪滴形成のメカニズム. *膜 MEMBRANE*

2008;33(1):17-23. 査読無し.

(7) Tsuiki E, Fujita A, Ohsaki Y, Cheng J, Irie T, Yoshikawa K, Senoo H, Mishima K, Kitaoka T, Fujimoto T. All-trans-retinol generated by rhodopsin photobleaching induces rapid recruitment of TIP47 to lipid droplets in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(6):2858-2867. 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

(1) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤本 豊士. 脂肪滴に局在するユビキチン化関連蛋白質の解析. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009 年 3 月 28 日 岡山理科大学 (岡山市)

(2) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤本 豊士. ADP-ribosylation による ApoB 代謝制御. 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 神戸ポートアイランド (神戸市)

(3) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤本 豊士. ADP リボシル化阻害による ApoB 分泌抑制. 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2008 年 10 月 6 日 長崎大学医学部 (長崎市)

(4) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤本 豊士. Brefeldin A 処理による小胞体内腔での脂肪滴形成. 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2008 年 3 月 27 日 大分大学医学部 (由布市)

(5) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤田 秋一, 藤本 豊士. Lipoprotein 産生細胞における脂肪滴-小胞体密着構造の形成と意義. 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 12 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

(6) Yuki Ohsaki, Jinglei Cheng, Michitaka Suzuki, Akikazu Fujita, and Toyoshi Fujimoto. Budding of lipid droplets from ER is arrested by accumulation of lipidated Apolipoprotein B-100. 科学研究費補助金特定領域研究「メンブレントラフィック」国際シンポジウム 2007 年 11 月 27 日 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)

(7) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤田 秋一, 藤本 豊士. 肝癌由来培養細胞における脂質滴-小胞体密着構造の解析. 日本解剖学会第 67 回中部支部学術集会 2007 年 10 月 13

日 愛知医科大学（愛知県長久手町）

(8) 大崎 雄樹, 程 晶磊, 鈴木 倫毅, 藤田 秋一, 藤本 豊士. Lipid droplets interact with ER in lipoprotein secretory cells. 第48回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2007年9月29日 甲府市総合市民会館（甲府市）

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・助教
研究者番号：00378027