

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890095

研究課題名（和文）

脂肪滴構造と形成メカニズムの解析

研究課題名（英文）

Analysis of the structure and formation mechanism of lipid droplets

研究代表者

尾里 納美 (Ozato Nami)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：60547454

研究成果の概要（和文）：

本研究では、脂肪滴の機能を明らかにするために、脂肪滴の形成過程とその構造に注目して、生化学的実験だけでなく、凍結割断レプリカ標識法、超薄切片法などを用いて電子顕微鏡レベルでの構造解析を行った。生化学的実験では、小胞体に分布するタンパク質が培養細胞から精製した脂肪滴にも分布していることが明らかになった。電子顕微鏡観察からは、一般的に脂肪滴に含まれる組成で人工的に脂肪滴を形成しても、培養細胞からの精製脂肪滴と人工脂肪滴では構造が異なることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, as the aim to clear the function of lipid droplets, I noticed the structure and formation of lipid droplets. I performed the biochemical experiments and the analysis of ultra-structure by using freeze-fracture replica staining and ultra-section with the electron microscope observation. In the biochemical experiments, it revealed that the lipid droplets from culture cells had many proteins, which were distributed in the endoplasmic reticulum. In the electron microscope observations, there were differences in the structures between artificial lipid droplets, made to contain the same elements, and the prepared lipid droplets from the culture cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：脂肪滴・凍結割断レプリカ標識法・(位相差)電子顕微鏡・ADRP・小胞体膜ドメイン

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪滴は脂質エステルをコアとし、磷脂質一重層で被われたオルガネラであり、脂肪細

胞だけでなく、多くの細胞に普遍的に存在する。脂肪滴は過剰な脂質を貯蔵する静的な構造と考えられてきたが、最近数年間の研究によりその認識は急速に変化してきた。すなわち脂肪滴に蓄えられた脂質が膜新生やリポ蛋白質、脂質メディエーターの産生に動員されるだけでなく、様々な刺激に応じて脂肪滴に存在する蛋白質の組成が急激に変化すること、細胞内シグナリングや膜トラフィックに関与する分子が存在することなどが明らかとなり、脂肪滴は多くの機能が集中する非常に動的なオルガネラであると見なされるようになった。脂肪滴への関心は国際的にも高まっており、ヨーロッパでは国際的な大規模共同研究が開始された、また脂肪滴をテーマとした研究集会や学術誌での特集が頻りに企画されている。

## 2. 研究の目的

A. 脂肪滴の「内部構造」を明らかにする  
一般には脂肪滴の内部は脂質エステルの無秩序な塊とされているが、細胞の種類によっては内部に何らかの構造が観察される場合がある。また超薄切片を用いた免疫電顕法により、時に脂肪滴内部に親水性蛋白質の標識が報告されている。また脂肪滴の凍結切断レプリカを標識すると、脂肪滴表面にあるはずの蛋白質の標識が、凸面、凹面、水平切断面のいずれにも出現する。しかし、凹面の標識はこれまでの図式で理解できるが、凸面、水平切断面のレプリカに標識がある理由を説明することはできない。

上記の結果は脂肪滴の内部に何らかの構造が存在する可能性を示唆する。しかし、脂質分子にはアルデヒド系の化学固定剤が作用しないため、脂質エステルが充満する脂肪滴内部の構造は通常の標本では十分に保たれていないと考えられる。このように従来の方法では解析が難しい脂肪滴の内部構造を明らかに

するため、(1) 様々な組成の人工脂肪滴を作製し、分子組成と構造の対比を容易に行いうる実験系を構築し、(2) 凍結切断レプリカ標識法だけでなくクライオ電顕法、位相差電顕法などの新手法を動員して詳細な解析を行う。

B. 脂肪滴の形成と小胞体膜ドメインの関係を明らかにする

脂質エステル産生の最終段階の酵素 (DGAT1,2, ACAT1,2) は小胞体膜の貫通蛋白質である。それらの酵素で産生される脂質エステルは、強い疎水性から考えて、小胞体膜の磷脂質二重層の内部に蓄積すると考えられる。このように脂肪滴の起源が小胞体膜にあることはほぼ確かと思われるが、小胞体膜から脂肪滴が独立する過程は不明であり、一般に信じられている「出芽」説のほか、「孵化」説も提唱されている。また脂肪滴が小胞体の任意の場所で形成されるのか、あるいは特定のドメインでのみ形成されるのかについては明らかでない。これらの問題について検討するため、膜平面の二次元的分化を広い範囲で解析することができる凍結切断レプリカ法を用い、脂肪滴が形成される小胞体局所の分子組成を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 【要旨】

(1) 様々な組成の人工脂肪滴を作製し、凍結切断レプリカ標識法、クライオ電顕法、位相差電顕法などの観察結果と対応させることにより、対象分子の位置を特定する。さらにトリプシンなどの処理と組み合わせて分子局在を明らかにする。

(2) 小胞体膜を二次元的に俯瞰できる凍結切断レプリカ標本を作製し、脂肪滴分子などの局在を検索し、脂肪滴形成と小胞体膜ドメインの関係を明らかにする。

#### A. 脂肪滴の「内部構造」を明らかにする

(1) 様々な組成を持つ人工脂肪滴を作製し、特異的な分解酵素で処理し、凍結切断レプリカ標識法で得られる標識との関係を検討する。

① 脂質エステル（トリグリセリド、コレステロールエステル）と様々な磷脂質を混合して人工脂肪滴を作製し、位相差顕微鏡、凍結切断レプリカ電顕などで形成を確認する。

② 磷脂質にイノシトール4,5二磷酸

[PI(4,5)P<sub>2</sub>] を含む人工脂肪滴を作る。

人工脂肪滴の凍結切断レプリカを

GST-phospholipase C(PLC)δ1-PH で標識する。

凍結前の人工脂肪滴をPLC で処理し、PLC が到達可能な領域（脂肪滴外周）にある

PI(4,5)P<sub>2</sub>を分解した場合の標識と比較する。

③ リコンビナントADRP、または対照となる別の分子を混合して人工脂肪滴を作製し、凍結切断レプリカを抗ADRP 抗体で標識する。

④ 上記②、③について、脂質エステルをトリグリセリド単独、コレステロールエステル単独にした場合についても検討する。

(2) 培養肝細胞の脂肪滴について、凍結切断レプリカを作製する。

① 精製した脂肪滴を用い、上記②、③と同様にPLC、トリプシンなどの処理の有無による標識の変化について検討する。

②細胞全体を急速凍結した標本の凍結切断レプリカを作製し、同様の検討を行う。

(3) 上記(1)、(2) で検討した各脂肪滴標本を急速凍結法で氷包埋し、液体窒素ステージ上でのクライオ電顕法、位相差電顕法で観察する。

B. 脂肪滴の形成と小胞体膜ドメインの関係を明らかにする

(1) 小胞体膜の凍結切断レプリカを作製し、小胞体膜ドメインと脂肪滴形成の関連を明らかにする。

① 小胞体膜の凍結切断レプリカを効率的に得る方法を確立する。小胞体が発達した分泌細胞などを広く検索し、適当な材料を選択する。また細胞を凍結し、切断する方法について、メタルコンタクト法、加圧凍結法などを比較検討する。細胞内の小胞体で十分な効率が得られない場合には、細胞分画法で精製した小胞体を材料として用いる。

② ①で得た凍結切断レプリカを用いて、脂質エステル合成に関わるDGAT、ACAT、ERADに関わるSec61、Derlin-1、SERCA2、Calnexin、脂肪滴特異的な分子であるADRP、TIP47についても二次元的分布を検索する。

(2) 精製した脂肪滴での分子局在について免疫電顕的検索を行い、(1)の実験結果を補完する。

① 種々の条件で培養した細胞から脂肪滴を精製し、種々の小胞体膜蛋白質の混入度をウェスタンプロットングで検索する。

② 精製脂肪滴を急速凍結し、①で検出された小胞体膜蛋白質の局在を凍結切断レプリカ標識法で観察する。

③ 精製脂肪滴をホルムバル膜を張ったグリッドに直接載せ、免疫電顕的な検索を行う。

#### 4. 研究成果

##### A. 脂肪滴の「内部構造」を明らかにする

(1) 培養細胞から精製した脂肪滴をそのままグリッドに載せ、ウェスタンプロットで脂肪滴画分を認識できる抗体でラベルした。それらのグリッドをメチルセルロースで封入した後、電子顕微鏡で観察した。ラベルは抗体によって精製脂肪滴に特異的に分布するものと、非特異的に分布するものがあった。次に、精製脂肪滴をトリプシンで処理したときの、分布様式の変化を調べた。精製脂肪滴上

に特異的に分布する ADRP のラベルは、トリプシンの濃度依存的に減り、ウエスタンブロッティングにおける精製脂肪滴画分でも同様の結果を示した (図 1)。

(2) 脂質エステル (トリグリセリド, コレステロールエステル) と様々な磷脂質を混合して人工脂肪滴を作製し、メチルセルロース封入サンプル、凍結切断レプリカなどを電顕観察し、形状を確認した。人工脂肪滴は球状の形態を示し、培養細胞からの精製脂肪滴と大きな違いが見られなかった (図 2)。

(3) 培養細胞からの精製脂肪滴には ADRP が存在する事がわかっているため、人工脂肪滴にも ADRP が特異的に結合する事を期待し、リコンビナント ADRP、対照として GST の分子と脂質エステル (トリグリセリド・コレステロールエステル) を混合して人工脂肪滴を作製した。作製した人工脂肪滴を(1)と同様に抗 ADRP・抗 GST 抗体でラベルし、電子顕微鏡で観察した。作製した人工脂肪滴には、ADRP だけでなく GST も外周に分布していた。また、この結合は、トリプシンの濃度依存的に消失した。

(4) 人工脂肪滴と培養細胞からの精製脂肪滴との形状、それぞれの脂肪滴の詳細な内部構造を調べるために、自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山教授のご協力を得て、それぞれの脂肪滴を位相差電子顕微鏡で観察した。位相差電子顕微鏡での観察では、人工脂肪滴は精製脂肪滴と異なり、多重膜構造を形成する事などがわかった (図 3)。

B. 脂肪滴の形成と小胞体膜ドメインの関係を明らかにする

(1) 高圧窒素ガスを用いて動物培養細胞を加圧破碎し、低速遠心で核などを取り除いた細胞破碎液を作製した。つぎに細胞破碎液をシ

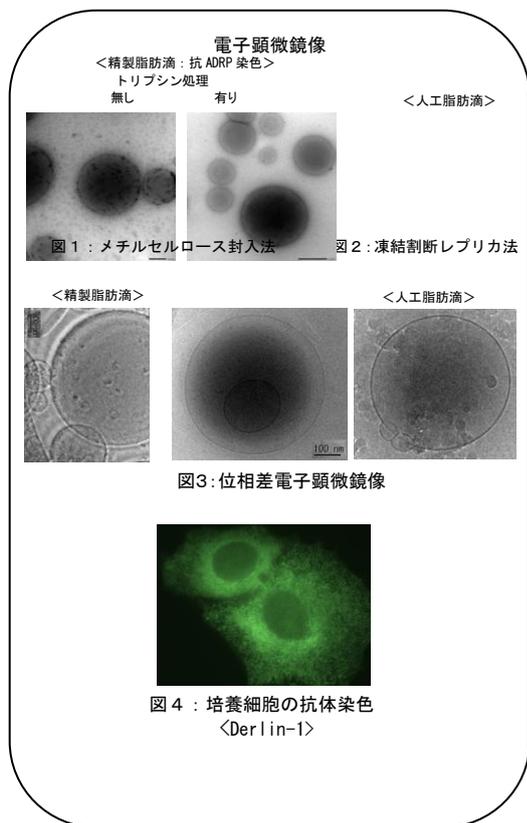
ョ糖による密度勾配に掛けて超遠心を行った。遠心後、最上層画分と沈殿を含まない最下層画分を別々に採取し、再度、密度勾配遠心をおこなった。二度目の超遠心ののち、最上層から順番に 12 のフラクションを回収し、各画分を TCA-アセトンで沈殿させウエスタンの材料とした。その結果、従来、脂肪滴タンパク質と考えられていたもののうちの幾つかは最上層だけでなく、やや重い画分にも回収され、一方、小胞体タンパク質のうちの幾つかは他の小胞体タンパク質よりも軽い画分に認められた。この結果は小胞体膜内に他とは性質の異なる領域があり、脂肪滴形成に関与している可能性を示唆した。

(2) 小胞体膜に分布し、脂肪滴にも分布が示唆された Derlin1 に注目し、培養細胞を抗体染色し蛍光顕微鏡で観察すると、Derlin-1 が細胞内に広く分布していた (図 4)。

(3) 電子顕微鏡によってナノレベルで Derlin-1 の分布を明らかにするため、ナノゴールド標識二次抗体処理後、金増感し、樹脂包埋した。現在、詳細に観察中である。

(4) 培養細胞を加圧凍結・切断して作成したレプリカを、SDS で処理し Derlin-1 の抗体で標識し、検索中である。

これまで、脂質成分が大半を占める脂肪滴のような構造を解析するための有効な手法がなかった。本研究では、凍結切断レプリカ標識法や位相差電顕法など化学固定剤を必要としない方法を駆使し、脂肪滴分子組成の改変操作と対応させることにより、脂肪滴構造を分子レベルで明らかにしたことが最大の特色である。また、小胞体膜ドメインと脂肪滴形成部位との関係を明らかにするために、小胞体膜上の二次元的分子分布を探索し、脂肪滴形成との関連を追究するアプローチは独創的な試みであった。しかしながら本研



究では、小胞体と脂肪滴の関連性は強く示唆されたが、脂肪滴形成部位の小胞体膜ドメインの特定にまではいたらなかった。今後は、小胞体膜ドメインの特定部位を決定し、その微細構造を明らかにすることを旨とする。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾里 納美 (OZATO NAMI )

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：60547454

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

