

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580134

研究課題名(和文)新規リン脂質代謝酵素GDE5の生理機能の解明、およびその応用

研究課題名(英文)Cellular functions of a cytosolic glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE5

研究代表者

矢中 規之(YANAKA, NORIYUKI)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70346526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規なリン脂質代謝酵素であるGDE5の脂肪細胞分化における役割について明らかにした。GDE5は脂肪細胞分化に伴って発現が誘導された。GDE5をノックダウンした際に脂肪細胞分化が抑制された。さらに、GDE5の発現抑制は、脂肪細胞分化初期において重要な一過性の増殖であるclonal expansionを抑制していた。GDE5は脂肪細胞内のglycerophosphocholine(GPC)を特異的に分解し、GDE5をノックダウンした場合には細胞内のGPC濃度が著しく上昇した。GDE5は細胞内GPC濃度の調節を介して浸透圧バランスを調整し、細胞増殖を調節する新規標的因子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that GDE5 is a cytosolic glycerophosphocholine (GPC) phosphodiesterase. Here, we characterized the cellular functions of GDE5 in adipocytes because GDE5 expression is highly expressed during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Knockdown of endogenous GDE5 in 3T3-L1 adipocytes dramatically suppressed adipocyte differentiation, unexpectedly, through a modulation of the mitotic clonal expansion. Decreasing GDE5 abundance resulted in a marked increase in intracellular GPC level. We showed that decreasing GDE5 expression significantly upregulated mRNA expression of proteoglycans such as lumican, and decorin in 3T3-L1 cells. These results suggest that decreasing GDE5 abundance caused osmotic imbalance by the intracellular GPC accumulation and inhibited the mitotic clonal expansion of adipocytes. These provide an insight into the novel roles of GDE5 in osmotic balance which depends on GPC phosphodiesterase activity.

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：脂肪細胞 コリン グリセロホスホコリン 浸透圧

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞への choline の供給は、肥満の進行における脂肪滴表層の一重膜や形質膜の形成、さらに、エピジェネティックな遺伝子発現制御においても極めて重要な調節点であると考えられる。特に、脂肪滴は新たに中性脂肪 (TG) を合成することで成長が誘導されるが、脂肪滴が拡大する際には、内部の TG の合成量の増加のみならず、脂肪滴の表面積の拡大のための表層リン脂質の合成が高まると考えられる。一方、肥満時の白色脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化 (脂肪サイズの拡大) が認められ、形質膜はリン脂質を主成分とする脂質二重層であることから、同様にリン脂質の需要が高まる。以上のことから、肥満時の白色脂肪細胞において、成長する脂肪滴を覆う単層リン脂質膜、およびリン脂質二重層の形質膜の形成のために、リン脂質の合成量の増加が伴うことは不可避であり、脂肪滴サイズの制御、あるいは脂肪細胞のサイズの制御の方策として、リン脂質の合成量の調節も有望であると考えられる。哺乳動物細胞の細胞膜を構成するリン脂質の 50 - 60% は phosphatidylcholine (PC) であり、また 20-30% は phosphatidylethanolamine (PE) であるが、主要なリン脂質である PC の供給量がリン脂質膜の合成量を規定する点で重要であると予想される。その PC は choline を材料に Kennedy pathway を経て主に生合成されるが、肥満時の脂肪細胞内の PC の生合成において choline の供給が極めて重要であり、その供給経路を解明することは大きな意義があると考えられる。脂肪細胞における choline の供給経路については細胞外から choline を取り込むトランスポーター (choline transporter) を介した経路、および細胞内で choline を産生する経路に関する解析を以前から行っている。その結果、細胞外から choline を供給する経路について、神経細胞特異的な高親和性 choline transporter (CHT1) が 3T3-L1 細胞において発現しており、さらに脂肪細胞分化に伴って発現量が増加することを明らかにしている (未発表)。しかし、CHT1 の阻害剤である hemicholinium-3 を培養上清に添加した際に、細胞内の choline 量の変化は認められなかったことから (未発表)、3T3-L1 細胞内の choline 供給における CHT1 の寄与は少ないと考えた。一方で、細胞内で choline を供給する経路として、glycerophosphodiester phosphodiesterase 5 (以下、GDE5) に着目した。GDE5 は以前のゲノム創薬的手法に基づいた研究により見出された新規リン脂質代謝酵素であり、試験管内の反応において PC の分解産物である glycerophosphocholine (以下、GPC) を特異的な基質として分解し、choline を産生することを明らかにしている。従って、GDE5 が脂肪細胞において発現を確認できれば、新たな choline 供給経路として重要な役割を担うと考え、さらに、脂肪細胞における GDE5 の生理機能の解明に着手することとした。

2. 研究の目的

脂肪細胞内で choline を供給する新規経路に関わる代謝酵素の候補因子として、glycerophosphodiester phosphodiesterase 5 (GDE5) に着目した。GDE5 は以前の動物酵素の探索研究により見出された新規リン脂質代謝酵素であり、試験管内の反応において PC の分解産物である GPC を基質として分解し、choline を産生することが明らかにされている。そこで、本研究では、脂肪細胞にける GDE5 の発現解析から着手し、その発現プロファイルを明らかにする。さらに、siRNA 法を用いたノックダウンによる GDE5 の発現抑制によって、GDE5 の生理機能に迫った。特に本研究では、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に伴って、GDE5 の mRNA レベル、およびタンパク質レベルでの発現上昇が確認され、また、siRNA 法による GDE5 の遮断によって基質である GPC の細胞内の著しい蓄積効果が認められた。脂肪細胞における choline の主要な供給経路として GDE5 の生理的、かつ積極的な関与が示唆され、本研究ではさらに GDE5 の遮断を行ったところ、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化が抑制される非常に興味深い効果を見出した。これまで述べてきたように、脂肪細胞分化にともない、拡張する脂肪滴表層の膜や形質膜を形成するために PC の必要量が高まると考えられるが、GDE5 の遮断により PC の材料となる choline の供給量が低下し、PC の合成量が減少したことにより脂肪細胞分化抑制効果が認められたとの仮説を立て、その検証に着手した。本研究では、さらに研究内容を発展させ、細胞内の浸透圧調節物質である GPC の役割についても明らかにすることを目標として研究を推進した。

3. 研究の方法

脂肪細胞はマウス白色脂肪組織由来 3T3-L1 細胞株を用いた。培養には、10% fetal calf serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 培地) を使用した。脂肪細胞への分化は、脂肪細胞がコンフルエントに達した二日後、3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, および bovine insulin を含む分化誘導培地に交換することで誘導した。その後、2 日おきに bovine insulin を添加した培地と交換し、分化誘導を進行させ、脂肪細胞の成熟化を行った。これら培養細胞の実験はすべてクリーンベンチ内にて無菌的に行った。

培養皿より 3T3-L1 細胞を回収し、懸濁した後、reverse transfection 法にて siRNA を導入した。transfection には Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) を用いた。対照群として luciferase siRNA を同様に導入し、比較を行った。total RNA の調製は RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN) を用いて行い、RNA 濃度を測定後、RevaTra Ace RT (Toyobo) を用いて cDNA の合成を行った。さらに、特異的 primer を添加し、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用

いた PCR 解析,あるいは THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(Toyobo)を用いた real-time PCR 解析に供した。3T3-L1 細胞の GDE5 を遮断した際の網羅的な遺伝子発現の解明を目的とした DNA microarray 解析には, Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ(Agilent Technologies)を用いて行った。調製した total RNA を用いて, Cy3 および Cy5 標識した cRNA 溶液を調製した。ハイブリダイゼーションはオリゴ DNA マイクロアレイハイブリダイゼーションプロトコール(Agilent Technologies)に従って行い,画像解析に供した。

細胞内 choline 化合物は,3T3-L1 細胞の培養液を取り除き,PBS(-)により洗浄した後,100%メタノールを加え,氷上で 10 分間静置し,抽出を行った。また,Bligh&Dyer 法により脂質分画を回収し,PC の分析に供した。choline 化合物は LC-MS 法,または LC-MSMS 法によって解析を行った。特に水溶性 choline 化合物は HILIC カラムを用いて分離し,ESI 法(positive mode)により GPC を $m/z=258$ [MH^+], choline を $m/z=104$ [MH^+]でイオンを定量化した。

アミノ酸分析のためのサンプルについては,3T3-L1 細胞を PBS(-)により洗浄し,滅菌水を加え,セルスクレーパーを用いて回収した。95,15 分間の熱処理を行い,12000rpm,5 分間の遠心を行い,上清を回収し,フィルトレートしたものをサンプルとした。アミノ酸分析は,全自動アミノ酸分析機(JLC-500/V2 JEOL)を用いて行った。

4. 研究成果

1. 3T3-L1 細胞における GDE5 の choline 供給経路としての関与

3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導し,0,3,および 9 日間培養した後,各細胞から total RNA を調製し,real-time PCR に供した。その結果,GDE5 の mRNA 量は 3 日目に約 7 倍に増加し,9 日目には約 4 倍に増加していた。また,3T3-L1 細胞を同様に脂肪細胞に分化誘導して,0,3,および 9 日間培養した後,各細胞から総タンパク質を調製し,ウェスタンブロット法により,GDE5 タンパク質を検出した。その結果,GDE5 タンパク質発現量は,mRNA レベルと異なり,分化誘導後期にピークを示した。未分化 3T3-L1 細胞において,siGDE5 の導入により GDE5 の発現を抑制させた 48 時間後の 3T3-L1 細胞から,GPC,および choline をメタノール抽出し,LC/MS 法により測定した。その結果,siGDE5 の導入により,GPC 量は約 4.7 倍に増加したが,choline 量の変化は認められなかった。以上の結果から,GDE5 が 3T3-L1 細胞において,GPC を分解する役割を担うことが示された。

2. 3T3-L1 細胞の GDE5 を遮断した際の脂肪細胞分化に与える影響

未分化 3T3-L1 細胞に,siGDE5 を導入し,2 日間培養した後,分化誘導刺激を行い,6 日目において,細胞を Oil-Red-O 染色し,細胞

を観察した後,色素を脱色し吸光度計にて定量を行った。その結果,control の 3T3-L1 細胞に比べ,82.1%の中性脂肪蓄積抑制効果が認められた。一方,未分化時より GDE5 を遮断し,2 日間培養した後,分化誘導刺激を行い,2 日目,および 6 日目において total RNA を調製し,real-time PCR 法を用いて,脂肪細胞分化マーカーの遺伝子発現解析を行った。その結果,脂肪細胞分化マーカーである,aP-2 や *C/EBP α* の遺伝子発現の減少が認められた。3T3-L1 細胞に脂肪細胞分化誘導刺激を行い,4 日目の細胞において siGDE5 を導入し,さらに 3 日間培養した 3T3-L1 細胞を,Oil-Red-O 染色し,細胞を観察した後,色素を脱色し吸光度計にて定量を行った。その結果,control の 3T3-L1 細胞に比べ,6.1%の中性脂肪蓄積抑制効果にとどまった。以上の結果から,GDE5 の遮断による脂肪細胞分化抑制効果は,脂肪細胞分化後期の脂肪滴の形成に働きかけるのではなく,脂肪細胞分化誘導に対して負に働きかけている可能性が示唆された。しかし,脂肪細胞分化後期においても,中性脂肪蓄積抑制効果が認められたことから,GDE5 の脂肪滴の形成に対する関与の可能性も考えられた。3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化については,IBMX,dexamethasone,および insulin の添加による脂肪細胞分化誘導直後には,clonal expansion と呼ばれる一過性の細胞増殖を起こし,その後,成熟脂肪細胞へと分化するが,近年,clonal expansion が脂肪細胞分化に必須であると考えられている。そこで次に,GDE5 の遮断による clonal expansion への影響を解析した。siGDE5 を導入し,GDE5 を発現抑制させ,2 日間培養した 3T3-L1 細胞に脂肪細胞分化誘導を行った 18 時間後,培養上清に BrdU を添加し,2 時間後に増殖期にある BrdU 陽性細胞率を算出した。その結果,control の BrdU 陽性細胞率が 61%であったのに対し,GDE5 の遮断により,BrdU 陽性細胞率は 34%にまで低下した。この結果から,GDE5 の遮断により choline の供給が低下したため,PC の合成が阻害され,増殖が抑制された可能性が考えられた。一方,PC の合成に関与すると考えられる CCT β についても同様に siRNA を導入し,CCT β を発現抑制させ,2 日間培養した 3T3-L1 細胞に脂肪細胞分化誘導を行った 18 時間後,BrdU 陽性細胞率を算出した。その結果,control の BrdU 陽性細胞率が 61%であったのに対し,CCT β の遮断により,BrdU 陽性細胞率は 19%にまで低下した。これらの結果は,GDE5,および CCT β の遮断による clonal expansion の抑制効果が,ともに 3T3-L1 細胞の増殖に必要な PC 合成を阻害することに基づく可能性を強く示唆するものであった。しかし,siGDE5,あるいは siCCT β を導入した 3T3-L1 細胞を 1 日間培養した後,Bligh&Dyer 法により脂質分画を回収し,TLC 法,および LC/MSMS 法によって PC の定量を行った。その結果,CCT β の遮断時には control に比べおよそ 21%の PC 量の低下が認められたが,GDE5

の遮断時には PC 量に変化が認められなかった。この結果から、GDE5、あるいは CCT β の遮断による clonal expansion の抑制効果は異なるメカニズムに基づく可能性が示された。3. 3T3-L1 細胞の GDE5 の遮断による浸透圧バランスへの影響

3T3-L1 細胞の GDE5 を遮断した際の DNA microarray 法による遺伝子発現解析を行った。3T3-L1 細胞の未分化時より GDE5 の遮断を行い、1 日後に分化誘導刺激を行い、翌日に total RNA を回収し、DNA microarray 解析に供した。その結果、lumican や decorin, epiphygan といった proteoglycan 類の遺伝子群、および urea の transporter である UT-b の遺伝子発現が上昇していることを見出した。これらの遺伝子発現変動は、GDE5 の遮断を行った 3T3-L1 細胞の total RNA を回収し、real-time PCR 法により確認を行った。また、3T3-L1 細胞の GDE5 を遮断した際の細胞内の遊離アミノ酸の解析を行った。3T3-L1 細胞の GDE5 の遮断による浸透圧バランスの変化の可能性と、UT-b の遺伝子発現の上昇から、細胞内の urea 濃度の変化が示唆された。そこで、3T3-L1 細胞の GDE5 を遮断した 2 日目の細胞において、細胞内の遊離のアミノ酸を分析したところ、GDE5 の遮断により細胞内の urea 濃度の上昇が確認された。また、興味深いことに Gly などのアミノ酸濃度の低下が確認された。

本研究結果では、GDE5 の遮断により浸透圧物質である GPC が細胞内に著しく蓄積し、proteoglycan 類や UT-b の遺伝子発現が著しく上昇し、さらに細胞内 urea 濃度の増加、および Gly などのアミノ酸濃度の低下が示された。さらに、細胞内酵素 LDH の培養上清への流出が確認されたことから、浸透圧バランスの変化による necrosis 様細胞死の可能性が示唆された。本研究において明らかとなった GDE5 の遮断による clonal expansion の抑制効果と、浸透圧バランスの変化との関連性を明らかにすることは、細胞増殖抑制（細胞死）の新しい誘導のメカニズムを提案することとなり、癌を始め、様々な疾病の発症に対して有用な治療概念を示すことができるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Daniela Corda, Maria G Mosca, Noriyasu Ohshima, Laura Grauso, Noriyuki Yanaka, Stefania Mariggio, The emerging physiological roles of the glycerophosphodiesterase family, FEBS J, 査読有, 281, 2014, 998-1016, doi: 10.1111/febs.12699
2. Yohei Sanada, Takahiro Kumoto, Haruna Suehiro, Fusanori Nishimura, Norihisa Kato, Yutaka Hata, Alexander Sorisky, Noriyuki Yanaka, RASSF6 expression in adipocytes is down-regulated by interaction with macrophages, PLoS One, 査読有, 8, 2013, e61931, doi: 10.1371/journal.pone.0061931

3. Keigo Toya, Atsuko Hirata, Tomomi Ohata, Yohei Sanada, Norihisa Kato, Noriyuki Yanaka, Regulation of colon gene expression by vitamin B6 supplementation, Mol Nutr Food Res, 査読有, 56, 2012, 641-652, doi: 10.1002/mnfr.201100707

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 中村啓司, 武田崇登, 吉澤郁美, 加藤範久, JEFF M. SANDS, 矢中規之, GDE5 の遮断による脂肪細胞分化の抑制は、clonal expansion の阻害による、日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 東京
2. 真田洋平, 山本岳史, 金井すみれ, 中村美奈子, 加藤範久, Fons A.J. van de Loo, 矢中規之, 肥満白色脂肪組織の慢性炎症像を可視化する非侵襲イメージングモデルマウスの作出, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 東京
3. 楊波, 橋本貴生, 吉澤郁美, 和田正信, 加藤範久, 矢中規之, 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現マウスの速筋型筋萎縮の病態解析, 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 5 月 25 日, 名古屋
4. 平田敦子, 真田洋平, 大畑智美, 加藤範久, 矢中規之, 大腸前癌病変(ACF)発症に対する vitamin B6 の抑制機構の解明, 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 5 月 25 日, 名古屋
5. 工藤尊裕, 大嶋紀安, Stefania Mariggio, 本田絢子, 長野友美, 加藤範久, Daniela Corda, 和泉孝志, 矢中規之, 新規酵素 GDE7 はオートタキシン活性を有し, LPA および alkyl-LPA の産生に参与する, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 仙台
6. 真田洋平, 山本岳史, 加藤範久, 西村英紀, 矢中規之, マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞の cholesterol 25-hydroxylase, および Cyp7b1 の発現は上昇する, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 仙台
7. 真田洋平, 久本高央, 米中久喜, 西村英紀, 畑裕, 矢中規之, 脂肪細胞における RASSF6 の発現はマクロファージとの相互作用によって減少する, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 25 日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢中 規之 (NORIYUKI YANAKA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：70346526

(2) 研究分担者

加藤 範久 (NORIHISA KATO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：20144892

(3) 研究分担者

和田 正信 (MASANOBU WADA)
広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号： 80220961

(4) 連携研究者

栗崎 知浩 (TOMOHIRO KURISAKI)
京都大学・再生医科学研究所・助教
研究者番号： 90311422