

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790098

研究課題名(和文)細胞内脂肪滴の生理機能：ステロイドホルモン産生を中心に

研究課題名(英文)The role of lipid droplets in the steroid hormone synthesis in MLTC-1 mouse Leydig tumor cells.

研究代表者

山口 智広 (Yamaguchi, Tomohiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50347530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内脂肪滴は全身の細胞に存在しているが、ステロイド産生細胞や好中球の脂肪滴の研究は進んでいない。本研究ではMLTC-1精巣ライディッヒ細胞およびHL-60由来の好中球細胞における脂肪滴タンパクと脂肪滴の役割について検討した。結果として、MLTC-1細胞の脂肪滴はステロイドホルモン産生酵素3 β -HSD、17 β -HSDが主要な構成タンパク質であり、細胞を黄体形成ホルモンで刺激すると、これらが小胞体に移行することがわかった。また、HL-60由来好中球では、Perilipin-3(PLIN3)が主要な脂肪滴タンパク質であり、PLIN-3が脂肪滴の形成に必須であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplets (LDs) are functional subcellular organelles involved in multiple intracellular processes. Although LDs are found in nearly all types of eukaryotic cells, their properties are highly variable among tissues.

Steroidogenic cells normally accumulate numerous small cytosolic LDs, but the profiles of LD-associated proteins and the biological significance of these remains unclear. I found that LD fraction from mouse Leydig tumor (MLTC-1) cells, abundantly contains the enzymes for steroidogenesis, especially 3 β -HSD1 and 17 β -HSD11 and the activation of steroidogenesis by luteinizing hormone (LH) caused drastic change in morphology of LDs. Upon stimulation, perinuclear LDs are changed into relatively nascent LDs and possibly fused to ER. I next studied about the LDs of HL-60-derived neutrophils and found that perilipin-3 (PLIN3) has a pivotal role in LD-biogenesis, and that PLIN3 is associated with the synthesis and secretion of PGE2.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂肪滴 細胞小器官 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

細胞内脂肪滴は中性脂肪がリン脂質一重層によって覆われた構造体であり、全身の細胞に存在している。近年、脂肪滴は単に余った脂肪を蓄積する器官ではなく、その表面には多数の機能タンパク質が局在し、積極的に脂質代謝を制御していることがわかってきた。現在、脂肪滴は生体の脂質ホメオスタシスに重要な細胞小器官（オルガネラ）であると認識されている。脂肪滴の形成機構や脂質代謝の分子機構については主に脂肪細胞、肝細胞、マクロファージを中心に研究が進められており、それ以外の細胞の脂肪滴については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) ステロイド産生細胞 (MLTC-1) の脂肪滴の解析。

脂肪滴の主要な内容物はトリアシルグリセロール (TG) とコレステロールエステル (CE) であり、細胞種によって異なる。脂肪細胞や肝細胞は主に TG を含む脂肪滴を有し、表層に存在するタンパク質が TG の合成と分解を制御している。この制御機構の破綻は肥満や脂肪肝の原因となる。メタボリックシンドロームへの社会的関心から、これまで脂肪細胞を中心とした TG を含む脂肪滴について多くの研究がなされてきた。一方、CE を含む脂肪滴についてはこれまでほとんど研究されていなかった。CE を含む脂肪滴を有する細胞としてステロイド産生細胞が挙げられる。CE はステロイドホルモンの前駆体として蓄えられており、ホルモン合成のシグナルを受けるとエステル結合が切断されコレステロールが遊離し、合成が開始される。本研究では、テストステロンを生成するマウス精巣ライディッヒ細胞由来 MLTC-1 細胞をモデルとして、その脂肪滴の構成タンパクと、ホルモン産生における脂肪滴の変化について検討した。

(2) HL-60 由来好中球の脂肪滴の解析。

血球細胞の脂肪滴についてはマクロファージが比較的よく解析されており、炎症反応にตอบสนองし脂肪滴が肥大することがわかっている。一方、好中球の脂肪滴についての知見はほとんどない。ヒト HL-60 細胞はレチノイン酸処理により好中球へと分化する。このモデル系を用いて、好中球の炎症反応における脂肪滴の役割について検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞

MLTC-1 (Mouse Leydig tumor cell-1) と HL-60 細胞は 10%FBS を含む RPMI-1640 培地で培養した。HL-60 細胞は 2 μ M レチノイン酸 (AtRA) 処理により好中球へと分化させた。

(2) 脂肪滴の単離

各細胞を回収し、ナイトロジェンキャビテーションとステンレスホモジナイザーにより細胞を粉砕した。PNS 画分を調製し、ショ糖密度勾配遠心法により脂肪滴画分を分離した。

(3) LC-MS/MS 解析

精製した脂肪滴画分を 10% SDS-PAGE で分離し、CBB 染色後、目的のバンドを切り出し、抽出、還元アルキル化、トリプシン処理し、得られたペプチド断片を LC-MS/MS および MASCOT ソフトウェアで解析した。

(4) 細胞へのプラスミド、siRNA の導入。

MLTC-1 への GFP-プラスミドの導入はリポフェクション法 (Lipofectamine plus) により行った。siRNA プローブは Thermo Scientific より購入し、HL-60 好中球への siRNA の導入はエレクトロポレーション法 (Nucleofector, Amaxa) により行った。

(5) 免疫蛍光抗体法

MLTC-1、HL-60 細胞は 4%PFA 固定後、0.01% ジギトニンで可溶化し、各種抗体で脂肪滴タンパク質やその他の細胞小器官を染色した。脂肪滴内の中性脂肪は LipidTOX Red で染色した。細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon A1Si) で観察した。

4. 研究成果

(1) ステロイド産生細胞 (MLTC-1) の脂肪滴の解析。

① 脂肪滴タンパクのプロテオミクス解析。

マウス由来の精巣ステロイド産生細胞である MLTC-1 ライディッヒ細胞より脂肪滴を回収し、SDS-PAGE で脂肪滴を構成するタンパク質を解析した。すでに解析されている J774 マクロファージ、Hepal 肝癌細胞、正常マウス肝臓の脂肪滴タンパク質と比較したところ、MLTC-1 細胞のタンパク質組成に明らかな差異が認められた。肝臓やマクロファージの細胞では Perilipin-2 (PLIN2) が主要構成タンパクであるのに対し、MLTC-1 では PLIN2 は比較的少なく、別に多量に存在する 2 つの成分が認められた。LC-MS/MS 解析からこれらはステロイドホルモン合成酵素の 3 β -hydroxyl steroid dehydrogenase type 1 (3 β HSD) と 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 11 (17 β HSD) であることが判明した。我々は独自の組成を持つ MLTC-1 に注目し、構成タン

パク質の網羅的な解析を進めた。プロテオミクスから MLTC-1 の脂肪滴にはリパーゼや Rab など多数のタンパク質が局在していることが分かり、脂肪滴表面が積極的に反応の場として機能していることが示唆された。また Perilipin ファミリーは存在していたが、他の細胞に比べ比較的少ないことが判明した。ライディッヒ細胞においてテストステロン合成を担う酵素は多数存在する (図 3)。プロテオミクスの結果、 3β HSD と 17β HSD 以外のステロイド合成に関与する酵素 (CYP11A1、CYP17) も MLTC-1 の脂肪滴画分に検出された。従来これらの酵素は小胞体やミトコンドリアに局在すると考えられており、脂肪滴における機能は分かっていない。

GFP- 3β HSD を MLTC-1 細胞に発現させたところ、リング状の構造と、細胞全体に網目状の構造が観察された。リング状の構造は Perilipin ファミリーと共局在することから脂肪滴と考えられ、網目構造は calnexin と一致することから小胞体であると考えられる。また GFP- 17β HSD でも同様の結果が得られ、これらの結果は 3β HSD と 17β HSD が脂肪滴と小胞体の両方に存在することを示唆している。

② ステロイドホルモン産生時の脂肪滴の形態変化。

MLTC-1 細胞を黄体形成ホルモン (LH) で刺激すると、プロゲステロンの合成が促進される。ホルモン産生刺激時の脂肪滴の形態変化を追跡したところ、LH 刺激後 2~4 時間で脂肪滴の形態が劇的に変化し、本来房状である脂肪滴が小型化し、細胞質全体に分散することを見いだした (図 1)。よって細胞内の cAMP 量が脂肪滴の形態を制御していると考えられる。また脂肪滴が小型化する際に、脂肪滴の Perilipin-1 (PLIN1) と小胞体の Calnexin が共局在する様子が観察された。また、LH 処理の影響をショ糖密度勾配遠心法により確認したところ、PLIN1 は LH (-) では主にトップフラクションに検出されたが、LH (+) ではトップフラクションではなく、中間フラクションに検出された。これらの結果は、LH 処理後に脂肪滴の一部が小胞体と融合していることを示唆している。

LH 処理による脂肪滴の小型化は、電子顕微鏡観察によっても確認された。通常の MLTC-1 細胞では多胞性の脂肪滴が核周辺にクラスター状に存在しているが、LH 処理後には小型化し、細胞全体に広がる傾向がある (図 2)。

LH 刺激からどのようなシグナル伝達経路を通じて脂肪滴に作用するのであろうか。LH 処理した MLTC-1 細胞をウエスタンブロットで解析すると、 3β HSD や 17β HSD に変化は認められなかったが、PLIN1 が顕著にバンドシフトしており、リン酸化されていることがわか

った。よって、LH 刺激→cAMP 増加→PKA 活性化→HSL と PLIN1 のリン酸化→CE 分解促進という経路により作用していると考えられる (図 3)。

今回の研究から、ステロイドホルモン合成に関与する酵素群が脂肪滴に局在することがわかった。脂肪滴上の酵素は通常不活性であり、ホルモン合成時に脂肪滴の一部が小胞体と相互作用し、脂質二重膜である小胞体上で活性型となり機能している可能性がある。各酵素の小胞体⇔脂肪滴⇔ミトコンドリア間の挙動と活性の変化についてさらに検討する必要がある。

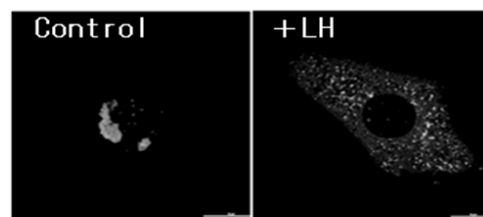


図 1 黄体形成ホルモン (LH) 刺激時の脂肪滴の形態変化。

MLTC-1 細胞に 125 mIU LH を加え、4 hr 後固定した。脂肪滴を PLIN1 抗体で染色し共焦点顕微鏡で観察した。LH 刺激により脂肪滴が小型化し、細胞質中に分散している。Bar=20 μ m

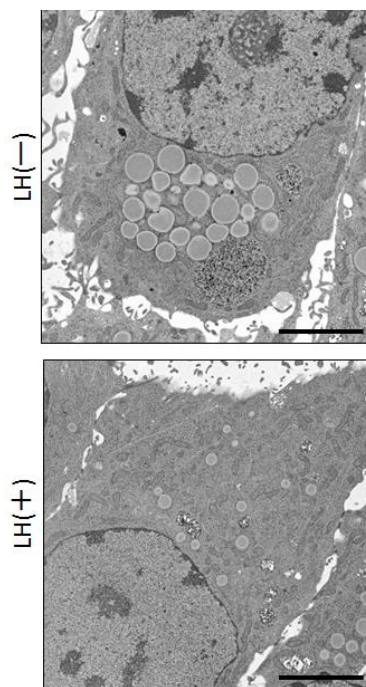


図 2 脂肪滴の電子顕微鏡観察。LH 刺激なし (LH-) および刺激時 (LH+) の MLTC-1 細胞を観察した。Bar=5 μ m

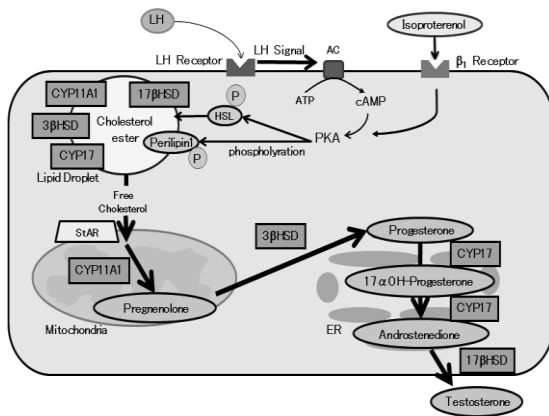


図3 MLTC-1細胞におけるステロイドホルモン産生のモデル。

(2) HL-60由来好中球の脂肪滴の解析。

急性骨髄性白血病患者の末梢血由来の細胞株であるHL-60をレチノイン酸により好中球に分化させた。分化した細胞を成人性歯周炎の発症と増悪に関わる最重要細菌とされている *Porphyromonas gingivalis* のリポ多糖 (*P. g*-LPS) で刺激し、炎症反応を惹起させたときの脂肪滴の形態変化を観察し、さらに PGE_2 の産生の変化をEIA法により調べた。

好中球に分化したHL-60を *P. g*-LPS で刺激すると濃度依存的に脂肪滴数が増加し、サイズが増大した。それに伴い脂肪滴局在タンパク質であるPerilipin-3 (PLIN3) が有意に増加することが確認された。脂肪滴画分のプロテオミクスやウエスタンブロットにより、HL-60における脂肪滴では、PLIN3が主たる構成タンパク質であることが示唆された。また、*P. g*-LPS刺激後の培養上清に含まれる PGE_2 を定量した結果、LPSの濃度依存的に PGE_2 の産生量が増加した。さらに、siRNAによりPLIN3をノックダウンした好中球では、脂肪滴が顕著に減少した。この時、プロスタグランジンE合成酵素の発現が減少しており、*P. g*-LPS刺激により産生される PGE_2 の量が減少することを確認した。一方、シクロオキシゲナーゼ(COX)-1やCOX-2の発現に変化は見られなかった。プロスタグランジンE合成酵素やCOXが脂肪滴に存在するのか、共焦点顕微鏡で観察したが、いずれも小胞体に存在しており、脂肪滴様の局在は見られなかった。

以上の結果より、HL-60から分化した好中球における脂肪滴では、PLIN3が主要なタンパク質であることを見出した。また、PLIN3はLPS刺激時の脂肪滴形成において重要な役割を担っていることがわかった。さらに、好中球においてPLIN3の減少は PGE_2 合成酵素の減少を引き起こすことを見出した。このメカニズムは不明であるが、PLIN3による脂肪滴形成が PGE_2 産生を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

① Nose F, Yamaguchi T, Kato R, Aiuchi T, Obama T, Hara S, Yamamoto M, Itabe H. Crucial Role of Perilipin-3 (TIP47) in Formation of Lipid Droplets and PGE_2 Production in HL-60-Derived Neutrophils. *PLoS One*. (2013) 8, e71542. doi: 10.1371/journal.pone.0071542. 査読有

② Hashimoto T, Segawa H, Okuno M, Kano H, Hamaguchi HO, Haraguchi T, Hiraoka Y, Hasui S, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Active involvement of micro-lipid droplets and lipid droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Cell Sci*. (2012) 125, 6127-6136 査読有

③ Kuramoto K*, Okamura T*, Yamaguchi T*, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Yanase T, Otsu K, Usuda N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose F, Osumi T. (*Equal Contribution) Perilipin 5, a Lipid Droplet-binding Protein, Protects Heart from Oxidative Burden by Sequestering Fatty Acid from Excessive Oxidation. *J Biol Chem*. (2012) 287, 23852-23863 査読有

④ Wang H, Bell M, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, Londos C, Yamaguchi T, Rizzo MA, Coleman R, Gong D, Brasaemle D, Sztalryd C. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem*. (2011) 286, 15707-15715 査読有

⑤ Obama T, Nagaoka S, Akagi K, Kato R, Horiuchi N, Horai Y, Aiuchi T, Arata S, Yamaguchi T, Watanabe M, Itabe H. Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway. *PLoS One*. (2011) 6, e22917 doi: 10.1371/journal.pone.0022917 査読有

⑥ Nagahama Y, Obama T, Usui M, Kanazawa Y, Iwamoto S, Suzuki K, Miyazaki A, Yamaguchi T, Yamamoto M, Itabe H.

Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with the up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (2011) 413, 566-571
査読有

〔学会発表〕(計7件)

① 二村哲未, 山口智広, 上原弥未, 菅井瞳, 猪砂絵美, 橘洋介, 渊上圭子, 中西里奈, 笹部直子, 加藤里奈, 板部洋之
ヒト間葉系幹細胞(hMSC)由来の脂肪細胞の分化に関する研究

2014年3月28日 日本薬学会第133年会 熊本

② 野瀬冬樹, 山口智広, 相内敏弘, 小浜孝士, 加藤里奈, 山本松男, 板部洋之
Perilipin-3/TIP47はHL-60由来好中球における脂肪滴の形成とプロスタグランジン E₂の産生に關与する

2013年9月12日第86回日本生化学会 横浜

③ 野瀬冬樹, 山口智広, 相内敏弘, 小浜孝士, 加藤里奈, 山本松男, 板部洋之
HL-60好中球においてPerilipin-3/TIP47は脂肪滴形成とプロスタグランジン E₂産生に關与する

2013年6月7日 第55回脂質生化学会 松島

④ 山口智広
細胞内脂肪滴における中性脂肪の蓄積と分解の制御機構

2012年10月13日 第56回日本薬学会関東支部大会 品川

⑤ 山口智広, 藤川典之, 長澤充, 櫻井敦史, 小浜孝士, 加藤里奈, 板部洋之
マウスライディッヒ細胞株(MLTC-1)における脂肪滴タンパク質の機能解析

2012年3月29日 日本薬学会第132年会 札幌

⑥ Tomohiro Yamaguchi
The role of lipid droplets in the steroid hormone synthesis in Leydig cells
2011年6月29日 The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology[II]
札幌

⑦ 山口智広, 藤川典之, 相内敏弘, 津田園佳, 徳岡雄太郎, 二村哲未, 小浜孝士, 加藤里奈, 板部洋之

ステロイド産生細胞(MLTC-1)における脂肪滴局在タンパク質の解析
2011年5月12日 第53回脂質生化学会 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 智広 (YAMAGUCHI, Tomohiro)
昭和大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50347530