

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390045

研究課題名(和文) 脂質超分子構造の形成メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism to generate lipid-based supramolecular structures

研究代表者

藤本 豊士 (Fujimoto, Toyoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50115929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂質が構造の基盤を形成するドメイン(脂質超分子構造)である脂肪滴、オートファゴソーム、脂質ドメインについて研究を行った。その結果として、1) 肝細胞において脂肪滴局在分子UBXD8を欠損するマウスではリポ蛋白質の分泌に異常が生じ、特異な脂肪肝が起こること、2) オートファゴソームに必須の膜脂質であるホスファチジルイノシトール3リン酸が、出芽酵母と哺乳類細胞では全く異なる分布を示すこと、3) 代表的な燐脂質であるホスファチジルコリンの細胞膜両葉への分布(非対称性)が出芽酵母と哺乳類細胞では異なること、などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We studied on lipid-based supramolecular structures, i.e., lipid droplet, autophagosome, and lipid domain. The results obtained are as follows: 1) In mice lacking a lipid droplet-resident protein, UBXD8, in liver, hepatocytes are deficient in lipoprotein secretion and exhibit an atypical type of steatosis; 2) Phosphatidylinositol 3-phosphate, a phospholipid indispensable for autophagy, takes drastically different distributions in autophagosomes between budding yeast and mammalian cells; 3) Distribution of phosphatidylcholine across the plasmalemmal lipid bilayer is different between budding yeast and mammalian cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂質ドメイン 脂肪滴 オートファゴソーム 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ラフト・カベオラ、脂肪滴、オートファゴソームは生理的に重要な機能を担い、疾病との関連でも大きな注目を集めている。我々はこれらの構造を『脂質が構造の基盤を形成するドメイン(脂質超分子構造)』と捉え、構造形成のメカニズムを明らかにすることを目指して研究を行ってきた。

これらのうち、ラフト・カベオラはコレステロールとスフィンゴ脂質を基盤とする膜ドメインである。一方、脂肪滴は単なる過剰脂質の蓄積と見られてきたが、カベオリンがターゲットされる膜ドメインとしての性質も持つ(Fujimoto et al, J Cell Biol, 152, 1079, 2001)。すなわち脂肪滴表面は特殊な脂肪酸組成を持つ燐脂質一重層であり(Tauchi-Sato et al, J Biol Chem 277, 44507, 2002)、小胞体膜の燐脂質二重層に連続する(Ohsaki et al, J Cell Sci 121, 2415, 2008)。また小胞体膜が脂肪滴表面に移行する部位(LD-ER juncture)は、細胞内蛋白質分解に関係する蛋白質同士が相互に結合し、機能的に重要な構造であることが明らかになってきた。オートファゴソームは内在性蛋白質をほとんど含まない膜で形成されるユニークな構造であり、脂肪滴との関連が示唆されている。

脂質超分子構造の解析には膜脂質の関与を詳細に知る必要があるが、既存の脂質解析法には多くの問題がある。例えば、生化学的に得られる『界面活性剤不溶性膜』は、多くの論文では『ラフトに相当するもの』として扱われてきたが、実際には生体膜に存在するラフトを単離精製したものではなく、『ラフト親和性を持つ分子』が半ば人工的に集合したサンプルであると理解されている。また、蛋白質を解析する分子生物学的手法の多くは、遺伝子で直接コードされない脂質には適用できない。蛍光アナログや脂質結合タンパク質をプローブに用いる方法は人工産物の危険性が懸念される。さらに大半の脂質は化学固定できないため、免疫電顕法を応用することも困難である。

我々はこれらの問題を回避し、定量的に膜脂質を解析する方法として急速凍結・凍結切断レプリカ標識法(QF-FRL法)を最適化し、GM1, GM3, PI(4,5)P₂などの膜脂質のナノ局在を定量的に解析することに成功した(Fujita et al, Mol Biol Cell 18, 2812, 2007; Proc Natl Acad Sci USA 106, 9256, 2009; Nat Protocol 5, 661, 2010など)。

これまでの研究結果を踏まえ、脂質超分子構造の形成機構をさらに詳細に解析するためには、QF-FRL法をより広範な膜脂質に適用可能なものとする必要があると考えに至った。これまで成果を挙げてきた抗脂質抗体や脂質ドメイン結合リコンビナント蛋白質を用いた方法の開発をさらに推進するとともに、膜脂質の親水性頭部(コリン、エタノールアミンなど)となる前駆体を最小限に修飾した化合物を細胞に取り込ませ、凍

結切断レプリカ上で化学反応を行うことにより、脂質動態・分布の解析を行えるのではないかと考えた。またオートファゴソームなどの形成機構を追究するためには遺伝子欠失・変異の影響を見る方法が欠かせないため、遺伝子操作が容易な酵母細胞を導入し、膜脂質動態を追究する。

一方、脂肪滴は小胞体のサブコンパートメントと考えられ、これまでの結果から、脂肪滴形成にはLD-ER junctureにおける蛋白質相互作用が関与すると推測される。この点を詳細に解析するため、LD-ER junctureに存在する蛋白質であるUBXD8をノックアウトしたマウスの作製が必要であると考えられ、すでにキメラマウスを得た。これらの動物個体を解析することにより、脂肪滴の生理的意義に迫ることができると考えている。

2. 研究の目的

本課題では上記に述べた結果と着想に基づき、下記の研究を進める。

(1) QF-FRL法の応用範囲を拡張するために、膜構造を物理的に安定的に保持できる凍結切断レプリカの特質を生かした脂質標識法を開発する。特に今回の実験では温和な条件下で反応が行え、かつ特異的で不可逆的にリガンドを結合させることができるクリック反応を応用し、コリン含有燐脂質の膜内分布を詳細に解析する。また出芽酵母と哺乳類細胞の比較検討を行う。

(2) 出芽酵母の遺伝子操作技術とQF-FRL法を組み合わせることにより、オートファゴソームの形成メカニズムを追究する。今回の実験では、オートファジーの成立に必須であることが知られているホスファチジルイノシトール3リン酸(PI3P)のナノ局在をQF-FRL法で可視化する方法を確立し、オートファゴソームやオートファジー小体の形成とPI3Pの関係を解明する。出芽酵母と哺乳類細胞の比較検討を通じて、両者におけるオートファジー過程の違いについても検討する。

(3) LD-ER junctureに存在する蛋白質であるUBXD8を肝細胞においてのみ欠失するマウスを作出し、その個体の表現型の解析を対照マウスと比較、解析する。またそれらのマウスから初代培養肝細胞を調製し、解析する。これらの研究を通じて肝細胞におけるUBXD8の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) コリン含有燐脂質(ホスファチジルコリン[PC]、リソホスファチジルコリン[lysoPC]、スフィンゴミエリン[SM])の頭部を形成するコリンのアナログとして、アルキル基を持つ propargylcholine を出芽酵母および培養哺乳類細胞に取り込ませ、代謝的にラベルした。加圧凍結装置を用いて細胞を急速凍結し、凍結切断レプリカを作製したのち、凍結切断レプリカ上に保持されると予想さ

れるアルキン基と biotin-azide をクリック反応で結合させた。通常の QF-FRL 法と同様の手法でコリン含有磷脂質に結合したビオチンを抗体標識し、電子顕微鏡で観察し、標識の分布を定量的に評価した。

(2) PI3P に特異的に結合するプローブとして p40^{phox} の PX ドメインと GST の融合リコンビナントを精製し、各種のホスフォイノシチドを含むリポソームの凍結割断レプリカを用いて QF-FRL 法における標識特異性を確かめた。出芽酵母および培養哺乳類細胞を飢餓状態またはラパマイシン処理してマクロオートファジーを誘導し、GST-PI3P を GST-p40^{phox}-PX、抗 GST 抗体、金コロイド結合 protein A の 3 段階法で標識し、電子顕微鏡観察して、オートファゴソーム、オートファジー小体、液胞などにおける分布を定量的に解析した。酵母における特異な分布をもたらず機序を解析するため PI3P 分解酵素を欠損する変異体についても解析した。

(3) アルブミンプロモータにより Cre recombinase を発現するマウスと UBXD8 exon1 配列を loxP 配列で挟むように操作したマウスを交配させ、肝細胞特異的に UBXD8 を欠損するマウス (UBXD8-LKO) を作出した。UBXD8-LKO マウスと対照マウス (WT) を通常食あるいは高脂肪食給餌下に 30 週齢まで飼育し、表現型を比較、解析した。それぞれのマウスから初代培養肝細胞についても解析した。

4. 研究成果

(1) propargylcholine はコリンと全く同じメカニズムで出芽酵母に取り込まれること、propargylcholine が細胞増殖に影響を与えないこと、QF-FRL 法による標識は propargylcholine 投与およびクリック反応依存性に起こることを確認した。得られた標識は SM を欠く出芽酵母ではほぼ PC だけを反映し、また哺乳類細胞でも大半は PC に由来する。出芽酵母の細胞内オルガネラ膜の細胞質側膜葉と非細胞質側 (内腔側) 膜葉の標識強度を定量的に解析した結果、内核膜、外核膜、小胞体膜、ミトコンドリア内膜・外膜、液胞膜では細胞質側・非細胞質側間に有意差はなく、PC は対称性に存在することが分かった。しかしゴルジ膜では非細胞質側よりも細胞質側膜葉の標識強度が有意に高く、さらに細胞膜では標識はほぼ細胞質側に局限して観察された。一方、培養哺乳類細胞の細胞膜では、Huh7 細胞 (ヒト肝癌細胞由来)、ヒト線維芽細胞とも、細胞質側と非細胞質側膜葉の標識強度はほぼ同じであった。ヒト赤血球膜では、PC の大半が非細胞質側膜葉に存在するような非対称性分布を取ることが知られているが、今回の結果は酵母、有核哺乳類細胞の細胞膜では全く違う分布を示すことを明らかにした。特に酵母細胞の細胞膜の結果は、スフィンゴ脂質を非常に多く含む時にゲル相の状態を示す特性とも関連する

と考えられた。また今回の方法では凍結割断レプリカが生体膜を物理的に安定的に保持できることを改めて示し、様々な化学反応との組み合わせが可能となることを示唆した。(2) 通常条件の出芽酵母では、PI3P は液胞膜の細胞質側膜葉にほぼ局限して存在した。マクロオートファジーを誘導すると、PI3P はオートファゴソームの外膜、内膜およびオートファジー小体に強く見られるようになった。オートファゴソーム、オートファジー小体ともに PI3P は細胞質側膜葉よりも閉鎖空間側膜葉 (2 枚のオートファゴソーム膜の間にある閉鎖空間に面した側) により多く存在した。一方、哺乳類細胞ではオートファゴソーム膜の PI3P は細胞質側膜葉に局限し、酵母と対照的な分布を示した。酵母オートファゴソームの PI3P の非対称性分布は、細胞質に存在する 2 つの PI3P 脱リン酸化酵素を欠損させた変異株では消失し、もともと対称性に存在する PI3P のうち、細胞質側膜葉の PI3P が分解されることによって非対称性分布が完成すると推測された。酵母オートファゴソームのように細胞質に面していない側の膜葉の脂質分布については、凍結超薄切片標識法や GFP 結合プローブ発現法など、他の方法で解析することは難しく、QF-FRL 法での解析が極めて有効であることが示された。オートファゴソーム閉鎖空間側に PI3P が生じる機構に関しては、フリッパーゼによる輸送、膜新生過程での内在化などの可能性がありうるが、現在のところ全く不明であり、今後の検討が必要である。今回の結果は酵母と哺乳類細胞のオートファジー膜形成の過程に大きな違いがあることを示すものであり、オートファジーの分子機構の解析において重要な意味を持つ。

(3) 通常食給餌下に飼育した場合には WT と UBXD8-LKO の間に大きな差は見られなかったが、高脂肪食給餌を行った UBXD8-LKO では、WT と比較して次のような差が認められた。血中トリグリセリド濃度、VLDL 濃度の低下、VLDL 中のトリグリセリド・コレステロール比の低下、in vivo でのトリグリセリド分泌低下、初代培養肝細胞の Apolipoprotein B 分泌低下、門脈周囲の大滴性脂肪肝、初代培養肝細胞での ApoB-crescent (脂肪滴と小胞体の融合構造で、脂質付加後の Apolipoprotein B 貯留によって形成される構造) 出現。これらの結果はこれまで培養細胞を用いた実験で観察された現象がマウス体内でも起こることを示した。すなわち、肝細胞での UBXD8 の欠損が脂質付加後の Apolipoprotein B の分解過程を阻害すること、その結果として脂肪滴・小胞体界面に蓄積した異常な Apolipoprotein B により正常な脂質付加過程が障害され、その結果として VLDL 分泌が低下したことを示唆する。門脈周囲の大滴性脂肪肝はヒトでも一部の疾患で見られる現象であり、今回の結果はそれら疾患の病態解明にも資すると期待される。

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 13 件)

1. Takatori S, Fujimoto T: Microscopy of membrane lipids - how precisely can we define their distribution? Essays Biochem, in press 査読有
2. Cheng J, Fujita A, Yamamoto H, Tatematsu T, Kakuta S, Obara K, Ohsumi Y, Fujimoto T: Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries. Nat Commun, 5, 3207, 2014 査読有 謝辞あり
3. Iyoshi S, Cheng J, Tatematsu T, Takatori S, Taki M, Yamamoto Y, Salic A, Fujimoto T: Asymmetrical distribution of choline phospholipids revealed by click chemistry and freeze-fracture electron microscopy. ACS Chem Biol, doi: 10.1021/cb500558n, 2014 査読有 謝辞あり
4. Chen Y, Ding Y, Yang L, Fujimoto T, et al (34人中 31 番目): Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in the *Rhodococcus opacus* PD630. Nucleic Acids Res, 42, 1052-1064, 2014 査読有
5. Takatori S, Mesman, R, Fujimoto T: Microscopic methods to observe the distribution of lipids in the cellular membrane. Biochemistry 53, 639-653, 2014 査読有 謝辞あり
6. Yamamura T, Ohsaki Y, Suzuki M, Shinohara Y, Tatematsu T, Cheng J, Okada M, Ohmiya N, Hirooka Y, Goto H, Fujimoto T: Inhibition of NPC1L1 by ezetimibe activates autophagy in human hepatocyte and reduces mutant α 1-antitrypsin Z deposition. Hepatology, 59, 1591-1599, 2014 査読有 謝辞あり
7. 高鳥翔、藤本豊士: 生体膜脂質の局在可視化法. 生化学 86, 5-17, 2014 査読無
8. Ohsaki Y, Suzuki M, Fujimoto T: Open questions in lipid droplet biology. Chem Biol, 21, 86-96, 2014 査読有 謝辞あり
9. Fujimoto T, Ohsaki Y, Suzuki M, Cheng J: Imaging lipid droplets by electron microscopy. Methods Cell Biol, 116C, 227-251, 2013 査読無
10. Suzuki M, Iio Y, Saito N, Fujimoto T: Protein kinase C η is targeted to lipid droplets. Histochem Cell Biol, 130, 505-511, 2013 査読有
11. Suzuki M, Shinohara Y, Fujimoto T: Histochemical detection of lipid droplets in cultured cells. Methods Mol Biol, 931, 483-491, 2013 査読無
12. Fujita A, Fujimoto T, Sakurai-Ozato N, Suzuki H: A method for efficient observation of intracellular membranes of monolayer culture cells by quick-freeze and freeze-fracture electron microscopy. J Electron Microsc, 61, 441-446, 2012 査読有
13. Fujimoto T, Fukazawa Y: Electron microscopy of membrane lipids, GCK Roberts (eds.), Encyclopedia of Biophysics, DOI 10.1007/978-3-642-16712-6, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012 査読無

[学会発表](計 6 件)

1. Fujimoto T: Nanoscale analysis of membrane domains, Freiburg-Adelaide-Nagoya Retreat, Adelaide, Australia, 2014年9月24日 招待講演
2. Fujimoto T: Electron microscopy for the nanoscale analysis of membrane lipid distribution, SciLifeLab The Svedberg seminar series, Uppsala, Sweden, 2014年9月15日 招待講演
3. Fujimoto T: Distribution of membrane lipids observed by quick-freezing/freeze-fracture replica labeling electron microscopy. The 18th International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, 2014年9月6-12日 招待講演
4. Fujimoto T: Analysis of membrane lipids by electron microscopy. XXIII International Symposium on Morphological Sciences, 新潟市中央区万代島, 新潟コンベンションセンター 2013年9月10-13日 招待講演
5. Fujimoto T: Nanoscale distribution of membrane lipids observed by electron microscopy. 47th Symposium of The Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry, Olsztyn, Poland, 2013年9月4-6日 招待講演

[その他]

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科・分子細胞学

ホームページ

(<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index-j.html>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50115929

(2)研究分担者

大崎 雄樹 (OHSAKI YUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 00378027

鈴木 倫毅 (SUZUKI MICHITAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 80456649