

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657131

研究課題名(和文)細胞の脂質量を維持する仕組みの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms involved in the regulation of the amount of cellular lipids

研究代表者

池ノ内 順一(Ikenouchi, Junichi)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10500051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は必要に応じて細胞を構成する膜脂質の量を調節する必要がある。一方、細胞膜を構成する脂質は数千種類存在することが知られており、その代謝経路は非常に複雑である。多くの脂質分子が存在する中、特にどの脂質分子種の合成のステップが律速段階となり、細胞の全脂質合成量の制御がなされているか、について、これまで全く明らかになっていない。本研究により、細胞が脂質量を増大させるときにダイアシルグリセロールの合成量を増加させることで調節している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The amount of cellular lipids need to be accurately controlled. The membranes of mammalian cells contain several thousands of different phospholipid species and their metabolic pathways are very complicated. In this research proposal, I aimed to clarify the rate-determining steps of these metabolic network of phospholipid species in the regulation of the amount of cellular lipids. I revealed that the biosynthesis of diacylglycerol is highly up-regulated when the total amount of cellular lipids is increased.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞膜脂質 脂質量 リン脂質 脂質代謝酵素 FANTOM4

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は、細胞表面に存在する形質膜と細胞小器官を形成する細胞内膜から構成される。これら細胞膜を構成する主な脂質分子は、リン脂質である。リン脂質には極性基や脂肪酸鎖の多様な組み合わせから数千種類も多様性が存在することが知られている。

このような多様なリン脂質であるが、それらの合成と分解は独立に行われるものではなく、極性基の置換、脂肪酸鎖の置換、リモデリングなどによってお互いの代謝は密接に関連している。

体を構成する様々な細胞には、細胞内膜の発達したリン脂質量の多い細胞が存在する。このような細胞の種類の違いに応じてリン脂質の量が異なるメカニズムは全く明らかになっていない。本研究では、細胞のリン脂質量がどのようなメカニズムで決められているかについて明らかにしようと考えた。

本研究提案では THP-1 細胞を対象として研究を行った。THP-1 細胞は単球系の培養細胞であり、先行研究においてホルボールエステル的一种である TPA で処理すること、24 時間後に一回細胞分裂を行い、48 時間後にはマクロファージ様の性質を持つ細胞に分化することが知られている。分化に伴い、形態が変化し、特に小胞体やゴルジ体などの細胞内膜構造が顕著に増加することが知られている。

2009 年に理化学研究所が中心となり THP-1 細胞の分化過程において変動する遺伝子とプロモーター領域について詳細な解析結果が FANTOM4 として報告された。研究代表者は、本研究提案の着想段階において、このデータベースの中の脂質代謝に関わる酵素群に着目することにより、細胞内膜の増加を可能にする遺伝子群を同定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

私たちの体を構成する様々な細胞のなかには、形質細胞やマクロファージなどの細胞内膜の非常に多い細胞が存在する。従って、細胞は、その種類に応じて、細胞を構成する膜脂質量を調節し、恒常性を維持する必要がある。一方、細胞膜を構成する脂質は数千種類存在することが知られており、その代謝経路は非常に複雑である。多くの脂質分子が存在する中、リン脂質全体の中でも特にどの脂質分子種の合成のステップが律速段階となり、細胞の全脂質合成量の制御がなされているか、について、これまで全く明らかになっていない。そこで本研究提案では、細胞が「脂質分子の需要と供給」をどのようにして感知し、どのような分子機構により、細胞内の全脂質分子の合成量を調節しているかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の遂行に当たり、以下の 2 つの方法によって THP-1 細胞の分化時の脂質代謝の変化を解析した。

FANTOM4 データベースを活用した *in silico* 解析

THP-1 細胞の TPA によるマクロファージへの分化誘導は、幸いにも遺伝子レベルでの研究リソースが非常に整備されている。特に、2009 年に発表された理化学研究所らにより行われた FANTOM4 では、THP-1 の分化誘導の際の全遺伝子の発現量の詳細な時間変化と転写開始点やプロモーター活性の変化がデータベース化されている。

例えば 1-acyl-Glycerol-3-phosphate からホスファチジン酸というリン脂質を作る酵素ファミリーの一つ (AGPAT9) の THP-1 細胞の分化過程における遺伝子発現量の変化を FANTOM4 データベースを用いて調べると、分化初期にはほとんど発現していないが、TPA 処理後、12 時間後に発現がピークとなり、分化後は安定して発現していることがわかる。

このように既知の脂質代謝酵素の THP-1 細胞の分化時における発現パターンを網羅的に調べて、THP-1 細胞の分化前後における脂質代謝酵素の遺伝子発現が顕著に変化する遺伝子群をピックアップし、KEGG のパスウェイデータベースを用いて *in silico* において、どの脂質の代謝経路の変化が顕著であるかについてマッピングを行った。

脂質量の変化の解析

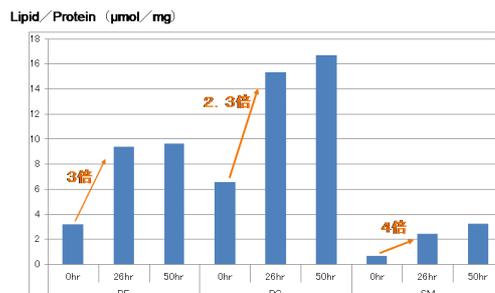
THP-1 細胞は、TPA で処理することにより、細胞内膜の発達したマクロファージに分化する。この分化過程において、動物細胞において存在量の多い代表的なリン脂質であるホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンの 3 種類について、タンパク質 (mg) 当りの脂質量 (μmol) の割合の変化を、薄層クロマトグラフィとモリブデン発色を用いたリン脂質量により解析した。

4. 研究成果

まず、THP-1 細胞が TPA 処理による細胞の分化に伴って、細胞内膜が増大しているかを調べる目的で、小胞体のマーカータンパク質である Calnexin に対する抗体を用いて蛍光抗体法および Western Blot によって分化前後での局在や量の増減の変化を調べた。その結果、TPA 処理によって確かに小胞体が増加していることを確認した。

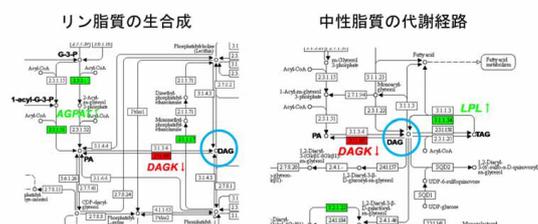
つぎに、THP-1 細胞の分化に伴って、主なリン脂質であるスフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンのリン脂質量が増加しているかを

調べた。TPA 処理による分化前および分化後の状態の THP-1 細胞から Bligh and Dyer 法によってリン脂質画分を抽出して、薄層クロマトグラフィによって分離をした。次に、プリムリン発色によってそれぞれのリン脂質のバンドを同定し、薄層のシリカを掻きとってそこから再度脂質を抽出した。次に、抽出した脂質をモリブデン発色法を用いて無機リンの濃度を算出して細胞内に存在するリン脂質の量を求めた。その結果を以下に示す。



TPA を 24 時間処理した細胞と 48 時間処理した細胞では、リン脂質量の変化は有意に変化しなかったのに対して、分化前（未処理）の細胞と 24 時間 TPA で処理した細胞では、顕著にリン脂質量が増大していることが明らかになった。またスフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンのいずれもが分化前に比べて、2 倍から 4 倍程度に増加することが明らかになった。

次に、FANTOM4 を利用して、THP-1 細胞の分化前後における脂質代謝酵素の遺伝子発現が顕著に変化する遺伝子群をピックアップし、KEGG のパスウェイデータベースを用いて in silico において、どの脂質の代謝経路の変化が顕著であるかについてマッピングを行った。代謝パスウェイ解析において、THP-1 細胞の 0 時間と 24 時間における脂質代謝酵素の発現量の変化をマッピングした結果を以下の図に示す。図の中の緑色の酵素はマクロファージへの分化に伴い発現量が 2 倍以上に増加している生合成過程、赤色の酵素は発現量が 2 分の 1 以下に減少している生合成過程である。



上述の insilico 解析から、上述の AGPAT 9 遺伝子発現の上昇 Diacyl-Glycerol (DAG) をリン酸化してホスファチジン酸をつくる DAG キナーゼ (DAGK) の発現の低下 Triacyl-Glycerol (TAG) を分解して DAG を産生するリパーゼ (LPL) の発現上昇を認め

た。これらの解析結果を纏めると、下図のようになる。非常に興味深いことに、THP-1 細胞の分化に伴い、これらの酵素は全て DAG を増やす方向に変化していることがわかる（未発表）。このことから、DAG の合成過程が細胞全体のリン脂質量の調節に重要なステップではないかという結論を得た。

現在は、TPA 処理によって遺伝子発現が大きく上昇する遺伝子群のプロモーター領域に着目して、「脂質分子の需要と供給」を感知し、リン脂質合成量を調節する分子機構の解明に取り組んでいる。

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 3 件)

Spingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli.

Ikenouchi J, Hirata M, Yonemura S, Umeda M.

J Cell Sci. 2013;126:3585-92. doi: 10.1242/jcs.122325.

Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42.

Oda Y, Otani T, Ikenouchi J, Furuse M.

J Cell Sci. 2014;1127 :4201-12. doi: 10.1242/jcs.150607.

EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells.

Ohoka A, Kajita M, Ikenouchi J, Yako Y, Kitamoto S, Kon S, Ikegawa M, Shimada T, Ishikawa S, Fujita Y.

J Cell Sci. 2015;128:781-9. doi: 10.1242/jcs.163113.

(学会発表)(計 3 件)

池ノ内順一

第 65 回日本細胞生物学会大会

「Spingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli」(口頭発表)

2013 年 6 月 21 日 名古屋

池ノ内順一

第 87 回日本生化学会大会 (招待講演)

「細胞膜脂質による微絨毛形成の制御機構」

2014 年 10 月 17 日 京都

池ノ内順一

日本薬学会第 135 年会 (招待講演)

「上皮細胞のバリア機能の人為的制御に向

けて」
2015年3月27日 神戸

〔図書〕(計2件)

池ノ内 順一
「上皮細胞の極性形成とリン脂質」
医学のあゆみ「生命を支える脂質 最新の研究と臨床」, 248巻13号 2014年

梅田真郷(分担執筆:池ノ内順一)
「生体膜の分子機構 リピッドワールドが先導する生命科学」化学同人 2014年

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称:タイトジャンクション形成促進剤
発明者:池ノ内順一、塩見僚
権利者:国立大学法人 九州大学
種類:特許
番号:特願 2014-083836
出願年月日:2014年4月15日
国内外の別:国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~ikenouchi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
池ノ内 順一(JUNICHI IKENOUCHI)
九州大学・理学研究院・准教授
研究者番号:10500051

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: