

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657141

研究課題名(和文)小胞体MAM構造を介した脂肪滴とペルオキシソームの関連

研究課題名(英文)Relationship between lipid droplets and peroxisomes through the mitochondria-associated ER membrane

研究代表者

多賀谷 光男 (TAGAYA, MITSUO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30179569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体サブドメインの一つであるMAM (mitochondria-associated membrane)が、脂肪滴とペルオキシソームの形成に関与するかどうかを調べた。脂肪滴形成は、syntaxin17などのMAM構築タンパク質の発現抑制によって抑制された。また、Rab32も脂肪滴形成に貢献していることが示唆された。Sec16Bの発現抑制は、ある種の細胞では脂肪滴形成を促し、ペルオキシソームを伸長させたが、別の細胞では脂肪滴形成を抑制し、ペルオキシソームは短くなった。以上の結果より、脂肪滴形成においてはMAMが重要な働きをし、また脂肪滴形成とペルオキシソーム形成には連携があることが示された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether the MAM (mitochondria-associated membrane), a subdomain of the endoplasmic reticulum, participates in lipid droplet formation and peroxisome biogenesis. Lipid droplet formation was suppressed by knockdown of MAM-organizing proteins, such as syntaxin17. Rab32 may also contribute to lipid droplet formation. Depletion of Sec16B caused lipid droplet formation and elongation of peroxisomes in a certain cell type, but suppressed lipid droplet formation and shortened peroxisomes in another type of cells. The data suggest that the MAM has an important role in lipid droplet formation, and that there is an intimate relation between lipid droplet formation and peroxisome biogenesis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞体 ミトコンドリア ペルオキシソーム 脂肪滴 Syntaxin 17 Sec16B

## 1. 研究開始当初の背景

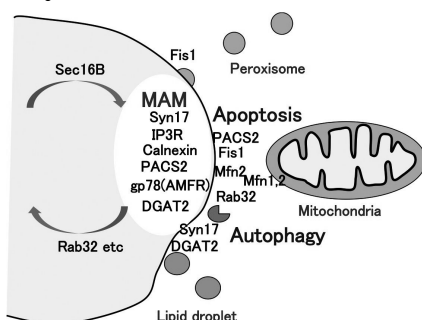
細胞機能を維持するために、真核細胞内の様々なオルガネラは独自の機能を発揮しながらも相互に連携して働く。しかしながら、オルガネラ間連携を支える分子機構はほとんどわかっていない。小胞体は細胞全体に広がる膜構造であり、いくつかのサブドメインをもち、種々のオルガネラと接している。MAM (mitochondria-associated membrane) もサブドメインの一つであり、脂質の合成とミトコンドリアへの輸送、小胞体-ミトコンドリア間での  $Ca^{2+}$  の移動などを司る。

研究代表者の多賀谷は、小胞体に存在する syntaxin17 (Syn17) が MAM に局在し、その発現抑制によって脂肪滴形成が抑制されることを見いだした。一方、研究分担者の谷らは、分泌経路における小胞輸送に関与すると考えられていた Sec16B が、ペルオキシソームの de novo 合成に関与することを見いだした (Yonekawa et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 12746)。近年、ペルオキシソームは「小胞体から de novo に合成されるオルガネラである」という概念が確立しつつあり、Sec16B は世界で初めて同定された小胞体に局在するペルオキシソーム de novo 合成因子である。興味深いことに、Sec16B の発現を抑制すると脂肪滴形成が起こる。この時、Syn17 やミトコンドリア分裂因子として知られている Fis1 の局在がやや変化する。これらの結果は、Sec16B が Syn17 と Fis1 の局在を調節することで MAM の形成と機能を調節し、MAM の機能が損なわれると抑制が解除されて脂肪滴が形成されるという可能性を示唆する。Syn17 は膜融合装置 (SNARE)、Fis1 は分裂装置であるので、これらのタンパク質が膜融合と分裂を介して小胞体上の MAM の構築またはその調節を担っている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

上述した研究成果から、申請者らは以下の仮説を立てた (図参照)。(1) ペルオキシソーム膜の de novo 合成と脂肪滴の合成は、小胞体のミトコンドリア接触領域 (MAM) で起こり、互いに関連している。(2) これらの過程に、syntaxin17 (Syn17: MAM に存在する SNARE) や Fis1 (ミトコンドリアおよびペルオキシソームの分裂因子) が関与し、またこれらのタンパク質の局在を Sec16B が調節している。

本研究ではこの仮説の検証を行うことを目指した。



## 3. 研究の方法

### (1) 試薬および抗体

Syn17 抗体を作製するために、大腸菌で GST-Syn17 を発現・精製し、ウサギに免疫した。抗体は、抗原カラムを用いてアフィニティ精製した。他の抗体は専ら市販品を用いた。

### (2) 細胞培養とタンパク質発現抑制

培養細胞は、HeLa 細胞 (培地にオレイン酸を添加して脂肪滴形成を誘導) や、予め脂肪滴を蓄積している HepG2 細胞を用いた。分化実験には NIH3T3-L1 を使い、分化培地中で脂肪細胞へと分化させた。RNAi は合成オリゴ RNA (siRNA) を用いて行った。複数の siRNA を用いるか、あるいは siRNA 耐性の cDNA を発現させて、発現抑制の効果が特異的であることを検証した。

### (3) 顕微鏡による解析

蛍光顕微鏡解析にはオリンパス fluoview 300 あるいは 1000 を用いた。

### (4) Proximity Ligation Assay (PLA)

Olink Bioscience より購入したキットを用いた。PLA では、2つのタンパク質が 30-40nm 以内に存在する場合に蛍光シグナルとして検出される。

## 4. 研究成果

(1) Syn17 の発現を RNAi 法によって抑制すると、HeLa 細胞における脂肪滴形成が抑制され、HepG2 細胞では脂肪滴が減少した。この減少は siRNA 耐性の Syn17 の発現によって回復した。HeLa 細胞における脂肪滴形成の抑制は、MAM の構築を司る PACS2 の発現抑制によっても起こったが、MAM とミトコンドリアの連携 (繫留) を司る mitofusin2 の発現抑制では起こらなかった。これらの結果は、脂肪滴形成には MAM が関与するが、MAM-ミトコンドリアの連携は必ずしも必要ではないことを示唆している。

(2) MAM 機能は、低分子量 GTPase である Rab32 によっても調節されていることが知られている。PLA 実験から、Syn17 と Rab32 が近接していることが明らかとなった。また Rab32 の発現を抑制すると、脂肪滴の成長が抑制されて小さな脂肪滴が蓄積した。

(3) マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化に伴い Syn17 の発現量が 5 倍程度上昇した。また Syn17 の発現を抑制すると脂肪細胞への分化が抑制された。

(4) Sec16B の発現抑制は、ペルオキシソーム膜タンパク質 (Pex16 および Pex3) のペルオキシソームへの輸送を阻害し、また脂肪滴形成を誘導するが、すべてのペルオキシソーム膜タンパク質の輸送が阻害されるわけではなく、また細胞種によっては脂肪滴形成を阻害することが判明した。

(5) HeLa 細胞では、Sec16B の発現抑制によってペルオキシソームは伸長したが、他の細胞ではむしろ短くなる傾向が見られた。

以上の結果より、脂肪滴形成においてはMAMが重要な働きをしていることが判明した。また、脂肪滴形成とペルオキシソーム形成には連携があることが確認された。その分子機構については今後の研究課題である。

#### 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 8 件)

1. Tagaya, M., Arasaki, K., Inoue, H., and Kimura, H. (2014) Moonlighting functions of the NRZ (mammalian Ds11) complex. *Front. Cell Develop. Biol.* in press. 査読有  
doi:10.3389/fcell.2014.00025
2. Baba, T., Kashiwagi, Y., Arimitsu, N., Kogure, T., Edo, A., Maruyama, T., Nakao, K., Nakanishi, H., Kinoshita, M., Frohman, M.A., Yamamoto, A., and Tani, K. (2014) Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A<sub>1</sub> regulates mitochondrial dynamics. *J. Biol. Chem.* **289**, 11497-11511. 査読有  
doi:10.1074/jbc.M113.531921
3. 多賀谷光男, 若菜裕一, 川端美緒 (2014) MAMの新たな機能と関連疾患、細胞工学 **33** (4) 学研メディカル秀潤社、436-442. 査読無
4. Wakana, Y., Villeneuve, J., van Galen, J., Cruz-Garcia, D., Tagaya, M., and Malhotra, V. (2013) Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. *J. Cell Biol.* **202**, 241-250. 査読有  
doi:10.1083/jcb.201303163
5. Miyazaki, K., Wakana, Y., Noda, C., Arasaki, K., Furuno, A., and Tagaya, M. (2012) Contribution of the long form of syntaxin 5 to the organization of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **125**, 5658-5666. 査読有  
doi:10.1242/jcs.105304
6. 多賀谷光男, 谷佳津子, 新崎恒平 (2013) オルガネラ接触部位：多様な機能と疾患、実験医学 **31** (11) 羊土社、1791-1797. 査読無
7. Steuble, M., Diep, T. M., Schätzle, P., Ludwig, A., Tagaya, M., Kunz, B., and Sonderegger, P. (2012) Calsyntenin-1 shelters APP from proteolytic processing during anterograde axonal transport. *Biol. Open* **1**, 761-774. 査読有  
doi:10.1242/bio.20121578
8. Tani, K., Kogure, T., and Inoue, H. (2012) The intracellular phospholipase

A<sub>1</sub> protein family. *Biomol. Concepts* **3**, 471-478. 査読有  
doi:10.1515/bmc-2012-0014

[学会発表](計 7 件)

1. 木村葉那, 茂刈寛史, 新崎恒平, 谷佳津子, 多賀谷光男, 脂肪滴形成および3T3-L1の脂肪細胞への分化におけるsyntaxin 17の関与、第66回日本細胞生物学会大会、2014/6、奈良
2. 新崎恒平, 多賀谷光男, 小胞の繫留に關与するCATCHRファミリータンパク質間の連携：RINT-1はCOG複合体と協調してエンドソームからトランスゴルジ・ネットワークへの小胞輸送を調節する、第36回日本分子生物学会年会、2013/12、神戸
3. 多賀谷光男, 新崎恒平, 小胞体とミトコンドリアの接触部位におけるsyntaxin17の役割、第86回日本生化学会大会、2013/9、横浜
4. 馬場崇, 江戸歩実, 小笠原裕太, 山本章嗣, 谷佳津子, Phosphatidic acid-preferring phospholipase A<sub>1</sub>(PA-PLA<sub>1</sub>)/DDHD1はミトコンドリアの形態形成に關与する、第86回日本生化学会大会、2013/9、横浜
5. 野田睦乃, 松下充, 新崎恒平, 多賀谷光男, VIMPは微小管結合タンパク質との相互作用を介して小胞体の形態を調整する、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
6. 新崎恒平, 川端美緒, Derek Toomer, 多賀谷光男, Craig Roy, レジオネラエフェクターであるDrrAはER小胞とLCV膜との融合を促進する、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡
7. 清水浩顕, 茂刈寛史, 西田直貴, 新崎恒平, 多賀谷光男, syntaxin 17はmitochondria-associated membrane(MAM)に局在し、脂肪滴の形成に關与する、第85回日本生化学会大会、2012/12、福岡

[図書](計 1 件)

1. Tani, K., Baba, T., and Inoue, K. (2014) Chapter 5 The Structures and Functions of Intracellular Phospholipase A<sub>1</sub> Family Proteins, in "Phospholipases in Health and Disease", Eds. Tappia, P. S, and Dhalla, N. S. Springer Science+Business Media New York 2014 p. 87-99.  
doi:10.1007/978-1-4939-0464-8\_5

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

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

取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

多賀谷 光男 ( TAGAYA MITSUO )  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：30179569

##### (2) 研究分担者

谷 佳津子 ( TANI KATSUKO )  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：40266896

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：