

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440053

研究課題名(和文) 脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の生理的役割およびその疾患モデルの解析

研究課題名(英文) Studies on the physiological roles and disease models of lipid droplets and lipid droplet-binding proteins

研究代表者

大隅 隆 (OSUMI, Takashi)

兵庫県立大学・生命科学研究科・特任教授

研究者番号：50111787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪滴は、脂肪を細胞内に安定に保持し、必要に応じて分解させることにより、生体のエネルギー代謝と脂質代謝の調節に重要な機能を果たす。脂肪滴結合タンパク質のうち、ペリリピンファミリータンパク質(Plin1-5)は、細胞内リパーゼの作用を制御することによって、脂肪分解の調節において中心的な役割を果たしており、その機能の解明は多くの脂質代謝異常疾患のメカニズムを理解する上で重要である。本研究では、Plin5が糖尿病性心筋症を悪化させるメカニズム、リパーゼに対するPlin5の阻害作用、肝再生および精子形成における脂肪滴とPlinタンパク質の機能を調べた。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplets (LDs) stably store lipids in living cells in the form of neutral lipids, such as triacylglycerol (TG). LDs play important roles in the regulation of energy and lipid metabolism, through permitting TG to be hydrolyzed by lipases depending on energy demand. Among LD-binding proteins, Plin family proteins (Plin1-5) play central roles in the regulation of cellular lipolysis, by limiting the actions of lipases. Hence, it is important to solve the functions of Plin proteins, for understanding the pathology of various diseases involving abnormal lipid metabolism. In this study, we investigated the mechanism by which Plin5 deteriorates diabetic cardiomyopathy and inhibitory function of Plin5 against lipases. Roles of LDs and Plin proteins in liver regeneration and spermatogenesis were also studied.

研究分野：生化学

キーワード：脂肪滴 ペリリピン リパーゼ 心臓 糖尿病 心筋症 肝再生 精子形成

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴は、トリグリセリド(TG)を主成分とする脂質コアがリン脂質一重層によって囲まれ、その表面に種々のタンパク質が結合した構造体である。脂肪滴は単なる脂肪の蓄積部位ではなく、活発な代謝を営む機能的オルガネラである。脂肪滴はほぼすべての細胞に存在するが、脂肪細胞の巨大な脂肪滴が大量のTGを長期的に貯蔵するのに対し、脂肪細胞以外の細胞の脂肪滴ははるかに小さく、わずかなTGを短期的に保持しているに過ぎない。非脂肪組織の脂肪滴の役割は明らかではなく、脂肪酸由来の生理活性脂質による脂質毒性を回避するため、脂肪酸をTGとして隔離するという役割が想定されていたが、立証されていなかった。

脂肪滴の性質を規定するのは表面に結合しているタンパク質と考えられ、特にペリリピンファミリー(PATファミリー)の役割が注目される。このファミリーはPlin1~5の5種類のタンパク質からなる。Plin1(従来のペリリピン)は脂肪細胞で特に強く発現し、TGの蓄積と、カテコールアミン刺激に応答した脂肪分解の両方において、中心的な役割を担っている。Plin2(ADRP)、Plin3(Tip47)、およびPlin4(S3-12)については、いずれも脂肪滴をリパーゼによる攻撃から保護する機能が示唆されているが、明確にはなっていない。これに対して我々がMyocardial lipid droplet protein(MLDP)の名で最初に報告したPlin5は、きわめて高い脂肪酸酸化活性を特徴とする心臓で、特に高度に発現している。我々はPlin5を、心臓の脂肪滴の性質を規定するタンパク質と推定した¹⁾。

このことを検証するために、Plin5のノックアウト(Plin5-KO)マウスを作出した。驚いたことにPlin5-KOマウスでは心臓に脂肪滴が観察されず、それを反映して心臓のTGと脂肪酸の蓄積も顕著に減少していた。心臓の代表的リパーゼであるAdipocyte triglyceride lipase(ATGL)などの一群のリパーゼに対する阻害剤を、心臓に短時間灌流すると、脂肪滴は回復した。また培養細胞にPlin5とATGLを共発現させると脂肪滴は維持されたが、Plin2とATGLの共発現では脂肪滴は著しく縮退した。したがって、Plin5はリパーゼの作用を制限することによって心臓の脂肪滴を維持しており、この役割はPlin2など他のタンパク質では置き換えられないと考えられる。

このマウスは心臓の脂肪滴の生理的意義を調べるのに適している。心筋初代培養細胞を用いて脂肪酸代謝活性を測定したところ、Plin5-KOマウスの心筋細胞では脂肪酸酸化が亢進していた。これが原因となって、Plin5-KOマウスの心臓では活性酸素種(ROS)が過剰に産生される可能性が考えられ、実際にROS産生量の指標となる過酸化脂質の蓄積が野生型マウスに比べて増加し

ていた。また心エコー検査において、Plin5-KOマウスでは加齢による心機能の低下が認められた。一方、抗酸化剤N-アセチルシステイン(NAC)の長期投与により、過酸化脂質量の増加は見られなくなり、それと共に加齢時の心機能低下も解消された。以上の結果から、心臓の脂肪滴は脂肪酸をTGとして隔離することによって脂肪酸酸化を適切なレベルに維持し、それによって酸化ストレスによる心機能の低下を防止していることが示された²⁾。これらの結果は、非脂肪組織における脂肪滴の生理的意義を初めて明確に示したものである。

糖尿病や肥満などの病的条件下では、心臓へのTGの過剰蓄積が心筋症の引き金となる。薬剤によってI型糖尿病を誘発したPlin5-KOマウスでは、野生型に比べて心臓のTG蓄積が劇的に減少していた。また野生型マウスで見られた糖尿病による心機能低下が、Plin5-KOマウスでは観察されなかった。Plin5-KOマウスが糖尿病による心機能低下を免れるしくみを明らかにすることにより、心臓への脂質過剰蓄積を経て糖尿病性心筋症に至る機序について、大きな手掛かりが得られると期待される。

心臓の主要なリパーゼの一つであるATGLのKOマウスは、心臓に著しいTG蓄積を呈し、心不全により生後20週頃までに死亡することが知られている³⁾。我々の実験結果は、Plin5がATGLに対する障壁として作用することを示しているが、ATGL-KOマウス的心臓には60-70%のリパーゼ活性が残存しており、Plin5はそれらに対する障壁としても機能している可能性がある。異なるリパーゼ分子種の間には機能分担があることが提唱されているので、Plin5がいずれのリパーゼを阻害するのかが、脂質代謝調節において重要な意味をもつ。

Plin5は心臓以外にも、骨格筋や肝臓など、酸化的代謝が盛んな器官に発現している。このうち肝臓は傷害からの再生能がきわめて高い器官であり、再生時には一時的に脂肪滴が発達すること、脂肪酸酸化によって得られるエネルギーが再生に重要であることが報告されている。この過程でPlin5がどのような役割を果たしているかは、興味深い問題である。

精巣や副腎皮質などのステロイド産生組織では、脂肪滴に貯蔵されたコレステロールエステルが、ホルモン産生の原料として消費される。これらの組織においても、脂肪滴結合タンパク質は重要な機能をもつと考えられるが、研究は進んでいない。

非脂肪組織への脂肪の過剰蓄積は、心筋症、肝障害、糖尿病など、種々の代謝疾患を引き起こし、世界的に大きな問題となっている。このような背景のもとに、Plin5を中心として、生体における脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の機能の解析を行った。

2. 研究の目的

Plin5-KO マウスは、生理的・病的条件下における脂肪滴の機能を調べる上で好適の実験系である。非脂肪組織における脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の役割を明らかにし、脂肪の過剰蓄積による種々の疾患の理解に寄与するため、主として Plin5-KO マウスを用いて、以下の課題に取り組んだ。

(1) 脂質蓄積による糖尿病性心筋症の発症機序の解明

Plin5-KO マウスでは、糖尿病性心筋症の症状が顕著に軽減される。野生型マウスと種々の代謝パラメーターを比較することにより、Plin5-KO マウスが糖尿病による心機能低下を免れるメカニズムを明らかにし、その結果に基づいて糖尿病性心筋症の発症機序を考察する。

(2) Plin5/ATGL 二重欠損マウスの表現型解析

ATGL およびその他のリパーゼに対する Plin5 の阻害作用の生理的意義を、Plin5/ATGL 二重欠損(DKO)マウスの表現型を調べることにより解析する。ATGL-KO マウスと比べて、DKO マウスで心臓の異常が緩和されるか否かに注目し、Plin5 が ATGL のほか、いずれのリパーゼに対して障壁となるのかを明らかにする。

(3) 肝再生における Plin5 の役割の解析

四塩化炭素投与による肝傷害および部分肝切除からの肝再生の進行を野生型マウスと Plin5-KO マウスとで比較することにより、この過程における Plin5 の役割を明らかにする。

(4) 精巣における脂肪滴および脂肪滴結合タンパク質の機能の解析

精巣のライディッヒ細胞では、脂肪滴に貯蔵されたコレステロールエステルがテストステロン合成に利用され、栄養細胞であるセルトリ細胞では、貯蔵された TG が精子形成のエネルギー源として利用されると考えられる。そこで、これらの細胞における脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) 脂質蓄積による糖尿病性心筋症の発症機序の解明

野生型マウスと当研究室で作製した Plin5-KO マウスに、生後 10-14 週から 3-4 日ごとに体重 1kg 当たり 150mg のストレプトゾトシン(膵細胞を破壊することにより I 型糖尿病を誘発する薬剤)を腹腔内投与し、血糖値が 350mg/dl を超えたのを確認してから糖尿病マウスとして実験に用いた。心機能はエコー検査により測定した。マウスへの NAC の投与と過酸化脂質の定量は、以前に報告した方法²⁾により行った。各種脂質は定法に従って定量した。個々のタンパク質はウェスタンブロッティングにより、mRNA は逆

転写(RT)-PCR により定量した。

(2) Plin5/ATGL 二重欠損マウスの表現型解析

ATGL-KO マウスは、オーストリア・グラーツ大学の Zechner 教授から供与を受けた。このマウスと Plin5-KO マウスとを掛け合わせることににより、Plin5/ATGL-DKO マウスを得た。DKO マウス由来の胎仔線維芽細胞(MEF)は、定法に従って調製した。MEF への Plin5 と ATGL の強制発現は、GFP-Plin5 と Myc-ATGL の発現プラスミドを、リポフェクトアミン 2000 を用いてトランスフェクションすることにより行った。組織切片の観察は、ヘマトキシリン-エオシン(HE)染色により、また脂肪滴の観察は Oil-Red-O または Bodipy 染色により行った。各種脂質と個々のタンパク質の定量は、(1)と同様に行った。

(3) 肝再生における Plin5 の役割の解析

12-18 週齢の野生型および Plin5-KO マウスに、ミネラルオイルを用いて 10%に希釈した四塩化炭素を、体重 1kg 当たり 10ml になるように腹腔内投与することにより、肝傷害を誘発した。投与後 96 時間まで 24 時間ごとに肝臓を摘出し、実験に用いた。70%部分肝切除は、12-16 週齢の野生型および Plin5-KO マウスから、麻酔開腹下に肝中間葉と左葉を切除することによって行った。術後 2 日と 7 日のマウスから肝臓を摘出し、実験に用いた。その他の実験方法は(1)および(2)と同様である。

(4) 精巣における脂肪滴および脂肪滴結合タンパク質の機能の解析

生後 1-5 週の雄 Jcl:ICR マウスより精巣を摘出し、若年期における精巣の成熟過程を追跡した。また、9-15 週齢の成熟マウスに DNA アルキル化剤ブスルファンを体重 1kg 当たり 20mg 投与し、精子形成を阻害した後の回復過程を、投与後 4 週から 2 週ごとに 12 週まで観察した。組織の HE 染色、脂肪滴の染色、抗体染色、RT-PCR などにより、脂肪滴の大きさや数、および脂肪滴結合タンパク質の発現や分布を調べた。

4. 研究成果

(1) 脂質蓄積による糖尿病性心筋症の発症機序の解明

ストレプトゾトシン投与によって野生型および Plin5-KO マウスに I 型糖尿病を誘発し、心臓の表現型を調べた。野生型マウスでは心臓に TG の過剰蓄積が見られ、エコー診断によって心機能(心収縮率)の低下が認められたが、Plin5-KO マウスではこれらの異常は観察されなかった。この時、野生型マウスの心臓では、遊離脂肪酸と脂質中間体であるジグリセリドやセラミドが増加しており、プロテインキナーゼ C(PKC)と NADPH オキシダーゼ(NOX)の活性化、および活性酸素種(ROS)の過剰産生が見られたが、Plin5-KO ではいずれも正常であった。また抗酸化剤 NAC

の投与により、野生型マウスの異常は解消された。これらの結果から、Plin5は糖尿病時には心臓でTGと脂質中間体を増加させ、これによるPKCの活性化がNOXの活性化をもたらし、ROSの過剰産生を招くことが、最終的に心機能低下につながると考えられる。すなわち、Plin5はATGLなどのリパーゼを阻害することにより、生理的条件下では脂肪滴を維持し、過剰な脂肪酸酸化を抑えることによって、酸化ストレスから心臓を保護しているが、糖尿病時には脂肪酸のクリアランスを低下させることにより脂質中間体を蓄積させ、脂質毒性による心筋症の発症を助長すると結論された。

(2) Plin5/ATGL 二重欠損マウスの表現型解析

ATGL以外のリパーゼに対するPlin5の作用を知るため、ATGL/Plin5二重ノックアウト(DKO)マウスの心臓の表現型を調べた。Plin5とATGLを共に欠損しているDKOマウスの胎仔由来線維芽細胞にPlin5のみを強制発現させると、脂肪滴の数と大きさが増加したことから、少なくとも細胞培養条件下では、Plin5はATGL以外のリパーゼに対しても阻害効果をもつことがわかった。DKOマウス心臓では、組織のHE染色において空隙として観察される脂肪滴様の構造が、ATGL-KOマウスよりも顕著に増加していた。一方、心臓のTGと遊離脂肪酸の量もDKOマウスで増加していたが、脂肪滴様構造の増加はTGの増加をはるかに上回るものであった。この結果は、Plin5がリパーゼ阻害作用をもつにもかかわらず、ATGLと同時にノックアウトされるとかえってTG蓄積を増加させることを示すと同時に、組織染色で観察される脂肪滴様構造の中には脂肪滴以外のものも存在し、それがDKOで増加することを示唆している。最近、Plin5がカテコールアミン依存的にリン酸化され、その条件下では非リン酸化状態とは逆に、ATGLを活性化する方向に作用することが示された⁴⁾。もしリン酸化Plin5が、ATGL以外のリパーゼに対しても活性化効果をもつとすれば、それがDKOでTGが増加する原因である可能性がある。一方、脂肪滴とは異なる脂肪滴様構造の実体は明らかにできなかった。

(3) 肝再生におけるPlin5の役割の解析

四塩化炭素投与後の野生型マウスとPlin5-KOマウスについて、肝傷害マーカーである血中アラニンアミノトランスフェラーゼ値と肝組織像により肝傷害の程度を見積もったところ、いずれのマウスでも24~48時間後には著しい傷害が見られ、72~96時間後にはほぼ回復していた。肝臓内のTGは24時間後にいずれのマウスでも2倍以上に増加し、時間を追って減少したが、Plin5-KOマウスでは72時間後から96時間後にかけて、野生型マウスよりも速やかにTGが減少する傾向が見られた。また、肝再生のマーカーである増殖細胞核抗原(Proliferating Cell

Nuclear Antigen; PCNA)の発現は、野生型マウス肝臓では72時間後にピークに達したのに対し、Plin5-KOマウス肝臓では48時間後と72時間後の間にピークが見られ、Plin5-KOマウスではやや再生が早まっていると判断された。一方、部分肝切除からの肝再生については、術後7日にはいずれのマウスでも肝重量が回復していたが、術後2日ではいずれもまだわずかに回復傾向が見られるのみであった。しかし、術後2日のPlin5-KOマウスでは半数以上に肝臓PCNAの発現上昇が見られたのに対し、野生型では見られなかった。また、すべての野生型マウスに術後2日で顕著な肝臓TGの蓄積が見られたのに対し、Plin5-KOマウスではPCNAの発現の低い個体のみで肝臓のTG蓄積が見られ、PCNAレベルの高い個体ではTGは蓄積していなかった。これらの結果を合わせると、Plin5-KOマウスでは肝傷害からの再生が早まっており、これはPlin5の欠損によってTGがより早く消費されることと関連していると考えられる。

(4) 精巣における脂肪滴および脂肪滴結合タンパク質の機能の解析

まずマウス精巣におけるPlin5の発現を組織の抗体染色によって調べたところ、明確な発現が認められなかった。そこで、多産系統であるICRの野生型マウスを用い、Plin1とPlin2に関して実験を行った。精巣全体で精子形成が同調的に起こっている状態を観察するため、生後初めての精子形成に向かう若年マウスと、ブスルファン投与による精子形成障害からの回復期のマウスを用いた。若年マウスでは、精巣の成熟に伴い、テストステロン産生細胞であるライディッヒ細胞で脂肪滴が増大した。この時、大部分のPlin1とPlin2は同一細胞内でも異なる脂肪滴に存在していた。一方、ブスルファンによる精子形成障害からの回復過程では、精祖細胞の減数分裂が再開する投与後4-6週から、ライディッヒ細胞と栄養細胞であるセルトリ細胞の両方で顕著な脂肪滴増大が見られた。その後、精子細胞形成期の8週でセルトリ細胞の、精子変態期の10週ではライディッヒ細胞の、それぞれ脂肪滴が減少した。この間、ライディッヒ細胞ではPlin1とPlin2とが異なる脂肪滴に存在するのが観察され、一方、セルトリ細胞ではPlin2のみの発現が見られた。これらの結果から、精子形成過程において脂肪滴に貯蔵されたTGやコレステロールエステルが、エネルギー源やステロイドホルモンの原料として消費され、脂肪滴結合タンパク質は、それら貯蔵物質の個別の代謝に選択的に寄与している可能性がある。

引用文献

- 1) Yamaguchi, T. et al. *J. Biol. Chem.* 281, 14232-14240 (2006)
- 2) Kuramoto et al. *J. Biol. Chem.* 287, 23852-23863 (2012)

- 3) Haemmerle, G. et al. *Science* 312, 734-737 (2006)
4) Pollak, N.M. et al. *J. Biol. Chem.* 290, 1295-1306 (2015)

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7件)

Osumi, T. and Kuramoto, K.: Heart lipid droplets and lipid droplet-binding proteins: Biochemistry, physiology, and pathology. *Exp. Cell Res.* 340, 198-204 (2016) doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.031 (査読有)

Kuramoto, K., Sakai, F., Yoshinori, N., Nakamura, T.Y., Wakabayashi, S., Kojidani, T., Haraguchi, T., Hirose, F., and Osumi, T.: Deficiency of a lipid droplet protein, Perilipin 5, suppresses myocardial lipid accumulation, thereby preventing type 1 diabetes-induced heart malfunction. *Mol. Cell. Biol.* 34, 2721-2731 (2014) doi:10.1128/MCB.00133-14 (査読有)

Tanaka, T., Uozumi, S., Morito, K., Osumi, T., and Tokumura, A.: Metabolic conversion of C20 polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids to essential fatty acids. *Lipids* 49, 423-429 (2014)
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11745-014-3896-5> (査読有)

[学会発表](計11件)

酒井章衣、北沢勇也、杉本拓也、大隅隆: Analysis of the testicular lipid droplets (LDs) and LD-binding proteins in young mouse testis (若年マウス精巣における精巣脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の解析). 第36回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

倉元謙太、大隅隆: 脂肪滴結合タンパク質による脂肪滴機能の調節. 第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24日、あわぎんホール(徳島県徳島市)(招待講演)

義則奈々、倉元謙太、Rudolf Zechner、大隅隆: ATGL/Plin5-ダブルノックアウトマウスを用いた心臓における Plin5 の機能解析. 第56回日本脂質生化学会大会、2014年6月7日、近畿大学(大阪府東大阪

市)

義則奈々、倉元謙太、酒井章衣、Rudolf Zechner、大隅隆: ATGL/Plin5-ダブルノックアウトマウス的心臓における表現型解析. 第34回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

倉元謙太、酒井章衣、大隅隆: 非脂肪組織における脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の役割 Perilipin 5 ノックアウトマウス的心臓の表現型解析. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(招待講演)

魚住幸加、森戸克弥、大隅隆、田中保、徳村彰: ペルオキシソーム/ミクロソームにおける鎖長短縮/伸長反応を介した脂肪酸リモデリング. 第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大隅隆 (OSUMI, Takashi)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任教授
研究者番号: 50111787

(3)連携研究者

酒井章衣 (SAKAI, Fumie)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号: 90623629