

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：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460348

研究課題名(和文) 脂肪肝に発現する機能未知遺伝子HPD1の機能解析-脂肪蓄積の新規シグナル因子-

研究課題名(英文) Physiological function of a novel HPD1 highly expressed in fatty liver

研究代表者

松末 公彦 (MATSUSUE, KIMIHIKO)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10389364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ob/obマウスの脂肪肝において高発現している機能未知遺伝子HPD1を単離した。本研究では、HPD1の生理機能を解明するために、レンチウイルスによるHPD1ノックダウンシステムを構築した。このシステムにより、3T3-L1脂肪細胞におけるHPD1発現はおよそ80%抑制された。HPD1ノックダウン脂肪細胞を用いて抗体アレイを行ったが、顕著に発現が変化するタンパクは見出せなかった。さらに、細胞分画法によりHPD1の細胞内局在を確認したところ、HPD1はミクロソーム画分に局在した。興味深いことに、HPD1は界面活性剤によりミクロソーム画分を可溶化すると、不溶性画分に局在した。

研究成果の概要(英文)：Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-dependent gene 1 (HPD1) gene was isolated as high expression in fatty liver and unknown function. The HPD1 gene is directly regulated by PPAR. In the present study, to assess physiological function of HPD1 protein, HPD1 expression was repressed by lentivirus expressing HPD1shRNA. Infection of lentiHPD1shRNA dramatically decreased HPD1 protein by about 20% as comparison with lenticontrolshRNA. Although normal or phospho-specific antibody array was performed using lenticontrol and HPD1shRNA-infected cells, there was no significant difference between the protein or phosphorylation levels of both cells. To assess subcellular localization of HPD1 protein, 3T3-L1 adipocytes were fractionated by differential centrifugation. The result showed that the HPD1 is exclusively detected in the microsomal fraction. Interestingly, HPD1 localized in detergent-insoluble microsomal fraction.

研究分野：分子生物学

キーワード：脂肪細胞 脂肪肝 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

典型的な肥満及び2型糖尿病モデル *ob/ob* マウスの脂肪肝において発現が上昇している転写因子、peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) の欠損は、ワイルド *ob/ob* マウスが発症している重篤な脂肪肝を劇的に改善した(Matsusue *et al.* J. Clin. Invest., 2003)。この結果は、PPAR γ が脂肪肝発症に関与していることを意味する。しかしながら、PPAR γ は転写因子であるため PPAR γ 制御下で脂肪肝形成に直接関与するエフェクター因子の存在が予想された。そこで、申請者はそのエフェクター因子の網羅的な単離のため GeneChip 発現解析を行い、機能未知遺伝子 *HPD1* の単離に成功した。

これまでに我々は、*HPD1* が正常肝臓では低レベルであるものの、*ob/ob* マウスの脂肪肝においては高発現していること、PPAR γ 標的遺伝子であること、さらに、脂肪肝以外にも白色及び褐色脂肪組織に高発現していることなどを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪肝に特異的に発現する機能未知遺伝子 *HPD1* の生理機能を解明し、本遺伝子産物を介した新しい脂肪蓄積シグナルの存在を証明することである。

3. 研究の方法

(1) *HPD1* ノックダウンシステムの構築

- ・ *HPD1* shRNA を発現するレンチウイルスベクターの作製
- ・ *HPD1* を高発現している 3T3-L1 脂肪細胞に、作製したレンチウイルスを感染させ、*HPD1* 発現の抑制をタンパク及び mRNA レベルで確認

(2) ワイルド及び *HPD1* ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞から抽出されたタンパクによる抗体アレイ解析

(3) ワイルド及び *HPD1* ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞から抽出されたタンパクによるリン酸化抗体アレイ解析

(4) 3T3-L1 脂肪細胞を用いた細胞分画による *HPD1* の細胞内局在解析

- ・ 遠心分離により分画された各オルガネラを用いて、抗 *HPD1* によるウエスタンブロット
- ・ 遠心分離により分画されたミクロソーム画分を Triton-X100 処理。遠心後、可溶化画分と不溶性画分に分け、それぞれウエスタンブロット

4. 研究成果

本研究の成果を以下に要約する。

- (1) *HPD1* shRNA 発現レンチウイルスベクターによる *HPD1* 発現の抑制
予備的な検討により、効率的に *HPD1* 発現が抑制される shRNA 配列を決定し、レンチウイルスベクターを作製した。レンチウイルスは、

HPD1 を高発現している 3T3-L1 脂肪細胞に高効率でトランスフェクション出来ることが知られている。3T3-L1 脂肪細胞における *HPD1* の発現は、*HPD1* shRNA 発現レンチウイルスの感染により、コントロール shRNA に比べおよそ 80% 抑制された(図1)。

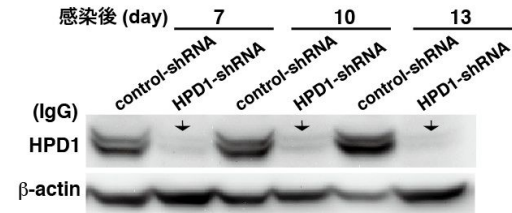


図1 *HPD1* shRNA 発現レンチウイルスは、*HPD1* の発現を効率的に抑制する。*HPD1* 抗体を用いた 3T3-L1 脂肪細胞のウエスタンブロット

この結果より、作製した *HPD1* shRNA 発現レンチウイルスは効率的に *HPD1* 発現を抑制でき、以後の機能解析の実験に使用された。

(2) ワイルド及び *HPD1* ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞によるアレイ解析

HPD1 の機能を推測するために、ワイルド及び *HPD1* ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞を用いて 2 つのアレイ解析を行った。はじめに、*HPD1* ノックダウンにより発現レベルが変化するタンパクを網羅的に同定するために、抗体アレイを行った。さらに、*HPD1* ノックダウンによりリン酸化の程度が変化するタンパクを同定するために、リン酸化抗体アレイを行った。これらの結果、いずれのアレイにおいてもワイルド及び *HPD1* ノックダウン 3T3-L1 脂肪細胞間で、明らかな変化を認めるタンパクは見出せなかった。

(3) *HPD1* は、Triton-X100 不溶性ミクロソーム画分に局在する。

機能未知タンパクの細胞内局在を明らかにすることは、その機能を解明するために重要な知見となる。はじめに、*HPD1*-GFP 融合タンパクあるいは抗 *HPD1* 抗体を用いた蛍光免疫染色を試みた。この結果、*HPD1* は、核あるいは細胞膜以外の細胞内全体に点在していた (data not shown)。次に、3T3-L1 脂肪細胞を細胞分画し、分画されたオルガネラに対して、抗 *HPD1* 抗体によるウエスタンブロットを行ったところ、*HPD1* タンパクはミクロソーム画分に局在していることを明らかにした。ミクロソーム画分には小胞体、細胞膜などの膜画分や細胞骨格などのオルガネラが共存している。そこで、ミクロソーム画分に Triton-X100 を加え膜画分を可溶化したところ、*HPD1* タンパクは細胞骨格タンパクなどがリッチに存在する Triton-X100 不溶性ミクロソーム画分に局在した (図2)。

本研究期間においては、*HPD1* の明確な生理機能を解明することは出来なかった。

しかしながら、本研究で作製されたHPD1 ノックダウンシステムは、今後の機能解析において極めて有力なツールになると思われる。

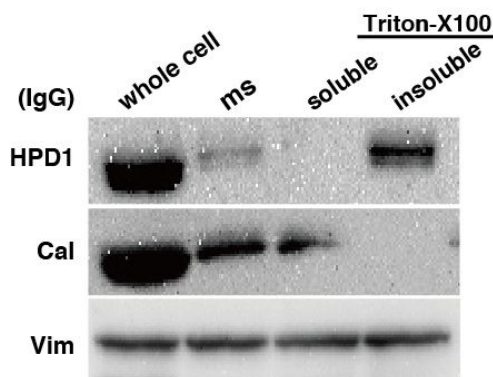


図2 HPD1は、Triton-X100不溶性画分に局在する。3T3-L1脂肪細胞からマイクロソーム画分(ms)を調製し、界面活性剤Triton-X100処理。可溶性(sol)と不溶性(insol)画分に分画後、HPD1抗体を用いたウェスタンブロット。cal: calreticulin(小胞体マーカー), Vim, vimentin.

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4件)

- Xu, M. J., Cai, Y., Wang, H., Altamirano, J., Chang, B., Bertola, A., Odena, G., Lu, J., Tanaka, N., Matsusue, K., Matsubara, T., Mukhopadhyay, P., Kimura, S., Pacher, P., Gonzalez, F. J., Bataller, R. & Gao, B. (2015) Fat-Specific Protein 27/CIDEA Promotes Development of Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans, *Gastroenterology*. 149, 1030-1041. (査読有)
 - Tagiguchi, S., Korenaga, N., Inoue, K., Sugi, E., Kataoka, Y., Matsusue, K., Futagami, K., Li, Y.-J., Kukita, T., Teramoto, N. & Iguchi, H. (2014) Involvement of CXCL14 in osteolytic bone metastasis from lung cancer., *Int J Oncol*. 44, 1316-1324. (査読有)
 - Matsusue, K., Aibara, D., Hayafuchi, R., Matsuo, K., Tagiguchi, S., Gonzalez, F. J. & Yamano, S. (2014) Hepatic PPAR γ and LXR α independently regulate lipid accumulation in the livers of genetically obese mice, *FEBS letters*. 588, 2277-2281. (査読有)
 - Aibara, D., Matsusue, K., Matsuo, K., Tagiguchi, S., Gonzalez, F. J. & Yamano, S. (2013) Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of Fatty liver., *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1766-1772. (査読有)
- [学会発表](計13件)
- 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成28年3月27日) 肝脂肪蓄積を促す LXR α による FSP27 遺伝子の発現調節機構の解析、第136年会日本薬学会、パシフィコ横浜 会議センター (横浜)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成27年11月28日) 脂肪肝形成に關与する FSP27 遺伝子の LXR α による発現制御、第32回日本薬学会九州支部大会、九州保健福祉大学 (宮崎)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成27年9月18日) 肝脂肪蓄積に關与する LXR α による FSP27 遺伝子の発現制御、フォーラム2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、神戸学院大学 (神戸)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成27年3月27日) 肝臓の脂肪蓄積における LXR α と PPAR γ シグナルとの関連性、第135年会日本薬学会、兵庫医療大学 (神戸)
 - 松尾康平, 松末公彦, 藍原大甫, 瀧口総二, 山野茂 (平成27年3月27日) 機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 3 (lpd3) の脂肪肝における細胞内局在の決定、第135年会日本薬学会、兵庫医療大学 (神戸)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成26年12月7日) 肝脂肪蓄積を促す LXR α シグナルへの PPAR γ の關与、第31回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学 (福岡)
 - 松尾康平, 松末公彦, 藍原大甫, 瀧口総二, 山野茂 (平成26年12月7日) Ob/ob マウスの脂肪肝における機能未知 liver PPAR γ -dependent gene 3 の細胞内局在解析、第31回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学 (福岡)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成26年3月30日) 成因の異なる脂肪肝モデルにおける fat-specific protein 27 遺伝子の発現解析、第134年会日本薬学会、熊本大学 (熊本)
 - 松尾康平, 松末公彦, 藍原大甫, 瀧口総二, 山野茂 (平成26年3月30日) 脂肪細胞における機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 3 (lpd3) の分化依存的な発現性、第134年会日本薬学会、熊本大学 (熊本)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 瀧口総二, 山野茂 (平成25年12月7日) 発症原因の異なる脂肪肝における fat-specific protein 27 遺伝子の発現解析、第30回日本薬学会九州支部大会、長崎国際大学 (長崎)
 - 松尾康平, 松末公彦, 藍原大甫, 瀧口総二, 山野茂 (平成25年12月7日) 脂肪細胞における機能未知遺伝子 liver PPAR γ -dependent gene 3 の発現解析、第30回日本薬学会九州支部大会、長崎国際大学 (長崎)
 - 藍原大甫, 松末公彦, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成25年9月14日) 脂肪細胞において誘導される liver PPAR γ -dependent gene 1 に対する shRNA 発現ベクターの作製及びノックダウン効

率の評価 in フォーラム2013 衛生薬学・環境トキシコロジー、九州大学 (福岡)

13. 松末公彦, 藍原大甫, 松尾康平, 瀧口総二, 山野茂 (平成 25 年 9 月 14 日) PPAR γ と肝脂肪蓄積 in フォーラム 2013 衛生薬学環境トキシコロジー 核内受容体と毒性学研究の最前線、九州大学 (福岡)

〔図書〕(計 1 件)

1. 松末公彦、株式会社エル・アイ・シー、疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患(上巻)第 15 節 FSP27、2015 年、270-278

〔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

松末 公彦 (MATSUSUE KIMIHIKO)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：10389364

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOICHI)
独立行政法人国立病院機構・
九州がんセンター臨床研究センター・
室長
研究者番号：00280793