

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860203

研究課題名(和文)オートファジー・リソソーム系に着目した新たな脂質分解機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of a novel lipid degradation pathway focused on autophagy-lysosomal system

研究代表者

相澤 修 (AIZAWA, Shu)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：10645899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、脂質を標的とする新たな選択的分解システムの分子機構ならびに生理学的意義を明らかにするものである。培養細胞において、我々が着目したリソソーム膜タンパク質の発現抑制により脂肪滴の蓄積が確認された。一方、上記タンパク質の過剰発現は脂肪酸により誘導される脂肪滴蓄積を減少させた。これらは、マクロオートファジーに非依存的な分解系であった。加えて、上記タンパク質に結合する脂質分子の一部を同定した。さらに、上記タンパク質の遺伝子欠損マウスの作製に成功し、現在表現型を解析中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the molecular mechanisms and physiological roles of a novel type of autophagy targeting lipid molecules. RNAi-mediated silencing of a lysosomal membrane protein, which binds to lipid molecules, induced lipid droplets accumulation in cultured cells, whereas overexpression of the protein decreases fatty acid-induced lipid accumulation. We found that these effects were independent of macroautophagy. We also identified a part of lipid substrates in this pathway. Furthermore, we established knockout mice lacking the lysosomal membrane protein, and phenotypes of the mice are now investigated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー リソソーム 脂質分解 脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

近年、食の欧米化や食生活の乱れ、運動不足などにより、肥満人口が増加している。肥満やそれに伴い増加する糖尿病や脂質異常症、高血圧などのメタボリックシンドロームは、脳心血管疾患や認知症などのリスクファクターとなることから、現代社会において解決されなければならない重要課題の一つであると考えられる。これらの疾患における分子基盤の確立のためには、生体内における脂質代謝制御システムの解明が急務と言える。

細胞内において、疎水性を呈する脂質分子は脂肪滴の形態で貯蔵されることが知られている。脂肪滴は、トリグリセリドやコレステロールエステルなどの中性脂肪をその中心とし、リン脂質一重層で覆われた構造を取る。これまで、脂肪滴は過剰な脂質を蓄積しているだけの細胞内構造体として考えられていたが、制御された脂質代謝を営むダイナミックな細胞内小器官であることが明らかとなり、近年非常に注目を集めている。また、脂肪滴は脂肪細胞のみならずほぼ全ての細胞に普遍的に存在する。脂肪細胞および非脂肪細胞における細胞内脂肪滴への過剰な脂質の蓄積は、肥満やそれに伴うメタボリックシンドロームの分子病態であると考えられていることから、脂質分解機構の解明はこれら疾患治療のターゲットとなることが想定される。

細胞内構成成分を分解する代表的な機構として、「リソソーム」における分解、すなわちオートファジー（自食作用）が挙げられる。オートファジーは、飢餓状態に対する適応をはじめ、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質や損傷したミトコンドリアの除去など、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている。オートファジーには、(1) 基質となる細胞質成分が脂質二重膜構造体である隔離膜により取り囲まれた後、リソソームと融合する「マクロオートファジー (macroautophagy)」、(2) リソソーム膜の陥入により分解基質を取り込む「ミクロオートファジー (microautophagy)」、(3) リソソーム膜タンパク質とシャペロンタンパク質を介した選択的なタンパク質取り込み・分解機構である「シャペロン介在性オートファジー (chaperone-mediated autophagy)」の3種類の経路が現在までに知られている。リソソームは直径約100~1,000 nmの細胞内小器官(オルガネラ)であり、その内部には、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼ、グリコシダーゼ、ホスファターゼなどあらゆる生体高分子を分解するための酸性加水分解酵素がおよそ40種類ほど含まれていることが報告されている。オートファジーによる脂質代謝に関しては、リソソームに脂質分子を運搬する経路が長きにわたり不明であったが、2009年にマウス肝臓組織においてマクロオートファジーによる脂肪滴成分の分解が報告され、生体内の脂質代謝におけるオー

トファジー・リソソーム系の重要性が示唆された。

申請者が所属する研究グループでは、リソソーム膜タンパク質を介してエネルギー依存的にRNAやDNAを直接リソソーム内に取り込み、分解するという核酸分子に選択的なオートファジー経路(RNautophagyならびにDNautophagy)の存在を発見し、現在その分子機構や生理学的意義について研究中である。さらに、その研究過程において、上記とは異なるリソソーム膜タンパク質が脂質分子と特異的に相互作用することを発見した。このことから、オートファゴソームの形成により分解基質となる生体高分子を運搬するマクロオートファジー経路とは全く異なり、リソソーム膜タンパク質を介して分解基質となる脂質分子を選択的にリソソームに運搬し分解するという新規オートファジー・リソソームシステムの存在が示唆された。

2. 研究の目的

以上の知見を基盤として、本研究課題では、我々が見出しつつある脂質を標的とする新たな選択的オートファジー・リソソームシステムの存在を証明し、その分子機構を明らかにすることを目的とする。さらに、我々が見出した脂質分子と結合するリソソーム膜タンパク質の遺伝子欠損マウスを作製し、その遺伝子改変マウスにおける脂質代謝に関連する表現型を詳細に解析することにより、新規オートファジー・リソソームシステムが生体内においても存在・機能することを示し、その生理学的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた検討

主にヒト培養細胞株HeLaを用いて研究を行った。我々が標的とするリソソーム膜タンパク質遺伝子に対するsiRNAを用いて特異的な発現抑制(RNAi)を行い、細胞をホルマリン固定後、細胞内脂肪滴の蓄積状態をオイルレッドO染色法による光学顕微鏡観察により評価した。加えて、上記の操作を行った細胞を、脂肪滴に特異的に取り込まれる蛍光色素BODIPY 493/503により染色し、蛍光顕微鏡観察を行うことにより脂質蓄積状態をさらに詳細に評価した。一方、HeLa細胞に対して上記リソソーム膜タンパク質の過剰発現を行い、オレイン酸処理により誘導される細胞内脂肪滴の蓄積が減少するか否かについて上記と同様の実験方法により検討を行った。また、上記と同様にリソソーム膜タンパク質の過剰発現を行った細胞に対して放射性同位体標識したオレイン酸を取り込ませ、脂質分子の細胞内代謝回転をパルスチェイス実験により測定した。

(2) 新規脂質分解システムの経路同定

上記(1)と同様に HeLa 細胞に対して我々が標的とするリソソーム膜タンパク質の過剰発現を行い、マクロオートファジー阻害剤として用いられる 3-メチルアデニン (3-methyladenine) の存在下における脂質蓄積に関して検討を行った。さらに、マクロオートファジー活性を欠く Atg5 欠損マウス胎仔線維芽細胞株 (Atg5 KO MEF) を用いて、上記リソソーム膜タンパク質の過剰発現により、オレイン酸処理に誘導される細胞内脂肪滴蓄積が減少するか否かをオイルレッド O 染色法により検討を行った。

(3) 分解基質となる脂質分子の同定

標的とするリソソーム膜タンパク質細胞質ドメインのアミノ酸配列とピオチンとの融合ペプチドを合成し、リン脂質や中性脂肪などの各種脂質がスポットされた疎水膜状で反応させ、ストレプトアビジン-HRP により検出することにより新規脂質分解システムの分解基質となる脂質分子の探索を行った。さらに、このリソソーム膜タンパク質細胞質ドメイン中の脂質結合に重要となるアミノ酸の同定を試みた。

(4) 新規脂質分解システムの生体における存在ならびに生理学的意義の検討

我々が見出した新規脂質分解システムの動物個体における生理学的意義を調べるため、標的とするリソソーム膜タンパク質の遺伝子欠損マウスを CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて作製した。遺伝子改変マウスの増体重、肝臓や脂肪組織などの重量、血中中性脂肪含量、脂質代謝関連遺伝子の発現などを測定した。また、肝臓組織における中性脂肪の蓄積は、凍結切片を作製し、オイルレッド O 染色法を用いた光学顕微鏡観察により検討を行った。

4. 研究成果

(1) 脂質代謝に及ぼすリソソーム膜タンパク質発現抑制ならびに過剰発現の影響

ヒト培養細胞株 HeLa に対する我々が標的とするリソソーム膜タンパク質の特異的発現抑制により、通常の培養条件下 (10%ウシ胎仔血清含有ダルベッコ改変イーグル培地) ではほぼ認められないオイルレッド O 陽性の細胞内脂肪滴が細胞質中に多数確認された。また、BODIPY 493/503 による蛍光染色による観察においても同様の結果が観察された (図 1)。

その一方で、上記リソソーム膜タンパク質を過剰発現した HeLa 細胞においては、オレイン酸の処理により誘導される細胞内脂肪滴の蓄積が著しく減少した。加えて、クロロキン (chloroquine) やバフィロマシ A1 (bafilomycin A1) などのリソソーム機能阻害剤を併用するとこの現象は有意に抑制された。このことは、上記の脂質代謝の変動がリソソーム分解に起因することを示唆する

ものである。さらに、放射性同位体標識したオレイン酸によりラベルした細胞を用いたパルスチェイス実験の結果から、上記リソソーム膜タンパク質の過剰発現は、培養細胞レベルにおいて脂質分解を高めることが確認された。

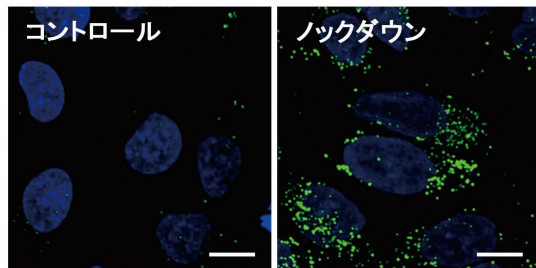


図1 コントロール(左)または標的とするリソソーム膜タンパク質をノックダウンされた(右)ヒト培養細胞株 HeLa における細胞内脂肪滴の蛍光染色像。緑は脂肪滴、青は核を示す

(2) 新規脂質分解システムの経路について

上記リソソーム膜タンパク質を過剰発現した HeLa 細胞では、マクロオートファジー阻害剤 3-メチルアデニンによって引き起こされる細胞内脂質の蓄積が対照群と比較して有意に低い値であることが確認された。また、Atg5 KO MEF におけるこのリソソーム膜タンパク質の発現抑制により引き起こされる脂質の蓄積は、野生型 MEF におけるものよりさらに高いものであった。さらに、上記リソソーム膜タンパク質を過剰発現した Atg5 KO MEF における脂質代謝回転を、放射性同位体標識したオレイン酸によるパルスチェイス実験により測定した結果、対照群と比較して有意に高い値を示した。これらの結果から、我々が見出した新規脂質分解システムは、膜輸送を介したマクロオートファジーに非依存的なリソソーム分解系であることが示唆された。

(3) 分解基質の同定

我々が標的とするリソソーム膜タンパク質の細胞質ドメインのアミノ酸配列とピオチンとの融合ペプチドを合成し、リン脂質や中性脂肪等の各種脂質との直接的な相互作用を検討した結果、細胞内に存在するある特定の脂質分子と相互作用することを確認した。さらに、リソソーム膜タンパク質細胞質ドメイン中に存在する脂質分子との相互作用に重要と考えられるアミノ酸残基を同定した。

(4) 新規脂質分解システムの生体における存在ならびに生理学的意義

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて我々が標的とするリソソーム膜タンパク質の遺伝子欠損マウスの作製に成功した。現在、増体重、組織重量、血中や組織中の脂質

含量、脂質代謝関連遺伝子の発現などの脂質代謝に関する表現型を中心にデータ解析中である。

以上、研究期間を通じて、リソソーム膜タンパク質を介して脂質分子を選択的に分解するという新規オートファジー・リソソームシステムの存在を証明することができた。また、動物個体における生理学的役割は、遺伝子欠損マウスの表現型解析から明らかになることが今後期待される。研究期間中に得られた研究成果については現在専門学術雑誌に投稿準備中である。

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 1 件)

- (1) Aizawa S, Fujiwara Y, Contu VR, Hase K, Takahashi M, Kikuchi H, Kabuta C, Wada K & Kabuta T. Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy* 2016; 12/3, 565-578. (査読有)
DOI: 10.1080/15548627.2016.1145325

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

相澤 修 (AIZAWA, Shu)

日本大学・生物資源科学部・助手
研究者番号：10645899

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし