様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２年　６月２７日現在

機関番号：１７７０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０８５１５

研究課題名（和文）LC3ノックアウトマウスにおける脂質代謝

研究課題名（英文）Lipid metabolism in the LC3 knockout mice

研究代表者
柴田　昌宏（Shibata, Masahiro）

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：１０３４３２５３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：オートファジーは細胞内の大規模な分解系である。LC3はオートファゴソーム膜上に局在することから、オートファジーのマーカータンパクとして知られている。LC3は脂質代謝にも関与することから、本研究ではLC3ノックアウトマウスを用いて、脂質代謝に関与する機構を明らかにすることを目的とした。LC3ノックアウトマウスは、高脂肪食を与えると脂肪組織の形成が抑制され、初代線維芽細胞を脂肪細胞へ分化させると、脂肪滴形成が抑制された。オートファジー亢進モデルであるカテプシンD欠損マウスと交配させてもオートファジーが抑制されなかったことから、LC3が他の分子で代償されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
オートファジーは細胞内の大規模タンパク分解系として知られている。今回LC3欠損マウスを用いることで、LC3が脂肪代謝に関与していることを示した。この結果には、脂質代謝のメカニズム解明という学術的意義があるだけでなく、脂質異常症の治療において貢献できるという臨床的な意義もある。さらに、オートファジー亢進モデルであるカテプシンD欠損マウスを交配させてもオートファジーが抑制されないことは、他の分子によってLC3が代償されていることを示し、細胞生物学の分野にとっても非常に意義深い結果である。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is one of the bulk degradation systems in cells. LC3 is localized in the autophagosomal membrane so that it has been considered as a marker protein for autophagy. In this study, I examined the LC3 function in lipid metabolism using LC3 knockout mice. Adipose tissue mass in the mice deficient for LC3 having high fat diet was suppressed rather than in the control mice, and the lipid droplets in the cells differentiated into the adipocytes decreased rather than those derived from the control cells. Autophagy in the LC3 knockout mice crossed with the cathepsin D knockout mice, in which autophagy is increased, was not suppressed. These results indicate that LC3 would be compensated with other molecules in the course of autophagy.

研究分野：解剖学

キーワード：LC3

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

オートファジーとは、細胞内の大規模な分解系で、Ohsumi らによる酵母を使った実験で必須遺伝子群が同定された(FEBS Lett, 1993)。これら遺伝子群の１つ atg8 は、オートファゴソーム膜に局在することから酵母のオートファジーマーカーとして広く利用されている。Kabeya らはデータベース検索をもとに哺乳類の atg8 ホモログとして LC3 を同定し(EMBO J, 2000)、LC3 が哺乳類のオートファジーマーカーとして現在でも広く利用されている。しかし、その後の研究から LC3 よりも atg8 に相同性が高い分子として GABARAP ファミリーが同定された。図１
申請者らは、この様な分子構造の相同性の低さから LC3 ファミリーにはオートファジー以外の機能もあると考え、培養細胞を用いた実験により世界で初めて LC3 が脂肪滴の形成に関与していることを報告した(BBRC,2009 & 2010)。

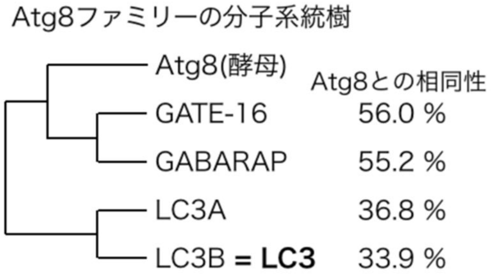

図 1：atg8 ファミリーの分子系統樹。LC3 は atg8 と 30%台の相同性であるが、GATE-16 や GABARAP には 55%以上の相同性があり、GABARAP ファミリーと LC3 ファミリーに大別できる。

２．研究の目的

申請者らは LC3 がオートファジーだけではなく、脂質代謝にも関与していると考え、その分子機構を明らかにするため以下の項目を目的とした。

(1)オートファジーと脂質代謝の相関を明らかにする。

(2)初代線維芽細胞を脂肪細胞へ分化させ、脂肪滴の形成能を明らかにする。

(3)LC ノックアウトマウスをオートファジー亢進マウスと交配させ、オートファジーが生じるかどうか明らかにする。

３．研究の方法

LC3 ノックアウトマウスを普通食と高脂肪食で飼育し、体重の増減を計測し、脂肪滴の形成能を BODIPY を使った蛍光染色で調べた。

オートファジー亢進モデルであるカテプシン D ノックアウトマウスと LC3 ノックアウトマウスを交配し、電子顕微鏡でオートファジーの有無を観察。

LC3 ノックアウトマウス胎児より皮膚を採取し、初代線維芽細胞を培養する。insulin, デキサメタゾン、IBMX の添加により脂肪細胞へ分化させ、Oil Red O により脂肪滴を染色。脂肪細胞分化マーカー遺伝子 SREB、PPARγの遺伝子発現変化を RT-PCR で調べた。

４．研究成果

野生型と LC3 欠損マウスから線維芽細胞を培養し、インスリン、デキサメタゾン、IBMX を添加して脂肪細胞へ分化誘導を行い、BODIPY（緑）により脂肪滴を染色した（図 2）。LC3 ノックアウトマウスでは脂肪滴の形成が顕著に抑制されていることが分かった。また、脂肪細胞分化マーカーである SREBP1 と PPARγ遺伝子の発現の差は認められなかった。

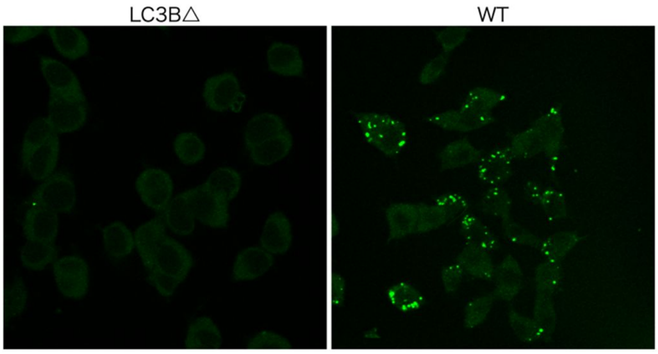

図 2：初代線維芽細胞を脂肪細胞に分化させ、BODIPY(緑)で染色した。左；LC3 ノックアウトマウス、右；野生型

野生型と LC3 ノックアウトマウスを普通食または高脂肪食を与え、体重変化を調べたところ、野生型マウスは高脂肪食で顕著に体重が増加したが、LC3 ノックアウトマウスでは体重の増加が緩やかであった。(図 3)

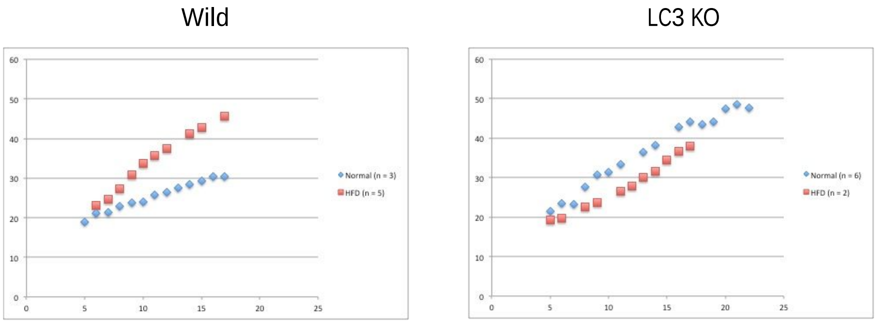

図 3：左；野生型、右；LC3 ノックアウトマウス

次に、オートファジー亢進モデルとして知られるカテプシン D 欠損マウスと LC3 ノックアウトマウスを交配し、オートファジーに変化があるかどうか調べた。両遺伝子欠損マウスで顕著な表現型の差が認められなかったが、現在も詳細に検討中である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Takakura K(1), Ito S(1), Sonoda J(1), Tabata K, Shiozaki M, Nagai K, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Gotow T	４．巻 3
２．論文標題 Cordyceps militaris improves the survival of Dahl salt-sensitive hypertensive rats possibly via influences of mitochondria and autophagy functions.	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Heliyon	６．最初と最後の頁 e00462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2017.e00462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 ―

１．著者名 Kusumi S, Koga D, Watanabe T, Shibata M	４．巻 39
２．論文標題 Combination of a cryosectioning method and section scanning electron microscopy for immuno-scanning electron microscopy.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Biomed Res	６．最初と最後の頁 21-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.39.21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 ―

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考