

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590066

研究課題名（和文）

脂肪細胞の分化を抑制する新規タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）

Characterization of a novel protein which inhibits adipocytes differentiation

研究代表者

山崎 尚志 (YAMAZAKI NAOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20271083

研究成果の概要（和文）：

褐色脂肪組織は糖や脂肪を積極的に分解して熱を産生するユニークな脂肪組織である。この組織に特徴的に発現していることが予想される新規タンパク質の解析の結果、本タンパク質がダイナミンと結合してエンドサイトーシスを制御する可能性が示唆された。このタンパク質を前駆脂肪細胞に過剰に発現させると成熟脂肪細胞への分化が抑制されたことから、その発現亢進は脂肪組織の発達を抑制して肥満の解消や予防に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Two kinds of adipose tissues are known to exist in mammals; white and brown adipose tissue. The physiological role of white adipose tissue is storage of bioenergy in the form of fat. Unlike white adipose tissue, the role of brown adipose tissue is dissipation of energy as heat, which prevents mammals from excess storage of energy. We obtained a cDNA encoding a novel protein which abundantly expressed in brown adipose tissue. The putative SH3 domain located on the C-terminal region of this protein can bind dynamin, and it is suggested that the binding of this protein to dynamin inhibits endocytosis process. When this protein was overexpressed in preadipocytes, differentiation to mature adipocytes was inhibited. These results suggest that a novel protein abundantly expressed in brown adipose tissue regulates dynamin-mediated endocytosis and its overexpression inhibits adipocytes differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬学、発生・分化、蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物には白色脂肪組織 (white adipose tissue:WAT) と褐色脂肪組織 (brown adipose tissue:BAT) という2種類の脂肪組織が存在する。WATは単に「脂肪」とも呼ばれる一般

的な脂肪組織で、余分なエネルギー源を中性脂肪の形で貯蔵し必要なときに全身に再供給する、いわばエネルギーの貯蔵庫として機能している。一方、BATは肩胛骨間や脇の下などごく限られた部位に僅かに存在する特

殊な脂肪組織である。BAT のミトコンドリア内膜には、プロトン透過担体である脱共役タンパク質がこの組織特異的に発現しており、この働きにより BAT は余分なエネルギー源を積極的に酸化分解して熱を産生する。この熱産生能は、冬眠動物が冬眠から目覚める際や自発的な運動が困難な新生児における体温維持に重要な役割があることは以前から知られているが、糖や脂肪酸を積極的に分解するという面から見ると、BAT の活性化は肥満の防止に繋がるのが期待される。従って、BAT において営まれている代謝の詳細を明らかとすれば、肥満に起因する生活習慣病を予防できる可能性がある。

我々の研究グループでは、脱共役タンパク質のように BAT に特徴的に存在するタンパク質を同定する目的で、ラットやマウスの BAT と WAT の mRNA の比較を行ってきた。その結果、WAT よりも BAT に優位に存在する既知のタンパク質をいくつか同定し、それらが BAT の特徴的な代謝にどのように関わるのかを明らかとしてきた。加えて新規タンパク質をコードする cDNA も数種単離することに成功した。そのうちのひとつ、ラット cDNA クローン 2-88 は 676 アミノ酸からなる 76.4kDa の機能未知タンパク質をコードすると考えられ、一次構造から DH ドメイン(アミノ酸 34-212)、BAR ドメイン(242-445)、SH3 ドメイン(606-665)が存在することが予想された。

このタンパク質を WAT のモデルであるマウス 3T3-L1 細胞に恒常的に発現させたところ、分化誘導処理を行っても脂肪滴を蓄積しないことが示された。SH3 ドメインは他のタンパク質と結合することが知られているので、このドメインと結合するタンパク質を探索した結果、エンドサイトーシスに重要なダイナミンと直接結合することが示された。このことから 3T3-L1 細胞内で過剰に発現した 2-88 は、ダイナミンなど他のタンパク質と相互作用することで脂肪細胞への分化を抑制している可能性が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

BAT は余分なエネルギー源を積極的に酸化分解する脂肪組織であり、その機能亢進は肥満解消に繋がるのが期待される。そして BAT に特徴的に発現しているタンパク質はこの組織の特徴的な機能に密接に関わっていると考えられる。そこで本研究では、BAT に特徴的に存在する新規タンパク質 2-88 の構造や機能を明らかとし、本タンパク質を標的とした BAT 機能亢進法あるいは WAT の分化抑制法の可能性を探ることを目的とする。また、組織間で mRNA を比較するという同様の手法によって BAT 特異的であることを明らかとした筋型カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (M-CPT1)、十分に成熟した脂肪細

胞においてその発現が認められた Tmem45b についても解析を行い、BAT や WAT の代謝の詳細を明らかとすることを試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 2-88 発現 3T3-L1 細胞のキャラクタリゼーション

2-88 を安定発現させた 3T3-L1 細胞が分化誘導後に脂肪滴を蓄積しない原因を探るため、脂肪細胞の分化に伴って発現量が変化する遺伝子の挙動を解析した。実験は通常の 3T3-L1 細胞および 2-88 発現 3T3-L1 細胞にインスリン、デキサメサゾンおよびイソブチルメチルキサンチン添加による分化誘導処理を行って、0、2、4、6、9 日後に mRNA を抽出し、RT-PCR によって対象とする mRNA の存在量を比較した。

### (2) 抗 2-88 ペプチド抗体の作製

これまでに本タンパク質の一部のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として、これに対するポリクローナル抗体 (ウサギ抗血清) を数種得ている。これらの抗体は大腸菌や培養動物細胞で過剰に発現させた 2-88 を検出することはできるものの、ラットの BAT など細胞内在性のタンパク質の検出には至っていない。そこで生体内に存在する 2-88 を検出可能な抗体の作製およびこれを用いた 2-88 の精製を試みた。

### (3) 2-88 SH3 ドメインの解析

ラット脳抽出液を用いた実験により、2-88 の SH3 ドメインはダイナミンと結合することが明らかとなっている。そこで、大腸菌発現系により GST 融合 2-88 SH3 ドメインを調製し、これを用いて GST pull-down 法により BAT や WAT、3T3-L1 細胞抽出液において 2-88 SH3 ドメインと結合するタンパク質の単離同定を試みた。

### (4) 2-88 の細胞内局在

アミノ末端に Myc タグを融合した全長 2-88、あるいは BAR ドメインや SH3 ドメインを欠損させた 2-88 を培養動物細胞に発現させ、抗 Myc 抗体を用いた免疫染色法によってその細胞内局在を観察した。またダイナミンも共発現させて 2-88 の局在と比較した。

### (5) M-CPT1 の SDS-PAGE 移動度に関わる領域の同定

CPT1 はミトコンドリア外膜に局在し、ミトコンドリア内膜不透過性の長鎖アシル CoA にカルニチンを転移する反応を触媒する酵素である。CPT1 には肝臓などの多くの組織で発現している肝型 (L-CPT1) と脂肪酸消費量の多い筋肉や BAT で特徴的に発現している筋型 (M-CPT1) が存在する。どちらもおよそ 770 アミノ酸からなる 88kDa のタンパク質であるが、SDS-PAGE を行くと M-CPT1 は 82kDa 程度のサイズとして検出されることが知られている。そこで部分的に欠損させたタンパク質

や肝型と筋型のキメラタンパク質を大腸菌や培養動物細胞に発現させて、電気泳動移動度の差をもたらす領域の同定を試みる。

#### (6) Tmem45bの構造的特徴

Tmem45b はマウス WAT に選択的に発現しているとして同定された新規遺伝子であり、十分に分化した WAT でのみ発現が認められている。この遺伝子がコードするタンパク質は WAT の発達に関わっている可能性が考えられることから、このタンパク質の発現抑制や機能阻害は WAT の減少に繋がる可能性がある。そこで本遺伝子がコードするタンパク質を解析する目的で培養動物細胞に発現させ、その機能の解明を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 2-88 発現 3T3-L1 細胞のキャラクタリゼーション

3T3-L1 細胞および 2-88 発現 3T3-L1 細胞に分化誘導処理を行ってから経時的に mRNA を抽出して RT-PCR を行った。まず脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られる C/EBP $\alpha$  と PPAR $\gamma$  を解析した。これらは脂肪細胞の分化に必要な遺伝子の発現を誘導する転写因子であり、それら自身の発現も分化初期に亢進する。しかし 2-88 発現細胞では分化誘導処理を行ってもこれらの mRNA 量があまり増加しないことが見出された。これに伴い、これら転写因子によって発現が誘導され、成熟脂肪細胞のマーカーとしても知られている脂肪酸結合タンパク質（脂肪組織型）の mRNA も 2-88 発現細胞では少なくなっていることが確認された。

一方、未分化の脂肪細胞では発現しているが、分化誘導後から減少し、成熟脂肪細胞ではほとんど発現していない Pref-1 の mRNA が、2-88 発現細胞ではほとんど減少しないことが明らかとなった。Pref-1 は細胞膜貫通型タンパク質であり、切断されて生じた断片が脂肪細胞の分化を抑制すると考えられている。

以上の結果から、2-88 発現 3T3-L1 細胞は脂肪細胞への分化のスイッチは入るものの、Pref-1 の発現が亢進されているため、それ以降の分化過程が進行しなくなり、結果として脂肪滴を蓄積しない可能性が示唆された。

### (2) 抗 2-88 ペプチド抗体の作製

2-88 のいくつかの領域（アミノ酸 2~20、33~52、257~275、539~558、634~653、657~676）を抗原として、ウサギを免役しポリクローナル抗体（抗血清）を得た。大腸菌や COS7 細胞で発現させた 2-88 を用いて、ウェスタン解析法により作製した抗体の検定を行ったところ、比較的自由度が高いと考えられるカルボキシ末端のアミノ酸配列（アミノ酸 657~676）を抗原として作製した抗体が 2-88 に対する認識能が最も高いことが示された。そこでこの抗体を用いてラット BAT 抽

出液のウェスタン解析を行ったところ、大腸菌や COS7 細胞で発現させたタンパク質とほぼ同じサイズのタンパク質シグナルを確認することができた。

続いてこの抗体を使用して、免疫沈降法により 2-88 タンパク質の精製を試みた。大腸菌や COS7 細胞で過剰に発現させた 2-88 の精製は可能であったが、BAT 抽出液から目的とするタンパク質を精製することはできなかった。ウェスタン解析法で検出されたシグナルが非常に弱かったことも考慮すると、細胞内での 2-88 発現量は非常に少ない可能性が示唆された。

### (3) 2-88 SH3 ドメインの解析

大腸菌で発現させた GST 融合 2-88 SH3 ドメインを用いて GST pull-down 法により、BAT や WAT、3T3-L1 細胞抽出液における 2-88 SH3 ドメインの結合タンパク質の単離を試みた。しかし、実験を行った条件では SH3 ドメインと結合するタンパク質は見出せなかった。そこでダイナミンと結合することが知られているアンフィファイシン SH3 ドメインと 2-88 SH3 ドメインの、ダイナミンに対する結合性を比較したところ、2-88 SH3 ドメインのダイナミンに対する結合性はアンフィファイシンのそれより 10 倍以上弱いことが判明した。また BAT や WAT、3T3-L1 細胞中におけるダイナミン発現量はかなり少ないことも明らかとなった。以上のことから、ダイナミンが豊富に存在する脳においては 2-88 SH3 ドメインの結合タンパク質としてダイナミンが同定できたが、BAT や WAT、3T3-L1 細胞においては 2-88 の結合タンパク質が単離できなかった可能性がある。

### (4) 2-88 の細胞内局在

COS7 細胞に発現させた Myc タグ 融合 2-88 を共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色法で観察した結果、そのほとんどは細胞質に不均一に存在し、一部は小胞体やゴルジ体に局在することが示された。この結果は GFP を融合した 2-88 を用いた結果とほぼ一致した。推定ドメイン構造から細胞内局在性に関わる領域として BAR ドメインと SH3 ドメインが考えられたので、これらの欠損体を発現させて観察したところ、BAR ドメイン欠損体では細胞膜、SH3 ドメイン欠損体では細胞質への局在が観察された。この結果から、BAR ドメインが細胞質への、SH3 ドメインが細胞膜周辺への局在に関与する可能性が示された。

また 2-88 全長を COS7 細胞にダイナミンと共発現させると、細胞質に生じた比較的大きな小胞に共局在することが示された。2-88 単独やダイナミン単独の場合、あるいは BAR ドメインや SH3 ドメインを欠損させた 2-88 をダイナミンと共発現させた場合にはこのような小胞は観察されなかった。エンドサイトーシス過程が阻害されると細胞内にこのよう

な小胞が発生し、この小胞は初期エンドソームである可能性が報告されている。

以上の結果から、① 2-88はそのSH3ドメインでダイナミンと結合して細胞膜付近に局在すること、② BARドメインは脂質膜と結合して膜の曲率を変化させることが知られている。従って、2-88のBARドメインはおそらく細胞内のエンドソームとの結合に関与すること、③ 過剰に発現した2-88によってダイナミンが関与するエンドサイトーシスの過程が阻害され、初期エンドソームが蓄積したのではないかと考えられた。

(5)M-CPT1のSDS-PAGE移動度に関わる領域の同定

L-CPT1とM-CPT1の欠損タンパク質やキメラタンパク質を大腸菌で発現させてSDS-PAGE移動度を比較した結果、M-CPT1の662~709のアミノ酸領域を含むと電気泳動移動度が大きくなり(小さなタンパク質として検出される)、反対にL-CPT1の662~709のアミノ酸領域を含むと電気泳動移動度が小さくなる(大きなタンパク質として検出される)こと、すなわち662~709の領域が両CPT1の電気泳動移動度を異なるものにする主な原因であることが示された。肝型と筋型のCPT1は基質であるカルニチンや内因性の阻害剤であるマロニルCoAに対する親和性が大きく異なっていることが知られているが、その原因はまだ明らかでない。662~709の領域が電気泳動移動度を異なるものにする理由は不明であるが、このような物理的な性質の違いが酵素的な特性に関与する可能性が考えられる。

(6)Tmem45bの構造的特徴

カルボキシ末端にMycタグを融合させたTmem45bをCOS7細胞に発現させてウェスタン解析法によってその発現の確認を試みた。しかしながら通常の操作方法では発現したタンパク質が全く検出できなかった。検討を行った結果、本タンパク質は細胞膜を7回貫通していると予想され、SDS-PAGEに供するサンプル調製時に一般的に行われる熱処理の際に推定膜貫通領域の4~7が凝集してしまうことが明らかとなった。

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)

① Hada T, Kato Y, Obana E, Yamamoto A, Yamazaki N, Hashimoto M, Yamamoto T, Shinohara Y. Comparison of two expression systems using COS7 cells and yeast cells for expression of heart/muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1b). *Protein Expr. Purif.* 査読あり、vol. 82, 2012, 192-196.

DOI:10.1016/j.pep.2012.01.006.

② Okada N, Yamamoto T, Watanabe M,

Yoshimura Y, Obana E, Yamazaki N, Kawazoe K, Shinohara Y, Minakuchi K. Identification of TMEM45B as a protein clearly showing thermal aggregation in SDS-PAGE gels and dissection of its amino acid sequence responsible for this aggregation. *Protein Expr. Purif.* 査読あり、vol. 77, 2011, 118-123.

DOI:10.1016/j.pep.2011.01.011

[学会発表](計14件)

① 柳沢未来、滝口祥令、山崎 尚志. CPT1アイソフォームのSDS-PAGE移動度の違い. 第51回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2012. 11. 10、島根県民会館(島根県).

② 秦拓也、加藤弓子、尾華絵里子、山本篤司、山崎 尚志、橋本満、山本武範、篠原康雄. COS細胞および酵母で発現させた筋型カルニチンパルミトイル基転移酵素(Cpt1b)の性質の比較. 日本薬学会第132年会、2012. 3. 29、北海道大学(北海道).

③ 岡田直人、山本武範、渡邊政博、吉村勇哉、尾華絵里子、山崎尚志、川添和義、水口和生、篠原康雄. 機能未同定のタンパク質TMEM45Bに見られた熱凝集と熱凝集を引き起こすアミノ酸領域の同定. 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011. 11. 24、岡山大学(岡山県)

④ 岡田直人、山本武範、渡邊政博、吉村勇哉、山崎尚志、篠原康雄、水口和生. TMEM45Bのthermal aggregationに関与するアミノ酸配列の同定. 日本薬学会第131年会、2011. 3. 30、ツインメッセ静岡(静岡県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 尚志(YAMAZAKI NAOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 20271083