

平成 22 年 6 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2009

課題番号：18590092

研究課題名 (和文) 細胞内脂肪滴形成の分子機構に関する研究

研究課題名 (英文) A study on lipid droplet biogenesis in mammalian cells

研究代表者

深澤 征義 (MASAYOSHI FUKASAWA)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：20291130

研究成果の概要 (和文)：

脂肪滴は中性脂肪などの中性脂質の貯蔵庫として重要な細胞内オルガネラであり、膜脂質代謝・エネルギー産生など様々な細胞機能に関与している。また、脂肪蓄積は様々な病態とも密接に関与している。しかし、脂肪滴形成に関わる分子・メカニズムについては不明の点が多い。本研究により、まず脂肪滴に存在する蛋白質を網羅的に同定した。また、アセチル CoA カルボキシラーゼ 1 が脂肪滴形成に必須であることを遺伝学的・細胞生物学的に明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

Lipid droplets are cellular lipid storage organelles involved not only in lipid homeostasis but also in a variety of diseases. However, little is known about cellular factors involved in the biogenesis of lipid droplets. In this study, we performed proteomic profiling of lipid droplet proteins in human liver cell lines and identified more than 80 proteins by 1D-SDSPAGE/MALDI-TOF mass spectrometry (MS) or direct nano-flow liquid chromatography-MS/MS. I also found that acetyl-CoA carboxylase 1 has an essential role in lipid droplet biogenesis in cultured mammalian cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	800,000	0	800,000
2009年度	500,000	0	500,000
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

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：生化学 脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴はほぼ全ての体細胞に認められ

る一種のオルガネラで、中性脂肪等の中性脂質を貯蔵する役割を主に果たしてい

る。これら中性脂質は、膜脂質代謝・エネルギー産生・生理活性脂質産生などに密接に関与しており生体機能に極めて重要であることが知られる。さらに、過剰な脂肪蓄積は動脈硬化などの様々な病態と密接に関連していることも知られており、病態発症メカニズムについて精力的に研究が行われている。細胞内において脂肪滴量は極めてダイナミックに変動するが、その生成・消失機構及びその制御については当初よりよくわかっておらず、依然として不明の点が多い。

2. 研究の目的

上述したように、脂肪滴は恒常性維持の生理機能に極めて重要であるばかりでなく、医学薬学的見地からも非常に注目されている。脂肪滴形成メカニズムを知ることが脂肪蓄積に付随した病態の解析・治療にもきわめて有用である。そこで、細胞内脂肪滴の形成メカニズムの一端を明らかにすることを本研究の最終目的とした。具体的な研究計画としては、体細胞変異株を用いた遺伝学的な手法とプロテオミクスを用いた生化学的な手法を用い細胞内脂肪滴の形成メカニズムに重要な因子を同定し、その関与機構を解析することである。

3. 研究の方法

(1) プロテオミクス解析の手法を用いた細胞内脂肪滴蛋白質の同定

脂肪滴を採取する細胞としては、ヒト肝培養細胞株、HepG2 および Huh7 由来の細胞株を用いた。これらの細胞を脂肪酸（オレイン酸）及びコレステロール添加培地にて培養することにより効率よく脂肪滴を形成させた。細胞を回収・破碎後、ショ糖密度勾配遠心分離

法により脂肪滴を精製した。精製度については、各オルガネラマーカーを用いたイムノプロットにより確認した。脂肪分を有機溶媒による脱脂操作により除いた。これ以降は2種類の方法で解析を行った。①1次元 SDS-PAGE で脂肪滴蛋白質を分離し、バンドを染色後、切り出し、トリプシン消化を行い、各ペプチドを MALDI-TOF マススペクトロメトリー (MS) により解析し蛋白質を同定した。②脂肪滴画分をトリプシン消化後、direct nano-flow 液体クロマトグラフィー-MS/MS により蛋白質を同定した。

(2) 脂肪滴形成に異常を示す高等動物細胞変異株の分離

親株としてはチャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞を用いた。まず、CHO 細胞に脂肪滴を効率よく形成させるために、脂肪酸（オレイン酸）及びコレステロールを添加した培地で数日間培養を行った。細胞内脂肪滴を蛍光色素 Nile Red で染色後、細胞を培養皿より剥離し、FACS (Fluorescence activated cell sorting) 法により細胞を分画し、蛍光の弱い細胞（脂肪滴形成低下株）と蛍光の強い細胞（脂肪滴形成亢進株）を採取した。実際にはこの操作を数回繰り返した。その後、細胞を限界希釈法にてクローニングして株として樹立した。

4. 研究成果

(1) 細胞内脂肪滴蛋白質の網羅的解析

まず、ヒト培養肝細胞株である HepG2 由来細胞より分離・精製した脂肪滴のプロテオーム解析を上述した2種類の方法により行った。計37種のタンパク質を同定し、脂肪滴には構造蛋白 (ADRP、TIP47など)、膜輸送蛋白 (Rab 蛋白など)、脂質代謝酵素などが多く存在するだけでなく、機能未知のタンパク質も多く同定された。次に、別のヒト培養肝細胞株、

Huh7細胞の脂肪滴画分をdirect nano-flow液体クロマトグラフィー-MS/MSを用いたプロテオーム解析にかけ、蛋白質の同定をさらに進めた。HepG2細胞で同定できた40種近くのタンパク質に加え計100種類近い脂肪滴タンパク質を同定できた。やはり、脂肪滴構造タンパク質 (ADRP、TIP47など)、膜輸送タンパク質 (Rab蛋白など)、脂質代謝酵素が比較的多く検出されたものの、それ以外にも広範にわたる各種機能を有するタンパク質が同定された。また、機能未知のタンパク質も多数同定された。これらの各分子が細胞内脂肪滴形成に関わっているかを検討することは非常に興味深く、siRNA、遺伝子過剰発現の系を用いてこれら分子の関与を今後検討することで重要性が明らかになってくるものと考えている。

また、病態と脂肪滴との関連では、C型肝炎ウイルス感染と脂肪滴との関連も近年非常に注目されており、これらの解析を通じて脂肪滴の新たな機能・形成機構が明らかになってくる可能性が考えられる。そこで、C型肝炎ウイルスに感染可能なヒト培養肝細胞 (Huh7細胞) を用いて、C型肝炎ウイルス増殖と脂肪滴の関連について検討を行った。まず、C型肝炎ウイルス感染により脂肪滴蛋白質に変動が見られるかプロテオーム解析を行った。脂質代謝に関連する分子を含め従来脂肪滴に分布していた分子はほぼ全て感染細胞由来の脂肪滴にも存在しており、ほとんど変化が見られなかった。一方、感染細胞の脂肪滴の特徴として、RNA結合能を有する分子が複数同定されるという結果が得られた。この結果は、我々が別に行ったC型肝炎ウイルスコア蛋白質を発現した細胞の脂肪滴プロテオーム解析でも見られた結果であり、矛盾しない。脂肪滴近傍でウイルスが増殖する可能性が示唆されており、このこととの関連

を踏まえ、今後この分布変動の原因 (特にコア蛋白質の関与に注目して) を明らかにすることは非常に重要と考えている。

(2) 細胞内脂肪滴の形成に変異を有する体細胞変異株

変異原処理したCHO細胞ライブラリより複数の脂肪滴の形成不全細胞株を樹立した。詳細な生化学的解析により、その中の一つの株LDD-1細胞は、アセチルCoAカルボキシラーゼ1の活性に欠損を持つことが明らかとなった。アセチルCoAカルボキシラーゼ1遺伝子の導入によりLDD-1細胞は脂肪滴形成が回復することから、アセチルCoAカルボキシラーゼ1が脂肪滴形成に必須であることを遺伝学的に明らかとした。

この結果に基づき、アセチルCoAカルボキシラーゼ活性を阻害する薬剤のスクリーニングを共同研究で行った。放射性炭酸のアセチルCoAへの取り込み活性に対する阻害能を指標に、試験管内アセチルCoAカルボキシラーゼ阻害活性の測定を行った。天然物由来ライブラリよりスクリーニングを行い、キサントン誘導体の一つが有意にアセチルCoAカルボキシラーゼ活性の阻害を示した。さらに、CHO細胞を用いたバイオアッセイにおいても、本薬剤は脂肪滴蓄積を有意に阻害することがわかった。これらの結果は、これまでの変異株を用いた解析と合致した。本薬剤を用いることで様々な細胞で広くアセチルCoAカルボキシラーゼ活性を阻害することが可能となり、細胞内脂質蓄積阻止の観点からも非常に有用と考えられた。

樹立した脂肪滴形成不全細胞株LDD-1の性状解析から脂肪滴形成機構の解析を行っているが難航している。LDD-1株では、diacylglycerol acyltransferaseなどの中性脂質合成に関わる酵素のin vitro活性については

全く変動がみられなかった。このことから、これら酵素の細胞内活性調節機構あるいは細胞内脂肪酸輸送過程等にアセチルCoAカルボキシラーゼ1が影響を与えることで脂肪滴形成に関与している可能性を考えている。

一方、脂肪滴過剰形成変異株の分離も試みた。変異株分離は、通常の10%血清（あるいはリポタンパク質除去血清）存在下で行った。1株が樹立でき、脂肪酸添加をしない培養状態でも親株に比べて有意に多数の脂肪滴が観察されている。

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 3 件）

- ① Sato, S., Fukasawa, M., Yamakawa, Y., Natsume, T., Suzuki, T., Shoji, I., Aizaki, H., Miyamura, T., and Nishijima, M. “Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein.” *J. Biochem.* 139, 921-930 (2006) 査読有
- ② Fukasawa M., Tanaka Y, Sato S, Ono Y, Nitahara-Kasahara Y, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, Nishijima M. “Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein.” *Biol. Pharm. Bull.* 29(9): 1958-61 (2006) 査読有
- ③ Fukasawa M. “Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle” *Biol. Pharm. Bull.* 33(3), 355-359(2010) 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 深澤征義、西島正弘 Isolation of a mammalian cell mutant defective in lipid droplet biogenesis The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology/11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006. 6. 18-23
- ② 深澤征義、田中康仁、小野祐仁、佐藤慈子、鈴木哲朗、宮村達男、花田賢太郎、西島正弘 Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein The 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, Australia, 2006. 8. 27-31
- ③ 深澤 征義、田中康仁、佐藤慈子、笠原 優子、鈴木 哲朗、宮村 達男、花田 賢太郎、西島 正弘 C型肝炎ウイルスコア蛋白質発現培養肝細胞における脂肪酸生合成の上昇 日本薬学会第127年会、富山、2007. 3. 28-30
- ④ 小林翔、松田大介、深澤征義、西島正弘、花田賢太郎、司書毅、供田洋 ACC1 阻害剤による脂肪滴蓄積阻害活性 日本薬学会第128年会、横浜、2008. 3. 26-28
- ⑤ 松田大介、小林翔、深澤征義、西島正弘、花田賢太郎、司書毅、供田洋 キサントン誘導体による脂肪滴蓄積阻害活性は acetyl-CoA carboxylase の阻害によるのだろうか？ 第50回日本脂質生化学会、徳島、2008. 6. 5-6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 征義 (MASAYOSHI FUKASAWA)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：20291130

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし