

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04023

研究課題名(和文) 脂肪滴表層の機能に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the function of the lipid droplet surface

研究代表者

藤本 豊士 (Fujimoto, Toyoshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：50115929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪滴表層は他の生体膜と異なる性質を持ち、様々なタンパク質の機能発現の場となる。我々は小胞体ストレスに晒された肝細胞では本来リポタンパク質として分泌されるはずの脂質が核内に侵入して核内脂肪滴となり、生体膜の主要なリン脂質ホスファチジルコリンを合成するタンパク質CCT を結合・活性化して、ストレスの緩和に寄与することを見出した。一方、飢餓に置かれた細胞では自己成分の分解で生じた脂肪酸を原料として作られる脂肪滴が、CCT とは異なるアイソフォームCCT 3を結合・活性化し、オートファジーを維持し、細胞の生存を助ける働きを持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった肝細胞における核内脂肪滴の形成機構が解明され、CCT 活性化を通じてストレス緩和に寄与することが明らかになった。肝細胞のストレス増悪は脂肪肝などの疾病要因であり、今後、核内脂肪滴を標的とした予防・治療法への展開が期待できる。一方、飢餓時に形成される細胞質脂肪滴はCCT 3活性化を通じてオートファジーの維持に重要な役割を果たすことが分かった。低栄養状態下の癌細胞生存にはこの機序が関与していると推測され、CCT 3を標的とした制癌治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The surface of lipid droplets (LDs) has properties different from other biological membranes and recruit unique proteins. In hepatocytes exposed to the endoplasmic reticulum stress, we discovered that lipids, which are normally secreted as lipoproteins, enter the nucleus and generate nuclear LDs. These nuclear LDs recruit and activate CCT , an isoform of the enzyme critical for phosphatidylcholine synthesis, thereby contributing to mitigation of the endoplasmic reticulum stress. In cells under starvation, free fatty acids derived from digested self materials generate cytoplasmic LDs. On those LDs, CCT 3, a different isoform of CCT, is activated, and this helps cells to maintain autophagy and survive for a prolonged time in starvation.

研究分野：細胞生物学、解剖学一般

キーワード：脂肪滴 ホスファチジルコリン 肝細胞 オートファジー 核膜 小胞体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴は真核細胞に普遍的に存在し、トリグリセリド、ステロールエステルなどの脂質エステルの集塊をコアとし、表面を燐脂質で被われた細胞内構造である。脂肪滴の存在は古くから知られていたが、長い間、過剰脂質貯蔵に特化した静的な構造と考えられていた。しかし最近の研究によってその概念は大きく変わり、脂肪滴は多様な機能に関わる動的なオルガネラであると考えられるようになった。多数の脂肪滴関連タンパク質が新たに同定される一方、リポミクス技術によって脂質の詳細な解析が進み、肥満や脂肪肝などヒト疾患との関連についての研究も大きく進展した。また脂肪細胞や肝細胞など脂質代謝を主たる生理機能とする細胞だけでなく、酵母など多種多様な細胞を用いた研究が行われたことにより、タンパク質輸送やウイルス粒子形成への関与など、当初は予想されなかった機能が脂肪滴に存在することが分かってきた。

我々は脂肪滴にカベオリンが存在すること、脂肪滴表層が特殊な燐脂質組成を持つ脂質一重層であり、Rab18 が特異的に局在することなどを発見し、近年の脂肪滴研究の先鞭をつけた。さらにその後、肝細胞の脂肪滴表層がアポリポプロテイン B100 (ApoB)がオートファジー、プロテアソームという2つのタンパク質分解系によって分解される場となり、UBXD8, Derlin-1 などがその分解に関与することを明らかにした。また直近には肝細胞の核内に存在する脂肪滴が核膜の陥入構造である Nucleoplasmic reticulum (NR)や PML 小体に近接して形成されること、脂肪滴のマイクロオートファジーにニーマンピック病 C 型蛋白質が関与することを報告した。

脂肪滴表層の燐脂質一重層は、疎水性で球状の塊となる脂質エステルの表面を被う形で存在するため、一般的な生体膜の燐脂質二重層とは異なり、自由に曲率を変えられない、脂質エステル塊の表面積に対応して拡張、縮小する必要がある、などの制約を受ける。脂質エステルの合成・分解は、脂肪滴表面の燐脂質量とは独立に変動しうるため、種々の条件下で脂肪滴コアと脂肪滴表層のミスマッチが起こり、燐脂質のパッキングの間隙 (packing defect) が生じることになる。このようにして生じた packing defect には両親媒性を持つタンパク質などが結合することが示されている。このような特殊な膜ドメインとしての性質を持つ脂肪滴表層の機能を解明することは重要な課題である。

2. 研究の目的

脂肪滴表層に生じる packing defect には哺乳類細胞の主要な燐脂質であるホスファチジルコリン (PC) を合成する経路の律速酵素 CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) が結合し、活性化される。この現象は脂肪滴が大きくなる際に脂肪滴を被うのに必要な PC を供給するための機構と理解されてきた。我々は CCT の3つのアイソフォームのうち、CCT α と CCT β 3がそれぞれ異なる条件で形成される脂肪滴にリクルートされ、より細胞全体の機能に関わる意義を持つことを示唆する予備的結果を得た。本研究ではその結果をさらに発展させ、脂肪滴における PC 合成制御の機序とその生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 核内脂肪滴形成機構と CCT α 活性化の意義の解明

CCT α は核に存在する可溶性タンパク質である。我々は肝癌由来培養細胞を用いた研究により、CCT α が核内に存在する脂肪滴に結合することを報告した (Ohsaki et al, J Cell Biol, 2016)。それに引き続く研究で核内脂肪滴の形成機序を調べたところ、ER ストレスなどによって超低比重リポタンパク質 (VLDL) の形成、分泌が阻害された場合に、VLDL 前駆体である脂質顆粒が ER 内腔に滞留し、さらに核膜槽、NR に逆流し、核内脂肪滴の形成に至ることを示唆する予備的結果を得た。この予想外の機序でできた核内脂肪滴に CCT α がリクルートされて PC 合成が活性化されると、膜新生が増加して ER が拡張し、ER ストレスが軽減されるのではないかと考えた。

この仮説について検証するため、まず NR 内腔に逆流した VLDL 前駆体が内核膜を隔てた核質側に核内脂肪滴形成を誘導する機序について、VLDL 前駆体、核内脂肪滴、NR 膜のマーカーの多重蛍光標識、ライブイメージング、電顕観察などを用いて解析する。また NR 膜の伸長

を制御する因子についても調べる。ついで核内脂肪滴において CCT α と相補的な分布を示す脂肪滴結合タンパク質 Perilipin-3 の発現レベルを操作し、CCT α の挙動、PC 合成活性、ER スレス応答に与える影響を探究する。

また肝細胞と異なり、リポタンパク質合成能を持たない細胞での核内脂肪滴形成機構を明らかにするために骨肉腫由来 U2OS 細胞を用いて検討する。脂質合成酵素の核膜への分布の有無を調べ、脂質合成酵素発現抑制の影響、核内脂肪滴のライプイメーシングなどを行う。また Perilipin-3 の発現操作が CCT α の挙動、PC 合成活性に与える影響を調べる。

(2) オートファジーにおける CCT β 3活性化の意義の探究

CCT β 3は細胞質の可溶性タンパク質として存在するが、アミノ酸飢餓でオートファジーが誘導されると、自己成分の分解で遊離した脂肪酸を原料として形成される細胞質脂肪滴に特異的に結合することが分かった。CCT β 3が結合した脂肪滴付近で隔離膜が形成され、新規合成された PC が取り込まれることを示唆する結果も得た。

オートファジーにおいて CCT β 3が担う役割を明らかにするため、オートファジーによって形成された脂肪滴、不飽和脂肪酸負荷で形成された脂肪滴について、CCT β 3、CCT β 3と N 末の一部だけが異なる CCT β 2、CCT α の挙動を比較する。また GFP でタグした WIPI, DFPC1, LC3 などオートファジー膜形成の各段階のマーカーを発現する細胞、Atg5, Atg7 など必須遺伝子を欠損した細胞などを用い、ライプイメーシング、オートファジー活性定量などを行い、CCT β 3発現の増減がオートファジーに与える影響を解明する。凍結切断レプリカを用いた解析により、オートファジー膜への新規合成 PC の取り込みについて詳細に解析する。CCT β 3を欠損する細胞を作製し、オートファジー活性や飢餓時の細胞の生存に対する影響を調べ、さらに CCT β 3欠損細胞に種々の CCT β 3変異体を発現させることにより、CCT β 3のどの部分が機能的に重要なかを明らかにする。

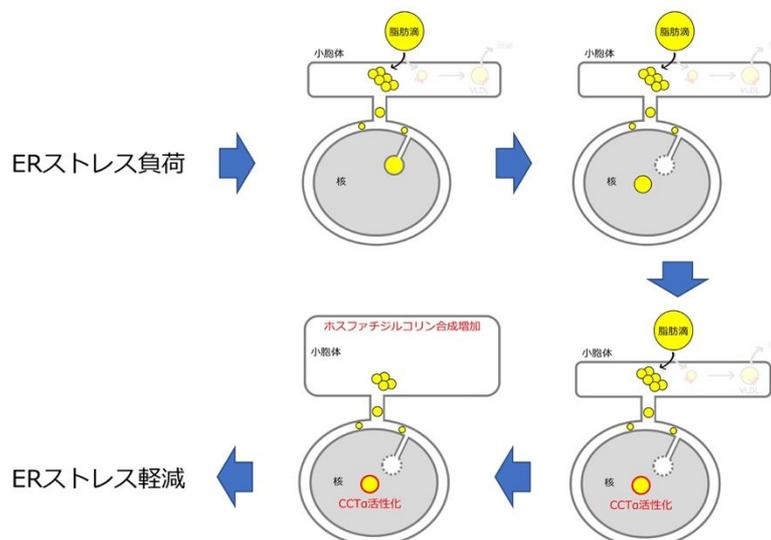
4. 研究成果

(1) 核内脂肪滴形成機構と CCT α 活性化の意義の解明

核内脂肪滴は肝細胞で比較的多く見られるが、その生理的意義や形成のメカニズムについてはほとんど分かっていなかった。我々は肝細胞の重要な機能である VLDL 合成との関係に着目し、下記の知見を得た。なお VLDL 合成過程には、コアとなるタンパク質である ApoB とともに脂質輸送活性を持つ Microsomal triglyceride transfer protein (MTP)が必須であることが分かっている。肝細胞の核内脂肪滴は MTP 阻害によって減少する。小胞体ストレス下では MTP の発現量は維持されるが ApoB は減少するため、VLDL 前駆体である ApoB を持たない脂肪顆粒 (ApoB-free luminal LD) が小胞体内に蓄積し、小胞体内腔の脂肪滴として観察されるようになる。内腔脂肪滴は核内膜が伸長して形成される type I NR の内腔で巨大化し、最終的には NR 膜の破綻を引き起こして核質内に移行し、核内脂肪滴となる。核質脂肪滴には CCT α がリクルートされ、活性化される。核質に存在する Perilipin-3 は CCT α と競合的に核内脂肪滴に結合し、Perilipin-3 の発現量の増加、減少は、それぞれ CCT α の核質脂肪滴への結合量の減少、増加、さらに PC 合成量の減少、増加を引き起こす。

Perilipin-3 の発現抑制は PC 合成を増加させることにより、小胞体ストレス応答を低減させる。小胞体内腔の脂肪滴や核内脂肪滴は、肝細胞株だけでなく、長期間高脂肪食を給餌し、小胞体ストレスを负荷したマウス体内の肝細胞でも認められる。

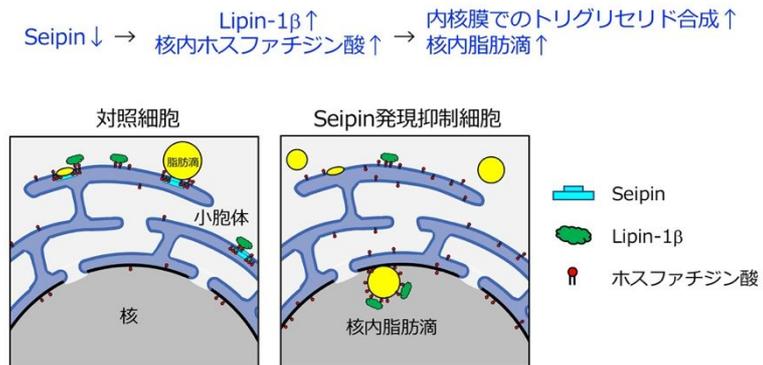
これらの結果は、小胞体ストレスに曝露された肝細



胞では核内脂肪滴が多数形成されることによってPC合成が活性化され、それによる小胞体膜の増量、小胞体容積の増大が小胞体ストレスの緩和をもたらすというフィードバック機構の存在を示唆する。

一方、リポタンパク質合成能のないU2OS細胞での核内脂肪滴形成については以下の結果を得た。核内膜にはトリグリセリド合成に関わる酵素が存在し、核内脂肪滴を形成する。核内膜での核内脂肪滴形成には細胞質脂肪滴の形成に重要な機能を担うSeipinは関与しない。Seipinの発現を抑制すると、Lipin-1 β 発現増加、核内ホスファチジン酸増加が起こる。その結果として内核膜でのトリグリセリド合成が増加する。肝細胞と異なり、Perilipin-3の発現抑制はPC合成にほとんど影響を与えない。

これらの結果は、リポタンパク質合成能を持たない細胞では肝細胞とは異なり、核内膜でのトリグリセリド合成によって核内脂肪滴が形成され、PC合成調節への寄与度も異なることを示唆する。

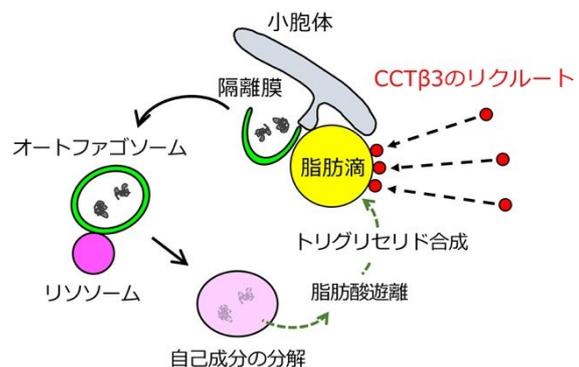


(2) オートファジーで形成される脂肪滴について

アミノ酸飢餓でオートファジーが誘導された細胞において、下記の結果が得られた。新規に合成されたPCはオートファゴソーム膜に優先的に取り込まれる。CCT β 3は、通常培養条件下では細胞質にびまん性に存在するが、短時間(1~2時間)飢餓時にはオメガソームなどのオートファジー関連構造に、長時間(8時間~3日)飢餓時にはオートファジー依存性に形成された細胞質脂肪滴にリクルートされる。一方、CCT α 、CCT β 2はそれぞれ核質、細胞質の可溶性画分にあり、CCT β 3のような分布変化を示さない。アミノ酸を含む通常の培地で培養した細胞に不飽和脂肪酸を付加して作らせた細胞質脂肪滴にはCCT β 3はリクルートされない。CCT β 3の過剰発現により長時間飢餓の細胞でのオートファゴソーム形成やオートファジー活性が増加する。CCT β 3の発現抑制はオートファゴソーム形成やオートファジー活性を減少させる。

~の結果はマウス線維芽細胞で得られたが、骨肉腫由来の癌細胞であるU2OS細胞でもCCT β 3を欠損させると、長期飢餓時のオートファジー活性が減弱し、さらに細胞の生存率が著しく低下する。

以上の結果から、長期間飢餓状態におかれた細胞では、オートファジーによる自己成分の分解で遊離した脂肪酸を原料として脂肪滴が形成され、そこにリクルートされたCCT β 3の活性化がオートファジー膜形成に必要なPC合成の活性化をもたらす、それによって細胞の生存維持に寄与すると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Soltysik K, Ohsaki Y, Fujimoto T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Duo in a mystical realm - nuclear lipid droplets and the inner nuclear membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Contact	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2515256419896965	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 Ogasawara Y, Tsuji T, Fujimoto T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Multifarious roles of lipid droplets in autophagy? Target, product, and what else?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2020.02.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大崎雄樹、藤本豊士	4. 巻 30
2. 論文標題 核内脂肪滴の形成機序と機能の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Lipid	6. 最初と最後の頁 346-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小笠原裕太、辻琢磨、藤本豊士	4. 巻 -
2. 論文標題 オートファジーと脂肪滴の関わり	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soltysik Kamil, Ohsaki Yuki, Tatematsu Tsuyako, Cheng Jinglei, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08411-x	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 Tsuji Takuma, Fujimoto Toyoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Lipids and lipid domains of the yeast vacuole	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Society Transactions	6. 最初と最後の頁 1047 ~ 1054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BST20180120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sobol Margarita, Krausova Alzbeta, Yildirim Sukriye, Kalasova Ilona, Faberova Veronika, Vrkoslav Vladimir, Philimonenko Vlada, Marasek Pavel, Pastorek Lukas, Capek Martin, Lubovska Zuzana, Ulicna Livia, Tsuji Takuma, Lisa Miroslav, Cvacka Josef, Fujimoto Toyoshi, Hozak Pavel	4. 巻 131
2. 論文標題 Nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate islets contribute to efficient RNA polymerase II-dependent transcription	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.211094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimura Hana, Arasaki Kohei, Ohsaki Yuki, Fujimoto Toyoshi, Ohtomo Takayuki, Yamada Junji, Tagaya Mitsuo	4. 巻 59
2. 論文標題 Syntaxin 17 promotes lipid droplet formation by regulating the distribution of acyl-CoA synthetase 3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 805 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M081679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yang Long, Wang Leilei, Ketkar Harshada, Ma Jinzhu, Yang Guang, Cui Shuang, Geng Tingting, Mordue Dana G., Fujimoto Toyoshi, Cheng Gong, You Fuping, Lin Rongtuan, Fikrig Erol, Wang Penghua	4. 巻 9
2. 論文標題 UBXN3B positively regulates STING-mediated antiviral immune responses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04759-8	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 該当する

1. 著者名 Sugo Masashi, Kimura Hana, Arasaki Kohei, Amemiya Toshiki, Hirota Naohiko, Dohmae Naoshi, Imai Yuzuru, Inoshita Tsuyoshi, Shiba Fukushima Kahori, Hattori Nobutaka, Cheng Jinglei, Fujimoto Toyoshi, Wakana Yuichi, Inoue Hiroki, Tagaya Mitsuo	4. 巻 37
2. 論文標題 Syntaxin 17 regulates the localization and function of PGAM5 in mitochondrial division and mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e98899 ~ e98899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201798899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Toyoshi Fujimoto
2. 発表標題 Lipid droplets in the hepatocyte nucleus
3. 学会等名 17th Chinese Biophysics Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyoshi Fujimoto
2. 発表標題 Lipid droplet formation in the nucleus
3. 学会等名 University of Zurich Institute of Molecular Life Sciences Lecture series in molecular life sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyoshi Fujimoto
2. 発表標題 Nuclear lipid droplets
3. 学会等名 EuroCellNet Workshop “ Nuclear architecture, lipids, and phase separation ” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本豊士
2. 発表標題 脂肪滴の謎を探る
3. 学会等名 認定NPO法人 総合画像研究支援 創立十五周年記念シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本豊士
2. 発表標題 肝細胞核内脂肪滴の生理的機能
3. 学会等名 第39回アルコール医学生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本豊士
2. 発表標題 脂質の細胞生物学 ~脂肪滴と脂質ドメインの解析~
3. 学会等名 The Future of Diabetes Conference 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本豊士
2. 発表標題 脂肪滴：多様な機能を持つオルガネラ
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyoshi Fujimoto
2. 発表標題 Nuclear lipid droplets: how they form and what they do in hepatocytes.
3. 学会等名 59th International Conference on the Bioscience of Lipids（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toyoshi Fujimoto
2. 発表標題 Nuclear lipid droplets in hepatocytes: Implications for hepatic steatosis
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference “Lipid Droplets on the Move from Health to Disease”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

肝細胞の中の脂肪滴はストレスに対抗する機能を持つことが明らかに！
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Nature_C_20190129.pdf

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
研究分担者	大崎 雄樹 (Ohsaki Yuki) (00378027)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	辻 琢磨 (Tsuj i Takuma) (40725628)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関