

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K13521

研究課題名(和文) 動脈硬化症を誘発するマクロファージ内脂質蓄積化メカニズムの新シナリオ

研究課題名(英文) Biophysical principles of liquid-liquid crystal phase transition in macrophage lipid droplets

研究代表者

下林 俊典 (Shimobayashi, Shunsuke)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：50787124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪滴はトリグリセリドとコレステリルエステル(SE)で主に構成され、これらはリン脂質の単層膜とタンパク質によって覆われています。SEが液晶の性質を持つにも関わらず、脂質の組成とその物理的な状態との関連性はまだ十分に理解されていません。本研究では、脂肪滴の細胞内相図を定量し、それがin vitroでの相図と定量的に一致することを明らかにしました。さらに、SEがほぼ生体に近い条件下で液体から液晶への相転移を引き起こすことを明らかにしました。さらに、拘束下での液晶理論を用いて、液晶化した脂質滴内での放射状の分子配列が、滴の表面でのアンカーリング力によって引き起こされることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージで見られる脂質の異常蓄積は、動脈硬化の主要な要因とされています。マクロファージの脂肪滴で多いとされるコレステロールエステルが脂肪滴の相転移を誘導することを見出した本研究は、動脈硬化の予防や治療に向けた新たな戦略を模索する可能性を秘めており、その社会的意義も極めて大きいと言えます。今後より生体内に近い条件下での脂質蓄積過程が解明されることが期待でき、その学術的価値はますます高まっていくものと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Lipid droplets are cytoplasmic microscale organelles involved in energy homeostasis and handling of cellular lipids and proteins. The core structure is mainly composed of two kinds of neutral lipids, triglycerides and cholesteryl esters, which are coated by a phospholipid monolayer and proteins. Despite the liquid crystalline nature of cholesteryl esters, the connection between the lipid composition and physical states is poorly understood. Here, we present a universal intracellular phase diagram of lipid droplets, semiquantitatively consistent with the in vitro phase diagram, and reveal that cholesterol esters cause the liquid-liquid crystal phase transition under near-physiological conditions. We moreover combine in vivo and in vitro studies, together with the theory of confined liquid crystals, to suggest that the radial molecular alignments in the liquid crystallized lipid droplets are caused by an anchoring force at the droplet surface.

研究分野：生物物理

キーワード：相転移 液晶 脂肪滴 オルガネラ ソフトマター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリオン様ドメインを持つタンパク質が神経細胞内で相転移し、不溶化することでアルツハイマー病などの神経疾患を引き起こすことが指摘されています。このように、分子が集まり相転移現象を引き起こすことは、細胞にとって大きな影響を及ぼし疾患の原因となることが知られています。我々は、細胞質にある脂肪滴という細胞のエネルギー貯蔵やタンパク質分解や脂質の合成などの機能をもつ脂質オルガネラにおいても同様の相転移現象が疾患を誘発するのではないかと考えました。我々は、動脈硬化症を引き起こす泡沫化マクロファージの脂肪滴にはコレステロールエステルという脂質が多く存在することを確認しました。さらに、そのコレステロールエステルが体温で液晶状態になる可能性を解き明かしました。これらの知見をまとめ、マクロファージの脂質異常が液体から液晶への脂肪滴の相転移によって引き起こされているのではないかと今までにはない新しい仮説を立てました。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪滴がステロールエステルを取り込んでいく過程でみられる脂肪滴内脂質の相転移現象を可視化し、その物理基盤を定量的に解明することです。さらに、それがマクロファージの泡沫化に与える影響を明らかにすることを目指しました。

3. 研究の方法

ヒト肝臓がん由来の Huh7 細胞を用いて、外部からコレステロールを細胞に取り込ませ、脂質組成を制御しました。脂肪滴の脂質組成を TLC アッセイにより定量するとともに、偏光顕微鏡観察により液晶状態への変化を実観察しました。温度や脂質のモル比をパラメータとした相図を作成し、その液体、液晶の相転移を定量的に解明しました。さらに、in vitro で artificial lipid droplets を脂質と界面活性剤を用いて作成し、in vivo と同様に相図を作成し、in vivo と in vitro での相転移動態の相違を定量的に調べました。さらに、得られた結果を液晶液滴の物理理論を用いて定量的な物理的解釈をおこなうことで、細胞内脂肪滴でみられる相転移現象の生物物理基盤を構築しました。

4. 研究成果

(i) 細胞内脂肪滴の液体液晶相転移の定量

脂肪滴は、中性脂質 トリアシルグリロール (triacylglycerol; TAG) とステロールエステル (esterified sterol; SE) などの中性脂質が脂質一重膜と膜タンパク質に覆われているオルガネラです。我々は、SE が液晶性分子であることに着目し、脂質の組成と脂肪滴の相状態の因果関係を検証しました。培地に添加するコレステロールの濃度を 25, 50, 170 μM と変化させ、高精度温度制御下で偏光顕微鏡を用いて細胞内脂肪滴の液晶構造を可視化しました(図 1)。液晶脂肪滴をもつ細胞の割合 p (%) を温度 T の関数として定量しました。結果、温度上昇に伴い p (%) は総じて減少しました。以上の定量データを用いて、 $0 < p < 50$ の場合は「脂肪滴は液体相」、 $50 < p < 100$ 「脂肪滴は液晶相」と大別しました。横軸に脂質量比を、縦軸に温度をとり、細胞内脂肪滴の液体 - 液晶相転移の相図を作成しました。なお、各条件における脂質量比は脂肪滴を遠心分離により単離し、TLC アッセイによって求めました。更に、この相転移現象の普遍性を調べるために、U2OS 細胞と MEF 細胞を用いて同様の実験を行い、データ点を相図に重ね合わせたところ、細胞種に依らない液体 - 液晶相転移の普遍的な相境界が得られました。以上より、縦軸を温度横軸を SE と TAG の質量比とした細胞内脂肪滴の相図の定量に初めて成功し(図 3)、SE が液体液晶相転移を駆動することを定量的に解明しました。

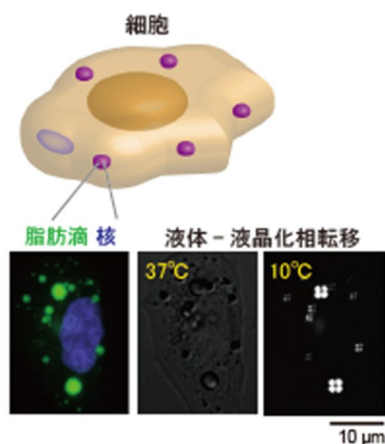


図 1: 温度変化による脂肪滴の液体-液晶相転移

(ii) 試験管内脂肪滴の液体液晶相転移の定量

脂肪滴液晶化のメカニズムを更に明らかにするため、試験管内で界面活性剤、水、中性脂質 (TAG/SE) を用いて人工的に脂肪滴を再構成し(図 2) その相挙動を調べました。結果、in vivo と in vitro で相境界が定量的に合致し(図 3)、細胞内脂肪滴は TAG 及び SE の二成分系とみなして解釈することが可能であり、SE が液晶化を駆動することが明らかとなりました。

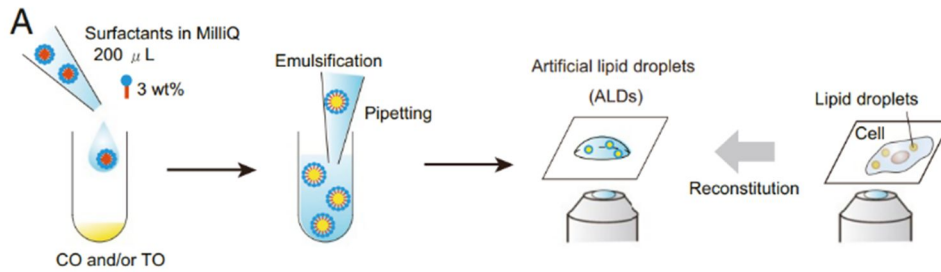


図 2: 人工脂肪滴作成プロトコル

(iii) 脂肪滴内液晶構造の物理的解釈

マイクロ・ナノ空間に拘束された液晶分子の挙動は、液晶ディスプレイといった応用の観点から統計物理学やソフトマター物理学における研究対象とされてきました。それらの知見をもとに、細胞内の脂肪滴というマイクロ・ナノ空間に拘束された液晶分子がいかにかふるまうのか？という問いに迫りました。拘束下にある液晶分子の自由エネルギーは以下のように記述されます。

$$F = \frac{1}{2} \int [K_{11}(\nabla \cdot \mathbf{n})^2 + B\gamma^2] dV + \frac{1}{2} \int W_0 \sin^2(\theta - \theta_0) dA.$$

我々はこの自由エネルギーモデルをもとに人工脂肪滴と細胞内脂肪滴でみられる偏光パターンを定量解析しました。特に人工脂肪滴では、液滴のサイズによって内部の液晶構造がポリドメイン構造から、細胞内の脂肪滴でもみられる放射線状配向へと転移することが明らかとなりました(図4)。この構造転移を手がかりに理論的な解釈を進めていくことで、最終的に細胞内脂肪滴でみられる放射線状の分子配向は脂肪滴界面でのアンカリング力によってもたらされると結論づけました。

これまでの結果は学術論文としてまとめられ、米国国際論文誌 *PNAS* に掲載されました。本研究は文部科学省若手科学者賞や日本生物物理学会若手奨励賞の受賞対象業績となるなど、国内外問わず評価されています。

() 脂肪滴の内部構造と機能の相関について

脂質蓄積メカニズムの解明のためには内部構造が脂肪滴界面のタンパク質組成にどのような影響を与え、脂質代謝に寄与するかが重要であると考えられます。脂肪滴表面にいるタンパク質ファミリーが相転移によって受ける変化を明らかにしました。

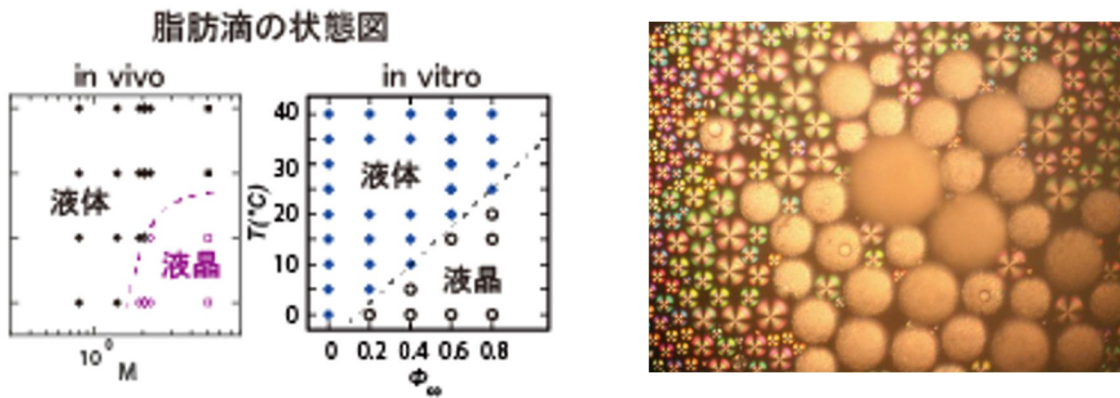


図 3: 細胞内、試験管内における脂肪滴の相図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimobayashi Shunsuke F., Ohsaki Yuki	4. 巻 116
2. 論文標題 Universal phase behaviors of intracellular lipid droplets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 25440 ~ 25445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1916248116	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下林俊典、大崎雄樹
2. 発表標題 細胞内脂肪滴の普遍的な相挙動
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------