

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19370056

研究課題名（和文） 細胞内脂肪滴の動態と機能調節機構に関する研究

研究課題名（英文） Studies of Lipid Droplets: Intracellular Dynamics and Regulatory Mechanisms of Functions

研究代表者

大隅 隆 (OSUMI TAKASHI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：50111787

研究成果の概要（和文）：脂肪滴は中性脂肪を貯蔵する細胞小器官である。脂肪滴には特有のタンパク質が結合しており、脂肪滴の組織特異性を規定していると考えられる。心臓で高発現する脂肪滴結合タンパク質 MLDP のノックアウトマウスを作製・解析したところ、心臓の脂肪滴が消失し、脂肪・糖代謝が亢進していた。また脂肪の病的蓄積によって起こる心筋症に対して抵抗性を示した。このほか、脂肪細胞のカテコールアミン応答性脂肪動員における、脂肪滴と脂肪滴結合タンパク質の動態を解析した。

研究成果の概要（英文）：Lipid droplets (LDs) are organelles storing neutral lipids. Specific sets of proteins bind to the surface of LDs, probably providing LDs with tissue specificities. We generated and characterized mice lacking MLDP, a LD-binding protein enriched in the heart. These mice completely lacked LDs in the heart, and exhibited higher level of metabolism of fat and carbohydrate. Consequently, they exhibited enhanced resistance to cardiomyopathy due to aberrant accumulation of fat in the heart. We also studied the morphological changes of LDs and redistribution of LD-binding proteins during catecholamine-dependent lipid mobilization in adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：脂肪滴、心臓、ノックアウトマウス、中性脂肪、脂肪酸、心筋症、脂肪滴結合タンパク質、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞内脂肪滴（以下、脂肪滴）は、真核

生物の細胞に広く存在する構造体であり、トリアシルグリセロール（TG）を主成分とする

コアをリン脂質一重層が取り囲み、その表面にさらに種々のタンパク質が結合したものである。脂肪滴は特有のタンパク質組成をもち、制御された脂質代謝を営んでいることから、最近では細胞小器官のひとつとみなされている。脂肪滴の機能調節は、肥満や脂肪肝などの病態と関連して、世界的に重要な研究分野となっている。

脂肪滴の機能や形態は、組織によって大きく異なる。脂肪組織の巨大な脂肪滴は、生体の余剰エネルギーをTGの形で長期間、大量に貯蔵するが、他の器官の脂肪滴ははるかに小さく、脂肪酸をエネルギー源として利用する過程で一部を一時的に再エステル化し、TGとして保管する場所と考えられる。実際、脂肪酸の利用能が特に高い心臓などは、きわめて微小な脂肪滴をもつ。脂肪滴表面には、PATファミリーとよばれるタンパク質群（後述のMLDPを含め、5種類のタンパク質が知られている）が組織特異的に結合している。脂肪細胞においては、飢餓時にカテコールアミン刺激に応答して蓄積脂肪の加水分解（以下、脂肪分解）が促進され、それによって血中に放出された脂肪酸が、他の組織においてエネルギー源として利用される（脂肪動員）。その際、脂肪組織特異的PATタンパク質であるペリリピンが、カテコールアミン刺激に応答してリン酸化される。ノックアウトマウスを用いた解析により、ペリリピンの可逆的リン酸化は、脂肪細胞における脂肪の蓄積と分解に中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。このような知見から、我々は脂肪滴の機能特異性はPATタンパク質によって規定されると推論し、研究を進めてきた。

まずペリリピンによる脂肪分解調節の機構を明らかにするため、ペリリピンと相互作用するタンパク質としてCGI-58を同定した。CGI-58は、全身におけるTGの異常蓄積を主徴

とするChanarin-Dorfman症候群（CDS）の原因遺伝子として報告されていた。我々はCGI-58の機能を解析し、これがリパーゼの活性化タンパク質であり、脂肪分解に重要な役割をもつことを明らかにした

CGI-58はリン酸化されたペリリピンとは相互作用せず、脂肪細胞における脂肪分解刺激時には速やかに大きな脂肪滴表面から離れ、細胞質ゾルおよび微小なドット状構造に移行することが観察された。この結果は、脂肪分解の主要な場が脂肪滴であるとすれば、CGI-58が脂肪分解において重要な役割をもつことと矛盾する。一方、脂肪分解過程での脂肪滴の挙動をCARS（Coherent Anti-Stokes Raman Scattering）顕微鏡によって解析した。その結果、脂肪分解刺激を受けた脂肪細胞では、細胞質全体の、大きな脂肪滴から離れた場所に、多数のごく微小な脂肪滴がまず出現し、時間とともにやや大きな微小脂肪滴へと成長するのが観察された。これらの観察にもとづき、我々は、新たに作られた極微小脂肪滴が、大きな脂肪滴からTGを受け取って成長しつつ、同時に主要な脂肪分解の場を形成するのではないかとの仮説を立てた。

一方、PAT タンパク質の機能特異性をさらに解析するため、マウス EST データベースを探索し、新たな PAT タンパク質遺伝子を同定した。このタンパク質は心臓でほぼ特異的に発現する脂肪滴結合タンパク質であり、MLDP(Myocardial lipid droplet protein)と名づけた。心臓は脂肪酸代謝が特に盛んな臓器であり、その脂肪滴はきわめて微小である。また MLDP は、絶食時には心臓のほか、肝臓でも発現が誘導される。この際には、脂肪動員によって脂肪組織から大量に放出された脂肪酸が各組織において利用される。これらの知見から我々は、MLDP は脂肪滴における活発な脂肪分解を保証する因子であると推定

し、それを検証すべく MLDP ノックアウト (MLDP-KO)マウスの作出に着手した。

2. 研究の目的

(1) MLDP-KOマウスの解析

生体におけるMLDPの役割を明らかにするため、MLDP-KOマウスを作成し、表現型を解析する。このマウスではMLDP高発現部位である心臓に脂肪の異常蓄積が起これ、脂肪が高負荷された条件では肝臓などにも異常が生じると期待される。そこで通常食での長期飼育、高脂肪食投与、絶食などの諸条件下に個体レベルの表現型を調べ、さらに組織レベルで病理学的、生理学的異常の有無を調べる。

(2) 脂肪分解刺激に応答した微小脂肪滴形成過程の解析

脂肪分解刺激時に新たに形成される極微小脂肪滴の機能を、形態学的手法により解析する。CGI-58、種々のPATタンパク質、リパーゼなどを、GFPまたはRFP融合タンパク質として3T3-L1脂肪細胞に発現させ、CARS顕微鏡による脂肪滴の観察と蛍光観察とを組み合わせ、長時間の多重タイムラプス観察を行う。これらのタンパク質が新たに形成された極微小脂肪滴に結合するか、その結合はどのような時間経過で起こるか、などを詳細に観察し、極微小脂肪滴が主要な脂肪分解の場となるという仮説を検証する。

(3) PATタンパク質の機能特異性の解析

脂肪分解におけるPATタンパク質の機能特異性を、in vivo と in vitro において明らかにする。3T3-L1細胞を用いて、個々のPATタンパク質をノックダウンした細胞や、PATタンパク質を異所的に発現させた細胞を樹立する。それらの細胞や MLDP ノックアウトマウス由来の細胞について、細胞レベルで脂肪分解活性を調べる。またそれらの細胞から分離した脂肪滴を用いて、in vitro のリパーゼ

アッセイを行う。

3. 研究の方法

(1) MLDP-KOマウスの解析

KOマウスの作製は定法どおりES細胞への相同組換えを利用して行い、C57BL/6J系統への戻し交配を経て実験に用いた。

(2) 脂肪分解刺激に応答した微小脂肪滴形成過程の解析

各種PATタンパク質およびリパーゼをGFPまたはmCherryにつないだものを、レンチウイルスベクターを用いて3T3-L1細胞に発現させ、クローン化したものを実験に用いた。

生細胞の蛍光観察は、未来ICTセンター研究所の平岡泰、原口徳子両博士のもとで、高解像度顕微鏡システムを用いて行った。マルチプレックスCARS顕微鏡による観察は、東京大学大学院理学系研究科化学専攻の加納英明、濱口宏夫両博士のもとで行った。

(3) PATタンパク質の機能特異性の解析

PATタンパク質のノックダウンは、shRNAのコード配列をもつレンチウイルスを細胞に感染させることによって行った。

心筋細胞は生後1.5-3日後のマウス心臓をコラゲナーゼとトリプシンを用いて処理することによって調製した。脂肪酸酸化活性は、シクロデキストリンに結合させた $[^{14}\text{C}]$ パルミチン酸を培地に添加し、 CO_2 と、細胞内外の酸可溶性および不溶性画分に取り込まれた放射能を測定することによって評価した。

4. 研究成果

(1) MLDP-KOマウスの解析

最初に得たKOマウスは129系統とBL/6系統とのハイブリッドであったため、実験結果の再現性が悪かった。そこで1年半あまりをかけてBL/6への戻し交配を重ね、ようやく安定した結果が得られるようになった。

まず MLDP を特に高発現している心臓について重点的に調べた。MLDP-KO マウスの心臓では、TG と脂肪酸の含量が顕著に減少していた。電子顕微鏡観察の結果、意外なことに、KO マウスでは心臓に脂肪滴が全く観察されなかった。これに対して、肝臓や褐色脂肪組織、白色脂肪組織などでは野生型と同様に脂肪滴が観察された。これらの組織でも、TG や脂肪酸の含量に双方のマウスで有意差が見られる場合があったが、組織や食餌条件などによってその傾向は一定ではなかった。

MLDP-KO マウスと野生型マウスとの間で、体重、体長、生殖能などに差は見られなかった。種々の代謝物質の血中濃度にも大きな差はなかったが、遊離脂肪酸については絶食時に KO マウスで有意に高かった。グルコース負荷試験において、KO マウスは有意に高い耐糖能を示し、この傾向は高脂肪食投与による肥満の状態でもより顕著であった。一方、インスリン負荷試験においては、KO マウスでややインスリン感受性の向上が見られた。各組織へのグルコースの取り込みを見たところ、心臓でのみ有意に取り込みが増加していた。KO マウスは野生型よりも夜間の酸素消費量が高く、活動量も有意に高かった。しかし呼吸商には差がなかった。

病的状態での MLDP 欠損の効果を調べるため、ストレプトゾトシン投与によって実験的糖尿病を誘導した。この処置により野生型マウスでは心臓に TG や脂肪酸が蓄積したが、KO マウスではそれが抑制されていた。また脂肪毒性のメディエーターとなる活性酸素の発生や、繊維化の生化学的指標であるコラーゲンの分泌が、KO マウスでは抑えられていた。すなわち MLDP-KO マウスは糖尿病による心筋症に対して抵抗性をもつものと考えられる。

MLDP の欠損によって心臓の脂肪滴が消失

するという結果は、研究開始前の予測とは全く逆であった。当初の仮説のように MLDP は心臓における活発な脂肪分解を保證するものではなく、むしろ活発な脂肪分解から TG を保護し、脂肪滴を維持する役割をもつと考えられる。他の組織は心臓ほど脂肪代謝が活発ではないため、MLDP が欠損しても別の PAT タンパク質によって機能的に補償されると考えられる。

(3)で述べるように、MLDP-KO マウスの心筋細胞では脂肪酸の酸化的代謝が亢進しており、TG として蓄積できない脂肪酸を活発に処理していると考えられる。実際、種々の脂質、糖代謝系のタンパク質の発現が KO マウスでは高まっており、このような適応が達成されていることを示している。おそらくこのことが、病的状態での脂肪蓄積の抑制、ひいては病変の軽減を導いているのであろう。これらの結果は、MLDP の機能を抑えることによって心筋症などの症状を改善できる可能性を示唆しており、今後の展開が期待される。また MLDP を比較的高レベルで発現する骨格筋、肝臓、褐色脂肪組織などにおけるこのタンパク質の役割についても、今後の課題である。

(2) 脂肪分解刺激に応答した微小脂肪滴形成過程の解析

脂肪細胞に高発現している PAT タンパク質ペリリピン、主要なリパーゼである ATGL と HSL、およびペリリピンの相互作用因子であり、ATGL の活性化タンパク質である CGI-58 について実験を行った。これらのタンパク質の GFP または mCherry 融合体を 3T3-L1 脂肪細胞に発現させ、脂肪分解過程における挙動を追跡した。また、内在性のタンパク質についても固定細胞を用いた蛍光抗体法により、細胞内分布を観察した。

ペリリピンは、脂肪分解刺激の前後で脂肪

滴表面に観察された。HSL は刺激前にはサイトゾルに均一に分布していたが、刺激後、ただちに既存の脂肪滴表面に結合するのが認められた。さらに、刺激数分後頃から両者が共存する点状構造が見え始め、時間とともにその数が増加した。脂肪細胞を含めて、脂肪分解により生じた脂肪酸は、高い比率(脂肪細胞では 50%以上)で TG へと再エステル化されることが知られている。再エステル化阻害剤を 3T3-L1 脂肪細胞に与えて脂肪分解刺激を加えたところ、ペリリピンと HSL が共存する点状構造は見られなくなった。また、3T3-L1 細胞にあらかじめ重水素標識した脂肪酸を与えて TG として蓄積させておき、その後脂肪分解刺激を加え、マルチプレックス CARS 顕微鏡により観察したところ、既存の脂肪滴と同様に重水素標識された微小脂肪滴が出現するのが観察された。これらの結果から、脂肪分解によって生じた脂肪酸の多くは再エステル化され、小胞体で微小脂肪滴へとパッケージされるが、その表面にはペリリピンと HSL が結合して、再びそこに含まれる TG を分解すると考えられる。

一方 ATGL は、我々の観察結果では脂肪分解刺激の前後で脂肪滴表面に存在していなかった。CGI-58 は刺激前には脂肪滴表面に局在していたが、刺激後には速やかに脂肪滴から遊離し、細胞質へと拡散した。二重観察の結果、両者は細胞質内の核に比較的近い部分で、不定形の構造に共存していた。細胞分画を行ったところ、刺激後には両者は膜画分に多く回収されるようになり、ショ糖密度勾配遠心では非常に幅広い密度分布を示した。このような分布の形成は、脂肪酸の再エステル化を阻害した条件でも見られた。また免疫学的共沈法により、両者は膜画分で相互作用していることが確認された。これらの結果から、ATGL と CGI-58 は小胞体などの膜上で相互作

用し、再エステル化によって生じた TG をその場で分解する役割をもつと推論した。

(3) PAT タンパク質の機能特異性の解析

MLDP-KO マウスと野生型マウスの心臓の初代培養細胞を調製し、¹⁴C 標識脂肪酸を与えて脂肪酸酸化活性を調べた。KO マウス由来の心筋細胞では、CO₂ および細胞内酸可溶性画分 (アセチル-CoA や TCA サイクル中間体を反映) への放射能の取り込みが、野生型マウス由来の細胞よりも有意に高かった。すなわち、MLDP-KO マウスの心臓では脂肪酸の完全酸化活性が高まっていると考えられる。(1)で述べたように心臓へのグルコースの取込みが KO マウスで高まっているのは、脂肪酸のβ酸化によって生じたアセチル-CoA を TCA サイクルで効率よく酸化するために、ピルビン酸からオキサロ酢酸を補給する必要があるためと考えられる。心臓における脂質・糖代謝に関与するタンパク質またはその mRNA の発現は、これに見合うものであった。すなわち、MLDP-KO マウスは、脂肪酸を TG として保持できないために、効率よく酸化的代謝を行うことによってその細胞内濃度を低レベルに保つべく、適応していると考えられる。

3T3-L1 細胞において、PAT タンパク質のペリリピンと ADRP をノックダウンし、その効果を調べた。ペリリピンは、複数の方法によって、いずれもほとんどノックダウンされず、それ以上の実験ができなかった。ADRP をノックダウンした場合、分化した脂肪細胞では脂肪蓄積や脂肪分解速度などに有意の変化は見られなかった。しかし未分化状態の細胞では ADRP のノックダウンによって TG の蓄積が抑えられたことから、ADRP はリパーゼから TG を保護する作用があると考えられる。

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 6 件)

- ① Tanaka, T., Morishige, J., Iwawaki, D., Fukuhara, T., Hamamura, N., Hirano, K., Osumi, T., and Satouchi, K.: Metabolic pathway that produces essential fatty acids from polymethylene-interrupted polyunsaturated fatty acids in animal cells. *FEBS J.* **274**, 2728-2737 (2007)
- ② Akter, Mst. H., Chano, T., Okabe, H., Yamaguchi, T., Hirose, F., and Osumi, T.: Target specificities of estrogen receptor-related receptors: Analysis of binding sequences and identification of Rb1-inducible coiled-coil 1 (*Rb1cc1*) as a target gene. *J. Biochem.* **143**, 395-406 (2008)
- ③ Akter, Mst. H., Yamaguchi, T., Hirose, F., and Osumi, T.: Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target gene of estrogen receptor-related receptor α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 563-568 (2008)
- ④ Gotoh, S., Ohgari, Y., Nakamura, T., Osumi, T., and Taketani, S.: Heme-binding to the nuclear receptor retinoid X receptor α (RXR α) leads to the inhibition of the transcriptional activity. *Gene* **423**, 207-214 (2008)
- ⑤ Nishino, N., Tamori, Y., Osumi, T., Kasuga, M. et al. (全 27 名、19 番目) : FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J. Clin. Invest.* **118**, 2808-2821 (2008)
- ⑥ Yamaguchi, T., and Osumi, T.: Chanarin-Dorfman syndrome: Deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 519-523 (2009)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 山口智広、大隅隆：脂肪滴での脂肪の分解と蓄積における PAT ファミリータンパク質の役割. 第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜、2007)
- ② 西村理津子、佐野由加子、大隅隆、廣瀬富美子：転写因子 hDREF の細胞周期における作用点の解析. 第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜、2007)
- ③ 山下大輔、下田鮎美、大隅隆、廣瀬富美子：転写因子 hDREF の SUMO 化修飾とその役割. 第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会合同大会 (横浜、2007)
- ④ 橋本健志、森本絵美、原口徳子、平岡泰、加納英明、濱口宏夫、山口智広、廣瀬富

美子、大隅隆：脂肪分解刺激に対する脂肪滴表面タンパク質の応答の解析 (第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸、2008))

- ⑤ 南部千恵、橋本健志、山口智広、廣瀬富美子、大隅隆：脂肪滴局在タンパク質 PAT ファミリーの機能特異性の解析 (第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸、2008))
- ⑥ 西村理津子、森美香子、松影昭夫、大隅隆、廣瀬富美子：転写因子 hDREF によるクロマチン構造制御 (第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸、2008))
- ⑦ 廣瀬富美子、大和茜、山口智広、大隅隆：転写因子 hDREF によるクロマチンリモデリング因子 Mi-2a の SUMO 化とその意味 (第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸、2008))
- ⑧ 後藤紗希、中村貴幸、片岡孝夫、大隅隆、竹谷茂：ヘムによる ALAS1 遺伝子の転写調節機構の解析 (第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会 (神戸、2008))
- ⑨ 橋本健志、蓮井志穂、原口徳子、平岡泰、加納英明、濱口宏夫、岡村智雄、廣瀬富美子、大隅隆：脂肪分解刺激に应答した脂肪滴表面タンパク質の挙動とその生理的意義 (第 82 回日本生化学会 (神戸 2009))
- ⑩ 五十嵐彩乃、西村律子、大隅隆、廣瀬富美子：hDREF は S 期後期から M 期への進行に必須である (第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜 2009))
- ⑪ 廣瀬富美子、五十嵐彩乃、大隅隆：hDREF は核膜および核小体周縁のヘテロクロマチン形成を負に制御する (第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜 2009))
- ⑫ 橋本健志、蓮井志穂、原口徳子、平岡泰、加納英明、濱口宏夫、岡村智雄、廣瀬富美子、大隅隆：脂肪分解過程で出現する微小脂肪滴および脂肪滴表面タンパク質の生理的意義 (第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜 2009))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 隆 (OSUMI TAKASHI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：50111787

(2) 研究分担者

山口 智広 (YAMAGUCHI TOMOHIRO)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50347530

岡村 智雄 (OKAMURA TOMOO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号：90553991