

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390049

研究課題名（和文） 細胞内脂質滴の細胞生物学的解析

研究課題名（英文） Cell biological analysis of cytoplasmic lipid droplets

研究代表者

藤本 豊士 (Toyoshi Fujimoto)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50115929

研究成果の概要：

肝細胞の脂肪滴について次のような成果を得た。

- (1) プロテアソーム阻害、多価不飽和脂肪酸投与などにより、小胞体内腔と細胞質の両方に面する特殊な脂肪滴が出現することを見出し、脂質エステルが小胞体膜中に蓄積し得ることを明確に示した。
- (2) 脂質付加後の Apolipoprotein B は小胞体の内腔にあるため、同分子が細胞質側でプロテアソーム分解を受けるためには特殊な機構が必要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：脂肪滴，小胞体，リポ蛋白質，電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

脂質滴 (lipid droplet) は脂質エステルをコアとする細胞内構造である。形態学的には古くから認識されていたが、その機能についての検討は十分でなく、一般には過剰な脂質を蓄積するための構造と考えられてきた。我々は脂質滴の機能的な重要性に着目し、おもに細胞生物学的、超微形態学的なアプローチにより、以下

のような結果を報告してきた。

(1) caveolin, 特に caveolin-2 β が脂質滴に局在する。[JCB 152: 1079, 2001]

(2) 脂質滴外周は特殊な脂肪酸組成を持つ磷脂質一重層である。[JBC 277: 44507, 2002]

(3) ADRP, TIP47 のそれぞれに固有の脂質滴局在ドメインを持つ。[BBRC 306: 333, 2003; 347: 279, 2006]

(4) Rab18 は脂質滴に特異的に局在し、脂質滴からの ADRP 排除、および脂質滴と ER の密着構造 (Lipid droplet-associated membrane) 形成を誘導する。 [JCS 118: 2601, 2005]

(5) VLDL 構成蛋白質の ApoB はプロテアソームやオートファジーを阻害すると脂質滴周囲に集中し、特異な構造

(ApoB-crescent) を形成する。 [MBC 17: 2674, 2006]

これらの結果から、脂質滴が従来考えられていたような静的な構造ではなく、蛋白質分解系や細胞内脂質輸送と機能的に連関する動的なオルガネラであることが明らかになってきた。特に(4)(5)の結果は、脂質滴と ER の構造的な関係が脂質滴機能に重要であることを強く示唆している。

脂質滴に関する初期の研究はおもに脂質代謝との関連で行われ、perilipin などの脂質滴局在蛋白質の機能が明らかにされてきた。一方、脂質滴への caveolin 局在が明らかになった後は、細胞内脂質動態や小胞輸送との関係が注目を集めてきた。過去数年の研究の進展で2つの潮流は融合し、細胞生物学的な観点からの研究だけでなく、肥満や脂肪肝などの疾患予防・治療への応用を視野に入れた脂質滴研究が急速に展開している。このような研究の動向は、申請者の結果も含めて Science 誌の New Focus 欄 (311: 1232-1234, 2006)で紹介され、幅広い領域の関心を集めている。

2. 研究の目的

脂質滴と ER の構造的・機能的連関に焦点を当てて研究を進める。肝細胞の脂質滴に見られる ApoB-crescent は脂質親和性の高い蛋白質がプロテアソーム、オートファジーの分解系で処理される過程で重要な役割を担うと考えられる。

ApoB-crescent が ER の一部または ER に由来する構造であることが明らかになってきた。我々は ApoB-crescent の解析が

脂質滴と ER の構造的・機能的連関を明らかにする上で重要であり、脂質滴形成機構の解明にも直結すると考えている。この観点から次の2点を目的として研究を進める。

(1) ApoB-crescent を手がかりとして、脂質滴と ER を構造的に連関させる分子機構を解明する。

(2) 脂質滴と ER の構造的連関が ApoB 分解、細胞内脂質動態に果たす役割を明らかにする。脂質滴蛋白質や caveolin などの関与も検索する。

3. 研究の方法

脂質滴周囲にある ApoB の特異な集積構造 (ApoB-crescent) を手がかりとして、脂質滴と ER の構造的連関、脂質滴と蛋白質分解機構、細胞内脂質動態の機能的関係を解析する。

(1) コレステロールに対する特異性が異なる4つの薬剤 [コレステロール特異性の高いものから順に Streptolysin O (SLO), filipin, digitonin, Triton X-100] を用いて細胞膜の穿孔 (透過性処理) を行い、下記の実験を行う。なお SLO は低温下で細胞に結合させ、非結合①⑤⑥のものを洗浄除去した後に加温することにより、形質膜だけを選択的に穿孔し、細胞内膜系を無傷に維持することができる。

① ApoB, ER シャペロン (PDI, BiP, ERp72, calreticulin), ER 膜蛋白質 (calnexin), 細胞質蛋白質 (actin, tubulin, Hsp70) などに対する抗体を用いて、異なる透過性処理での標識の可否を免疫組織化学的に検索し、ApoB-crescent と各分子のトポロジカルな関係を明らかにする。

② 異なる透過性処理ののち、細胞をトリプシンで処理し、ApoB, ER シャペロン, ER 膜蛋白質, 細胞質蛋白質の分解の有無をウェスタンブロッティングで解析する。

③ SLO で形質膜だけを穿孔して第一の抗体で標識したのち、異なる透過性処理を行って第二の抗体で標識する。この方法により細胞質に露出した分子と何らかの膜で被われた分子の分別、異なるコンパートメントに分かれて存在する分子の定量的分布検索を行う。

④ 蔗糖密度勾配遠心で脂質滴分画を精製し、異なる透過性処理ののち（または無処理で）、トリプシン消化を行う。ウェスタンブロッティングにより各分子の脂質滴表面への露出度、分子を被っている膜の性質を明らかにする。

(2) ApoB-crescent を被う膜の脂質についての解析を以下のように行う。

① 細胞を filipin で処理し、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で ApoB-crescent を被う膜のコレステロール量の多寡を定性的に解析する。

② *lo* 相に入る DilC16(3), *ld* 相に入る FAST-Dil で細胞を標識して、ApoB-crescent の標識強度を ER と比較し、ApoB-crescent の膜の脂質の性質を検索する。

③ ApoB-crescent の含量が異なる細胞から得た 2 群の脂質滴を材料として、薄層クロマトグラフィー、生化学的定量、質量分析法で脂質成分の比較解析を行う。質量分析は田口良教授（東京大学）の協力を得る。

(3) ApoB-crescent 含量が異なる細胞から得た脂質滴を材料として、質量分析法で蛋白質の比較解析を行い、ApoB-crescent を被う膜に特異的な蛋白質を同定する。質量分析は谷口寿章教授（徳島大学）との共同研究として行う。

(4) 脂質滴と ER の構造的連関について下記の方法で超微形態学的に解析する。

① 上記(1)-①の結果をもとに選択的透過性処理を行い、ApoB, ER シャペロン

などの超微局在を Nanogold 銀増感法による免疫電顕で詳細に解析する。

② 液体ヘリウムを用いたメタルコンタクト法で細胞を急速凍結し、凍結置換法による純形態観察、SDS 処理凍結レプリカ標識法による ApoB, ADRP, ER 膜蛋白質などの免疫電顕標識を行う。ApoB-crescent を含む精製脂質滴を急速凍結した試料についても同様に検索する。

③ ApoB を発現しない細胞に種々の脂質を負荷し、ER シャペロンの局在をもとに ApoB-crescent に相当する構造を免疫電顕的に同定する。

4. 研究成果

ApoB-crescent の ApoB は ER 内腔の可溶性蛋白質である MTP の作用で脂質付加された pre-VLDL であること、

ApoB-crescent には ApoB だけでなく ER 可溶性シャペロン、ER 膜蛋白質、分泌蛋白質が存在すること、ApoB-crescent が脂質滴に扁平な ER 槽（以下、扁平槽）が融合した構造であり、ApoB や上記の可溶性蛋白質が扁平槽内にあること、扁平槽の外側は単位膜構造を示すのに対し、内側（脂質滴側）には膜構造が見られないこと、さらに扁平槽がフリーコレステロールを豊富に含み、streptolysin O などで透過性になること、ApoB-crescent には脂質付加された ApoB が強固に結合していることなどを見出した。ApoB-crescent の構造はトポロジカルには従来想定されてきた脂質滴形成モデルの中間段階（脂質エステルが ER 膜の内部に蓄積する状態）と同等である。今回の結果は、脂質二重層の中に脂質エステルが蓄積し得ることを初めて明確に示したものであり、脂質滴形成と VLDL 形成過程の密接な連関を示唆する。

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 11 件)

1. Ohsaki, Y, Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., Fujimoto, T.: Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim. Biophys. Acta*, in press. 査読有
2. Fujita, A., Fujimoto, T.: Segregation of GM1 and GM3 clusters in the cell membrane depends on the intact actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta*, in press. 査読有
3. Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Fujita, A., Fujimoto, T.: Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100. *J. Cell Sci.*, 121: 2415-2422, 2008. 査読有
4. Nishino, N., Fujimoto, T. (他 25 名, 21 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. 査読有
5. Urahama, Y., Ohsaki, Y., Fujita, Y., Maruyama, S., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Fujimoto, T.: Lipid droplet-associated proteins protect renal tubular cells from fatty acid-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 173: 1286-1294, 2008. 査読有
6. Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y.: Lipid droplets: a classic organelle with a new outfit. *Histochem. Cell Biol.*, 136: 263-279, 2008. 査読有
7. 藤本豊土, 大崎雄樹, 鈴木倫毅: 脂質滴の形成メカニズム, *膜* 33: 17-23, 2008. 査読無
8. Fujita, A., J. Cheng, M. Hirakawa, K. Furukawa, S. Kusunoki, T. Fujimoto: Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol. Biol. Cell*, 18: 2812-2822, 2007. 査読有
9. Tsuiki, E., Fujita, A., Ohsaki, Y., J. Cheng, K. Yoshikawa, H. Senoo, K. Mishima, T. Kitaoka, T. Fujimoto: All-trans-retinol generated by rhodopsin photobleaching induces rapid recruitment of TIP47 to lipid droplets in the retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48: 2858-2867, 2007. 査読有
10. Fujita, A. and T. Fujimoto: Quantitative retention of membrane lipids in the freeze-fracture replica. *Histochem. Cell Biol.*, 125: 385-389, 2007. 査読有
11. 藤田秋一, 藤本豊土: 凍結レプリカ標識法による膜脂質の分布解析, *細胞工学*, 26: 314-319, 2007. 査読無

[学会発表] (計 10 件)

1. Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Fujita,

A., Cheng, J., Shinohara, Y.: Lipid droplets as a new functional platform, The 6th Symposium of the Asian Biophysics Association, Hong Kong, 2009 年 1 月 11~14 日 招待講演

2. 藤本豊土, 藤田秋一, 程晶磊: 凍結切断レプリカ法標識法による膜脂質のナノ局在解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会年会合同大会 (BMB2008), シンポジウム, 神戸, 2008 年 12 月 9~12 日 招待講演
3. 藤本豊土: 膜脂質ドメインの形態学的解析, 特定領域研究「生体膜トランスポートゾームの分子構築と生理機能」平成 20 年度班会議, 淡路島, 2008 年 9 月 24~26 日 招待講演
4. Fujimoto, T.: Analysis of lipid supramolecular structures by electron microscopy, The 13th International Congress on Histochemistry and Cytochemistry (ICH2008), Symposium, Gdansk, Poland, 2008 年 8 月 23~27 日 招待講演
5. 藤本豊土, 藤田秋一, 程晶磊: 第 60 回日本細胞生物学会大会, ミニシンポジウム, 横浜, 2008 年 6 月 29 日~7 月 1 日 招待講演
6. 藤本豊土, 藤田秋一, 程晶磊: 電子顕微鏡による膜脂質のナノ局在解析, 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, シンポジウム, 大分, 平成 20 年 3 月 27~29 日 招待講演
7. 藤田秋一, 程晶磊, 佐藤久美, 藤本豊土: 細胞膜脂質のナノスケール局在解析, 日本薬学会第 128 年会, シンポジウム, 横浜, 2008 年 3 月 26 日 招待講演
8. 藤本豊土: 脂質超分子構造を電顕で解析する, 第 32 回顕微鏡学会関東支部講演会, 東京, 2008 年 3 月 8 日 招待講演
9. 藤本豊土, 大崎雄樹: 脂肪滴構造と機能の解析, 第 51 回日本顕微鏡学会シンポジウム, 徳島, 2007 年 10 月 19-20 日 招待講演
10. 藤本豊土: 脂質超分子構造を電顕で見る, 日本学術会議シンポジウム, 東京, 2007 年 9 月 8 日 招待講演

[図書] (計 2 件)

1. 藤田秋一, 藤本豊土: 蛋白質と脂質を見るための電子顕微鏡法, 日本組織細胞化学会「組織細胞化学 2008」, 京都, 2008, pp. 25-33.
2. 藤本豊土, 山本章嗣 (監修): 電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ. ナノワールドに迫るパワフル技術入門. 秀潤社, 東京, 2008. 160 ページ.

[その他]

ホームページ等

www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/index.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 豊士 (Toyoshi Fujimoto)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50115929

(2)研究分担者

藤田 秋一 (Akikazu Fujita)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60282232

大崎 雄樹 (Yuki Ohsaki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00378027

鈴木 倫毅 (Michitaka Suzuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80456649