

平成21年 4月 12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19591029

研究課題名（和文） 脂肪細胞内におけるペリリピンの脂肪分解制御機構と肥満・代謝疾患

研究課題名（英文） Role of Perilipin in Adipocyte Lipolysis and Metabolic Disease

研究代表者

三好 秀明 (MIYOSHI HIDEAKI)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：30360902

研究成果の概要：定常状態での脂肪細胞の脂肪貯留と分解の程度や脂肪細胞の大きさについて、それらの制御に関与していると考えられる3種類の蛋白（ペリリピン、HSL、ATGL）の相対的寄与度と相関性を分子学的手法を用いて明らかにし、英文雑誌に掲載された。また、ペリリピンを過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成し、それが痩せていて糖代謝改善などを来すことを発見し、ペリリピン量の変化が生体内での様々な代謝変化と関係することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

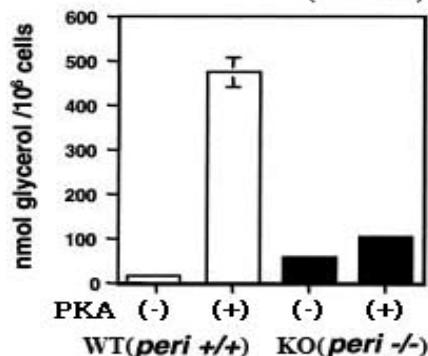
キーワード：代謝異常症、肥満症

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪細胞はそのほとんどを脂肪滴すなわち中性脂肪(TG)が占めているが、Perilipin A (PeriA)は脂肪細胞内に最も多く存在するリン酸化蛋白で、脂肪滴周辺に限局して存在する。ノックアウトマウスの研究などから、PeriAは平常時無刺激下(Basal)では脂肪分解を抑制し、反対にカテコラミン刺激下(Stimulated)でリン酸化を受けbasalの100倍以上まで脂肪分解を促進させる働きがある(Fig. 1)。TG貯留・分解の制御プロセスは最近の研究で解明に向かってきてはいるものの、PeriAと実際の脂肪分解役である脂肪分解酵素との分子学的な干渉など明らかに

なつたとは言えない。

Fig. 1 単離脂肪細胞脂肪分解反応 (2001 PNAS)



この分野の最近の進歩のきっかけとなったのは新しいTG分解酵素であるATGLの発見である(2004, Science)。ATGLの脂肪分解活性はCGI-58というcoactivatorとの干渉により約20倍まで増強すること、そのCGI-58はbasalでは脂肪滴上でPeriAと結合して存在し、カテコラミン刺激後にCGI-58がATGLの方にリリースされることも2006年頃までに分かってきた。また、古くから知られていたもう一つの脂肪分解酵素であるHSLはリン酸化により自ら細胞質から脂肪滴表面に移動するが、これもPeriAがリン酸化していないと脂肪分解活性を発揮しないことを2006年に我々が明らかにした(Miyoshi et al. J Biol Chem 2006)。これらの結果からPeriAは脂肪滴表面で様々な蛋白の足場となりながら、その働きをコントロールしているorganizing centerであるという考えが広まってきている。

カテコラミン刺激後のリン酸化やそれに伴う脂肪分解の機序はこのように徐々に明らかになってきているが、定常状態での脂肪分解のプロセスや、肥満治療に直結する脂肪細胞の大きさの制御はどうなっているのか研究は進んでいない。

(2)ペリリピンノックアウトマウスは脂肪組織が1/4ほどに萎縮した痩せマウスで耐糖能異常などの代謝変化も認め、PeriAの役割を知る上で重要な研究であった。これに対してPeriAのトランスジェニックマウスはこれまでに報告がなく、PeriAが状況により2相性の正反対の作用をもつと考えられることから、どのようなフェノタイプのマウスがみられるか興味深かったため、aP2プロモーターを用いて、脂肪組織特異的にPeriAを過剰発現させたマウスを作成した(未公表)。また2003年以降、ペリリピンの発現量や遺伝子多型と、肥満や代謝異常の関連を示す臨床研究が次々と報告されてきた。

2. 研究の目的

(1) 平常時無刺激下での脂肪細胞の脂肪貯留と分解の程度や脂肪細胞のサイズについて、脂肪貯留・分解を規定していると予想される主たる3種類の蛋白(ペリリピン、HSL、ATGL)の相対的寄与度とそれらの相関性を明らかにする。

(2) 我々が作成した脂肪特異的ペリリピントランスジェニックマウスの解析からPeriAの発現量の違いによる、生体内での代謝変化や代謝変化の発生機序について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PeriA, HSL, ATGLの各アデノウイルス、

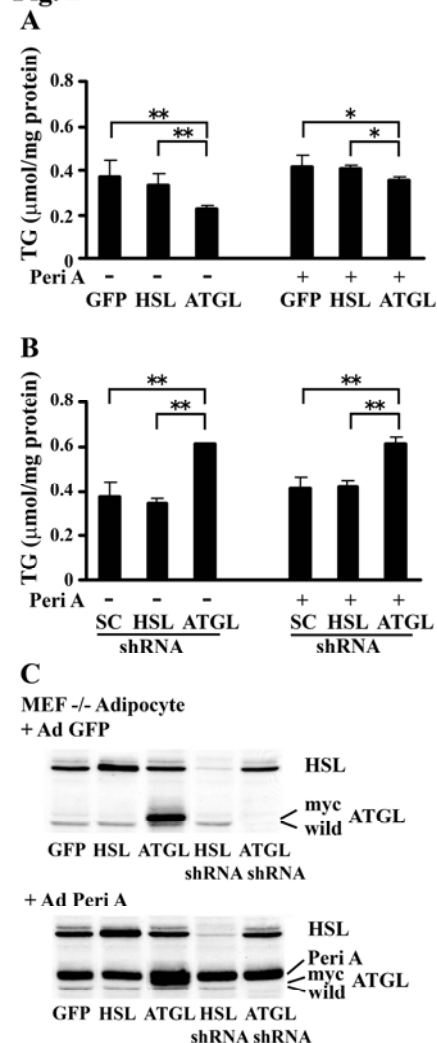
HSL, ATGLの各shRNAのアデノウイルスをそれぞれ作成し、独自に作成したペリリピンノックアウトマウス由来のMEFのstable cell line培養細胞(Peri^{-/-}MEF)に、それぞれの蛋白を過剰発現やノックダウンすることで3種類の発現レベルを変化させ、脂肪滴サイズや脂肪分解反応がどのように変化するかを観察した。

(2) 普通食、高脂肪食を負荷した際のペリリピントランスジェニックマウスのフェノタイプを評価し(摂餌量、体重変化、脂肪重量変化、耐糖能検査、生体刺激脂肪分解反応検査、単離脂肪細胞脂肪分解反応検査、酸素消費量測定、血液検査など)、代謝変化の機序解明のための実験(脂肪、肝臓、骨格筋組織のDNAマイクロアレイ、real-time PCR、Western blot. など)を行なっていく。

4. 研究成果

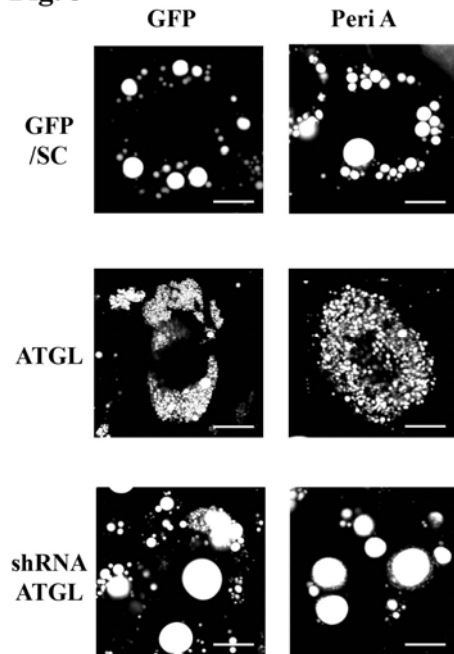
Peri^{-/-}MEFにコントロール(GFP, SC

Fig. 2



(scrambled))アデノウイルスもしくは PeriA アデノウイルスを導入し、翌日更に GFP、HSL、ATGL の各アデノウイルスを追加導入(蛋白過剰発現) (Fig. 2A)、もしくは SC、HSL、ATGL の shRNAi の各アデノウイルスを追加導入(ノックダウン) (Fig. 2B)して、脂肪細胞内の中性脂肪(TG)貯留の程度を比較した。その際の、細胞抽出物(lysate)について Western blot. を行い蛋白の発現レベルを評価した (Fig. 2C)。PeriA の発現により TG 貯留は増加傾向を認めたが有意ではなかった ($p=0.082$)。ATGL の増加により有意な TG 貯留減少、ATGL の消失により有意な TG 貯留増加を認め、そ

Fig. 3



の有意な変化は PeriA の存在の有無による影響は少なかった。また HSL の発現量変化による TG 貯留変化は認めなかった。

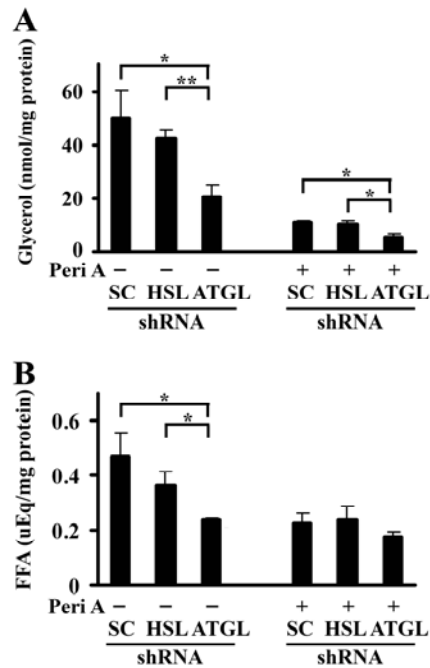
同条件で細胞を顕微鏡下で観察したところ、Fig. 3 に示すように ATGL の発現量によって脂肪滴のサイズが著しく変化し、脂肪滴サイズの定量測定によって (data not shown)、PeriA の発現によっても有意に脂肪滴サイズが増加することが明らかになった。一方 HSL の発現変化では脂肪滴サイズに変化は認めなかった。

basal での脂肪分解反応は、PeriA による影響を最も受け、PeriA の発現により著しく脂肪分解反応の低下を認めた。また ATGL の減少によっても有意な脂肪分解減少を認めた (Fig. 4)。

これらの結果から、basal では PeriA の発現は脂肪分解反応を著しく抑制し貯留の方向に進めるが、脂肪滴サイズや脂肪細胞内 TG

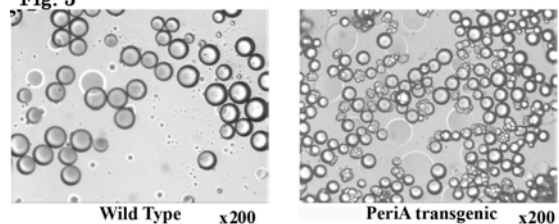
貯留の制御に関しては ATGL の発現の方がより大きく影響することが明らかになった。basal での脂肪分解反応と脂肪滴サイズは必ずしも相関しないことから、その機序はより複雑であると考えられる。また、basal では、脂肪滴サイズや脂肪細胞内 TG 貯留の決定、脂肪分解反応に関して、脂肪分解酵素としての HSL の作用は乏しく、ATGL がおもに担当していること、ATGL の basal での脂肪分解作用は、stimulated と異なり PeriA の存在に依存していないことが本研究により明らかになった。

Fig. 4



(2) 同マウスは、ノックアウトマウスと同様に脂肪細胞、脂肪組織が萎縮した痩せマウスであったが、ノックアウトマウスで見られた耐糖能の悪化とは反対に、コントロールマウスで認められた高脂肪食負荷による耐糖能悪化について有意な改善を認めた。脂肪細胞は白色、褐色とも縮小化しており、単離白色脂肪細胞の中には、ブドウの房のように集簇した小さな脂肪細胞が見られた (Fig. 5) (投稿中)。フェノタイプの違いは高脂肪食負荷した雌マウスでより顕著であり、PeriA の数における影響に性差があることも示唆された。この脂肪萎縮や耐糖能の改善について、白色・褐色脂肪組織以外にも他のエネルギー

Fig. 5



臓器での代謝変化の検討が必要であると考え、本研究では骨格筋、肝臓なども含めた遺伝子発現や代謝関連蛋白の変化について引き続き解析を行なっている。

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9件)

(1) Miyoshi H, Perfield JM, Obin MS, et al. (4人中1番目). Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. **J Cell Biochem.** 2008;15(6):1430-6. 査読有

(2) Gauthier MS, Miyoshi H, Souza SC, et al. (7人中2番目). AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. **J Biol Chem.** 2008;283(24):16514-24. 査読有

(3) Miyoshi H, Perfield JM, Souza SC, et al. (9人中1番目). Control of ATGL action by serine 517 of perilipin A globally regulates PKA-stimulated lipolysis in adipocytes. **J Biol Chem.** 2007;282(2):996-1002. 査読有

(4) Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, et al. (7人中3番目). Adipocyte death, adipose tissue remodeling and obesity complications. **Diabetes.** 2007;56(12):2910-8. 査読有

(5) Souza SC, Christoffolete MA, Miyoshi H, et al. (12人中4番目). Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. **J Lipid Res.** 2007;48(6):1273-9. 査読有

(6) Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, et al. (11人中1番目). Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. **J Biol Chem.** 2006;281(23):15837-44. 査読有

(7) Gross DN, Miyoshi H, Hosaka T, et al. (9人中2番目). Dynamics of lipid droplet associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: Stabilization and lipid droplet binding of ADRP/adipophilin. **Mol Endocrinol.** 2006. 査読有 Feb;20(2):459-66

(8) 三好秀明、脂肪細胞内におけるPerilipinの脂肪分解制御機構と肥満・代謝疾患、リポ蛋白・代謝研究会誌、37巻、11-14、2007、査読なし

(9) 三好秀明、メタボリックシンドロームの基礎、北海道医報、1071巻、26-31、2007、査読なし

[学会発表] (計1件)

(1) 三好秀明、脂肪滴周囲蛋白perilipinの脂肪分解制御部位(アミノ酸)の同定と脂肪分解酵素ATGLとの関与、第50回日本糖尿病学会年次学術集会、2007年5月、仙台市

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.hokudai.ac.jp/~med-2w/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 秀明 (MIYOSHI HIDEAKI)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：30360902

(2) 研究分担者

清水 力 (SHIMIZU CHIKARA)

北海道大学・北海道大学病院. 講師

研究者番号：00292029

(3) 連携研究者 なし