

機関番号：32622

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770160

研究課題名 (和文) 細胞内脂肪滴における中性脂肪の蓄積と分解の機構：MLDP を中心に

研究課題名 (英文) The role of MLDP in lipid metabolism on lipid droplets.

研究代表者

山口 智広 (YAMAGUCHI TOMOHIRO)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50347530

研究成果の概要 (和文)：細胞内脂肪滴は中性脂肪がリン脂質一重膜によって覆われた細胞小器官であり、生体の脂質ホメオスタシスに重要な役割を果たしている。しかし、脂肪滴の表面でどのように脂質代謝が制御されているのかは不明な点が多い。本研究では、その機構に重要な役割を果たすと推定されている脂肪滴局在タンパク質 MLDP (Perilipin 5) の生理的役割について、主に MLDP 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行い、MLDP が心臓における脂肪滴の維持に必須の因子であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Lipid droplet (LD), an intracellular storage depot of lipids, is also an active organelle involved in diverse cellular processes, such as membrane traffic and lipid metabolism. Their properties are highly variable among tissues and are possibly determined by the PERILIPIN family of LD-binding proteins. We identified a new member of this family, named MLDP (also called Perilipin 5) and found that it is highly enriched in the heart. MLDP knockout mice completely lacked LDs in the heart, substantiating the essential role of MLDP in keeping heart LDs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能、脂質、中性脂肪、脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

細胞内脂肪滴（以下、脂肪滴）はトリアシルグリセロール（TG）などの中性脂肪がリン脂質一重膜によって覆われた構造体であり、真核生物の細胞に広く存在している。脂肪滴は単なる余剰脂肪の貯蔵庫ではなく、その表面では厳密な制御のもと脂肪の蓄積と分解が行われており、生体の脂質ホメオスタシスに重要な役割を果たしている。脂肪滴の異常は肥満や脂肪肝、動脈硬化症など様々な疾患と関連しており、その基礎的理解は重要な課題であるが、脂肪滴の表面において、どのような分子メカニズムにより脂質代謝が制御されているのかは不明な点が多い。脂肪滴の機能は、その表面に存在するタンパク質によって規定されると考えられる。動物細胞の脂肪滴表面には、Perilipin ファミリーとよばれる配列に相同性をもつタンパク質群が組織特異的に結合している。我々は以前新規 Perilipin ファミリーメンバーとして MLDP（別名 Perilipin 5）を見出した(Yamaguchi ら (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 14232)。MLDP は PPAR α による制御のもと心臓に選択的に発現しており、心臓における脂質代謝に関与していると予想されるが、その生理的機能は不明なままであった。

2. 研究の目的

心臓はその消費エネルギーの多くを脂肪酸に依存しているにもかかわらず、脂肪貯蔵の容量は少なく、心臓の脂肪滴は他の臓器と比べて極めて小型である。その代わりに脂質の代謝回転が非常に速いという特徴を有している。我々は MLDP が心臓の脂肪滴における活発な脂質代謝を保証する因子であると推定している。そこで MLDP の生理的機能の解明を目的として、MLDP 遺伝子欠損マウスを作製し、その解析を行った。

また、研究期間後半には MLDP の機能解析に加え、新しい脂肪滴局在タンパク質の同定を目的とした研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) MLDP ノックアウトマウスの解析

MLDP の遺伝子は9つの exon より成り、exon 2~4 を欠損するようにターゲティングベクターを設計した。MLDP 欠損マウスは出生前致死ではなく、新生仔は生存、発育した。遺伝子欠損はウエスタンブロット法、サザンブロット法により確認した。この MLDP 欠損マウスの表現型解析を以下の方法により行った。

①電子顕微鏡による脂肪滴の形態の観察 --- 心臓の脂肪滴は微小なため、MLDP 欠損における変化を通常の組織染色で検討することは困難である。そこで、電子顕微鏡を用いた解析を行った。また、新生仔の心臓より初

代培養細胞を調製し、脂肪滴の形態、脂肪酸代謝活性の変化を調べた。

②エネルギー代謝への影響 --- 通常食、および高脂肪食投与時の体重変化、寿命、運動量、各組織の脂肪蓄積量などに対する MLDP 欠損の影響について検討した。

③マウス心筋初代培養細胞を用いた解析 --- 野生型マウスと MLDP 欠損マウスから心筋初代培養細胞を調製し、脂肪酸の取り込み、放出や脂肪酸酸化能について検討した。

(2) 新規脂肪滴局在タンパク質の探索

MLDP の機能解析と並行して、新たな脂肪滴局在タンパク質の探索のために、単離脂肪滴のプロテオミクスを遂行した。ステロイド産生細胞は脂肪滴の比較的発達した細胞であり、MLDP の発現も見られる。マウス精巣ライディッヒ細胞株 (MLTC-1) からシヨ糖密度勾配超遠心法により脂肪滴を単離し、タンパク質画分を抽出した。SDS-PAGE で分離後、LS/MS/MS を用いて各成分を同定した。

4. 研究成果

(1) MLDP ノックアウトマウスの解析

脂肪滴局在タンパク質 MLDP の機能を明らかにするため、本遺伝子の欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。まず、ウエスタンブロット法、サザンブロット法により、MLDP タンパク質が完全に消失しており、部分的な発現も起こっていないことを確認した。MLDP 欠損 (KO) マウスは出生前致死ではなく新生仔は生存、発育する。KO マウスの外観は野生型 (WT) と顕著な差は認められず、体重や成育についても雌雄にかかわらず有意な差はみられなかった。

①電子顕微鏡による脂肪滴の形態の観察 --- 脂肪滴の形態的变化を調べるために、心筋をはじめとして、各臓器の電子顕微鏡観察を行った。興味深いことに、MLDP 欠損マウスの心筋では脂肪滴が全く観察されなかった。心臓における脂肪滴タンパク質の発現量を検討したところ、Perilipin ファミリーである ADRP (Perilipin 2) が KO の心臓において顕著に減少していた。心臓のトリアシルグリセロール量も顕著に減少しており、これらの結果は心臓の脂肪滴の消失を支持している。よって MLDP は心臓の脂肪滴の形成において必須な因子であると考えられる。一方、肝臓や他の臓器については脂肪滴の数、大きさに顕著な差は認められなかった。よって MLDP は心臓の脂肪滴の形成において必須な因子であることが示唆される。

②エネルギー代謝への影響 --- 現時点では、寿命、高脂肪食投与時や絶食時の体重変化において MLDP 欠損の影響は確認されていない。また、運動量や持久力への影響を確認

するために、巻き戻し交配により遺伝的背景を合わせたマウスを使用し、自発運動量、強制運動量の測定を進めた。結果として運動量に有意差は認められなかった。

③心筋初代培養細胞の解析 --- WT および KO マウスの新生仔より心筋初代培養細胞を調製し、脂肪酸の酸化や、脂肪酸取り込みの活性を比較検討した。結果として、KO マウス由来の心筋細胞において脂肪酸 β 酸化活性が亢進していることを見出した。一方、MLDP の欠損は脂肪酸の取り込みには影響を与えなかった。心臓の脂肪滴の欠損により TG の貯蔵ができない状況において、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化が亢進していると考えられる。

(2) 新規脂肪滴局在タンパク質の探索

MLDP は心臓以外にも、褐色脂肪細胞やステロイド産生細胞でも発現している。ステロイド産生細胞はステロイドホルモンの原料となるコレステロールエステル (CE) を脂肪滴内に貯蔵しており、比較的脂肪滴が多い細胞種であるが、ホルモン合成における脂肪滴の役割は不明である。本研究では、テストステロン産生細胞であるマウス精巣ライディッヒ細胞株 (MLTC-1) を用いて、脂肪滴タンパク質のプロテオミクスを行った。結果として、MLTC-1 細胞の脂肪滴上に MLDP やステロイド合成酵素群など 80 種以上の脂肪滴タンパク質を同定した。この情報を基に、今後ステロイドホルモン産生における脂肪滴の役割について検討を進める。

MLDP 欠損マウスの解析から、心筋細胞の主要な脂肪滴局在タンパク質である MLDP が心臓の脂肪滴の維持に必須のタンパク質であることが判明した。心筋の脂肪滴が完全に消失していることから、このマウスの解析は、MLDP の機能解析にとどまらず、心臓の脂肪滴の生理的意義の解明に寄与すると考えられる。糖尿病や中性脂肪蓄積心筋血管病など心臓における脂肪蓄積は基本的にリスク因子と考えられている。しかし、その逆が真であるのか、つまり脂肪滴がなくなることが、病態の改善につながるのかは未だ明らかになっていない。心臓の脂肪滴が欠損したモデルマウスというのは初めての報告であり、心臓の脂肪滴の生理的機能と病態への影響を解明するための有用なモデルとなると期待される。

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 7 件)

① Yamaguchi T. Crucial role of CGI-58/

α/β hydrolase domain-containing protein 5 in lipid metabolism. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 342-325 (2010) 査読有

② Takahashi K., Sasabe N., Ohshima K., Kitazato K., Kato R., Masuda Y., Tsurumaki M., Obama T., Okudaira S., Aoki J., Arai H., Yamaguchi T., Itabe H. Glucagon regulates intracellular distribution of adipose differentiation-related protein during triacylglycerol accumulation in the liver. *J. Lipid Res.* **51**, 2571-2580 (2010) 査読有

③ Wang H., Hu L., Dalen K., Dorward H., Marcinkiewicz A., Russell D., Gong D., Londos C., Yamaguchi T., Holm C., Rizzo MA., Brasaemle D., and Sztalryd C. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J. Biol. Chem.* **284**, 32116-32125 (2009) 査読有

④ Nishino N., Tamori Y., Tateya S., Kawaguchi T., Shibakusa T., Mizunoya W., Inoue K., Kitazawa R., Kitazawa S., Matsuki Y., Hiramatsu R., Masubuchi S., Omachi A., Kimura K, Saito M., Amo T., Ohta S., Yamaguchi T., Osumi T., Cheng J., Fujimoto T., Nakao H., Nakao K., Aiba A., Okamura H., Fushiki T, and Kasuga M. 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 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) 査読有

⑥ Akter MH., Yamaguchi T., Hirose F. and Osumi T. Perilipin, a critical regulator of fat storage and breakdown, is a target gene of estrogen receptor-related receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 563-568 (2008) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 山口智広、脂肪滴局在タンパク質 PERILIPIN ファミリーによる脂質代謝制御、日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 30 日、静岡

② 山口智広、脂肪分解刺激に応答した脂肪滴局在タンパク質の細胞内動態の解析、日本脂質生化学会、2009 年 7 月、名古屋

〔図書〕(計 1 件)

山口智広、大隅隆、他、金原出版、分子糖尿病
学の進歩—基礎から応用まで—2008、2008 年、
pp42-47

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/major/biolchem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 智広 (Yamaguchi Tomohiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50347530

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：