

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390053

研究課題名（和文）脂質超分子構造の細胞生物学的解析

研究課題名（英文）Cell Biological Analysis of Lipidic Supramolecular Structure

研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)

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（和文）：

(1) 脂質付加された ApoB がプロテアソーム分解を受ける際に小胞体内腔から脂肪滴表面に移行し、その過程に UBXD8, Derlin-1 が関わることを見出した。Derlin-1 は小胞体内腔から脂肪滴表面へ、UBXD8 は脂肪滴表面からプロテアソームへの ApoB 移送に関与する。この結果は脂肪滴を足場とする ApoB 分解の分子メカニズムを初めて明らかにしたものである。

(2) 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法により、PI(4,5)P2 のナノ局在を明らかにした。PI(4,5)P2 が培養線維芽細胞のカベオラやコーテッドピットの開口部に集積し、リガンド刺激時に膜平坦部と異なる挙動を示すこと、またラット体内の膵外分泌細胞ではギャップ結合に多く分布することなどが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

(1) We found that lipidated ApoB is dislocated from the ER lumen to the lipid droplet surface for proteasomal degradation and that UBXD8 and Derlin-1 are critically involved in the mechanism. Derlin-1 is engaged in the dislocation step, whereas UBXD8 functions after the dislocation. The result elucidated the molecular mechanism of ApoB degradation process that occurs on the lipid droplet surface.

(2) We demonstrated the nanoscale distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P2] by the quick-freezing, freeze-fracture replica labeling method. The following findings were obtained: in cultured fibroblasts, PI(4,5)P2 is concentrated at the orifice of caveolae and coated pits and shows different behaviors from that in the flat undifferentiated membrane region; in rat pancreatic epithelial cells in vivo PI(4,5)P2 was found densely distributed in the gap junction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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、膜ドメイン、膜脂質、凍結切断レプリカ法、電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

脂肪滴は脂質エステルをコアとし、磷脂質一重層で被われたオルガネラであり、脂肪細胞だけでなく、多くの細胞に普遍的に存在する。脂肪滴は過剰な脂質を貯蔵する静的な構造と考えられてきたが、最近数年間の研究によりその認識は急速に変化してきた。すなわち脂肪滴に蓄えられた脂質が膜、リポ蛋白質、脂質メディエーターの合成に動員されるだけでなく、様々な刺激に応じて脂肪滴に存在する蛋白質の組成が急速に変化すること、細胞内シグナリングや膜トラフィックに関与する分子が存在することなどが明らかとなり、脂肪滴は多くの機能が集中する非常に動的なオルガネラであると見なされるようになってきた。

2. 研究の目的

我々はカベオラ、ラフトなどの膜マイクロドメインについて研究を進める途上で、カベオリンが脂肪滴に存在することを見出し (Fujimoto et al., *J. Cell Biol.*, 152, 1079, 2001), 脂肪滴が新たな膜ドメインであると考えに至った。その後、脂肪滴表層が特殊な脂肪酸組成を持つ磷脂質一重層であること (Tauchi-Sato et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 44507, 2002), 脂肪滴には Rab 蛋白質の一つである Rab18 が局在して小胞体との間の接合形成を制御すること (Ozeki et al., *J. Cell Sci.*, 118: 2601, 2005), さらに ApoB の細胞内分解に関する知見などを報告してきた。また我々は脂肪滴やラフトなど、構造形成に脂質が大きな役割を果たすと考えられる「脂質超分子構造」を超微形態レベルで解析し、分子局在を定量的に決定する方法の開発を行ってきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を改良することにより、ナノレベルで脂質と蛋白質を標識・解析することが可能となった (Fujita et al., *Mol. Biol. Cell*, 18: 2812, 2007)。

今回の研究では上記に述べた結果に基づき、(1) 脂肪滴を足場として働く蛋白質分解系の分子構築を明らかにし、生理的機能を解明する、(2) 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法の適用範囲を拡張し、細胞内

の様々な「脂質超分子構造」について検索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脂肪滴を足場として働く蛋白質分解系の分子構築の解明

精製脂肪滴を質量分析で解析することにより、E2, E3 などのユビキチン化関連酵素、p97/VCP と結合するドメインを持つ分子、E3 活性を調節する分子など、蛋白質分解に関与する分子を多数同定した。これらの分子の機能を多面的に解析し、生理的意義を明らかにする。

① 精製脂肪滴画分中に同定された蛋白質分解系関連分子 (以下 LD-PDs と総称する) についてタグ付き分子を発現させ、免疫組織化学標識、細胞分画のウェスタンブロットリング法などで細胞内の局在を検索する。

② LD-PDs 相互間、LD-PDs と既知の蛋白質分解系関連分子 (p97/VCP, Derlin-1, gp78 など), LD-PDs と ApoB, 脂肪滴蛋白質 (perilipin, ADRP, TIP47, Rab18 など) の相互作用を免疫沈降法、GST-pull down 法で検索する。

③ LD-PDs の部分欠失変異体を作製し、他の分子との結合に関わるドメインを同定する。タグ付き分子を用いた免疫沈降実験、GST-リコンビナント分子を用いた GST-pull down 実験を行う。

④ LD-PDs の過剰発現、RNAi によるノックダウン、dominant-negative 変異体発現による ApoB, 脂肪滴蛋白質などの分解過程への影響を検索する。

⑤ 上記実験で蛋白質分解過程への影響が確認された分子について、脂肪滴形成を抑制する条件 (ADRP の RNAi によるノックダウン、リポ蛋白質欠乏血清中での培養、脂質エステル合成酵素阻害剤など)、脂質滴形成を促進する条件 (ADRP 過剰発現、不飽和脂肪酸負荷など) での結果を比較する。

(2) 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法による「脂質超分子構造」の解析

細胞膜中を非常に早い速度で拡散する膜脂質は化学固定できないため、その微細局在を解析する方法はない。我々は細胞を急速凍結して分子運動を一瞬にして止め、さらに凍結切断レプリカで物理的に固定することによって膜分子を解析する方法を開発してきた。これまでに細胞膜外葉の糖脂質を標識することに成功したが、今回の研究ではその適用範囲を細胞膜内葉に広げ、機能的に重要なホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PI(4,5)P2)に応用し、細胞膜上でのナノレベル局在を解析することを目指す。また人工プローブの導入などを必要としないという利点を生かして、動物体内の細胞における PI(4,5)P2 のナノ局在を解析する。

① 培養細胞をメタルコンタクト法、加圧凍結法のいずれかによって急速凍結して作製した凍結切断レプリカを PI(4,5)P2 に特異的に結合するホスホリパーゼ C δ 1 の PH ドメインと GST と融合リコンビナント蛋白質で標識し、電顕観察する。

② 標識の特異性を確かめるため、7種類のイノシトール燐脂質を含むリポソームを①と同様の方法で標識する。また PH ドメインのアミノ酸を2個置換し、PI(4,5)P2 との結合能を欠く変異分子が結合しないことを確かめる。

③ 種々リガンドで細胞を刺激して PI(4,5)P2 濃度を変化させ、①の方法で局在変化を追跡する。

④ 動物体内の細胞に上記の方法を応用し、生理的条件下で高度に分化した細胞における PI(4,5)P2 のナノ局在を解析する。

4. 研究成果

(1) 脂肪滴を足場として働く蛋白質分解系の分子構築の解明

アポリポ蛋白質 B100 (ApoB) は VLDL の主要構成成分である。翻訳に同期して十分な脂肪付加が得られない ApoB は Sec61 トランスロコンから引き抜かれ、プロテア

ソームで分解される。脂肪付加後の ApoB も ER 内で分解されるが、それがどこでどのように起こるかは分かっていなかった。我々は脂肪付加後の ApoB が脂肪滴表面に移動し、ユビキチン化された状態で蓄積することを見出した。脂肪滴に局在する UBXD8 の発現を低下させると、p97 の脂肪滴へのリクルートが減少し、脂肪滴表面のユビキチン化 ApoB と ER 内腔の脂質付加 ApoB が増加した。一方、Derlin-1 の機能障害は ER 内腔の脂質付加 ApoB を増加させたが、脂肪滴表面のユビキチン化 ApoB は変化しなかった。UBXD8 と Derlin-1 は相互に、またそれぞれが ApoB と結合し、脂肪滴近傍で共局在した。これらの結果は、1) 脂質付加後の ApoB が ER 内腔から脂肪滴表面に移行してプロテアソーム分解を受けること、2) Derlin-1 と UBXD8 がそれぞれ ER 内腔から細胞質への移行、細胞質移行後の段階に関与することを示す。

(2) 急速凍結・凍結切断レプリカ標識法による「脂質超分子構造」の解析

① 多種多様な機能に関連する PI(4,5)P2 の細胞膜上のナノ局在を解明するために、凍結切断レプリカをホスホリパーゼ C δ 1 の PH ドメインで特異的に標識する方法を開発した。この方法では化学固定や人工プローブの発現などが不要でないため、どのような細胞にも応用でき、しかも定量的な解析が可能である。この方法による解析により、培養線維芽細胞ではカベオラ開口部に強度に集中していることを見出した。PI(4,5)P2 はコーテッドピット辺縁部にも濃縮を示したが、平坦な膜領域ではごく弱いクラスターを形成するのみであった。

Angiotensin II 刺激後、平坦な膜領域では 10 秒で PI(4,5)P2 標識密度は最低レベルに低下し、2 分までに徐々に回復した。カベオラの PI(4,5)P2 は 10 秒では変化せず、40 秒で最も低下し、2 分で静止期レベルに回復した。コーテッドピットは 10 秒でやや減少したが、その程度は平坦な膜領域に比

較してごく軽度であった。PI(4,5)P2 の集合は、カベオラではカベオリンに、コーテッドピットでは epsin, dynamin などのエンドサイトーシス関連蛋白質に結合することによって生じると考えられる。上記の結果は、3つの異なる挙動を示す PI(4,5)P2 のプールが形質膜に存在することを明確に示した。

② ①に述べた方法を用いてラット体内の膵外分泌細胞における PI(4,5)P2 を解析した。同細胞は高度に分化した上皮細胞であるが、頂部、タイト結合部、側・基底部の細胞膜での PI(4,5)P2 密度には違いがなかった。一方、ギャップ結合部では、周囲の細胞膜よりも高い PI(4,5)P2 密度が見られた。細胞内小器官には有意の PI(4,5)P2 標識はなかった。これらの結果は体内細胞の PI(4,5)P2 分布が培養細胞とは異なることを示唆する。

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 13 件)

- ① Suzuki M., Otsuka T, Ohsaki Y., Cheng J, Taniguchi T, Hashimoto H, Taniguchi H, and Fujimoto T.: Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. *Mol Biol Cell*, 2012, in press. 査読有
- ② Sakurai-Ozato N, Fujita A., Fujimoto T.: The distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in acinar cells of rat pancreas revealed with the freeze-fracture replica labeling method. *PLoS ONE* 6: e23567, 2011. doi: [10.1371/journal.pone.0023567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023567) 査読有
- ③ Fujimoto T., Parton RG: Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 3, doi:10.1101/cshperspect.a004838, 2011. 査読有
- ④ Suzuki M., Shinohara Y, Ohsaki Y., Fujimoto T.: Lipid droplets: Size matters. *J Electron Microsc.* 60, S101-S116, 2011. 査読有
- ⑤ Fujita A., Cheng, J., Fujimoto T.: Quantitative electron microscopy for the nanoscale analysis of membrane lipid distribution. *Nature Protocols* 5: 661-669, 2010. 査読有
- ⑥ Ohsaki Y., Shinohara, Y., Suzuki M., Fujimoto T.: A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for fluorescence microscopy.

Histochem. Cell Biol., 133: 477-480, 2010. 査読有

- ⑦ Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y., Fujimoto T., Takaku H, Shimotohno K.: Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology* 407, 152-159, 2010. 査読有
 - ⑧ Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y., Fujimoto T., Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K.: Hepatitis C virus infectivity is influenced by association of apolipoprotein E isoforms. *J Virol*, 84, 12048-12057, 2010. 査読有
 - ⑨ Ohsaki Y., Suzuki M., Shinohara Y, Fujimoto T.: Lysosomal accumulation of mTOR is enhanced by rapamycin. *Histochem Cell Biol*, 134, 537-544, 2010. 査読有
 - ⑩ Fujita A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Takenawa, T., Fujimoto T.: A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 9256-9261, 2009. 査読有
 - ⑪ Fujita A., Cheng, J., Fujimoto T.: Segregation of GM1 and GM3 clusters in the cell membrane depends on the intact actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 388-396, 2009. 査読有
 - ⑫ Cheng, J., Fujita A., Ohsaki Y., Suzuki M., Shinohara, Y., Fujimoto T.: Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem. Cell Biol.*, 132: 281-291, 2009. 査読有
 - ⑬ 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*, 1791: 399-407, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Toyoshi Fujimoto: Nanoscale detection of membrane lipids by freeze-fracture electron microscopy, University of Washington-Kobe University Joint Symposium on Integrative Membrane Biology and Signal Transduction Medicine, Kobe, 2011年12月13-14日
 - ② Toyoshi Fujimoto: Nanoscale distribution of phospholipids observed by electron microscopy, 第9回 JBS バイオフロンティア国際シンポジウム(九州大学創立百周年記念) New Aspect of Phospholipid Biology and Medicine 2011 (リ

ン脂質機能の新機軸 2011), 福岡, 2011年11月14-16日

③ 藤本豊士: 電顕で脂質を見る, 第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 金沢, 2011年9月23-24日

④ 藤本豊士: 膜脂質分布のナノレベル局在解析, 第84回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月21-24日

⑤ Toyoshi Fujimoto: Lipid droplets as a platform of protein degradation, The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [II], Sapporo, 2011年6月28日-7月1日

⑥ 藤本豊士, 藤田秋一, 櫻井納美, 程晶磊: Nanoscale detection of membrane lipids by electron microscopy

第67回日本顕微鏡学会学術講演会, 福岡, 2011年5月16-18日

⑦ Toyoshi Fujimoto: Nanoscale detection of membrane lipids by electron microscopy, The 2nd International Symposium on Membrane Biology, Ningbo, China, 2010年11月10-12日

⑧ Akikazu Fujita, Jinglei Cheng, and Toyoshi Fujimoto: Nanoscale detection of membrane lipids by electron microscopy, The 4th International Society for Neurochemistry Special Neurochemistry Conference “Membrane domains in CNS physiology and pathology”, Erice, Italy, 2010年5月22-25日

⑨ Toyoshi Fujimoto: Quantitative electron microscopy to observe nanoscale distribution of membrane lipids

The 13th Membrane Forum, Kyoto, 2010年1月26-28日

⑩ 藤本豊士: 膜ドメインと膜脂質局在, 第25回 Wako ワークショップ「細胞膜ナノドメイン: 統合的理解と新たな展開」, 東京, 2009年11月17日

⑪ 藤本豊士, 藤田秋一, 程晶磊: 凍結切断レプリカ標識法によるイノシトール磷脂質局在の解析, 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月21-24日

⑫ 藤本豊士: 脂肪滴の構造と機能, 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 大津, 2009年9月26-28日

⑬ Toyoshi Fujimoto: Nanoscale localization of membrane lipids by electron microscopy, The 4th iCeMS International Symposium “Integrated Physical/Chemical Biology of the Cell: from Genes to Membrane Systems”, Kyoto, 2009年5月27-29日

[図書] (計5件)

① 藤本豊士, 鈴木倫毅, 櫻井納美, 藤田秋一: 膜を構成する分子の解析法, 日本組織細胞化学会編「組織細胞化学2011」, 2011, pp. 55-61

② Fujita, A., Fujimoto, T.: High Resolution

Molecular Localization by Freeze-Fracture Replica Labeling, Schwartzbach, S.D., Osafune, T. (eds.), Immunoelectron Microscopy: Methods and Protocols, Humana Press, 2010, pp. 205-216.

③ 大崎雄樹, 篠原友樹, 鈴木倫毅, 藤本豊士: 脂質・脂肪滴の光顕・電顕検出法, 日本組織細胞化学会編「組織細胞化学2010」, 2010, pp. 39-45.

④ 池ノ内順一, 藤本豊士 (編集): 見えてきた膜ドメインの姿と生体脂質のダイナミクス, 実験医学 28: No. 8, 2010.

⑤ 藤田秋一, 大崎雄樹, 藤本豊士: 脂質の組織化学, 日本組織細胞化学会「組織細胞化学2009」, 2009, pp. 35-44

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)

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

大崎 雄樹 (OHSAKI YUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00378027

(H21-H21)

鈴木 倫毅 (SUZUKI MICHITAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80456649

藤田 秋一 (FUJITA AKIKAZU)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号: 60282232

(H21-H22)

(3) 連携研究者なし