

平成23年 5月 27日現在

機関番号： 82401
研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2009～2010
課題番号： 21790105
研究課題名(和文) 小胞体コレステロールによる脂肪滴形成とリポタンパク質分泌の制御
研究課題名(英文) ER cholesterol regulates the biogenesis of LD and the ApoB secretion
研究代表者
牧野 麻美 (MAKINO ASAMI)
独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・特別研究員
研究者番号： 20373368

研究成果の概要(和文)：

本研究ではヒト培養肝細胞を用いて、ACAT阻害剤により細胞内のコレステロール量を増加した時の脂肪滴形成とアポリポ蛋白質 B(ApoB)の分泌について調べた。その結果脂肪滴の形成とApoBの分泌は抑制されることがわかった。細胞内のApoBの局在を蛍光顕微鏡で調べたところ、小胞体に蓄積することが示唆された。ApoBの分泌には脂肪滴特異的タンパク質 ADRP と Rab18が深く関与していることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

Cholesterol loading in ER induced the enlargement of lipid droplets and the degradation of major LD protein, adipose differentiation-related protein (ADRP) in cultured human hepatocytes. However, lipid particles were not disappeared. Instead, the lipids were surrounded by VLDL protein, ApoB. This step was controlled by rab18. These results indicate that cholesterol modulates both biogenesis/maintenance of LDs and ApoB secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂肪滴、小胞体、コレステロール、VLDL、ACAT、ADRP、Rab18、ApoB

1. 研究開始当初の背景

肝細胞における超低比重リポ蛋白(VLDL)の分泌

と、脂肪滴の形成は体内のコレステロールホメオスタシスに重要であることが分かっている。しかしVLDL分泌および脂肪滴の形成のメカニズムは明らかになっていない。われわれは最近、アシルCoA-アシルトランスフェラーゼ (ACAT) 阻害剤が小胞体に遊離コレステロールを蓄積し、その結果VLDLの分泌が抑制されることを明らかにした。

2. 研究の目的

肝細胞のコレステロールは中性脂質とともに分泌され、超低比重リポ蛋白 (VLDL) となる。VLDLの合成、分泌の異常は脂肪肝を引き起こす。一方、肝細胞では脂肪滴の形成も常時起こっているが、この場合はコレステロール、中性脂質は細胞質側に分泌される。つまり、肝細胞の小胞体からは中性脂質を含んだ膜小胞の形成が常に細胞質側とルーメン側の両方向に起こっていることになる。VLDL はアポリポタンパク質B (ApoB) を主なタンパク質成分とする。VLDL およびApoBの分泌メカニズムは良くわかっていないが、細胞のコレステロールが重要な役割を果たすことが示唆されている。本研究では培養肝細胞を用い、小胞体のコレステロールレベルを変化させることによりApoB の分泌と脂肪滴の形成がどのように変化するかを解析する。この研究によりVLDLの分泌機構を知るとともに、VLDL 分泌における脂肪滴の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ApoB を蓄積した小胞体ドメインの解析

われわれのこれまでの結果はコレステロールエステルの減少ではなく小胞体のコレステロールの増加がApoB の分泌に重要な役割を果たしていることを示唆している。

①ACAT 阻害剤とコレステロール・サイクロデキストリンの複合体をヒト肝臓由来培養細胞 Huh7に作用させたときにのみApoB の分泌が

阻害される。

②U18666A により後期エンドソームからのコレステロール輸送を止めるとコレステロールのエステル化は抑えられるが、このときにはApoB の分泌は影響を受けない。

これらの結果は小胞体にコレステロールが蓄積することによりApoB の分泌が阻害されることを示唆している。蓄積したApoB は小胞体のマーカーおよび脂肪滴のマーカーと共存することから、ApoB は小胞体の特殊なドメインに集積し、その後分解を受けることが示唆された。コレステロールもまたこのような特殊なドメインに蓄積することが示唆される。本研究ではこの結果をさらに推し進め、コレステロールに結合する抗生物質であるフィリピンを用いた蛍光顕微鏡での観察に加え、免疫電子顕微鏡解析によるApoB およびADRP の詳細な細胞内分布の解析を行う。免疫電子顕微鏡解析は理化学研究所・小林脂質生物学研究室の村手源英博士との共同研究により行う。

(2) ADRP, ApoB分解へのコレステロールの影響

ApoB, ADRP はいずれもユビキチン経路で分解を受けることが報告されている (Ohaski et al. *Mol. Biol. Cell* 17, 2674 (2006); Masuda et al. *J. Lipid Res.* 47, 87 (2006))。われわれの予備的な結果はコレステロールの小胞体への蓄積が、これらのタンパク質の分解に関与していることを示唆している。本研究ではACAT 阻害剤添加に伴うApoB, ADRP の減少の経時変化の測定とApoB, ADRP 分解に対するユビキチン化阻害剤の影響の測定を行う。

(3) ADRP, Rab18 と ApoB 分解の関連性

われわれはADRP を過剰発現することにより細胞内にApoB が蓄積しなくなる、ということを見出している。この結果は脂肪滴の形成とVLDL の分泌がカップリングしていることを示唆している。脂肪滴の動態は低分子量G タンパク質rab18 によってコントロールされている (Ozeki et al. *J. Cell*

Sci. 118, 2601 (2005))。Rab18 のGTP型 (constitutive active) およびGDP型 (dominant negative) をそれぞれHuh7 細胞に過剰発現し、ApoB の分泌への影響を測定する。

4. 研究成果

(1) 蛍光顕微鏡による小胞体ドメインの解析
本研究ではヒト培養肝細胞 Huh7 を用いて細胞内のオルガネラの染色を行った。ACAT 阻害剤の F1394 を細胞に 24 時間処理した時の ApoB の細胞内局在を調べたところ、細胞内に大きなリング状の構造が観察された。小胞体タンパク質 PDI との二重染色を試みたところ、通常の条件では PDI の染色が見られなかった。小胞体はコレステロールの少ないオルガネラであることから、通常穴あけに用いる digitonin では小胞体に十分な効果が見られなかったことが示唆されたため、可溶化剤を Tx100 に変えて再び実験を行ったところ、PDI と ApoB が共局在することが分かった。F1394 により細胞内のコレステロールの量を変化させたとき、ApoB が小胞体に蓄積することが示唆された。

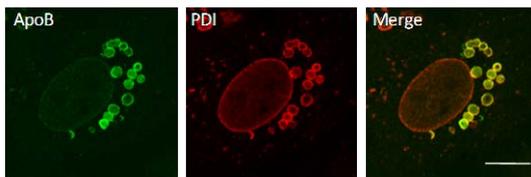


図1 小胞体蛋白 PDI と ApoB の二重染色

(2) 電子顕微鏡による小胞体ドメインの解析
理化学研究所・小林脂質生物学研究室の村手源英博士との共同研究により、電子顕微鏡による観察を行った。細胞に F1394 を 6 時間処理した細胞では、肥大化した脂肪滴様の構造物がミトコンドリアの近傍に局在することがわかった。処理していない細胞では脂肪滴は小さく、細胞全体に均一に局在している。

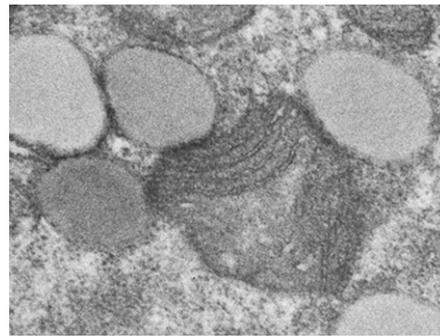


図2 電子顕微鏡による観察

(3) ユビキチン阻害剤の影響

細胞に F1394 を処理すると時間依存的に ADRP が減少することがわかった。文献では ADRP はユビキチン経路により分解されることが分かっているので、F1394 による分解がユビキチン経路を介しているか調べた。ユビキチン阻害剤を処理した細胞では ADRP の量が増加したが、F1394 を同時に処理した細胞ではコントロールに比べて ADRP の減少が少ないことから、小胞体にコレステロールが蓄積した条件では ADRP はユビキチン経路では分解されないことが示唆された。

(4) ADRP, Rab18 と ApoB 分解の関連性

これまでの研究で ApoB と ADRP の間に密接な関係があることが示唆された。Rab18 は脂肪滴に局在するタンパク質で脂肪滴が小胞体へ融合するときに重要であることが報告されている。そこで細胞内の Rab18 の局在を調べたところ、細胞全体に小さなドット状に染色像を示した。しかしこれは ADRP とは一致せず、ADRP が存在する脂肪滴とは異なる脂肪滴に Rab18 が存在することを示唆している。次に細胞に F1394 を時間を変えて処理したところ、薬剤処理 3 時間後くらいから Rab18 のシグナルは減少し 24 時間後には完全になくなった。F1394 を処理して 3 時間後くらいから ApoB のシグナルは観察され始めることから、Rab18 と ApoB には関連性があることが示唆された。次に Rab18 の Rab18 の GTP 型 (constitutive active) および GDP 型 (dominant negative) を用意し、それぞれ細胞に高発現させた。その結果、GTP 型を発現した細胞では F1394 処理をすると発現していない細胞と同様、ApoB が小胞体に蓄積するが、GDP 型を発現した細胞では ApoB の蓄積が見られないこと

が分かった。以上の結果からも ApoB と Rab18 の関連性が示唆される。この点についてはさらに詳細な研究が必要である。

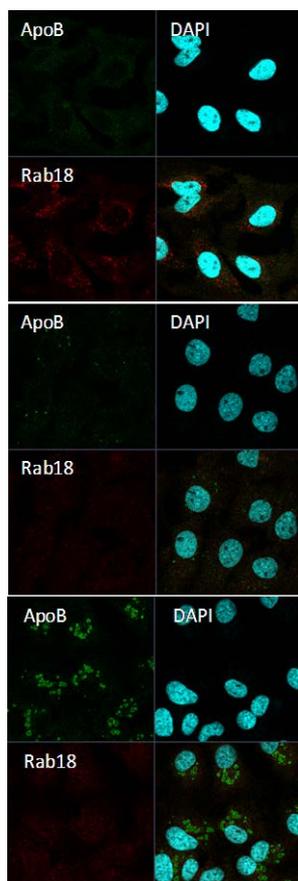


図3 上:コントロール、中:F1394 処理 4 時間後、下:F1394 処理 24 時間後の ApoB と Rab18 の染色

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 3 件)

①Makino A (9 名中 4 番目). Fluorescent probes for superresolution imaging of lipid domains on the plasma membrane. *Chemical Science*. 2011. in press. 査読有

②Makino A (9 名中 2 番目). Multiplex analysis of sphingolipids using amine-reactive tags (iTRAQ). *J Lipid Res*. 52(6):1294-302, 2011. 査読有

③Makino A (12 名中 2 番目) (2009) Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in

prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res*. 69(20):8133-40. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

①Kobayashi T, Abe M, Kishimoto T, Makino A, Hullin-Matsuda F, Ishitsuka R, Murate M. “Visualization of lipids and lipid domains” 第 53 回日本脂質生化学会、2011 年 5 月 12 日、東京

②Makino A. “Endoplasmic reticulum cholesterol controls both ApoB secretion and the formation of lipid droplets” RIKEN-SNU (Seoul National University) workshop on Chemistry and Biology, Mar. 3-4. 2011, Saitama

③小林俊秀、牧野麻美 「小胞体コレステロールによる脂肪滴形成とリポタンパク質分泌の制御」文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」第二回「細胞内ロジスティクス」班会議、2010 年 6 月 28 日-7 月 1 日、札幌

④Hullin-Matsuda F, Ishii K, Makino A, Ishitsuka R, Lagarde M, Vidal H, Kobayashi T. “Screening of new inhibitors of sphingolipid metabolism. 10ème Journée Scientifique, Institut Mutidisciplinaire de Biochimie des Lipides, Juin. 21. 2010, Lyon, France

⑤牧野麻美 「肝細胞における小胞体コレステロールによる脂肪滴形成とリポタンパク質分泌の制御」理研バイオアーキテクトシンポジウム 2010, 2010 年 2 月 24-26 日、熱海

⑥Makino A. Endoplasmic reticulum cholesterol controls both ApoB secretion and the formation of lipid droplets in cultured hepatocytes, 13th

International Membrane Research Forum/6th
iCeMS International Symposium, Jan. 27-29.
2010, Kyoto, Japan

⑦小林 俊秀, 阿部 充宏, 石塚 玲子, 嶋田
有紀子, 牧野 麻美, 村手 源英
"Visualization of lipid domains" 第59
回 FCCA セミナー/環境医学研究所ワークショ
ップ 2009, 2009年10月20日、東京

⑧Kobayashi T, Abe M, Ishitsuka R, Shimada
Y, Makino A, Murate M. "Imaging lipid
domains" 22nd Biennial Meeting of the
ISN/APSN Joint Meeting. Aug. 27. 2009,
Busan, Korea

⑨Kobayashi T, Abe M, Ishitsuka R, Shimada
Y, Makino A, Murate M. "Imaging lipids and
lipid domains" The First International
Symposium on Membrane Biology. July. 9-11.
2009, Guilin, China

⑩Kobayashi T, Abe M, Ishitsuka R, Shimada
Y, Makino A, Murate M. "Lipid rafts: new
tools, new fluorescent probes" 6th
Proceedings of the GERLI Lipidomics
Meeting. Bioactive Lipids, Nutrition and
Health. July. 1-3. 2009, Rennes, France

⑪Hullin-Matsuda F, Ishii K, Makino A,
Ishitsuka R and Kobayashi T. Limonoid; a
family of phytochemicals as new inhibitors
of sphingolipid metabolism, Inserm-Riken
Lipidomics Unit (IRLU) 1st Meeting, June. 18.
2009, Lyon, France

⑫Makino A, Hullin-Matsuda F, Murate M,
Abe M, Delton-Vandenbroucke I, Lagarde M
and Kobayashi T. Endoplasmic reticulum

cholesterol controls both ApoB secretion and
the formation of lipid droplets in cultured
hepatocytes, Inserm-Riken Lipidomics Unit
(IRLU) 1st Meeting, June. 18. 2009, Lyon, France

⑬Bouvier J, Makino A, Hullin-Matsuda F,
Lagarde M, Kobayashi T, Delton-Vandenbroucke
I. Regulation of cellular cholesterol
homeostasis by bismonoacylglycerophosphate,
an endosome-specific phospholipid,
Inserm-Riken Lipidomics Unit (IRLU) 1st Meeting,
June. 18. 2009, Lyon, France,

⑭Hullin-Matsuda F, Bouvier J,
Delton-Vandenbroucke I, Makino A, Lagarde M and
Kobayashi T. The late endosome lipid,
bis(monoacylglycerol)phosphate modifies the
metabolism and transport of cellular
cholesterol, 4th International conference on
phospholipase A2 and lipid mediators (PLM2009),
May. 25-28. 2009, Tokyo, Japan,

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規なタンパク質およびその利用
発明者: 小林俊秀 (発明協力者 牧野麻美、阿部
充宏、石塚玲子、村手源英)
権利者: 独立行政法人理化学研究所
種類: 1
番号: 特願 2010-112681
出願年月日: 平成22年5月14日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 麻美 (MAKINO ASAMI)

独立行政法人理化学研究所・小林脂質生物学研究
室・特別研究員
20373368

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者