

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658088

研究課題名(和文)細胞内膜タンパク質PGDR/GHITMを介したエネルギー代謝調節機構解明への挑戦

研究課題名(英文)Elucidation of regulation of energy metabolism mechanisms through PGDR/GHITM

研究代表者

片岡 宏誌 (KATAOKA, Hiroshi)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60202008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類から昆虫まで普遍的に存在するPGDR/GHITMを介したエネルギー代謝調節機構の解明を目指し、1) PGDR/GHITMの局在解析、2) PGDR/GHITMの有無によって変化する細胞内の脂質類の変動解析、3) PGDR/GHITMを介した遺伝子発現調節機構および脂肪細胞分化制御機構の解析、を行った。

その結果、1) PGDR/GHITMは従来考えていたペルオキシソームよりミトコンドリアに主として存在すること、2) ミトコンドリアの形態や機能維持に機能している可能性が高いこと、3) Ghitmノックアウトマウスおよび野生型マウスの各組織の脂肪酸の量および存在比が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the regulation of energy metabolism by PGDR/GHITM, which is conserved from mammalian to insect, we analyzed 1) Cellular localization of PGDR/GHITM, 2) Lipid content and composition of tissues in the presence or absence of PGDR/GHITM, 3) The adipocyte differentiation and regulation of gene expression through PGDR/GHITM.

As a result, 1) GDR/GHITM is localization in mitochondria compare to peroxisome, 2) PGDR/GHITM may mediate to maintain mitochondrial morphology, 3) Fatty acid composition is different between wild-type and Ghitm knockout mouse.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：脂肪細胞 膜タンパク質 GHITM ミトコンドリア ペルオキシソーム

1. 研究開始当初の背景

PGDR は、昆虫の脱皮・変態の最初の引き金となる前胸腺刺激ホルモン受容体を探索する過程で見いだした膜タンパク質である (BBB, 70, 554-558, 2006)。PGDR は鱗翅目間で極めて保存性が高く、また、ショウジョウバエでは発育に伴って遺伝子発現が上昇することが示されている (PNAS, 97, 13726-31, 2000)。一方、米国 Kopchick らのグループによって、成長ホルモンを阻害した脂肪細胞において発現が低下する遺伝子 (*Ghitm*) として *pgdr* 相同遺伝子が同定されている (Endocrinology 142, 2937-45, 2001)。我々は *pgdr* 遺伝子のカイコ組織別発現解析やショウジョウバエ機能喪失系統の作製を進めるとともに、マウス *Ghitm* 遺伝子についても組織別発現解析やノックアウトマウスの作製を進め、断片的であるが下記の結果を得ていた。

- (1) カイコ PGDR は前胸腺のみならず、脂肪体、脳、腸、筋肉など様々な器官で発現している。
- (2) マウス *Ghitm* 遺伝子は褐色脂肪組織に特に強く発現し、肝臓、腎臓、白色脂肪組織などにおいても発現している (BBRC, 341, 13-18, 2006)。
- (3) GHITM は培養細胞ならびに脂肪細胞でペルオキシソームと思われる細胞内小器官に局在する。
- (4) 3T3-L1の脂肪細胞への分化段階で *Ghitm* 遺伝子が発現上昇し、成熟細胞では発現が低下する。
- (5) *Ghitm* ノックアウトマウスは、高脂肪飼料を与えると体重が顕著に増加し、血液中のグルコース濃度が上昇するなど、エネルギー代謝異常の表現型を示す。

これらの結果は、哺乳類から昆虫まで普遍的に存在する PGDR/GHITM を介したエネルギー代謝調節機構が存在している可能性を示している。

2. 研究の目的

上記に述べた背景のもと、動物種を越えた PGDR/GHITM の普遍的作用の解明に迫るため、

- (1) 昆虫およびマウスで PGDR/GHITM の局在部位がペルオキシソームであるか別の細胞内小器官であるかを確定する。
- (2) PGDR/GHITM と相互作用するタンパク質や、PGDR/GHITM の有無によって変化する有機化合物 (脂質など) を探索・同定する。
- (3) PGDR/GHITM を介した遺伝子発現調節機

構および脂肪細胞分化制御機構を明らかにする。

これらの研究を通じて、PGDR/GHITM を介したエネルギー代謝制御機構解明のための基盤を作ることを目的とした。

これまで、余剰エネルギーの貯蓄の場として考えられてきた脂肪組織は、アディポカインなど生理活性物質を分泌するエネルギー代謝調節機構の場であることが近年明らかになってきた。本研究で取り上げる PGDR/GHITM は、脂肪細胞 (昆虫の場合は脂肪体と呼ばれる) で高発現している膜タンパク質である。動物間で極めて保存性が高く、動物種を越えたエネルギー代謝を調節する基本分子である可能性が高い。既に *Ghitm* ノックアウトマウスに高脂肪飼料を与えると正常個体に比べ体重増加が顕著に増進すること、また逆に低脂肪飼料を与えると体重増加が顕著に減少することを見いだしている。また、いずれの場合も、血液中のグルコース濃度が上昇しており、その原因がインスリン分泌の抑制であるとの予備的結果を得ている。このような機能を担う膜タンパク質はこれまで見いだされていない。

さらに、PGDR/GHITM が細胞内小器官に局在することを免疫組織化学により見いだしている。ペルオキシソームは、極長鎖脂肪酸のβ酸化を行う唯一の小器官であり、胆汁酸の生合成など生物の代謝を司る器官として重要であるが、その生理機能は十分に研究されていない。本研究の特色の一つは、エネルギー代謝異常とペルオキシソームの機能を結びつける点にある。さらに、脂質類をはじめエネルギー代謝調節に関与するペルオキシソームに由来 (またはペルオキシソームに作用) する新規生理活性物質の発見も目指した。

3. 研究の方法

1. PGDR/GHITM の局在解析

マウス GHITM 抗体を用いた免疫染色の実験から、GHITM は PMP70 (70-kDa peroxisomal membrane protein) と同様ペルオキシソーム膜に共局在していると考えられる。また、これまでの実験から GHITM は N 末端部分が切断されたのち細胞内に存在することを示している (BBRC, 341, 13-18, 2006) が、配列中に既知のペルオキシソームへの移行シグナルは見出されていない。そこで、GHITM の局在がペルオキシソーム局在するか、他の細胞内小器官に局在するか否かについて、確認するとともに、局在に必要なシグナル配列を明らかにすることを目的に以下の実験を行った。

PGDR 抗体および GHITM 抗体の作製
GHITM は哺乳類間では同源性が高く、こ

れまでの研究で細胞内小器官に局在することから小器官への移行シグナルの存在やシグナル配列の切断の可能性が考えられる。そこで、マウスおよびカイコの PGDR/GHITM のN末端部分およびC末端部分に相当するペプチドを抗原として、ウサギ抗マウスPGDR/GHITM 抗体の作製を行うことにした。

GHITM が存在する細胞内小器官の特定

HeLa 細胞に *Ghitm* を発現させ、1- で作製した抗体を用い免疫染色を行い、小胞体、ペルオキシソーム、エンドソーム、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の何処に局在するかについて解析した。

タグ配列などを付加した GHITM の発現解析から、N 末端部分のプロセシング部位の違いで GHITM の発現量や局在が変化することが示唆されている。そこで、N 末配列を部分的に欠失させたコンストラクトを作製し、GHITM の発現への影響やシグナル配列の特定を試みた。

2. PGDR/GHITM の有無によって変化する細胞内の脂質類の変動解析

Ghitm ノックアウトマウスおよび野生型マウスの肝臓、腎臓などの各組織から、Folch 法を用いて脂質を抽出し、脂質（コレステロールエステル、コレステロール、トリグリセリド、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルコリンなど）を PEGASIL Silica SP100（4.6φ × 100mm）カラムを用いて、移動相 A に isooctane-tetrahydrofuran 99:1 (v/v)、移動相 B に isopropanol-chloroform 4:1 (v/v)、移動相 C に isopropanol-water 1:1 (v/v) の 3 液グラジエントにより、0-1.3min 移動相 A (100) 6.7-6.8 min 移動相 A/移動相 B (80/20) 6.8-26.7min 移動相 A/移動相 B/移動相 C (42/52/6) 26.7-26.8min 移動相 A/移動相 B/移動相 C (32/52/16) 26.8-33.3min 移動相 A/移動相 B/移動相 C (30/70)、流速 1.5 ml/min の条件で分離した。検出は Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)を用いて行い、脂質の含量および種類の違いについて解析した。

また、ヘキサンを用いて *Ghitm* ノックアウトマウスおよび野生型マウスの肝臓、心臓、腎臓、血清、脂肪細胞などの各組織から脂質類を抽出した後、けん化処理を行い、脂肪酸を抽出し、ADAM (9-Anthryldiazomethane) により脂肪酸を誘導体化し、C8 (4.6φ × 250 mm) カラムで、流速 1 ml/min、85% アセトニトリルで分離して、蛍光検出器で検出することにより、C12 ~ C18 脂肪酸の種類と量の解析を行った。

3. PGDR/GHITM を介した遺伝子発現調節機構および脂肪細胞分化制御機構の解析

Ghitm の発現は、3T3-L1 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化過程で増加することを我々は既に明らかにしている。そこで、脂肪細胞

での脂肪代謝制御における GHITM の機能を明らかにするために、3T3-L1 細胞における siRNA によるノックダウンを試み、脂肪細胞の分化にどのように影響があるかについて、形態学的な変化、遺伝子発現変化について解析を目指した。

4. 研究成果

哺乳類において PGDR/GHITM は脂肪組織、肝臓、腎臓をはじめとした様々な組織で発現する機能未知の7回膜貫通タンパク質であり、これまでペルオキシソームへの局在が示唆されている。GHITM の細胞内局在について詳細に解析するために、これまで使用していた Tag 配列に対する抗体ならびに、ニワトリ抗マウス GHITM 抗体に加え、新たに N 末側、C 末側側のペプチドに対するウサギ抗 GHITM 抗体免疫し抗体を作製した。N 末側のペプチドに対する抗体を用いて免疫染色を行った。小胞体、ペルオキシソーム、エンドソーム、ミトコンドリアなどの細胞内小器官マーカーを用いてマウス GHITM との共局在解析を行ったところ、PMP などのペルオキシソームのマーカーよりも、むしろミトコンドリアのマーカーである AE1 やミトコンドリアトラッカーとの共局在を示すことが明らかになった。HeLa 細胞に C 末側に GFP を融合したマウス GHITM をトランスフェクションし、その局在を調べたところ、免疫染色と同様に、マウス GHITM (GFP) のシグナルがミトコンドリアに観察された。また、マウス GHITM を過剰発現した HeLa 細胞においては、ミトコンドリアトラッカーで染色されないことがわかった。このことからマウス GHITM を過剰発現すると、ミトコンドリアの恒常性が破綻していることが示唆された。

マウス GHITM を発現させることによる細胞傷害への影響について、テトラゾリウム塩 (WST-8) を用いて細胞中の脱水素酵素により産生される NADH の量によって解析したところ、GHITM 発現細胞ではわずかながら NADH の産生量がさがるものの、WT と比べ大きな差はなく、GHITM が発現することにより、直接細胞傷害することはないと考えられた。

GHITM が種を超えて、ミトコンドリアの形態の維持に関与するのかを明らかにするため、カイコ PGDR 抗体を作製するとともに、カイコ PGDR に GFP を融合した遺伝子を作製し、HeLa 細胞に導入して PGDR の細胞内局在の観察を試みた。しかしながら、カイコ PGDR-GFP を発現させた細胞は、ほとんど観察されず、細胞が死滅する傾向があることがわかった。また、マウス GHITM の結果と同様に、カイコ PGDR が過剰に発現すると、ミトコンドリアトラッカーで染色されないことがわかった。

これらの結果を合わせると、*Ghitm* は、ペ

ルオキシソームに局在するよりも、むしろミトコンドリアに主として局在し、ミトコンドリアの形態維持や機能維持に機能しているだろうと結論した。

GHITM のN末端部分のプロセッシング部位の違いによってGHITMの発現量が変化するか否かについて、N末にFlagタグ付加したΔN44 (1-44番目のアミノ酸の欠失) 変異体およびΔN57 (1-44番目のアミノ酸の欠失) 変異体を作製し、HeLa細胞にトランスフェクションして発現量を解析したところ、全長およびΔN44では、Ghitmの発現は確認できなかったが、Flag-ΔN57では発現することがわかった。このことから切断部位は、44-57番目のアミノ酸であろうことが示唆された。

GHITMの脂質代謝に関わる機能について、野生型マウスとGhitmノックアウトマウスの肝臓、腎臓の脂質の量比について、PEGASIL Silica SP100(4.6φ×100mm)カラムを用いて、分離し、ELSDを用いて各脂質を分析した。その結果、GHITM欠損マウスの腎臓において顕著な脂質の蓄積がみられ、肝臓においてコレステロールエステル/コレステロールの割合が増加するという予備的データが得られた。しかしながら、再測定の結果、脂質の分解等の影響が疑われた。再現性をとる実験を計画したが、GHITM遺伝子欠損マウスの繁殖が思うように進まず、実験に必要な数に達しなかったため予定していた野生型マウスとGHITM遺伝子欠損マウスの肝臓および腎臓における発現遺伝子の違いを明確に解析するに至らなかった。

Ghitmノックアウトマウスおよび野生型マウスの肝臓、心臓、腎臓、血清、脂肪細胞などの各組織のC12~C18の脂肪酸(ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸)の組成の違いについて各組織からヘキサンを用いて脂質を抽出しADAM化を行いHPLC-蛍光検出器によりについて解析を行った。Ghitmノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、肝臓および腎臓においては他の脂肪酸に対するオレイン酸の比率が上昇する傾向がみられ、一方で、ステアリン酸などの比率が低下した。また、各組織での脂質の量も上昇する傾向が得られた。

また、Ghitmの発現は、3T3-L1脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化過程で増加することが明らかとなっており、脂肪細胞での脂肪代謝制御におけるGhitmの機能を明らかにするために、3T3-L1細胞におけるsiRNAによるノックダウンを試みた。脂肪細胞に分化後、siRNAを導入することは非常に困難であるが、エレクトロポレーション法により、siRNAを100%近く導入することが可能となった。現在、Ghitmのノックダウンの最適条件を決定中である。今後、Ghitmをノックダウンした3T3-L1細胞を用いて、内在性Ghitmの脂肪代謝に果たす役割を細胞レベルで検討する予定である。

本研究開始時にはGHITMがペルオキシソーム膜に存在するという予備的な実験結果を得ていたが、今回の研究で、ミトコンドリア膜にも存在することを発見した。今後、Ghitmのノックアウトマウス、ノックダウン細胞を用いて、ペルオキシソームやミトコンドリアにGHITMが存在する分子機構、これらの細胞内小器官でGHITMが脂肪代謝制御に果たす新たな役割を明らかにしたいと考えている。

本研究は当初2年間の予定で研究を開始したが、研究途中でGhitmノックアウトマウスの繁殖がうまくいかなくなり、戻し交配などを行うことにより、研究期間を3年間に延長することで実験に必要な最低数のノックアウトマウスを確保できた。そのため明確な結論を得るに至らなかったのは非常に残念である。

一方で、Ghitmノックアウトマウスの繁殖がうまくいかなかった原因として、GHITM欠損によりミトコンドリアの形態維持や機能維持に異常をきたしたとも考えられる。今後、脂肪細胞のエネルギー代謝におけるPGDR/GHITMの機能解析のみならず、生殖細胞におけるPGDR/GHITMの機能解析にも目を向ける必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molecular-recognition/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

片岡 宏誌 (KATAOKA, Hiroshi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60202008

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし