

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659094

研究課題名（和文）

脂肪滴蛋白質の操作による肝再生促進技術の開発

研究課題名（英文）

The promotion of hepatic regeneration by lipid droplet' s proteins operation

研究代表者

鈴木 倫毅（SUZUKI MICHITAKA）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80456649

研究成果の概要（和文）：

部分肝切除後の肝再生には脂肪滴の代謝が重要である。本課題では、脂肪滴上の蛋白質の分解を操作することによって脂肪酸代謝を制御し、肝再生促進に繋げる方法を探索することを目的として研究を行なった。我々は UBXD8 と p97/VCP を脂肪滴局在蛋白質として同定し、この蛋白質複合体が脂肪滴上において Apolipoprotein B の分解を制御していることを明らかにした。更に我々は、UBXD8 が脂肪滴局在蛋白質の分解、及び脂肪滴の代謝へも関与する結果を得た。この成果は、更なる研究により肝再生促進技術開発に繋がることを期待できるものであった。

研究成果の概要（英文）：

Lipid droplet metabolism is essential for liver regeneration. The aim of this study is to promote liver regeneration by controlling a degradation of protein on LD. In this study, we found that UBXD8 and p97/VCP are localized on LDs, and that they are engaged in apolipoprotein B degradation around LDs. Furthermore, we showed that UBXD8 participated in degradation of LD-associated proteins as well as lipid metabolism in LDs. Further studies on UBXD8 should help develop a new technique that promotes liver regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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、組織学・発生学

キーワード：脂肪滴、部分肝切除

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪滴は過剰脂質を貯留するだけの不活性な構造と考えられてきたが、最近の研究により細胞内トラフィック、シグナル伝達などにも関与する動的なオルガネラであることが明らかになってきた。

近年、非アルコール性脂肪肝の罹患率が増加し、その一部が肝炎に、更にその一部

が肝硬変、肝癌に進展することが知られている。

脂肪肝は部分切除後の再生能が低いいため、肝移植のドナーとして不適格であることも問題となっている。一方、正常な肝臓を部分切除すると、再生初期に脂肪滴が激増し、一過性に脂肪肝状態を呈する。脂肪滴形成にカベオラを形成する Caveolin-1 が関与していることは周知の事実である。

Caveolin-1 ノックアウトマウスにおいて部分肝切除を施すと、正常肝で観察される脂肪滴増加が抑制され、正常マウスより肝再生が顕著に遅延する。このような一見、相矛盾する事実は、肝細胞の脂肪滴が重要な役割を担っていることを示唆している。

脂肪滴の分解は、リパーゼである ATGL が脂肪滴へリクルートされ、トリグリセリド(TG)をジアシルグリセロール(DG)に分解し、続いて HSL や MGL が脂肪滴上にリクルートされ DG がモノアシルグリセロール(MG)、さらにはグリセロールと脂肪酸にまで分解されることにおきる。ATGL の脂肪滴へのターゲットは、脂肪滴局在蛋白質である ADRP を過剰発現させることにより阻害されるとの報告がある。この ADRP はプロテアソームで分解されることが知られている。これらのことは、脂肪滴上に局在する蛋白質の分解を制御することで、脂肪滴代謝を制御できる可能性を示唆している。

肝細胞において、Apolipoprotein B (ApoB)は、小胞体内腔で脂質付加されて、very low density lipoprotein (VLDL)として細胞外に分泌される。以前、当研究室において、肝癌由来の細胞株である Huh7 細胞に脂肪酸を付加すると、脂肪滴周囲に ApoB が集積する構造体(ApoB-crescent)を見出した。ApoB-crescent は小胞体と脂肪滴の接合構造であり、小胞体内腔に脂質付加後の ApoB が蓄積していた。また、ApoB-crescent はプロテアソームを阻害することで増加することも見出した。つまり、脂肪滴を介した蛋白質分解系があることを示唆している。そこで、ApoB-crescent を手がかりに脂肪滴を介した分解機構を解明することで、脂肪滴局在蛋白質の動態を操作でき、肝再生の促進につながるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

正常肝では部分切除後の脂肪滴増加が再生に必要であるが、脂肪肝の部分切除後の再生能は低下している。我々は脂肪滴タンパク質の発現を操作することによって、脂肪肝を軽減し、部分切除後の再生能を高める方法を創出することを最終目標においている。

本研究では、我々が見出した ApoB-crescent を手がかりに、脂肪滴を介した蛋白質分解メカニズムを解明し、脂肪滴局在蛋白質の操作基盤を確立することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) Huh7 細胞を用いた ApoB-crescent における蛋白質分解メカニズムについて

- ① 窒素ガスを用いたキャビテーションにより細胞を破壊し、このサンプルを 0.54M ショ糖溶液にして、この上に、0.27M、0.135M、0M ショ糖溶液を順に積み重ねる。その後、SW41 ローターを用いて 30,000rpm で超遠心を行なった。最上層を脂肪滴分画とした。
- ② 脂肪滴分画を SDS-PAGE ゲルで電気泳動を行ない、トリプシン処理により切断する。切断されたペプチドを LC/MS と LC-MS/MS により解析した。
- ③ 細胞を 3% PFA/ 0.1M PB で固定し、0.01% digitonin/ PBS で透過性処理した。その後、免疫抗体反応により免疫抗体染色を行なった。
- ④ 細胞を 2.5% glutaraldehyde/ 0.1M Sodium cacodylate buffer で固定し、その後、1% Osmium tetroxide/ 0.1% potassium ferrocyanide で後固定し、エタノールで脱水後、Queto1 812 resin に包埋し、超薄切片を作製して電子顕微鏡により観察。
- ⑤ Lipofectamine RNAiMAX Regent (インビトロジェン)を用いて、siRNA を細胞に導入してノックダウンを行なった。
- ⑥ 細胞を 1% TritonX-100 /1% Sodium deoxycholate /TBS で処理し、可溶画分にヤギ抗 ApoB 抗体を入れ、4°C で 1 時間ローテーションし、続いて Protein A agarose を入れ 4°C で 1 時間ローテーションして免疫沈降を行なった。
- ⑦ 3% PFA/ 0.1M PB で固定し、0.01% digitonin/ PBS で透過性処理した。その後、各々の蛋白質に対する一次抗体を反応させた後、PLA PLUS 及び MINUS 抗体 (Olink) を反応させて、In site PLA (Proximity Ligation Assay) を行ない結合蛋白質の局在を観察した。

### (2) マウスでの解析

- ① 12 週齢のマウスに、siRNA を TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solution (タカラバイオ)を用いて、体重の 1/10 量を尾静脈より注入する。
- ② マウス exon1 を Flox で挟んだターゲット

イングコンストラクトを作製し、相同組換えにより ES 細胞に導入した。その後、マウス胚盤胞この ES 細胞を注入した。標的アレルの生殖系列伝播によって、雄のキメラを作製し、標的変異をもつ子孫を得た (Flox/Wt)。Flox/Wt を交配し Flox/Flox を誕生させて、このマウスと Albumin プロモーターで Cre がドライブされるマウスと交配することで、Flox/Flox, Albumin-Cre マウス (肝臓特異的コンディショナルノックアウトマウス) を作製した。

- ③ マウスを 10%ホルマリンにより還流固定し、パラフィン及び OCT に包埋し、パラフィン切片及び凍結切片を作製した。凍結切片は Oil-Red O 染色を施した。

#### 4. 研究成果

(1-①, ②, ③) 脂肪酸負荷 Huh7 細胞の脂肪滴分画を精製し、LC-MS/MS で解析した結果、p97/VCP と UBXD8 が脂肪滴分画に含まれていた。更に、脂肪滴分画を用いた Western Blotting や細胞の免疫蛍光染色により、これらの蛋白質が脂肪滴上に局在することを見出した。また、ApoB-crescent においては脂肪滴の細胞質側に局在していることが判明した。

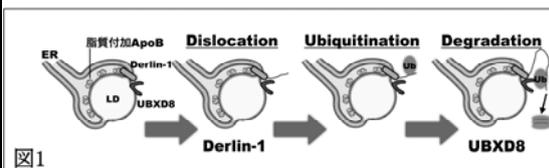
(1-③, ④, ⑤) 同定した UBXD8 を siRNA にてノックダウンすると ApoB-crescent が増加した。つまり、UBXD8 が脂肪滴上で機能し、ApoB の分解に関与していることが示唆された。

(1-⑤, ⑥, ⑦) UBXD8 は C 末端側に p97 と結合する UBX ドメイン、N 末端側にユビキチンと結合する UBA ドメインを有している蛋白質である。そこで、UBXD8 の各々のドメインを欠損した mutant で結合実験を行なった結果、UBX ドメインで p97 と結合し、p97 を脂肪滴にリクルートすること、UBA ドメインでユビキチン化した ApoB と結合することが判明した。また、siRNA によって UBXD8 をノックダウンしても ApoB はユビキチン化されるので、UBXD8 はユビキチン化された ApoB をプロテアソームに引き渡す過程に関与していることが示唆された。

ApoB-crescent とは小胞体と脂肪滴の接合構造で、小胞体内腔に ApoB が蓄積しているものである。ApoB はユビキチン化されているので、小胞体内腔から細胞質へ出ていくことになる。この移動に関与している分子として Derlin-1 を同定した。Derlin-1 をノックダウンすると ApoB-crescent が増

加するが、ApoB のユビキチン化は減少した。つまり、Derlin-1 が ApoB-crescent において ApoB を小胞体内腔から細胞質に移動させる機能を担っている。

In situ PLA により、UBXD8 と Derlin-1 が複合体を形成している場所が脂肪滴上であることが判明した。Derlin-1 は多重膜貫通蛋白質で、小胞体に局在していることが知られている蛋白質である。したがって、これらの蛋白質複合体は脂肪滴と小胞体が融合した ApoB-crescent に局在していることが示唆された (図 1)。



この成果は脂肪滴が蛋白質分解の足場として機能することを初めて示したものである。また、UBXD8 ノックダウンにより脂肪滴上に ApoB 以外の蛋白質が蓄積すること、細胞内脂肪滴量が増加することを見出した。つまり、UBXD8 が蛋白質分解を通じて脂質代謝を制御していることを示唆している。

(2-①) マウス UBXD8 および脂肪滴特異的蛋白質 ADRP に対する siRNA を作製し、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) で 60%以上のノックダウン効果を確認した。その後 TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solution (タカラバイオ) を用いて、マウス尾静脈より siRNA の導入を行ない、肝臓 (右葉、左葉、中間葉、尾状葉) を用いた Western Blot を行なった。その結果、肝臓において UBXD8、ADRP のノックダウンができていなかった。

(2-②) マウス UBXD8 の exon1 を loxP 配列で挟んだマウス (Flox) を作製した。その後、このマウスを交配することで Flox/Flox マウスを作製し、このマウスと Albumin プロモーターで Cre がドライブされるマウス (Albumin-Cre マウス) と交配し、肝臓特異的ノックアウトマウスが作製されたことをウェスタンブロットにより確認した。Protein X の肝臓特異的ノックアウトマウスの報告は、国内外において未だないものである。

(2-③) 通常食または高脂肪食を離乳とともに与え、16 週齢での肝臓への脂肪蓄積量をパラフィン切片及び、凍結切片での Oil-Red O 染色により検討した。高脂肪食負荷により、ノックアウトマウスにおいて脂肪滴量が増加していた。しかし、正常食では差はなかった。また、通常食で 60 週間飼育したマウスで比較したが、正常型

(Flox/Flox)とノックアウト(Flox/Flox, Albumin-Cre)の肝臓で脂肪滴量に有意な差は認められなかった。つまり、UBXD8は脂肪肝のリスクファクターになりうることを示唆している。

(今後の展望)UBXD8は脂肪滴上に局在し、蛋白質分解を司る分子であることが判明した。また、この分子をノックダウンあるいはノックアウトすることで、細胞及びマウスで脂肪滴が増加することを確認した。つまり、UBXD8が脂肪滴代謝に関与していると考えられる。

今後、このノックアウトマウスで部分肝切除を行ない肝臓再生の影響、及びノックアウトにより脂肪滴に蓄積している蛋白質を解析する予定である。このマウスにおいて肝再生の遅延が観察できれば、UBXD8の蛋白質量を操作することによって、又は蓄積蛋白質を操作することによって脂肪滴を操作し、結果的に肝再生を促進できると期待される。

#### 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3件)

1. Suzuki M, Iio Y, Saito N, Fujimoto T. Protein kinase C  $\eta$  is targeted to lipid droplets. *Histochem Cell Biol*, 139, 505-11, 2013
2. Suzuki M, Ohsaki Y, Tatematsu T, Shinohara Y, Cheng J, Fujimoto T. Translation inhibitors induce formation of cholesterol ester-rich lipid droplets. *PLoS One*, 8, e42379, 2012
3. Suzuki M, Otsuka T, Ohsaki Y, Cheng J, Taniguchi T, Hashimoto H, Taniguchi H, Fujimoto T. Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. *Mol Biol Cell*, 23, 800-10, 2012

[学会発表] (計6件)

1. \*鈴木倫毅、大崎雄樹、程晶磊、藤本豊士 第85回日本生化学会大会 “ER-LD 接合部における ApoB 分解

メカニズム” 2012年12月14日(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡・福岡)

2. \*Suzuki M, Ohtsuka T, Ohsaki Y, Cheng J, Fujimoto T 14th INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY “Derlin-1 and UBXD8 are related to dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at the ER-LD juncture” 2012年8月28日(京都国際会館・京都)
3. \*鈴木倫毅 鳥取大学医学部保健学科検査技術学専攻セミナー “脂肪滴と Apo-B の小胞体関連分解” 2012年8月3日(鳥取大学医学部・米子)
4. \*鈴木倫毅 医学・創薬に向けた小型魚類モデル利用推進ネットワーク第4回研究会 “脂肪滴局在蛋白質を介した ApoB 分解メカニズム” 2012年6月27日(生理学研究所・岡崎)
5. \*鈴木倫毅、大塚利彦、大崎雄樹、程晶磊、藤本豊士 第117回日本解剖学会総会・学術集会 “脂肪滴と ApoB の小胞体関連分解” 2012年3月26日(山梨大学・甲府)
6. \*Fujimoto T, Suzuki M, Ohsaki Y 第30回内藤コンファレンス「生体膜ダイナミクスと脂質生物学[II] 脂質ドメイン、脂肪滴、疾患」 “Lipid droplets as a platform of protein degradation.” 2011年6月28日-7月1日(シャトレーゼキングダム札幌・札幌)

[図書] (計1件)

1. Suzuki M, Shinohara Y and Fujimoto T, Histochemical Detection of Lipid Droplets in Cultured Cells, 483-492, Cell Imaging Techniques 2<sup>nd</sup> Edition, Humana Press, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

谷口 寿章 (TANIGUCHI HISAAKI)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授  
研究者番号：10257636