

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 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790087

研究課題名（和文）脂質代謝調節因子 Lipin1 の制御による肥満解消への戦略

研究課題名（英文）Strategy for the prevention of obesity by the regulation of Lipin1

研究代表者

石本 憲司（ISHIMOTO KENJI）

大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤）

研究者番号：00572984

研究成果の概要（和文）：脂質代謝調節因子 Lipin1 の機能を制御する新たな因子を同定するために、プロテオミクス的手法を用いて解析した。その結果、解糖系に関わる因子、ユビキチン-プロテアソームに関わる因子、プロリンの生合成関わる因子が Lipin1 と相互作用していた。次にユビキチン-プロテアソーム関連因子に着目し、この因子と Lipin1 の詳細な分子機構を解析した。その結果、Lipin1 タンパク質の安定性はユビキチン-プロテアソーム関連因子によって制御されていた。

研究成果の概要（英文）：We set out to search for novel mechanisms for regulation of Lipin1 protein by using proteomics analysis. As a result, we have identified the glycolysis protein, the ubiquitin-proteasome protein, and the proline biosynthetic protein as novel Lipin1 interacting factors. We next examined interaction between Lipin1 and the ubiquitin-proteasome protein actually, and to reveal the proteolytic mechanism for Lipin1. Our findings suggest that Lipin1 is polyubiquitinated by the ubiquitin-proteasome protein, and degraded by ubiquitin-proteasome system.

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	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：Lipin1、脂質代謝調節因子、トリグリセリド生合成、脂肪酸酸化、肥満、細胞内局在、プロテオミクス、ユビキチン-プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

生体内における脂質代謝の恒常性は、摂取エネルギーと消費エネルギーのバランスを厳密に制御することで維持される。このバランス制御には多種多様の脂質代謝調節因子が関与しており、これら因子群と細胞間シグナルとが連携して、壮大かつ緻密な脂質調節ネットワークを構築している。一方、形成された脂質調節ネットワークが崩壊すると、糖

尿病や高脂血症のような脂質代謝異常が発生し、最終的に動脈硬化症のような重大な疾患へと移行する。

Lipin1 は細胞内脂質代謝の恒常性を維持する鍵因子である。この因子のユニークな点として、細胞内局在を変化させることで、対極的な2つの脂質代謝機能を使い分けることである。具体的には、①細胞質：脂質生合成過程における酵素であるホスファチジン酸

ホスファターゼとして働く、②核：脂肪酸酸化に関連する遺伝子の発現を活性化する転写共役因子として働く。このように Lipin1 は、従来とは異なった代謝調節因子であり、創薬標的としても注目されている。しかしながら、Lipin1 がもつ2つの機能をどのように使っているかほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、Lipin1 と相互作用する因子を網羅的に同定し、Lipin1 がもつ2つの脂質代謝機能の新たな制御メカニズムを解明することを目的とした。また、Lipin1 のもつ脂質代謝機能を踏まえて、糖尿病や高脂血症のような脂質代謝異常症の基盤とある肥満を解消するための新しい治療戦略を提唱することを目指した。

3. 研究の方法

(1) エピトプタグを融合させた Lipin1 を細胞内に発現させ、免疫沈降法と質量分析計を用いて Lipin1 の相互作用因子を網羅的に探索する。

(2) 探索した因子が Lipin1 と相互作用する詳細な分子機構を免疫沈降法で解析する。また、その相互作用因子が Lipin1 に与える機能を検討する。

4. 研究成果

(1) Lipin1 の一次構造内には、種間で高度に保存された N-LIP ドメインと C-LIP ドメインが存在する(図1)。C-LIP ドメイン内には、Phosphatidate phosphatase (PAP) 酵素サイト (DXDXT) やコアクチベーターモチーフ (LXXIL) が存在する。また、N-LIP ドメインよりも C 末端側には核移行シグナル (NLS) が存在する。Lipin1 の脂質代謝機能は、細胞内局在が重要であり、その局在には NLS が関与する。そこで、エピトプタグの1つである V5 タグを融合させた Lipin1 発現プラスミド (V5-hLipin1) および NLS に変異を加えたプラスミド (V5-hLipin1 NLS Mut) を作製した。

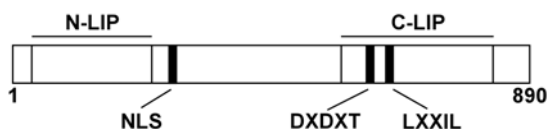


図1 ヒト Lipin1 の一次構造

作製した2つの発現プラスミドをヒト子宮頸

癌 HeLa 細胞にリポフェクション法で導入し、抗 Lipin1 抗体を用いた免疫蛍光染色法で解析した。その結果、V5-hLipin1 は主に核に局在し、V5-hLipin1 NLS Mut は主に細胞質に局在していた。従って、これらのプラスミドを用いて免疫沈降を行うことで、細胞内局在ごとに Lipin1 と結合する因子を推察できるようになった。

次に作製した発現プラスミドを HeLa 細胞に導入し、全細胞全抽出液を調製した。そして、調製した細胞抽出液と抗 V5 抗体を用いて免疫沈降後、得られたサンプルを用いて Western Blotting と銀染色を行った(図2)。その結果、Lipin1 およびそれと共沈した複合体と予測されるバンドが確認できた。そこで、このサンプルを用いて LC-MS/MS 解析を行ったところ、核と細胞質のシャトルタンパク質やアポトーシスの際に DNA 断片化に関わるタンパク質など Lipin1 と相互作用が報告されていない数十個のタンパク質を見出すことができた。

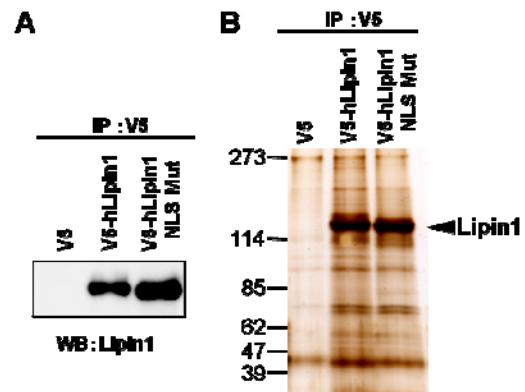


図2 野生型または NLS 変異型 Lipin1 複合体の精製 A. 抗 V5 抗体を用いた Western Blotting の結果 B. 銀染色法の結果

(2) LC-MS/MS 解析の結果から得られた因子のうち、コントロールと十分な差があると考えられる7個のタンパク質についての cDNA クローニングを行った。そして、これら候補タンパク質と Lipin1 との相互作用が実際に細胞内で行われているか否かを共発現による免疫沈降法で調べた。その結果、解糖系に関わる因子、ユビキチン-プロテアソームに関わる因子、プロリンの生合成に関わる因子が Lipin1 と相互作用していた。

次にユビキチン-プロテアソーム (Ub-Pro) 関連因子に着目し、この因子と Lipin1 が相互作用する詳細な分子機構の解析を行った。まず Ub-Pro 因子が結合するモ

モチーフを論文検索し、そのモチーフが Lipin1 に存在するかを調べたところ、Lipin1 の構造内にそのモチーフがあることがわかった。そこで、Lipin1 の Ub-Pro 因子結合モチーフが実際に Ub-Pro 因子との相互作用に寄与しているかを調べることにした。具体的には、Ub-Pro 因子結合モチーフに変異を加えた Lipin1 発現プラスミド (V5-hLipin1 Mut) を作製し、V5-hLipin1 Mut と Ub-Pro 因子との結合を免疫沈降法で調べた。その結果、V5-hLipin1 と Ub-Pro 因子間で確認できた結合が、V5-hLipin1 Mut を用いた場合には観察されなかった (図 3)。また、図 3 と同条件のサンプルと抗ユビキチン化抗体を用いて Western Blotting 解析を行ったところ、Lipin1 と Ub-Pro 因子が共存下することで、Lipin1 のポリユビキチン化が起こることがわかった。

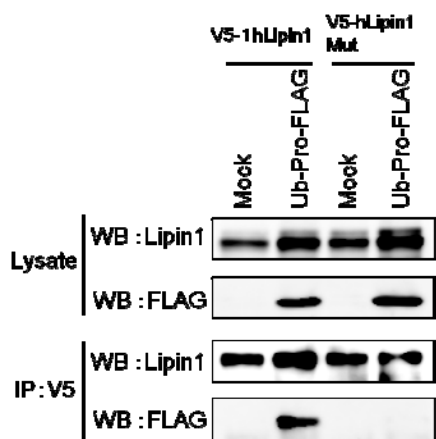


図 3 Lipin1 と Ub-Pro の相互作用解析

最後にヒト肝癌由来細胞株とプロテアソーム阻害剤を用いて、内在性 Lipin1 タンパク質の安定性を調べたところ、Lipin1 がプロテアソームにより調節されていることがわかった。また、プロテアソーム処理を加えた細胞を細胞質成分と核成分に分画し、Lipin1 タンパク質の安定性を解析したところ、細胞質画分の Lipin1 がプロテアソームに制御されていた。

これらのことから Lipin1 は、今回新たに見出した Ub-Pro 因子と相互作用することにより Lipin1 タンパク質の安定性を制御しており、この分子機構を介して細胞内の脂肪合成の機能を調節していることが予想された。従って、この Lipin1 の分解機構を特異的に活性化することが、肥満に対する新たな治療戦略となりうる。

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 4 件)

① Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Sugimoto K, Ishimoto K, Yamashita M, Maegawa T, Yamasaki D, Osada S, Tanaka T, Rakugi H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) via a peroxisome proliferator responsive element. *J. Biochem.*, 査読有, in press.

② Yamaguchi S, Yamane T, Takahashi-Niki K, Kato I, Niki T, Goldberg MS, Shen J, Ishimoto K, Doi T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Transcriptional activation of low-density lipoprotein receptor gene by DJ-1 and effect of DJ-1 on cholesterol homeostasis. *PLoS One*, 査読有, 7(5), e38144, (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0038144

③ Ishimoto K. Lipin 1 in lipid metabolism. *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 131(8), 1189-1194, (2011).

④ Yamasaki D, Kawabe N, Nakamura H, Tachibana K, Ishimoto K, Tanaka T, Aburatani H, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T. Fenofibrate suppresses growth of the human hepatocellular carcinoma cell via PPAR α -independent mechanisms. *Eur. J. Cell Biol.*, 査読有, 90(8), 657-664, (2011).

[学会発表] (計 11 件)

① 藤田泰聖, 樋野展正, 上原光太郎, 前川貴志, 熊谷文子, 石本憲司, 橘敬祐, 土井健史, 核内受容体 PPAR δ の恒常的転写活性化領域への結合因子の解析, 日本薬学会 第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜

② 熊谷文子, 石本憲司, 河井恵, 橘敬祐, 川村猛, 田中十志也, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史, 脂質代謝調節因子 Lipin1 タンパク質の分解制御機構の解析, 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月, 福岡

③ 橘敬祐, 竹内健太郎, 稲田大彦, 杉本研, 石本憲司, 田中十志也, 楽木宏実, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 沢村達也, 土井健史, ヒト核内受容体 PPAR α による生体防御レクチン MBL2 の発現制御機構の解析, 第 121

回 日本薬理学会近畿支部会, 2012 年 6 月, 徳島

④ 河井恵, 石本憲司, 橘敬祐, 山崎大典, 川村猛, 田中十志也, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史, 脂質代謝因子 Lipin1 の細胞内局在を制御する相互作用因子の探索, 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月, 横浜

⑤ 山下雅礼, 橘敬祐, 杉本研, 秋山恵麻, 石本憲司, 山崎大典, 岩成宏子, 田中十志也, 望月康弘, 楽木宏実, 酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, 転写制御因子を介したミトコンドリアの脂肪酸酸化制御の解析, 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月, 横浜

⑥ Kenji Ishimoto, Megumi Kawai, Keisuke Tachibana, Daisuke Yamasaki, Takefumi Doi. Global proteomic analysis of lipin1 involved in lipid metabolism. The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011 Nov. Osaka

⑦ Keisuke Tachibana, Kotaro Uehara, Takashi Maegawa, Masanori Yamashita, Fumiko Kumagai, Taisei Fujita, Kenji Ishimoto, Daisuke Yamasaki, Takefumi Doi. Functional analysis of the roles of posttranslational modification of PPAR delta in regulating transcriptional activity. The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011 Nov. Osaka

⑧ Eiko Gotoh, Keisuke Tachibana, Yoshie Uchihara, Natsuko Kawamata, Kenji Ishimoto, Daisuke Yamasaki, Takefumi Doi. Protein purification and generation of antibody for structure analysis of SETDB1. The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011 Nov. Osaka

⑨ 石本憲司, 中村太樹, 河井恵, 橘敬祐, 土井健史, 肥満解消を目指した Lipin1 遺伝子の発現制御機構の解明, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011 年 10 月, 神戸, 支部会奨励賞受賞者講演

⑩ 後藤英子, 橘敬祐, 内原佳恵, 川又那津子, 石本憲司, 岩成宏子, 川村猛, 望月康弘,

酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の細胞内局在の解析, 第 84 回 日本生化学会年会, 2011 年 9 月, 京都

⑪ 橘敬祐, 後藤英子, 内原佳恵, 川又那津子, 石本憲司, 山崎大典, 岩成宏子, 望月康弘, 酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, ヒストンメチル化酵素 SETDB1 はメチル基供与体 SAM の輸送体になり得るか? 第 6 回 トランスポーター研究会年会, 2011 年 6 月, 仙台

〔図書〕(計 1 件)

① 石本憲司, 土井健史. 朝倉書店, 血管生物医学事典 (日本血管生物医学会編), 2011 年 12 月, p380-383.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 憲司 (ISHIMOTO KENJI)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教 (常勤)

研究者番号 : 00572984