

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660076

研究課題名(和文)細胞外に放出される膜小胞エクソソームを介したPLSCR3の脂肪細胞分化制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of adipocyte differentiation by PLSCR3 mediated by extracellularly secreted vesicle exosomes

研究代表者

牧 正敏(Maki, Masatoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40183610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト胎児腎由来HEK293細胞に過剰発現させたphospholipid scramblase 3 (PLSCR3)が細胞外に膜小胞(エクソソーム)として分泌されることを既に報告したが、本研究により、マウス脂肪前駆細胞3T3-L1において、細胞内のPLSCR3量は分化に伴い減少するが、細胞外に膜小胞に含まれて放出される量は増加することを明らかにした。また、3T3-L1細胞に恒常的にPLSCR3を発現させると脂肪細胞分化が抑制されること、また、転写カスケードにおいて後期分化因子の発現誘導を抑制することが判明し、PLSCR3が脂肪細胞分化における負の制御因子として作用することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that phospholipid scramblase 3 (PLSCR3), stably expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells, is secreted from the cells extracellularly as membrane vesicles (exosomes). In the present study, we clarified that PLSCR3 is expressed in mouse preadipocytic 3T3-L1 cells and that the amount of intracellular PLSCR3 decreased during differentiation but that of extracellularly secreted protein increased. Overexpression of PLSCR3 in 3T3-L1 cells suppressed adipocytic differentiation and transcription factor induction at the late stage. PLSCR3 was suggested to act as a negative regulator of adipogenesis.

研究分野：農芸化学・応用生物化学

キーワード：脂肪前駆細胞 エクソソーム 細胞外膜小胞 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

Phospholipid scramblase (以下、PLSCR)は、1990年代後半、脂質二重層の不均衡性を解消する因子として同定されたが、現在では、多重膜貫通タンパク質である TMEM16F がその主な役目を果たしていると考えられ、PLSCR1 は、EGF 受容体に結合してシグナル伝達の亢進や、核内にも存在して、IP3 受容体遺伝子の発現を亢進させると注目されている。ヒトゲノムに存在する5つの PLSCR アイソフォームのうち、PLSCR3 はミトコンドリアに存在し、ミトコンドリア特異的リン脂質カルジオリピンをミトコンドリア外膜の脂質ドメイン(ラフト)に露出させ、アポトーシス関連因子 tBidの足場として作用すると考えられているが、PLSCR3 の局在や機能についても不明な点が多い。自然発症肥満マウスの原因遺伝子 *Tub* (*tubby*、デブ、太ったの意)産物、およびそのホモログ TULP1-3 は転写活性化ドメインをもち、発現部位である神経系において転写因子機能が想定されているが、PLSCR との間にも一次構造上の有意な相同性がある。一方、PLSCR3 のノックアウトマウスは腹部脂肪が蓄積し、血中の脂質濃度上昇、インスリン抵抗性など、生活習慣病様の症状を示すことが報告されている。我々は PLSCR3 がアポトーシス関連カルシウム結合蛋白質である ALG-2 の相互作用因子であることを見出すとともに、PLSCR3 がパルミトイル化され、細胞外にも膜小胞(エクソソーム)として分泌されることを明らかにしてきた。ホメオドメインをもつ一部の転写因子は、細胞外に分泌され、近傍の細胞に受け取られ、発生分化を制御していることも知られている。

## 2. 研究の目的

PLSCR3が細胞外にエクソソームとして分泌されることは、ヒト胎児腎由来HEK293細胞に PLSCR3を恒常的に発現する細胞を樹立することにより明らかにした。しかし、内在性の PLSCR3が同様にエクソソーム分泌されるか否か、また、PLSCR3ノックアウトマウスにおける脂肪蓄積の仕組みは、不明のままであった。一般に、動物細胞から放出されるエクソソームが細胞間のコミュニケーションに関わっていることが明らかになりつつある。本研究では PLSCR3がエクソソームとして分泌されることの生物学的意義について、脂肪細胞分化を中心に、生化学的、分子細胞生物学的に明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞分化研究のモデル細胞であるマウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 を独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから入手した。脂肪細胞分化誘導は、コンフルエントに達した細胞をさらに2日間培養したのち、合成グルココルチコイド Dexamethasone、cAMP ホスホジエステラーゼ阻害剤イソブチルメチルキサンチン IBMX、インスリンを含む分化誘導培地で2日間培養し、さらに1日おきにインスリンを含む培地と交換しながら、8日間培養を続けた。

(2) ヒト PLSCR3 の N 末端領域の GST-融合タンパク質を抗原とし、ウサギに免疫して得られた抗血清を得たのち、MBP 融合蛋白質固定化カラムを用いて PLSCR3 特異抗体をアフィニティ精製した。そしてウェスタンブロット法による PLSCR3 の発現解析を行った。

(3) 3T3-L1 細胞より RNA を抽出し、逆転写酵素反応(RT)後、特異的プライマーを用いて、着目した遺伝子の転写産物 mRNA 量を LightCycler Nano (Roche Applied Science 社)リアルタイム定量 PCR (qPCR) 装置を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 入手したマウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞が、所定の分化誘導条件下で培養すると、細胞内に脂肪滴を蓄積することを脂肪染色色素 Oil-Red O を用いて染色されることを確認した。そして、トリグリセリド量の増加、および脂肪細胞分化マーカーである Ap2 (別名 Fatty acid-binding protein 4, Fabp4) mRNA 量の増加を確認した。

(2) 調製した抗 PLSCR3 抗体を用いて 3T3-L1 全細胞抽出液のウェスタンブロット解析をしたところ、PLSCR3 の発現を明瞭に検出することができた。そして、分化誘導剤処理により検出される PLSCR3 量が顕著に減少した。

一方、培地中に放出された PLSCR3 は、培地を 10,000 × g で遠心し、その上清を 100,000 × g で遠心して得られる沈殿画分 (CM-P<sub>100</sub>) に検出され、エクソソームに含まれて分泌されること、そして、その量は分化に伴って増加することが判明した。

(3) 3T3-L1 細胞より RNA を調製し、PLSCR3 mRNA を RT-qPCR で定量したところ、分化に伴い減少したが、その程度は蛋白質の減少量と比較して少なかった。PLSCR3 蛋白質量の大きな減少は、mRNA 量の減少に加え、培地中にエクソソームとして分泌される PLSCR3 蛋白質量の増加も一因であることが分かった。しかし、翻訳効率や分解率の変動が PLSCR3 存在量に影響を及ぼす可能性は否定できない。

(4) PLSCR3 の発現量減少と脂肪細胞分化の関係を明らかにするため、レトロウイルスベクターを用いて、ヒト PLSCR3 (hPLSCR3) を 3T3-L1 で一過性に過剰発現させ、脂肪細胞分化に及ぼす影響を調べた。hPLSCR3 を恒常的に発現させた細胞ではトリグリセリドの蓄積が顕著に抑制された。

(5) PLSCR3 が 3T3-L1 細胞のトリグリセリド蓄積を抑制するメカニズムを明らかにするため、細胞分化に関与する転写因子の遺伝子発現を RT-qPCR により解析した。hPLSCR3

の過剰発現は、初期分化転写因子である C/EBP $\alpha$  や C/EBP $\beta$  の mRNA 量増加に対しては影響を与えなかったが、後期分化転写因子である PPAR $\gamma$  や C/EBP $\beta$  の発現誘導を抑制した。

(6) 転写因子 XBP1 は、脂肪細胞分化にも関わっていることが報告されている。小胞体ストレス応答因子である小胞体膜貫通蛋白質 Ire1 の活性化により XBP1 の mRNA は細胞質において特殊なスプライシングを受け、その翻訳産物 sXBP1 が活性型転写因子として核内に移行し、小胞体ストレス応答遺伝子の転写を活性化するとともに、脂肪細胞後期分化転写因子の誘導にも作用する。hPLSCR3 の過剰発現は、小胞体ストレス誘導剤であるタブシガルギン (小胞体・筋小胞体カルシウム ATPase 阻害剤) 処理による XBP1 スプライシングには影響を与えないが、脂肪細胞分化過程における sXBP1 量増加に対して抑制的に働いた。

(7) 脂肪細胞分化の転写因子カスケードにおいて PLSCR3 は負の制御因子として作用することが示唆された。従って、分化に伴って細胞内の PLSCR3 蛋白質量を減少させるため、PLSCR3 がエクソソームとして細胞外に放出されることは合目的であると考えられる。エクソソームは細胞間シグナルを媒介する細胞外小器官としても認識されつつあるが、PLSCR3 を含む場合には、近隣の細胞に作用して過度の脂肪細胞分化を抑制する可能性もある。PLSCR3 を恒常的に発現する HEK293 細胞株を樹立し、PLSCR3 を含むエクソソーム画分を 3T3-L1 細胞培地に添加し、分化に対する影響を調べる実験を行ったが、有意な分化抑制効果は認められなかった。エクソソーム量が不十分であった、あるいはエクソソーム調製過程に問題があった可能性もあり、結論は得られていない。

(8) 脂肪前駆細胞で PLSCR3 の発現量が高い理由は、単に脂肪細胞分化を抑制するだけではなく、間葉系細胞が脂肪前駆細胞に分化

するために必要な因子である可能性もある。  
3T3-L1細胞とその親株である3T3細胞を比較することにより有益な情報が得られる可能性があり、今後の解析が望まれる。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

猪川亮、犬塚達俊、柴田秀樹、牧正敏  
脂肪前駆細胞 3T3-L1 の分化過程における  
PLSCR3 の発現および細胞外膜小胞(エキソソーム)分泌の解析 日本生化学会中部支部  
2013年度例会 2013年5月25日 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

猪川亮、犬塚達俊、高原照直、柴田秀樹、牧正敏  
脂肪前駆細胞 3T3-L1 の分化過程における  
PLSCR3 の発現および非古典的分泌の解析 第86回日本生化学会大会 2013年9月11日-13日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

猪川亮、犬塚達俊、高原照直、柴田秀樹、牧正敏  
脂肪前駆細胞3T3-L1分化における分泌小胞エクソソームに含まれるPLSCR3の発現解析および発現抑制の影響 日本農芸化学会中部支部例会 2013年10月12日 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

猪川亮、犬塚達俊、高原照直、柴田秀樹、牧正敏  
マウス脂肪前駆細胞3T3-L1細胞分化におけるPLSCR3の役割 日本農芸化学会2014年度大会 2014年3月27日-30日 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

猪川亮、犬塚達俊、高原照直、柴田秀樹、牧正敏  
マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化における PLSCR3 の発現および役割の解析 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-27日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

猪川亮、犬塚達俊、高原照直、柴田秀

樹、牧正敏 PLSCR3 は脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化の負の制御因子として機能する  
2015年度日本農芸化学会大会 2015年3月26日-29日 岡山大学(岡山県・岡山市)

[その他]

ホームページ等

[http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100003692\\_ja.html](http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100003692_ja.html)

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~mcr/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

牧正敏 (MAKI, Masatoshi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 40183610

##### (2)研究分担者

なし

研究者番号:

##### (3)連携研究者

柴田秀樹 (SHIBATA, Hideki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号: 30314470

##### (4)研究協力者

高原照直 (TAKAHARA, Terunao)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号: 90708059

猪川亮 (INOKAWA, Akira)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・  
博士課程後期課程大学院生