

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏名 篠田 旭弘
指導教員名 佐藤 隆一郎

論文題目 脂肪細胞脂肪滴形成の分子基盤研究

肥満が生活習慣病のリスクファクターであるという事実は広く認知されるようになってきたが、それにもかかわらず、BMI (body mass index) 25 以上の肥満人口は成人男性を中心に増え続けている。肥満とは脂肪細胞が余剰なエネルギーを脂肪滴の形で蓄積し、脂肪細胞中の脂肪滴が肥大化した状態である。脂肪細胞は最大の分泌器官であり、肥満に伴う脂肪滴過形成はアディポサイトカインの分泌異常を引き起こし、インスリン抵抗性を惹起する一因となる。さらに、近年、脂肪滴は脂質代謝の場となることや膜形成、メンブレントラフィック、シグナル伝達に関与することが明らかになってきており、その過形成は肥満や脂肪肝だけでなく、ニューロパチーなどの疾患にもかかわることが明らかになってきた。脂肪滴の形成機構を明らかにすることはこれらの疾患の予防や新たな治療法の確立の手がかりになることが期待される。

脂肪滴形成に重要なタンパク質として PAT ファミリータンパク質が知られている。PAT ファミリータンパク質は脂肪滴に局在するタンパク質であり、perilipin、ADRP (adipose differentiation-related protein)、Tip47、S3-12、MLDP (myocardial lipid droplet protein) の 5 種類が現在までに報告されている。そのうちのひとつ、ADRP は非脂肪組織の脂肪滴に局在し、リパーゼによる脂質分解から脂肪滴を保護することが明らかとなっている。ADRP ノックアウトマウスを用いた解析やアンチセ

ンスオリゴを用いた解析から ADRP の発現減少が脂肪肝の抑制につながることを示されている。この ADRP のタンパク質量はユビキチン・プロテアソーム系による分解によって制御されているが、その詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では ADRP のユビキチン化を介した分解制御機構の解明を目的として、ユビキチン化及びその他の翻訳後修飾の解析を行った。

第 1 章 脂肪細胞における ADRP の発現制御

脂肪細胞の脂肪滴には主に perilipin が局在し、リパーゼによる脂質分解から脂肪滴を保護する一方、脂質分解刺激時には PKA (protein kinase A) によりリン酸化され、リパーゼと結合し、脂質分解を促進することが知られている。しかし、他の PAT ファミリータンパク質の脂肪細胞における機能に関してはほとんど報告がない。そこで本章では脂肪細胞における ADRP の発現制御および機能に関する解析を行った。

脂肪細胞分化に伴い、脂肪滴が形成されていく。この時、perilipin は mRNA 発現量およびタンパク質量が分化に伴い増加したのに対し、ADRP は mRNA 発現は増加するが、タンパク質発現は増加せず、プロテアソームにより分解を受けていることが示された。脂肪細胞では perilipin が脂肪滴に局在することが報告されていることから ADRP の局在を検証すると、細胞質に局在することが蛍光免疫染色法により示された。そこで perilipin knockout mouse より初代前駆脂肪細胞および MEF を調製し、脂肪細胞へと分化させたところ、分化に伴い脂肪滴が形成され、ADRP は mRNA 発現量およびタンパク質量が分化に伴い亢進することが示された。この時、ADRP が脂肪滴に局在しており、プロテアソームによる分解が阻害されていることが明らかとなった。Perilipin knockout mouse より調製した初代前駆脂肪細胞に perilipin を強制発現し、脂肪細胞へと分化させたところ、ADRP のタンパク質量は減少し、脂肪細胞分化過程での ADRP のタンパク質発現に perilipin が関与することが示された。加えて、perilipin knockout mouse より調製した MEF (mouse embryonic fibroblasts) の ADRP をノックダウンして脂肪細胞へと分化させたところ、脂質蓄積の減少が認められたことから、perilipin 非存在時には ADRP は脂肪細胞分化過程において脂質蓄積に寄与することが示された。

また、脂質分解刺激時の ADRP の発現変動を調べたところ、ADRP の mRNA 発現量は変化しなかったが、タンパク質量が増加することが示され、この時、ADRP は脂肪滴に局在しており、プロテアソームによる分解が阻害されていることが明らかとなった。加えて、ADRP をノックダウンして脂肪細胞へと分化させたところ、脂肪細胞分化過程における脂質蓄積に変化は認められないものの、脂質分解

刺激時の培地中へのグリセロール放出量が減少したことから、脂肪細胞において ADRP は脂質分解刺激時に脂肪滴上で脂質分解を促進する機能を持つことが示唆された。

第 2 章 ADRP のユビキチン・プロテアソーム系による分解機構の解析

ADRP はユビキチン・プロテアソーム系による選択的な分解を受けることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで本章ではユビキチン・プロテアソーム系による分解に関わる ADRP のアミノ酸配列やユビキチン化サイトの特定を試みた。

まず始めに、N 末端または C 末端に 3xFlag タグを付加した ADRP をマウス線維芽細胞 NIH-3T3 に発現させたところ、C 末端に付加した ADRP 3xFlag は分解が認められたが、N 末端に付加した 3xFlag ADRP は分解が認められなかった。そこで ADRP の N 末端の deletion mutant および point mutant を発現させたところ、ADRP の 1-7 アミノ酸残基およびそのうちの 2 番目と 3 番目のアラニンがプロテアソーム系による分解に重要であることが示された。これらの ADRP mutant はユビキチン化が減少していたことから ADRP の N 末端が ubiquitin ligase の認識もしくは結合に重要な配列であることが示唆された。

また、LC-MS/MS を用いて ADRP の N 末端の翻訳後修飾を調べたところ、1 番目のメチオニンが除去され、2 番目のアラニンがアセチル化する翻訳後修飾を受けていることが明らかとなった。そこで N 末端のアラニンをアセチル化すると報告される Naa10 をノックダウンしたが、2 番目のアラニンのアセチル化に変化は認められなかった。この時、ADRP の mRNA 発現量に変化はなかったが、ADRP タンパク質量が増加したことから、Naa10 が間接的に ADRP の分解に関与することが示唆された。

続いて ADRP のユビキチン化サイトを探索するために C 末端の deletion mutant を発現させたところ、全長 ADRP (1-425) と同様に、ADRP (1-225) もプロテアソームによる分解を受けていたことからユビキチン化リジンが 1-225 アミノ酸残基中に存在することが示唆された。また、1-225 アミノ酸残基中の全リジンをアルギニンに置換した全長 ADRP (1-425) もプロテアソームによる分解を受けていたことから 225-425 アミノ酸残基中にもユビキチン化サイトが存在することが示唆された。

第 3 章 脂肪滴上の ADRP の安定化と翻訳後修飾

ADRP はユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けるが、脂肪滴上の

ADRP の分解が遅いことが^[35S]-Met puls chase 実験により報告されている。また、プロテオーム解析により脂肪滴上の ADRP がリン酸化タンパク質として報告されている。その詳細はいずれも明らかとなっておらず、ユビキチン化とリン酸化は協調もしくは拮抗することが報告されていることから脂肪滴上の ADRP の安定化とリン酸化の詳細を検討した。

脂肪滴を形成するために培地にオレイン酸を添加したところ、非添加群と比較してプロテアソームによる分解が阻害されていることが明らかとなり、この時、脂肪酸添加条件下では ADRP のユビキチン化が減少していた。また、脂肪滴形成後、細胞分画を行ったところ、脂肪滴に局在する ADRP は細胞質に局在する ADRP と比較してユビキチン化が減少することが明らかとなり、脂肪滴上の ADRP の分解の抑制はユビキチン化の減少に起因することが示唆された。

脂肪滴を形成するために培地にオレイン酸を添加したところ、ADRP 中のセリン残基のリン酸化が western blotting により検出された。また、脂肪滴形成後、細胞分画を行ったところ、脂肪滴に局在する ADRP と同様に細胞質に局在する ADRP もリン酸化していることが明らかとなった。そこで N 末端を deletion し、脂肪滴に局在できない ADRP を発現させた細胞にオレイン酸を処理したところ、この N 末端 deletion ADRP もリン酸化したことから、ADRP のリン酸化は細胞質で起こり、その後 ADRP は脂肪滴へと局在が変化することが示唆された。一方、C 末端を deletion した ADRP はオレイン酸を処理してもリン酸化しなかったこと、脂肪滴に局在したことから、ADRP のリン酸化セリン残基は C 末端側に存在し、脂肪滴への局在にセリン残基のリン酸化は寄与しないことが示された。続いて、オレイン酸と同時にアシル CoA 合成阻害剤である triacsinC を処理して TG 合成を阻害したところ、ADRP のリン酸化が減少したことから、ADRP のリン酸化には TG 合成が関与することが示唆された。

まとめ

本研究では ADRP のユビキチン・プロテアソーム系による分解制御機構に関する研究を行い、脂肪滴への局在によりユビキチン化が抑制され、分解から免れることを示した。また、ADRP の N 末端の 2 つのアミノ酸がユビキチン化を制御していることを示した。今後、E3 ligase の同定、さらなる分解制御機構の解明が課題となる。加えて、脂肪細胞において ADRP が脂質分解に寄与することが示唆されたことから、さらなる機能解析を進めていく。