

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 篠田 旭弘

---

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、世界の肥満人口は増え続けている。これらの病態が一個人に重積しやすい状態はメタボリックシンドロームと呼ばれる概念で定着しており、脳卒中や冠動脈疾患の発症率が上昇することが知られている。そのため、肥満を頂点とするこれらの疾患の発症機構の解明は非常に急務な課題となっている。

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、肥大化した状態である。この脂肪滴は脂肪細胞分化過程で形成され、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。脂肪細胞では主に PAT ファミリータンパク質の一つ、perilipin が脂肪滴上に局在し、脂質蓄積、脂質分解を促進するという 2 つの異なる機能を持つこと、これらはリン酸化修飾により調節されることが報告されている。一方、PAT ファミリータンパク質の一つ、ADRP は脂肪滴が形成される脂肪細胞分化過程で発現誘導される遺伝子として同定され、ユビキタスに発現している。ADRP は肝細胞において脂肪滴に局在し脂質蓄積を促進することが報告されているものの、脂肪細胞における機能に関する報告はほとんどない。また、ADRP はユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けることが報告されているが、その詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では脂肪細胞脂肪滴形成機構の解明を目的として、脂肪細胞における ADRP のタンパク質発現制御機構解析および機能解析を行った。

まず初めに野生型マウスの MEF、初代前駆脂肪細胞の脂肪細胞分化過程における ADRP の発現変動を調べた結果、脂肪細胞分化初期は ADRP の mRNA 発現量およびタンパク質量は増加したが、脂肪細胞分化後期にかけては ADRP の mRNA 発現量は増加したもののタンパク質量は増加せず、プロテアソームによる分解を受けていること、ADRP は細胞質に局在することが示された。一方、脂肪細胞の脂肪滴に主に局在している perilipin のノックアウトマウスより調製した MEF の脂肪細胞分化過程では ADRP の mRNA 発現量およびタンパク質量は増加し続け、プロテアソームによる分解を受けず、脂肪滴に局在することが示された。さらに perilipin ノックアウトマウスの脂肪細胞にレトロウイルスを用いて perilipin を発現させると ADRP タンパク質量は減少した。以上の結果から脂肪細胞分化過程において perilipin 非存在時には ADRP は脂肪滴に安定に局在するが、perilipin が発現すると ADRP は細胞質に局在し、プロテアソームによる分解を受けることが示された。また、脂肪細胞のもう一つの機能である脂質分解刺激時の ADRP の発現変動を調べた結果、脂質分解刺激時に perilipin はリン酸化され、タンパク質量が減少したが、ADRP は mRNA 発現量は変動しないもののタンパク質量が増加し、プロテアソームによる分解を受けず、脂肪滴に局在することが示された。

続いて、脂肪細胞における ADRP の機能解析を行った。ADRP を強制発現、もしくは内因性 ADRP をノックダウンしても脂肪細胞分化過程での脂質蓄積量に影響を与えなかった。一方、perilipin ノックアウトマウスの脂肪細胞の内因性 ADRP をノックダウンすると分化過程での脂質蓄積量が減少した。また、内因性 ADRP をノックダウンすると脂質分解刺激時に放出されるグリセロール量が減少することが示された。以上の結果から脂肪細胞において ADRP は perilipin 非存在時の脂肪細胞分化過程での脂質蓄積を促進し、脂質分解時には脂質分解を促進するという 2 つの異なる機能を持つことが示された。

続いて ADRP のユビキチン・プロテアソームによる分解に関与する ADRP 内のアミノ酸配列を調べた結果、ADRP の 1-6 番目のアミノ酸配列、特に 2、3 番目のアラニン残基が ADRP のユビキチン化に重要であることが示された。続いて、ADRP のユビキチン化サイトを探索した結果、ADRP は複数個のリジン残基もしくはリジン残基以外のアミノ酸残基がユビキチン化することが示唆された。また、タンパク質の N 末端アセチル化酵素複合体の酵素活性部位である Naa10 をノックダウンすると ADRP タンパク質量が増加し、Naa10 が間接的に ADRP のタンパク質分解に関与することが示された。

続いて perilipin 非存在時の脂肪細胞や脂質分解刺激時に認められた ADRP の脂肪滴上での安定化メカニズム解析を脂肪酸添加により脂肪滴形成を行うことで解析した。その結果、脂肪滴上に局在する 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していることが示された。続いて脂肪滴上でのユビキチン化の減少のメカニズムを解析するために、脂肪酸添加時の ADRP のリン酸化を解析した。その結果、ADRP は脂肪酸添加時に細胞質において複数個のセリン残基がリン酸化され、このリン酸化には ADRP の C 末端および脂肪酸 CoA 合成が重要であることが示された。しかし一方で、脂肪酸添加時の ADRP のリン酸化は ADRP の脂肪滴への移行やユビキチン化の減少には関与しないことが示された。

本研究において脂肪細胞における ADRP のタンパク質発現制御機構解析、機能解析を行い、脂肪細胞において ADRP は脂肪滴への局在によりユビキチン化が抑制され、プロテアソームによる分解から免れ、脂質蓄積および脂質分解を正に制御しうることを示した。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、ADRP のユビキチン化を行う E3 ligase の同定を含めたさらなる分解制御機構、ADRP の機能のメカニズムの解明が課題となる。

白色脂肪細胞における過剰な脂肪滴蓄積が肥満であり、この過剰蓄積をどのように予防、解除するかが生活習慣病、メタボリックシンドロームの予防、軽減化に直結する事は疑いない。従って、白色脂肪細胞内での脂肪滴形成の分子基盤を解明する事は急務の課題であり、本研究成果はその分子機構の一部を提示する事に成功した。さらに、褐色脂肪細胞における熱産生を介したエネルギー消費上昇が、抗肥満効果をもたらす事から、白色細胞の褐色脂肪化、すなわち **Browning** に興味が集まっている。白色脂肪と異なり、多房性の脂肪滴を細胞内に溜め込む褐色脂肪細胞内での脂肪滴蓄積機構を理解することは、**Browning** を介した抗肥満を目指す上で不可欠の課題であり、今後さらなる解析によりその詳細が明らかにされる必要がある。本研究成果が、その解明の進展に寄与する事が期待される。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。