

論文要旨

脂肪滴の成熟における脂肪滴膜リン脂質脂肪酸鎖の生物学的意義の解明 有澤 琴子

背景・目的

脂肪滴は、他の二重膜のオルガネラとは異なりリン脂質の一重膜が中性脂肪を取り囲んだ特徴的な構造をしている。リン脂質には飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合しているが、脂肪滴一重膜リン脂質の脂肪酸鎖が脂肪滴膜においてどのような意義を持つのかはこれまでほとんど報告されていなかった。筆者はこれまでに、白色脂肪細胞のモデル細胞である 3T3-L1 脂肪細胞では、脂肪細胞への分化に伴い、脂肪滴一重膜リン脂質の脂肪酸組成が変化することを報告した (Arisawa *et al.*, *J. Biochem.*, 2013)。脂肪細胞の分化に伴い脂肪滴は成熟し、初期には小型である脂肪滴は分化後半になると顕著に肥大化し、また脂肪滴に局在するタンパク質の種類や量も変化する。リン脂質の脂肪酸の不飽和度の変化は、膜の流動性や曲率に影響するため、大型の脂肪滴を安定化させるための物理的性質を調節している可能性や、脂肪滴膜への脂肪蓄積関連タンパク質の局在を調節している可能性が考えられる。これらの視点から、本研究では脂肪滴のサイズ調節やタンパク質局在変化における脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸の意義を検討することで、脂肪滴膜の脂肪酸組成の変化が脂肪滴の脂肪蓄積においてどのような意義を持つのか解明することを目的として研究を行った。

1. 脂肪滴膜リン脂質脂肪酸組成が脂肪滴サイズに与える生物物理的影響

大型脂肪滴モデル細胞の作製および脂肪滴の脂質解析

脂肪滴の肥大化と脂肪滴一重膜の脂肪酸変化の関係性を明らかにするため、脂肪滴どうしの融合を誘導する Fat specific protein 27 (FSP27) をマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に安定発現させ、大型脂肪滴モデル細胞を作製した (FSP27 細胞)。小型脂肪滴と大型脂肪滴の脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成の特徴を調べるため、作製した FSP27 細胞の大型脂肪滴とコントロール (mock 細胞) の小型脂肪滴を分画し、脂肪滴膜の主なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) の脂肪酸組成を測定した。その結果、FSP27 細胞から得られた大型脂肪滴は、mock 細胞の小型脂肪滴と比較して PC の飽和脂肪酸が多く、一価・多価不飽和脂肪酸が少ないという結果が得られた。一方、トリアシルグリセロール (TAG) や各リン脂質量については mock と FSP27 細胞間で顕著な差は見られなかった。

培養細胞の脂質抽出物を用いた脂肪滴様エマルジョンの再構成

次に、脂肪滴の脂質組成そのものが脂肪滴のサイズを規定している可能性を検討するために、細胞より得られた小型・大型脂肪滴の脂質抽出物を用いて試験管内で脂肪滴に似た構造の oil in water (O/W) 型エマルジョンを再構成し、そのサイズを評価した。mock 細胞と FSP27 細胞それぞれの脂肪滴の脂質抽出物からエマルジョンを再構成させると、FSP27 細胞の脂質抽出物からは大型のエマルジョンが得られたのに対して、mock 細胞の脂質抽出物では小型のエマルジョンしか見られなかった。この結果より、大型脂肪滴を構成している脂質組成そのものが、大型脂肪滴を形成しやすい性質を持つことが示唆された。

合成脂質を用いた脂肪滴様エマルジョンの作製

リン脂質脂肪酸の不飽和度の違いがエマルジョン形成に与える影響を調べるために脂肪酸の不飽和度の異なる合成リン脂質を材料にしてエマルジョンを作製した。飽和脂肪酸モデルの PC である DSPC、

不飽和脂肪酸モデルの PC である DOPC それぞれと TAG を混合してエマルジョンを形成させると、DSPC を用いた際に大型の脂肪滴が観察されたことから、リン脂質の飽和脂肪酸は大型脂肪滴の形成に必要であることが示唆された。

脂肪滴様エマルジョンの膜密度測定

膜リン脂質の不飽和度の違いは、エマルジョン表面を覆う一重膜の密度に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、蛍光分子であるラウルダンをを用いて膜密度の測定を行った。その結果 DSPC エマルジョンは DOPC よりも膜密度が高く、また FSP27 細胞の脂肪滴から再構成したエマルジョンは、mock と比べて膜密度が高いことがわかった。膜密度が高い場合、リン脂質の側方移動は制限されるため、脂肪滴内部のトリアシルグリセロールが部分的に露出し、エマルジョンの安定性が低く融合しやすい状態にあると考えられる。このことから、飽和脂肪酸を多く含むリン脂質を用いたエマルジョンの大型化は、不安定な小型エマルジョンどうしが融合することで表面積を減らし安定化しようとする生物物理的な作用に起因するものであると考えられた (Arisawa *et al.*, BBRC, 2016)。

2. 脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成が脂肪滴膜タンパク質の局在に与える影響

脂肪滴一重膜におけるリン脂質脂肪酸組成の違いによる Perilipin1 局在の変化

脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸不飽和度の違いがタンパク質の局在に影響を与える可能性を検討するために、脂肪滴膜タンパク質である Perilipin1 の局在と脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成の関係性を調べた。Perilipin1 は小型の脂肪滴よりも成熟した大型脂肪滴に多く局在する膜タンパク質であり、脂肪滴を脂肪分解から保護する作用を持つことが報告されている。この Perilipin1 を安定発現させた NIH3T3 細胞に種々の脂肪酸を添加し免疫蛍光染色にて Perilipin1 の局在を調べた。その結果、飽和脂肪酸を添加した場合は Perilipin1 が細胞質に分散して見られたのに対して、不飽和脂肪酸添加では脂肪滴への局在が増加していることが確認された。

脂肪滴様エマルジョンへの Perilipin1 局在と結合能の評価

脂肪滴一重膜のリン脂質脂肪酸の不飽和度と Perilipin1 の相互作用を更に詳細に検討するため、DSPC と DOPC を用いてエマルジョンを作製し、エマルジョンへの Perilipin1 の結合能を Western blotting で評価した。すると、Perilipin1 は不飽和脂肪酸モデルの DOPC を用いたエマルジョンに多く結合する傾向があった。次に DSPC と DOPC エマルジョンへの Perilipin1 の結合の要因を調べるために、疎水性および静電気相互作用の阻害剤を用いて検討した。その結果、静電気相互作用の阻害でより顕著に Perilipin1 との結合が阻害されることがわかった。また、DOPC エマルジョン表面では DSPC エマルジョンよりも疎水性相互作用および静電相互作用が強く働いていることが示された。

結論

脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸は脂肪滴の成熟に応じて変化するだけでなく、脂肪滴の肥大化や脂肪滴上のタンパク質局在を調節する因子のひとつとなっていることが示された。本研究により、脂肪滴膜の飽和脂肪酸は脂肪滴どうしの融合・大型化を促進する生物物理的な役割を果たしていることが明らかになった。一方、脂肪滴膜における不飽和脂肪酸の増加は Perilipin1 などの脂肪蓄積に関わるタンパク質の局在を調節していることが示唆された。これらの結果より、脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸は脂肪滴の成熟において重要な役割を持つことが示された。