

論文要旨

題目

脂肪細胞におけるアクアポリン 8 の機能に関する研究 ～3T3-L1 細胞を用いたアプローチ～

氏名

伊香賀 玲奈

背景

アクアポリン 8 (AQP8) は、水チャネルタンパク質であるアクアポリンファミリーに属しており、肝臓や精巣などの様々な組織で発現している。細胞内では、細胞膜およびミトコンドリア内膜において機能することがこれまで報告されており、ミトコンドリアに局在するミトコンドリア型 AQP8 については、 H_2O の他、 H_2O_2 、 NH_3 の透過において重要な役割を果たしているという報告があるが、その情報は肝臓などのいくつかの組織や細胞に限られている。

目的

本研究において、マウス脂肪組織ならびに脂肪細胞に分化可能な培養細胞株である 3T3-L1 細胞にも AQP8 が発現し、ミトコンドリア型が多いことを見出した。本研究ではこの結果をふまえ、3T3-L1 細胞を用いて AQP8 ノックダウン細胞株を樹立し、AQP8 の発現抑制がミトコンドリア機能に与える影響を調べることを目的とした。さらに、AQP8 遺伝子の発現制御機構についても検討を行った。

結果および考察

1. マウス脂肪細胞ならびに株化脂肪細胞 3T3-L1 における AQP8 の存在と細胞内局在

マウス脂肪組織ならびに 3T3-L1 細胞における AQP8 の細胞内局在をウエスタンブロット法と免疫染色法により調べたところ、AQP8 が発現することを見出し、その細胞内局在はミトコンドリアであることがわかった。

2. AQP8 ノックダウン細胞株の樹立とミトコンドリア機能に対する影響

ミトコンドリアにおける AQP8 の機能を調べるため、3T3-L1 細胞に AQP8 に対する shRNA を発現させるためのプラスミドをトランスフェクションし、AQP8 の mRNA 発現量ならびにタンパ

ク質量が 25%まで抑制された AQP8 ノックダウン細胞 (shAQP8 細胞) を樹立した。

AQP8 ノックダウン細胞では、酸素消費量が減少し、細胞内 ATP 量も顕著に減少していた。また、ミトコンドリアにおいて水を生成する 2 つの酵素、シトクロム c オキシダーゼならびに ATP 合成酵素の活性が AQP8 ノックダウン細胞で減少していた。加えて、AQP8 の抑制はミトコンドリアの著しい膨張を引き起こすことが電子顕微鏡によって確認された。これらの結果から、AQP8 の発現抑制は、ミトコンドリアにおける水の流れを障害してミトコンドリアの膨張を引き起こし、その結果引き起こされた水生成反応の抑制を介して、電子伝達系と ATP 合成酵素の活性を低下させているのではないかと考えられた。

また、AQP8 ノックダウン細胞において、脂肪蓄積の低下や、糖代謝・脂質代謝の変化が見られ、ミトコンドリア機能低下を介して脂肪細胞の状態に様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。

3. 発現制御機構からみた AQP8 の役割

AQP8 とミトコンドリアエネルギー代謝のより積極的な関わりを示すため、細胞内の AMP:ATP 比の低下に伴い活性化し、代謝に関わる様々な遺伝子制御の中心的な役割を担う AMP-activated protein kinase (AMPK) シグナルに着目した。3T3-L1 細胞において、AQP8 の遺伝子発現量は、AMPK 活性化剤 AICAR 濃度依存的に増加し、その増加は AMPK 活性化抑制剤 Compound C により低下することが示された。更に、AMPK で制御される遺伝子のうち、ミトコンドリア生合成に関わる NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 を siRNA により抑制したところ、AQP8 の発現もそれに伴い低下することが示された。AQP8 の発現はエネルギー生成の要求に従って変動し、ミトコンドリアエネルギー生成に関与する遺伝子と共に制御されることが示唆された。

総括

AQP8 はマウス脂肪組織ならびに 3T3-L1 細胞で発現していることを見出した。3T3-L1 細胞では主としてミトコンドリア型 AQP8 が存在し、AQP8 の発現抑制はミトコンドリアからの水の排出不全、および電子伝達系における水生成反応の活性の低下を介してミトコンドリア呼吸機能を低下させることが示唆された。更に、ミトコンドリア型 AQP8 の遺伝子発現はエネルギー代謝に関わる遺伝子と共に制御されることが示唆された。

以上の事から、脂肪細胞においてミトコンドリア型 AQP8 は、水の排出を通してミトコンドリア機能を正常に保つ役割を担うと考えられた。