



Cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A and fat-specific protein 27 β coordinately control lipid droplet size in brown adipocytes

Nishimoto, Yuki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7030号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007030>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A and fat-specific protein 27 β coordinately control lipid droplet size in brown adipocytes

褐色脂肪細胞における CideA と FSP27 β による脂肪滴サイズの制御機構

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌内科学
(指導教員: 小川 渉 教授)

西本 祐希

[背景・目的]

脂肪組織は白色脂肪組織 (WAT) と褐色脂肪組織 (BAT) の大きく 2 種類に分類される。WAT は、エネルギー蓄積型の脂肪細胞であり、効率的に中性脂肪を蓄積するのに適した単房性の巨大脂肪滴を形成する。一方、BAT は熱産生を担うエネルギー消費型の脂肪細胞であり、中性脂肪を分解して生じた遊離脂肪酸を効率的に細胞質内のミトコンドリアで消費するのに適した多房性の小脂肪滴を形成する。このように、WAT や BAT は、細胞の機能に適した脂肪の蓄積形態をとると考えられているが、形態の違いをわけるメカニズムは未だ明らかにされていない。Cide ファミリーは脂肪滴形成に関連する脂肪滴関連蛋白である。Cide ファミリーには 3 つのアイソフォームがあり、CideA は BAT、CideB は肝臓や腎臓、CideC すなわち FSP27 (Fat-specific protein of 27) は WAT や BAT にそれぞれ主に発現している。WAT における巨大脂肪滴の形成には、FSP27 が重要であることが既に知られている。CideA も FSP27 と同様に脂肪滴の融合および増大を促すことが報告されている。一方、BAT は脂肪滴サイズを増大させる CideA が特異的に発現しているにも関わらず、なぜ多房性の小脂肪滴を形成するのかは不明であり、大変興味深い点である。

FSP27 に関する最近の知見として、既知のアイソフォームである FSP27 α に加えて、新たに FSP27 β が同定された。FSP27 β は、FSP27 α と同一遺伝子で、異なったプロモーター領域から転写されるため、従来の FSP27 α の N 末端に 10 アミノ酸が附加された構造を示す。しかし、脂肪細胞における脂肪滴形成に対する機能は不明であった。そこで、FSP27 β を含めた Cide ファミリーが脂肪滴サイズに及ぼす効果を検討し、BAT における脂肪滴サイズの制御メカニズムを明らかにすべく本研究を行った。

[方法・結果]

野生型マウスの脂肪細胞に発現する CideA と FSP27 について、WAT、BAT における発現を検討したところ、mRNA および蛋白レベルで、WAT には主に FSP27 α 、BAT には FSP27 β と CideA の発現を認めた。次に、これらの蛋白を COS 細胞へ過剰発現させて脂肪滴サイズに対する効果を検討した。既知通り、FSP27 α と CideA の過剰発現により巨大脂肪滴の形成が認められた。興味深いことに、FSP27 β を過剰発現させても、脂肪滴サイズの増大は認められなかった。蛍光免疫染色の結果では、FSP27 α 、 β および CideA はいずれも脂肪滴表面に局在した。BAT の Cide ファミリーの発現パターンを再現すべく、COS 細胞へ FSP27 β と CideA を同時に過剰発現させると、CideA による脂肪滴サイズの増大が、FSP27 β の濃度依存性に抑制された。また、機能喪失型と考えられる変異型 FSP27 β と CideA を共発現させた COS 細胞では、FSP27 β による脂肪滴サイズ増大に対する抑制効果が有意に減弱した。FSP27 β と CideA を共発現させた際にも、両者は同じく脂肪滴表面で共局在した。

逆に、褐色脂肪細胞由来 HB2 培養脂肪細胞において、siRNA により FSP27 をノック

クダウンすると、脂肪滴サイズは有意に増大した。同様に FSP27 ホモ欠損マウスの BAT でも、野生型やヘテロ欠損マウスと比較して有意な脂肪滴サイズの増大と脂肪滴数の減少を認めた。これらの結果は、BAT において FSP27 β が CideA による脂肪滴サイズの増大を抑制的に制御していることを示唆するものと考えられ、脂肪滴表面において FSP27 β は何らかのメカニズムで CideA の脂肪滴増大作用に対して抑制優位型に作用していることが推察された。そこで、野生型マウスの BAT の可溶化分画を用いた共沈実験を行ったところ、BAT における CideA と FSP27 β の結合が確認できた。CideA は FSP27 α と同様に、脂肪滴同士の接触面において、ホモダイマーを形成することで、脂肪滴同士の融合とサイズ増大を促進する機序が証明されている。そこで我々は、FSP27 β が CideA に結合し、CideA のホモダイマー形成を抑制することで脂肪滴の融合やサイズの増大を抑制しているのではないかと考え、2種のタグ付き CideA と FSP27 β を COS 細胞へ同時に過剰発現させた。共沈実験を行い、CideA 同士のホモダイマーの形成が、実際に FSP27 β によって阻害されることを明らかにした。

[考察]

本研究における Cide ファミリーの解析の結果、BAT には CideA とともに FSP27 β が多く発現していることが明らかとなった。さらに、FSP27 β は、FSP27 α と異なり巨大脂肪滴を形成せず、BAT の脂肪滴表面において、CideA に結合することにより、CideA のホモダイマー形成による巨大脂肪滴の形成を阻害する結果、BAT が多房性の小脂肪滴形態をとるメカニズムを解明した。BAT が細胞内に蓄積した中性脂肪を分解して、FFA を細胞外に放出するのではなく、細胞質において隣接するミトコンドリアに効率的に流入させて利用するには、单房性脂肪滴よりも多房性脂肪滴形態が適していると考えられ、その形態維持において FSP27 β が重要な役割を担っていることを示した。肝臓では、CREBH (cyclic-AMP responsive element binding protein H) が FSP27 β の転写調節因子であることが既に示されているが、BAT には CREBH が存在しないため、BAT における FSP27 β の転写調節など未だ明らかではない点も多い。今後のさらなる解析が必要であるが、BAT における小脂肪滴形態の維持はエネルギー消費を増大させるために有利であり、FSP27 β が肥満治療のターゲットとなりうる可能性も出てきた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2723 号	氏名	西本 祐希
論文題目 Title of Dissertation	<p>Cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A and fat-specific protein 27β coordinately control lipid droplet size in brown adipocytes</p> <p>褐色脂肪細胞における CideA と FSP27β による脂肪滴サイズの制御機構</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 中村 康一</p> <p>副査 Vice-examiner 中村 俊一</p> <p>副査 Vice-examiner 西本 祐希</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

脂肪組織は白色脂肪組織(WAT)と褐色脂肪組織(BAT)の大きく2種類に分類される。WATは、エネルギー蓄積型の脂肪細胞であり、単房性の巨大脂肪滴を形成する。一方、BATは熱産生を担うエネルギー消費型の脂肪細胞であり、多房性の小脂肪滴を形成する。WATやBATがこのような形態の違いを生じるメカニズムは不明である。Cide ファミリーは脂肪滴関連蛋白であり、3つのアイソフォームがあり、CideAはBAT、CideBは肝臓や腎臓、CideCすなわちFSP27(Fat-specific protein of 27)はWATやBATにそれぞれ主に発現している。BATは脂肪滴サイズを増大させるCideAが特異的に発現しているにもかかわらず、なぜ多房性の小脂肪滴を形成するのかは不明である。FSP27のアイソフォームは、FSP27 α に加えて新たにFSP27 β が同定された。しかし、FSP27 β の脂肪細胞における脂肪滴形成に対する機能は不明であった。申請者らは、FSP27 β を含めたCide ファミリーがBATにおける脂肪滴サイズを制御するメカニズムを明らかにすることを目的に、本研究を行った。

【方法および結果】

野生型マウスのWAT、BATにおけるCideAとFSP27の発現を検討したところ、mRNAおよび蛋白レベルで、WATには主にFSP27 α 、BATにはFSP27 β とCideAの発現を認めた。次に、これらの蛋白をCOS細胞へ過剰発現させて脂肪滴サイズに対する効果を検討したところ、FSP27 α とCideAの過剰発現により巨大脂肪滴の形成が認められた。一方、FSP27 β を過剰発現させても、脂肪滴サイズの増大は認められなかった。蛍光免疫染色の結果では、FSP27 α 、 β およびCideAはいずれも脂肪滴表面に局在した。COS細胞にFSP27 β とCideAを同時に過剰発現させると、CideAによる脂肪滴サイズの増大が、FSP27 β の濃度依存性に抑制された。また、機能喪失型と考えられる変異型FSP27 β とCideAを共発現させたCOS細胞では、FSP27 β による脂肪滴サイズ増大に対する抑制効果が有意に減弱した。

褐色脂肪細胞由来HB2培養脂肪細胞において、siRNAによりFSP27をノックダウンすると、脂肪滴サイズは有意に増大した。同様にFSP27ホモ欠損マウスのBATでも、野生型やヘテロ欠損マウスと比較して有意な脂肪滴サイズの増大と脂肪滴数の減少を認めた。次に、野生型マウスのBATの可溶化分画を用いた共沈実験を行ったところ、BATにおけるCideAとFSP27 β の結合が確認できた。さらに、2種のタグ付きCideAとFSP27 β をCOS細胞へ同時に過剰発現させたところ、CideAのホモダイマーの形成が、FSP27 β によって阻害された。

【結論】

申請者らは、BATにはCideAとともにFSP27 β が多く発現していることを明らかにし、さらに、FSP27 β はBATの脂肪滴表面において、CideAに結合することにより、CideAのホモダイマー形成を阻害する結果、BATが多房性の小脂肪滴形態となることを解明した。本研究は、BATにおける小脂肪滴形態の維持のメカニズムを明らかにし、FSP27 β が肥満治療のターゲットとなりうる可能性を示した価値ある研究であると認める。したがって、本研究者は博士(医学)を得る資格があると認める。