OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	代謝制御因子Lipin-1 の脱リン酸化制御因子の探索とその機能調節
Author(s)	奥野, 紘子
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72329
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　奥野　紘子　）	
論文題名	代謝制御因子Lipin-1 の脱リン酸化制御因子の探索とその機能調節

論文内容の要旨

Lipin-1 は、脂肪や骨格筋、肝臓などに発現し、細胞内脂質量のコントロールに重要な因子である。肥満や2型糖尿病、脂肪肝などの代謝性疾患において、Lipin-1 の発現異常が報告されており、Lipin-1 はこれら疾患の治療標的となる可能性がある。Lipin-1 は、細胞質ではホスファチジン酸ホスファターゼ（PAP）として機能し脂質の合成を促進する一方で、核内では転写共役因子として働き脂肪酸酸化促進に寄与する。このように、Lipin-1 は細胞内局在により異なる機能を発揮するが、その制御機構については不明な点が多い。そのため、Lipin-1 の機能を制御する詳細なメカニズムを明らかにすることができれば、核内Lipin-1 が担う脂肪酸酸化能を積極的に活性化させることを通じて、代謝性疾患の治療につなげることが期待される。本研究では、翻訳後修飾の一種であるリン酸化によるLipin-1 の局在制御に着目し、Lipin-1 の詳細なリン酸化機構や脱リン酸化酵素の同定を試みた。また、新規に同定したLipin-1 の脱リン酸化酵素であるPGAM5 がLipin-1 の機能をどのように制御するかについて解析を行った。

まず、Lipin-1の リン酸化とその局在制御の関係性について調べる。細胞内におけるLipin-1のリン酸化状態を確認するために、HeLa 細胞に強制発現させた野生型Lipin-1を免疫沈降で精製した。そして、タンパク質を脱リン酸化するアルカリホスファターゼ（BAP）処理後、Western Blot 解析でLipin-1 を検出した。その結果、BAP 未処理のものに比べ、BAP 処理を行ったサンプルについて、脱リン酸化に由来する低分子量側へのバンドシフトが観察された。この結果から、細胞内のLipin-1 は高度にリン酸化修飾を受けていることが確認できた。続いて、890アミノ酸を持つLipin-1 から各種欠損させた変異体を作製し、同様の検討を行った。その結果、Lipin-1 の162-217 アミノ酸領域を除いた欠損体がBAP 処理によるバンドシフトが観察されなかった。以上の結果から、162-217 アミノ酸領域がLipin-1 のリン酸化の鍵となる領域であることが予想され、この領域をPivotal region in phosphorylation of Lipin-1 （PRPL）と命名した。

次にPRPL 領域を除いたLipin-1（ΔPRPL）を構築しリン酸化状態をWestern Blot 解析で調べた結果、野生型Lipin-1 に比べΔPRPL のセリン、並びに、スレオニン残基のリン酸化状態が低下した。また、PRPL 領域に存在する７つのセリン残基と2つのスレオニン残基をアラニンに置き換えたLipin-1（9A）についてリン酸化状態を調べた結果、野生型Lipin-1 に比べ9A のセリン残基のリン酸化状態が低下した一方で、スレオニン残基のリン酸化は変化がなかった。以上の結果から、PRPL 領域のセリン残基のリン酸化がLipin-1 タンパク質全体のリン酸化に寄与することが示唆された。高度にリン酸化されたLipin-1 は細胞質の局在が高まり、リン酸化状態が低下すると核に蓄積することが報告されている。そこで、PRPL 領域がLipin-1 の局在に与える影響を解析した。その結果、野生型Lipin-1 に比べ、Lipin-1（ΔPRPL）とLipin-1（9A）は核に多く発現していた。以上より、PRPL 領域のセリン残基のリン酸化がLipin-1 の細胞内局在を制御することがわかった。

Lipin-1 を積極的に脱リン酸化することで、Lipin-1 の核移行を促進できると期待できる。そこで、Lipin-1 の脱リン酸化酵素の同定を試みた。FLAG タグ融合Lipin-1 を発現させたHEK293 c18 細胞抽出液から免疫沈降によりLipin-1 複合体を単離し、その複合体をLC-MS/MS 解析を行った。その結果、セリン/スレオニンホスファターゼであるPGAM5 を同定した。次にLipin-1 がPGAM5 の標的基質であるか調べた。HeLa 細胞内にLipin-1 とPGAM5 を共発現した結果、Lipin-1 のセリン残基のリン酸化が減少した。さらに、HeLa 細胞内に発現させたLipin-1 を免疫沈降により精製し、リコンビナントPGAM5 をin vitro で反応させたところ、Lipin-1 のリン酸化状態が低下した。これらの結果から、PGAM5 は細胞内でLipin-1 を直接脱リン酸化することが示された。

続いてPGAM5 の活性化が肝臓細胞内でLipin-1 の局在や機能に与える影響について解析を進めた。PGAM5 の活性化剤であるCCCP をヒト肝がん由来HepG2 細胞に90分間作用させた結果、Lipin-1 のリン酸化状態が低下し、核内のLipin-1 タンパク質の発現が増加していた。これらの結果から、CCCP 添加により活性化したPGAM5 がLipin-1 を脱リン酸化し、

核移行を促進することが示唆された。

脂肪肝病態において、肝臓細胞内のミトコンドリアが障害を受けていることが報告されており、このような条件下では常にPGAM5 が活性化していると予想される。そこで長期的なPGAM5 の活性化がLipin-1 に及ぼす影響を調べた。HepG2細胞にCCCP を長時間作用させた結果、細胞内のLipin-1タンパク質の発現が減少した。Lipin-1 の減少メカニズムを解析した結果、Lipin-1 タンパク質の減少はPGAM5 の発現量に依存しており、オートファジー阻害剤であるクロロキンによって減少を阻害できることが明らかとなった。次に、PGAM5 の活性化がLipin-1 がもつ脂質代謝制御機能に与える影響を明らかにするため、HepG2 細胞にCCCP を72時間添加し、細胞内トリグリセリド（TG）量を測定した。その結果、細胞内TG 量はCCCP 添加濃度依存的に減少し、Lipin-1 ノックダウン群ではCCCP 添加によるTG 量の変化は認められなかった。以上の結果から、CCCP 添加によるPGAM5 の長期的な活性化は、Lipin-1 のオートファジー分解を促進しPAP 機能を抑制することで、細胞内TG 量を減少させることが示唆された。

本論文において著者は、Lipin-1 の脱リン酸化酵素としてPGAM5 を同定した。さらに、PGAM5 がLipin-1 タンパク質の局在や安定性を制御することで、細胞内脂質代謝を制御することを見出した。本知見から、Lipin-1 はPGAM5 を介してミトコンドリアダメージを感知し、脂肪酸酸化促進や脂質合成抑制を通して細胞内脂質量を減少させる機能を有することが示唆された。今後、PGAM5-Lipin1 シグナルを介した細胞内脂質量調節機構が、脂肪肝をはじめとする代謝性疾患において、新たな治療標的となることが期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　奥野　紘子　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者		
主 査	教授	土井　健史
副 査	教授	辻川　和丈
副 査	教授	藤尾　慈

論文審査の結果の要旨

奥野さんは、代謝制御因子 Lipin-1 の脱リン酸化による機能調節機構の解明を目指して研究を行った結果、Lipin-1 の核局在を制御する自らの領域を見つけた。また、Lipin-1 の新規ホスファターゼとして PGAM5 を同定し、PGAM5 活性化剤 CCCP が Lipin-1 の脱リン酸化や核局在を促進し、細胞内脂質量を減少させることを明らかにした。

まず、Lipin-1 タンパク質全体のリン酸化維持に重要な領域を同定し、この領域のリン酸化阻害が Lipin-1 の核移行を促進することを見出した。

次に、Lipin-1 の新規ホスファターゼとしてミトコンドリア Ser/Thr ホスファターゼである PGAM5 を同定し、続いてミトコンドリア脱共役により PGAM5 を活性化させる CCCP の添加が、Lipin-1 の脱リン酸化や核移行を促進することを明らかにした。さらに、CCCP 添加が Lipin-1 依存的に細胞内トリグリセリド量を減少させることが示された。

これらの結果は、ミトコンドリアのダメージを PGAM5 が Lipin-1 に伝達し、細胞内脂質量を調節するという新たな細胞内機構の存在を示唆している。

以上の成果は、細胞が高脂肪負荷などの細胞外環境に合わせたエネルギー消費機構を備えていることを示したことになり、複雑な脂質代謝機構の解明の一助となることが期待されることから、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。