

主論文の要約

Studies on functions of PLSCR3 in adipocyte differentiation (脂肪細胞分化における PLSCR3 の機能に関する研究)

生命農学研究科 応用分子生命科学専攻 応用生命化学講座 猪川亮

【序文】 Phospholipid scramblase (PLSCR, 以下 Scr)には 5 種類のアイソフォーム (Scr1-5)が存在している。一次構造上、Scr ファミリーの C 末端側膜会合性転写調節因子である Tubby (TUB)や Tubby-like protein (TULP)の Tubby domain に似ていることから Scr ファミリーは Tubby-like protein スーパーファミリーに属している。また、Tubby domain が疎水性ヘリックスを有する 12 本の β バレルに囲まれた球状構造も持つことから Scr ファミリーの Scr1 と Scr3 は TUB や TULP と同様の構造を持つと予想させている。さらに、TUB 欠損もしくは変異のあるマウスは遅発性肥満、難聴、盲目の表現型を示している。また、TUB と TULP は PIP_2 を介して細胞膜に結合しており、G タンパク質の活性化でホスホリパーゼ C が PIP_2 を切断すると、Tubby と TULP は細胞膜から核に移行してゲノム DNA と結合すると報告されている。

赤血球より単離された Scr1 ならびにその組換タンパク質は、これまで *in vitro* 実験において Ca^{2+} 依存的に脂質二重膜のリン脂質を双方向に混合させる活性をもつため、スクランブラーゼと呼ばれている。しかし、Scr1 ノックアウトマウスの赤血球膜上で依然としてリン脂質の混合が起こることに加えて、Scr1 とは別の因子であり、8 回膜貫通タンパク質 TMEM16F (スクランブラーゼ) や 6 回膜貫通タンパク質 Xkr8 (フリッパーゼ) が *in vivo* で機能する因子として同定された。そのため、Scr タンパク質ファミリーは生理的なスクランブラーゼとしての機能は疑問視され、これとは異なる別の生理機能をもつと考えられている。実際、Scr1 はイノシトール三リン酸レセプター遺伝子の転写活性化因子として働くと報告されている。一方、Scr3 はカルジオリピンの合成・輸送やアポトーシスへの関与、さらに細胞外膜小胞エクソソームに含まれて細胞外に分泌されていると報告されている。また、Scr3 ノックアウトマウスでは腹部脂肪の蓄積、血中の脂質濃度の上昇、インスリン抵抗性の生活習慣病症状を示すことが知られている。本研究では Scr タンパク質ファミリーのうちでも特に Scr3 に着目し、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞 (マウス線維芽細胞株 3T3 由来) を用いて脂肪細胞分化における Scr3 の生理機能解明を目的とした。

【1】 3T3 および 3T3-L1 細胞における分化誘導刺激による Scr3 発現量変化

Scr3 の発現をウェスタンブロットや RT-qPCR 法で解析した。3T3-L1 細胞内の Scr3 タンパク質及び mRNA 量は分化誘導刺激後、2 日目に大きく減少した。2 日目以降、細胞内の Scr3 タンパク質の量および mRNA 量は 8 日目まで低レベルに維持された。さらに、細胞外分泌される Scr3 タンパク質の量は経時的に増加した。一方、3T3 細胞では 3T3-L1 細胞分化過程とは異なり、分化誘導刺激後、2 日目に細胞内 Scr3 タンパク質の量および mRNA 量は一時的に減少するものの、その後増加した。また、細胞外分泌される Scr3 タンパク質の量に大きな変化は見られなかった。このことから 3T3 細胞が分化能を獲得すると Scr3 発現制御機構が変化すると示唆された。また、分化に伴う細胞内 Scr3 タンパク質の顕著な量的減少は Scr3 mRNA 量の減少とともに Scr3 タンパク質細胞外分泌量の増加によることが示唆された。

【2】 Scr3 過剰発現による脂肪滴蓄積抑制ならびに後期転写因子の発現誘導抑制

細胞分化における Scr3 タンパク質の量的減少の生物学的意義を理解するために 3T3-L1 細胞にレトロウイルスベクターを用いて Scr3 を一過性に発現させ、トリグリセリド蓄積に及ぼす影響を調べた。その結果、Scr3 過剰発現はコントロールベクターと比較してトリグリセリド蓄積を有意に抑えた。3T3-L1 脂肪細胞分化過程ではホスホジエステラーゼ阻害剤 IBMX や合成グルココルチコイド Dexamethasone によってインスリン共存下で前期段階転写因子である C/EBP β と C/EBP δ が誘導される。その後、後期段階転写因子である C/EBP α や PPAR γ が C/EBP β と C/EBP δ によって誘導される。また、後期段階転写因子は小胞体ストレス応答型 XBP1 によっても誘導される。このような知見をもとに Scr3 過剰発現が細胞分化過程経路のどの段階に影響を与えるかを調べた。C/EBP β と C/EBP δ (前期段階転写因子) mRNA 発現誘導に対して Scr3 過剰発現の影響はなかった。一方、C/EBP α や PPAR γ (後期段階転写因子) mRNA や小胞体ストレス応答型 XBP1 mRNA の発現誘導を抑制した。さらにルシフェラーゼレポーター測定系を用いて、C/EBP ファミリーにおける Scr3 の転写抑制効果について解析した。Scr3 による C/EBP α の標的プロモーターに対する転写活性化活性の有意な機能阻害は認められなかった。一方、C/EBP β と C/EBP δ の転写活性化活性を僅かながら有意に阻害した。以上のことから、Scr3 過剰発現による脂肪滴蓄積抑制は、後期転写因子の発現誘導抑制によることが示唆された。

【3】 3T3 細胞における分化刺激応答に対する Scr3 ノックアウトの効果

3T3-L1 細胞においては Scr3 発現量の低い状態を維持することが脂肪細胞分化に重要であると考えられた。そこで、3T3-L1 の親株である 3T3 細胞において CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて樹立した Scr3 ノックアウト細胞が脂肪細胞分化能を獲得して、脂肪蓄積を亢進するか調べた。まず、Scr3 遺伝子のエクソン 3 を標的にした sgRNA によって挿入欠損 (InDel) 変異を誘導し、未成熟終止コドン出現やタンパク質読み取り枠が破壊

された 2 株の **Scr3** ノックアウト細胞を樹立した。脂肪細胞分化誘導剤で刺激し培養した結果、**Scr3** ノックアウト細胞において脂肪蓄積は観察されなかったが、コントロール細胞と比較して、**C/EBP β** と **C/EBP δ** の mRNA 量に増加傾向が見られた。

以上の結果、**Scr3** は脂肪細胞分化の転写カスケードにおける負の制御因子として作用し、量的に減少することが細胞分化に対して重要であることが判明した。