

脂肪滴形成・融合・分解の制御機構解明を目指した 新規蛍光プローブの開発

鎌田 瑠 泉*

Development of Novel Fluorescent Probe for Analyzing Cell Differentiation and Lipid Droplet Formation

Rui KAMADA*

Obesity is associated with various severe diseases including diabetes, hypertension, and cancer. Lipid droplet is a cellular organelle that plays an important role in storage of energy. Formation of lipid droplets is strictly regulated in adipocytes. There is a strong requirement to develop an efficient inhibitor for reducing lipid droplets with a divergent target/pathway. Ser/Thr protein phosphatase PPM1D is involved in cellular metabolic processes and is a promising target for anti-obesity treatment. We have previously developed a potent and specific PPM1D inhibitor, SL-176. In this study, we demonstrated that significant reduction of adipocyte differentiation and lipid droplet formation by SL-176. We revealed that SL-176 significantly suppressed lipid droplet formation both in amount and in size by repressing PPAR γ and C/EBP α expression at nontoxic conditions. SL-176 has a completely different and unique molecular structure as an anti-obesity compound. This provides insights into SL-176 as a lead compound for novel anti-obesity drugs.

1. 緒言

肥満は白色脂肪細胞における脂肪滴形成が過剰に行われ、脂肪細胞の肥大と増殖によって引き起こされる。脂肪細胞はトリアシルグリセロールの合成・貯蔵を行い、その細胞質はトリアシルグリセロールをコアとする脂肪滴で満たされている。この脂肪滴が脂肪細胞肥大の原因となっており、脂肪滴形成の分子機構を明らかにすることは肥満抑制にとって極めて重要である。近年、脂肪細胞および脂肪滴が癌の発生および悪性化に関与していることが報告されている。このため、脂肪細胞における脂肪滴形成の詳細な分子制御機構を解明することは新規癌治療法の開発に極めて重要である。癌抑制タンパク質 p53 誘導性 Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、乳癌を含む様々な癌においてその過剰発現が報告されている癌原遺伝子産物であり、抗癌剤の標的として注目されている (図 1)。近年、PPM1D がインスリン感受性を制御し、グルコース恒常性維持に関与していることが報告されている。このため、PPM1D が代謝においても重要な役割を果たしていると考えられている。本研究は、脂肪滴形成および脂肪滴を介した脂肪細胞の機能制御機構を明らかにすることを目的とし、『脂肪滴形成・融合・分解を生きた細胞でモニター可能な新規プローブの開発』および『PPM1D の脂肪細胞分化における機能解明』を目的としている。

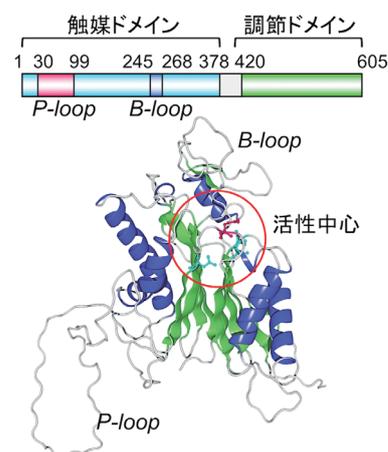


図 1. PPM1D のドメイン構造と触媒ドメイン

2. 脂肪細胞における PPM1D の機能解明

我々はこれまでに、PPM1D に対する強力な特異的阻害剤 SL-176 を開発している (図 2)。SL-176 は、細胞内において PPM1D のホスファターゼ活性を特異的に阻害し、タンパク質の活性を制御した免疫細胞分化・成熟・細胞老化の制御機構解析が可能である。また、我々は新規蛍光プローブ TAP-4PH を用いた細胞分化過程の迅速な可視化手法の開発に成功している¹。近年は、これらの手法を用いて PPM1D の自然免疫における機能解明に関する研究を進めており、PPM1D が好中球分化を制御していることを報告している^{2,3}。

2019年3月8日 受理

* 豊田理研スカラー

北海道大学大学院理学研究院化学部門

本研究では、脂肪細胞分化モデルとして 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いて、脂肪細胞分化および脂肪滴形成における PPM1D の機能を解析した。3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導に伴い、PPM1D の mRNA およびタンパク質発現量が増加することを見出した。さらに、3T3-L1 脂肪前駆細胞を脂肪細胞へと分化誘導する際、PPM1D 阻害剤 SL-176 が脂肪細胞の分化に及ぼす効果を解析した結果、PPM1D 阻害により脂肪細胞分化が著しく抑制され、脂肪滴のサイズおよび量が大きく減少することが明らかとなった (図 3A)。

脂肪細胞分化は Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)、CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) などの脂肪細胞制御因子により誘導される。PPM1D 阻害剤 SL-176 は、脂肪細胞分化にともなう PPAR γ , C/EBP α の発現を著しく抑制することが明らかとなった (図 3B)。一方、SL-176 は PPAR γ , C/EBP α の上流の転写因子である C/EBP β の発現量は抑制しなかった。これらの結果から、PPM1D 阻害剤 SL-176 は脂肪細胞分化にかかわる転写因子 PPAR γ , C/EBP α の発現抑制を介して脂肪細胞分化・脂肪滴形成を制御していることが示唆された。以上より、PPM1D が脂肪細胞分化および脂肪滴形成を正に制御することが示された⁴。

次に、より詳細な解析を行うために PPM1D 阻害剤 SL-176 を分化の初期、中期、後期の 3 段階に分けて投与した。その結果、分化初期段階での SL-176 投与時には分化マーカー発現量の減少により脂肪滴サイズが減少した。その一方で驚くべきことに、分化中期段階での SL-176 投与時には分化マーカーの発現量に変化がないにもかかわらず、脂肪滴サイズが減少することが示された。このことから、PPM1D が脂肪細胞分化の制御と、分化とは非依存的な脂肪滴形成の制御という多重機構をもつことが示唆された。

3. 細胞分化・脂肪滴を可視化する蛍光プローブの開発

脂肪滴は、小さな脂肪滴同士が融合し、大きな脂肪滴を形成すると考えられているが、その分子機構は明らかになっていない。このため、細胞を生きた状態のまま脂肪滴を観察できる蛍光プローブの開発が望まれている。我々は、置換基の導入により幅広い波長選択性と高い蛍光量子収率を示す 1,3a,6a-Triazapentalene (TAP) 誘導体の one-pot 合成法を開発している。今回、脂肪滴において特異的に蛍光を示し、脂肪細胞の脂肪滴を可視化する TAP 誘導体 TAP-2CY4E1 を見出した (図 4)。

4. 今後の展望

生体の基本単位である細胞は、未分化細胞から刺激を受けて脂肪細胞や血球細胞などの様々な細胞へと分化し、生命活動を担っている。特異的な蛍光染色による細胞の分化状態を解析する手法は、様々な生命現象の理解や創薬において極めて重要である。現在、開発した脂肪滴染色プローブ TAP-2CY4E1 や TAP-4PH などの TAP 誘導体による多重染色により、細胞の分化や刺激応答を迅速に識別する新規手法の開発を進めている。最後に、本研究は公益財団法人豊田理化学研究所・豊田理研スカラー助成により遂行されたものであり、心より感謝いたします。

REFERENCES

- (1) Kamada, R., Tano, F., Kudoh, F., Kimura, N., Chuman, Y., Osawa, A., Namba, K., Tanino, K., and Sakaguchi, K. "Effective Cellular Morphology Analysis for Differentiation Processes by a Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivative Probe in Live Cells" PLOS ONE, 11, e0160625 (2016)
- (2) Kamada, R., Kudoh, F., Yoshimura, F., Tanino, K., and Sakaguchi, K. "Inhibition of Ser/Thr Phosphatase PPM1D Induces Neutrophil Differentiation in HL-60 Cells. J. Biochem. 162, 303-308 (2017)
- (3) Ogasawara, S., Chuman, Y., Michiba, T., Kamada, R., Imagawa, T., and Sakaguchi, K. "Inhibition of Protein Phosphatase PPM1D Enhanced Retinoic Acid-induced Differentiation in Human Embryonic Carcinoma Cell Line" J. Biochem. (2018) doi: 10.1093/jb/mvy119.
- (4) Kamada, R., Kimura, N., Yoshimura, F., Tanino, K., and Sakaguchi, K. "Inhibition of Lipid Droplet Formation by Ser/Thr Protein Phosphatase PPM1D Inhibitor, SL-176" PLOS ONE, 14, e0212682 (2019)

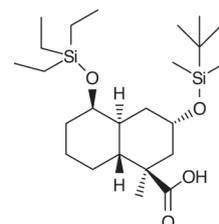


図 2. PPM1D 阻害剤 SL-176

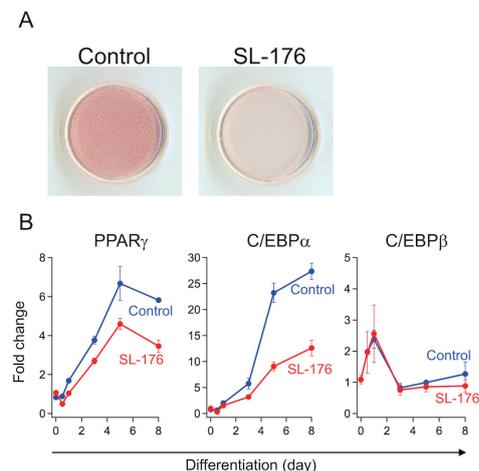


図 3. SL-176 存在下、非存在下で脂肪細胞へと分化させ、脂肪滴を Oilred O により染色 (A) および mRNA 発現量 (B) を定量した。

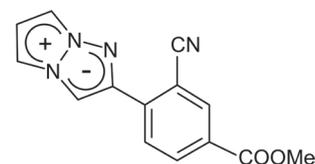


図 4. TAP-2CY4E1