

脂肪滴表面タンパク質ペリリピン4の発現抑制が脂肪細胞に与える影響 —AMPKを介してエネルギー代謝に与える影響—

Knockdown of perilipin 4, a surface protein on lipid droplets affects energy metabolism in adipocytes
via AMP-activated protein kinase

長谷川 千織, 小谷 実祐, 中村 祐希, 田中 直子
大妻女子大学家政学部

Chiori Hasegawa, Miyu Kotani, Yuuki Nakamura, and Naoko Iida-Tanaka
Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：脂肪細胞, ペリリピン4, ミトコンドリア, バイオイメージング
Key words : Adipocytes, Perilipin 4, Mitochondria, Bioimaging

抄録

脂肪細胞は脂肪の合成・蓄積を行う一方、生理活性物質を分泌して全身のエネルギー代謝や炎症状態に影響を与えている。われわれは、脂肪細胞の肥大化による代謝変化や炎症性変化のメカニズムを調べるために、脂肪滴表面で脂肪の合成・分解に関与することが推測されているタンパク質ペリリピン4の発現抑制細胞株を作成した。本研究では、ペリリピン4が脂肪細胞のエネルギー代謝に与える影響を調べることを目的とし、発現抑制細胞株のエネルギー代謝関連タンパク質のmRNA発現量およびミトコンドリアの形態の変化を調べるとともに、エネルギー代謝の中心的制御因子AMP活性化プロテインキナーゼ（AMPK）に着目して、AMPK活性化剤AICARをこの細胞株に添加したときの変化を調べた。

ペリリピン4発現抑制細胞株は特異的shRNAを3T3-L1細胞にトランスフェクションすることで作成した。この細胞を分化誘導後18日および30日目まで培養し、ミトコンドリア関連タンパク質のmRNA発現量を定量し、また、ミトコンドリアを蛍光染色して観察した。AICAR処理は実験24時間前に1mMのAICARが添加された培地に交換することによって行った。ペリリピン4の発現を抑制することによって、エネルギー代謝関連タンパク質のmRNA発現量が減少し、ミトコンドリアの分布に変化がみられた。一方、炎症性サイトカインMCP-1の発現量は増加していた。エネルギー代謝関連酵素のmRNA発現量およびミトコンドリア形態については、AMPK活性化剤で回復が見られたが、MCP-1の発現量の回復はみられなかった。これらの結果から、脂肪滴表面タンパク質ペリリピン4は、脂肪細胞のエネルギー代謝をAMPKを介して制御している可能性が示唆されるとともに、ペリリピン4発現抑制細胞株における炎症性サイトカインの発現増加は、エネルギー代謝とは別経路で引き起こされている可能性が示唆された。

1. 序論

脂肪細胞は中性脂肪（Triacylglycerol, TG）を合成・蓄積しながら、さまざまな生理活性物質を分泌する内分泌細胞である。脂肪細胞からは全身の代謝を制御する生理活性物質の他、炎症性サイトカインも分泌されており、細胞周辺に炎症性変化を引き起こしたり、インスリン抵抗性をはじめと

する全身の健康状態に影響を与えていることが報告されている^[1,2]。

ミトコンドリアはエネルギー代謝を担う細胞内小器官であるが、ミトコンドリアのエネルギー状態の異常がさまざまな病態を引き起こすことが近年明らかになってきている^[2]。われわれは白色脂肪細胞モデルである 3T3-L1 脂肪細胞を用いた研

究で、ミトコンドリアの機能低下が脂肪細胞中の炎症性サイトカイン量を増加させること、正常な 3T3-L1 脂肪細胞中のミトコンドリアは脂肪滴周辺に局在しているが、ミトコンドリア機能を低下させた細胞では、ミトコンドリアが脂肪滴周辺から離れて細胞全体に広がっている様子が観察されることを報告している^[3]。

ペリリピン (Perilipin, PLIN) は脂肪滴の表面に存在するタンパク質で、脂肪滴の融合・分裂、脂肪滴中に蓄えられている TG の合成・分解の制御などに密接に関わっており、PLIN1 から 5 までの 5 種類が報告されている^[4]。PLIN4 は、白色脂肪細胞の脂肪滴表面に恒常的に発現し、脂肪滴形成に密接に関係があることが示唆されているが^[5]、その機能の詳細についてはまだ明らかになっていない。

本研究では、脂肪細胞の肥大化およびそれに伴う TG の代謝 (合成・分解) の変化や炎症性変化を引き起こすメカニズムにおける脂肪滴表面タンパク質の関係を明らかにすることを目的として、PLIN4 の発現を抑制した白色脂肪細胞モデル 3T3-L1 細胞株 (shPLIN4) を作製した。本研究では、PLIN4 の発現抑制が脂肪細胞のエネルギー代謝に与える影響を、エネルギー代謝関連タンパク質の mRNA 発現量およびミトコンドリアの形態の変化から調べるとともに、エネルギー代謝の中心的制御因子 AMPK に着目して、AMPK 活性化剤を shPLIN4 に添加したときの変化を調べた。また、細胞の炎症性変化を、炎症性サイトカインの mRNA 発現量変化から調べた。

2. 方法

2.1. PLIN4 の発現抑制

PLIN4 の発現抑制は、shRNA プラスミドベクター (QIAGEN, 336313 KM05785N) を、Lipofectamine 3000 (Life technologies) を用いて、線維芽細胞の状態の 3T3-L1 に導入することによって行った。shRNA が導入された細胞を G418 (Geneticin, GIBCO) を用いて選別し、得られた細胞を shPLIN4 とした。特定のタンパク質の発現に影響を与えない shRNA を含むプラスミドベクター (Negative control vector) を同様の方法で導入した細胞を shCont とし、コントロール細胞として実験に用いた。PLIN4 の shRNA の配列は 5'-CAAGCAGCTTCTCAGACAAAT-3', Negative control の配列は 5'-GGAATCTCATTTCGATGCATAC-3' を使用した。

shPLIN4 における PLIN4 の mRNA 発現量は、本実験で用いた分化誘導後 18, 30 日目の細胞で、shCont における発現量の 35~40% まで減少していた。

2.2. 細胞培養

shPLIN4 と shCont をそれぞれ、10% calf serum / 20mM HEPES / 100μg/ml Penicillin / Streptomycin (PS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) を用いて 5%CO₂ 下、37°C で培養した。Confluent まで培養後、10% Fetal bovine serum (FBS) / 20mM HEPES / 100μg/ml PS / 10μg/ml Insulin / 2.5μM Dexamethasone / 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine を含む DMEM を用いて 2 日間培養し、脂肪細胞への分化誘導を行った。その後 10% FBS / 20mM HEPES / 100μg/ml PS / 10μg/ml Insulin を含む DMEM で 2 日間、さらに 10% FBS / 20mM HEPES / 100μg/ml PS を含む DMEM (分化維持培地) で、分化誘導後 17 日目および 29 日目まで培養した。

2.3. AMPK 活性化剤による処理

AMPK の活性化剤として 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside (AICAR) を使用した。分化誘導後 17 日目および 29 日目に、1mM の濃度になるように分化維持培地に添加し 24 時間培養した。

2.4. mRNA の定量

細胞から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて Total RNA を抽出し、Prime Script RT Master Kit RR036A (TaKaRa) を用いて cDNA に変換した。SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用い、ABI-7300 Real-Time PCR System で mRNA の定量を行った。リファレンス遺伝子として β-actin を用いた。

2.5. 蛍光観察

ミトコンドリアを MitoTracker Deep Red FM (励起波長 633nm, 観察波長 650-710nm), 脂肪滴を Nile Red (励起波長 543nm, 観察波長 560-615nm) でそれぞれ染色し、高速走査型共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて撮像した。得られたデータは LSM Image Browser (Carl Zeiss) で解析し、Adobe Photoshop Elements 10.0 で画質の微調整を行った。

3. 結果

3.1. AMPK の mRNA 発現量の変化

AMPK の mRNA 発現量を図 1 に示した. PLIN4 の発現を抑制した shPLIN4 では, shCont と比較して, AMPK の mRNA 発現量が 20%程度まで減少していたが, AMPK 活性化剤である AICAR を添加して 24 時間培養することにより, shCont の約 1.3 倍まで回復していた.

AMPK は, 細胞がエネルギー不足 (AMP/ATP 比の増加) に陥った際に活性化され, エネルギー産生増加に働く制御因子である. shPLIN4 では AMPK の発現量が低下しているため, エネルギー産生の代謝経路が機能していない可能性が示唆された. 本結果から, AMPK 活性化剤 AICAR は, AMPK の活性化 (リン酸化) を促すだけでなく, mRNA 発現量も増加させる効果があることも示された.

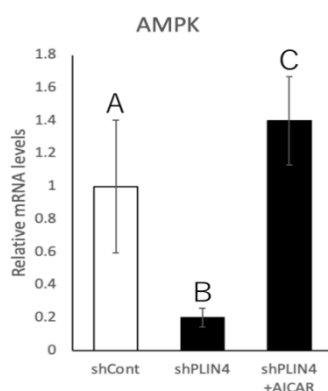


図 1. AMPK の mRNA 発現量

細胞を分化誘導後 30 日目まで培養し, AMPK の mRNA 発現量を調べた. shPLIN4+AICAR は, 分化誘導後 29 日目に 1mM の濃度で AICAR を添加した培地に交換し, 24 時間培養した. 異なるアルファベット間に 5%の危険率で有意差あり.

3.2. エネルギー代謝関連タンパク質の mRNA 発現量の変化

エネルギー代謝関連タンパク質の mRNA 発現量を図 2 に示した. shPLIN4 では shCont と比較して, 解糖系酵素である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) はわずかだが有意に減少, 電子伝達系の Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 (COX4I1) も有意に減少しており, 減少傾向はミトコンドリア電子伝達系で大きかった. これらのタンパク質の発現量は, shPLIN4 を AICAR 処理することにより回復した.

一方, 嫌氣的代謝の最終段階を触媒する Lactate dehydrogenase (LDH) の mRNA 発現量は, shPLIN4 で shCont の約 70%程度まで減少していたが, AICAR 処理によって回復しなかった. AICAR は主に好氣的エネルギー代謝を活性化すると考えられた.

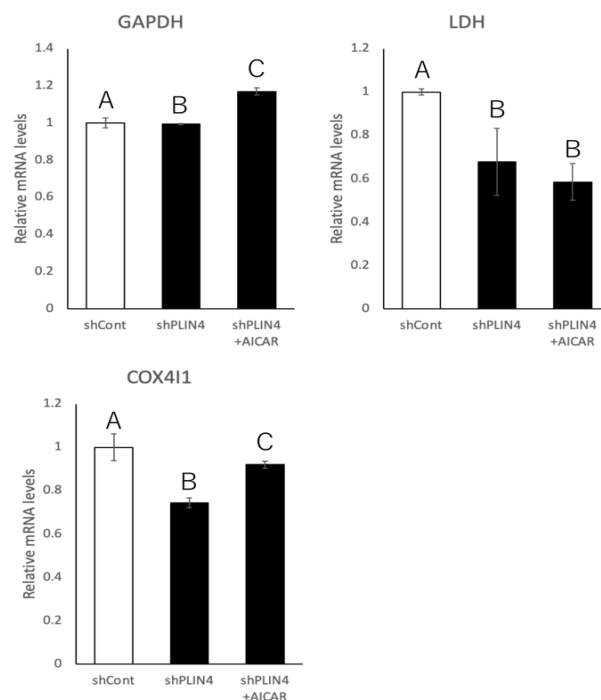


図 2. エネルギー代謝関連タンパク質の mRNA 発現量

細胞を分化誘導後 30 日目まで培養し, エネルギー代謝に関連するタンパク質の mRNA 発現量を調べた. shPLIN4+AICAR は, 分化誘導後 29 日目に 1mM の濃度で AICAR を添加した培地に交換し, 24 時間培養した. 異なるアルファベット間に 5%の危険率で有意差あり.

3.3. ミトコンドリア形態に及ぼす影響

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー状態に応じて, 融合・分裂してエネルギー代謝を変化させることが知られている. PLIN4 の発現抑制がミトコンドリア形態に与える影響を, ミトコンドリア内膜融合に関わるタンパク質 Optic atrophy 1 (OPA1) の mRNA 発現量の変化 (図 3) と, ミトコンドリアの蛍光観察 (図 4) で調べた.

OPA1 の mRNA 発現量は, shPLIN4 で shCont の約 50%程度まで減少していたが, AICAR 処理によって shCont とほぼ同程度に回復した.

蛍光観察では, 分化誘導後 18 日目および 30 日目の細胞のミトコンドリアの様子を調べた. shCont

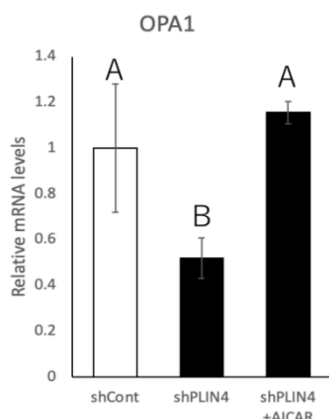


図3. ミトコンドリア融合に関わるタンパク質のmRNA発現量

細胞を分化誘導後 30 日目まで培養し、エネルギー代謝に関連する OPA1 の mRNA 発現量を調べた。shPLIN4+AICAR は分化誘導後 29 日目に 1mM の濃度で AICAR を添加した培地に交換し、24 時間培養した。異なるアルファベット間に 5% の危険率で有意差あり。

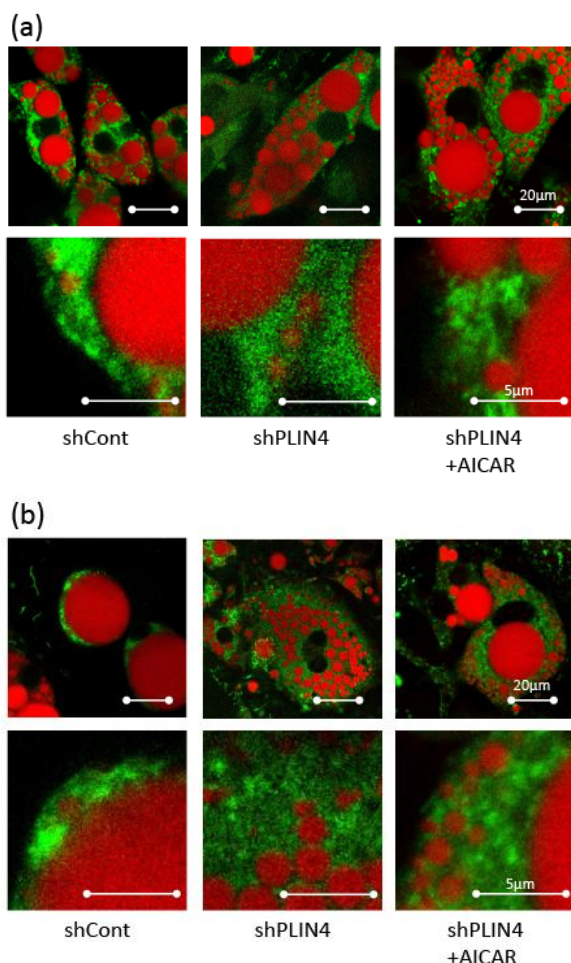


図4. AICAR 処理のミトコンドリア形態への影響

細胞を分化誘導後 18 日 (a) および 30 日目 (b) まで培養し、ミトコンドリア形態を蛍光観察した。shPLIN4+AICAR は観察前日から 24 時間処理した。ミトコンドリア (緑) は MitoTracker Deep Red, 脂肪滴 (赤) は Nile Red で染色した。下段は拡大図。

では、ミトコンドリアは融合して脂肪滴を囲むように存在していたが、分化誘導後 18 日目、30 日目の shPLIN4 ではミトコンドリアが分裂傾向で細胞全体に広がって存在している様子が観察された。これに対して AICAR 処理をした shPLIN4 では、分裂傾向だったミトコンドリアが融合している様子が観察された。

3.4. 細胞の炎症状態に与える影響

脂肪細胞から分泌される炎症性サイトカインのうち、Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現量を定量した (図 5)。

shPLIN4 における MCP-1 の mRNA 発現量は、shCont の約 3.5 倍に増加していたが、AICAR 処理をした shPLIN4 では、さらに発現量が増加し、shCont の約 4.6 倍となった。エネルギー代謝に関するタンパク質の発現量やミトコンドリア形態変化などについては、shPLIN4 で見られた変化が、AMPK 活性化によって打ち消される方向であったが、MCP-1 の発現量の増加については AICAR 処理で回復しなかった。

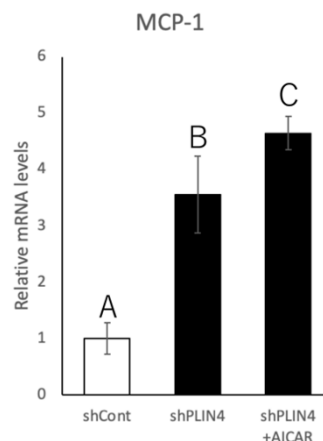


図5. 炎症性サイトカインの mRNA 発現量

細胞を分化誘導後 30 日目まで培養し、炎症性サイトカイン MCP-1 の mRNA 発現量を調べた。shPLIN4+AICAR は分化誘導後 29 日目に 1mM の濃度で AICAR を添加した培地に交換し、24 時間培養した。異なるアルファベット間に 5% の危険率で有意差あり。

4. 考察

4.1. PLIN4 の発現抑制が与える影響

本研究では、脂肪滴とミトコンドリアの相互作用および脂肪滴表面タンパク質のミトコンドリアエネルギー代謝への関与を想定して、脂肪滴表面タ

ンパク質の1つである PLIN4 の発現抑制がエネルギー代謝に与える影響を調べた。

shPLIN4 では、ミトコンドリア電子伝達系酵素およびミトコンドリア融合制御タンパク質だけでなく、解糖系酵素の mRNA 発現量にも低下が見られ、エネルギー代謝全般が低下している可能性が示唆された。蛍光画像からも、ミトコンドリアの分裂傾向が観察され、脂肪滴周辺から離れて細胞全体に広がる様子も見られた。

このようなミトコンドリアの分布傾向について、脱共役剤を用いてミトコンドリアエネルギー産生を阻害した時に同様の現象が見られること、この時、炎症性サイトカインの mRNA 発現量が増加することを前報で報告している^[4]。shPLIN4 では、AMPK の発現量も低下していたことから、PLIN4 の発現抑制が AMPK の発現量の低下を誘因し、その結果エネルギー代謝を低下させ、炎症性サイトカインの発現量増加の原因となっているのではないかと推測された。

4.2. PLIN4 発現抑制株に AMPK 活性化剤 AICAR が与える影響

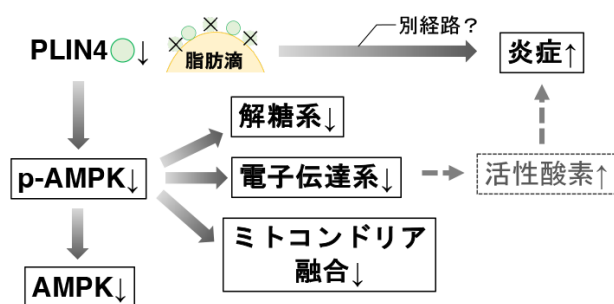
PLIN4 の発現抑制で観察されたことが、AMPK の発現低下に由来する現象であるかどうかを確認するために、shPLIN4 に AMPK 活性化剤の AICAR を添加して、その影響を調べた。

AICAR 処理をした shPLIN4 では、AMPK の mRNA 発現量が回復するとともに、解糖系および電子伝達系に関連する酵素の mRNA 発現量が増加したことから、エネルギー産生が増加していることが示唆された。また、ミトコンドリア内膜融合に関わる OPA1 の発現量が増加し、蛍光観察からもミトコンドリア融合の促進が観察された。

ペリリピンファミリーの中には AMPK を活性化するプロテインキナーゼ A (PKA) によってリン酸化されるものがあるが、PLIN4 と AMPK の関連性についてはまだ明らかになっていない^[6]。本研究の結果から、PLIN4 の発現抑制によって AMPK のリン酸化が阻害され、エネルギー代謝関連タンパク質の mRNA 発現に影響を与えた可能性が考えられた (図 6)。リン酸化 AMPK (p-AMPK) の減少は p-AMPK/AMPK 比を大きく変化させ、AMPK の生合成 (mRNA 発現量) にも影響を与えている可能性がある。そこに AMPK 活性化剤である AICAR で処理することによって p-AMPK/AMPK

比の回復し、AMPK の mRNA 発現量も回復したと考えられた。

一方、炎症性サイトカインである MCP-1 の mRNA 発現量は、AICAR 処理によって打ち消されずにさらに増加していたことから、PLIN4 の発現抑制による炎症性サイトカインの発現増加は、エネルギー代謝の制御機構とは別経路によって誘導されている可能性が示唆された (図 6)。AMPK の活性化が電子伝達系のエネルギー産生を増加させ、ミトコンドリア融合が促進されることによって活性酸素が減少し、炎症性サイトカインの発現量が抑えられると考えていたが、この結果からエネルギー代謝の制限機構とは別経路で炎症性サイトカインの発現量に影響を与えていると考えられた。



※破線矢印は推測

図 6. PLIN4 の発現抑制が 3T3-L1 脂肪細胞に与える影響の模式図

付記

本研究は、大妻女子大学人間文化研究所の大学院生研究助成 (A) (DA2105)、大妻女子大学戦略的個人研究費 (N2311, N2409) を受けたものである。

引用文献

- [1] Wilson-Fritch L *et al.* Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol.* 2003, **23**(3), 1085-1094.
- [2] Patti ME *et al.* The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocr Rev.* 2010, **31**(3), 364-395.
- [3] Hasegawa C *et al.* Mitochondrial dysfunction causes inflammatory changes in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J.*

Hum. Cult Stud. 2021, **31**, 10-13.

[4] Kimmel, A. R., and Sztalryd, C. J. The perilipins: major cytosolic lipid droplet-associated proteins and their roles in cellular lipid storage, mobilization, and systemic homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 2016, **36**, 471-509.

[5] Jingwen Pei *et al.* Senp7 deficiency impairs lipid

droplets maturation in white adipose tissues via Plin4 deSUMOylation. *J Biol Chem.* 2024, **300**(6), 107319-107335.

[6] Elena Grisetti *et al.* Molecular mechanisms of perilipin protein function in lipid droplet metabolism. *FEBS Letters.* 2024, **598**, 1170-1198.

Abstract

Adipocytes synthesize and store triacylglycerols, while secreting bioactive substances that affect systemic energy metabolism and inflammatory conditions. To investigate the mechanisms of metabolic and inflammatory changes caused by adipocyte hypertrophy, we generated a cell line in which perilipin-4, a protein speculated to be involved in triacylglycerol synthesis and degradation on the surface of adipocytes. In this study, the mRNA expression levels of energy metabolism-related proteins and mitochondrial morphology were investigated to determine the effects of perilipin-4 on energy metabolism in adipocytes. In addition, focusing on AMP-activated protein kinase (AMPK) that play an important role in regulating metabolism, the effects of AICAR, the AMPK-activating reagent, on perilipin 4-knockdown cells were investigated.

The knockdown of perilipin 4 was performed by transfection of the specific shRNA to 3T3-L1 cells. The knocked down cells were differentiated to adipocytes, cultured for 18 or 30 days and used to mRNA quantification and fluorescence microscopy. Before the experiments, AICAR was added to the medium at 1mM and cultured the cells for 24 hours. Knockdown of perilipin-4 reduced mRNA expression of energy metabolism-related proteins and increased expression of the inflammatory cytokine MCP-1. Mitochondria appeared to be split and present throughout the cells, away from around the lipid droplets in the knockdown cells. Activation of AMPK restored mRNA expression levels of energy metabolism-related proteins and mitochondrial morphology, but not MCP-1 expression levels. These results suggest that the lipid droplet surface protein perilipin 4 may regulate adipocyte energy metabolism via AMPK, and that the increased inflammatory cytokines in perilipin 4-knocked down cells may be caused by a regulatory pathway different from energy metabolism.

(受付日：2025 年 5 月 12 日，受理日：2025 年 9 月 16 日)



長谷川 千織（はせがわ ちおり）

現職：大妻女子大学家政学部食物学科助手

プロフィール：

大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程修了（生活科学）。

大妻女子大学大学院人間文化研究科博士課程中退。

日本バイオイメーjing学会第 24 回学術集会ベストイメーjing賞受賞。

専門は栄養生化学および細胞生物学。

大学院在学中より一貫して脂肪細胞の炎症性変化とミトコンドリアの関係を調べている。