

脂肪細胞 Carrier X の基質同定と生理的意義の解明

Substrate identification and physiological relevance of adipose Carrier X

所属機関：ベスイスラエルディーコネス医療センター 代表研究者氏名：山室 禎

研究期間：2021年4月13日～2022年3月31日

滞在研究機関：ベスイスラエルディーコネス医療センター/ハーバード医科大学
ボストン, マサチューセッツ州, アメリカ

共同研究者等：梶村 真吾 教授

Obesity and related metabolic disorders, such as diabetes, dyslipidemia, and fatty liver, are one of the biggest health concerns due to their association with life-threatening diseases. To prevent the progression of obesity, thermogenic brown and beige adipocytes are of particular interest since they consume surplus energy and produce heat. Both brown and beige adipocytes possess much mitochondria and oxidize fatty acid into acetyl-CoA, which is utilized through the TCA cycle for the maintenance of the mitochondrial membrane potential that is required for UCP1-dependent thermogenesis, gluconeogenesis, and lipogenesis. However, it is yet to be understood how the TCA cycle is maintained and regulated in adipocytes. Here, we show that Carrier X is highly expressed and required for TCA cycle maintenance in adipocytes. *Carrier X* knockout cells exhibit a significant decrease in cellular and mitochondrial respiration. Mitochondrial metabolomics by the MITO-Tag method revealed that phosphoenolpyruvate is accumulated and citrate is reduced in the mitochondria from the *Carrier X* knockout cells, suggesting that Carrier X transports phosphoenolpyruvate and/or citrate, which are associated with the TCA cycle. Furthermore, adipose-specific *Carrier X* knockout mice exhibited a reduction in fat mass and glucose intolerance on a high fat diet. Because the TCA cycle is essential for gluconeogenesis and lipogenesis, we propose that Carrier X transports the TCA cycle substrates to maintain gluconeogenesis and lipogenesis in adipocytes.

研究目的

世界的に肥満の人口は急増しており、約 20 億人が肥満か過体重に該当する。2 型糖尿病や脂質異常症、脂肪肝といった代謝疾患は肥満と密接な関わりがあり、脳卒中や心筋梗塞といった致命的な動脈硬化性疾患の原因となる。そのため、肥満に対する有効な治療法の開発が全世界で喫緊の課題となっている。そのような中で注目を集めているのが、熱産生脂肪細胞である。白色脂肪細胞が余剰なエネルギーを中性脂肪として蓄積する一方で、褐色脂肪細胞はエネルギーを燃焼して熱産生を担う。褐色脂肪細胞は、寒冷刺激に応じて誘導されるベージュ脂肪細胞と共に熱産生脂肪細胞と呼ばれている。これらの細胞は生体内でのエネルギー消費を担い、肥満やそれに伴う代謝異常を改善しうることを示されている。その

ため、世界中の研究者によって精力的に熱産生脂肪細胞の研究が進められてきた。

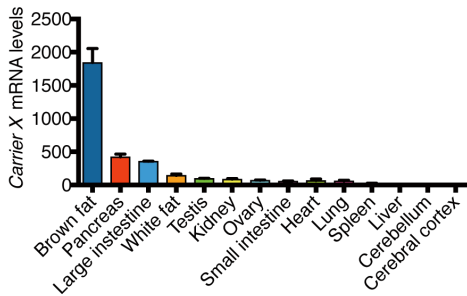
熱産生脂肪細胞において最も重要なオルガネラがミトコンドリアである。熱産生脂肪細胞はブドウ糖や脂肪酸を取り込み、ミトコンドリア内の TCA 回路を介して分解し、NADH や FADH₂ を産生する。これらは続いて電子伝達系に供され、ミトコンドリアの膜電位の維持に用いられる。膜電位は ATP 産生や UCP1 依存的な熱産生に必須であり、ATP は Ca サイクリングやクレアチンサイクリングにより UCP1 非依存的な熱産生に利用される。以上の機構で、褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞は生体内の熱産生に寄与している。また、TCA 回路は脂質合成や糖新生といった多様な代謝経路にも必須である。しかしながら、脂肪細胞ミトコンドリアの TCA 回路がどのよ

うに保たれ、生体内の代謝恒常性維持に寄与しているのかは十分に理解されていない。そこで本研究では、ミトコンドリア内膜トランスポーターに着目し、脂肪細胞ミトコンドリアの代謝を理解することを目指す。

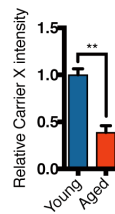
研究経過

初めに、ミトコンドリア内膜トランスポーターの各タンパクの遺伝子発現プロファイルを調べた。すると、機能未知の *Carrier X* が褐色脂肪細胞で顕著に高発現していることが判明した (Fig. 1A)。白色脂肪細胞でも比較的高い発現が見られた。さらに、加齢に伴い褐色脂肪細胞ミトコンドリアでの *Carrier X* 発現が顕著に低下することが判明した (Fig. 1B)。

Fig1. A

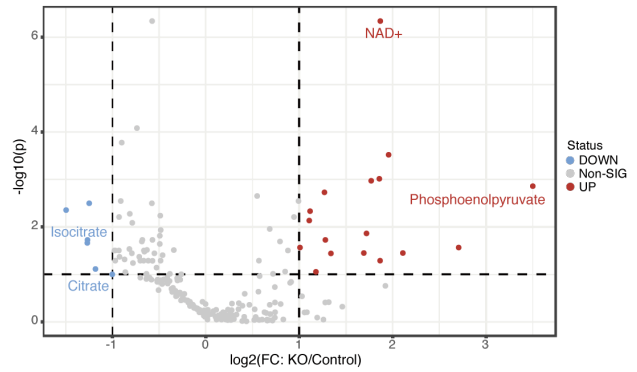


B

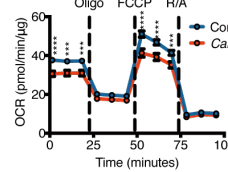


Carrier X の役割を明らかにするため、*Carrier X* flox マウスを作成し、本マウスから不活化前駆脂肪細胞株を樹立した。この細胞にレトロウイルスにより Cre を発現させて、*Carrier X* KO 細胞を作製した。コントロール細胞と *Carrier X* KO 細胞からそれぞれ MITO-Tag (Chen, WW., et al., Cell, 2016) でミトコンドリアを単離し、メタボロミクスに供した。その結果、*Carrier X* KO 細胞のミトコンドリアでは Isocitrate ないし Citrate が著減し、 NAD^+ と Phosphoenolpyruvate (PEP) が顕著に蓄積していた (Fig. 2A)。ミトコンドリア内膜トランスポーターの多くは対向輸送を担うため、Isocitrate ないし Citrate を汲み入れ、PEP を汲み出している可能性がある。Isocitrate や Citrate、Oxaloacetate は TCA 回路の基質であり、PEP は Oxaloacetate から直接合成される。 NAD^+ の増加は TCA 回路の不全を示唆する。さらに、Seahorse flux assay や Oroboros O2k assay で *Carrier X* KO 細胞は細胞呼吸 (Fig. 2B)、ミトコンドリア呼吸 (Fig. 2C) が顕著に低下していた。これらの結果から、*Carrier X* は TCA 回路への基質供給を担い、ミトコンドリア呼吸を維持していると考えられる。

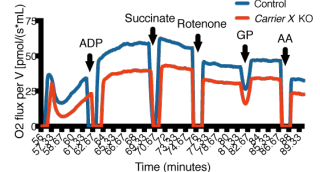
Fig2. A



B

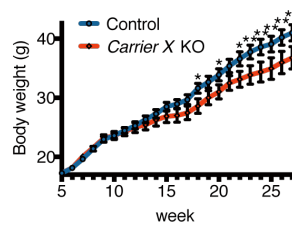


C

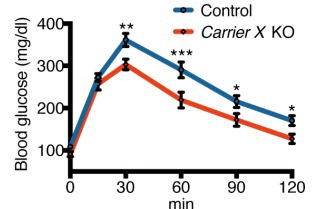


生体内における *Carrier X* の役割を調べるため、脂肪細胞特異的 *Carrier X* KO マウスを作製した。このマウスでは高脂肪食による肥満 (Fig. 3A) や耐糖能異常 (Fig. 3B)、インスリン抵抗性 (Fig. 3C) が顕著に軽減していた。脂質合成や糖新生は TCA 回路に依存しているため、脂肪細胞 *Carrier X* は TCA 回路への基質供給を介して脂質合成、糖新生にも寄与している可能性がある。

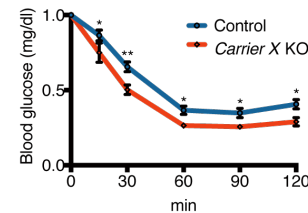
Fig3. A



B



C



考察

上記の結果から、*Carrier X* は TCA 回路への基質供給を介してミトコンドリア呼吸や糖新生、脂質合成に寄与していると考えている。今後は、Isocitrate や Citrate といった各基質候補の輸送を安定同位体や放射性同位体を用いたトレース実験で検証する予定である。同様に、同位体ラベリングで糖新生や脂質合成も詳細に評価していきたい。*Carrier X* は褐色脂肪細胞での発現が高いことから、熱産生にも寄与する可能性を検証する。また、*Carrier X* KO マウス

は肥満や糖尿病に対して明らかな抵抗性を示しているため、今後は Carrier X の薬理的な阻害で肥満や糖尿病を改善する可能性も検証していきたい。

研究の発表

口頭発表、誌上発表

現時点で該当なし。今後 1 年以内の公開を目指す。