

## 脂質代謝における Lipin1

石本 憲司

### Lipin 1 in Lipid Metabolism

Kenji ISHIMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka,  
Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received March 30, 2011)

The gene encoding lipin 1 was identified with a positional cloning approach that localized the causative mutation in fatty liver dystrophic (*fld*) mice, a mouse model of lipodystrophy. The *fld* mouse lacks normal adipose tissue in the body, and displays metabolic dysregulation such as obesity, insulin resistance, and hypertriglyceridemia. Lipin 1 is abundantly expressed in key metabolic tissues, including adipose tissue, skeletal muscle, and liver. In the cytosol, lipin 1 acts as an  $Mg^{2+}$ -dependent phosphatidate phosphatase type-1 (PAP1), catalyzing a key step in the synthesis of glycerolipids. In the nucleus, lipin 1 acts as a transcriptional coactivator through its direct interaction with peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and PPAR $\alpha$ . Through two distinct functions in the nucleus and cytosol, lipin 1 modulates lipid metabolism and glucose homeostasis. Here we will discuss recent developments in our understanding of the role of lipin 1 in lipid metabolism.

**Key words**—lipin 1; lipid metabolism; sterol regulatory element-binding protein; gene regulation; phosphatidate phosphatase; promoter

#### 1. はじめに

近年の多くの研究から、エネルギー代謝や脂肪蓄積に係わる脂肪組織が、代謝の恒常性維持にとって中心的な役割を担っていることが知られている。特に生体内の脂肪組織量のバランスは重要な要因と考えられ、その量が多すぎても少なすぎても脂質代謝異常が発生し、糖尿病やインスリン抵抗性、高トリグリセリド血症などの病態を呈する。<sup>1,2)</sup> すなわち、脂肪蓄積量増大に伴う肥満が影響する症状と、その肥満と対照的な位置づけにある全身性脂肪萎縮症（全身の脂肪組織が欠落した疾患）で起こる症状は同一である。これら2つの病態に共通する問題点は、脂肪組織の機能異常、特に種々のアディポカインを分泌する内分泌細胞としての機能不全である。<sup>3)</sup> 例えば代表的なアディポカインであるレプチンは、視床下部での摂食抑制作用、末梢組織での脂

肪酸合成抑制作用や脂肪酸酸化促進作用が知られており、脂質の恒常性を維持するために必要である。一方、肥満によるレプチンの過剰分泌は、その感受性が低下しインスリン抵抗性を引き起こす。このように、肥満にも脂肪萎縮症にもならないような一定量の脂肪組織量を維持することがヒトの健康に必須である。そこで本稿では、脂質の恒常性維持の鍵因子 Lipin1 タンパク質に着目し、筆者らが今日まで得た研究成果を主に紹介するとともに、脂質代謝における Lipin1 タンパク質の構造と機能について概説する。

#### 2. Lipin1 遺伝子と代謝調節

Lipin1 遺伝子は、脂肪萎縮症のモデルマウスである fatty liver dystrophy (*fld*) マウスの原因遺伝子として 2001 年に発見された。<sup>4)</sup> *fld* マウスでは、内臓や皮下の白色脂肪細胞や肩甲骨間の褐色脂肪細胞を含む全身の脂肪組織が欠落している。<sup>5)</sup> このため、脂質が肝臓、骨格筋、血管内などの非脂肪組織に移り、インスリン抵抗性、2型糖尿病、高トリグリセリド血症、脂肪肝のような代謝異常を呈する。またこのマウスでは、ヒトの脂肪萎縮症患者の一部

大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

e-mail: kenji@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞（生物系薬学）の受賞を記念して記述したものである。

でしか観察されない末梢神経障害を示す。

Lipin1 遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニックマウスでは、肥満を促進させる。<sup>6)</sup> Adipocyte fatty acid binding protein 由来のプロモーターを用いて脂肪組織特異的に発現する Lipin1 トランスジェニックマウスを解析すると、正常マウスと比較して脂肪細胞数に変化はないが、Fatty acid synthase や Acetyl-CoA carboxylase, Diacylglycerol acyltransferase を含む脂質生合成遺伝子の発現が上昇し、脂肪細胞中のトリグリセリド量が増加する。<sup>7)</sup> また、Muscle creatine kinase 由来プロモーターを用いて作製した筋肉特異的な Lipin1 トランスジェニックマウスでも、脂肪酸酸化によるエネルギー消費の減少やトリグリセリド増加による肥満が観察される。このように、脂肪あるいは筋肉特異的に Lipin1 を発現させたマウスの両方において肥満が生じるが、興味深い相違点がある。筋特異的な Lipin1 トランスジェニックマウスでは、脂質蓄積によるインスリン抵抗性が予想通り観察される。一方、脂肪特異的なトランスジェニックマウスでは、肥満状態であるにもかかわらず、血中グルコースやインスリンレベルが正常マウスより減少し、インスリン感受性が改善されている。このメカニズムは不明であるが、脂肪組織でより効果的に脂肪酸を取り込むことにより、骨格筋や膵臓のような組織での脂肪蓄積が減少し、全身のインスリン感受性が改善された可能性がある。

### 3. Lipin1 の構造と機能

Lipin1 タンパク質は、構造的に類似した特徴を持つ Lipin2, Lipin3 とともに Lipin ファミリーに属する (Fig. 1)。Lipin1 は、肝臓や脂肪組織、骨格筋などの脂質代謝が盛んな臓器で発現する。<sup>4,8)</sup> 一方 Lipin2 は肝臓や脳で多く発現し、Lipin3 は小腸や肝臓などの組織で少ないながら発現している。<sup>9)</sup> なお Lipin1 では、マウスにおいて選択的スプライシングによる 2 種類のアイソフォーム、Lipin1 $\alpha$  と Lipin1 $\beta$  が同定されている。<sup>7)</sup> 一方ヒトでは、Lipin1 $\alpha$ , Lipin1 $\beta$  のほかに、ヒト胎児脳 cDNA からクローニングされた Lipin1 $\gamma$  の存在が報告されている。<sup>10)</sup>

Lipin ファミリーは、非哺乳類を含む広範な種で保存されている。<sup>11,12)</sup> すべての Lipin タンパク質には、核移行シグナルである Nuclear localization sig-



Fig. 1. Lipin Protein Domains and Functional Motifs

nal (NLS) やいくつかのセリン/スレオニンでリン酸化を受けるサイトが存在する。さらに、Lipin タンパク質の N 末端側と C 末端側には、高い相同性を持つ領域 N-LIP ドメインと C-LIP ドメインが存在し、これらのドメインが Lipin の重要な機能を担うことが考えられる。実際に C-LIP ドメインには、Lipin1 の生理的機能に寄与する DXDXT (X は任意のアミノ酸) 触媒ドメインと LXXIL モチーフを含んでいる。

Lipin1 タンパク質は、細胞内局在の違いによる 2 つの脂質代謝調節機能が知られている (Fig. 2)。1 つ目として Lipin1 は、トリグリセリドやリン脂質の生合成経路を促進するホスファチジン酸ホスファターゼ (Phosphatidate phosphatase; PAP) 活性を持つ。<sup>9,13)</sup> PAP は植物を含む幅広い種間で存在し、小胞体膜上においてホスファチジン酸を脱リン酸化することでジアシルグリセロールを生成する。また PAP には、Mg<sup>2+</sup> に依存的な PAP1 活性と Mg<sup>2+</sup> に非依存的な PAP2 活性があり、Lipin1 は PAP1 活性を有することが知られている。この PAP1 活性は、Lipin1 タンパク質の C-LIP ドメイン内に存在している DXDXT 触媒ドメインが寄与する。

次に Lipin1 は、転写共役因子として核内で機能する。<sup>14,15)</sup> Lipin1 タンパク質の C-LIP ドメインにある LXXIL モチーフを介して、核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) や他の転写共役因子 PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) と結合し、脂肪酸酸化に関連する PPAR $\alpha$ /PGC1 $\alpha$  の標的遺伝子 (Acyl CoA oxidase, PPAR $\alpha$ , Carnitine palmitoyl transferase-1) の発現を制御する。ま



石本憲司

大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野・助教 博士(薬学)。山口県出身。2001年東京薬科大学薬学部卒業、2003年北海道大学大学院薬学研究科修士課程修了、2006年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了。2006年大阪大学医学部特任研究員を経て、2009年10月より現職。

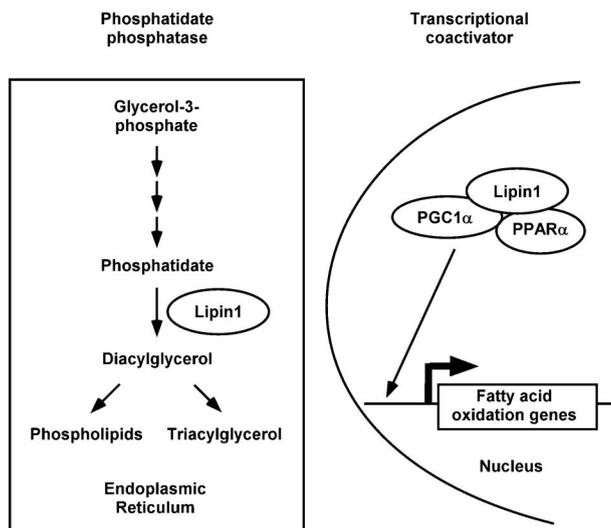


Fig. 2. Dual Molecular Functions of Lipin 1 Protein as Phosphatidate Phosphatase and Transcriptional Coactivator

た Lipin1 は、核内受容体 Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  や PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , Glucocorticoid receptor とも相互作用することが知られている。以上のことから Lipin1 は、エネルギーを細胞内に貯蓄する前者の機能と細胞内エネルギーを消費する後者の機能を持つ二面性のタンパク質である。したがって、Lipin1 が脂質調節を行うための複雑なシステムを理解するためには、多面的な解析が必要であると考えられる。

#### 4. 細胞内ステロールによる Lipin1 遺伝子発現への影響

前述したように、Lipin1 は生体内の脂質代謝に深く関連している因子である。しかし、Lipin1 遺伝子の発現がどのような機構で制御されているかほとんどわかっていない。この発現制御機構が解明できれば、Lipin1 による脂質調節を理解するための新たな知見が得られると考えられる。そこで、細胞膜や生理活性物質などの材料となる脂質成分であるステロール（コレステロールやヒドロキシコレステロールなど）に着目し、細胞内ステロールと Lipin1 遺伝子発現の関係を調べた。<sup>16)</sup>

まず細胞内のステロール量を厳密に調節するために、脂質を除去した FBS である Lipoprotein-deficient serum (LPDS) を用いて 3 種類の条件を設定した。すなわち、LPDS(培地中に脂質がない状態)、Sterols (LPDS 条件にコレステロールと 25-ヒドロキシコレステロールを加えた培地)、Statin (LPDS 条件にコレステロール生合成経路を遮断する

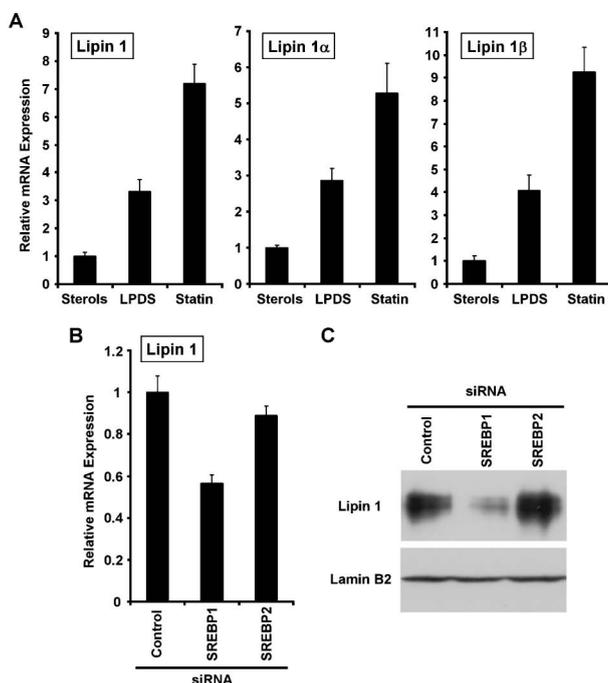


Fig. 3. Lipin 1 Expression Regulated by Cellular Sterols in Huh7 Cells

(A) Huh7 cells were cultured for 24 h in medium containing sterols, LPDS, or statin. Lipin 1, lipin 1 $\alpha$ , and lipin 1 $\beta$  mRNA levels were normalized to those of 36B4 mRNA. All values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ). (B, C) Knockdown of SREBP-1 reduces lipin 1 expression in Huh-7 cells. Huh7 cells were transfected with 25 nM control, SREBP-1, or SREBP-2 siRNA. (B) Total RNA was extracted for analysis by real-time RT-PCR 24 h after transfection. Target mRNA levels were normalized to cyclophilin A mRNA levels. All values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ). (C) Forty-eight hours after transfection, cell extracts were prepared, and aliquots were subjected to SDS-PAGE. Immunoblots were probed with anti-lipin 1 antibody or anti-lamin B2 antibody.

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンを加えた培地) の条件である。この設定した条件における細胞内ステロール量は、Sterols, LPDS, Statin の順番で多くなる。これらの培地条件を用いて、ヒト肝がん由来 Huh7 細胞における Lipin1 mRNA 量の変化をリアルタイム PCR 法を用いて調べた [Fig. 3 (A)]. その結果、細胞内ステロール量が減少するにつれて、Lipin1 mRNA 量は増加していた。また、Lipin1 のアイソフォームである Lipin1 $\alpha$ , Lipin1 $\beta$  についても同様な結果が得られた。これらのことから Lipin1 の発現は、アイソフォームに関係なく、細胞内ステロール量が増加することで制御されることが明らかとなった。

細胞内ステロールが枯渇すると活性化する転写因子として Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) が知られている。<sup>17-19)</sup> SREBP は、SREBP-1 と SREBP-2 の 2 つのアイソフォームが存在し、

SREBP-1は主に脂肪酸やトリグリセリドを合成する遺伝子を、SREBP-2は主にコレステロールを合成する遺伝子を制御している。筆者たちは、SREBPタンパク質がLipin1の発現を調節しているのではないかと考え、SREBP-1とSREBP-2のsiRNAを用いて検討した [Fig. 3 (B) and (C)]. LPDS条件下のHuh7細胞において、SREBP-2 siRNAを用いた時のLipin1発現量は、コントロールと比較して変化がなかった。一方SREBP-1 siRNAを用いた時では、コントロールと比較して有意にLipin1発現量が減少していた。したがって、Lipin1遺伝子は、転写因子SREBP-1によって制御されていた。

### 5. SREBP-1によるLipin1遺伝子の転写制御機構

次に細胞内ステロールによるLipin1遺伝子の発現制御メカニズムをより詳細に解析するために、転写開始点から約2.6 kb (野生型) のヒトLipin1プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを構築した。また、野生型Lipin1プロモーターを順次欠失させた様々なコンストラクトも作製し、ヒト肝がん由来HepG2細胞にこれらすべてのレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った [Fig. 4(A)]. その結果、野生型のLipin1プロモーターにおいて、細胞内ステロールが減少するにつれて、転写活性化が増大した。この応答性は-2478の長さまでは観察されたが、-2378の長さまで欠失させると、ステロール枯渇による応答性が著しく減少した。このことから、ヒトLipin1プロモーターの-2478から-2378の間に細胞内ステロールに応答する領域が存在すると予測された。そこで、この領域の配列を解析したところ、SREBP-1が制御する配列であるSREモチーフが存在した [Fig. 4(B)]. また、SREBPが最大の転写活性化を得るために必要な配列Nuclear factor Y (NF-Y) 結合サイトも発見した。<sup>20,21)</sup> このサイトには転写因子NF-Yが結合することが知られている。<sup>22)</sup>

そこで、Lipin1プロモーター中のこれら2つの領域がSREBP-1によって調節されているか調べた。具体的にはSREモチーフとNF-Y結合サイトのそれぞれ、あるいは両方に変異を入れたレポータープラスミドを作製し、これらのプラスミドに対するSREBP-1の応答性を調べた [Fig. 4(C)]. そ

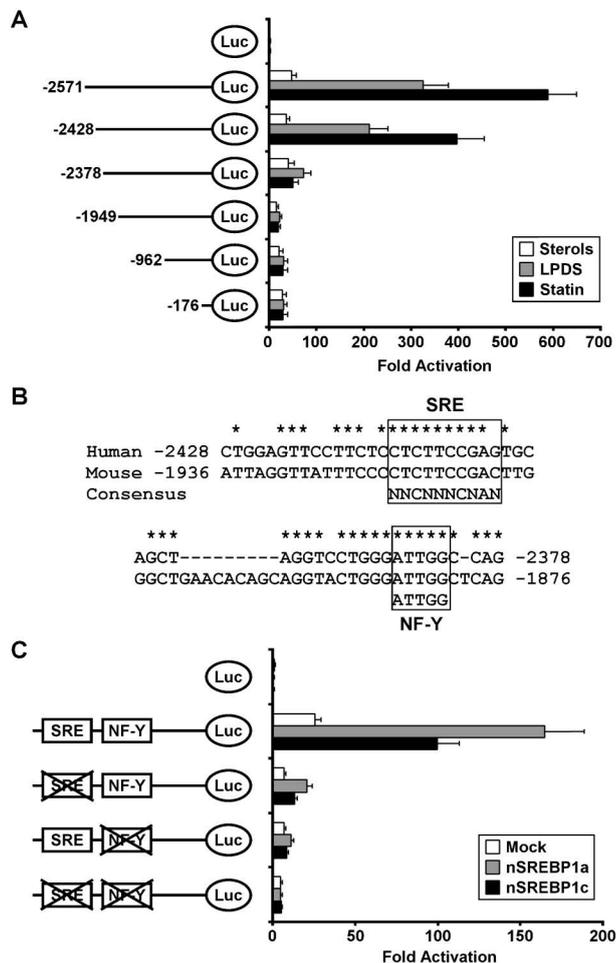


Fig. 4. The Region between Nucleotides -2428 and -2378 of the Human Lipin 1 Promoter Contains Sequences that Mediate the Induction of Lipin 1 Expression by Sterol Depletion

(A) HepG2 cells were transiently transfected with luciferase reporter constructs of the lipin 1 promoter. The cells were harvested and the luciferase activity was measured and normalized to the  $\beta$ -galactosidase activity. The values represent means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ). (B) Schematic representation of the human lipin 1 gene between nucleotides -2428 and -2378, illustrating the SRE motif and the NF-Y-binding site. Conserved nucleotides are indicated by asterisks. (C) Reporter constructs were cotransfected into HepG2 cells with pcDNA3 (mock), SREBP-1a (nSREBP1a), or SREBP-1c (nSREBP1c) expression vector. The cells were harvested, and the luciferase activity was measured and normalized to the  $\beta$ -galactosidase activity. The values represent means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ).

の結果、野生型プロモーターではSREBP-1により強い転写活性を示した。一方、作製したすべての変異体において、SREBP-1による転写活性化が大きく減少した。これらのことより、Lipin1遺伝子の発現制御は、細胞内ステロールの枯渇により活性化したSREBP-1がLipin1プロモーターに結合し、転写を調節していることが明らかとなった。

## 6. 細胞内ステロールに制御される Lipin1 はトリグリセリド合成を制御する

Lipin1 は2つの脂質調節機能として、「トリグリセリド生合成酵素過程における PAP1 活性」と「転写共役因子として脂肪酸酸化促進」を持つ<sup>11,12</sup>。そこで、細胞内ステロールにより制御される Lipin1 が、これら2つの機能のどちらに関与するか検討した。まず細胞内ステロール量を変化させた Huh7 細胞を回収・分画し、Lipin1 の細胞内局在を調べた [Fig. 5(A)]。その結果、PAP 活性として機能する場である膜成分や細胞質成分において、Lipin1 タンパク質の発現増加が確認できた。一方、Lipin1 が転写共役因子として機能する場である核成分では、Lipin1 タンパク質の増減は観察されなかった。これらの結果から、細胞内ステロールの枯渇により発現が誘導される Lipin1 は、PAP1 活性を有していると予測されたため、実際に PAP 活性

を測定した [Fig. 5(B)]。その結果、Lipin1 の発現増加と相関するように PAP1 活性が上昇したが、PAP2 活性にはほとんど影響を与えなかった。最後に、Lipin1 に対する siRNA を用い、最終生成物である細胞内トリグリセリド量を調べた [Fig. 5(C)]。コントロール siRNA を導入した場合には、細胞内ステロールを枯渇させることによりトリグリセリド量は増加した。しかしながら、Lipin1 siRNA ではトリグリセリド量の変化が観察されなかった。以上のことから、細胞内ステロールにより制御される Lipin1 は、PAP1 活性を通じて、細胞内トリグリセリドを調節していると考えられた。

## 7. おわりに

メタボリックシンドロームは、高血糖、脂質代謝異常、高血圧が重積する病態であり、動脈硬化の前駆状態として注目されている。このメタボリックシンドロームの予防策として、上流の原因である内臓肥満を解消することが重要となる。このような背景の中、2001年に発見された Lipin1 遺伝子は、年月を重ねる毎に注目度を増し、興味深い報告がいくつもなされている。特に Lipin1 遺伝子発現制御の破綻は、生体内の脂質バランスを崩し、肥満やインスリン抵抗性などの代謝異常が生じる。したがって、Lipin1 発現を厳密に制御できれば、これらの脂質異常に対する有効な対策や治療法が開発できると考えられる。一方、Lipin1 は「トリグリセリド合成」と「脂肪酸酸化」という対局した2つの機能を有しており、生体内においてこれらの機能を使い分ける制御システムが存在すると予想されるがいまだに明らかとされていない。その一端として、筆者たちの結果である SREBP-1 が Lipin1 を制御するという事象から、SREBP-1 の上流シグナルであるインスリンが1つの要因であると予測する。すなわち、食事を摂取した時に過剰の糖や脂質を血中から取り除くためにインスリンが分泌され、SREBP-1 を活性化し、Lipin1 発現による「トリグリセリド合成」を促進すると考えられる。しかしながら、SREBP-1 は「脂肪酸酸化」が機能する場面では発現が抑制されているため、Lipin1 が「脂肪酸酸化」を調節する新しい制御システムが存在する可能性がある。今後、脂質調節機能における Lipin1 の正確なメカニズムを詳細に理解し、メタボリックシンドロームを始めとする脂質代謝異常に対する新しい治療戦略を

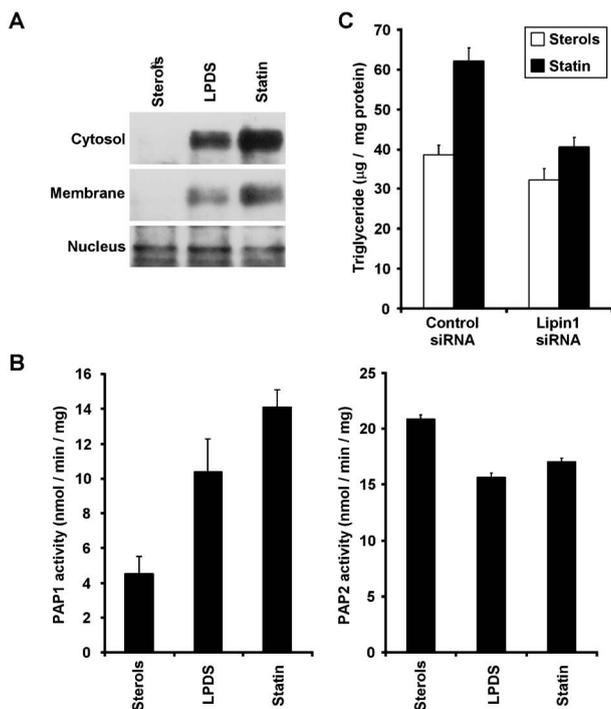


Fig. 5. Sterol-mediated Lipin 1 Expression Modulates Triglyceride Accumulation through Its PAP1 Activity in Huh7 Cells

(A) Huh7 cells were cultured in medium containing sterols, LPDS, or statin for 24 h. Cell extracts were fractionated, and aliquots were subjected to SDS-PAGE. Immunoblots were probed with anti-lipin 1 antibody. (B) Huh7 cells were cultured in medium containing sterols, LPDS, or statin for 48 h. PAP activity was measured using the cytosolic fraction. The values represent means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ). (C) Huh7 cells were transfected with each siRNA and cultured in medium containing sterols or statin for 72 h. The cellular TG content was measured and normalized to the total protein content. The values represent means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ).

提唱していきたい。

**謝辞** 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野で行われた研究であり、終始、御指導、御鞭撻を賜りました土井健史教授に心から感謝申し上げます。また、本研究を行うに当たり、御協力と御助言を賜りました橘 敬祐助教を始めとする同研究室の皆様は心より御礼申し上げます。本研究を推進するに当たり、幾多の御協力と有益な御助言を賜りました東京大学先端科学研究センターシステム生物学ラボラトリー児玉龍彦教授、酒井寿郎教授、浜窪隆雄教授、田中十志也准教授、大阪大学大学院医学系研究科平野賢一助教、大田明生博士に深謝致します。

#### REFERENCES

- 1) Reue K., Phan J., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **9**, 436–441 (2006).
- 2) Garg A., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1220–1234 (2004).
- 3) Ahima R. S., *Obesity*, **14**, 242–249 (2006).
- 4) Peterfy M., Phan J., Xu P., Reue K., *Nat. Genet.*, **27**, 121–124 (2001).
- 5) Reue K., Xu P., Wang X. P., Slavin B. G., *J. Lipid Res.*, **41**, 1067–1076 (2000).
- 6) Phan J., Reue K., *Cell Metab.*, **1**, 73–83 (2005).
- 7) Peterfy M., Phan J., Reue K., *J. Biol. Chem.*, **280**, 32883–32889 (2005).
- 8) Huffman T. A., Mothe-Satney I., Lawrence J. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1047–1052 (2002).
- 9) Donkor J., Sariahmetoglu M., Dewald J., Brindley D. N., Reue K., *J. Biol. Chem.*, **282**, 3450–3457 (2007).
- 10) Han G. S., Carman G. M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 14628–14638 (2010).
- 11) Reue K., Zhang P. X., *FEBS Lett.*, **582**, 90–96 (2008).
- 12) Khalil M. B., Blais A., Figeys D., Yao Z. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**, 1249–1259 (2010).
- 13) Han G. S., Wu W. I., Carman G. M., *J. Biol. Chem.*, **281**, 9210–9218 (2006).
- 14) Finck B. N., Gropler M. C., Chen Z. J., Leone T. C., Croce M. A., Harris T. E., Lawrence J. C., Kelly D. P., *Cell Metab.*, **4**, 199–210 (2006).
- 15) Santos-Rosa H., Leung J., Grimsey N., Peak-Chew S., Siniossoglou, S., *EMBO J.*, **24**, 1931–1941 (2005).
- 16) Ishimoto K., Nakamura H., Tachibana K., Yamasaki D., Ota A., Hirano K., Tanaka T., Hamakubo T., Sakai J., Kodama T., Doi T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 22195–22205 (2009).
- 17) Brown M. S., Goldstein J. L., *Cell*, **89**, 331–340 (1997).
- 18) Brown M. S., Goldstein J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11041–11048 (1999).
- 19) Brown M. S., Ye J., Rawson R. B., Goldstein J. L., *Cell*, **100**, 391–398 (2000).
- 20) Shimano H., *Prog. Lipid Res.*, **40**, 439–452 (2001).
- 21) Ishimoto K., Tachibana K., Hanano I., Yamasaki D., Nakamura H., Kawai M., Urano Y., Tanaka T., Hamakubo T., Sakai J., Kodama T., Doi T., *Biochem. J.*, **429**, 347–357 (2010).
- 22) Mantovani R., *Gene*, **239**, 15–27 (1999).