

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00872

研究課題名(和文) 肝星細胞におけるビタミンA取り込み関連因子のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening of factors required for uptake of vitamin A into hepatic stellate cells

研究代表者

目崎 喜弘 (Mezaki, Yoshihiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40431621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンAは生体に必須の脂溶性ビタミンであるが、必要量を超えた摂取は過剰症を引き起こす。ところが北極圏の食物連鎖の頂点に立つホッキョクグマは、大量のビタミンA摂取にもかかわらず過剰症を引き起こさない。ホッキョクグマの貯蔵型ビタミンA合成酵素(LRAT)を調べたところ、LRAT活性自体は低いにもかかわらず、基質を効率的にLRATに提示し、反応産物を脂質滴に効率的にため込むことで、ビタミンAの大量貯蔵を実現している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分厚い脂肪に覆われたアザラシなどを捕食するホッキョクグマは、必然的に高濃度のビタミンAを摂取することになり、ビタミンA過剰症の危機にさらされたが、進化の過程で効率的なビタミンA貯蔵能力を獲得することで、その地位を維持することが可能になったと考えられる。本研究で得られたビタミンA貯蔵に関する知見は、ヒトにおけるビタミンA過剰症や欠乏症の解決にも役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：Vitamin A is a fat-soluble vitamin required for many physiological functions, however, excess intake of vitamin A causes hypervitaminosis A. Polar bears, the top predators in the Arctic, take a large amount of vitamin A but they do not suffer from hypervitaminosis A. We analyzed vitamin A-esterifying enzyme, LRAT, and revealed that LRAT activities of liver microsome fractions from polar bears were considerably lower than those obtained from rats. LRAT and cellular retinol-binding protein (CRBP) I were well co-localized. The CRBP I effectively conveys retinol to the LRAT, thereby alleviating the low enzymatic activity of LRAT in polar bear livers.

研究分野：生物学

キーワード：ビタミンA 肝臓 星細胞 北極圏 放射能

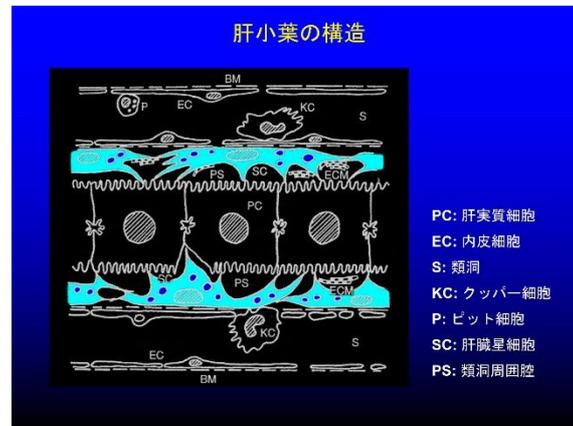
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミンAは視覚、免疫、上皮のバリア機能など多くの生理作用に必須の脂溶性ビタミンであるが、必要量を超えた摂取はビタミンA過剰症の原因となり、頭痛、めまい、嘔吐、食欲減退、肝肥大、小結節性肝硬変、骨の痛み、皮膚の乾燥・剥離、口唇炎、手指爪の劣化、脱毛などを引き起こす。

(2) 哺乳類において、ビタミンAの大部分は肝星細胞(ビタミンA貯蔵細胞、伊東細胞、リポサイトとも呼ばれる)に貯蔵されている。肝星細胞は血流からビタミンA(レチノール)を取り込み、レチニルエステルに変換して細胞質の脂質滴に隔離する。肝臓においてレチノールをレチニルエステルに変換する酵素はレシチン:レチノールアシル基転移酵素(lecithin:retinol acyltransferase, LRAT)である。

(3) 我々はこれまでに、ホッキョクグマ、アゴヒゲアザラシ、ホッキョクギツネなど、北極圏の食物連鎖の頂点に立つ動物において、肝臓に大量のビタミンAが貯蔵されていることを明らかにしてきた。過剰に摂取したビタミンAが肝臓からあふれ、ビタミンA過剰症となるヒトやラットと異なり、ホッキョクグマは大量のビタミンAを蓄えつつも、その局在は肝星細胞に限定されており、ビタミンA過剰症を呈することはない。



### 2. 研究の目的

ホッキョクグマ肝臓においてビタミンAの大量貯蔵を可能にしている分子メカニズムを解明し、ヒトの健康維持に応用することを目的とする。

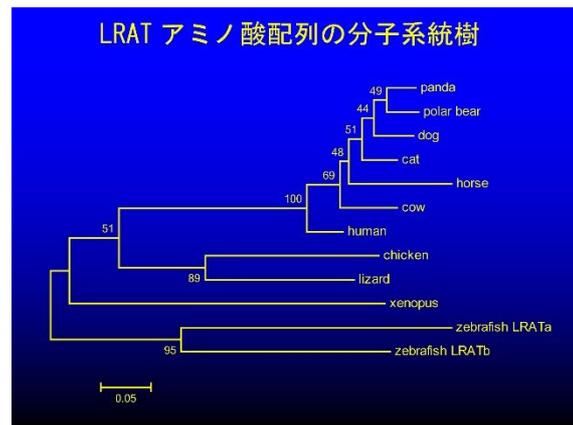
### 3. 研究の方法

(1) ホッキョクグマ肝臓の小片をホモジェナイザーで破碎し、低速(600 x g)で遠心して核画分を沈殿させた。上清を集め中速(8,000 x g)で遠心し、ミトコンドリア画分を沈殿させた。さらに上清を高速(105,000 x g)で遠心し、ミクロソーム画分を沈殿させた。得られたミクロソーム画分を-80℃で保存し、LRAT活性測定とウェスタンブロッティングに用いた。

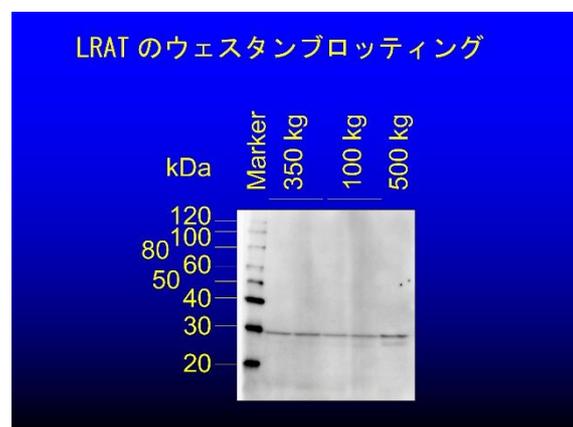
(2) LRAT活性はトリチウム標識したレチノールを用いて測定した。非標識レチノールを大過剰に共存させ(反応時の全レチノール濃度5 μM、トリチウム標識レチノールが全レチノールの5%となるよう反応液を調製した)、短時間(1分間)で反応を止めることにより、LRAT活性の最大速度Vmaxを近似的に測定した。

### 4. 研究成果

(1) データベースに登録されているホッキョクグマLRATアミノ酸配列をさまざまな脊椎動物のLRATアミノ酸配列と比較したところ、酵素活性に必須のアミノ酸は高度に保存されていた。これらのLRATアミノ酸配列を用いて系統樹を作成したところ、研究者の間で広く受け入れられている系統樹と同様の結果が得られた。すなわち、ホッキョクグマはパンダの近縁でありクマ科を形成する。クマ科はイヌやネコとともに食肉目を形成する。食肉目に最も近縁なのは奇蹄目(ウマを含む)であり、偶蹄目(ウシを含む)がそれに次ぐ。霊長目は上に述べた動物群の姉妹群であり、合わせて哺乳綱を形成する。



(2) ヒトLRATに対して作成された抗体がホッキョクグマLRATを認識するかどうかをウェスタンブロッティングで確認したところ、推定分子量29 kDaの単一バンドが観察された。ホッキョクグマLRATの計算上の分子量26 kDaよりもやや大きい分子量であった。この結果は、ホッキョクグマLRATの翻訳後修飾やエクソン-イントロン構造が他種のLRATと異なる可能性を示唆しており、このことがLRATの酵素活性に影響しているかもしれない。



(3) ホッキョクグマ肝臓ミクロソーム画分の LRAT 活性を測定したところ、1.4 ~ 5.7 pmol/min/mg ミクロソームであった。これは比較として同条件で測定したラット肝臓ミクロソーム画分の LRAT 活性 (16.9 および 20.7 pmol/min/mg ミクロソーム) より低値であった。一方ホッキョクグマ肝臓のレチニルエステル濃度は 18 ~ 48  $\mu\text{M/g}$  湿重量であり、ヒト (例えば栄養状態の良いアメリカ人の成人で 0.33  $\mu\text{M/g}$  湿重量) やラット (例えば 240 ~ 300 g の実験用ラットで 0.73  $\mu\text{M/g}$  湿重量) の肝臓より高値を示した。肝臓のレチニルエステル濃度と LRAT 酵素活性は正の相関を示したが (ピアソンの  $r = 0.90$ )、サンプル数が少ないため有意ではなかった ( $p = 0.28$ )。

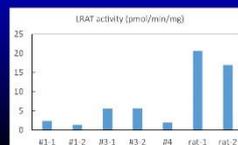
### LRAT 酵素活性とレチニルエステル貯蔵量

Animal	Body weight* (kg)	Liver weight (kg)	LRAT activity (pmol/min/mg microsome)	REs ( $\mu\text{mol/g wet weight}$ )
#1	100	2.0	1.8 <sup>b</sup> (1.4 and 2.3)	29
#2	250	4.5	N.D. <sup>c</sup>	18
#3	350	5.6	5.6 <sup>b</sup> (5.6 and 5.7)	48
#4	500	7.7	2.0	38

\* Estimated by the body length of the animal.

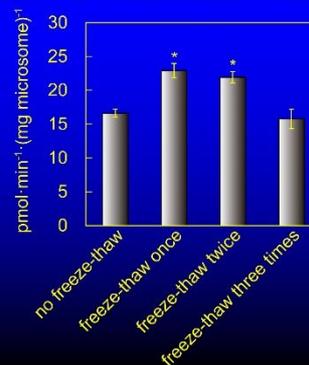
<sup>b</sup> Average of two independent measurements (parentheses) using different microsome preparations.

<sup>c</sup> Not determined due to sample shortage.



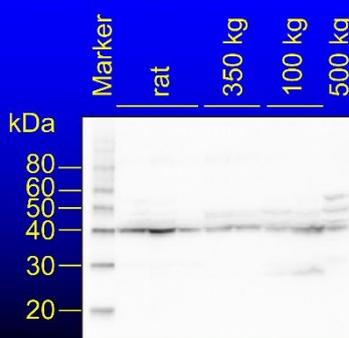
(4) ホッキョクグマの肝臓は凍結されたままグリーンランドからノルウェーを経由して日本まで空輸されており、その間に温度変化にさらされた可能性も考えられた。そこで、凍結融解の繰り返しが生じた肝臓ミクロソーム画分の LRAT 活性に及ぼす影響をラットの肝臓で調べたところ、1 回ないし 2 回の凍結融解はむしろ LRAT 活性を有意に上昇させ、3 回の凍結融解では酵素活性に変化は見られないことが明らかとなった。

### 凍結融解ラット肝ミクロソームの LRAT 活性



(5) ビタミン A はレチニルエステルとして貯蔵されるが、活性型のビタミン A はレチノイン酸である。組織のレチノイン酸濃度は合成と異化作用のバランスによって規定されている。ホッキョクグマ肝臓において、LRAT 活性が低いにもかかわらずレチニルエステル濃度が高い理由として、ビタミン A の分解速度が遅い可能性が考えられた。そこで、レチノイン酸の異化作用に重要なチトクローム P450 26A1 (CYP26A1) の肝臓における発現量をホッキョクグマとラットで比較した。その結果、両者にほとんど差がないことが判明した。

### CYP26A1 のウェスタンブロッティング



(6) 免疫組織染色により、LRAT と細胞内レチノール結合タンパク質 I (cellular retinol-binding protein, CRBP-I) が強く共局在することが明らかとなった。CRBP-I に結合したレチノールは分解から保護され、LRAT の良い基質となることが知られている。したがって、ホッキョクグマの肝臓では、CRBP-I がレチノールを効率的に LRAT に運ぶことで、弱い LRAT 活性を克服し、ビタミン A の大量貯蔵を実現しているのではないかと考えられた。

(7) これらの研究を遂行するにあたり、ノルウェーのオスロ大学との長年にわたる共同研究が不可欠であった。2011 年 3 月 11 日の福島第一原発事故を受けて、このノルウェーとの共同研究チャンネルを活用し、北極圏にあるノルウェー領スヴァールバル諸島よりさまざまな北極圏生物試料を取得して、セシウム 134 およびセシウム 137 の放射能を測定した。明確に福島由来と判断できる放射能は観測されなかったが、いくつかの植物・地衣類・菌類において、1986 年のチェルノブイリ原発事故もしくは 1950 年代から 1960 年代にかけて行われた核兵器実験由来と考えられる微量のセシウム 137 放射能を観測した。今後、福島原発由来の放射能が海流を経由して北極圏に到達する可能性もあることから、今回の測定結果は北極圏における長期的な放射能モニタリングの参照 (reference) として寄与するのではないかと考えている。

### < 引用文献 >

Senoo H, Imai K, Mezaki Y, Miura M, Morii M, Fujiwara M, Blomhoff R. Accumulation of vitamin A in the hepatic stellate cell of arctic top predators. *Anat Rec (Hoboken)*. 295, 1660-1668, 2012

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mezaki Yoshihiro, Kato Shigeaki, Nishikawa Osamu, Takashima Isao, Tsubokura Masaharu, Minowa Haruka, Asakura Tadashi, Matsuura Tomokazu, Senoo Haruki	4. 巻 5
2. 論文標題 Measurements of radiocesium in animals, plants and fungi in Svalbard after the Fukushima Daiichi nuclear power plant disaster	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03051 ~ e03051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e03051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 93
2. 論文標題 爬虫類における - カロテン摂取と肝臓のビタミンA 貯蔵	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 257 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 51
2. 論文標題 肝星細胞活性化とレチノイン酸受容体	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 32(550) ~ 33(551)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 目崎喜弘, 政木隆博, 松浦知和	4. 巻 94
2. 論文標題 最近10年間のビタミンA研究の動向と未来への展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 129 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mezaki Y., Nagatsuma K., Yokoyama H., Park J.H., Nakamura M., Masaki T., Blomhoff R., Senoo H., Matsuura T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Biochemical and histochemical analyses of lecithin:retinol acyltransferase from polar bear ( <i>Ursus maritimus</i> ) livers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Polar Biology	6. 最初と最後の頁 805 ~ 815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00300-017-2241-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 92
2. 論文標題 ビタミンA1をビタミンA2に変換する酵素の発見.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 319-321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 92
2. 論文標題 リガンド結合に伴う細胞内レチノール結合タンパク質の立体構造変化.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 461-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 91
2. 論文標題 脊椎動物の腸を支配する神経の系統発生学的由来とその神経を介するビタミンAの貯蔵.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 655-656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 目崎喜弘	4. 巻 91
2. 論文標題 Stra6による細胞内へのビタミンA取り込み機構.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 139-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 目崎喜弘, 政木隆博, 中村まり子, 松浦知和
2. 発表標題 肝臓ビタミンA貯蔵細胞 (肝星細胞) におけるレチノイン酸受容体の局在と機能
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 目崎喜弘, 政木隆博, 松浦知和
2. 発表標題 データベースで分析したレチノイド研究の動向
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第30回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mezaki Y., Masaki T., Nakamura M., Yokoyama H., Nagatsuma K., Matsuura T.
2. 発表標題 Vitamin A esterification and storage in polar bear livers.
3. 学会等名 FASEB the 4th International Conference on Retinoids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 目崎喜弘, 横山 寛, 政木隆博, 中村まり子, 白井美佐子, 井上育代, 原 詳子, 小嶋聡一, 松浦知和
2. 発表標題 ウイルス性肝炎患者におけるTGF- LAP断片R58抗体染色の検討
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第29回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 目崎喜弘, 政木隆博, 松浦知和
2. 発表標題 ヤツメウナギにおけるビタミンAの吸収と代謝
3. 学会等名 日本発生物学会第50回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 目崎喜弘, 政木隆博, 松浦知和
2. 発表標題 レチニン：レチノールアシル基転移酵素（LRAT）の昆虫細胞による大量発現の試み
3. 学会等名 日本ビタミン学会第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 目崎喜弘, 永妻啓介, 横山 寛, 朴ジョンヒョク, 中村まり子, 政木隆博, 妹尾春樹, 松浦知和
2. 発表標題 ホッキョクグマ肝臓におけるビタミンA貯蔵と代謝 LRATを中心として
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第28回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 ビタミンA代謝酵素とレチノイド結合タンパク質によって制御されるビタミンA恒常性維持機構
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mezaki Y., Masaki T., Matsuura T.
2. 発表標題 Roles of retinoic acid receptors, cellular retinol-binding proteins and lecithin:retinol acyltransferase in vitamin A homeostasis.
3. 学会等名 FASEB 3rd International Conference on Retinoids（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 目崎喜弘，松浦知和
2. 発表標題 レチノイン酸受容体 タンパク質の細胞質における粒状の局在は肝星細胞の活性化マーカーとなり得る
3. 学会等名 第63回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 目崎喜弘
2. 発表標題 肝星細胞のビタミンA貯蔵に関わるレチノイン酸受容体の性状解析
3. 学会等名 日本レチノイド研究会第27回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 目崎喜弘, 永妻啓介, 横山 寛, 朴ジョンヒョク, 中村まり子, 政木隆博, 妹尾春樹, 松浦知和
2. 発表標題 ホッキョクグマ肝臓レチノールエステル化酵素の生化学的および組織学的解析
3. 学会等名 第30回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松浦 知和  (Matsuura Tomokazu)  (30199749)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	
研究分担者	岩本 武夫  (Iwamoto Takeo)  (90568891)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	