

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590075
 研究課題名 (和文) 肥満の病態生理における長鎖アシル CoA チオエステラーゼの機能解明
 研究課題名 (英文) Functional analysis of acyl-CoA thioesterases in obesity.

研究代表者
 山田 純司 (YAMADA JUNJI)
 東京薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：60200721

研究成果の概要：従来から肥満と生活習慣病の因果関係が指摘されてきたが、最近になって、肥大化した脂肪細胞が分泌する液性因子や脂肪酸が肝臓や筋肉などの機能に悪影響を及ぼすことが分かってきた。そこでアシル CoA チオエステラーゼと呼ばれる脂肪酸代謝酵素を取り上げ、高脂肪食による肥満動物を用いて脂質代謝異常や内臓脂肪における代謝的悪循環との関係を調べた。そして脂肪組織におけるこの酵素の特徴を明らかにし、メタボリックシンドローム研究へ展開する手がかりを掴んだ。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：病態生化学，代謝生物化学，脂質代謝

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：肥満，脂肪酸代謝，酵素，脂肪組織，メタボリックシンドローム

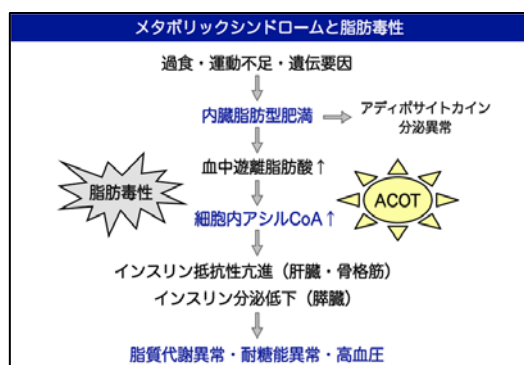
1. 研究開始当初の背景

近年，世界的規模で蔓延する肥満症は，内臓脂肪の蓄積を背景として糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病を合併し，メタボリックシンドロームの主要な原因となっている。この点に関して，従来から肥満と生活習慣病の関連性が指摘されてきたが，その具体的な因果関係を証明するには至っていなかった。しかし最近になって，脂肪組織は中性脂肪を貯蔵するだけでなく，アディポサイトカインや遊離脂肪酸を分泌する内分泌器官であることが明らかにされ，メタボリックシンドロームの発症機構が次第に解明され始めた。こうした状況の下で「脂肪毒性 Lipotoxicity」という概念が提唱され，膵 β 細胞や骨格筋，肝臓における脂肪酸 (アシル CoA) の蓄積がインスリン分泌の低下やインスリン抵抗性を惹起することが明らかになった。

一方，肥満者の脂肪組織では脂肪細胞の肥大化に伴い形質転換が起こり，アディポサイトカインの分泌異常，さらに単球/マクロファージの浸潤を特徴とする炎症性変化がもたらされ，結果として腫瘍壊死因子 α などのインスリン抵抗性惹起因子の分泌が亢進

すると考えられるようになった。この過程においても脂肪細胞から分泌される遊離脂肪酸が重要な役割を果たしており、浸潤マクロファージによるその受容が炎症性サイトカインの分泌を促すことが明らかにされている。しかも、こうした一連の変化は、体内で脂肪組織の存在する部位によって異なり、たとえば皮下脂肪よりも内臓脂肪の方がより顕著であると考えられている。

こうしたことから肥満(症)という病態を理解しようとするとき、脂肪酸代謝の解析は有用な情報を提供するものと考えられ、様々な側面から多くの研究がなされている。脂肪酸は細胞内でコエンザイムA (CoA-SH) にチオエステル化されて初めて代謝され、 β 酸化も中性脂肪やセラミドへの生合成もアシルCoA に活性化されなければ進行しない。そして、細胞内アシルCoA濃度は種々の酵素によって調節されており、それらのうちで長鎖アシルCoAチオエステラーゼ (Acyl-CoA thioesterase; ACOT) は、アシルCoAを加水分解することによって細胞内局所でアシルCoA、遊離脂肪酸、およびCoA-SHレベルを調節すると考えられている。

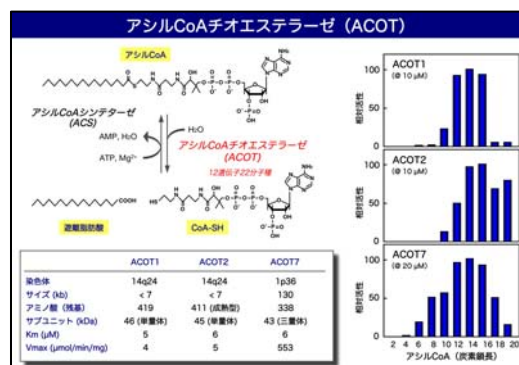


我々はこれまでに ACOT の分子多様性と生化学的特性について明らかにしてきた。その生理的役割に関して不明な部分が多く残されているものの、最初の分子種が同定されてから十余年を経て現在では 12 遺伝子 22 種類の分子種がクローニングされている [1-3]。細胞内アシルCoA加水分解活性それ自身は古くから知られていたが、その実態として ACOT が単離・同定されてから未だ歴史が浅く、その研究人口は必ずしも多くない。しかし、それ故に肥満の病態生理の理解を目指した ACOT の機能解析は、独創的な研究に発展するものと考えられた。そこで本研究を計画し、肥満症・メタボリックシンドロームの予防と治療に貢献することを目標として、ACOT という新たな視点から情報を収集しようと試みた。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの予防と治療を考える上で、肥満に伴う脂質代謝異常と脂

肪毒性発現のメカニズムを解明することは重要な研究課題である。そこで本研究では、細胞内における脂肪酸の活性化中間体であるアシルCoAの代謝に注目し、その加水分解酵素である ACOT について検討した。すなわち、肥満状態における主要な ACOT 分子種の発現変化を解析し、脂肪毒性発現への関与について、さらに各種臓器・組織における ACOT 分子種の機能と脂質代謝異常との関係を明らかにし、肥満(症)の病態生理における ACOT の役割を解明することを目的とした。



3. 研究の方法

モデル動物としてラットを用い、5種類の主要な ACOT 分子種 (ACOT 1, 2, 7, 9, 11) について、主にイムノブロット法によって各種臓器・組織におけるそれぞれの発現レベルを定量分析した。研究対象とした分子種のうち ACOT9 [4] と ACOT11 [5] は、その酵素学的性質等を解析することから研究を開始した。したがって、本研究は以下の2つの検討課題から構成された。

(1) ACOT 分子種の生化学的特性

ACOT9およびACOT11に対するヒトおよびラット cDNA クローンを単離し、バクテリア発現系を用いて組み換えタンパクを調製した。それを用いて基質特異性や反応速度定数などを調べ、他の分子種と比較検討した。次に GFP 融合タンパク発現系によって細胞内分布を調べた。さらに、それぞれに対する特異抗体を作製し、免疫化学的分析に供した。

(2) ACOT 分子種の発現変化

未処置ラットから心臓や肝臓、脂肪組織をはじめとする各種臓器・組織を摘出し、各 ACOT 分子種の発現レベルを解析した。また、ラットに高脂肪食負荷 (60 or 10 kcal %fat, 自由摂食あるいは 70%摂食制限, 20 週間), 絶食 72 時間処置, あるいは薬物処置 (Wy14,643 or Troglitazone, 経口投与, 2 週間) を施し同様な検討を行った。さらに、褐色脂肪細胞の初代培養系を用い、高濃度グルコース、脂肪乳剤あるいはパルミチン酸で 5 日間処理して同様な検討を行った。単球/マクロファージに関する検討では、ヒト白血病細胞由来 THP-1 細胞株を用いた。

4. 研究成果

(1) ACOT 分子種の生化学的特性

ヒト ACOT9 遺伝子は X 染色体上 (Xp22.11) 1.7 kb にわたって 15 個のエクソンから構成され、439 アミノ酸残基から成る分子量 49,600 の可溶性タンパクをコードすると推測された。また N 末端の 21 アミノ酸残基にミトコンドリア標的シグナルの存在が予測された。さらにラット ACOT9 (439 アミノ酸残基, 分子量 50,100) と 90% の相同性を示し、この遺伝子が種を超えて高度に保存されていることが確認された。次に HeLa 細胞における GFP 融合タンパク発現実験および抗 ACOT9 ペプチド抗体による培養ラット心筋細胞の免疫蛍光染色の結果から、ACOT9 はミトコンドリアに局在する可溶性タンパクであると考えられた。バクテリア発現系によって調製した酵素標品を用いてアシル CoA 加水分解活性を測定した結果、ACOT9 は炭素鎖長 C2-C16 のアシル CoA に対して幅広い特異性を示し、特にデカノイル CoA に対して高い親和性 (K_m 値 3.5 μM , V_{max} 2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を持つことが明らかになった。ラットにおける臓器分布を調べたところ ACOT9 は心筋で高発現し、骨格筋 (ヒラメ筋および長趾伸筋) にもわずかに認められた。しかし、平滑筋 (小腸) や肝臓、脂肪組織ではほとんど検出されなかった。心筋における ACOT9 の発現レベルは、ラットへの Wy14,643 処置、高脂肪食負荷あるいは腹部大動脈狭窄処置 (圧負荷心肥大モデル) のいずれによっても変化しなかった。このとき、ACOT2 は Wy14,643 および高脂肪食によって上昇し、心肥大で低下した。以上の結果から、心筋においては ACOT2 が環境変化に即したアシル CoA 加水分解活性を提供するのに対し、ACOT9 は基礎レベルの活性維持に寄与すると考えられた。これまでもミトコンドリアに局在する分子種として ACOT2 と ACOT7b が知られており、その組織分布や触媒特性も ACOT9 と重複する部分がある。各分子種の機能分担に興味を持たれるが、脂肪酸燃焼あるいはエネルギー産生の中心的オルガネラにおける ACOT の重要性が示唆される。

一方、ラット ACOT11 は 573 アミノ酸残基 (分子量 64,800) から成り、数カ所の糖鎖結合部位を持つ可溶性タンパクと推測された。また、ヒトホモログと 94% の相同性を示した。GFP 融合タンパク発現実験、抗 ACOT11 部分タンパク抗体による培養ラット褐色脂肪細胞の免疫蛍光染色、さらに褐色脂肪組織ホモジネートの細胞分画の結果、ACOT11 は小胞体内腔に局在する可溶性タンパクであると考えられた。ACOT11 は主に褐色脂肪組織と心臓で発現していた。ACOT11 はマウス褐色脂肪組織の熱産生関連分子として報告され [5]、またその遺伝子が食餌性肥満関連遺伝子座 (Do1)

近傍に位置することから、当初ミトコンドリアにおける脂肪酸燃焼への関与が期待された。しかし、今回の検討結果から小胞体への局在が推測され、むしろ貯蔵脂肪の調節に関係する可能性が考えられた。ヒト ACOT11 遺伝子に認められる一塩基多型と ACOT 機能、さらに肥満体質との関連性については今後の検討課題となった。

(2) ACOT 分子種の発現変化

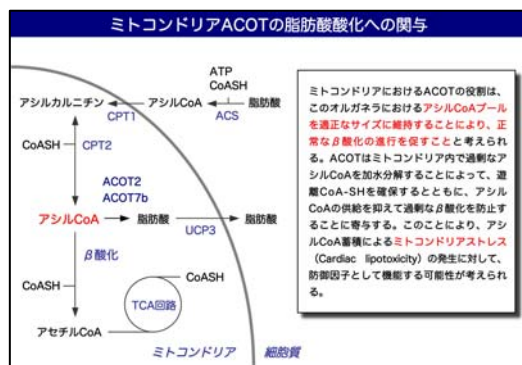
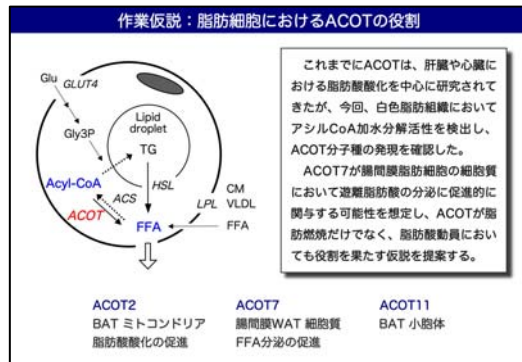
ラットの腹部皮下、腎臓周囲、腸間膜、副睾丸周囲それぞれから白色脂肪組織を摘出し、パルミトイル CoA 加水分解活性を測定したところ、いずれにおいても当該酵素活性が検出された。特に腸間膜白色脂肪組織では褐色脂肪組織や肝臓、心臓に匹敵する高い活性が認められた。さらに、イムノブロット分析によって、腸間膜脂肪では ACOT7、皮下脂肪では ACOT1、また褐色脂肪では ACOT2 と ACOT11 の発現レベルが高いことが明らかになった。そこで、肝臓と心臓を対照として、これらの脂肪組織における ACOT 分子種の発現変化を解析した。

ラットを絶食させると肝臓で ACOT1 と ACOT2 が誘導されたが、心臓と脂肪組織では有意な変化は認められなかった。Wy14,643 処置では心臓や脂肪組織においても ACOT 1, 2, 7 が誘導され、特に肝臓での発現上昇は顕著であった。しかし、ACOT11 の発現レベルに変化は認められなかった。高脂肪食あるいは普通食を 4 週間自由摂食させたところ、いずれのラットも肥満したが、普通食群で血清中性脂肪濃度が高く、これと逆相関するように褐色脂肪で ACOT2 と ACOT11 の発現レベルが低下していた。この点に関して培養褐色脂肪細胞を高脂肪含有培地等で処理することによって検討したが、*in vivo* における変化を再現することは出来なかった。腸間膜脂肪では、普通食と高脂肪食のいずれによっても自由摂食 20 週までに ACOT7 の発現レベルが約 40% に低下した。しかし、心臓においてはいずれの摂食期間においても高脂肪食によって ACOT 1, 2, 7 が有意に上昇していた。骨格筋における ACOT の発現レベルは極めて低く、またラットへの各処置によっても大きな変化は認められなかった。

以上の結果から、白色脂肪組織に ACOT が発現していることが初めて明らかになった。その機能については依然として不明な点が多いが、細胞質酵素である ACOT1 と ACOT7 は遊離脂肪酸の動員において、また褐色脂肪組織のミトコンドリア酵素である ACOT2 は脂肪酸燃焼において、それぞれ補助的な役割を果たすものと考えられた。発現調節に関しては、ACOT 1, 2, 7 が PPAR α によって誘導されるのに対して、ACOT11 は PPAR α にも PPAR γ にも影響されないことが示唆された。さらに、褐色脂肪組織における ACOT2 と ACOT11 の発

現は、基質レベルの調節よりも神経や内分泌系など、他の調節機構に依存するものと考えられた。

最後に、THP-1 細胞を用いた検討から、ACOT7 は単球にも発現し、マクロファージへの分化によってそのレベルが著明に低下すること、しかし Troglitazone により有意に発現誘導されることを初めて明らかにした。



(3) 総括

本研究では、ACOT9 や ACOT11 といった新たな分子種について生化学的特性を明らかにし、その過程で調製した特異抗体を用いて ACOT 分子種の発現解析を行った。ラットに高脂肪食を負荷し、肥満による脂肪毒性発現に対する ACOT の役割を調べた。その結果、肝臓や骨格筋におけるアシル CoA 蓄積に対して ACOT が防御的な役割を果たすことを直接的に支持する証拠は得られなかったが、PPAR リガンドによって誘導されることから薬物療法や多価不飽和脂肪酸摂取による脂質代謝改善の過程で機能することが推測された。一方、白色脂肪組織における ACOT の発現、特に内臓脂肪と単球/マクロファージにおける ACOT7 の特徴的な発現分布を初めて明らかにした。このことは、マクロファージにおけるプロスタグランジンの産生調節と関連して、内臓脂肪における炎症性変化と ACOT7 の役割に関して新たな研究課題へと発展した。近年、メタボリックシンドロームを全身性の軽度慢性炎症性疾患として捉え、内臓脂肪における炎症性変化がインスリン抵抗性亢進に重要な役割を果たすことが明らかになっ

てきた。こうした状況を踏まえて今後、肥満(症)の病態生理の理解と効果的な薬物療法の開発に向けて、本研究成果の更なる展開が期待される。

参考文献：

1. Yamada, J. et al. Hepatic induction of mitochondrial and cytosolic acyl-CoA hydrolases/thioesterases in rats under conditions of diabetes and fasting. *Metabolism* 52, 1527-1529 (2003).
2. Hunt, M. C., Yamada, J. et al. A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. *J. Lipid Res.* 46, 2029-2032 (2005).
3. Yamada, J. Long-chain acyl-CoA hydrolase in the brain. *Amino Acids* 28, 273-278 (2005).
4. Poupon, V. et al. Molecular cloning and characterization of MT-ACT48, a novel mitochondrial acyl-CoA thioesterase. *J. Biol. Chem.* 274, 19188-19194 (1999).
5. Adams, S.H. et al. BFIT, a unique acyl-CoA thioesterase induced in thermogenic brown adipose tissue: cloning, organization of the human gene and assessment of a potential link to obesity. *Biochem. J.* 360, 135-142 (2001).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Takagi, M., Ohtomo, T., Hiratsuka, K., Kuramochi, Y., Suga, T., and Yamada, J. Localization of a long-chain acyl-CoA hydrolase in spermatogenic cells in mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 446, 161-166 (2006). 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

- ① 百瀬敦, 藤田真理子, 勝亦秀樹, 田野中浩一, 豊田裕夫, 森川正子, 山田純司, 脂肪組織におけるアシル CoA チオエステラーゼ分子種の発現解析. 日本薬学会第 129 年会 (2009 年 3 月, 京都)
- ② 栗島彬, 山田純司, 森川正子, 中込明裕, 草間芳樹, 新博次, 脂質異常症患者におけるスタチン薬物間の多面的作用の相違に関する検討. 日本薬学会第 129 年会 (2009 年 3 月, 京都)
- ③ 山田純司, 百瀬敦, 藤田真理子, 大友隆之, 田野中浩一, 豊田裕夫, ラット脂肪組織におけるアシル CoA チオエステラーゼの発現解析. 第 29 回日本肥満学会 (2008 年 10 月, 大分)

- ④ 百瀬敦, 田野中浩一, 豊田裕夫, 山田純司, アシル CoA チオエステラーゼの分子多様性と脂肪酸代謝における役割. 第 1 回 NsDME 研究会 (2008 年 8 月, 福島)
- ⑤ 中村美幸, 藤田真理子, 大友隆之, 野水基義, 山田純司, アシル CoA チオエステラーゼ (ACOT9) の発現・性状解析. 日本薬学会第 128 年会 (2008 年 3 月, 横浜)
- ⑥ 藤田真理子, 大友隆之, 中村美幸, 野水基義, 山田純司, ラット脂肪組織に発現するアシル CoA チオエステラーゼと高脂肪食負荷の影響. 日本薬学会第 128 年会 (2008 年 3 月, 横浜)
- ⑦ 中村美幸, 藤田真理子, 大友隆之, 野水基義, 山田純司, アシル CoA チオエステラーゼ (ACOT 9) の発現解析. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回生化学会大会合同大会 (2007 年 12 月, 横浜)
- ⑧ 藤田真理子, 中村美幸, 大友隆之, 野水基義, 山田純司, アシル CoA チオエステラーゼに及ぼす高脂肪食と PPAR リガンドの影響. 第 28 回日本肥満学会 (2007 年 10 月, 東京)
- ⑨ 藤田真理子, 中村美幸, 大友隆之, 高木充弘, 野水基義, 山田純司, 脂肪組織に発現するアシル CoA チオエステラーゼ分子種. 日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月, 富山)
- ⑩ 中村美幸, 藤田真理子, 大友隆之, 高木充弘, 野水基義, 山田純司, 高脂肪食負荷によるアシル CoA チオエステラーゼの発現変化. 日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月, 富山)
- ⑪ 藤田真理子, 中村美幸, 大友隆之, 高木充弘, 野水基義, 山田純司, ラット脂肪組織におけるアシル CoA チオエステラーゼの検出. 第 27 回日本肥満学会 (2006 年 10 月, 神戸)
- ⑫ 中村美幸, 藤田真理子, 大友隆之, 高木充弘, 野水基義, 山田純司, 高脂肪食負荷ラットにおけるアシル CoA チオエステラーゼの発現変化. 第 27 回日本肥満学会 (2006 年 10 月, 神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 純司 (YAMADA JUNJI)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60200721

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし