

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2007～2011

課題番号：19108002

研究課題名（和文）

脂肪細胞脂肪蓄積の分子基盤解明による抗メタボリックシンドローム研究

研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms of lipid accumulation in adipocytes for anti-metabolic syndrome

研究代表者

佐藤 隆一郎 (SATO RYUICHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50187259

研究成果の概要（和文）：

脂肪組織を構成する脂肪細胞はトリグリセリドを脂肪滴に蓄え、エネルギー必要時にはこれを分解して供給しています。脂肪滴への過度のトリグリセリド蓄積が肥満であり、メタボリックシンドロームの主原因となることから、脂肪滴形成の分子機構を明らかにする分子細胞生物学的解析を行いました。その結果、複数の新たな因子の機能を明らかにすることに成功し、また、脂肪細胞でのエネルギー産生を亢進する因子を活性化させる食品成分の探索系を構築し、抗肥満作用を持つ柑橘由来因子を見いだすことに成功しました。

研究成果の概要（英文）：

Adipocytes in adipose tissues store energy as triglycerides within lipid droplets and provide energy by degrading them when required. Excess storage of triglycerides in lipid droplets leads to obesity, which causes metabolic syndrome. To explore molecular mechanism of lipid droplet formation in adipocytes, molecular cell biological studies were carried out. We succeeded to identify a couple of novel factors that are deeply involved in lipid accumulation in adipocytes. Moreover, an assay system to evaluate the activity of food factors that increase energy expenditure in adipocytes was established. Using this system, a citrus limonoid was found to be a novel anti-obesity agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2008年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2009年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2010年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2011年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
総計	79,900,000	23,970,000	103,870,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：脂肪細胞、脂肪滴、トリグリセリド、メタボリックシンドローム、抗肥満、エネルギー

1. 研究開始当初の背景

高齢社会をすでに迎えた日本において、高齢者の全人口に閉める割合は20%を超えており、2015年までには25%を突破する勢いです。

高齢化に伴い、生活習慣病患者の増加、付随的な医療費の膨大化は避けがたい現実です。多くの生活習慣病高齢者を抱えた高齢社会では、医療費が社会経済を疲弊させ、活力ある

社会発展を期待できません。このような現実を少しでも改善する試みとして、食品機能を活用した健康維持、疾病予防が考えられます。食の活用は医療費高騰をもたらさず、逆に医療を必要とする患者数を減少させ医療費軽減への寄与が期待されます。

2005年には、予防医学的な見地からメタボリックシンドロームの診断基準が設けられ、内蔵脂肪の蓄積が種々の生活習慣病の原因として、第一の診断基準に挙げられています。内蔵脂肪組織から分泌される種々の活性因子が糖尿病、高血圧、高脂血症の引き金となることから、これを抑止する事が強く望まれています。肥満はエネルギー摂取過剰が脂肪細胞への脂肪蓄積を誘引した結果である事は周知の事実ですが、脂肪細胞内で脂肪滴がどのような機構で形成され、またその結果として種々の増悪因子を分泌亢進する機構に関する分子レベルでの解明は十分に行われていません。本研究課題では、脂肪細胞内での脂肪滴形成の分子基盤を明らかにし、それに伴う増悪因子の発現、分泌機構を発生工学的手法を駆使して実験動物レベルで解明し、さらにこれらを抑制する食品成分の探索系の樹立、ならびに食品因子の探索を行います。メタボリックシンドロームを誘発するどの経路のどの部位に食品成分が分子として作用するのかを、分子細胞生物学的手法により明らかにする、先端的食品科学研究を進展させる事も本研究の目的の一つと挙げられます。

2. 研究の目的

脂肪細胞内でPerilipin発現に呼応して脂肪滴が形成される分子機構の全容を明らかにする事を目標にしています。その解析により、種々の細胞内タンパク質の関与が明らかにされる事が予想されます。そして、脂肪滴形成プロセスに関与する細胞内因子は、すべて抗肥満の標的候補となり得ます。エネルギー余剰のシグナルがどのような経路を介して脂肪滴形成を促すのか、発生工学的手法をも駆使して、培養細胞レベル、個体レベルの双方から解析を進め、その複雑な機構を明らかにしていきます。さらに、そのような基礎知見に基づき、脂肪滴肥大化を抑制する活性を有する食品成分の評価系を構築し、活性因子の探索を試みます。基礎研究と応用研究を結びつけ、先端的食品科学研の潮流を創出する事を目指します。

3. 研究の方法

前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化過程において発現が亢進する核内受容体に着目し、その機能を追跡します。核内受容体

の多くは脂質リガンドを結合し、活性化される事から、脂肪細胞分化により細胞内でリガンド濃度が高まり、活性化した受容体が分化あるいは脂肪滴形成に関与する可能性が高くあります。このような核内受容体の一つとしてROR α に着目し、その機能解析を行ないました。脂肪細胞へと分化時に、レンチウイルス発現系を用い、ROR α 過剰状況下、あるいはshRNAを用いてノックダウン状況下で、分化進行、脂肪滴蓄積の変化を追跡しました。

また、脂肪細胞脂肪滴表面タンパク質Perilipin欠損マウスを用い、脂肪組織での遺伝子発現解析、脂肪組織より前駆脂肪細胞を調製し、これを脂肪細胞へと分化させ、脂肪滴形成が低下した状況下での分化の進行を追跡しました。同様に胎児より腺維芽細胞を分離し、シャーレ上で脂肪細胞へと分化させ、脂肪滴形成を解析しました。このような解析により、脂肪細胞内で脂肪滴表面タンパク質を介した脂肪滴形成の分子機構を明らかにすることを目指しました。

近年、褐色脂肪細胞に存在する胆汁酸受容体TGR5が胆汁酸結合を介して、細胞内で脂肪酸酸化上昇、熱産生亢進を導き、抗肥満作用を引き起こすことが明らかにされました。TGR5を抗メタボリックシンドロームの標的分子と定め、ヒト受容体をクローニングし、この受容体に胆汁酸と同様なりガンド活性を有する食品成分の探索系を構築し、その探索を行いました。また、活性成分である柑橘ノミリンを実験動物に投与し、抗肥満活性を評価しました。

4. 研究成果

(1) インスリンシグナルの下流に位置してそのシグナル伝達を軽減する作用が知られているTRB3タンパク質の脂肪細胞内での機能解析を行いました。脂肪細胞分化モデル細胞の3T3-L1を分化させると、TRB3は分化初期に発現低下するものの、その後上昇することが確認され、脂肪細胞分化時に何らかの機能を発揮していることが予想されました。そこで3T3-L1細胞にレンチウイルスを用い、TRB3を過剰発現させると分化が抑制され、脂肪滴蓄積の減少が見られました。一方、siRNAを用いてTRB3発現を抑制させると、分化は亢進しました。この作用点を明らかにすべく、分化のマスターレギュレーターであるPPAR γ へのTRB3の作用を解析したところ、阻害活性が見出されました。TRB3はPPAR γ にタンパク質-タンパク質結合をすることを、*in vitro*、*in vivo*で確認しました。以上の結果より、TRB3はPPAR γ 活性を負に制御することにより脂肪細胞分化を抑制する作用を

持つことが明らかとなりました。

(2) ApoC-III は、肝臓において合成され、VLDL の表面タンパク質として血中に分泌されます。これまで肝臓が主たる合成臓器と考えられてきましたが、脂肪細胞分化の過程で数百倍に発現が上昇する因子として、今回新たに見出しました。ApoC-III は分化に伴い、RXR リガンドにより発現の亢進が認められました。プロモーター解析の結果、RXR 応答配列が同定され、RXR がホモ二量体で作用することが示唆されました。発現量としては、肝臓、小腸に比べるとごく微量であり、脂肪組織周辺において機能することが想定されます。

(3) 脂肪細胞分化過程で発現上昇し、機能が期待される因子として核内受容体 ROR α に着目しました。ROR α は生理的なリガンドが不明であり、その機能も不確かな点が多い分子です。過剰発現、ノックダウン実験の結果、ROR α は分化を抑制する因子であることが判明しました。その機序は、PPAR γ によるペリリピン遺伝子発現抑制を介して脂肪滴形成を負に制御するものです。ROR α は肝臓においては、インスリン抵抗性を促す因子ですが、脂肪組織においては分化を負に制御し、脂肪滴蓄積を抑制するという、組織特異的な機能を発揮する因子であることが明らかになりました。

(4) Perilipin 欠損マウスより前駆脂肪細胞を調製し、シャーレ上で脂肪細胞へと分化させました。分化は野生型マウス由来の前駆脂肪細胞と同様に進行するものの、細胞内の脂肪滴のサイズは小さく、トリグリセリド蓄積も低値でした。同様に、胎児より MEF を調製し、同様にシャーレ上で脂肪細胞へと分化した際にも、野生型と比較し、同様の結果が得られました。Perilipin 欠損細胞では、Perilipin と同じく脂肪滴表面タンパク質ファミリーメンバーである ADRP が、脂肪滴の回りに結合してました。脂肪細胞分化過程において、ADRP により小型の脂肪滴形成が進行し、その後、Perilipin 遺伝子発現が亢進し、ADRP に入れ替わって脂肪滴表面に結合し、さらに脂肪滴サイズが大きくなることが明らかになりました。こうして脂肪滴表面から遊離した ADRP は速やかに分解を受けます。この2種類の脂肪滴表面タンパク質の役割分担、脂肪滴表面からの入れ替わりの分子機構などさらに解析を進めています。

Perilipin 欠損により脂肪細胞では、脂肪滴形成が十分に進行せず、小型の脂肪滴が形成されます。この際に、転写因子 SREBP-1 の

活性化が抑制されていることを明らかにしました。その結果、脂肪酸合成関連遺伝子発現が減少、脂肪滴形成が抑制される機構を明らかにしました。

(5) ヒト胆汁酸受容体 TGR5 を培養細胞に遺伝子導入し、発現させ、培地中に添加した化合物が結合すると、ルシフェラーゼ遺伝子発現が上昇する評価系を構築しました。食品に含まれる化合物（市販精製化合物）を約 160 種類集め、培地に添加し、TGR5 依存的にルシフェラーゼ活性を上昇させる因子を探索しました。その結果、内因性リガンド胆汁酸の1種類であるケノデオキシコール酸と同程度の活性を持つ、柑橘成分ノミリンを同定しました。柑橘に含まれるリモノイドのうち、ノミリン、オバキュノンには活性は認められたものの、それらの代謝変換化合物であるリモニンには活性は認められませんでした。高脂肪食にノミリンを 0.2% 添加し、マウスに 11 週間投与した所、顕著な体重増加抑制作用が見いだされました。血糖値、血中インスリン濃度も激減しました。従って、本評価系は、抗肥満、代謝改善効果を有する機能性食品成分探索に優れた評価系であると判断しました。

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 24 件)

[雑誌論文] (計 24 件)

(1) Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito N, and Nishimaki-Mogami T (2012) HNF4 α Increases Liver-Specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to Apolipoprotein A-I in Response to Cholesterol Depletion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32: 1005-1014. 査読有り

doi: 10.1161/ATVBAHA.111.238360

(2) Ono E, Inoue J, Hashidume T, Shimizu M, and Sato R (2011) Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410: 677-681. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.055> (3) Inoue J, Ito Y, Shimada S, Satoh S, Sasaki T, Hashidume T, Kamoshida Y,

Shimizu M, and Sato R (2011) Glutamine stimulates the gene expression and processing of sterol regulatory element-binding proteins, thereby increasing the expression of their target genes. *FEBS J.* 278; 2739-2750. 査読有り
doi: [10.1111/j.1742-4658.2011.08204.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08204.x)

(4) Inoue J, Yamasaki K, Ikeuchi E, Satoh, S, Fujiwara Y, Nishimaki-Mogami T, Shimizu M, and Sato R (2011) Identification of MIG12 as a mediator for stimulation of lipogenesis by LXR activation. *Mol. Endocrinol.* 25; 995-1005. 査読有り

doi: [10.1210/me.2011-0070](https://doi.org/10.1210/me.2011-0070)

(5) Hatori M, Hirota T, Iitsuka M, Kurabayashi N, Haraguchi S, Kokame K, Sato R, Nakai A, Miyata T, Tsutsui K, and Fukada Y (2011) Light-dependent and circadian clock-regulated activation of sterol regulatory element-binding protein, X-box-binding protein 1, and heat shock factor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108; 4864-4869. 査読有り

doi: [10.1073/pnas.1015959108](https://doi.org/10.1073/pnas.1015959108)

(6) Takahashi Y, Shinoda A, Inoue J, and Sato R (2010) The gene expression of the myocardial lipid droplet protein is highly regulated by PPARgamma in adipocytes differentiated from MEFs or SVCs.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 399; 209-214. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.056>

(7) Horiba T, Nishimura I, Nakai Y, Abe K, and Sato R (2010) Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323; 208-214. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.03.020>

(8) Irisawa M, Inoue J, Ozawa N, Mori K and Sato R (2009) The sterol-sensing ER membrane protein TRC8 hampers ER-to-Golgi transport of SREBP-2/SCAP and reduces SREBP-2 cleavage. *J. Biol. Chem.* 284; 28995-29004. 査読有り

doi: [10.1074/jbc.M109.041376](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041376)

(9) Ohoka N, Kato S, Takahashi Y, Hayashi H, and Sato R. (2009) The orphan nuclear receptor RORα restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBPβ activity and perilipin gene expression. *Mol Endocrinol.* 23; 759-771. 査読有り

doi: [10.1210/me.2008-0277](https://doi.org/10.1210/me.2008-0277)

(10) Takahashi Y, Inoue J, Kagechika H and Sato R (2009) ApoC-III gene expression is sharply increased during

adipogenesis and is augmented by retinoid X receptor (RXR) agonists. *FEBS Lett.* 583; 493-497. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.050>

(11) Inoue J, Satoh S, Kita M, Nakahara M, Hachimura S, Miyata M, Nishimaki-Mogami T and Sato R (2008) PPARα gene expression is up-regulated by LXR and PXR activators in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371; 675-678. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.100>

(12) Arito M, Horiba T, Hachimura S, Inoue J and Sato R (2008) Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 283; 15224-15231. 査読有り

doi: [10.1074/jbc.M800910200](https://doi.org/10.1074/jbc.M800910200)

(13) Takahashi Y, Ohoka N, Hayashi H and Sato R (2008) TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARγ transcriptional activity. *J. Lipid Res.* 49; 880-892. 査読有り

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.056>

[学会発表] (計 34 件)

(1) 井原 悠介、神田 美里、篠田旭弘、Shimizu Makoto、井上 順、佐藤 隆一郎 Bcl11b による脂肪細胞分化制御機構の解析 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012. 3. 22-26 京都

(2) 井上 順、山崎 康平、池内 江美奈、宮田 慎吾、佐藤 伸一、清水 誠、佐藤 隆一郎 新規 LXR 応答遺伝子の探索と機能解析 第 84 回日本生化学会大会 2011. 9. 21-24, 京都

(3) 篠田 旭弘、高橋 裕、井上 順、佐藤 隆一郎 脂肪細胞内脂肪滴形成による SREBP-1 プロセッシング促進 第 84 回日本生化学会大会 2011. 9. 21-24, 京都

(4) 井上 順、佐藤 隆一郎 脂肪細胞における脂肪蓄積によるエネルギー代謝制御 第 64 回 日本栄養・食糧学会 2010 年 5 月 22 日, 徳島

(5) 篠田 旭弘、高橋 裕、渡辺 英里、古屋 徳彦、八村 敏志、井上 順、佐藤 隆一郎 脂肪細胞分化過程における脂肪滴局在タンパク質 ADRP の機能解析 第 31 回 日本分子生物学会年会/第 81 回 日本生化学会大会 2008. 12-9-12. 12 京都

(6) 高橋 裕、金山 知彦、井上 順、佐藤 隆一郎 脂肪細胞分化過程に伴うアポリポ

タンパク質 apoC-IIIの発現誘導機構 第31回
日本分子生物学会年会/第81回 日本生化学
会大会 2008.12-9-12.12 京都

(7) 伊藤 友香、島田 聡子、佐藤 伸一、
八村 敏志、井上 順、佐藤 隆一郎 グル
タミンによる脂質代謝関連遺伝子調節因子
SREBPの活性化機構の解明 第62回日本栄
養・食糧学会大会 2008.5.2-4 埼玉

東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師
研究者番号：70323962

〔図書〕(計1件)

「生活習慣病の分子生物学」佐藤 隆一郎・
今川 正良 共著 三共出版 2007年
156頁

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：TGR5 作動剤
発明者：佐藤 隆一郎・井上 順・小野 絵
里
権利者：同上
種類：特許
番号：P03102205
出願年月日：2010年5月20日
国内外の別：国内

名称：TGR5 作動剤
発明者：佐藤 隆一郎・井上 順・橋本 修
造・清水 誠・中村 明朗
権利者：同上
種類：特許
番号：201202027
出願年月日：2012年2月27日
国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/food-biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆一郎 (SATO RYUICHIRO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：50187259

(2) 研究分担者

井上 順 (INOUE JUN)

