

## 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6月1日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580163

研究課題名（和文） 細胞内脂肪酸組成の変化とインシュリン分泌酵素の分解制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Research on correlations between the intracellular composition of fatty acids and the protein degradation machinery of insulin secretion-related enzymes.

研究代表者

安藤 秀哉（ANDO HIDEYA）

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：60454493

研究成果の概要（和文）：培養マウス膵β細胞（MIN6細胞）のインシュリン分泌作用に及ぼす細胞内脂肪酸組成の影響を評価した。同じモル濃度の各種不飽和脂肪酸を培養液中に添加すると、オレイン酸、リノール酸、αリノレン酸の順に、MIN6細胞のインシュリン分泌が促進された。一方、これらの脂肪酸をそれぞれ72時間処理すると細胞内脂肪酸組成が変化し、同様な条件下で、αリノレン酸、リノール酸、オレイン酸の順にインシュリン分泌が促進された。これらの結果より、MIN6細胞のインシュリン分泌作用が、細胞内脂肪酸組成の変化に影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The effects of alterations of the intracellular composition of fatty acids on insulin secretion by cultured murine pancreatic β cells (MIN6 cells) was evaluated. The insulin secretion from MIN6 cells was enhanced most efficiently by oleic acid, followed by linoleic acid and α-linolenic acid, when each fatty acid was treated transiently at the same molar concentration. On the other hand, preincubation with each fatty acid for 72 hr in advance changed the intracellular composition of fatty acids and the most efficient effect of insulin secretion under this condition was elicited by α-linolenic acid. These results suggest that the insulin secreting activity of cultured MIN6 cells is affected by the intracellular composition of fatty acids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：酵素・細胞・組織・脂質・蛋白質分解・糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 不飽和脂肪酸が膵β細胞のインシュリン分泌を促進する作用をもつことは知られているが、細胞内脂肪酸組成の変化がインシュリン分泌作用にどのような影響を及ぼす

かは知られていない。

(2) 遊離脂肪酸がタンパク質の選択的分解に働く酵素のユビキチン化を制御する作用をもつことは知られているが、遊離脂肪酸が

ユビキチン・プロテアソームシステムで分解を受けるインシュリン分泌酵素のユビキチン化にどのような影響を及ぼすかは知られていない。

## 2. 研究の目的

(1) 膵β細胞の細胞内脂肪酸組成の変化が、インシュリン分泌作用にどのような影響を及ぼすか、系列の異なる不飽和脂肪酸を用いて、明らかにする。

(2) 膵β細胞のユビキチン化インシュリン分泌酵素の分解が、遊離脂肪酸にどのような影響を受けるか、明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 培養マウス膵β細胞 (MIN6 細胞) の培養液 (High glucose: 4500 mg/mL) に 25 μM のオレイン酸 (n-9 系)、リノール酸 (n-6 系)、及び α リノレン酸 (n-3 系) を添加し、添加 2 時間後に培養液中に放出されたインシュリン量を ELISA 法にて定量した。一方、同濃度の 3 系列の不飽和脂肪酸をそれぞれ 72 時間前処理した MIN6 細胞の細胞内脂肪酸組成を HPLC により分析し、不飽和脂肪酸処理前の組成と比較した。また、不飽和脂肪酸処理で細胞内脂肪酸組成が変化した MIN6 細胞に再度 25 μM のオレイン酸、リノール酸、α リノレン酸を処理し、その 2 時間後に培養液中に放出されたインシュリンの量を ELISA 法にて定量した。

(2) 不飽和脂肪酸未処理の MIN6 細胞と各種不飽和脂肪酸を 72 時間前処理した MIN6 細胞のユビキチン化タンパク質をウェスタンブロットリング法により検出し、不飽和脂肪酸によるインシュリン分泌酵素のユビキチン化の増減評価を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 25 μM のオレイン酸 (OA)、リノール酸 (LA)、もしくは α リノレン酸 (LNA) を 2 時間処理した培養 MIN6 細胞では、いずれもコントロール (ctrl) と比較してインシュリン分泌促進作用が認められ、その作用はオレイン酸が最も強かった。また、リノール酸と α リノレン酸はほぼ同等の促進作用を示した (図 1)。

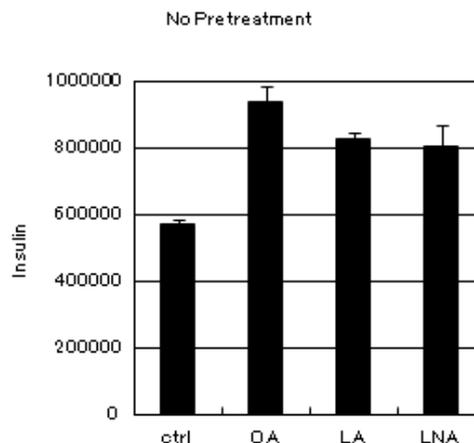


図 1. 各種遊離脂肪酸の培養液中インシュリン濃度に与える影響 (前処理なし)

25 μM のオレイン酸 (OA)、リノール酸 (LA)、もしくは α リノレン酸 (LNA) で 72 時間前処理した培養 MIN6 細胞を、培地交換してそれぞれ 3 種類の遊離脂肪酸 (25 μM) でさらに 2 時間処理したところ、いずれもコントロール (図 1 ctrl) と比較してインシュリン分泌促進作用が認められた。また、その作用はどの遊離脂肪酸を前処理した場合も、α リノレン酸が最も強かった (図 2)。

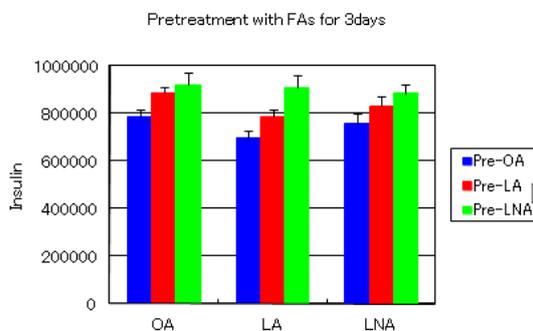


図 2. 各種遊離脂肪酸の培養液中インシュリン濃度に与える影響 (72 時間前処理あり)

25 μM のオレイン酸 (OA)、リノール酸 (LA)、もしくは α リノレン酸 (LNA) を 72 時間前処理した培養 MIN6 細胞の細胞内脂肪酸組成を分析したところ、オレイン酸処理では脂肪酸未処理のコントロールとほぼ同等な組成であったが、リノール酸処理ではオレイン酸が減少し、リノール酸とアラキドン酸 (AA) が増加した。また、α リノレン酸処理ではオレイン酸が減少し、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が増加

した (図3)。

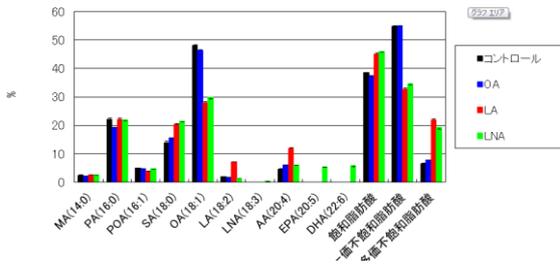


図3. 各種遊離脂肪酸 72 時間処理後の細胞内脂肪酸組成

これらの結果より、培養臍β細胞のインシュリン分泌機構は、細胞内脂肪酸組成の影響を受けることが示唆された。

(2) 不飽和脂肪酸処理の前後における MIN6 細胞のユビキチン化の変化の検出を試みた。しかしながら、かつてわれわれが実施したメラノーマ細胞におけるユビキチン化タンパク質の検出条件では、良好な結果が得られなかった。これはユビキチン化タンパク質を検出するために必要なプロテアソーム阻害剤の細胞毒性がメラノーマ細胞と MIN6 細胞では異なり、MIN6 細胞に大きなダメージを与えることなくユビキチン化タンパク質の分解を阻止することができなかったことによると考えられた。

### 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7件)

- ① Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui M, Yarosh D, Ichihashi M. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake and dispersion. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読有, Vol.132, 2012, pp. 1222-1229
- ② Niki Y, Yoshida M, Ando H, Wakamatsu K, Ito S, Harada N, Matsui M, Yarosh D, Ichihashi M. 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane inhibits melanin synthesis by dual mechanisms. *Journal of Dermatological Science*, 査読有, Vol. 63, 2011, pp.115-121
- ③ Ando H, Niki Y, Yoshida M, Ito M, Akiyama K, Kim J, Yoon T, Matsui M,

Yarosh D, Ichihashi M. Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. *Cellular Logistics*, 査読有, Vol.1, 2011, pp.12-20

- ④ Ando H, Matsui M, Ichihashi M. Quasi-drugs developed in Japan for the prevention or treatment of hyperpigmentary disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, Vol.11, 2010, pp. 2566-2575
- ⑤ Kim J, Sohn K, Choi T, Kim M, Ando H, Choi S, Kim S, Lee Y, Lee J, Kim C, Yoon T.  $\beta$ -catenin regulates melanocyte dendricity through the modulation of PKC  $\zeta$  and PKC  $\delta$ . *Pigment Cell and Melanoma Research*, 査読有, Vol. 23, 2010, pp. 385-393
- ⑥ Ando H, Niki Y, Yoshida M, Ito M, Akiyama K, Kim J, Yoon T, Lee J, Matsui M, Ichihashi M. Keratinocytes in culture accumulate phagocytosed melanosomes in the perinuclear area. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 査読有, Vol.23, 2010, pp.129-133
- ⑦ Ando H, Ichihashi M, Hearing V. Role of the ubiquitin proteasome system in regulating skin pigmentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, Vol.10, 2009, pp. 4428-4434

[学会発表] (計6件)

- ① 安藤秀哉、市橋正光. 紫外線による皮膚の色素沈着メカニズムについて. 第11回日本抗加齢医学会総会. 2011年5月27日. 国立京都国際会館
- ② 安藤秀哉、福島光夫、高橋良寿、今井緑、寺師浩人、清野進、市橋正光. 培養臍β細胞のインスリン分泌作用に及ぼす長時間遊離脂肪酸処理の影響. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011年5月19日. さっぽろ芸術文化の館
- ③ Ando H. Skin lightening quasi-drugs from the present into the future. 6<sup>th</sup> Healthy-Beauty Bio-Industry Symposium. 2010年12月10日. Jeju Island, Korea
- ④ 安藤秀哉、仁木洋子、吉田雅紀、Matsui M, Yarosh D、市橋正光. 新規メラノソームトランスファーメカニズムの解明: 多数のメラノソームを包含した膜小胞の発見. 第10回日本抗加齢医学会総会. 2010年6月12日. 国立京都国際会館
- ⑤ Ando H, Niki Y, Yoshida M, Matsui M, Ichihashi M. A new proposal for the

evaluation method of melanosome transfer in respect to melanosome uptake by keratinocyte phagocytosis. 22<sup>nd</sup> Annual meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research. 2009年12月5日. Fukuoka, Japan

- ⑥ Ando H, Ichihashi M, Hearing VJ. Inhibition of melanin synthesis via modification of tyrosinase function. 3<sup>rd</sup> Conference of the Asian Society for Pigment Cell Research. 2009年6月13日. Seoul, Korea

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 秀哉 (ANDO HIDEYA)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号：60454493