

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：34423

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11663

研究課題名（和文）生活習慣病発症における脂肪酸結合タンパク質の内分泌因子としての働き

研究課題名（英文）The Role of Fatty Acid Binding Proteins as Endocrine Factors in the Development of Lifestyle-Related Diseases

研究代表者

楠堂 達也（KUSUDO, Tatsuya）

帝塚山学院大学・食環境学部・教授

研究者番号：00460535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：FABPsは細胞内タンパク質と考えられてきた。本研究ではFABP1とFABP3に焦点を当て、細胞への添加実験や動物への投与実験により、FABPsの内分泌因子としての働きについて検討した。その結果、FABP1に細胞増殖抑制作用があること、及び脂肪細胞の分化に影響を与えることが示された。また、FABP1は骨格筋のモデル細胞であるC2C12のインスリン応答性を増強する可能性が示された。さらに、動物への投与実験の結果から、FABP3が糖代謝に影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FABPsは、細胞内での脂溶性分子の輸送体として、代謝、酵素活性、転写制御などに関与している。これまで、FABPsは、細胞内タンパク質と考えられてきたが、FABP4が内分泌因子として作用することが報告され、考えを改める必要が出てきている。本研究では、FABPsの内分泌因子としての働きについて検討し、FABP1やFABP3も内分泌因子としての作用を有することを示した。本研究成果は、FABPsに内分泌因子としての新しい視点をもたらすという学術的意義は勿論であるが、今後、内分泌因子としての研究が発展することにより、その機能を応用した薬剤・機能性食品の開発など、広く社会に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：FABPs have been considered intracellular proteins. This study focused on FABP1 and FABP3 and investigated their functions as endocrine factors. The results showed that FABP1 inhibits cell proliferation and influences adipocyte differentiation. It was also shown that FABP1 may enhance the insulin responsiveness in C2C12 skeletal muscle cells. Furthermore, the results of animal studies suggest that FABP3 influences glucose metabolism.

研究分野：栄養生化学

キーワード：FABP 脂肪酸結合タンパク質 発現精製 細胞外生理作用 内分泌因子

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸などの脂溶性分子は生体内におけるエネルギー源やシグナル分子として様々な役割を担っている。しかし、脂溶性分子は、生体内において遊離した状態では殆ど存在できず、体内循環や、細胞内への取り込み、輸送、代謝にはアルブミンや脂肪酸結合タンパク質(Fatty Acid Binding Proteins; FABPs)などの脂質輸送タンパク質が重要な役割を果たしている。FABPsは脂溶性分子に対して高いアフィニティーを持つ14-15 kDaの小型の細胞内タンパク質であり、脂溶性分子の各細胞小器官や酵素への輸送を担うことから、細胞内代謝、酵素活性、及び転写制御などに広く関与することが明らかとなっている。また、個体レベルにおいても、肥満、動脈硬化などの生活習慣病をはじめ、統合失調症や自閉症などの精神疾患や高次脳機能にまで影響することが報告されている。

FABPsは少なくとも9種類が同定されており、ほぼ組織特異的な発現を示す。アミノ酸配列中に分泌シグナルを持たないFABPsは細胞内タンパク質として扱われ、各組織内でのみ働くと考えられてきた。実際、細胞内のFABPsは細胞障害の際には血液中に逸脱することから、臓器障害や病態を反映するバイオマーカーとして用いられている。しかし、FABP4が内分泌因子としてホルモン様に働き、肝糖新生、インスリン分泌、インスリン抵抗性に関与していることが報告され、考えを改める必要が生じてきている。

研究代表者は肝臓型FABPであるFABP1や心臓型FABPであるFABP3を対象とし、肥満や生活習慣病の発症に果たす役割について検討してきた(BBRC. 2008、Genes to Cells. 2011、FEBS Lett. 2015、FEBS Open bio. 2017)。FABP1、及びFABP3の血中濃度はFABP4に次いで高いことから、研究代表者は、これらもFABP4と同様に内分泌因子として働いているのではないかと考えるに至った。研究開始当初において、これらの分子が内分泌因子として働くことを示す報告はなかった。

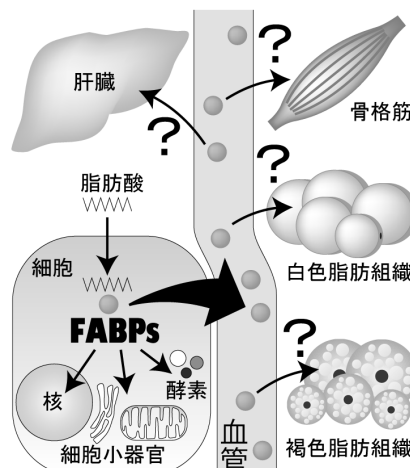


図1 FABPsの内分泌因子としての働き

2. 研究の目的

FABPsは細胞内での脂溶性分子の輸送体として、細胞内でのみ機能すると考えられてきた。しかし、FABPファミリーの1つであるFABP4が内分泌因子として作用していることが報告され、従来からの考えを改める必要性が出てきている。本研究は、FABP1とFABP3に焦点を当て、その内分泌因子としての働きを明らかにすることを目的とする。FABPsは様々な疾患に関与していることが報告されていることから、本研究成果は、FABPsに内分泌因子としての新しい視点をもたらすだけでなく、その機能を応用した創薬・機能性食品開発のターゲット分子を提供することにより、広く社会に貢献できると期待される。

3. 研究の方法

・FABP1、3の発現と精製

マウスcDNAよりFABP1、3をクローニングし、シーケンスにより配列を確認した。これらをpET発現ベクターに連結し、大腸菌にて発現させた。菌体を回収し、硫酸分画(40-70%)を行った後、クロマトグラフィーに供した。FABP1の精製にはHiPrepQ、HiPrepS、Sephacryl S-200を用いた。FABP3の精製にはHiPrepQ、Sephacryl S-200を用いた。シングルバンドにまで精製した後、リガンド結合部位に結合している脂質を除くためにLipidex-1000に供した。

・細胞培養

脂肪細胞のモデルである3T3-L1細胞は10%FCS含有DMEM培地を用いて培養し、分化誘導には10%FBS含有DMEM培地にDex、IBMX、インスリンを添加し行った。筋肉細胞のモデルであるC2C12細胞は、10%FBS含有DMEM培地で培養し、分化誘導には2%馬血清を用いた。褐色脂肪細胞のモデルであるC3H10T1/2細胞は、10%FBS含有DMEM培地を用いて培養し、分化誘導は培地にDex、IBMX、インスリン、T3、インドメタシンを添加し実施した。

・動物実験

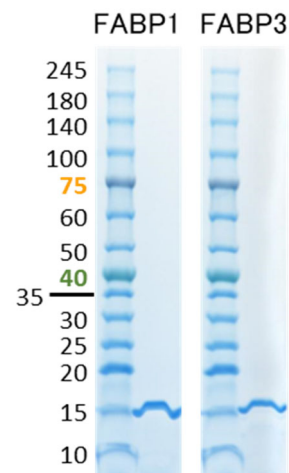
実験動物にはC57BL/6J(雄)マウス用い、自由摂食、自由飲水の条件下で飼育した。通常食としてCE-2(日本クレア)、超高脂肪食としてD12492(RESEARCH DIETS)を使用した。

本研究における動物実験、及び遺伝子組換え実験は、帝塚山学院大学の動物実験委員会、及び組換えDNA実験安全委員会の承認を受けその規定に従って行った。

4. 研究成果

(1) FABP1、3 発現系の構築と精製

研究開始時において、研究代表者らは His タグのついた FABP1、3 の発現・精製系を確立していた。しかし、本研究においては、His タグ自体が生理作用や細胞取り込みに影響する可能性が否定できない。そこで、タグの無い FABP1、3 の発現系、及び精製系の構築を行った。大腸菌発現ベクター pET-21 から His タグ部分を取り除いた pET-21(Δ His) を作製し、マウス FABP1、3 遺伝子を繋いだ。作製したベクターを大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し、発現を誘導した所、FABP3 は発現したが、FABP1 は発現が見られなかった。そこで、FABP1 を発現させるために、大腸菌発現ベクター (3 種類)、宿主大腸菌 (4 種類)、培養温度 (25°C、37°C) を組合せ、検討を行った。その結果、検討した 1 つの組合せにおいて、FABP1 の発現が見られた。発現させた FABP1、3 を硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いてシングルバンドにまで精製した (右図)。FABPs は脂質結合能を有するタンパク質であることから、発現、精製時にリガンド結合部位に脂質が結合している可能性がある。そこで、脂質を除去するために Lipidex-1000 に供し、以下の実験に用いた。



(2) FABPs の細胞外生理作用の検討

FABPs の細胞外生理作用を検討するために、脂肪細胞のモデルである 3T3-L1 細胞、筋肉細胞のモデルである C2C12 細胞、褐色脂肪細胞のモデルである C3H10T1/2 細胞を用いて、FABP1、及び FABP3 の添加実験を行った。

(2)-1 3T3-L1 細胞に対する細胞外生理作用

未分化な 3T3-L1 細胞に FABP1 を添加し 24 時間後に細胞増殖/細胞毒性アッセイを行った所、濃度依存的な増殖抑制効果 (あるいは細胞毒性) が見られた。この効果は、分化した 3T3-L1 細胞に対しては見られなかったことから、毒性効果ではなく、増殖抑制効果であると考えられた。次に脂肪分化に対する影響を検討するために、分化期間中 FABP1 を持続的に添加した。FABP1 の添加は分化率や油滴のサイズに影響しなかった。分化マーカーの発現を検討した所、分化 2 日目において *Cebpa*、*Ppar γ* の有意な上昇が認められたが、分化 6 日目の時点では分化マーカーの発現に差は認められなかった。以上のことから、FABP1 は細胞外から作用し、前駆脂肪細胞の増殖、及び分化初期に影響する可能性が示された。FABP3 については、FABP1 でみられた増殖、及び分化初期への影響は見られなかった。

(2)-2 FABP1 の C2C12 細胞に対する細胞外生理作用

FABP1 は 3T3-L1 細胞と同様、未分化な C2C12 細胞に対する細胞増殖/細胞毒性作用を示した。この効果は、分化した C2C12 細胞には見られなかった。筋分化に対する影響を検討するために、分化期間中 FABP1 を持続的に添加した。FABP1 の添加は分化率や筋線維の太さに影響しなかった。分化マーカーである *MyoG*、*MyoD* の発現に変化は見られなかったことから、FABP1 は筋分化には影響しないと考えられた。また、糖代謝への影響を検討するために、インスリン応答性を検討した。分化した C2C12 細胞に対して FABP1 を添加し、24 時間後にインスリン刺激を行った。インスリン応答の指標となる Akt のリン酸化をウエスタンブロッティングにより確認した所、FABP1 の濃度依存的に Akt のリン酸化は上昇した。このことから、FABP1 には C2C12 細胞のインスリン感受性を増強させる作用があることが示唆された。FABP3 については、このような作用は見られなかった。

(2)-3 C3H10T1/2 細胞に対する細胞外生理作用

褐色脂肪分化への影響を検討するために、C3H10T1/2 細胞に FABP1、3 を添加し、分化誘導を行った。分化期間中も FABP1、3 を持続的に添加し、分化 7 日目に褐色脂肪マーカーである *Ucp1* の発現量を測定した。その結果、*Ucp1* 発現量に変化は見られなかった。従って、FABP1、3 は褐色脂肪分化には影響しないと考えられた。

(2) 動物実験

生活習慣病の形成と、FABP1、3 の関連を検討するために、肥満時における血中 FABPs 濃度を検討した。通常食、及び高脂肪食にて 4 カ月間飼育したマウスより血清を調製し、ウエスタンブロッティングにより血中 FABP1、3 濃度を解析した。その結果、血中 FABP1 濃度は肥満マウスで上昇していたのに対して、血中 FABP3 濃度は肥満において低下していることが明らかとなった。このことから、肥満に伴う FABPs 濃度の変化が生活習慣病の病態形成に何らかの関係があることが示唆された。そこで、肥満の形成における血中 FABPs の生理的役割を明らかにするために、食事誘導性肥満マウスを作製し、FABP1、3 タンパク質の投与実験を実施した。FABPs を 2 日おきに投与し、2 週間後にグルコース負荷試験を実施した。FABP3 投与マウスにおいては、耐糖能に低下傾向が認められた。一方、FABP1 の投与は、耐糖能に影響しなかった。投与 3 週間後に解剖し解析した所、体重、組織重量 (脂肪、肝臓、筋肉)、及び血中脂質量に変化は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 楠堂 達也	4. 巻 61
2. 論文標題 小さな運び屋, 脂肪酸結合タンパク質の可能性 -FABPsによる細胞機能制御-	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 220-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.61.220	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楠堂達也、向井貴子
2. 発表標題 脂肪酸結合タンパク質の細胞外生理作用の探索
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022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	向井 貴子 (MUKAI Takako) (60701464)	帝塚山学院大学・人間科学部・助手 (34423)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------