

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580385

研究課題名(和文) 肝臓に発現する新規リポ蛋白レセプター(LRP12)の機能解析 - 脂質代謝制御基盤 -

研究課題名(英文) Characterization of a novel lipoprotein receptor (LRP12) in chicken liver –The basic knowledge for lipid metabolism -

研究代表者

佐藤 幹 (Kan, Sato)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20250730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニワトリのLDL receptor related protein 12 (LRP12)の機能を解析し、卵および肉の生産の効率化に利用する基礎となる研究を行った。LRP12は肝臓に多く発現しており、LRP12がリポ蛋白の取り込み能力があること、肝臓におけるリポ蛋白取り込みの主要な因子であることを証明した。さらに、LRP12はその発現が栄養の影響を受けないことが明らかとなった。よって、LRP12は産卵期に特徴的な血中の多量な脂質の酸化を防ぐために機能しているものと推測された。

研究成果の概要(英文)：In present study, the function of LDL receptor related protein 12 (LRP12), a novel lipoprotein receptor in chickens, was characterized, and it is possible to utilize as the improvement in efficiency of the egg and meat production in chickens. LRP12 gene expression was high in liver of laying hens. Chicken LRP12 is the molecule for the uptake of LDL into cells, and it is a master regulator of lipoprotein uptake in chicken liver. In addition, LRP12 is characterized that the gene expression and lipoprotein uptake were no changed by the intracellular cholesterol concentrations of cells, and it plays the important role for the lipid recycling of liver-blood lipid-liver in chickens.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：ニワトリ 肝臓 リポ蛋白 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 21 世紀における世界人口の増加と食生活の多様化が進む中、高品質の畜産食品（特に食肉）を安全、効率的、かつ家畜を健康に生産する技術体系の確立が要請されている。特に、近年における穀物価格の高騰に対応するためには、少ない飼料資源を有効に活用し、より効率的に生産性を向上させなければいけない。この要請に応えて、飼料エネルギーの損失となる無駄な脂肪（廃棄脂肪）の蓄積を抑制するために、家畜・家禽の脂質代謝調節を担う遺伝子群の機能解析をベースとした生産技術の科学的基盤を構築することは「畜産学」の重大な使命である。

(2) 本研究の主題である LRP12 は、申請者がニワトリの肝臓からその存在を発見した分子であり(Matsuyama, Sato et al., BBA, 2005)、哺乳動物のゲノム上にその配列が発見されているもの(Garnis et al. Oncogene, 2004)、哺乳動物においても依然その機能が不明な分子である。

2. 研究の目的

脂肪の過剰蓄積(脂肪組織・肝臓)は、ヒト、そして家畜・家禽の脂質代謝異常を引き起こす代謝障害であり、その発現機序の解明と具体的な抑制法の開発が望まれている。申請者らは、家禽の脂質代謝の解明を先進的に進め(Sato et al., 1995,1999)、脂質代謝の中枢を担う新たな分子(リポ蛋白レセプター; LDL receptor related protein 12 (LRP12))を肝臓で発見した(Matsuyama, Sato et al., BBA, 2005)。本研究では、家禽肝臓における LRP12 の機能を解析し、その代謝的役割を同定することにより、「脂質代謝の解明とその制御→無駄な飼料エネルギーの節約と脂質代謝障害の予防」という効率的畜産

物生産の技術基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 申請者は発見した新たな分子の部分アミノ酸配列を基に、ニワトリ肝臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、すでにヒト LRP12 と相同性の高い分子をクローニングした。しかし、クローニングした配列は、ニワトリゲノムから推定された配列より 5'側の配列が 300bp 短く、N 末端側から約 100 アミノ酸残基短い。しかも、ゲノムから推定された 5'末端の遺伝子配列を Primer とした RT-PCR を行っても、遺伝子の増幅は認められなかった。そこで、真の転写配列を明らかにするために、5'-RACE や Random primer を用いた RT-PCR を行い、ニワトリ LRP12 転写配列を同定する。

(2) LRP12 のニワトリの脂質代謝における重要性の確認と代謝的意義を推定するため、遺伝子および蛋白質の発現を、組織分布および産卵や成長に伴う変動を明らかにする。

(3) ニワトリより分離したリポ蛋白を DiI で蛍光ラベルして、ニワトリ LRP12 発現細胞 (CHO-K1) におけるリポ蛋白の取り込みを実証する。さらに、取り込むリポ蛋白の種類 (VLDL, LDL, remnant) を同定する。

(4) ニワトリ肝臓には他のリポ蛋白レセプターも発現している。そこで、LDL receptor、LRP1 を siRNA を用いて knockdown した場合、あるいは LRP12 を knockdown した場合のリポ蛋白の取り込みを、前述の DiI ラベルリポ蛋白で明らかにし、肝臓におけるリポ蛋白の取り込みにおける LRP12 の重要性を実証する。また、LRP12 の細胞内分布を免疫染色により明らかにする。

(5) LRP12 の転写活性を制御する栄養素(アミノ酸やビタミンを想定している)を飼料に添加し、肝臓 LRP12 発現量、血中脂質濃度、脂肪蓄積を測定するとともに、本分子の代謝的意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 5'-RACE や Random primer を用いた RT-PCR などの様々な手法を用いて、真の配列を同定したところ、ニワトリ LRP12 の真の転写配列は、ヒトの配列やニワトリゲノムから推定された配列より、5'側の配列が 300bp 短く、N 末端側から約 100 アミノ酸残基短いことが明らかとなった。

次に、大腸菌発現ベクターおよび哺乳動物細胞発現ベクターにこの配列を組み込み、リコンビナントタンパク質を作成し、抗体を作成した。作成した抗体は、約 95kDa のタンパク質を認識し、これは、アミノ酸配列から推定された分子量より大きかった。よって、細胞内で糖鎖の付加がされている可能性が推察された。そこで、LRP12 タンパク質を各種クロマトグラフィーにより精製し、糖鎖を染色する PAS 染色を行うことにより糖鎖の付加を確認した。

(2) LRP12 のニワトリの脂質代謝における重要性の確認と代謝的意義を推定するため、遺伝子発現を解析し、肝臓に特に多く発現していること(図 1)、そして産卵期の肝臓では発現が亢進することを確認した。

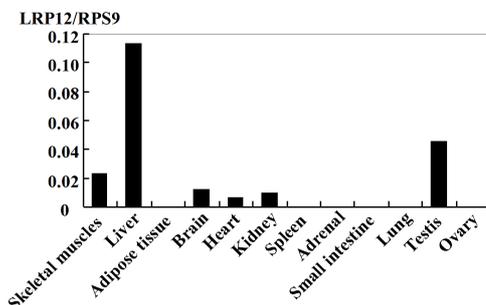


図 1 LRP12 発現の組織分布

(3) ニワトリ LRP12 の全長配列を pIND-V5-His にコンストラクトし、CHO-K1 細胞に導入して、ニワトリ LRP12 発現細胞を確立した。次に、ニワトリより分離したリポ蛋白質(LDL)を DiI で蛍光ラベルして、ニワトリ LRP12 発現細胞と非発現細胞の培地に添加したところ、ニワトリ LRP12 発現細胞で蛍光 LDL の取り込みが認められた(図 2)。よって、特殊な構造を持つニワトリ LRP12 が、LDL 受容体として機能していることをはじめて明らかにした。LRP12 の取り込むリポ蛋白質の種類(VLDL, LDL, remnant)を同様の実験条件で検討したところ、LDL だけではなく、remnant や卵黄前駆物質である VLDL も取り込むことが明らかとなった。よって、ニワトリ LRP12 はマルチリポ蛋白レセプターとして機能している可能性が示唆された。

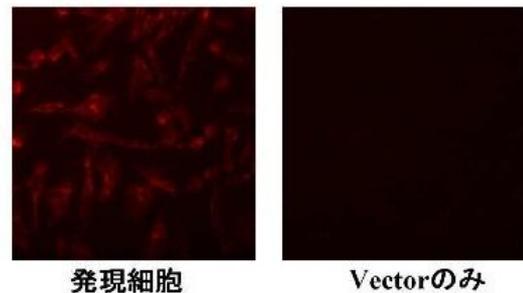


図 2 LRP12 発現細胞におけるニワトリ LDL の取り込み

(4) ニワトリ初代肝細胞を用いて、LDL receptor、LRP1 の siRNA を用いて knockdown した場合、あるいは LRP12 を knockdown した場合のリポ蛋白質の取り込みを、前述の DiI ラベル LDL を用いて検討したところ(図 3)、肝臓における LDL の取り込みには、LRP12 が大きくかかわっており、LRP12 のニワトリ肝臓における重要性を実証した。

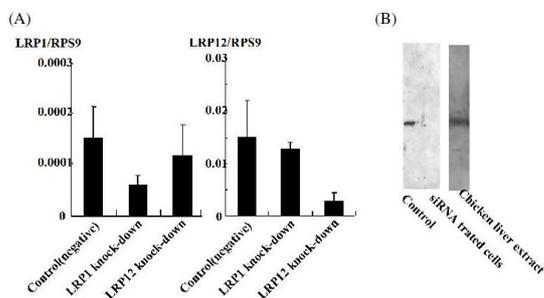


図3 LRP12のニワトリ初代肝細胞におけるノックダウン

(A)は遺伝子発現、(B)は蛋白質発現を示す。

(5) 実験系を用いて本レセプターの発現を制御する栄養素、あるいはホルモンを検索したが、本レセプターは他のリポ蛋白レセプターとは異なり、コレステロールなど栄養素、およびインスリンなどのホルモンに影響を受けないことが明らかとなった。そこで、LRP12の発現が産卵期に増加することに着目して、その代謝的意義を明らかにすることを試みた。その結果、LRP12は産卵期に特徴的な血中の多量な脂質の酸化を防ぐために発現がかわらず、肝臓→血中脂質→肝臓の脂質リサイクリングに重要な役割を果たしているものと推測された。

(6)結論：

本研究では、ニワトリのLDL receptor related protein 12の機能を解析し、卵および肉の生産の効率化に利用する基礎となる研究を行った。本研究で明らかにしたニワトリLRP12の構造的な特徴とその代謝的特異性は、これまでに発見されていない鳥類における卵を産生する特異的な脂質代謝の特徴とその維持機構を良く説明しているものと考えられる。すなわち、ニワトリの産卵期には、卵黄脂質を輸送するために、血中脂質濃度が大きく増加する。ヒトなどの哺乳類では、同様の脂質濃度であれば間違いなく動脈硬化や心疾患を直ちに引き起こす濃度であるが、鳥類ではそうではない。

この長年の代謝的特徴を本研究結果を踏まえて説明すると、LRP12が産卵期に特徴的な血中の多量な脂質の酸化を防ぐために発現し、肝臓→血中脂質→肝臓の脂質リサイクリングに重要な役割を果たしているものと考えられる。以上の結果より、本研究は、ニワトリの代謝特徴の一つである脂質代謝における重要な因子としてLRP12を提示し、動物の進化の特徴を提示するだけでなく、脂質代謝を介した効率的そしてニワトリに負荷をかけない卵生産を実現する基礎的知見を提示したものと言える。

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3件)

(1) Matsubara, Y., Aoki, M., Endo, T., Sato, K. Characterization of the expression profiles of adipogenesis-related factors, ZNF423, KLFs and FGF10, during preadipocyte differentiation and abdominal adipose tissue development in chickens. (2013) *Comp Biochem Physiol A*. 165:189-195.
doi: 10.1016/j.cbpb.2013.04.002.

査読有り

(2) Sato, K., Aoki, M., Kondo, R., Matsushita, K., Akiba, Y., Kamada, T. Administration of insulin to newly hatched chicks improves growth performance via impairment of MyoD gene expression and enhancement of cell proliferation in chicken myoblasts. (2012) *Gen Comp Endocrinol*. 175: 457-463.
doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.043.

査読有り

(3) Sato, K., Kamada, T. Regulation of bile acid, cholesterol and fatty acid synthesis in chicken

primary hepatocytes by different concentrations
of T0901317, an agonist of Liver X
receptors.(2011) Comp Biochem Physiol A.158:
201-206.

doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.028.

査読有り

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 幹 (Sato, Kan)

東京農工大学・農学研究院・准教授

研究者番号 : 20250730