

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504001

研究課題名(和文)細胞質レチノール結合タンパク質によるビタミンA代謝関連酵素活性の調節

研究課題名(英文) Modulation of enzymatic activities of vitamin A-metabolizing enzymes by cellular retinol-binding proteins

研究代表者

目崎 喜弘 (Mezaki, Yoshihiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40431621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞にレシチン：レチノールアシル基転移酵素(LRAT)を発現させてレチニルエステル(RE)を定量した。その結果、ビタミンA添加直後のRE蓄積は細胞内レチノール結合タンパク質(CRBP) IIにより促進されたが、長時間培養後のRE蓄積はCRBP IIにより逆に減少した。肝星細胞や小腸吸収上皮細胞では、REの隔離機構(脂質滴)や分泌機構(キロミクロン)がそれぞれ発達しているため、LRAT活性が十分に発揮されると思われる。

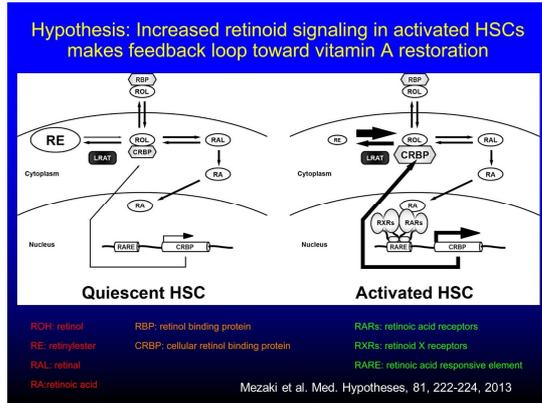
研究成果の概要(英文)：Retinyl esters (REs) were quantified in cells transfected with lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). The amount of REs was up-regulated in cells co-transfected with cellular retinol-binding protein (CRBP) II. However, prolonged cultivation resulted in decrease in the amount of REs. Deposition of REs into the lipid droplets in hepatic stellate cells and discharge of REs from intestinal absorptive cells are considered to be important for proper enzymatic activity of LRAT.

研究分野：生化学

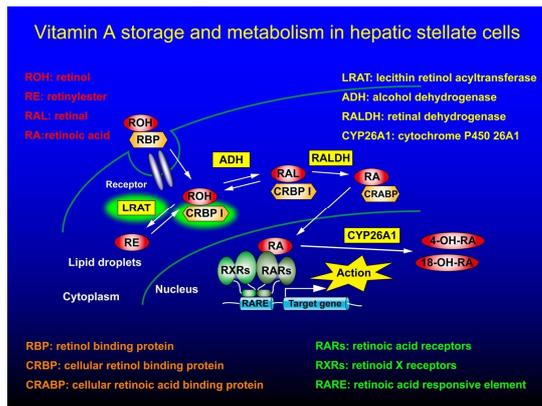
キーワード：ビタミンA 星細胞 肝臓 小腸 酵素 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

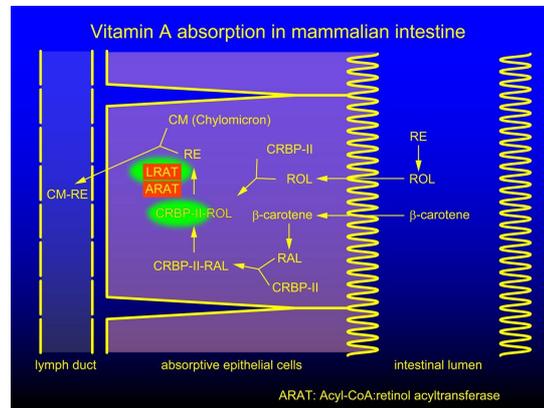
(1) ビタミン A は網膜において視物質として機能するのみでなく、細胞の増殖、分化、組織形成、あるいは癌細胞の増殖抑制、分化誘導など広範な生命現象に関与することが知られている。脂溶性であるビタミン A は生体に蓄積しやすく、欠乏症のみならず過剰症が存在するため、血中濃度を一定に保とうとする恒常性が備わっている。このビタミン A 恒常性維持のための貯蔵庫として働くのが肝臓星細胞である。



(2) 肝臓星細胞では過剰なビタミン A はレチニルエステルに変換されて脂質滴の中に貯蔵される。一方ビタミン A の標的臓器で細胞内に取り込まれたレチノールはレチナルからレチノイン酸へと酸化され、核内のレチノイン酸受容体に結合して標的遺伝子の転写を活性化する。



(3) 脂溶性分子であるビタミン A は単独では生体内で安定に存在できないため、その疎水性を緩衝するタンパク質が存在する。細胞外では血漿レチノール結合タンパク質が存在し、細胞内では細胞内レチノール結合タンパク質 (CRBP) I および II が存在する。CRBP I は全身に発現しておりレチノールに強く、またレチナルに弱く結合する。CRBP II は小腸特異的に発現しており、レチノールとレチナルに同程度の強さで結合する。CRBP はビタミン A の疎水性を緩衝するのみならず、ビタミン A エステル化酵素であるレシチン：レチノールアシル基転移酵素 (LRAT) などの酵素活性を調節することが示唆されているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。



2. 研究の目的

(1) LRAT, RDH, RALDH などのビタミン A 代謝関連酵素活性に CRBP がどのような影響を及ぼすかを生化学的および細胞生物学的に解明することを目的とする。

(2) 肝臓星細胞は、肝線維化・肝硬変などの病理学的条件下では活性化してビタミン A 脂質滴を失い、細胞外マトリックスを盛んに合成することから、肝線維化の責任細胞とも考えられている。肝線維化モデルラットにビタミン A を投与すると肝線維化を抑制する。しかしながらビタミン A には急性、慢性の副作用があり使用量に限界がある。本研究によりビタミン A を効率的に肝臓星細胞内に取り込ませる機構が明らかになれば、肝線維化予防および治療のための効果的なビタミン A 投与の指針とすることができる。

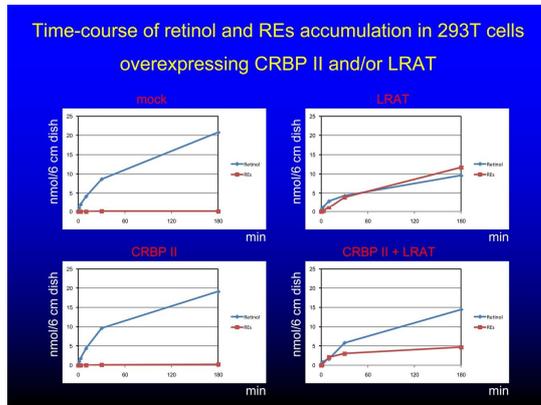
3. 研究の方法

ビタミン A 代謝関連酵素遺伝子 cDNA をクローニングする。哺乳類培養細胞内にそれらの cDNA をトランスフェクションした後、基質を培地に添加し、発現タンパク質の酵素活性を測定する。さらに CRBP cDNA をコトランスフェクションして酵素活性の変化を測定する。定性的な測定はビタミン A 自家蛍光の蛍光顕微鏡観察で行い、定量的な測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行う。これにより、CRBP によるビタミン A 代謝関連酵素の活性調節機構を解明する。

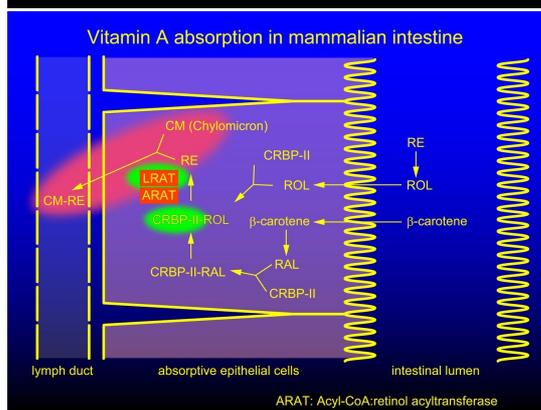
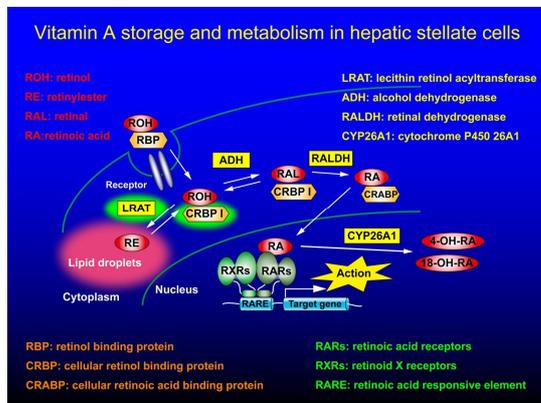
4. 研究成果

(1) ラットのビタミン A 代謝関連酵素遺伝子のうち LRAT の cDNA をクローニングし発現系を構築した。得られた cDNA を胎児腎由来細胞株 293T に導入しビタミン A を添加したところ細胞内にレチニルエステルが形成されることを HPLC で確認した。この系にさらに CRBP II を強制発現して細胞内のレチニルエステル蓄積量を HPLC で定量した。その結果、ビタミン A 添加直後のレチニルエステル生成量は CRBP II 添加により確かに促進されたが、長時間培養後のレチニルエステル生成量は CRBP II によりむしろ減少する傾向を示した。長時間培養により過剰に蓄積したレチニルエステルと、CRBP II によるレチノールの隔

離が、LRAT の触媒反応に対して抑制的に作用したと考えられた。



(2)生体における LRAT、CRBP I/II の発現細胞である肝星細胞や小腸吸収上皮細胞においては、生成したレチニルエステルの隔離機構（脂質滴） 分泌機構（キロミクロン）がそれぞれ発達しているため、LRAT 酵素活性が十分に発揮される環境が整えられていると思われる。



(3)LRAT はHRAS 様癌抑制遺伝子産物 (HRASLS) ファミリータンパク質の一員であるが、HRASLS がアシル基のアクセプターとして多様な分子を許容するのに対して、LRAT の酵素反応において、アシル基のアクセプターはレチノールに限られる。近年 LRAT と HRASLS3 のキメラタンパク質の X 線結晶構造が報告されたが、アシル基の結合ポケットは同定されたものの、レチノールの結合サイトは同定されなかったことから、LRAT の酵素反応においてアシル基のアクセプターがレチノールに

限られる理由は不明のままである。そこで LRAT の基質特異性を規定する要因として、LRAT と CRBP が物理的に結合し、CRBP に存在するレチノール結合ポケットを LRAT が利用している可能性を提唱した。アポ CRBP I が LRAT の酵素活性を拮抗的に阻害するとの観察報告があるが、本仮説がそのメカニズムを説明しうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Mezaki Y, Fujimi TJ, Senoo H, Matsuura T. The coordinated action of lecithin:retinol acyltransferase and cellular retinol-binding proteins for regulation of vitamin A esterification. *Med. Hypotheses*, 88, 60-62, 2016. (査読有) doi: 10.1016/j.mehy.2016.01.013

目崎喜弘. 肝星細胞によるビタミン A の恒常性維持機構. *ビタミン*, 89(10), 471-478, 2015. (査読有) <http://ci.nii.ac.jp/naid/110010000885>

目崎喜弘. レチノール結合タンパク質群によるビタミン A の輸送、貯蔵、代謝の調節とその意義. *ビタミン*, 89(5-6), 271-274, 2015. (査読有) <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009969587>

Hebiguchi T, Mezaki Y, Morii M, Watanabe R, Yoshikawa K, Miura M, Imai K, Senoo H, Yoshino H. Massive bowel resection upregulates intestinal expressions of cellular retinol-binding protein II and apolipoprotein A-IV mRNAs and alters intestinal vitamin A status in rats. *Int. J. Mol. Med.*, 35(3), 724-730, 2015. (査読有) doi: 10.3892/ijmm.2015.2066

目崎喜弘. 男性避妊とビタミン A. *ビタミン*, 88(5-6), 292-293, 2014. (査読有) <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009823440>

目崎喜弘, 森井真也子, 蛇口 琢, 吉川 究, 山口典子, 三浦光隆, 今井克幸, 吉野裕顕, 妹尾春樹. 肝臓星細胞 (ビタミン A 貯蔵細胞) の活性化に伴う中間径フィラメントの発現量と局在の変化. *ビタミン*, 88(5-6), 284-286, 2014. (査読有) <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009823437>

目崎喜弘. 細胞質に局在するレチノイン酸受容体のはたらき. *ビタミン*, 87(10),

579-580 , 2013. (査 読 有)
http://ci.nii.ac.jp/naid/11000967499
9

Mezaki Y, Morii M, Hebiguchi T,
Yoshikawa K, Yamaguchi N, Miura M, Imai
K, Yoshino H, Senoo H. Differential
increases in the expression of
intermediate filament proteins and
concomitant morphological changes of
transdifferentiating rat hepatic
stellate cells observed in vitro. *Acta*
Histochem. Cytoc., 46(5), 137-143,
2013. (査読有) doi: 10.1267/ahc.13007

Mezaki Y, Morii M, Hebiguchi T,
Yoshikawa K, Yamaguchi N, Yoshino H,
Senoo H. The role of retinoic acid
receptors in activated hepatic
stellate cells. *Med. Hypotheses*, 81(2),
222-224, 2013. (査読有) doi:
10.1016/j.mehy.2013.04.045

[学会発表] (計 9 件)

Mezaki Y, Park JH, Shindo D, Senoo H,
Matsuura T. Feedback mechanism toward
storage of vitamin A-containing lipid
droplets in activated hepatic stellate
cells. 18th International Symposium on
Cells of Hepatic Sinusoid, November 11,
2015, Asilomar (USA)

目崎喜弘 . 肝星細胞における核内レチノ
イン酸受容体のはたらきとビタミン A の
恒常性維持機構 . 第 29 回肝類洞壁細胞研
究会学術集会, 2015 年 11 月 1 日, 秋田
市にぎわい交流館 AU (秋田県・秋田市)

Mezaki Y, Senoo H, Matsuura T. Cellular
retinol-binding protein II enhances
the enzymatic activity of
lecithin:retinol acyltransferase. 3rd
International Conference on Retinoids
and 26th Congress of the Japanese
Society for Retinoid Research, October
21, 2015, Gifu Grand Hotel (Gifu
Prefecture, Gifu City)

目崎喜弘, 松浦知和, 妹尾春樹 . トラン
スフォーミング増殖因子ベータ 3 遺伝子
発現のレチノイン酸による調節 . 第 47 回
日本結合組織学会学術大会, 2015 年 5 月
16 日, コクヨホール (東京都・港区)

目崎喜弘, 蛇口 琢, 森井真也子, 吉川
究, 三浦光隆, 今井克幸, 吉野裕顕, 妹
尾春樹 . レシチン:レチノールアシルト
ランスフェラーゼ酵素活性に対する細胞
質レチノール結合タンパク質 II の影響 .
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集

会 第 92 回日本生理学会大会 合同大
会, 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場
(兵庫県・神戸市)

目崎喜弘, 蛇口 琢, 森井真也子, 吉川
究, 三浦光隆, 今井克幸, 吉野裕顕, 妹
尾春樹 . 細胞質レチノール結合タンパク
質共存下におけるビタミン A エステル化
酵素活性の測定, 日本ビタミン学会第 66
回大会, 2014 年 6 月 13 日, 姫路商工会
議所 (兵庫県・姫路市)

目崎喜弘, 森井真也子, 蛇口 琢, 吉川
究, 山口典子, 三浦光隆, 今井克幸, 吉
野裕顕, 妹尾春樹 . 活性化肝臓星細胞に
おける中間径フィラメントの役割 第 119
回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014
年 3 月 27 日, 自治医科大学 (栃木県・下
野市)

Mezaki Y, Morii M, Hebiguchi T,
Yoshikawa K, Yamaguchi N, Miura M, Imai
K, Yoshino H, Senoo H. Differential
increases in the expression of
intermediate filament proteins in
transdifferentiating rat hepatic
stellate cells. 17th International
Symposium on Cells of Hepatic Sinusoid,
September 24-25, 2013, Osaka
International Convention Center
(Osaka Prefecture, Osaka City)

目崎喜弘, 森井真也子, 蛇口 琢, 吉川
究, 山口典子, 三浦光隆, 今井克幸, 吉
野裕顕, 妹尾春樹 . 肝臓星細胞 (ビタミ
ン A 貯蔵細胞) の活性化における中間径
フィラメントの発現量と局在の変化 . 日
本ビタミン学会第 65 回大会, 2013 年 5
月 18 日, 一橋大学・一橋講堂 (東京都・
千代田区)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

目崎 喜弘 (MEZAKI , Yoshihiro)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 4 0 4 3 1 6 2 1

(2) 研究分担者

妹尾 春樹 (SENOO , Haruki)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 9 0 1 7 1 3 5 5

山口 典子 (YAMAGUCHI , Noriko)
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 9 0 2 5 1 5 5 3

吉川 究 (YOSHIKAWA , Kiwamu)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 9 0 4 0 0 4 8 1