

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660294

研究課題名(和文) 珍奇三重結合含有脂肪酸に着目したバイオロジーの新展開

研究課題名(英文) Biological function of a rare fatty acid with a triple bond

研究代表者

永尾 雅哉 (NAGAO, MASAYA)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10237498

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)： Marrubium vulgareという植物の抽出液中に6-octadecynoic acid (6-ODA)という三重結合を有する珍しい脂肪酸見いだしたため、その機能について解析した。まず合成により量を確保した上で、核内受容体のPPAR のアゴニストとして機能し、前駆脂肪細胞の分化系を用いて、脂肪蓄積促進活性があることを確認した。また、GPR40という別の細胞膜に存在する受容体を介して、膵臓細胞株であるMIN6において用量依存的にインスリンの分泌を促進することを見いだした。また、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の脂肪毒性による小胞体ストレスの誘導に対して保護的な効果を示すことを見いだした。

研究成果の概要(英文)： Biological function of 6-octadecynoic acid (6-ODA), a rare fatty acid identified in methanol extract of Marrubium vulgare with triple bond, was examined. At first, 6-ODA was synthesized. Both 6-ODA and 9-octadecynoic acid (9-ODA) with a triple bond in a position different from that of 6-ODA that had similar PPAR agonist activity in luciferase reporter assay increased lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes in a PPAR dependent manner. Both 6-ODA and 9-ODA could also stimulate insulin secretion in pancreatic cell line MIN6 in a fatty acid receptor GPR40 dependent manner. It was reported that glucose induced insulin secretion in a biphasic pattern: first phase, which develops rapidly but lasts only a few minutes, followed by second phase. Both 6-ODA and 9-ODA induced second-phase insulin secretion in MIN6 cells. Both 6-ODA and 9-ODA reduced induction of CHOP caused by saturated fatty acid palmitic acid in MIN6 cells.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：脂肪酸 インスリン 脂肪蓄積 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

Marrubium vulgare という植物のメタノール抽出液中に、核内受容体 PPAR γ のアゴニストとして機能すると考えられる三重結合を有する珍しい脂肪酸の 6-octadecynoic acid (6-ODA) をレポーターアッセイで見いだした。三重結合を有する脂肪酸である 6-ODA に関しては、抗真菌活性の報告があるぐらいで¹⁾、その生理活性についてはほとんど知られていなかったもので、新たな生理活性について明らかにしていく必要があった。

2. 研究の目的

三重結合を有する珍奇な脂肪酸である 6-ODA について、その生理活性を明らかにすることを目的とした。具体的には、まず、6-ODA を合成し、PPAR γ のアゴニストとして、脂肪蓄積促進活性を有するかについて検討した。また 6-ODA は脂肪酸の一種であることから、中・長鎖脂肪酸の受容体である GPR40 を介して機能する可能性があった。そこで、膵臓 β 細胞株 MIN6 を用いて、GPR40 を介してインスリンの分泌を促進するか検討した。一方、飽和脂肪酸のパルミチン酸が小胞体ストレスを誘導して、脂肪毒性を発揮するのに対して、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸が保護的に作用することが知られており、三重結合を有する脂肪酸である 6-ODA は脂肪毒性を発揮するのか、それとも保護的に作用するのかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 6-ODA の合成

ペトロセリン酸を初発物質として、Shak らの方法²⁾を参考にして合成した³⁾。

(2) 脂肪蓄積促進活性測定

3T3-L1 細胞を常法⁴⁾に従い、コンフルエントになった細胞を 2 日培養後、インスリン (5 μ g/ml)、イソブチルメチルキサンチン (IBMX) (0.5 mM)、デキサメサゾン (DEX) (0.25 μ M) 存在下で 2 日間培養後、さらに 2 日間インスリン (5 μ g/ml) のみを添加し培養後、被験物質を含まない、又は含む培地で、2 日ごとに交換しながら 8 日間培養した。トリグリセライドの測定は細胞を超音波処理後、和光のトリグリセライド E-テストキットを用いて行った。

(3) MIN6 細胞からのインスリン分泌測定

96 穴プレートに 1 穴あたり 2.0 x 10⁴ 個の MIN6 細胞を播種し、48 時間培養後グルコースを含まないクレブスバッファー (脂肪酸を含まないウシ血清アルブミン 0.1% を含む) で洗浄後、同じクレブスバッファーで 1 時間プレインキュベーションした後で、グルコース不含、またはグルコースを含むクレブスバッファーで希釈した被験物質に交換し、一定時間培養後、その培養上清のインスリン量について、HTRF インスリンキット (Cisbio) を用いて測定した。GPR40 アンタゴニスト GW1100 (Cayman) は目的に応じて、被験物質と同時に

に添加した。

(4) MIN6 細胞における小胞体ストレスの検出

12 穴プレートに 1 穴あたり 4.0 x 10⁵ 個の MIN6 細胞を播種し、翌日にウシ胎児血清を含まない DME 培地で洗浄後、被験物質を含むウシ胎児血清を含まない DME 培地で一定時間培養後、細胞溶解液を添加して、細胞抽出液を得た。一定タンパク量の細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、抗 CHOP 抗体 (Santa cruz, sc-7351) を用いて、小胞体ストレスの惹起を確認した。

4. 研究成果

(1) 6-ODA、9-ODA による 3T3-L1 細胞における PPAR γ を介した脂肪蓄積促進

前駆脂肪細胞 3T3-L1 を常法に従い、IBMX、Dex、インスリン、ならびに、インスリンのみで脂肪細胞への分化誘導を行った時点で、6-ODA、ならびに三重結合の位置が異なるその誘導体の脂肪酸である 9-ODA を添加して 8 日間培養後、細胞内のトリグリセライド (中性脂肪) 量を測定したところ、どちらの脂肪酸も用量依存的にトリグリセライド量を増加させることが観察された。また、脂肪代謝のマスターレギュレーターである核内受容体の PPAR γ のアンタゴニスト GW9662 を共存させると、この増加が抑制されたことから、6-ODA と 9-ODA は PPAR γ を介して、脂肪蓄積を促進していることが明らかになった (図 1)。

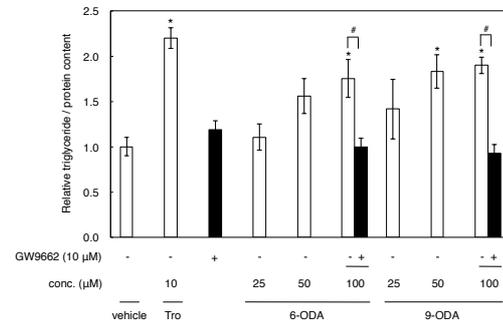


図1. 6-ODA、ならびに9-ODAによる3T3-L1細胞における脂肪蓄積促進効果。

6-ODA、ならびに9-ODAの用量依存的なトリグリセライドの蓄積促進が見られ、その効果はPPAR γ アンタゴニストGW9662 (10 μ M) で抑制される。TroはポジティブコントロールのPPAR γ アゴニストのトログリタゾン (10 μ M)。(*P < 0.05, 溶媒コントロールとの比較。 #P < 0.05, GW9662を加えない場合との比較。)

(2) 6-ODA、9-ODA による脂肪酸受容体 GPR40 を介した膵臓 β 細胞株 MIN6 からのインスリン分泌促進

6-ODA、9-ODA は三重結合を有する珍しい脂肪酸であり、中・長鎖脂肪酸の受容体である GPR40 を介して機能するかは不明であった。そこで、膵臓 β 細胞株の MIN6 細胞において、GPR40 依存的に、6-ODA と 9-ODA がインスリン分泌を促進するか検討した。その結果、6-ODA、9-ODA とともに用量依存的に、MIN6 細胞においてインスリン分泌を促進した (図 2)。そして、6-ODA、9-ODA によるインスリン分

泌の促進は、GPR40 のアンタゴニスト GW1100 で共処理することで、抑制されたことから、GPR40 を介していることが示唆された(図 3)。

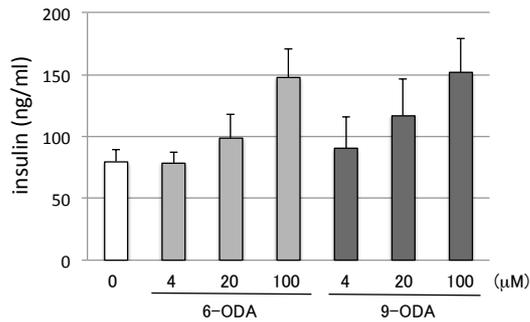


図2. MIN6細胞からの6-ODA、9-ODAの用量依存的なインスリン分泌

2.0 x 10⁵ cells /mlでMIN6細胞を播種し、48時間後にグルコースを含まないクレスバッファーで1時間処理後、25 mMグルコースを含むクレスバッファーに、6-ODA、または9-ODAを加えて、1時間後、上清のインスリン量をHTRFにて測定した。

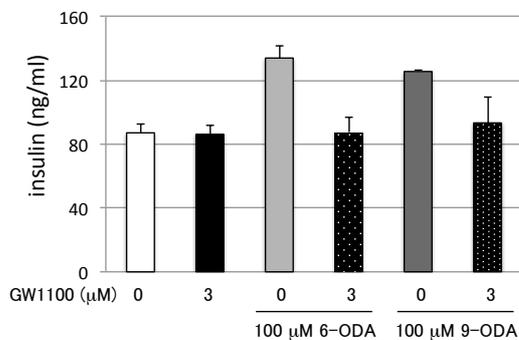


図3. GPR40アンタゴニストGW1100共処理による6-ODA、および9-ODAによるMIN6細胞でのインスリン分泌促進の阻害

図2と同じ条件で、GW1100は、6-ODA、9-ODAと同時に添加した。

さらにGRP40のsiRNAによって、これらの脂肪酸によるインスリン分泌が抑制されることも確認している (data not shown)。

ところで、膵臓β細胞におけるグルコース応答性のインスリン分泌には二相性があることが知られている。即ち、10分以内に生じる一過性の早い第一相分泌(既に細胞膜に前もって結合しているインスリン顆粒と、刺激で瞬時に細胞膜に移行する顆粒を介して生じることが最近報告されている⁵⁾)と、ゆっくりと細胞内インスリン顆粒が、アクチンネットワークを介して細胞膜に移動して分泌される第二相分泌が存在する(図4)。そこで、6-ODA、9-ODAを添加して経時的にMIN6細胞の培養上清に含まれるインスリン量を測定した。その結果、25 mMグルコースで刺激する際に同時に6-ODAまたは9-ODAを添加しても、添加後10分までの上清のインスリン量は、グルコースのみの刺激の場合と殆ど変わらず、10分後以降に、6-ODAまたは9-ODAによってインスリンの分泌が促進されたことから、6-ODA、9-ODAは第一相の分泌ではなく、第二相のインスリン分泌を促進すると考え

られた(図5a, b)。

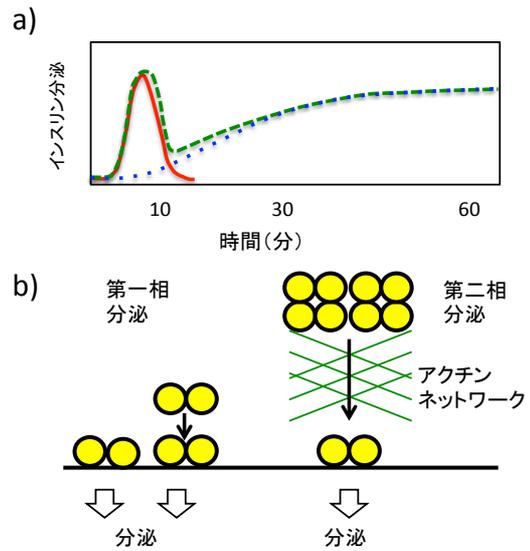


図4. 膵臓β細胞からのインスリン分泌のイメージ

a) 刺激にตอบสนองして実線で示した第一相の早い分泌と、点線で示した第二相の遅い分泌の合計として、破線のインスリン分泌が観察される。

b) 第一相は、膜に結合している顆粒と、刺激により瞬時に膜に結合して分泌される顆粒によるとされている⁵⁾。

第二相は、刺激により細胞内から細胞膜に移動してドッキング後、細胞膜に融合して分泌される。

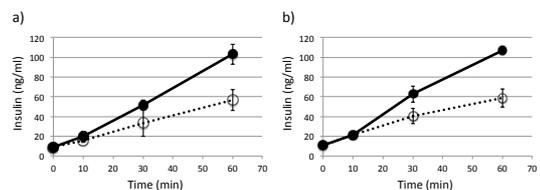


図5. 6-ODA、9-ODAによるMIN6細胞上清中のインスリン量の経時変化

図2の条件で経時的に測定、a) ○; グルコースのみ、●; 100 μM 6-ODA添加、b) ○; グルコースのみ、●; 100 μM 9-ODA添加

脂肪酸受容体のGPR40はホスホリパーゼC-β (PLC-β)を介して、プロテインキナーゼD (PKD)の活性化を経て、アクチンのリモデリングを制御することで、インスリン分泌を制御することが報告された⁶⁾。そこで、上記の25 mMグルコースと同時に、6-ODAまたは9-ODAで刺激を加える系で、アクチンのリモデリングについて、繊維状のアクチン(F-actin)を染色するファロイジンを用いて検討した。すると、グルコースのみの処理では、細胞の辺縁部にF-actinのスポットが点在して観察されたが、グルコースと同時の6-ODA、9-ODA処理により、F-actinの辺縁部のF-actinのスポットは消え、細胞全体に薄くひろがっていたため、アクチンの脱重合が阻害されたと考えられた。なお、この現象はGPR40のアンタゴニストGW1100で抑制されたことから、GPR40を介した効果であると考え

られた (data not shown)。

(3) 脂肪毒性の一因とされる飽和脂肪酸による小胞体ストレス誘導に対する 6-ODA、9-ODA の保護効果の検討

パルミチン酸のような飽和中・長鎖脂肪酸は小胞体ストレスを誘導し、膵臓β細胞のアポトーシスを誘導することで、糖尿病におけるインスリン抵抗性に寄与するとされている。そこで、パルミチン酸による小胞体ストレス誘導を介した CHOP (C/EBP-homologous protein) の発現誘導を 6-ODA や 9-ODA が抑制出来るかについて、抗 CHOP 抗体を用いた Western blot によって解析した (図 6)。その結果、6-ODA、9-ODA 自身は CHOP の誘導は起こさず、逆に 100 μM のパルミチン酸による CHOP の誘導を濃度依存的に抑制出来ることがわかった。

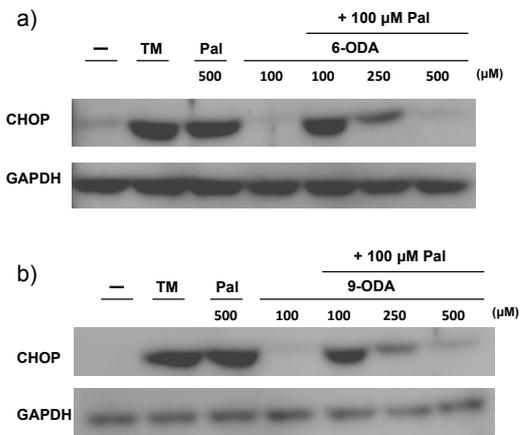


図6. パルミチン酸による小胞体ストレス誘導に対する 6-ODA、9-ODAの濃度依存的な抑制効果

100 μMのパルミチン酸 (Pal)によるCHOPの誘導を、a) 6-ODA、b) 9-ODAは、濃度依存的に抑制
TM: 2 μg/mlツニカマイシン。抗CHOP、抗GAPDH抗体を用いたWestern blottingによる。

(考察)

PPAR γ アゴニストとして同定された三重結合を有する珍しい脂肪酸である 6-ODA については、抗真菌活性が知られているぐらいで¹⁾、その生物学的な活性は殆ど知られていなかった。

また 6-ODA、9-ODA についてはレポーターアッセイ系で PPAR γ アゴニストと同定していただけであったので、3T3-L1 細胞を用いて脂肪蓄積促進活性について確認したところ、PPAR γ 依存的な脂肪蓄積促進活性が認められた (図 1)。これにより、三重結合を有する珍しい脂肪酸の新たな機能を示すことができた。

ところで、中・長鎖脂肪酸の受容体として核内受容体の PPAR γ ではなく、細胞膜に存在する三量体 G タンパク質共役型受容体の GPR40 が知られており、例えば膵島のβ細胞に発現している GPR40 はリガンドが結合することで、インスリンの分泌を促進することが知られていた。面白いことに、脂肪酸ではな

い、合成の PPAR γ リガンドで、糖尿病の治療薬として臨床応用されているロシグリタゾンも GPR40 に作用する⁷⁾。そこで、三重結合を有する脂肪酸である 6-ODA や 9-ODA が、GPR40 を介して作用するかについて検討したところ、GPR40 依存的にインスリンの分泌を促進することを明らかに出来た (図 2、3、5)。グルコースに応答したインスリンの分泌は二相性であることが示されており (図 4)、従来第一相は、早い (10 分以内) 分泌として知られていたが、既に膜に結合しているインスリンの分泌顆粒が放出されるものと、刺激後直ぐに膜に移行して、分泌される顆粒があることが最近報告されている⁵⁾。一方、二相目の分泌は細胞内部からアクチンのネットワークを介して分泌される遅い分泌である。6-ODA、9-ODA によるインスリン分泌の促進は添加後、10 分までは観察されず、その後、促進されることから第二相の分泌を促進すると考えられた (図 6)。実際、6-ODA や 9-ODA によりアクチンの脱重合が阻害されることを示す結果を、F-アクチンに結合するファロイジンを用いた実験により得ており、この結果からも 6-ODA や 9-ODA はアクチンネットワークを介した第二相のインスリン分泌を促進すると思われた。

さらにパルミチン酸のような中・長鎖飽和脂肪酸は、膵臓β細胞に小胞体ストレスを誘導して、細胞機能障害、細胞死を誘導することで脂肪毒性を発揮し、これに対して一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、この脂肪毒性を抑制することが知られている。そこで、6-ODA と 9-ODA について、飽和脂肪酸のパルミチン酸の脂肪毒性を阻害するか検討したところ、これらの三重結合含有脂肪酸は脂肪毒性を惹起せず、パルミチン酸による小胞体ストレス応答を用量依存的に抑制出来ることが示せた (図 6)。なお、飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答の活性化は、膜脂質の飽和化に起因し、異常タンパク質の蓄積を介さずに、膜脂質の飽和化を直接感知して引き起こされている可能性が示されている⁸⁾。但し、飽和脂肪酸のパルミチン酸による個体での脂肪毒性の惹起は、パターン認識受容体の一つの TLR4 (Toll-like receptor 4) とそれに結合する MyD88 をノックアウトしたマウスでは見られないという報告もあり⁹⁾、個体での脂肪毒性の発揮には TLR4 を介した炎症反応が関わっている可能性がある。

本研究では三重結合を有する珍しい脂肪酸のいくつかの新たな生物機能を示すことができた。本研究ではいずれの生物活性においても、三重結合の位置の異なる脂肪酸である 6-ODA と 9-ODA は同程度の活性を示したが、例えば *Candida albicans* に対する抗真菌活性においては、6-ODA は抗菌活性を示すものの、9-ODA は非常に弱い活性しか示さないことが報告されている¹⁾。今後、6-ODA と 9-ODA に関して、新たな生物活性やその作用の差異が見られると考えられる。

<引用文献>

- 1) Li XC et al., "Potent In Vitro Antifungal Activities of Naturally Occurring Acetylenic Acids." *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2442-2448 (2008)
- 2) Shak S et al., "Leukotriene B4 dldydroxylase in Human Polymorphonuclear Leukocytes." *J Biol Chem* 260, 13023-13028 (1985)
- 3) Ohtera A et al., "Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist." *Biochem Biophys Res Commun* 440, 204-9 (2013)
- 4) Sakaue H et al., "Posttranscriptional Control of Adipocyte Differentiation through Activation of Phosphoinositide 3-Kinase." *J Biol Chem* 273, 28945-28952 (1998)
- 5) Seino S et al., "Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes." *J Clin Invest* 121, 2118-2125 (2011)
- 6) Ferdaoussi M, et al., "G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1." *Diabetologia* 55, 2682-2692 (2012)
- 7) Gras D et al., "Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L970-L978 (2009)
- 8) Kitai Y et al., "Membrane lipid saturation activates IRE1 α without inducing clustering." *Genes to Cells* 18, 798-809 (2013)
- 9) Eguchi K et al., "Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link β Cell Dysfunction and Islet Inflammation." *Cell Metabolism* 15, 518-533, (2012)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ohtera A, Miyamae Y, Nakai N, Kawachi A, Kawada K, Han J, Isoda H, Neffati M, Akita T, Maejima K, Masuda S, Kambe T, Mori N, Irie K, Nagao M. "Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist." *Biochem Biophys Res Commun.* 440, 204-9 (2013) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.003. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

①Ohtera A, Miyamae Y, Nakai N, Kawachi A, Kawada K, Han J, Isoda H, Neffati M, Maijima K, Akita T, Mori N, Irie K, Kambe T, Masuda S, Nagao M. "Identification of 6-Octadecynoic acid from *Marrubium vulgare* L. as a PPAR γ agonist." The Tunisia-Japan Symposium on Science, Society and Technology (TJASSST) 2013, Yasmine Hammamet, Tunisia, Nov. 16, 2013

②大寺杏奈、宮前友策、仲井奈緒美、荒川武明、平澤明、河内敦、川田清和、韓峻奎、磯田博子、Mohamed Neffati、前嶋一宏、秋田徹、森直樹、入江一浩、神戸大朋、増田誠司、永尾雅哉

ニガハツカ由来不飽和脂肪酸の PPAR γ および GPR40 に対するデュアルアゴニスト活性、第 12 回新規素材探索研究会、2013 年 6 月 7 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=156 (本研究に関しては準備中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 永尾 雅哉 (NAGAO, Masaya)
京都大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号： 1 0 2 3 7 4 9 8

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし