

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07733

研究課題名(和文) クラスBスカベンジャー受容体による脂肪酸およびその関連物質の認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of recognition mechanisms of fatty acids and their related substances by class B scavenger receptors

研究代表者

都築 巧 (TSUZUKI, SATOSHI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50283651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CD36とSR-B1はクラスBスカベンジャー受容体の構成員である。本研究では(i) SR-B1にある種の不飽和型長鎖脂肪酸の認識能があること、(ii) SR-B1が味細胞や嗅上皮表面に発現していること、(iii) CD36がある種の酸化型リン脂質と直接的に相互作用していること、(iv) ある種の脂肪族アルデヒドがSR-B1およびCD36のリガンドとなり得ること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりCD36の姉妹分子であるSR-B1もある種の脂肪酸を認識しうること、味蕾や嗅上皮表面に存在していることが明らかになったが、このことにより本受容体の新規機能(感覚器官における役割)が提示された。CD36が酸化型リン脂質と直接的に相互作用することが示されたが、両者の結合様式について今後詳細に検討していく上で重要な知見となった。CD36、SR-B1が食品中にも含まれる香気成分である種の脂肪族アルデヒド(テトラデカナル等)を認識することが明らかになった。本結果がよい香りのする食品の開発等に応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：CD36 and SR-B1 belong to class B scavenger receptors. In this study, we found that (i) SR-B1 has an ability to recognize distinct unsaturated long-chain fatty acids, (ii) SR-B1 is expressed in taste bud cells and on the surface of olfactory epithelium, (iii) CD36 directly interacts with a certain of oxidized phospholipids, and (iv) specific fatty aldehydes can serve as ligands of SR-B1 and CD36.

研究分野：栄養化学

キーワード：クラスBスカベンジャー受容体 長鎖脂肪酸 酸化型リポ蛋白質 酸化型リン脂質 CD36 脂肪族アルデヒド 嗅上皮

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラスBスカベンジャー受容体として分類される CD36 と SR-BI はそれぞれ 472、509 のアミノ酸からなる 2 回膜結合性の細胞表面蛋白質である (図 1)。両者は生体中に広く分布しており、臓器・組織に障害を与える oxLDL (oxidized low-density lipoprotein、酸化型低密度リポ蛋白質) 等の変性リポ蛋白質を捕獲、体内環境 (体液) の浄化に寄与することが主要機能のひとつと考えられている。

一方、CD36 については、脂肪細胞等において長鎖脂肪酸の認識と細胞内への取り

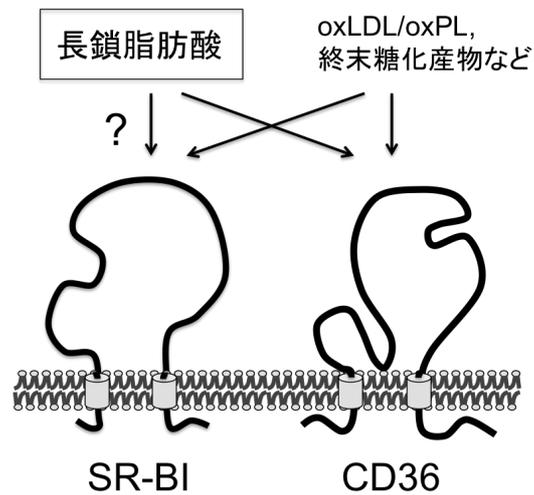


図 1 SR-BI と CD36 の構造模式図とリガンド特異性

込みを司る輸送体 (fatty acid translocase) としても機能すると考えられている (Abumrad *et al.* J. Biol. Chem. 268, pp. 17665, 1993 等)。しかしながら、CD36 と脂肪酸の結合を支持する決定的な実験的証拠が得られていた訳ではなかった。長鎖脂肪酸が細胞膜を透過・液化するので、受容体発現細胞やその膜面分を用いる常套的な結合試験が適用実施できない、CD36 は細胞膜から溶出すると凝集・失活する、等の理由による。リガンド結合活性を保持した CD36 を固体支持体へ固定化させる必要があった。2000 年代、米国において CD36 と oxLDL の結合様式解明に向け研究が進展し、(i) oxLDL 粒子の表面には、2 位アシル基に酸素原子が付加したリン脂質 (酸化型リン脂質 oxidized phospholipid, 以下 **oxPL**) が生じていること、(ii) CD36 は oxLDL 粒子の中で、oxPL の 2 位アシル基、正確には末端にカルボキシル基等の極性基が付加された一定長さ以上の直鎖状炭化水素 (基) を認識していることが明らかになっていた (Podrez *et al.* J. Biol. Chem. 277 pp. 38503, 2002 等)。さらに、CD36 の oxLDL/oxPL 結合部位はアミノ酸 157 から 171 の間にあることも示された (Kar *et al.* J. Biol. Chem. 283, pp. 8765, 2008) (図 2)。研究代表者はこれらの報告に接し、長鎖脂肪酸は CD36 分子上の oxLDL/oxPL 結合部位に結合するであろうと予測、さらに、この結合部位を化学合成、固体支持体に固定化すれば、脂肪酸結合検証のための人工模擬受容体として活用できると考えた。

研究代表者らは、マウス CD36 の oxLDL/oxPL 結合部位およびその周辺と同一配列で構成されるオリゴペプチドを化学合成、固体支持体に固定化、この「模擬 CD36」に対して蛍光標識 oxLDL (基準リガンド) が特異的に結合すること、そして、オレイン酸などの長鎖脂肪酸が基準リガンドの模擬 CD36 への結合を阻害することを明らかにした (Takai *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 78, pp. 238, 2014 等)。これは CD36 と長鎖脂肪酸の結合を支持する実験的証拠のひとつである。

なお、SR-BI の oxLDL/oxPL 結合部位はアミノ酸 183 から 205 の間にあると考えられている (Gao *et al.* J. Biol. Chem. 285, pp. 4447, 2010)。SR-BI の oxLDL/oxPL 結合部位のアミノ酸配列は CD36 のそれと類似性があり、本受容体が長鎖脂肪酸を結合させる可能性は十分に考えられるが、それについてまだ報告例はなかった。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らや国外のいくつかの研究グループは CD36 が動物の味蕾や嗅細胞にも発現すること、CD36 遺伝子破壊マウスは野生型マウスに比べ長鎖脂肪酸を含む試験液の摂取量が少ないこと (Laugerette *et al.* J. Clin. Invest. 115, pp. 3177, 2005 等) などから、この受容体が脂肪酸の感知に寄与すると提言してきている。しかしながら、CD36 遺伝子破壊の効果は軽微であり、

別種の受容体が CD36 損失を補償している可能性がある。研究代表者はその第一候補として SR-BI を想定した。本研究では、化学合成により模擬 SR-BI を作出、これを用いて SR-BI と長鎖脂肪酸の結合性を検証、さらに、同受容体が動物の味蕾および嗅細胞で発現しているのかを調査、このものが脂肪酸感知に寄与するのか明らかにすることを第一の目的とする。

(2) 長鎖脂肪酸の CD36 (模擬 CD36) への結合を支持する、より直接的な証拠を示すこと、その結合様式についての知見を得ることも本研究の主要な目的である。

(3) 本研究では、模擬受容体を利用した評価系により、CD36 および SR-BI のリガンド候補物質を探索も行う。なおリガンド候補は食品中に含まれることが分かっている脂肪酸関連物質から探索した。

3. 研究の方法

(1) 申請者らは化学合成オリゴペプチドを人工模擬受容体 (CD36₁₅₀₋₁₆₈)、蛍光標識 oxLDL を基準リガンドとする CD36 リガンド結合評価系を構築してきている (図 2)。本アッセイ系では試験物質が模擬受容体、蛍光標識 oxLDL の結合を阻害するとき、それにリガンド活性があると判定する。本研究では、化学合成による模擬 SR-BI (アミノ酸 187 から 206 からなる領域を含む化学合成ペプチド) を作出し (SR-BI₁₈₇₋₂₀₆ と命名)、

これに対して基準リガンドが特異的に結合するか、もし結合するとすれば長鎖脂肪酸がそれを阻害するかを検証した。また、C57BL6/J 系マウスの味蕾および嗅細胞で SR-BI が発現しているかについて、逆転写-ポリメラーゼ鎖反応、免疫組織化学染色により検証した。

(2) 実際に長鎖脂肪酸が模擬 CD36 に結合しているかを示す場合、トリチウム等の放射性同位元素で標識された脂肪酸をリガンドとする結合試験を実施するのが一般的である。しかし、長鎖脂肪酸の解離定数は数百マイクロモラーオーダーと予想され、そのような濃度で標識脂肪酸を含む試験液を準備することはほぼ不可能である。本研究では、大腸菌発現系を利用してグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の融合蛋白質 (という形で模擬 CD36 (GST-CD36₁₅₀₋₁₆₈) を作出、このものに脂肪酸が結合するかを非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native PAGE) 分析にて検証した。なお、陽性対照として市販の精製 oxPL (実際は K0diA-PC という oxPL 種を使用) もこれらの試験に供し、その測定結果を長鎖脂肪酸の結合様式理解への手掛かりとした。

(3) (1) で示した *in vitro* アッセイ系により、長鎖の脂肪酸アルデヒドに CD36, SR-BI リガンド活性があるかを検証した。

4. 研究成果

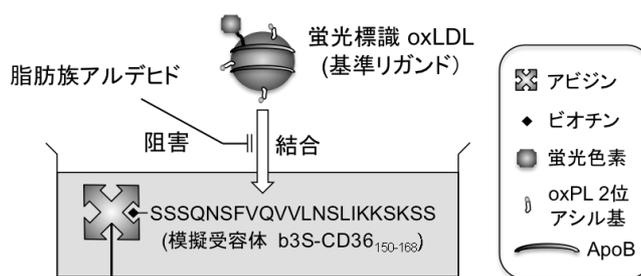


図2 クラスBスカベンジャー受容体リガンド結合評価系の概要

本図では蛍光標識 oxLDL (その表面の oxPL 2 位アシル基) の 模擬CD36 のひとつ CD36₁₅₀₋₁₆₈ (構成アミノ酸は一文字表記) への結合、脂肪酸アルデヒドによる阻害を模式的に表示した。蛍光色素は oxLDL の蛋白質成分、アポリポ蛋白質 B (ApoB) に付加させている。本研究ではこれと同等の SR-BI リガンド結合評価系の構築した。

(1) 蛍光標識 oxLDL が SR-B1₁₈₇₋₂₀₆ に特異的に結合すること、オレイン酸、リノール酸といった不飽和の長鎖脂肪酸がその結合を阻害することを明らかにした。一方、パルミチン酸、ステアリン酸には阻害作用がみられなかった。これらの結果から SR-B1 にはある種の不飽和型長鎖脂肪酸の認識能があることが示唆された。逆転写-ポリメラーゼ鎖反応により、SR-B1 の mRNA がマウスの舌上皮、嗅上皮に発現していることを明らかにした。また、免疫組織化学染色により SR-B1 タンパク質が一部のマウスの味蕾細胞、及び嗅上皮表面(図 3)に局在していることを明らかにした。上記の結果より、CD36 だけでなく SR-B1 も味覚、嗅覚系において長鎖脂肪酸の認識に関わることが示唆された。

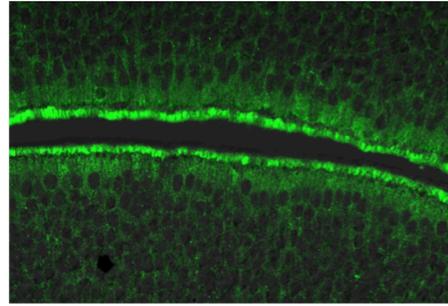


図3 SR-B1のマウス嗅上皮表面における発現

(2) GST-CD36₁₅₀₋₁₆₈ に対して oxPL の一種 KODiA-PC が直接的に相互作用していることを native PAGE にて明らかにした。一方、GST-CD36₁₅₀₋₁₆₈ と長鎖脂肪酸の相互作用については同分析では明らかにすることができなかった。GST-CD36 の改変が必要であると考えている。

(3) CD36₁₅₀₋₁₆₈、SR-B1₁₈₇₋₂₀₆ を利用したアッセイ系により、テトラデカナール等の脂肪族アルデヒドが CD36 及び SR-B1 のリガンドとなり得ることを明らかにした(図 4)。これらの脂肪族アルデヒドは食品中に含まれる香気成分でもある。以上の結果から、CD36、SR-B1 は哺乳動物の鼻腔内にて何らかの匂い物質の認識にも関わることが初めて示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tsuzuki S, Yamasaki M, Kozai Y, Sugawara T, Manabe Y, Inoue K, Fushiki T. Assessment of direct interaction between CD36 and an oxidized glycerophospholipid species. J. Biochem., 査読有, Vol. 162, 2017, pp. 163-172, doi: 10.1093/jb/mvx019
- ② Tsuzuki S, Amitsuka T, Okahashi T, Kimoto Y, Inoue K. A search for CD36 ligands from flavor volatiles in foods with an aldehyde moiety: identification of saturated aliphatic aldehydes with 9-16 carbon atoms as potential ligands of the receptor. J. Agric. Food Chem., 査読有, Vol. 65, No. 31, 2017, pp. 6647-6655, doi: 10.1021/acs.jafc.7b01890
- ③ Tsuzuki S, Kimoto Y, Lee S, Sugawara T, Manabe Y, Inoue K. A novel role for scavenger receptor B1 as a contributor to the capture of specific volatile odorants in the nasal cavity. Biomed. Res., 査読有, Vol. 39, No. 3, 2018, pp. 117-129, doi: 10.2220/biomedres.39.117
- ④ Tsuzuki S, Lee S, Kimoto Y, Sugawara T, Manabe Y, Inoue K. A role for scavenger receptor B1 as a captor of specific fatty acids in taste buds of circumvallate papillae. Biomed. Res. 査読有, Vol. 39, No. 6, 2018, pp. 295-300, doi: 10.2220/biomedres.39.295

[学会発表] (計 2 件)

- ① 木本悠作(発表者), 都築巧, 井上和生 クラス B スカベンジャー受容体に対するリガンド結合評価のための *in vitro* アッセイ系の確立, 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 16 日, 名城大学天白キャンパス 愛知県 名古屋市

- ② 都築巧 (発表者), CD36 ligand activities of flavor volatiles in foods with an aldehyde moiety: identification of saturated aliphatic aldehydes with 9-16 carbon atoms as potential ligands of the receptor. 2018 256th American Chemical Society National Meeting. 2018年8月21日, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, MA, USA (Invited Lecture)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 井上 和生
ローマ字氏名 : (INOUE, kazuo)
所属研究機関名 : 京都大学
部局名 : 大学院農学研究科
職名 : 教授
研究者番号 (8桁) : 80213148

研究分担者氏名 : 山崎 正幸
ローマ字氏名 : (YAMASAKI, masayuki)
所属研究機関名 : 龍谷大学
部局名 : 農学部
職名 : 准教授
研究者番号 (8桁) : 80397562

研究分担者氏名 : 真鍋 祐樹
ローマ字氏名 : (MANABE, yuki)
所属研究機関名 : 京都大学
部局名 : 大学院農学研究科
職名 : 助教
研究者番号 (8桁) : 20730104

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。