

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780129

研究課題名（和文）骨格筋における脂肪酸結合タンパク質の生活習慣病における役割と関連分子の探索

研究課題名（英文）The role of fatty acid binding protein 3 in life-style related diseases

研究代表者

楠堂 達也 (KUSUDO TATSUYA)

中部大学・生命健康科学部・助手

研究者番号：00460535

研究成果の概要（和文）：

脂肪酸結合タンパク質 (FABPs) は細胞内で脂溶性物質の輸送に関与している。本研究では FABP3 が生活習慣病の病態発症に果たす役割の解明を目的として検討を行った。その結果、FABP3 の発現が AMPK→AS160 のシグナルを介して骨格筋細胞の糖取り込みを上昇させることを明らかにした。また、細胞内で FABP3 と相互作用する分子について検討し、いくつかの分子を同定した。さらに生活習慣病と FABP3 との関連について検討するためのツールとして遺伝子改変マウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：

Fatty acid binding protein 3 is an intracellular translocator of lipids. We have investigated the relationship between FABP3 expression and life-style related diseases. In this study, we showed that an increase in FABP3 expression in C2C12 myotube stimulates AS160 phosphorylation and glucose uptake via AMPK activation. And we also identified several proteins that interact with FABP3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子生物学、予防医学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：FABP3、糖脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸やその誘導体は生体内におけるエネルギー源、あるいは生体内でのシグナル分子(リガンド)として重要な役割を果たしている。これら脂溶性分子は、様々な生理作用を示すことから医薬品や機能性食品成分として盛んに研究・探索がなされている。一方、それら脂溶性分子の輸送やトラフィッキングについては生理機能を発揮する上で重要

であるにもかかわらず研究が遅れている。脂肪酸などの脂溶性分子は遊離した状態ではほとんど存在できない。従って、体内での循環、細胞内への取り込み、及び輸送は、アルブミンやFABPsなどの脂肪酸結合タンパク質に依存しており、生理機能を発揮する上でも脂肪酸結合タンパク質が重要な役割を果たしていると考えられる。

FABPs は脂肪酸などの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、細胞内への脂質の取り込み、細胞内での輸送、代謝、及び酵素活性などに関与していると考えられている。近年、FABPsは脂肪酸や脂質メディエーターの細胞内での伝達を調節することによって Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) などの脂質応答性の核内受容体や c-Jun N-terminal Kinase (JNK) などのシグナルを制御する役割を果たしていることが報告されており、細胞応答における制御因子としての働きが注目されている。

FABP3は心筋と骨格筋に多く発現している FABP 分子種であり、FABP3 欠損マウスは運動持続能力や骨格筋での脂肪酸利用が低下することから骨格筋におけるエネルギー利用に重要な働きをすることが示唆されている。これまでの研究で我々は、FABP3 が通常では発現のみられない褐色脂肪組織に高脂肪食摂取により誘導されることや、骨格筋における FABP3 の発現が体重や内臓脂肪重量と相関するという結果を得ており、

また、マウス筋芽細胞である C2C12 を用いた実験からも、FABP3 の発現上昇がインスリン抵抗性の改善、及び脂肪酸燃焼の促進に働くという結果を得ている。これらのことから、FABP3 は骨格筋においてエネルギー代謝に関与するだけでなく、生活習慣病の発症にも積極的な役割を果たしているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、生活習慣病の病態発症に果たす FABP3 の役割を明らかにすることを目的とし、FABP3 が骨格筋においてインスリン抵抗性改善作用や脂肪酸燃焼促進作用を発揮するメカニズムの解明、及び FABP3 と相互作用するタンパク質についての検討を行った。さらに、骨格筋特異的な FABP3 トランスジェニックマウスを作製しエネルギー代謝の面から解析を行った。

3. 研究の方法

本研究で用いる FABP3 は心筋、骨格筋に特異的に発現している分子種である。そこで、実験にはマウス筋芽細胞である C2C12 を使用した。本細胞は低血清下で筋管を形成するだけでなく、パルミチン酸で処理することによりインスリン抵抗性を惹起することができるため、本研究に適していると考えられる。また、筋管に分化させた C2C12 細胞に FABP3 を発現させるための手段としては FABP3 発現アデノウイルスを使用した。

(1) FABP3 の発現上昇が糖代謝に与える影響とシグナル経路の解析

① 糖取り込みへの影響の測定

筋管に分化させた C2C12 細胞に FABP3 発現アデノウイルスを用いて FABP3 を発現させた。48 時間後に放射性 2-デオキシグルコースを添加し、10 分間取り込ませた。その後、放射活性を測定した。

② シグナル経路の検討

筋管に分化させた C2C12 細胞に FABP3 発現アデノウイルスを用いて FABP3 を発現させた。48 時間後に 0.5 mM パルミチン酸を添加する群と添加しない群に分け 16 時間処理した。その後、インスリン刺激を行った後、細胞を RIPA バッファーにて可溶化しサンプルを回収した。Akt、ERK、AS160、AMPK などのシグナル分子のリン酸化についてウエスタンブロットティングにて検討した。

(2) FABP3 と相互作用するタンパク質の同定

① Halo-tag 発現系の作製と安定発現株の樹立

Halo-tag 融合 FABP3 遺伝子を作製し、レトロウイルスベクターに組み込んだ。このベクターを用いてレトロウイルスを作製し、C2C12 細胞に感染させることで、Halo-tag 融合 FABP3 安定発現 C2C12 細胞を得た。

② Halo-tag を用いた Pull down assay

Halo-tag 融合 FABP3 安定発現 C2C12 細胞を分化させた。十分に筋管を形成させた後、セルスクレイパーにて細胞を回収し、ダウンス型ホモジナイザーで細胞を破壊することで抽出液を得た。抽出液に Halo-tag 特異的結合ビーズを作用させた。ビーズを洗浄後、吸着成分を回収し、SDS-PAGE で展開した。

③ FABP3 と相互作用する分子の同定

②の結果得られたゲルより、FABP3 特異的に検出されたバンドを切り抜いた。ゲル内消化を行い、ペプチドを抽出し LC-MS/MS にて同定を行った。

(3) FABP3 のリガンド依存的核移行の検討

Halo-tag 融合 FABP3 安定発現 C2C12 細胞を分化させた。十分に筋管を形成させた後 Halo-tag に結合する蛍光リガンドを取り込ませた。洗浄後、細胞に Palmitate、Retinoic acid、GW901516 (PPAR α リガンド)、Wy14693 (PPAR δ リガンド)、BRL49653 (PPAR γ リガンド) を添加し、標識 FABP3 の細胞内局在性を蛍光顕微鏡にて観察した。

(4) 骨格筋特異的 FABP3 過剰発現 トランスジェニックマウス (FABP3-Tg) の作製と代謝解析

① FABP3-Tg マウスの作製

骨格筋特異的に FABP3 遺伝子を発現させるために、ヒト α アクチンプロモーターにヒト FABP3 遺伝子を連結しトランスジーンを作製した。培養細胞を用いてトランスジーンが機

能することを確認した後、本トランスジーンをマウス胚にマイクロインジェクションし、骨格筋特異的 FABP3 過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。

② FABP3-Tg マウスの代謝解析

呼吸ガス分析装置を用いて、骨格筋特異的 FABP3 過剰発現トランスジェニックマウスの代謝解析を行った。

4. 研究成果

(1) FABP3 の発現上昇が糖代謝に与える影響とシグナル経路の解析

① 糖取り込みへの影響

FABP3 の発現が骨格筋のグルコース取り込みに与える影響を 2-デオキシグルコースを用いて検討した。その結果、FABP3 の発現は分化した C2C12 のグルコース取り込みを上昇させた (図 1)。一方で、FABP3 の発現はインスリン刺激による糖取り込みの上昇には影響を与えなかったことから、FABP3 は C2C12 細胞の基底レベルの糖取り込みを上昇させると考えられた。

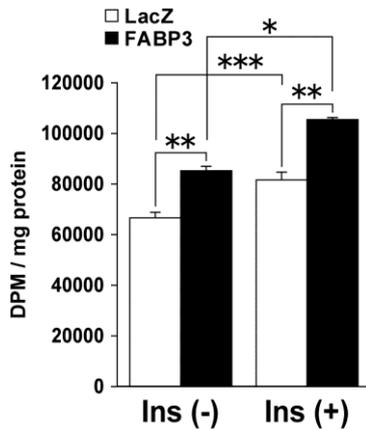


図 1. 糖取り込みへの影響

② シグナル経路の検討

FABP3 が分化した C2C12 細胞のグルコース取り込みを上昇させるメカニズムについての検討するために。糖代謝に関連するシグナルについてウエスタンブロッティングによって検討した。

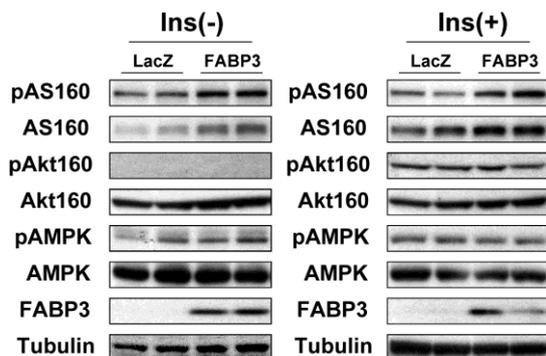


図 2. シグナル解析 1

その結果、グルコース取り込みに重要な役割を果たす AS160 のリン酸化が FABP3 の発現により上昇していた (図 2)。また、インスリン非添加の条件で AMPK のリン酸化の上昇が見られた。インスリン非添加の条件下での AS160 のリン酸化が AMPK を介しているかどうかを検討するために、AMPK の阻害剤である Compound C を用いて検討したところ。AS160 のリン酸化は Compound C の添加によって抑制された (図 3)。従って、インスリン非添加条件下において FABP3 は AMPK を介して AS160 をリン酸化しグルコース取り込みを促進していると考えられた。

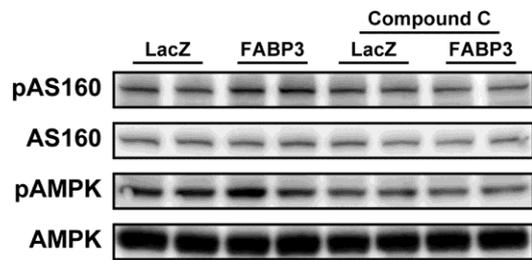
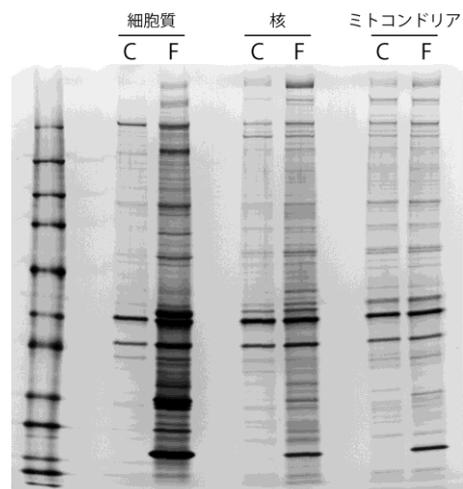


図 3. シグナル解析 2

(2) FABP3 と相互作用するタンパク質の同定

FABP3 と相互作用するタンパク質を得るために、抗 FABP3 抗体を用いた免疫沈降、及び GST-FABP3 融合タンパク質を用いた Pull down assay を行った。しかしながら、非特異的なバンドが多く、FABP3 が特異的に相互作用するタンパク質を得ることはできなかった。そこで、Halo-tag を用いた実験系を構築した。

Halo-tag 融合 FABP3 遺伝子を作製し、トロウイルスベクターを用いて Halo-tag 融合 FABP3 を C2C12 細胞に安定発現させた。この細胞株を用いて Pull down assay を行った (図 4)。



C: control, F: FABP3

図 4. Halo-tag を用いた Pull down assay

その結果、Halo-tag 融合 FABP3 に特異的なバンドが複数検出された。検出されたバンドを切り抜き、ゲル内消化を行い LC-MS/MS を用いて解析した。その結果、Tubulin、HSP などが同定された。Tubulin は微小管の構成因子であり、モータータンパク質であるダイニンやキネシンなどの足場として働くことが知られている。FABP3 は脂溶性リガンドの細胞内輸送を担っていることから、今回の知見は FABP3 が単なる拡散によって脂溶性物質を輸送しているのではなく、微小管をレールとした厳密な輸送を行っている可能性を示すものであると考えられる。

(3) FABP3 のリガンド依存的核移行の検討

FABP3 がリガンド依存的な細胞内移行を示すことを Halo-tag を用いて検討した。蛍光リガンドにて FABP-Halo を標識した後、Palmitate、Retinoic acid、GW901516、Wy14693、BRL49653 を添加し、標識 FABP3 の局在性を蛍光顕微鏡にて観察した (図 5)。

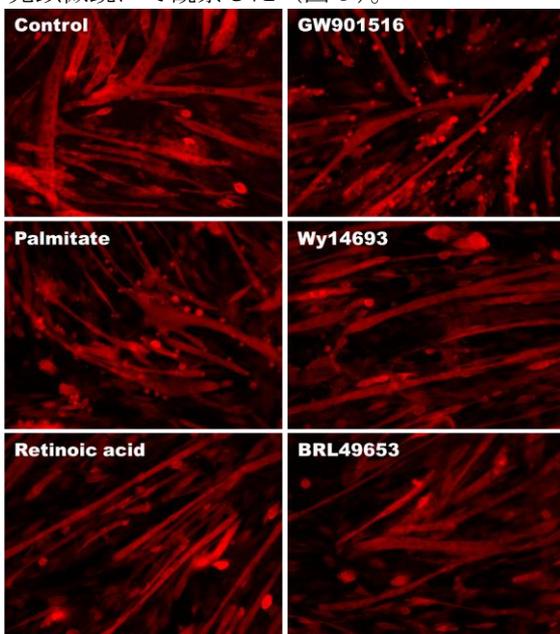


図 5. FABP3 のリガンド依存的核移行

リガンドを添加しない条件下では、FABP3 は細胞質内にとどまっていたが、Palmitate や Retinoic acid などの脂肪酸を添加することにより、FABP3 は速やかに核内へと移行した。また、FABPs は PPARs などの核内受容体のリガンドを輸送していることが報告されている。そこで PPAR リガンドの影響を検討した。PPAR α 、 δ のリガンドである GW901516、Wy14693 を添加した場合には FABP3 の核内移行が観察されたが PPAR γ のリガンドである BRL49653 の添加では核内移行は観察されなかった。以上の結果から、FABP3 は脂溶性物質と結合し、それをランダムに輸送しているのではなく、リガンド依存的に選択的な細胞内輸送をしていると考えられた。従って、

FABP3 は骨格筋において細胞応答制御に重要な働きをしていると考えられた。

(4) 骨格筋特異的 FABP3 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と代謝解析

骨格筋における FABP3 の発現上昇の生活習慣病に対する役割を in vivo で検討するために、骨格筋特異的な FABP3 発現トランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンを作製しマウス胚にマイクロインジェクションしたところ 4 匹のファウンダーマウスが得られ、現在ライン化を行っている。FABP3 過剰発現によるエネルギー代謝への影響を見るために、呼気ガス分析を行ったところ、通常飼育条件下では野生型とトランスジェニックマウスの間で有意な差は認められなかった。今後、高脂肪食摂食試験などを行うことで、生活習慣病の病態発症における FABP3 の役割を明らかにできると期待される。

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 1 件)

- ① Kusudo T, Kontani Y, Kataoka N, Ando F, Shimokata H, Yamashita H. Fatty acid-binding protein 3 stimulates glucose uptake by facilitating AS160 phosphorylation in mouse muscle cells. *Genes to Cells*, 2011; 16(6) 681-691、査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 楠堂 達也、片岡 直也、山下 均、骨格筋の細胞内代謝における脂肪酸結合タンパク質 3 の役割の検討、日本農芸化学会 2012 大会 (2012/4/京都)
- ② 楠堂 達也、片岡 直也、山下 均、生活習慣病の発症における脂肪酸結合タンパク質 3 の役割の検討、第 31 回日本肥満学会 (2011/9/淡路島)
- ③ 楠堂 達也、片岡 直也、山下 均、生活習慣病の発症における脂肪酸結合タンパク質 3 の役割の検討、第 33 回日本分子生物学会年会 (2010/10/神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠堂 達也 (KUSUDO TATSUYA)
中部大学・生命健康科学部・助手
研究者番号：00460535

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し