

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500684

研究課題名（和文） メタボリック症候群を制御するリポ蛋白質受容体の活性化を促す食品因子の探索

研究課題名（英文） Role of lipoprotein receptors in the development of metabolic syndrome

研究代表者

金 東浩（KIM DONGHO）

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・講師

研究者番号：70326271

研究成果の概要（和文）：私たちは、新規のリポ蛋白質受容体である LRP10 を発見し、複数の食品因子がリポ蛋白質受容体ファミリーの機能発現を調節することを見出した。LRP10 は糖代謝や骨代謝を制御している Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の活性を阻害した。この結果は、LRP10 が糖代謝や骨代謝のフィードバック機構として作用することを示唆する。今後、リポ蛋白質受容体ファミリーを介する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の調節における食品因子の作用機構を明らかにすることは、メタボリック症候群を抑制できる鍵となると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Wnt signaling pathways play fundamental roles in the differentiation, proliferation and functions of many cells as well as developmental, growth, and homeostatic processes in animals. We demonstrate that LRP10, belonging the LDLR gene family, inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in HEK293 cells. The present studies suggest that LRP10 may interfere with the formation of the  $\beta$ -catenin/TCF complex and/or its binding to target DNA in the nucleus, and that the extracellular domain of LRP10 is critical for inhibition of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活科学

キーワード：食と栄養・メタボリック症候群・食品因子

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化が加速する現代社会において、メタボリック症候群は万人に起こりうる疾病であり、その抑制は急務の研究課題である。メタボリック症候群は、肥満、2型糖尿病、高脂

血症などの生活習慣病が重複して発症する病態を示し、それぞれの疾病が軽度であっても重篤な動脈硬化症を誘導し、致命的な心筋梗塞や脳梗塞の発症頻度を相乗的に増加させる。メタボリック症候群の発症には遺伝因子が関

与するが、食習慣の改善によって発症を遅らせる、または進行を抑えることができる。従って、メタボリック症候群の発症を抑制する食品因子を同定し、その分子機構を明らかにすることができれば、健全な食生活の構築に大きく寄与する。

食事として摂取したコレステロールや、体内で合成されたコレステロールは、低密度リポ蛋白質に結合して体内を循環し、細胞膜上に存在する低密度リポ蛋白質受容体 (LDLR) を介して細胞内に取り込まれる。低密度リポ蛋白質受容体は細胞内のコレステロール量を一定に保つセンサーとして働き、その遺伝子異常は人類で最も頻度の高い遺伝病の一つである家族性高コレステロール血症を引き起こす。しかし、近年、複数のリポ蛋白質受容体がクローニングされ、コレステロール代謝のみに関与すると思われていたリポ蛋白質レセプターが、肥満、高脂質血症、糖尿病、骨粗鬆症に大きく関与することが明らかとなった。即ち、超低密度リポ蛋白質受容体 (VLDLR) の機能異常は、肥満、高脂質血症に関与し、低密度リポ蛋白質受容体類似蛋白質 5 (LRP5) の機能異常は糖尿病、骨粗鬆症に関与する。これらの実験事実は、リポ蛋白質レセプターの機能異常が、複数の生活習慣病の発症を惹起し、メタボリック症候群を誘導することを強く示唆する。従って、メタボリック症候群を抑制する鍵は、リポ蛋白質レセプターの活性を制御することであり、その活性を有する食品因子を同定できればメタボリック症候群を抑制できると期待できる。

そこで本研究では、リポ蛋白質受容体の活性を調節する食品因子を迅速かつ鋭敏にスクリーニング出来る *in vitro* 実験系を構築した後、その分子機構の詳細を検討するとともに、*in vitro* で効果のみられた食品因子が *in vivo* でもリポ蛋白質受容体の活性を調節するか、更に、メタボリック症候群を実際に抑制することが出来るかを、各種の疾患モデル動物を用いて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、メタボリック症候群の発症に関わるリポ蛋白質受容体として LDLR、VLDLR、LRP5、LRP10 に注目し、解析を行う。LRP10 は私たちが最近発見した新規リポ蛋白質受容体であり、LRP10 を過剰に発現させると、LDLR、VLDLR、LRP5 の遺伝子発現が 2~3 倍亢進することを見出しており、LRP10 は他のリポ蛋白質受容体の発現調節を介してメタボリック症候群を制御する可能性があると考えている。

(1) リポ蛋白質受容体の活性を調節する食品因子の *in vitro* での同定

リポ蛋白質受容体の活性化調節は、①リポ蛋白質受容体の遺伝子発現の調節と、②リポ蛋白質受容体の情報伝達に関わるシグナル伝達経路の遺伝子発現の調節の調節、とによって制御されていると考えられる。そこで、①については株化動物培養細胞、またはラットから分離培養した初代培養細胞を用いることによって、②についてはリポ蛋白質受容体を過剰発現する細胞を用いることによって、リポ蛋白質受容体の活性を調節する食品因子をスクリーニングできる。

(2) リポ蛋白質受容体ファミリーによる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の制御

リポ蛋白質受容体ファミリーのうち LRP5、LRP6 は生体分子 Wnt の共役受容体として機能している。Wnt は糖代謝や骨代謝に関与し、糖尿病や骨粗鬆症の発症に重要な役割を担っている。また、私たちが発見した LRP10 遺伝子について、細胞質ドメインに結合する脳内アダプタータンパク質の探索実験から、LRP10 遺伝子は Wnt シグナル伝達に関与することが示唆された。Wnt シグナル伝達の制御は糖代謝の制御につながり、メタボリック症候群の予防に繋がると考えられる。そのため今回の研究では、Wnt シグナルの中でも典型的なシグナル経路であり、Wnt3a によって活性化される Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路に注目し、リポ蛋白質受容体ファミリーによる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路調節機構を解析した。

(3) LRP10 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達制御の分子機構

私たちがクローニングした LRP10 は、LRP5 や LRP6 と同じリポ蛋白質受容体ファミリーに属すにもかかわらず、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制することが示されたので、LRP10 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路抑制の詳細な分子機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) リポ蛋白質受容体の活性を調節する食品因子の *in vitro* での同定

① 各リポ蛋白質受容体の cDNA を動物細胞発現ベクターへ挿入した組み換え体を作製し、株化動物培養細胞とラットから分離培養した初代培養細胞に導入し、過剰発現系を確立した。

② 各リポ蛋白質受容体に特異的な抗体を細

胞に反応させ、ライブセルイメージングシステムを用いてリアルタイムで観察し、発現量と細胞内局在を確認した。

③ 株化動物培養細胞とラットから分離培養した初代培養細胞 (a. リポ蛋白質受容体の発現調節)、上記②で作製した過剰発現細胞 (b. リポ蛋白質受容体を介するシグナル伝達系調節) を 96 ウェルのプレートに培養し、様々な食品因子を添加後、数時間または数日間培養し、mRNA を精製した。各条件下での発現量解析はリアルタイム PCR により行った。以上により、a、b を担う食品因子の同定を行った。

(2) リポ蛋白質受容体ファミリーによる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の制御

① 各リポ蛋白質受容体ファミリー遺伝子の cDNA を動物細胞発現ベクターへ挿入した組み換え体を作製した。

② TCF レポータープラスミド (TOP-Flash) を、Wnt3a 遺伝子または上記で作製したリポ蛋白質受容体ファミリー遺伝子と共に HEK293 細胞にトランスフェクションし、TCF 活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

(3) LRP10 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達制御の分子機構

① LRP10 遺伝子をトランスフェクションした HEK293 細胞に GSK-3 $\beta$  のリン酸化を抑制する LiCl を添加し、TCF 活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

②  $\beta$ -catenin のユビキチン化部位にミューテーションを起こし、ユビキチン化を受けない活性型  $\beta$ -catenin 遺伝子を HEK293 細胞にトランスフェクションし、TCF 活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

③ LRP10 遺伝子を導入した細胞に LiCl を添加し、回収した細胞を細胞質と核に分画し、それぞれに含まれる  $\beta$ -catenin の量を免疫染色法により解析することで、 $\beta$ -catenin の核への移行について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 複数の食品因子がリポ蛋白質受容体の活性を調節した

各リポ蛋白質受容体ファミリー遺伝子が過剰発現する細胞の作製に成功し、それぞれのリポ蛋白質受容体の過剰発現によって、他のリポ蛋白質受容体の発現が増加あるいは減少することが分かった。また、複数の食品因子がリポ蛋白質受容体ファミリーの発現を調節することが分かった。現在、これらの実験結果については現在論文を作成中であり、現段階では詳細な結果は公表出来ない。

(2) LRP10 と ApoER2 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制した

HEK293 細胞に Wnt3a 遺伝子を投入すると Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を介して TCF の転写は活性化するが、LRP10 や ApoER2 遺伝子を同時に導入すると TCF の転写活性は抑制された (図 1)。

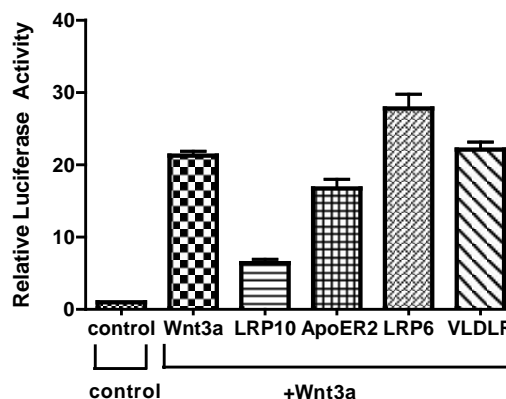


図 1. Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路におけるリポタンパク質レセプターファミリーの影響

(3) LRP10 は TCF 転写因子の活性化を阻害し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制した

Wnt シグナルの情報伝達は  $\beta$ -catenin を介して行われ、 $\beta$ -catenin のリン酸化、ユビキチン化、核内移行阻害、TCF 転写因子の活性化阻害のいずれかによって抑制される。そこで、HEK293 細胞に LiCl の添加、または活性型  $\beta$ -catenin の導入し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を活性化したところ、TCF 転写活性は上昇したが、LRP10 はその活性を抑制した (図 2, 3)。

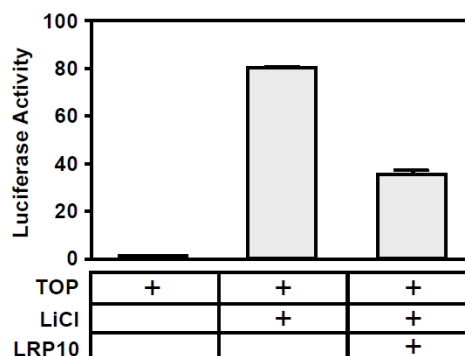


図 2. LiCl の添加により活性化した Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達における LRP10 の影響

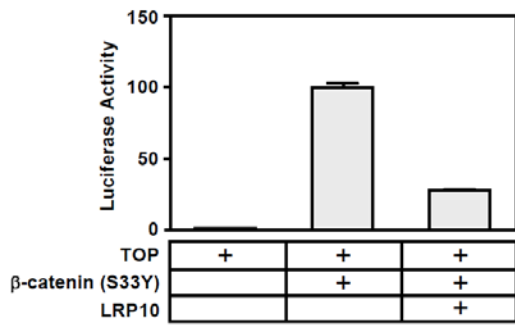


図 3.  $\beta$ -catenin のユビキチン化阻害により活性化した Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達における LRP10 の影響

また、LRP10 遺伝子を導入した細胞に LiCl を添加し、回収した細胞を細胞質と核に分画し、それぞれに含まれる  $\beta$ -catenin を免疫染色したところ、LRP10 は  $\beta$ -catenin の核内への移行も阻害しなかった (図 4)。

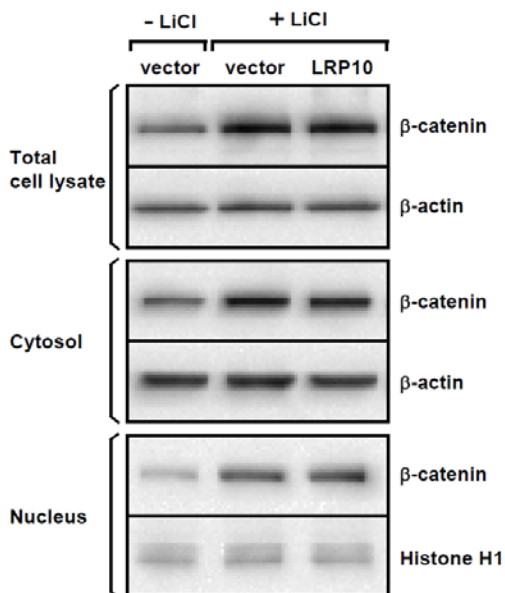


図 4. LiCl の添加により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達を活性化した時の細胞内の  $\beta$ -catenin 分布における LRP10 の影響

以上の結果から、LRP10 は TCF 転写因子の活性化を阻害し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制すると考えられる。TCF 転写因子の活性化阻害には、核での  $\beta$ -catenin と TCF の結合阻害と  $\beta$ -catenin/TCF 複合体とそのターゲット遺伝子との結合阻害の二つが想定される。今後、LRP10 による  $\beta$ -catenin と TCF の結合阻害と  $\beta$ -catenin/TCF 複合体とそのターゲット遺伝子との結合阻害について検討する必要があると考えられる。

本研究により、リポ蛋白質受容体ファミリーのうち LRP10 や ApoER2 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制することが示された。このことから、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路は LRP5、LRP6 によって活性化し、LRP10 や ApoER2 によって抑制されることにより、恒常性が維持される、また、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路に対する作用が、構造が類似したリポタンパク質レセプターであっても、その種類によって全く異なることを示している。

今後、LRP10 を含むリポ蛋白質受容体ファミリー遺伝子の機能発現を調節する食品因子の作用機構を明らかにすることはメタボリック症候群を抑制できる鍵となると期待できる。

## 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 5 件)

- ① Hosoda A, Inoue T, Mao CC, Jeong YH, Yamagishi A, Ye M, Yamamoto T, Kim DH, Saeki S, Polymorphisms in the human apolipoprotein E receptor 2 gene in Japanese sporadic Alzheimer's disease patients, *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 74(3), 2010, pp.677-679
- ② Jeong YH, Sekiya M, Hirata M, Ye M, Yamagishi A, Lee SM, Kang MJ, Hosoda A, Fukumura T, Kim DH, Saeki S, The low-density lipoprotein receptor-related protein 10 is a negative regulator of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 392, 2010, pp.495-499
- ③ Jeong YH, Ishikawa K, Someya Y, Hosoda A, Yoshimi T, Yokoyama C, Kiryu-Seo S, Kang MJ, Tachibana T, Kiyama H, Fukumura T, Kim DH, Saeki S, Molecular characterization and expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein-10, a new member of the LDLR gene family, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 391, 2010, pp. 1110-1115
- ④ Lee SM, Jeong YH, Kim HM, Park HY, Yoon D, Kim DH, Saeki S, Moon SJ, Kang MJ, Presenilin enhancer-2 (PSENEN), a component of the gamma-secretase complex, is involved in adipocyte

differentiation, Domestic Animal Endocrinology, 査読有, 37, 2009, pp. 170-180

- ⑤ Jeong YH, Lee SM, Kim HM, Park HY, Yoon D, Moon SJ, Hosoda A, Kim DH, Saeki S, Kang MJ, Cloning, expression, and regulation of bovine cellular retinoic acid-binding protein-II (CRABP-II) during adipogenesis, American Journal of Animal Science, 査読有, 21(11), 2008, pp.1551-1588

[学会発表] (計 12 件)

- ① 平田 倫子, リポ蛋白質受容体ファミリーによる Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路の阻害機構, 第63回日本栄養・食糧学会大会, 2009年5月22日, 長崎
- ② 叶 明娵, メタボリック症候群モデル動物における体内時計遺伝子と脂質代謝関連遺伝子の発現解析, 第63回日本栄養・食糧学会大会, 2009年5月22日, 長崎
- ③ Dong-Ho Kim, The LDL Receptor Gene Family with New Physiological Functions Involved in Development of Metabolic Syndrome: International Symposium for Exchange Program between Yeungnam University and Osaka City University, November 7, 2008, Kyung-San, Korea
- ④ 佐伯 茂, メタボリックシンドローム発症時における肝臓体内時計関連遺伝子の発現解析, 第 58 回日本生理人類学会, 2008 年 6 月 7 日, 大阪
- ⑤ 福村 智恵, メタボリックシンドロームの脂質代謝に対する植物性タンパク質摂取の影響, 第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 2008 年 5 月 3 日, 埼玉
- ⑥ 金 哲民, OLETF ラットにおける体内時計関連遺伝子と脂質代謝関連遺伝子の発現解析, 第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 2008 年 5 月 3 日, 埼玉
- ⑦ 丁 英姫, リポ蛋白質レセプターファミリー遺伝子による Wnt シグナル伝達の調節機構, 第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 2008 年 5 月 3 日, 埼玉
- ⑧ 金 哲民, メタボリックシンドローム発症モデル動物における体内時計関連遺伝子の発現解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2008 年 3 月 28 日, 名古屋
- ⑨ 関屋 麻奈美, リポ蛋白質レセプターファミリーを介するシグナル伝達機構の解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2008 年 3 月 28 日, 名古屋
- ⑩ 金 東浩, 生体機能調節に果たすリポ蛋白質

受容体ファミリーの役割, 日本農芸化学会 2008 年度大会 (招待講演), 2008 年 3 月 28 日, 名古屋

- ⑪ Shigeru Saeki, The LDL Receptor Gene Family with New Physiological Functions Involved in Development of Life-Style Related Diseases, 2007 International Symposium and Annual Meeting (Metabolic Syndrome and Functional Foods), October 19, 2007, Muju, Korea
- ⑫ 丁 英姫, リポ蛋白質受容体ファミリーの脳神経系における機能解析, 第 61 回日本栄養・食糧学会大会, 2007 年 5 月 20 日, 京都

[図書] (計 1 件)

佐伯 茂, 金 東浩: 日本医事新報, 脂質代謝の日内変動, 日本医事新報社, No. 4387, pp. 87 - 88 (2008)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金 東浩 (KIM DONGHO)  
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・講師  
研究者番号: 70326271

### (2) 研究分担者

佐伯 茂 (SAEKI SHIGERU)  
大阪市立大学・大学院生活科学研究科・准教授  
研究者番号: 60211926

細田 明美 (HOSODA AKEMI)  
東京医療保健大学・医療保健学部・助手  
研究者番号: 40449418

(H19→H20: 連携研究者)

山岸 あづみ (YAMAGHISI AZUMI)  
山形大学・地域教育文化学部・助教  
研究者番号: 00400513

(H19→H20: 連携研究者)

### (3) 連携研究者

なし