

機関番号：12605

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580302

研究課題名 (和文) 鶏肝臓における新規脂質シグナルの転写調節メカニズム解析  
—高機能性食肉生産の基盤—

研究課題名 (英文) Study on a novel lipid signaling pathway and that possible regulatory mechanism in chicken hepatocytes -Basal knowledge for production of functional meats-

研究代表者

佐藤 幹 (SATO KAN)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20250730

研究成果の概要 (和文)：

家畜・家禽の脂肪細胞の容量を決定する VLDL の本体である apolipoprotein B は、通常、post-transcriptional regulation (apolipoprotein B 蛋白質の細胞内分解) によって制御されていることが知られている。本研究では、apolipoprotein B の遺伝子発現を制御する肝臓の新たな脂質シグナル制御機構を明らかにすることを試みた。本研究では、まず、この応答が生理的な in vivo の状況でも起きていることを確認した。次に、初代肝細胞を用いて、プロモーターアッセイを行ったところ、apolipoprotein B のプロモーター領域-200bp および-1000～-2000bp の2カ所に応答領域が存在することが明らかとなり、新たなシグナル経路であることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Apolipoprotein B (apoB) is an integral protein component of very low density lipoprotein (VLDL), a key regulator of fat mass in farm animals. ApoB mRNA expression and apoB protein synthesis in hepatocytes are relatively constitutive and generally does not change under conditions that alter apoB secretion. Therefore, VLDL assembly is regulated largely at co- and post-translational levels. In present study, we investigated the identification and characterization of novel lipid signaling pathway to impair the apoB mRNA synthesis. ApoB mRNA expression in chickens supplemented with octanoate (C8:0)- and decanoate (C10:0)-triacylglycerols in diets significantly decreased compared to that in control group. This result suggested that the impairment of apoB mRNA expression by medium chain fatty acids (MCFAs) in chicken causes in normal and physiological condition in chickens. The two MCFAs responsible elements were determined in chicken apoB promoter, which was cited in -200 and -1000~-2000bp from coding region. These results clearly show a novel lipid signaling pathway, which is associated by MCFAs, and the signaling impaired apoB mRNA expression in chicken hepatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：代謝・内分泌制御

## 1. 研究開始当初の背景

畜産食品（食肉・卵・乳）は良質なタンパク質の供給源である。その反面、動物性食品の過剰摂取はヒトの肥満や糖尿病・動脈硬化症の発生の要因となっていることも見逃せない。将来の人類の健康増進・疾病予防を食の面から保証するために、「安全性・疾病予防性をもつ高品質機能性畜産食品の生産システム」を開発することが必須である。これには2つのアプローチがあり、一つは、低脂肪食肉などの食肉を根本から変える手法と、機能性物質を食肉に移行させる手法である。

低脂肪食肉の生産を考えた場合、家畜・家禽の脂肪蓄積を決定する因子である apolipoprotein B(apoB)について考えなければいけない。apoBの遺伝子発現は、一般に実験動物においても栄養素では修飾されないと考えられてきた。しかし我々は、これまでに中鎖脂肪酸に分類されるオクタン酸(C8)・デカン酸(C10)が、鶏肝実質細胞のapoB遺伝子発現を直接抑制するユニークな作用を持つことを発見してきた。この結果は、オクタン酸・デカン酸が新たなシグナルを制御する因子（脂質シグナル）であることを強く示唆するものである。

オクタン酸、デカン酸は、ヒトの抗肥満にも有効であることが知られている。すなわち、家畜・家禽に中鎖脂肪酸を与え、そのメカニズムを解明し、低脂肪食肉の基盤とともに、中鎖脂肪酸を移行させた高機能性食肉生産の基盤ともなる。

## 2. 研究の目的

本研究では、家禽肝臓におけるオクタン酸・デカン酸の脂質シグナルによる転写調節機構の詳細なメカニズムを *in vivo* および *in vitro* で明らかにするとともに、「脂質シグナルー転写因子のクロストークー機能性食肉の生産」という新たな畜産の技術基盤を構築することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) *In vivo* 試験

①**試験 1-1(中鎖脂肪の短期投与試験)**：我々がこれまで確立してきた血漿中の特定脂肪酸濃度を上昇させる実験系を使用して、血漿中の中鎖脂肪酸濃度を上昇させた場合の、VLDL-apoB 代謝の様相を探る。すなわち、14日齢のプロイラーオスを供試し、24h絶食後6hおきに3回10g/kg体重のオクタン酸(C8)およびデカン酸(C10)のトリグリセリド(TG)を6時間おきに3回強制給与し、最後の給与から12時間後にサンプリングを行う。

パルミチン酸(C16)のTGをコントロールとして測定する。

②**試験 1-2(高脂肪給与時における中鎖脂肪給与試験)**：血漿中VLDL濃度を上昇させた条件下における中鎖脂肪の影響を観察するために、高脂肪（コレステロール1%, TG10%）を含む精製飼料のTG部分をオクタン酸(C8)TG、デカン酸(C10)TG、パルミチン酸(C16)TG主体の油脂にそれぞれ置き換えた3区を設定し、2週間 pair feeding 後のVLDL-apoB代謝の様相を検討する。

③**試験 1-3(精製飼料を用いた中鎖脂肪給与試験)**：試験2の飼料からコレステロールを除去し、TGを8%に添加した精製飼料を作成し、試験1-2と同様に飼育してVLDL-apoB代謝の様相を検討する。

### (1) *In vitro* 試験

①**試験 2-1(apoBのpromoter解析)**：apoBのpromoter領域約2kbを各ゲノムからPCRで増幅する。得られた配列から様々な長さのデリション配列を作成し、pGL4.10(Luciferaseがレポーター, Promega)に挿入する。これをpGL4.74とともに鶏肝初代細胞 co-transfection して、デカン酸を添加した培地と無添加培地で培養した時のapoB遺伝子のpromoter解析を行い、その応答配列を決定する。

②**試験 2-2(転写因子と脂質シグナルのクロストーク解析)**：apoBのプロモーターを転写因子HNF-4 $\alpha$ とともに導入し、クロストークがあるかを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) *In vivo* 試験

①**試験 1-1(中鎖脂肪の短期投与試験)**：オクタン酸(C8:0)あるいはデカン酸(C10:0)のトリグリセリドを短期強制給与、すなわち絶食24h後に各トリグリセリドを強制給与した12h後の肝臓apoB mRNA発現量は、パルミチン酸(C16:0)トリグリセリドを強制給与した鶏より有意に低下した。さらに、肝臓mRNA発現量は、24h絶食した鶏に比べ低い値を示した。肝臓apoB mRNA発現量と同様に、血中VLDL-apoB濃度は中鎖脂肪の強制給与により有意に減少した。また、他の脂質代謝関連遺伝子発現では、SREBP-1, 2 およびHNF-4 $\alpha$  mRNA発現は、中鎖脂肪酸給与により有意に低い値を示したが、他の遺伝子(FXRおよびLXR)に中鎖脂肪給与の影響は認められなかった。

②**試験1-2(高脂肪給与時における中鎖脂肪給与試験)**：高脂肪飼料にオクタン酸・デカン酸トリグリセリドを添加した飼料を給与すると、試験1-1(中鎖脂肪の短期投与)と同様に、肝臓apoB mRNA発現量と血中VLDL-apoB濃度が中鎖脂

肪給与により有意に低下した。

### ③試験 1-3(精製飼料を用いた中鎖脂肪給与試験) :

中鎖脂肪添加飼料で、血中 VLDL-apoB 濃度は有意に低下したものの、肝臓の apoB mRNA 発現に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、中鎖脂肪は in vivo において肝臓 apoB mRNA 発現とそれに続く VLDL-apoB 分泌を低下する作用があること、中鎖脂肪による VLDL-apoB 分泌低下作用は油脂の給与形態、飼料組成条件に依存することなく認められること、中鎖脂肪の他の脂肪酸とは異なる特徴的作用である肝臓 apoB mRNA 発現調節作用は、生体内のリポタンパク代謝が活性化した条件下でのみ現れることが明らかとなった。さらに、中鎖脂肪による肝臓 apoB mRNA 発現低下機構は、転写因子である HNF-4 $\alpha$  を直接的要因とし、SREBP もその制御機構に関与している可能性が示唆された。

### (2)In vitro 試験

#### ①試験 2-1(apoB の promoter 解析)

デカン酸による鶏初代肝細胞の apoB mRNA 抑制機構を明らかにすることを目的として、apoB のプロモーター領域(約2000bp)を鶏ゲノムより抽出し、各種のデリベーションミュータントを作成し、これを pGL4.10 にコンストラクトした。次に、鶏肝細胞に、リポフェクションでコンストラクトを pGL4.74 とともに導入し、Dual-Luciferase Reporter Assay を行なった。その結果、転写開始点より -200bp に応答領域が同定され、3箇所の HNF4- $\alpha$  結合推定領域が認められた。本実験系の細胞の mRNA 発現を調べたところ、HNF4- $\alpha$  の遺伝子発現低下が認められたものの、SREBP-1 の遺伝子発現には、デカン酸は影響しないことが明らかとなった。さらに、EMSA と Western blot による解析から、デカン酸は核内 HNF4- $\alpha$  のタンパク質を減少させることが明らかとなった。よって、デカン酸は HNF4- $\alpha$  の核内蛋白量を介して apoB promoter 領域に応答して apoB 遺伝子発現を抑制する可能性が明らかとなった。

#### ②試験 2-2 (転写因子と脂質シグナルのクロストーク解析) :

apoB の promoter を HNF4- $\alpha$  とともに導入したところ、HNF4- $\alpha$  に依存しない、新たな応答領域が -2,000~-1,000bp に存在することが明らかとなった。よって、脂質によるシグナルは、単一の分子や配列で制御されているのではなく、複合的な制御を受けていることが明らかとなった。

以上の結果から、新たな脂質シグナルとして

HNF4- $\alpha$  を介した(-200bp)、あるいは、未同定の新たな調節領域を介した(-1,000~-2,000bp) apoB 遺伝子発現制御機構を明らかにすることができた。残念ながら、本研究では、そのすべてを解析することはできなかったが、中鎖脂肪酸による脂質代謝制御シグナルの存在を世界ではじめて確定することができた。すなわち本研究は、中鎖脂肪による体脂肪蓄積低下作用の作用機構には、HNF4- $\alpha$  等の調節に基づく肝臓の VLDL-apoB 分泌が関与するとの、新たな機能性を提示するものである。

### 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7件)

- ① Sato K, Kamada T. Regulation of bile acid, cholesterol, and fatty acid synthesis in chicken primary hepatocytes by different concentrations of T0901317, an agonist of liver X receptors. *Comp Biochem Physiol A*. 158. 201-206. 2011. 査読有
- ② Sato K, Seol HS, Kamada T. Tissue distribution of lipase genes related to triglyceride metabolism in laying hens (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol B*. 155. 62-66. 2010. 査読有
- ③ Sato K, Suzuki K., Akiba Y. Characterization of chicken portomicron remnant and very low density lipoprotein remnant. *Journal of Poultry Science*. 46. 35-39. 2009. 査読有
- ④ Sato K, Yonemura T, Ishii H, Toyomizu M, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in chicken adipogenesis. *Comp Biochem Physiol A*. 154. 370-375. 2009. 査読有
- ⑤ Sato K, Takahashi K, Tohno M, Miura Y, Kamada T, Ikegami S, Kitazawa H. Immunomodulation in gut-associated lymphoid tissue of neonatal chicks by immunobiotic diets. *Poultry Science*. 88. 2532-2538. 2009. 査読有
- ⑥ Sato K, Matsushita, K., Matsubara, Y., Kamada, T., Akiba, Y. Adipose tissue fat accumulation is reduced by a single intraperitoneal injection of PPAR $\gamma$  agonist when given to newly hatched chickens. *Poultry Science*. 87. 2281-2286. 2008. 査読有
- ⑦ Sato K, Seol HS, Sato K, Kamada T, Akiba Y. Molecular characterization and expression of angiopoietin-like protein 3 in the chicken, *Gallus gallus*. *Gen. Comp. Endocrinology*. 158. 102-107. 2008. 査読有

[学会発表] (計0件)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 幹 (SATO KAN)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20250730