

機関番号：13601

研究種目：基盤研究 (C)

研究機関：2008～2010

課題番号：20580304

研究課題名(和文) 反芻動物の脂肪細胞形成に関与する脂溶性シグナル分子の探索およびその機能解析

研究課題名(英文) Search and the functional analysis of lipophilic signaling molecule as a regulator of adipogenesis in the ruminants.

研究代表者

佐々木晋一 (SASAKI SHIN-ICHI)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：00003682

研究成果の概要(和文)：現在、反芻動物における詳細な脂肪細胞増殖・分化制御機構は不明である。そこで、反芻動物の脂肪細胞形成に関与する脂溶性シグナル分子の探索およびその機能解析を行った。その結果、反芻動物において VFA が内因性因子として、ラクトースウレイドが外因性因子として脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ -2 および脂質合成に関与する LXR α の遺伝子発現を制御し、脂肪細胞形成に深く関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：To date, the regulating mechanism of adipogenesis in the ruminants have not been clear. Therefore, we investigated the search and the functional analysis of lipophilic signaling molecule as a regulator of adipogenesis in the ruminants. In this study we demonstrated that VFA and lactoseureid are an intrinsic and an extrinsic factor, respectively, controlling the gene expression of PPAR γ -2 and LXR α in the ruminants, and VFA is a prominent inducer and regulator on the ruminant adipocyte differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：反芻動物、脂肪細胞分化制御、シグナル伝達、生理活性物質、核内転写因子

1、研究開始当初の背景

脂肪組織は、エネルギーの貯蔵臓器としてだけでなく、種々の生理活性物質を生成・分泌する内分泌器官として働いていることが明らかになっている。そのため、全身のエネルギーホメオスタシス、糖代謝・脂質代謝を維持する上で非常に重要な器官の一つである脂肪組織の生理機能を正常に保つことは、生体が生命活動を行う上で非常に重要である。ヒトにおいては、脂肪蓄積をコントロ

ールすることによる肥満や糖尿病等の生活習慣病の予防が重要視されている。また、畜産においては、反芻家畜の脂肪組織への脂肪蓄積の調節による肥育体質の改善や脂肪交雑は肉生産性の向上にとって重要である。

脂肪細胞は前駆脂肪細胞の増殖・分化によるものであり、増殖・分化を引き起こす種々の因子が現在までに明らかにされている。インスリンが脂肪細胞の増殖・分化を誘導することによりエネルギーホメオスタシスを保っていることは既によく知られている。我々

は、脂肪細胞においてインスリン情報伝達系における非反芻動物と反芻動物の違いの一端を既に明らかにし総説として発表している (Animal Science Journal, 2006, 77:472-477; Animal Science Journal, 2002, 73:421-431)。しかしながら、非反芻動物と反芻動物の脂肪細胞増殖・分化のメカニズムの違いは完全に明らかにされていない。本研究は、非反芻動物と反芻動物の脂肪細胞増殖・分化制御機構を明らかにするだけでなく、非反芻動物と反芻動物における脂溶性シグナル分子の分子種とその生理機能の相違を明らかにすることによって、非反芻動物と反芻動物の脂肪細胞増殖・分化過程のメカニズムの違いを分子レベルで明らかにできる可能性がある。これにより、ヒトにおける分子創薬の開発につながる点、さらには反芻家畜の脂肪蓄積の人為的コントロールによる産肉の効率化につながるものと考えられる。

生体における正常細胞の発生・増殖・分化には、上皮-間葉系細胞の相互作用が必須の役割を果たしている。脂肪前駆細胞は繊維芽細胞と共に脂肪組織に広く分布している間葉系間質細胞である。さらに脂肪細胞は内分泌細胞としての役割を果たしている。そのため、脂肪組織内で脂肪前駆細胞は脂肪細胞に隣接し、その増殖・分化の一部は脂肪細胞によって調節されていることが想定される。我々はこれまで、脂肪細胞分化・形成に関わるグレリン、GPCR43などを同定し、その制御機構について報告している (Endocrinology 2003, 144:754-759; Endocrinology 2006, 146:5092-5099)

脂肪細胞の増殖・分化は内外からの様々な刺激に応じて、それに関与する遺伝子群の発現を調節している。その刺激は多様であり、それら遺伝子の転写因子の活性制御に関わるメカニズムもまた多様である。脂溶性リガンド依存性の転写因子である核内レセプターは個体発生における形態形成、細胞の増殖・分化、代謝調節、炎症・免疫の制御など、生体の恒常性維持においてきわめて重要な機能を果たしている。核内転写因子の主たる機能であるリガンド依存的な正負の転写制御には、核内に局在するコアクチベーター・コリプレッサーを必要とする。現在までに、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ -2 (PPAR γ -2) は、15d-PGJ₂、9-HODE や 13-HODE を内因性リガンドとすることが明らかにされている。しかしながら、脂肪細胞には PPAR γ 2 だけではなく、さらに多くの核内レセプターが存在し、それらの転写因子活性化制御において、どのような物質が外因性あるいは内因性の活性化因子となっているのかは現時点では完全に明らかにされてはいない。それゆえ、この因子を探索し、脂

肪細胞の増殖・分化制御機構を明らかにすることは、高品質牛肉生産のために必要とされている。

そこで本研究は、反芻動物の脂肪形成に関与する脂溶性シグナル分子の探索およびその機能解析を行い、脂肪細胞増殖・分化の制御を明らかにするために企画されたものである。

2. 研究の目的

生体内や食餌中に存在している分子量 300 前後の脂溶性生理活性物質が核内受容体リガンドとして作用することが報告されている。これらの脂溶性シグナル分子は、核内レセプターを介して転写調節因子として、標的遺伝子群を転写レベルで調節している。しかしながら、オーファン核内レセプターも数多く存在し、そのリガンドの探索が必要であると考えられる。さらに、核内レセプターの中、非ステロイド受容体群はリガンドに対する特異性が低く、動物種間における相違も大きい。そのため、我々は、第一に脂肪細胞増殖・分化制御に関与する内・外因性リガンドをラット等の非反芻動物および反芻動物であるめん羊およびウシの脂肪細胞、さらには脂肪細胞の増殖・分化を研究する上で汎用されている 3 T3-L1 脂肪細胞を用いて探索し、候補因子を同定すること、第二にそれら因子がどの核内レセプターを介して脂肪細胞増殖・分化に関与する遺伝子群の転写調節を行っているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞分化過程における機能未知核内レセプターの発現パターンの解析

現在までに、核内レセプターはヒトにおいて 48 種類同定されている。その核内レセプターの脂肪細胞増殖・分化過程における発現パターンを非反芻動物であるラットと反芻動物である黒毛和種牛およびめん羊において比較検討およびその解析を行った。

(2) 脂肪前駆細胞の分化促進マスターレギュレーターである転写因子 PPAR γ - 2 mRNA の発現動態を制御する外因性因子の同定

外因性因子存在下における転写因子 PPAR γ - 2 mRNA の発現パターンを RT-PCR 法を用いて解析した。

(3) PPAR γ - 2 および C/EBPs の内因性リガンドの候補因子の探索

PPAR γ の内因性リガンドは既にいくつか同定されているが、反芻動物においても同様であるかは不明である。そのため、既に同定されている内因性リガンドも含め、PPAR γ および C/EBPs の内因性リガンド存在下における下流遺伝子の発現パターンを RT-PCR 法を用いて解析することにより、その候補因子を同定した。

(4) 候補因子による遺伝子転写因子活性化制御の解明

PPAR γ および C/EBPs のコアクチベーター (RXR:retinoid X receptor) あるいは LXR α (Liver X receptor α) 等の二量体化に及ぼす候補因子の果たす役割を RT-PCR 法を用いて解明した。

(5) 転写因子 PPAR γ 、LXR α および Rev-Erv α mRNA の発現動態を制御する内因性因子の探索

黒毛和種牛脂肪前駆細胞を使用して、候補因子と予想されるリガンドを添加し、細胞の分化過程におけるそれぞれの核内転写因子発現動態を測定することにより候補因子を同定した。

(6) 脂肪細胞分化制御および抗炎症性サイトカイン発現抑制を誘導することが報告されているオーファン核内受容体 Rev-Erv α の内因性および外因性制御因子の探索

Rev-Erv α は、マウス胎児由来脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞の分化過程に従ってその発現が上昇している。しかし、反芻動物においてそれが脂肪細胞の分化に影響しているのか、またそれを制御している因子は不明である。そこで、黒毛和種牛の脂肪前駆細胞を使用して、内因性および外因性制御因子の探索を行った。

(7) 核内転写因子 LXR α のノックダウンが脂肪細胞分化に与える影響の解析

この転写因子はウシおよびめん羊における脂肪細胞形成過程で強く発現していることが前項の実験より確認され、特に、分化後期に VFA によりその発現は増強されていることが明らかになった。そこで、この転写因子の siRNA を使用し、この転写因子のノックダウンを作成して、この転写因子が実際に脂肪細胞の分化制御因子として作用しているか否かを 3T3-L1 細胞を使用して検証した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞分化過程における機能未知核内レセプターの発現パターンの解析

現在までに、核内レセプターはヒトにおいて 48 種類同定されているが、その中 8 種について、脂肪前駆細胞分化過程における発現パターンを 3T3-L1 細胞およびラット、ウシおよびめん羊の脂肪前駆細胞を用いて解析した。その中で、PPAR γ - 2 の発現はどの動物種でも分化の進行と共に増加した。レチノイド X 受容体および肝 X 受容体の発現は 3T3-L1、ラット脂肪前駆細胞より反芻動物、とくにウシ脂肪前駆細胞において高いことが判明した。PPAR δ はウシで発現しているもののラット、めん羊では発現せず、FXR はめん羊、ウシで発現しないもののラットで発現、Rev-Erv α はウシおよびラットで分化の進行と共に発現が上昇し、めん羊では発現しているものの分化期間中変化は観察されなかった。このように、アディポジェネシスは動物種によって異なる転写因子によって調節されているだけでなく、脂肪細胞分化誘導後の早期や中、後期に作用するといった分化過程で時間的な差も存在することが判明した。

(2) PPAR γ - 2 および C/EBP mRNA の発現動態を制御する外因性因子の同定

めん羊脂肪前駆細胞において、共役リノール酸 (trans-10, cis-12) は PPAR γ - 2、aP2、adipophilin mRNA の発現を優位に増加させ、脂肪細胞形成に深く関与していることを明らかにした。逆に、3T3-L1 細胞においてはこれらの発現を減少させ、脂肪細胞への分化を抑制した。ウシおよびめん羊において、ラクトースウレイドは PPAR γ - 2 の発現を抑制することで脂肪細胞形成を抑制することを明らかにした。

(3) PPAR γ - 2 および C/EBP s の内因性リガンドの候補因子の探索

めん羊脂肪前駆細胞の分化過程において、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の VFA は、PPAR γ - 2、C/EBP α 、aP2 の発現を増加させ、特に、プロピオン酸および酪酸は PPAR γ - 2 の内因性リガンドの候補因子となることが立証された。逆に、反芻動物のタンパク質合成源として重要な尿素、アンモニアは PPAR γ - 2 mRNA の発現を抑制した。

(4) 候補因子による遺伝子転写因子活性化制御の解明

反芻動物において PPAR γ - 2 および LXR α

の DNA response element 領域への結合に RXR の二量体化が必要であるか否かを検証した。めん羊、ウシ脂肪前駆細胞においてレチノイン酸は PPAR γ - 2 により誘導される aP2 の発現を減少させ、さらに LXR α の下流にある遺伝子、SREBP-1C の発現も減少させた。反芻動物においても RXR の PPAR γ - 2 および LXR α との二量体化が、脂肪細胞分化関連遺伝子の誘導に必須であることが明らかとなった。

(5) 転写因子 PPAR γ - 2、LXR α および Rev-Erv α mRNA の発現動態を制御する内因性因子の探索

ウシ脂肪前駆細胞の分化過程において、VFA の中で酢酸、プロピオン酸が PPAR γ - 2 を上昇させたが、酪酸はむしろその発現を抑制した。VFA のいずれもが LXR α の発現を増加させ、Rev-Erv α は酪酸のみがその発現を増加させた。このように、ウシにおいては VFA が転写因子の発現動態を制御する内因性因子となることが明らかとなった。

(6) 脂肪細胞分化制御および抗炎症性サイトカイン発現抑制を誘導することが報告されているオーファン受容体、Rev-Erv α の内因性および外因性制御因子の探索

Rev-Erv α はマウス胎児由来脂肪前駆細胞、3T3-L1 細胞分化の進行に伴ってその発現が上昇している。しかし、反芻動物において Rev-Erv α が脂肪細胞の分化に影響しているのか、またそれを制御している因子は不明である。そこで、Rev-Erv α の内因性および外因性制御因子の探索を行った。その結果、黒毛和種牛皮下脂肪前駆細胞の分化の進行に伴い Rev-Erv α mRNA の発現は上昇し、それは VFA、中でも酪酸によってその発現は著しく上昇した。しかし酢酸は影響しなかった。さらに、ラクトースウレイドはその発現を抑制する傾向を示した。以上の結果は反芻動物においてもオーファン核内受容体である Rev-Erv α が脂肪細胞の分化に深く関与し、VFA が内因性因子であることが立証された。

(7) 核内転写因子 LXR α のノックダウンが脂肪細胞分化に与える影響の解析

前項の研究より、核内転写因子 LXR α がウシおよびめん羊における脂肪細胞形成過程で強く発現していることを確認した。そこで、本研究では LXR α の siRNA を使用して転写因子のノックダウンを作成して、この転写因子が実際に脂肪細胞の分化制御因子として作用しているか否かを検証した。その結果、3T3-L1 細胞において LXR α siRNA は分化誘導 3 日目で LXR α の発現を抑制したが、LXR α の

下流に存在する SREBP-1C の発現は抑制されず、脂肪細胞の分化も抑制されなかった。以上の結果は、従来提唱されている LXR α の発現上昇、それに伴う SREBP-1C の発現上昇、そして脂質合成酵素遺伝子の発現誘導といった説を覆すものであり、SREBP-1C の発現は他の経路を経て制御されている可能性を示唆した。

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 3 件)

- ① Song S.H., Fukui K., Nakajima K., Kozakai T., Sasaki S., Roh S.G. and Katoh K. Domest. Anim. Endocrinol. 39:97-105, 2010 査読有
- ② Iga T., Satoh T., Yamamoto S., Fukui K., Song S.H., Choi K.C., Roh S.G. and Sasaki S. Differential action of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on adipocyte differentiation of ovine and 3T3-L1 preadipocytes. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 22:1566-1573, 2009 査読有
- ③ Song S.H., Hong Y.H., Sasaki S., Roh S.G. and Katoh K. Prostatic androgen-repressed message-1 as a regulator of adipocyte differentiation in the mouse. Tohoku J. Exp. Med. 219:311-317, 2009 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 米澤明彦、麻生 久、盧 尚建、濱野光市、米倉真一、佐々木晋一 黒毛和種牛脂肪前駆細胞、BIP 細胞および C2C12 細胞の増殖・分化に及ぼすラクトースウレイドおよびそのルーメン内代謝産物の影響 第 59 回北信越畜産学会大会、2010・11・5、富山県
- ② 米倉真一、米澤明彦、麻生 久、佐々木晋一 牛筋肉内脂肪前駆細胞株 (BIP 細胞) におけるレプチンの発現様式 第 59 回北信越畜産学会大会 2010・11・5 富山県
- ③ 盧 尚建、宋 相憲、鈴木 裕、佐々木晋一、加藤和雄 脂肪細胞由来遺伝子、adipogenin の発現調節について 日本畜産学会大 112 回大会、2010. 3. 28、東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 晋一 (SASAKI SHIN-ICHI)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：00003682

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：