

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591107

研究課題名(和文)

BMP-3bの新しいアディポサイトカインとしての機能解析

研究課題名(英文)

Functional analysis of BMP-3b as a novel adipocytokine

研究代表者

日野 純 (HINO JUN)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・生化学部・室長

研究者番号：40260351

研究成果の概要(和文)：

BMP-3bは、私達が骨組織から骨代謝調節因子として同定したタンパク質である。BMP-3bは、骨組織だけでなく、脂肪組織にも多く存在しているものの、そこでの機能は不明であった。一方、脂肪組織には、アディポサイトカインと呼ばれる因子が存在し、それがメタボリック症候群等の病態と密接に関与していることが判ってきた。私達は、BMP-3bの脂肪組織における機能解析研究を行い、BMP-3bの新規分子型を同定し、その脂肪細胞分化抑制作用を示し、新たなアディポサイトカインとして機能していることを証明した。

研究成果の概要(英文)：

We originally isolated BMP-3b, which inhibited osteogenesis, from bone tissue. BMP-3b is strongly expressed not only in the bone but also in adipose tissue. However, the function of BMP-3b in adipose tissue is still unknown. Recent studies show that adipocytokine, which exists in adipose tissue, is involved in metabolic syndrome or its related diseases. We performed functional analysis of BMP-3b in adipose tissue, which demonstrated that BMP-3b acts as a novel adipocytokine that inhibits adipogenesis and its secreted molecular form is a unique complex.

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	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学・内分泌学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：BMP-3b、アディポサイトカイン、肥満、脂肪細胞、TGF- β 、分化因子、分子型、複合体

1. 研究開始当初の背景

BMP-3bは、私達が骨組織から骨形成調節因子として同定したタンパク質である。

BMP-3bは、骨組織だけでなく、脂肪組織においても多く存在しているものの、そこでの

機能は不明であった。

2. 研究の目的

BMP-3bの脂肪組織における機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 以下に示す脂肪組織およびそれらから由来する細胞の **BMP-3b** の遺伝子発現解析

①マウス皮下脂肪、内臓脂肪（腸間膜、腎周囲）、褐色脂肪及び精巣周囲脂肪組織。

②脂肪組織を成熟脂肪細胞と前駆脂肪細胞を含む細胞分画（SVF, stromal-vascular fraction）に分画した細胞。

③SVF を初代培養して成熟脂肪細胞へ分化させた細胞。

(2) **BMP-3b** の肥満動物における遺伝子発現解析

①マウス（C57BL/6J）に高脂肪食を与えて作製した肥満マウス（8週令）を使用。

(3) 株化前駆脂肪細胞（3T3-L1）による検討

①成熟脂肪細胞分化過程における **BMP-3b** 遺伝子発現の変化

② **BMP-3b** の脂肪細胞分化における作用の検討を、**BMP-3b** siRNA、**BMP-3b** 遺伝子の一過性過剰発現および **BMP-3b** を安定発現する CHO 細胞の培養上清を用いて行った。

③ **BMP-3b** の分子型の検討を **BMP-3b** 一過性過剰発現細胞や正常細胞の培養上清を用いて行う。新たに、**BMP-3b** のプロ体部分に対する抗体を新たに作製したので、それを用いて、プロ体の分子型についても検討する。

4. 研究成果

(1) **BMP-3b** は、各種脂肪組織に高いレベルで発現し、その分布を調べると、前駆脂肪細胞で多く、成熟脂肪細胞で減少していた。初代培養した SVF 細胞でも同様の結果であった。また、他の BMP ファミリーと比較すると、**BMP-3b** の発現量が圧倒的に多く、脂肪組織で機能する主要 BMP としての新しい役割が明らかになった。

(2) 高脂肪食負荷肥満マウスの脂肪組織において、**BMP-3b** 発現量が増加した。興味深いことに、これは、内臓脂肪の一つである、腸間膜脂肪組織での現象であり、皮下脂肪やその他の脂肪組織においては、ほとんど変化がなかった。臨床的観点からは、内臓脂肪による肥満が、皮下脂肪による肥満より、重要

であることが知られていることより、**BMP-3b** の病態生理学的研究の意義・必要性が高まった。

(3) 株化前駆脂肪細胞による検討

① **BMP-3b** は 3T3-L1 に多く発現し、成熟脂肪細胞で発現量が減少した。この結果は、研究成果（1）に記した、初代培養における結果と一致しており、**BMP-3b** の脂肪組織中での発現パターンが明らかとなった。

② **BMP-3b** 以外の BMP ファミリーは、3T3-L1 にほとんど発現していない。

この結果および研究成果（1）に記した組織レベルでの結果から、**BMP-3b** は、脂肪組織中、前駆脂肪細胞において発現していることが明らかになった。また、その発現量は他の BMP ファミリーの発現量を大きく凌いでいることより、脂肪組織由来の主要 BMP としての新たな機能が示唆された。

③ **BMP-3b** siRNA により、**BMP-3b** の遺伝子発現を抑制すると、脂肪細胞分化が亢進した。

④ **BMP-3b** 遺伝子を過剰発現すると、脂肪細胞分化が抑制された（図 1）。

3T3-L1 細胞において、**BMP-3b** 遺伝子が多量に発現していることより、まず、siRNA により、**BMP-3b** 遺伝子発現を抑制し、脂肪細胞分化への作用を検討した。その結果、各種、脂肪細胞マーカー（アディポネクチン、aP2、PPAR γ ）の発現量が亢進し、**BMP-3b** の脂肪細胞分化抑制作用が示唆された。次に、**BMP-3b** 遺伝子の過剰発現による効果を調べると、上記脂肪細胞マーカー発現量が減少し、**BMP-3b** の脂肪細胞分化抑制作用が強く示唆された（図 1）。

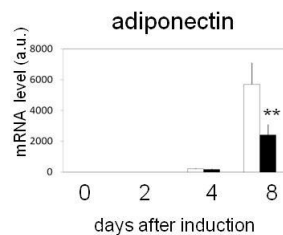


図 1 **BMP-3b** 遺伝子の過剰発現により 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化が抑制されるアディポネクチン遺伝子の発現を指標とした。n=3, **p<0.01
白：コントロール、黒：**BMP-3b** 過剰発現細胞

⑤BMP-3b タンパク質を加えると、脂肪細胞分化が抑制された。

前項に示した、BMP-3b 遺伝子の抑制および過剰発現により、BMP-3b の脂肪細胞分化抑制作用が示されたことより、次に、分泌した BMP-3 b タンパク質の作用を調べるため、BMP-3 b タンパク質複合体 (⑦で記述) を安定的に分泌する、CHO 細胞の培養上清を用いて検討を行った。その結果、BMP-3b を添加すると、コントロールと比較して、オイルレッドで染色される細胞内脂肪滴量が激減し、BMP-3b タンパク質が脂肪細胞分化抑制作用を有することが判った。この抑制作用を定量的に解析するため、前項で使用した各種脂肪細胞マーカーの遺伝子発現量を測定した。抑制作用は、分化開始後、2 日目より始まり、その効果が最終分化する 8 日目まで継続していた。

⑥⑤の効果は、BMP-3b 特異的抗体により消失した。

前項⑤の培養上清の効果が BMP-3b タンパク質に由来することを確認する為、BMP-3b に対する抗体 (⑦に記述) で、BMP-3b を含む培養上清を処理して、その効果を検討した。その結果、予想通り、抗体処理により、BMP-3b 培養上清による分化抑制作用が消失したことから、培養上清中の BMP-3 b タンパク質による脂肪細胞分化抑制であることが証明できた。

⑦BMP-3b は、脂肪細胞よりユニークな複合体 (プロ体と成熟体からなる) として分泌され、それが脂肪細胞分化抑制作用を有する (図 2)。

上記の脂肪細胞分化に対する BMP-3b の機能解析研究より、BMP-3b 遺伝子を過剰発現した脂肪細胞の培養上清中には、活性型 BMP-3b タンパク質が存在することを示していた。そこで、その培養上清中の BMP-3b タンパク質の分子型の解析を行った。まず、成熟体に着目し、その分子型を調べると、これまでと同様の分子型にて分泌されていたことより、脂肪細胞においても、前駆体が、通常通りにプロセッシングを受けていることが判明した。次に、これまで、その役割が不明であった、プロ体部分に着目し、その部分に対する抗体 (3bpro) を作製し、分子型の検討を行った。3bpro のキャラクタリゼーションにより、プロ体部分を認識することを確認した。次いで、3bpro による免疫沈降を行い、分子型を調べると、驚くべきことに、プ

ロ体だけでなく、成熟体も共沈していた。この結果は、プロ体と成熟体が非共有結合にて複合体を形成していることを示していたので、次にこの複合体について検証を行った。まず、先ほどとは逆に、成熟体部分の抗体により、免疫沈降を行った。すると、予想通り、プロ体が、成熟体と共沈していた。更に、クロスリンク法、非還元状態での分析を行い、この複合体を解析し、最終的に図 2 に示すような、結論を得た。すなわち、BMP-3b は、脂肪細胞において、通常通りにプロセッシングを受け、プロ体と成熟体となり、その後、プロ体のモノマーと成熟体のダイマーから構成される、新規複合体として分泌していることを証明した。この新規複合体は、正常の 3T3-L1 細胞培養上清中からも同定できたことより、BMP-3b の基本となる活性を有する分泌型分子型であることも証明できた。

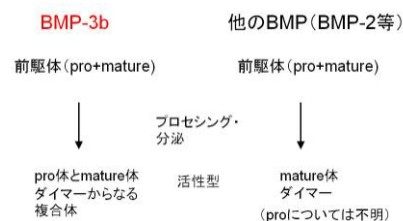


図 2 BMP-3b の新しい分泌型分子型

pro : プロ体部分、
mature : 成熟体部分

従来、BMP ファミリーは、右に示すような合成過程により、成熟体ダイマーが活性型として作用し、プロ体の機能については不明であった。これに対し、BMP-3b は、成熟体とプロ体の複合体という、新規分子型として分泌していることが判った。

【得られた成果の位置づけおよび今後の展望】

BMP-3b は、骨組織の他、脂肪組織等様々な部位で発現しているものの、その機能は骨代謝において判明しているのみで、未だ不明な部分が多かった。本研究により、BMP-3b が脂肪組織にて高発現し、新規分泌型分子型が脂肪細胞分化抑制作用を有していることを明かにし、BMP-3b が新しいアディポサイトカインとして機能していることを、国内外において初めて証明することができた。BMP ファミリーの一つの因子という観点からは、BMP-3b のみが、脂肪組織、脂肪細胞において多く存在し、機能している結果より、BMP-3b がオートクライン作用で機能する初めてのアディポサイトカイン様 BMP として

位置づけされる。更に、本研究で同定した、**BMP-3b** の新しい分泌型分子型は、BMP ファミリーの中でも初めての構造であること、およびこれまで知られていなかったプロ体部分の構造や機能を解明したことより、生化学的見地からも新しい発見となる。今回の結果は、脂肪細胞分化のメカニズム解明への新たな見識を示すだけでなく、メタボリックシンドロームの基盤となる肥満の病態解明へと発展する大きな成果である。今後は、これらの結果を踏まえ、**BMP-3b** の動物個体レベルでの生理学的、病態生理学的役割を解明する為、肥満動物、**BMP-3b** ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いた検討を推進していく予定である。

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 2 件)

① Hino J, Miyazawa T, Miyazato M, Kangawa K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is expressed in adipocytes and inhibits adipogenesis as a unique complex. *Int. J. Obesity*, 査読有、2011, doi. 10.1038/ijo.2011.124, in press.

② Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Arai Y, Schwenke DO, Hino J, Okano I, Kawano Y, Kohno M, Miyazato M, Nakao K, Kangawa K. Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation*, 査読有、2008;117:2329-39

[学会発表] (計 5 件)

① 日野 純、BMP-3b 過剰発現マウスを用いた脂肪組織における機能解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸

② 日野 純、BMP-3b functions as a novel adipocytokine that inhibits adipocyte differentiation by its unique complex、8th International Conference on BMPs、2010 年 9 月 17 日、Leuven

③ 日野 純、Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is an adipocytokine secreted from preadipocytes and inhibits their differentiation、14th International Congress of Endocrinology、2010 年 3 月 27 日、京都

④ 日野 純、BMP-3b は脂肪細胞分化抑制作用を有する新たなアディポサイトカインである、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸

⑤ 日野 純、BMP-3b の脂肪細胞分化における遺伝子発現およびその新しい分泌型分子型の同定、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸

[その他]

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/seika/seikaj_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 純 (HINO JUN)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・
生化学部・室長
研究者番号：4 0 2 6 0 3 5 1

(2) 研究分担者

宮里 幹也 (MIYAZATO MIKIYA)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・
生化学部・部長
研究者番号：5 0 2 9 1 1 8 3

荒井 勇二 (ARAI YUJI)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・
分子生物学部・室長
研究者番号：3 0 2 0 2 7 2 4

(3) 連携研究者

寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)

独立行政法人 国立循環器病研究センター・
研究所長
研究者番号：0 0 1 1 2 4 1 7