

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20780104
 研究課題名(和文)生活習慣病の病態発症における脂肪酸結合タンパク質の役割に関する研究

研究課題名(英文) The roles of fatty acid binding protein in the pathogenesis of lifestyle-related disease

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)：

脂溶性物質は生体内においてエネルギー源や生理活性物質として重要な役割を演じている。本研究では細胞内において脂溶性物質の輸送を担う脂肪酸結合タンパク質(FABP3)に注目し、FABP3の生活習慣病の病態発症との関わりについて検討した。FABP3は脂肪酸取り込み、転写因子の活性調節には大きな影響を与えなかった。一方でFABP3はインスリン抵抗性の改善、およびエネルギー代謝に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Fatty acid binding protein 3 is an intracellular translocator of lipids. In this study, we examined the effects of FABP3 on the pathogenesis of lifestyle-related disease and found that FABP3 could affect the insulin signaling and energy metabolism.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学、酵素化学、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、脂肪酸結合タンパク質、インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸やその誘導体などの脂溶性分子は生体内におけるエネルギー源、あるいはシグナル分子として重要な役割を果たしている。そのため、これら脂溶性分子に関しては薬品や機能性食品成分として盛んに研究されてきている。一方で、その細胞への輸送や細胞内でのトラフィッキングについては重要で

あるにもかかわらず、積極的な研究はなされてきていない。脂溶性分子は生体内において遊離した状態ではほとんど存在できず、体内での循環や、細胞内への取り込み、輸送、代謝にはアルブミンや脂肪酸結合タンパク質(Fatty acid binding proteins: FABPs)が重要な役割を果たすと考えられている。

FABPs は飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸など

の疎水性のリガンドに対して高いアフィニティを持つ 14-15 kDa の小型の細胞内タンパク質である。FABPs は脂溶性物質の輸送あるいは、緩衝剤として受動的な役割をしていると考えられてきたが、近年、脂溶性物質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、c-Jun terminal kinase(JNK) や peroxisome proliferator activated receptors(PPARs)などの脂質応答性のタンパク質の活性を制御する役割を果たしていることが報告されてきている。このことから、FABPs は細胞内における脂溶性物質の輸送分子としての働きだけではなく、細胞内での制御因子として細胞応答に積極的な役割を演じている可能性が示されてきている。

FABPs の中で、FABP3 は心筋と骨格筋で多く発現している FABP 分子種である。FABP3 欠損マウスは運動持続能力の低下や骨格筋での脂肪酸利用が低下していることが報告されていることから、FABP3 が骨格筋におけるエネルギー利用に重要な働きを果たしていることが示唆されている。我々の実験においても、高脂肪食摂取により、FABP3 が通常は発現の見られない白色脂肪組織に発現が誘導されることや、FABP3 の発現が体重や内臓脂肪重量などともよく相関するというデータが得られている。これらのことから、FABP3 は肥満や生活習慣病とも関連があると考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景から、我々は FABP3 が骨格筋においてエネルギー利用に重要な働きをするだけでなく、様々なシグナル因子を調節することによって、肥満や生活習慣病の発症に積極的な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで本研究では、FABP3 の細胞内における調節機能、生理的役割、生活習慣病の病態発症との関りについて分子レベルで明らかにすることを目的とした。

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、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 FABP3 発現アデノウイルス作製した。

(1) FABP3 の脂肪酸取り込みに与える影響の検討

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 時間後に蛍光ラベルした脂肪酸を添加し、その取り込みを観察した。

(2) FABP3 の発現が骨格筋の代謝関連遺伝子の発現に与える影響の検討

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 時間後に細胞を回収しリアルタイム PCR を用いて代謝関連遺伝子の発現量を検討した。

(3) FABP3 の発現が核内受容体のリガンド依存的な転写活性化に与える影響の検討

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 時間後に核内受容体 PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ のリガンドを添加した。12 時間インキュベートした後に細胞を回収し標的遺伝子である CPT1 遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって検討した。

(4) FABP3 のインスリンシグナルに対する影響の検討

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 パルミチン酸を含む培地に交換し、インスリン抵抗性を惹起した。インスリンによって刺激後、細胞を溶解しインスリンシグナルに関与しているシグナル分子についてウエスタンブロッティングによって検討した。

(5) FABP3 の発現が動脈硬化モデルマウスに与える影響の検討

動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損マウスの尾静脈から FABP3 発現アデノウイルスをインジェクションした。3 日後に解剖し肝臓、脂肪組織、血中の遊離脂肪酸、トリグリセリド、コレステロールレベルを測定した。

(6) FABP3 と相互作用する分子の探索

大腸菌発現系を用いて FABP3 を発現させた。発現させた FABP3 を精製し、固定化カラムを作製した。また、同様に GST 融合 FABP3 を発現・精製した。これらに分化した C2C12 の細胞質および核の抽出液を供し FABP3 と相互作用するタンパク質を取得した。これらを SDS-PAGE にて展開後、LC/MS/MS によって同定した。

4. 研究成果

(1) FABP3 の脂肪酸取り込みに与える影響の検討

脂肪酸取り込みに速度に対する FABP3 の影響を検討した。その結果、FABP3 の発現は C2C12 細胞の脂肪酸取り込み速度には大きな影響を与えないことが示された。

(2) FABP3 の発現が骨格筋の代謝関連遺伝子の発現に与える影響の検討

FABP3 の発現が代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。FABP3 の発現はいずれの代謝関連遺伝子の発現にも影響を与えないことが示された(図1)。

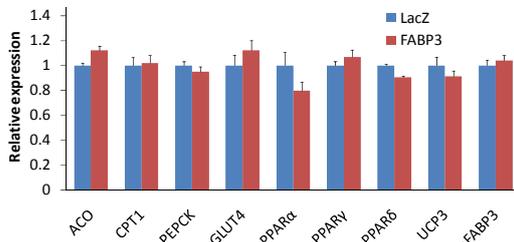


図1. FABP3 発現による代謝関連遺伝子の発現変化

(3) FABP3 の発現が核内受容体のリガンド依存的な転写活性化に与える影響の検討

FABP3 の発現が核内受容体の活性化に与える影響について検討した。PPAR α 、 γ 、 δ リガンド添加による標的遺伝子の発現上昇は FABP3 によって影響を受けなかった。従って、FABP3 の発現は PPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ のリガンド依存的な転写活性化に与える影響を与えないと考えられた(図2)。

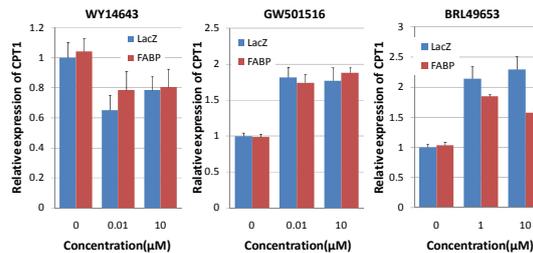


図2. FABP3 発現が PPARs のリガンド依存的な転写活性化に与える影響

(4) FABP3 のインスリンシグナルに対する影響の検討

インスリンシグナルに対する FABP3 の影響について検討した。インスリンシグナルに重要な働きをしている Akt のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討したところ、通常培養条件下でのインスリン応答においては FABP3 の発現による影響は見られなかった。一方で、パルミチン酸よりインスリン抵抗性を惹起した場合には、コントロール細胞では Akt のリン酸化が抑制されたのに対して、FABP3 を発現させた細胞では Akt のリン酸化の回復が見られた。従って、FABP3 が骨格筋におけるインスリンシグナリングに関与していることが示唆された。さらに、糖の輸送体である GLUT4 の機能発現に重要な役割を果たす AS160 の発現量、リン酸化が FABP3 の発現によって上昇することが示された。また、脂肪酸燃焼のキーファクターである AMPK のリン酸化も FABP3 発現細胞では有意に上昇し

ていることが明らかとなった(図3)。これらのことから、FABP3 が骨格筋におけるインスリン応答、糖取り込み、脂肪酸燃焼に関与している可能性が示された。

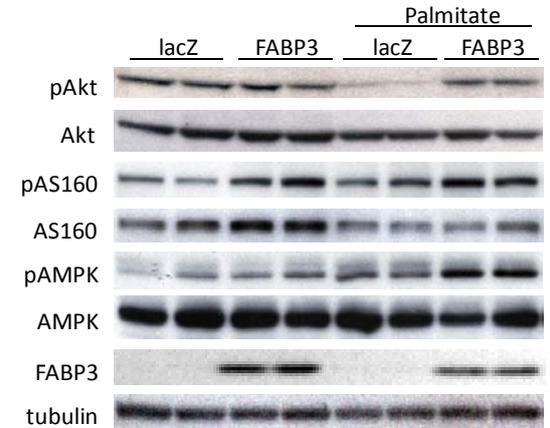
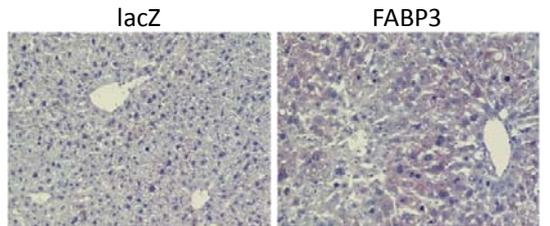


図3. FABP3 発現がインスリンシグナリング系に与える影響

(5) FABP3 の発現が動脈硬化モデルマウスに与える影響の検討

生活習慣病における FABP3 の機能を個体レベルで検討するためにアデノウイルスを用いて肝臓に FABP3 を発現させた。FABP3 発現アデノウイルス投与後3日目に血中成分を比較したところ、血中遊離脂肪酸、トリグリセリド、コレステロールレベルはコントロールマウス (lacZ 投与) と比較して差は認められなかった。一方で、肝臓における脂肪蓄積を検討したところ、FABP3 発現マウスは顕著な脂肪肝を示し(図4)、肝臓中の脂肪酸、トリグリセリド、コレステロールレベルの有意な上昇が見られた。この結果より FABP3 は血中から組織中への脂質の取込みへの直接的な関与は低いと考えられるが、組織内での脂質合成、及び細胞内における脂質プールを上昇させることが示唆された。



Liver Oil red O staining
図4. FABP3 を投与したマウスの肝臓切片

(6) FABP3 と相互作用する分子の探索
FABP3 の機能発現についての知見を得るために、FABP3 と相互作用する分子の同定を試みた。現時点では、インスリンシグナルやグルコース代謝、脂肪酸代謝に直接関与する分子は得られていないが、いくつかの分子が同定され、さらなる発展に期待が持たれる。
まとめ

本研究は、細胞内における FABP3 の調節機能、生理的役割、生活習慣病の病態発症との関りについて、主に骨格筋を対象とした検討を行うことを目的とした。FABP3 の発現上昇は代謝関連遺伝子の発現や、リガンド依存的な核内受容体の活性に大きな影響を与えなかったことから、細胞内における代謝関連遺伝子の発現制御や核内受容体のリガンド輸送には大きな関与をしていないと考えられた。一方でパルミチン酸によって抑制されたインスリンシグナリングは FABP3 の発現により回復し、糖取り込みに関与する AS160 の発現及びリン酸化レベルの上昇がみられた。さらにエネルギー代謝に重要な働きをする AMPK のリン酸化も FABP3 の発現により上昇した。このことから、FABP3 はインスリン応答や、グルコース代謝、脂肪酸代謝に関与している事が示唆された。これらはこれまでに報告のない新規の知見である。詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、本研究によって FABP3 が生活習慣病予防・治療のターゲットとなる可能性が示された。

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 1 件)

- ① Yamashita H, Wang Z, Wang Y, Segawa M, Kusudo T, Kontani Y. Induction of fatty acid-binding protein 3 in brown adipose tissue correlates with increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 377(2):632-5. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① 第 30 回日本肥満学会大会 (2009 年 10 月 9~10 日 アクトシティ浜松)
楠堂 達也、山下 均、骨格筋における脂肪酸結合タンパク質 3 の発現上昇と生活習慣病のかかわりについて
- ② 第 81 回日本生化学会大会 (2008 年 12 月 9~12 日 神戸ポートアイランド)
楠堂 達也、山下 均、脂肪酸結合タンパク質 (FABP3) における SNPs 由来変異体の機能解析
- ③ 第 29 回日本肥満学会大会 (2008 年 10 月 17~18 日 大分全日空ホテル)
山下 均、楠堂 達也、脂肪酸結合タンパク質 (FABP3) の発現誘導と内臓肥満

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