

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790269

研究課題名（和文） 肝臓星細胞によるビタミンA恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文） Vitamin A homeostasis by hepatic stellate cells

## 研究代表者

目崎 喜弘 (MEZAKI YOSHIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40431621

研究成果の概要（和文）：ビタミンAは視覚・生殖・胚発生・表皮機能維持など多くの生理機能に関与しヒトでは血中濃度が $2\mu\text{M}$ に調節されている。ビタミンAを大量に貯蔵するヤツメウナギを用い細胞質レチノール結合タンパク質（CRBP）の解析を行い、ヤツメウナギCRBPがレチノールに結合しないことや小腸に強く発現していることなどを明らかにした。小腸におけるビタミンA吸収と肝臓におけるビタミンA貯蔵のバランスによって実現される血中ビタミンA恒常性維持機構は脊椎動物進化の早い時期から発達してきたことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Vitamin A is a fat-soluble vitamin needed for many physiological functions including vision, reproduction, embryonic development, and epithelial maintenance. Vitamin A levels in the bloodstream are kept within a range around  $2\mu\text{M}$  in humans. The Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*, stores a high concentration of vitamin A. We have cloned a lamprey cDNA for cellular retinolbinding protein (CRBP). The cloned CRBP did not bind to retinal. The CRBP mRNA showed the highest expression within the intestine. Adult lamprey may not require CRBP binding to retinal in order to effectively absorb vitamin A from fish blood. As a result, lamprey CRBP may have lost the affinity for retinal, while retaining the affinity for retinol.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

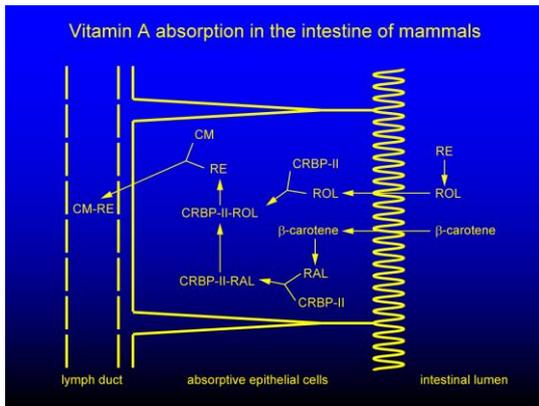
キーワード：ヤツメウナギ、ビタミンA、肝臓星細胞、レチノイド結合タンパク質、細胞質レチノール結合タンパク質、脊椎動物、分子進化

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミンAは視覚・生殖・胚発生・表皮機能維持など多くの生理機能に関与することが知られており、ヒトでは血中濃度がおよそ $2\mu\text{M}$ となるように調節されている。このとき血中の余分なビタミンAを貯蔵離し、必要に応じて再び血中に放出するのが肝臓星細胞（伊東細胞、脂肪摂取細胞、ビタミンA貯蔵細胞、リポサイトとも呼ばれる）である。ヒトはビタミンAを動物性食品からレチニ

ルエステルとして、また植物性食品から $\beta$ -カロテンとして摂取している。レチニルエステルは小腸内腔でリパーゼのはたらきによりレチノールに加水分解され吸収上皮細胞に取り込まれる。一方 $\beta$ -カロテンは吸収上皮細胞に取り込まれてからレチノール、さらにレチノールへと変換される。これらのレチノールは再びエステル化されキロミクロンとともにリンパへ分泌され、血液を経由して最終的に肝臓星細胞へ運ばれる。肝臓星細胞は

取り込んだビタミン A をエステル化し細胞質の脂質滴に貯蔵し、必要に応じてレチノールに加水分解して血中に放出する。



ビタミン A は脂溶性分子であり単独では血中や細胞内で安定に存在できず、疎水性ポケットを持つタンパク質に埋め込まれている。細胞外では血漿レチノール結合タンパク質 plasma retinol-binding protein (RBP) が存在し、細胞内では細胞質レチノール結合タンパク質 cellular retinol-binding protein I および II (CRBP I および CRBP II) が存在する。CRBP I は全身に発現しておりレチノールに強く、またレチナールに弱く結合する。CRBP II は小腸特異的に発現しており、レチノールとレチナールに同程度の強さで結合する。これらのレチノイド結合タンパク質はビタミン A 代謝関連酵素の働きを調節することが知られている。例えば、CRBP I や CRBP II に結合したレチノールは肝臓星細胞や小腸吸収上皮細胞に存在するレチノールエステル化酵素であるレシチン：レチノールアシルトランスフェラーゼ lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) の良い基質となることが知られている。

## 2. 研究の目的

ヤツメウナギは原始的な脊椎動物でありビタミン A を多く含むことが知られている。ヤツメウナギにおけるビタミン A 貯蔵と吸収のメカニズムを解明するためにヤツメウナギ CRBP 遺伝子のクローニングとタンパク質の解析を行った。

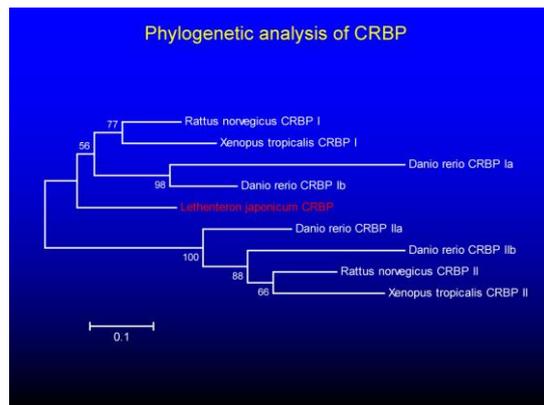


## 3. 研究の方法

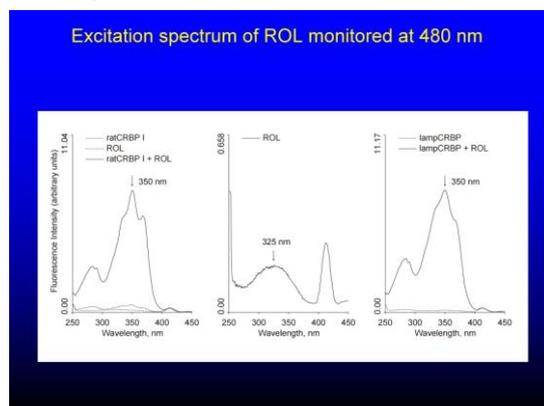
ヤツメウナギ CRBP の cDNA クローニングを行い、さまざまな脊椎動物 CRBP のアミノ酸配列と比較して分子系統樹を作成した。ヤツメウナギ CRBP に His タグを付加して大腸菌で大量発現し精製した。レチノールの発する自家蛍光が CRBP と結合することで増強する現象を利用して CRBP とレチノールとの結合を測定した。レチナールが自家蛍光を発しないことから、CRBP とレチナールとの結合は CRBP に含まれるトリプトファン残基の蛍光が近傍に存在するレチナールに再吸収され消光する現象を利用して測定した。各種臓器・組織におけるヤツメウナギ CRBP 遺伝子の発現をノザンブロットングにより解析した。

## 4. 研究成果

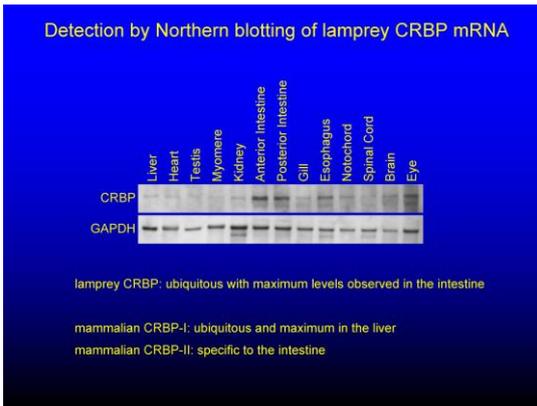
分子系統樹の解析から脊椎動物の CRBP I と CRBP II はそれぞれ単系統群を形成し、ヤツメウナギ CRBP は両単系統群の中間に位置することが明らかとなった。



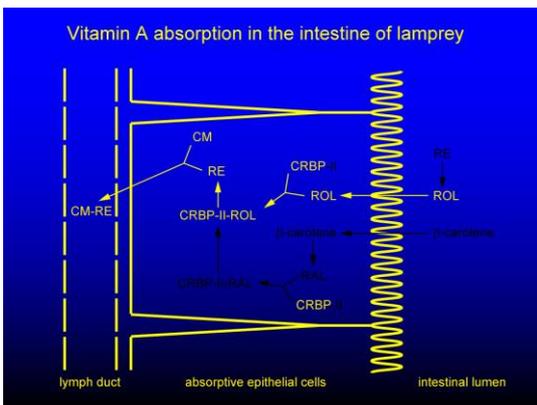
分光学的解析によりヤツメウナギ CRBP はレチノールには強く結合するが、レチナールにはほとんど結合しないことが明らかとなった。



ノザンブロットングによりヤツメウナギ CRBP 遺伝子は全身で発現しており、特に消化管で強い発現を示すことが明らかとなった。



以上の結果からヤツメウナギにおいて CRBP I と CRBP II の使い分けはなさそうであること、ヤツメウナギ CRBP は小腸に強く発現していること、ヤツメウナギ CRBP はレチノールには結合するがレチナールには結合しないことなどが明らかとなった。成体のヤツメウナギは海でサケなどに取り付いてその体液を吸って生活している。血液中の主要なビタミン A は RBP に結合したレチノールであるから、ヤツメウナギにとってのビタミン A 源はレチニルエステルでも  $\beta$ -カロテンでもなくレチノールであると考えられる。したがって、ヤツメウナギが食餌から効率よくビタミン A を摂取するためにレチナールとの結合は必要なかったため、進化の過程でレチナールとの結合性を失ったと考えられる。小腸におけるビタミン A 吸収と肝臓におけるビタミン A 貯蔵のバランスによって実現される血中ビタミン A 恒常性維持機構は脊椎動物進化の早い時期から発達してきたことが示唆された。



## 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 5 件)

(1) 目崎喜弘 (2013) 肝臓星細胞によるビタミン A の代謝・貯蔵メカニズムとその意義. ビタミン, 87(1), 33-37. (査読有)

(2) 目崎喜弘, 森井真也子, 吉川 究, 山口典子, 三浦光隆, 今井克幸, 吉野裕顕, 妹尾春樹 (2012) ヤツメウナギ細胞質レチノール結合タンパク質のキャラクタリゼーション. ビタミン, 86(5-6), 313-315. (査読有)

(3) Mezaki Y., Morii M., Yoshikawa K., Yamaguchi N., Miura M., Imai K., Yoshino H., Senoo H.: Characterization of a cellular retinol-binding protein from lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 161(3), 233-239, 2012. (査読有) DOI 10.1016/j.cbpb.2011.11.011

(4) Mezaki Y., Morii M., Yoshikawa K., Yamaguchi N., Satoyoshi K., Miura M., Imai K., Hebiguchi T., Habuchi T., Senoo H.: Elevated expression of transforming growth factor  $\beta$ 3 in carbon tetrachloride-treated rat liver and involvement of retinoid signaling. *Int. J. Mol. Med.* 29(1), 18-24, 2012. (査読有) DOI 10.3892/ijmm.2011.809

(5) 目崎喜弘, 森井真也子, 吉川 究, 山口典子, 三浦光隆, 今井克幸, 吉野裕顕, 妹尾春樹 (2011) 活性化肝臓星細胞におけるビタミン A 脂質滴の消失と肝線維化. ビタミン, 85(8), 439-440. (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 目崎喜弘 ほか, ヤツメウナギのビタミン A 貯蔵に関与する細胞内レチノール結合タンパク質のリガンド認識機構の解明, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 30 日, 高松

(2) 目崎喜弘 ほか, 細胞内レチノール結合タンパク質のリガンド特異性を規定するアミノ酸残基の探索, 日本レチノイド研究会第 23 回学術集会, 2012 年 10 月 20 日, 米子

(3) 目崎喜弘, 肝臓星細胞によるビタミン A の代謝・貯蔵メカニズムとその意義, 日本ビタミン学会第 64 回大会, 2012 年 6 月 22 日, 岐阜

(4) 目崎喜弘 ほか, 分子レベルで考察するヤツメウナギのビタミン A 貯蔵, 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月 27 日, 山梨

(5) 目崎喜弘 ほか, カワヤツメにおけるビタミン A の取り込みと細胞内レチノール結合タンパク質の共進化, 日本レチノイド研究会第 22 回学術集会, 2011 年 11 月 12 日, 東京

(6) Mezaki Y. et al., Speckled cytosolic distribution of retinoic acid receptor alpha protein may be a marker of hepatic stellate cell activation, 16th International Symposium on Cells of Hepatic Sinusoid, September 22-24, 2011, Florence, Italy

(7) Mezaki Y. et al., Feedback mechanism toward storage of vitamin A-containing lipid droplets in activated hepatic stellate cells, The 30th Naito Conference 生体膜ダイナミクスと脂質生物学[II], 2011年6月29日, 札幌

(8) 目崎喜弘 ほか, カワヤツメ由来ビタミンA代謝関連タンパク質のクローニングとキャラクターゼーション, 日本ビタミン学会第63回大会, 2011年6月5日, 広島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

目崎 喜弘 (MEZAKI YOSHIHIRO)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40431621

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：