

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：35409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650508

研究課題名(和文) ボディウエイト・コントロール中の脂肪酸代謝

研究課題名(英文) The metabolic pathway of fatty acid in bodyweight control period

研究代表者

山本 覚 (YAMAMOTO, Satoru)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：10191404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪酸酸化経路が飢餓のような緊急時に働く代謝経路であるとの仮説を立て、同代謝経路に関わる酵素系の解明と糖欠乏状態中の同代謝経路の働きについて研究を行った。脂肪酸酸化経路の最初の反応はCYP4Aに分類される脂肪酸水酸化酵素により触媒される。本研究において、脂肪酸位の水酸基はアルコールデヒドロゲナーゼによりアルデヒドに酸化され、ついでアルデヒドデヒドロゲナーゼによりカルボキシル基にまで酸化されジカルボン酸を生成することを明らかにした。さらに、体温環境下では酸化に加えて酸化も同時に行われ、炭素数が奇数のジカルボン酸が尿中に排泄されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, based on the tentative theory that fatty acid omega oxidation is the pathway for emergency such as a starvation, we elucidated the enzymes contribute to this pathway and the physiological function. The first reaction of omega-oxidation is omega-hydroxylation catalyzed by omega-hydroxylases. In this study, we clarified that the hydroxyl group of the fatty acid was oxidized to aldehyde by an alcohol dehydrogenase and subsequently it was oxidized to carboxyl group by an aldehyde dehydrogenase. Furthermore, under low temperature condition, we confirmed fatty acids were metabolized via alfa-oxidation pathway also in addition to omega-oxidation, produced dicarboxylic acids which number of carbon are odd secreted in urine.

研究分野：生化学

キーワード：fatty acid omega-oxidation alfa-oxidation

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸はエネルギー代謝の重要な基質であり、主として脂肪酸酸化経路により代謝され、Acetyl CoA にまで分解され、さらに TCA サイクルで利用される。一方、脂肪酸の一部は酸化経路でも代謝されることが知られている。脂肪酸酸化経路は、脂肪酸の位炭素をカルボキシル基にまで酸化しジカルボン酸を生成する代謝経路であるが、その代謝経路及び生理的意義は明確にされていない。

脂肪酸の酸化経路の最初の反応である位の水酸化反応はミクロソームの脂肪酸水酸化酵素(シトクロム P450 CYP4A)により触媒される。位に水酸基が導入された脂肪酸をさらに酸化する酵素系については、アルコールデヒドロゲナーゼ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼによりカルボキシル基にまで酸化される。しかし、アルコールデヒドロゲナーゼには種々のアイソザイムが存在しており、脂肪酸酸化経路に働く ADH は未だ特定されていない。

一方、脂肪酸酸化経路で生成する長鎖ジカルボン酸は、酸化経路で代謝されアジピン酸やコハク酸などの短鎖のジカルボン酸に代謝されると推定されている。これまでの研究により、脂肪酸水酸化酵素がクロフィブレート等の抗高脂血症剤の投与、糖尿病や飢餓、により誘導されることが明らかになっている。動物はグリオキシル酸経路を持たないため、脂肪酸からの糖新生はできないとされているが、著者は脂肪酸の酸化及び酸化により生成するコハク酸が糖新生に用いられる可能性を示唆してきた。すなわち、脂肪酸酸化経路は糖尿病や絶食等のグルコ

ースを利用できない緊急時や、過激なボディアウエイト・コントロール時などに脂肪酸からグルコースを生成して供給する役割を果たしていると推測している。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪酸酸化経路を解明することを目的として、同経路で働く ADH アイソザイムの特定を行う。また、食餌制限下で著しくエネルギーを消費する低温下での脂肪酸代謝の動態について検討し、脂肪酸酸化の生理的意義の解明を試みる。

3. 研究の方法

アルコールデヒドロゲナーゼをコードする cDNA はウサギ肝 mRNA を鋳型に用いて RT-PCR 法によりクローニングした。PCR に用いたプライマーは、データベースに登録されたラット肝のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイム (ADH Class 、ADH Class isozyme 1、ADH Class isozyme 2、及び ADH Class)cDNA の塩基配列を参考に作成した。クローニングされた cDNA は全塩基配列を決定して、上述の 4 種類のアイソザイムをコードしていることを確認した。これらの cDNA を大腸菌内発現ベクターである pCold のクローニングサイトに挿入して、4 種類のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムの発現ベクターを構築した。形質転換した大腸菌の培養は常法に従って行い、組換え酵素を GST 融合タンパク質として発現させた。菌体破碎液からの発現タンパク質の精製には GST-セファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行い、SDS-PAGE で単一バンドを示す標品を調製した。大腸菌内で発現させた組換えアルコール

デヒドロゲナーゼの酵素活性は、エタノール及び 12-ヒドロキシラウリン酸を基質に用いて、反応に伴って生成する NADH に起因する 340 nm の吸光度の増加を分光光度計により測定した。アルコールデヒドロゲナーゼのこれら基質に対する Km 及び Kcat は基質飽和曲線及びそのダブルレシプロカルプロットより求めた。

低温環境下における脂肪酸代謝生成物の検討には、実験動物として SD 系ラット(メス)を用いた。ラットに 24 時間絶食処理を施した後、24 (対照群)及び 4 (試験群)でメタボリックケージ内で 24 時間飼育して尿を回収した。回収した尿をメンブレンフィルターで濾過した後、凍結乾燥した。これを 10%塩酸メタノールに溶解した後、90℃で 2 時間インキュベートし、尿中に含まれる脂肪酸類をメチルエステル誘導体とした。これをヘキサンに溶解して GC-MS で分析した。GC-MS による定量には内部標準物質として 1,13-ジカルボキシトリデカンを用いた。

4. 研究成果

アルコールデヒドロゲナーゼの特定

ラット、ヒトでは 5 種類のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムの存在が知られている。その中で肝に存在するアイソザイムは、アルコールデヒドロゲナーゼ Class、Class isozyme 1、Class isozyme 2、及び Class の 4 種類である。著者らは酸化経路に関わる酵素系の解明にウサギを実験動物に用いているため、ウサギ肝の mRNA をテンプレートに用いて、RT-PCR 法によりこれら 4 種類のアイソザイムの cDNA をクローニングした。これら cDNA の塩基配列は、対応するラットの cDNA とそれぞれ 95%以上の

相同性を有していたことから、本研究でクローニングした 4 種類の cDNA について、それぞれアルコールデヒドロゲナーゼ Class、Class isozyme 1、Class isozyme 2、及び class とした。これらの cDNA を大腸菌内発現ベクター pCold のクローニングサイトに挿入し、GST 融合タンパク質として発現させた。発現タンパク質を SDS-PAGE で均一バンドを示す標品まで精製した後、エタノール及び 12-ヒドロキシラウリン酸を基質として基質飽和曲線を求めた。その結果より、Km 及び Kcat を求めた(表 1)。Class isozyme 1 の組換え酵素はまったく示さず、測定できなかった。他のアイソザイムはいずれもエタノールよりも 12-ヒドロキシラウリン酸に対して高い親和性を示し、ヒドロキシ脂肪酸がこれらアルコールデヒドロゲナーゼの生理的基質であることが推察された。Kcat/Km は Class が最も高い値を示した。それぞれのアイソザイムに特異的な抗体を用いたウェスタンブロット解析及びウサギ肝細胞質画分の 12-ヒドロキシラウリン酸デヒドロゲナーゼ活性の抗体阻害実験の結果(データ未発表)より、Class が脂肪酸酸化経路で主に働いていると推定された。

表 1 ウサギ肝アルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムのエタノール及び 12-ヒドロキシラウリン酸に対する Km 及び Kcat の比較

Isozyme	Class	Class		Class
		Isozyme 1	Isozyme 2	
Ethanol				
Km (μM)	297	ND	6,570	1,390
Kcat	69.0	ND	0.924	31.0
Kcat /Km	232	ND	0.141	22.3
12-OH LA				
Km (μM)	6.38	ND	6.89	63.9
Kcat	37.0	ND	1.12	39.0
Kcat /Km	5,830	ND	162	612

次に、絶食処理によるアイソザイムの mRNA 発現量に対する影響をリアルタイム PCR 法により検討した。その結果、Class の mRNA 発現量にはほとんど増減が認められなかったが、絶食処理により Class isozyme 1 では約 2 倍に Class isozyme 2、及び Class ではそれぞれ 1.3 倍に増加した。

以上の結果より、Class は構成的に発現しており、他のアイソザイムは緊急時に誘導される可能性が示唆された。

低温環境下における脂肪酸代謝

体温維持のためにエネルギーを著しく消費する低温環境における脂肪酸の代謝について検討した。脂肪酸の代謝物は尿中に排泄されることが知られている。7 週齢の SD 系ラットに前処理として 24 時間絶食させた後、対照群は 24 °C、低温条件は 4 °C で 24 時間飼育し、それぞれの 24 時間尿を回収した。内部標準として炭素数 13 のジカルボン酸であるブラシル酸を添加し、メチルエステル化した後 GC-MS で分析した。常温で飼育した場合、トータルイオンスペクトルでは内部標準のブラシル酸より炭素数の短いジカルボン酸

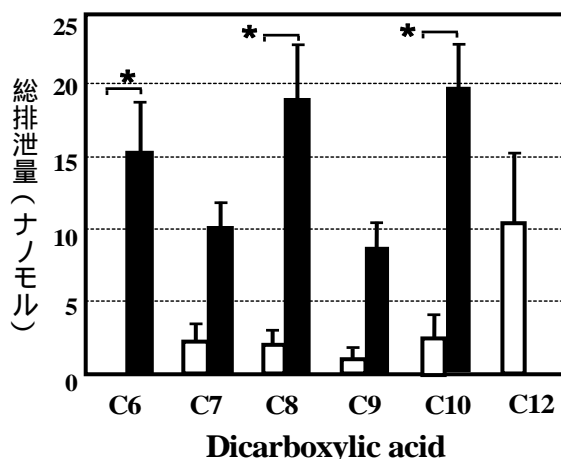


図 1 24 °C 及び 4 °C で飼育したラットの尿中に排泄されるジカルボン酸量

; 24 °C、; 4 °C、* ; $P < 0.01$ 、 $N = 9$

の排泄は極めて少なく、低温下で飼育した場合には、顕著な量の炭素数 6、7、8、9、及び 10 のジカルボン酸が検出された。

24 °C 及び 4 °C でそれぞれ 9 匹のラットを用いて同様の実験を行い、24 時間に尿中に排出されたジカルボン酸の総排泄量の平均値を図 1 に示した。低温環境下において、炭素数 6~10 のジカルボン酸の排泄量は常温で飼育した場合より顕著に増加することが明らかになった。炭素数 7 のジカルボン酸であるピメリン酸、アジピン酸、炭素数 8 のスベリン酸、炭素数 9 のアゼライン酸、炭素数 10 のセバシン酸の総排泄量は低温環境下では 4 ~ 8 倍に増加していた。また、常温環境ではほとんど排泄されなかった炭素数 6 のアジピン酸が、低温環境で顕著な量が排泄されていた。炭素数が偶数のジカルボン酸では両者は統計的に有意に差が認められた (危険率 < 0.01)。炭素数が奇数のジカルボン酸では個体差が大きいため、統計的に有意な差は認められなかったが、明らかに違いが存在した。

以上の結果より、低温環境下では、明らかに常温とは異なる代謝経路で脂肪酸代謝されていることが示唆された。すなわち、多量のエネルギーを消費し、グルコースが欠乏する状況では、脂肪酸酸化経路によってジカルボン酸が活発に生成し、それが酸化を受けて炭素数の短いジカルボン酸が生成していると考えられる。また、炭素数が奇数のジカルボン酸を生成していることから、酸化による代謝も行われることが強く示唆された。酸化については、細菌、及び植物では詳細な研究が行われているが、動物では解明されておらず、本研究を端緒としてその解明が期待される。

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)

[学会発表](計 2 件)

絶食、及び低温環境が 酸化、酸化及び酸化経路による脂肪酸代謝に及ぼす影響

山本 覚、桑田尚平、宮尾夕子、吉崎隆之、太田雅也

日本農芸化学会 2015 年度大会

岡山大学(岡山県、岡山市)

2015.3.27

紅麹の新規食品機能である脂肪肝抑制機構の解明

吉崎隆之、本村 巨、吉崎由美子、高橋信彦、高後 裕、山本 覚

日本農芸化学会 2015 年度大会

岡山大学(岡山県、岡山市)

2015.3.27

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 覚 (YAMAMOTO, Satoru)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：10191404