

体脂肪蓄積と食事性脂肪に関する栄養学的研究

京都大学大学院農学研究科 教授 伏木 亨

要 約

肥満発症及び改善の鍵を握る脂肪細胞の発生・機能分化を、特に食事性脂肪との関連において解析するとともに、その作用機序について核内受容体の観点から解明することを目的とした。その結果、食品由来の脂肪酸は、核内転写共役因子のひとつであるCBPの介在のもとに脂質代謝制御に関与する核内レセプター、PPAR γ の活性化を惹起することにより脂肪細胞の分化・増殖、脂質代謝さらには肥満・糖尿病などの病体発症と深く関連していることが推察された。これらの知見は、今後の食生活、特に脂肪摂取の観点からの生活習慣病の予防・改善のための方法論的基盤をもたらすものである。

キーワード：肥満、体脂肪、生活習慣病、食事性脂肪、脂肪酸、核内受容体、転写共役因子

序 論

高脂血症、糖尿病、高血圧、動脈硬化症など多くの生活習慣病が体脂肪の過剰蓄積（肥満）を基盤として発症し、また増悪することは良く知られた事実となってきた。このような肥満の第一義的な要因としては、摂食コントロールの破綻によるエネルギーの過剰摂取並びに体熱産生機能不全によるエネルギー消費の低下が指摘されている。食事性あるいは遺伝性肥満は、栄養学のみならず健康科学・予防医学上極めて重要な課題であるが、その基本的な脂肪細胞形成のメカニズムさえ、この十数年前までほとんど進展が認められなかった。しかし、今日漸くの細胞生物学、分子生物学的手法の進歩に伴い脂肪細胞の特性の解析法が進展し、栄養学的な解析が可能な状況となってきた。

脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞があり、単に脂肪細胞といえば前者を意味する。両細胞は生体の特徴的な部位で発生・分化し組織を形成する。白色脂肪組織は、単なる脂肪の貯蔵庫であり、代謝的に不活発な組織と見なされていた。しかし最近では交感神経系や内分泌系（レプチン等）の制御下で褐色細胞も含めた脂肪組織の営む活発な代謝制御機構が認識され、脂肪組織が脂質代謝や糖代謝の接点となって生体全体のエネルギーバランスの要となっていることが明らかとなってきた。

白色脂肪組織は一般に脂肪組織として知られているもので量的にも多く、全身に広く分布する。白色脂肪組織は、食物摂取後の余剰エネルギーを中性脂肪の形で貯め込み、必要なときに脂肪酸とグリセロールの形で全身に再供給するために特殊化した器官である。また、白色脂肪細胞は少なくともこのような脂肪の合成と分解の両能力を同時に有する細胞と定義される。白色脂肪組織は複数の細胞から構成されており、それらの細胞には、脂肪滴を貯め込んだ脂肪細胞、前駆脂肪細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞などがある。それらの細胞のうち成熟脂肪細胞の数は、以前は乳幼児期や思

春期など限られた時期にしか増加せず、その時期に生涯の数（およそ300億個）が決定されると考えられていたが、近年の注意深い研究によって成人になっても過剰のエネルギー摂取や運動不足などによって脂肪細胞の数が増加し、肥満者では400～600億個にも達することが明らかとなってきた。これは人の体を構成する細胞のおよそ0.5～1%であるが、重量では通常約0%前後、肥満者では30～40%にまで達する。脂肪細胞の直径は、10 μm から200 μm ものバリエーションがある。1個の成熟脂肪細胞には通常0.5～0.9 μg 、上限1.2 μg の脂肪が含まれている。成人の軽度の肥満では、個々の脂肪細胞の脂肪含量が増加し、細胞が肥大化 (hypertrophy) する。

脂肪細胞の肥大化は、病態発症と深く関連することが次第に明らかになりつつある。また脂肪細胞の大きさには限界があるため、さらに過剰の食物をとると脂肪細胞数の増加 (hyperplasty) を引き起こすことによって獲得したエネルギーを逃がすことなく迅速に貯蔵する。また、白色脂肪細胞は脂肪を溜め込むだけでなく、それらの貯蔵エネルギーを β 3 アドレナリン受容体を介した神経系・内分泌系制御下に脂肪酸の形態で全身に再供給し、生体の恒常性を維持している。

動物は本来恒常的に「飢え」に直面しており、捕獲や逃避などの活動のためのエネルギー源を体内に貯蔵しておくことが生き残るための必須条件である。そのためか動物がエネルギーを体内に溜め込む機構は極めて巧妙である。脂肪組織は一連の脂肪細胞の増殖と分化の過程を介して極めて効率的にエネルギーを脂肪の形態で貯蔵する。動物は本来生存のためにエネルギーを脂肪として体内に保持しやすく、かつ放出しにくいという生理的特徴がある。このような本質的な特性がヒトの肥満発症と深く関わっていると考えられる⁽¹⁾。

さらに近年、脂肪細胞に関する生物学および生化学的な研究が発展するにつれ、脂肪細胞の新しい機能が次第に明らかとなってきた。とりわけ興味深い点は、「分泌細胞」としての白色脂肪細胞である。成熟し脂肪滴が充満した脂肪細胞からはTNF- α などのサイトカイン類をはじめとして各種の化学因子が細胞外に分泌され、脂肪組織内さらには全身性に強く影響を及ぼすことが明らかとなってきた。このような白色脂肪細胞から分泌される生理活性物質は、アディポサイトカイン (adipocytokine) と命名されている⁽²⁾。今後、このような脂肪細胞から分泌される因子類と、肥満に伴う糖尿病、高血圧や動脈硬化症などいわゆるcommon diseaseの発症との関わりを理解することが極めて重要になるであろう。

研究目的

我々は、肥満すなわち白色細胞組織の過形成には、白色脂肪細胞の分化・増殖シグナルと生体内の特殊なエネルギー消費器官である褐色脂肪組織 (brown adipose tissue : BAT) の機能不全が強く影響することを示してきた⁽³⁻⁵⁾。BATの熱産生機能は、機能タンパク質である脱共役タンパク質 (UCP) の発現が極めて重要な役割を果たしている。ヒトや実験動物では若齢期においてはBATに由来する体熱産生機能が活発に働いている。ところが、交感神経系の機能低下や過齢等に伴いBATの減少とそれ

に連動して体熱産生機能不全が発生し、白色脂肪組織の増加が引き起こされる。核内受容体などの転写調節機構が重要であろうと推察されているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。

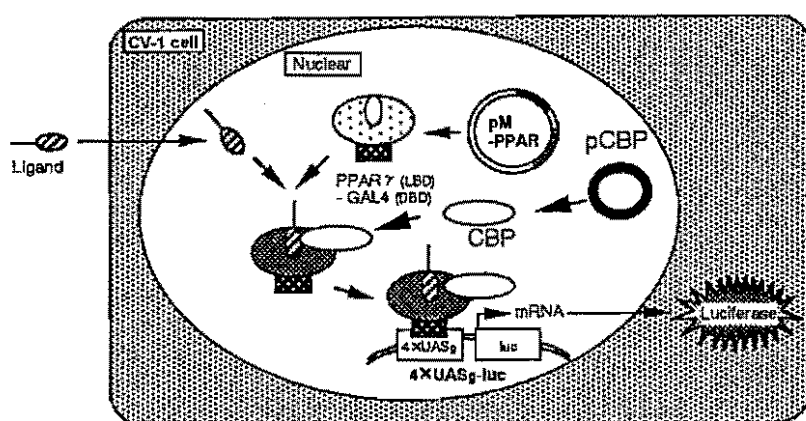
本研究においては、上記のような肥満発症および改善の鍵を握る2種類の脂肪組織に関して、核内受容体を介する脂肪細胞の発生・分化・機能発現の解析を、特に食事性脂肪との関連において解析することを目的としている。本研究課題は、前年度の食事性脂肪の構成脂肪酸による体熱産生活性化機構への影響に関する成果を踏まえたものである。

研究方法

核内受容体を介する脂肪細胞の発生・分化・機能発現と食事性脂肪との関連の解析

(1) 転写共役因子（コアクチベーター）による核内受容体活性化機構の解析

CBP (cAMP Response Element Binding-protein Binding Protein) が1996年に報告された⁽⁶⁾。CBPは、同様な転写因子コアクチベーター機能を有するp300と高いアミノ酸配列の類似性が認められることからCBP/p300とも呼ばれる。本研究においては、先ずCBP遺伝子を組み込んだpSK-CBPを構築した。リガンド結合ドメインがPPAR γ 、DNA結合ドメインがGAL-4（微生物由来）からなるキメラタンパクを合成するプラスミドpM-PPARを構築した。また、レポーター遺伝子であるLucの上流にGAL-4応答配列が存在するプラスミド4×UASg-lucとpMCBPを構築し、それらのプラスミドをアフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞であるCV-1にトランスフェクトした（図1）。そして、リガンド候補試薬（ポジティブコントロールや脂肪酸など）を添付した培地でこの細胞を24時間培養した後、ルシフェラーゼ活性をルミノメータで測定し、加えた試薬のPPARに対する活性化能を評価した。



※ PPAR; Peroxisome proliferator-activated receptor
UAS_g; GAL4 upstream activating sequence luc; luciferase
DBD; DNA binding domain LBD; Ligand binding domain
CBP; coactivator

図1 CBP/PPAR γ レポーターアッセイ系の概念図

(2) 遺伝性肥満・糖尿病マウス脂肪組織におけるPPAR γ およびコアクチベーター遺伝子の発現と病態発症の解析

脂肪組織中の微量の遺伝子発現を測定するために、近年著しい開発の進歩が見られる定量的リアルタイムRT-PCR法⁽⁷⁾の適用を試みた。測定した遺伝子は、PPAR γ 、CBP、p300、SRC-1および内部標準遺伝子としてのGAPDH (glycerophosphate-dehydrogenase)であった。またRT-PCRに使用した各遺伝子のプライマーは、表1に示した。リアルタイムRT-PCRの測定条件は、現在報告中の論文にその詳細を記述した (ref)。肥満・糖尿病マウスKKAyは、6週齢の雄を日本クレアより購入し、市販の固形飼料 (オリエンタル酵母: MF) で1週間飼育した後、各種代謝パラメーターと目的遺伝子の測定に供した。また、対照群として肥満・糖尿病抵抗性として知られているA/J系マウスを用い、これらのマウスも同様に6週齢のものを購入し、KKAyマウスと同様の条件で実験に供した。なお、これらの動物実験は、京都大学農学研究科実験動物委員会の承認のもとに行われた。

表1 リアルタイムRT-PCR法で測定した遺伝子とそのプライマー配列

| Target genes | GeneBank accession number | Primer sequence | |
|---------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------|
| | | 5'- | 3'- |
| PPAR γ | U01841 | Forward | GGAGATCTCCAGTGATATCGACCA |
| | | Reverse | ACGGCTTCTACGGATCGAAACT |
| CBP | S66385 | Forward | GATGCATGTGCAAGATACGGC |
| | | Reverse | TTTGAAGATGTCCTTATAGTCGTT |
| p300 | AF000581 | Forward | TCCTCCATATAACCGAGCGGT |
| | | Reverse | TTGCACCTGGCAGTCGATTAG |
| SRC-1 | U64828 | Forward | GCTCTCTGACTGAGCGGCATA |
| | | Reverse | TCCAAACTGGTTATCGATCGC |
| GAPDH | M32599 | Forward | GAAGGTCGGTGTGAACGGATT |
| | | Reverse | GAAGACACCAGTAGACTCCACGACATA |

結果および考察

(1) 転写共役因子 (コアクチベーター) による核内受容体活性化機構の解析

最近、核内レセプターとタンパク質-タンパク質相互作用し、転写の活性化能を正あるいは負に制御するコアクチベーター (インテグレーター) やコリプレッサー (coactivator, corepressor; 共役転写制御因子) の性状が急速に明らかにされつつある (図2)。亀井、Rosenfeldらにより核内レセプターによる転写活性化に必須のコアクチベーター (インテグレーター) としてCBP (cAMP Response Element Binding-Protein) が1996年に報告された。CBPは、同様な転写因子コアクチベーター機能を有するp300と高いアミノ酸配列の類似性が認められることからCBP/p300とも呼ばれる。CBPは様々な組織や細胞で普遍的に、少量発現する核タンパク質であり、Znフィンガーやプロモ領域などさまざまな機能タンパク質モチーフをもつ分子サイズが265kDの巨大なタンパク質である。CBPは、核内レ

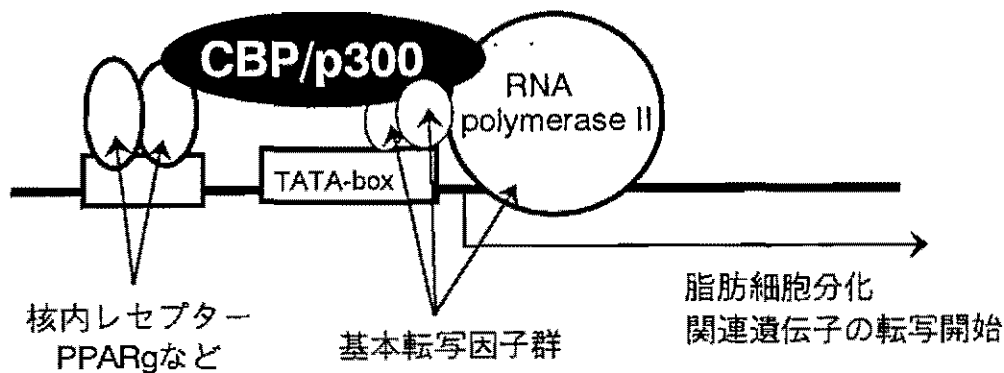


図2 脂肪細胞分化におけるコアクチベーターCBP/p300の転写調節への関与の概念図

セプターのみならず、Jun、Fos、C/EBP β 、pp90rsk、NF- κ B、MyoD、p160 (SRC-1)、ヒストンアセチラーゼ、さらにはSTATなどさまざまな情報伝達系の分子と複合体を形成しインテグレーターとして機能していることが判明してきた。このモデルによってこれまでに知らされていた核内レセプターと他の転写因子との相乗・拮抗現象が、統一的に説明できる可能性がでてきた。

本研究では、食品の主要な構成脂肪酸であるオレイン酸について、そのPPAR γ 活性化能を検討するとともに、さらにそれらの反応時に主要なコアクチベーターのひとつであるCBPが影響するかどうかを細胞系で検討した。そ

の結果、図3に示したようにオレイン酸のみでもPPAR γ の活性化が認められるが、さらにCBPを加えると活性が増強された。

また、CBPによるこのようなオレイン酸によるPPAR γ 活性能の増強は、添加したCBP遺伝子量に比例したことから、細胞内ではリガンドとしての脂肪酸量と同時にCBP量がPPAR γ 活性には極めて重要な因子であることが推察された。

(2) 遺伝性肥満・糖尿病マウス脂肪組織におけるPPAR γ およびコアクチベーター遺伝子の発現と病態発症の解析

脂肪組織中の微量の遺伝子発現を測定するための定量的リアルタイムRT-PCR法を確立した。設計した遺伝子プライマーは定量性に優れていること、感度が極めて高いこと、操作が簡便であることなど

Oleic acid

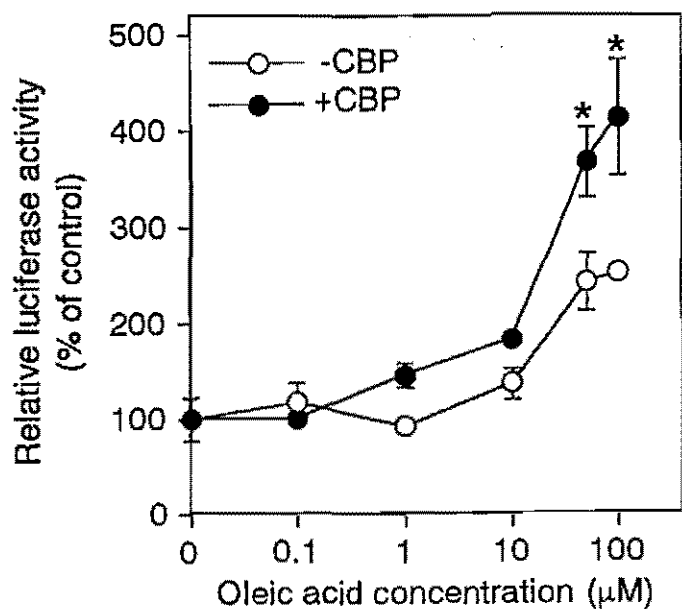


図3 脂肪酸のPPAR γ 活性化能に及ぼすコアクチベーター、CBPの影響
脂肪酸としては食品中の主要な構成脂肪酸であるオレイン酸を用いた。

が判明した。図4にPPAR γ mRNA定量のための検量線の例を示した。測定した遺伝性肥満・糖尿病マウス脂肪組織における遺伝子は、PPAR γ 、CBP、p300、SRC-1および内部標準遺伝子としてのGAPDH (glycerophosphate-dehydrogenase) であり、それらは総て良好な定量性が得られた。目的遺伝子発現量は総て、内部標準遺伝子とGAPDH発現量で補正して、算出した。続いて、実験に供したマウスの体重やインスリン、レプチンなどの各種代謝パラメーターを測定した(表2)。その結果、KKAYマウスは、明らかに肥満と糖尿病を発症していた。一方、その対照群であるA/Jマウスではそのような症状は認められず、肥満・糖尿病に対して抵抗性があることが確認された。そこで、両群の遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCR法で測定したところ、肥満・糖尿病マウスであるKKAYのPPAR γ mRNAの発現量が対照のA/Jマウスにくらべて著しく高いことが判明した(図5)。また、代表的なコアクチベーターであるp300とSRC-1は、それらのmRNAの発現量に両群間で有意な差は認められなかった。しかしながら、興味深いことにCBPmRNAの発現量は、KKAYマウスで有意な増加が認められた。また、CBPはPPAR γ の発現を制御することが知られている。これらのことから、CBPが脂肪細胞でのPPAR γ の発現を増強し、その結果脂肪細胞の分化と肥満を促進し、その後糖尿病へと進展していくことが推察された。従って、CBPは肥満・糖尿病を導くキーレギュレーターとして機能していることが示唆された。

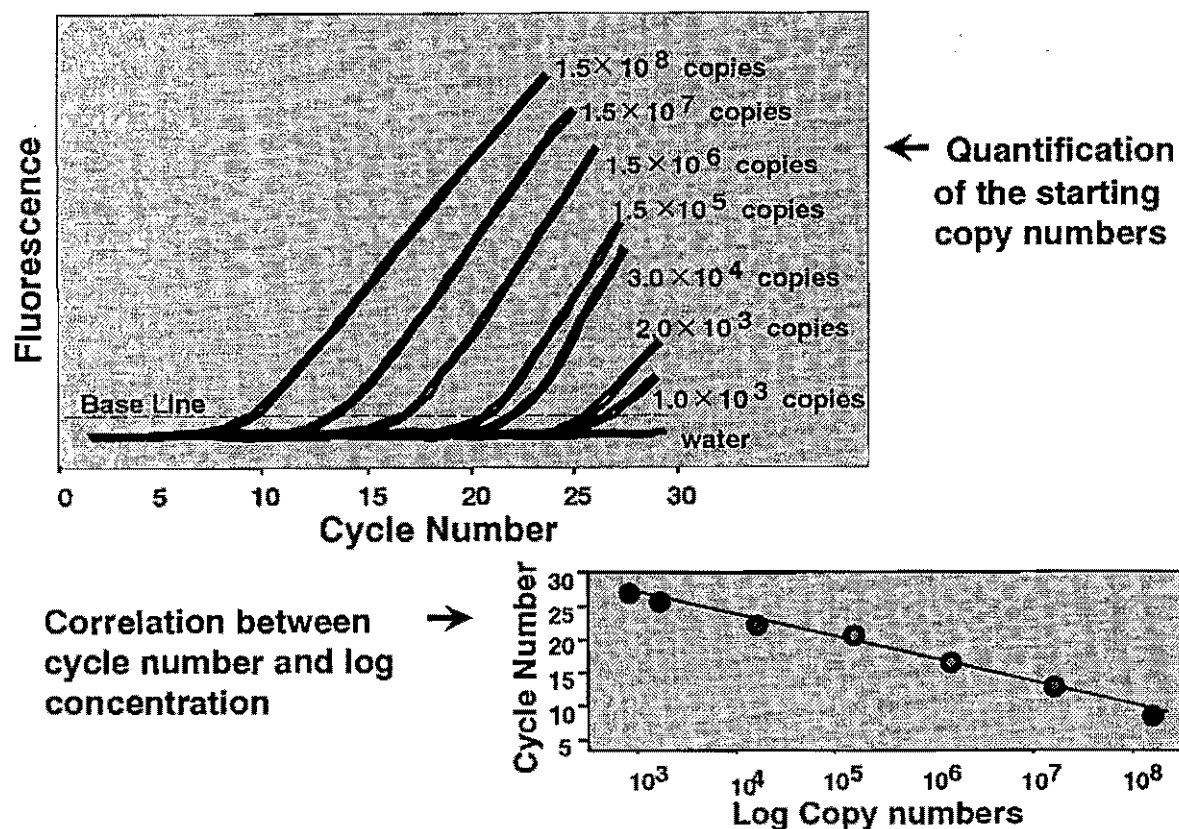


図4 リアルタイムRT-PCR法によるmRNAの定量

表2 遺伝性肥満・糖尿病マウスにおける各種代謝パラメーター

| | A / J | KK-Ay |
|---------------------------|---------------|----------------|
| Body weight (g) | 23.6 ± 0.6 | 34.6 ± 1.1 * |
| Epididymal fat (% of B.W) | 1.82 ± 0.122 | 3.11 ± 0.278 * |
| Perirenal fat (% of B.W) | 0.714 ± 0.083 | 1.17 ± 0.163 * |
| Peritoneal fat (% of B.W) | 2.54 ± 0.165 | 4.28 ± 0.427 * |
| Heart (% of B.W) | 0.463 ± 0.019 | 0.442 ± 0.017 |

| | A / J | KK-Ay |
|-----------------|---------------|------------------|
| Glucose (mg/dl) | 173.0 ± 24.6 | 283.8 ± 34.0 * |
| Insulin (pg/ml) | 484.2 ± 36.8 | 4710.3 ± 675.5 * |
| Leptin (pg/ml) | 2242 ± 930 | 9066 ± 646 * |
| TG (mg/dl) | 171.4 ± 11.2 | 271.5 ± 29.2 * |
| NEFA (mEq/l) | 0.910 ± 0.130 | 0.763 ± 0.091 |

* p < 0.05

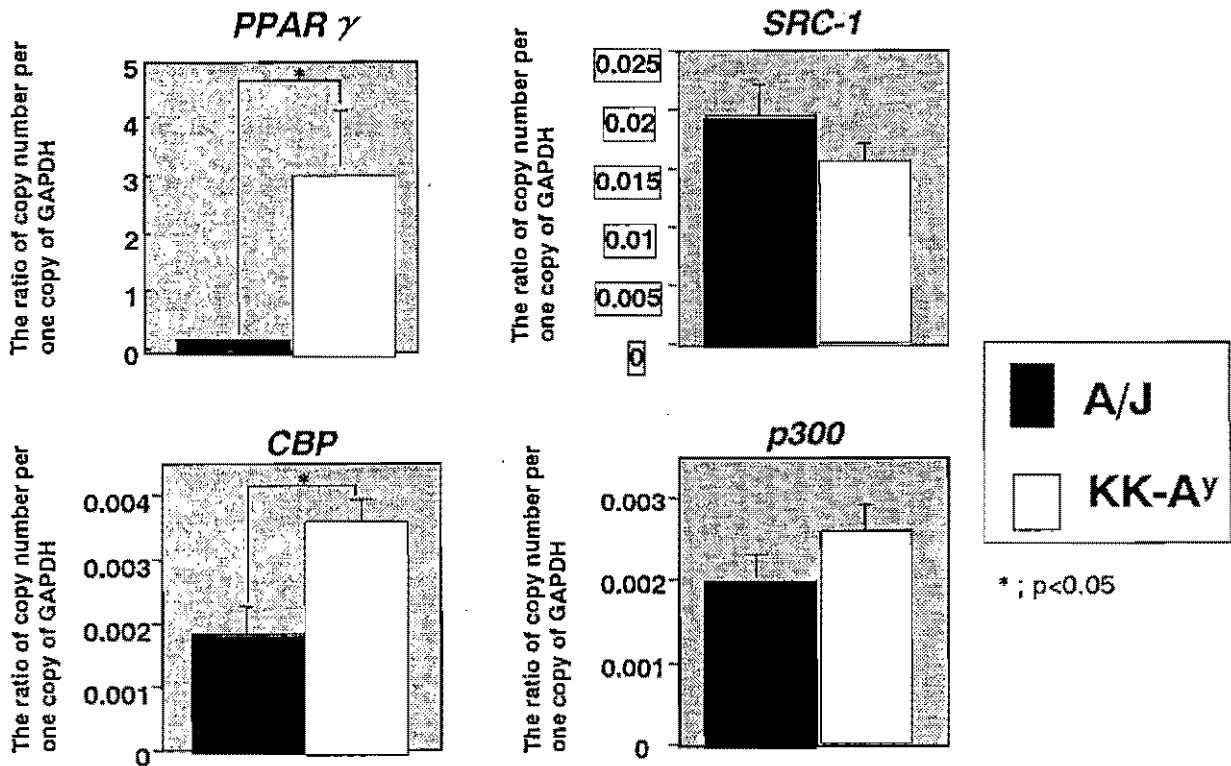


図5 遺伝性肥満・糖尿病マウス (KK-Ay) とその抵抗性マウス (A/J) 白色脂肪組織における PPAR γ およびコアクチベーター (CBP, p300, SRC-1) 遺伝子の発現の比較

本研究においては、肥満発症及び改善の鍵を握る脂肪細胞の発生・機能分化を、特に食事性脂肪との関連において解析するとともに、その作用機序について核内受容体、特にPPAR γ とその共役因子CBPの観点から解明することを目的とした。その結果、食品由来の脂肪酸は、核内転写共役因子のひとつであるCBPの介在のもとに脂質代謝制御に関与する核内レセプター、PPAR γ の活性化を介して脂肪組織における脂肪細胞の分化・増殖、さらには肥満・糖尿病などの病態発症と深く関連していることが推察された。これらの知見は、今後の生活習慣病の予防・改善のための方法論的基盤となるものである。

文 献

- 1) Kawada T, takahasi N, Fushiki T. Biochemical and physiological characteristics of fat cell. *J Nutr Sci Vitaminol* 47, 1-(2001)
- 2) Shimomura I, Funahashi T, takahashi M, et al:Enhanced expression of PAI- in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Medicine* 2:800-803 (1996)
- 3) Kawada T, Kayahashi S Y. Hida K. Koga Y. Nadachi, T. Fushiki: Fish (Bonito) oil supplementation enhances the expression of uncoupling protein in brown adipose tissue of rat. *J.agric. Food Chem.*, 46: 1225-1227 (1998)
- 4) HIDA. Y, T. Kawada, S. kayahashi, T. Ishihara and T. fushiki: counteraction of retinoic acid and 1, 25-dihydroxy vitamin D3 on up-regulation of adipocyte differentiation with PPAR γ ligand, an antidiabetic thiazolidinedione, in 3T3-L1 cells. *Life Sciences*. 62: PL205-211 (1998)
- 5) Kawada T, Y. kamei and E. Sugimoto: The possibility of active from of vitamins A and D as suppressors on adipocyte development via ligand-dependent transcriptional regulators. *Int.J. Obesity*, 20: S52-S57 (1996)
- 6) Kamei Y, Xu L, Heinzl T, et al.:A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85:403-414 (1996)
- 7) Rasmussen,R. in:Quantification on the the LightCycler (Meuer,S.,Witter,C.and Nakagawara, K., Eds) Rapid cycle real-time PCR, pp.21-34, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. (2001)
- 8) Takahasi N. Kawada T. and Fushiki T. et al.:Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and Hep G2 hepatocytes. *FEBS Letters* in press (2002)