

機能性発酵食品成分に関する基礎ならびに応用研究

佐藤 隆一郎

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

研究の目的

高齢社会を迎えた日本において、食品機能を活用した生活習慣病予防は医療費軽減のためにも社会的要請度の高い試みである。生活習慣病の多くは脂質代謝恒常性破綻の引き起こす肥満に起因しており、その発症には種々の核内受容体の関与が確認されている。核内受容体はヒトには48種類存在し、その大半はC末端側にリガンドを結合し、活性化を受けると考えられているが、内因性リガンドが不明のオーファン受容体が現在でも数多く残っている。その中で、ROR α (Retinoic acid receptor-related orphan receptor α)はコレステロール硫酸もしくはその誘導体がリガンドと想定されているが、依然としてオーファン受容体の一つであり、機能が十分に明らかにされていない(1)。我々は、脂肪細胞分化研究において、ROR α が脂肪細胞に発現し、しかも未知なリガンドの活性が成熟脂肪細胞への分化過程で上昇することを見出した。発酵食品には種々のステロイド誘導体の存在が期待され、それら食品成分の標的としてのROR α の脂肪細胞内での機能解析を行なった。

方法

定法に従い、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を成熟脂肪細胞へと分化させた。GAL4 DNA-binding domain の後方にROR α リガンド結合領域(LBD)を連結した plasmid を構築し、リガンド活性評価系を構築した。脂肪細胞内の個々の mRNA 量は定量 PCR 法により定量した。ROR α 発現レンチウイルスベクター、ROR α shRNA レンチウイルスベクターを構築し、3T3-L1 細胞に感染し、ROR α 過剰発現条件、ノックダウン条件下で脂肪細胞分化を追跡した。

結果

脂肪細胞分化過程でROR α 発現は上昇する

3T3-L1 細胞を分化誘導培地を用いて成熟脂肪細胞へと分化させ、経日的に RNA を回収した。分化マーカーである aP2 遺伝子は分化誘導 4 日目程度から上昇することが確認され、ROR α 遺伝子発現も同様に分化後期に向かって分化前の5倍程度にまで上昇した。特異的抗体を用いてタンパク質発現量を検討したところ、mRNA 同様、分化後期に発現上昇が認められた。これらの結果より、分化過程において ROR α は種々の応答遺伝子発現を積極的に制御している可能性が示唆された。

脂肪細胞培養液中にROR α リガンド様活性成分が検出された

脂肪細胞は分化に伴い細胞内に多量の脂肪滴を蓄え、同時に核内受容体の脂溶性内因性リガンドも増加することが想定されている。分化のマスターレギュレーターと認識さ

れている PPAR γ は、分化前期から発現が上昇し、同時に内因性のリガンドも上昇し活性化が促進されると考えられている(2)。内因性リガンドは細胞から分泌される培養液中に検出されることから、PPAR γ をポジティブコントロールとして、ROR α レポーター遺伝子を用いてルシフェラーゼアッセイを行なった。PPAR γ リガンド活性は分化 6 日目の培養上清に認められ、同様に ROR α リガンド活性も同程度確認された。種々の核内受容体 LBD を用いた同様のアッセイを行なったところ、PPAR γ と ROR α にのみ、リガンド活性が確認された。以上の結果は、脂肪細胞分化に伴い、脂肪細胞内には ROR α リガンド濃度が上昇し、タンパク質発現と呼応して、応答遺伝子発現を制御していることを示している。

ROR α 過剰発現は脂肪細胞分化を抑制する

レンチウイルスを用い、3T3-L1 細胞に ROR α を過剰発現させた。分化前で 10 倍強の発現上昇が認められた。脂肪滴形成は ROR α 過剰発現により著しく抑制され、種々の分化マーカー遺伝子発現も低下が認められた。脂肪滴表面タンパク質で脂肪滴形成に必要な perilipin 遺伝子発現が ROR α 過剰発現により低下した。これらの結果として、脂肪滴形成が抑制されたものと考えられる(3)。

ROR α ノックダウンは脂肪細胞分化を促進する

レンチウイルスを用い、3T3-L1 細胞に ROR α shRNA を発現させ、ROR α 発現をノックダウンさせた。ROR α 発現量はコントロール shRNA に比べて 30%程度にまで減少した。このような条件下で、3T3-L1 細胞では脂肪滴形成が亢進し、分化が促進された。種々の遺伝子発現もノックダウンにより亢進し、過剰発現条件下と逆の結果となった。以上の結果より、内因性 ROR α は脂肪細胞分化を抑制する機能を有することが明らかとなった。

結論

脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ は分化前期、中期から発現が上昇し、それとともに細胞内のリガンド活性も増加し、分化を促進することが考えられている。本研究で着目した ROR α は、その発現上昇時期、リガンド活性増加のいずれも PPAR γ のそれらと一致し、脂肪細胞分化過程でそれ相応の役割を演じていることが予想された。実際、過剰発現させると脂肪細胞分化は抑制され、一方ノックダウンにより分化が促進された。特に脂肪滴形成に関与する脂肪滴表面タンパク質 perilipin 発現を ROR α は負に制御することから、ROR α リガンド活性成分には、一定の抗肥満活性が期待できる。リガンド活性に関して、合成リガンド等のポジティブコントロールが無いことから、技術的に困難であり、また脂肪細胞培養液中に認められる活性もコントロールの 2-3 倍程度であり、発酵食品中にそのリガンド活性を評価するには至らなかった。より高感度なアッセイ系を構築すると同時に、内因性リガンドの同定あるいは合成リガンド開発により、信頼性の高いリガンド活性評価が可能となると考えられる。

文献

- (1) Kallen, J., Schlaepfli, J.-M., Bitsch, F., Delhon, I. and Fournier, B.
Crystal structure of the human ROR α ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 Å. , *J. Biol. Chem.* 279, 14033-14038 (2004)
- (2) Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M. and Spiegelman, B.M.
ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4333-4337 (1998)
- (3) Ohoka, N., Kato, S., Takahashi, Y., Hayashi, H. and Sato, R.
The orphan nuclear receptor ROR α restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBP β activity and perilipin gene expression. *Mol. Endocrinol.* (2009) in press