

【トピックス】

カロリー制限が白色脂肪組織における脂肪酸合成に及ぼす影響の経時的解析

土屋 拓郎、沖田 直之、須藤 結香、樋上 賀一

東京理科大学 薬学部 薬学科 分子病理・代謝学研究室

はじめに

1935年、米国の栄養学者である McCay らは、適度な摂取カロリーの制限 (caloric restriction; CR) がラットの平均および最大寿命を延伸し、加齢性疾患の発症を抑制または軽減することを報告した [1]。以降、酵母や線虫からげっ歯類を中心とした哺乳類に至るまで様々な生物種において、CR が老化を遅延、平均および最大寿命を延伸することが明らかにされてきた [2-4]。

CR の抗老化・寿命延伸効果には、エネルギー代謝に関わるミトコンドリアが重要な役割を担うと考えられている [5]。また、CR のエネルギー代謝の特徴は、エネルギー効率の高い脂質を利用することである [6]。近年、エネルギーの貯蔵庫であり、放出源でもある白色脂肪組織 (WAT) において、CR がミトコンドリア機能を亢進させ、脂質代謝を活性化させるという報告が数多くなされている [6-8]。我々も、6ヶ月間 CR したラットの WAT をプロテオーム解析し、CR がミトコンドリアや脂肪酸合成に関わるタンパク発現量を増加させることを報告した [9]。本稿では、CR による WAT での脂質代謝変化の経時的な解析から、CR による代謝の分子メカニズムについて報告する。

1. 脂肪細胞の小型化とアディポカイン

WAT における主要な構成細胞である脂肪細胞は、そのサイズによってアディポカイン分泌プロファイルを変化させることが知られている [10]。また、CR に伴い WAT では脂肪細胞が小型化し、アディポネクチンの分泌が増加し、レプチンや多くの炎症性サイトカインの分泌が減少することが知られている [11-13]。アディポネクチンは、肝臓や骨格筋などの非脂肪組織での脂肪蓄積を減少させ、インスリン感受性を亢進させる [14]。また、レプチンは、視床下部の受容体を介して強力な摂食抑制やエネルギー消費を亢進させる [15]。

まず、我々は脂肪細胞の形態学的観察とエネルギー代謝に関連が深いアディポネクチンとレプチンの経時的解析を行った。WAT の組織学的解析において、CR 群の脂肪細胞のサイズは自由摂食 (ad libitum; AL) 群に比

べ5ヶ月齢(CR期間2ヶ月)から有意に減少した。アディポカインの解析において、CR 群のアディポネクチンの mRNA 発現量は、3.5ヶ月齢で顕著に上昇した。一方、CR 群のレプチンの mRNA 発現量は、5ヶ月齢から AL 群に比べ有意に減少した (図1)。

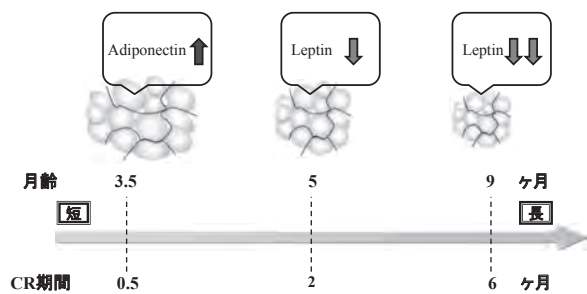


図1 脂肪細胞サイズとアディポカインの経時的変化

2. 脂肪酸合成

前項でも述べたが、我々は6ヶ月間 CR したラットの WAT をプロテオーム解析し、CR が脂肪酸合成に関わるタンパク発現量を増加させることを報告した [9]。また、CR が WAT の脂肪酸合成効率を増加させるという報告もある [6]。

我々は脂肪酸合成において重要な酵素である FASN (Fatty acid synthase)、ACC (Acetyl-CoA carboxylase)、ACLY (ATP-citrate synthase)、ME1 (Malic enzyme1) のタンパク質発現量の経時的変化をウエスタンブロット法により解析した。すると、WAT では、全月齢において CR でこれらの脂肪酸合成関連タンパク質の発現量が顕著に増加した。しかしながら、5ヶ月齢において CR に伴う増加が一時的に抑制された。CR 群のみ経時的に発現量を比べると、5ヶ月齢に境に V 字型を示していた (図2)。次に、3.5、5、9ヶ月

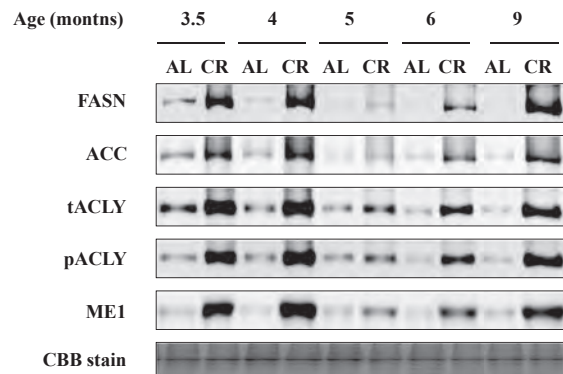


図2 脂肪酸合成関連因子の経時的変化

連絡先：〒 278-851
千葉県野田市山崎 264
TEL：04-7121-3676
FAX：04-7121-3676
E-mail：taku6384@gmail.com

月齢においてこれらの脂肪酸合成関連因子の mRNA 発現量の解析を行った。タンパク質発現と同様の変化が、mRNA 発現でも見られ、CR に伴う経時的な変化は転写レベルで制御されていると考えられた。

3. SREBP1 (Sterol regulatory element-binding protein 1)

SREBP1 は basic helix-loop-helix (b-HLH) leucine zipper 型の転写因子であり、*Fasn*、*Acc*、*Acly*、*me1* などの脂肪酸合成系遺伝子発現を正に転写制御する [16-18]。SREBP1 には SREBP1a と SREBP1c の 2 つのアイソフォームが存在する [18]。これらの 2 つのアイソフォームの発現分布は組織によって異なり、SREBP1a は脾臓や骨髄由来マクロファージ、骨髄樹状細胞などの免疫や炎症に関連する臓器および細胞で優位に発現しているのに対し、SREBP1c は肝臓や脂肪組織などのインスリン感受性臓器で優位に発現している [19]。また、細胞内の SREBP1 は、Srebp cleavage activating protein (Scap) と複合体を形成し、SREBP1 自身の膜貫通領域を介して小胞体 (ER; endoplasmic reticulum) 膜に結合している。Sterol が豊富な時には ER 膜上で insulin inducing gene (Insig) と三量体を形成している。Sterol が減少すると Insig との複合体形成が抑制され、Srebp-Scap 複合体がゴルジ体に輸送される。ゴルジ体において、site 1 protease (S1P) および site 2 protease (S2P) により C 末端側を順次切断され、全長を持つ前駆型から bHLH 領域を含む N 末端側のみのもので活性型となり核内に移行して転写活性を示す [20]。

我々は図 2 の結果より SREBP1 の解析をおこなった。すると、CR 群における前駆型及び核内にある活性型の SREBP1 のタンパク質発現量も、5 ヶ月齢を境に V 字型に変化を示した。また、*Srebp1a*、*1c* の mRNA 発現量を解析したところ、CR 群の *Srebp1a* の mRNA 発現量は、全月齢で AL 群に比べ有意な差は見られなかった。一方、*Srebp1c* の mRNA 発現量は、全月齢で AL 群に比べ高く、特に 3.5 ヶ月齢で有意に高かった。以上より、SREBP1c が CR による脂肪酸合成関連タンパク質の 5 ヶ月齢を境にした V 字型の発現増加に関与していると考

えられる。

4. インスリンとレプチンによる SREBP1 の調節機構

SREBP1 の転写活性は、インスリンやレプチンによって調節されていることが知られている [21]。インスリンは SREBP1 の転写を促進するが、特に SREBP1c の発現を強く誘導する [22]。この転写機構は、インスリン受容体の下流にある PI3k/Akt 経路に一部依存する。SREBP1c の転写調節因子として同定されているのが Liver X receptor (LXR) である。LXR は SREBP1c のプロモーター部位に存在する LXR-responsive elements (LXRE) を介して、その転写を亢進する [23]。PI3k/Akt 経路の中には、核内移行した pAkt が、LXR を抑制する Forkhead box protein O1(FoxO1) をリン酸化させ、核外移行させることで、*Srebp1c* の mRNA 発現量を増加させるという知見もある [24] (図 3)。一方、レプチンは脂肪組織で SREBP1c の転写を抑制し、下流遺伝子である *Fasn*、*Acc1*、*Acly*、*Me1* や *LaminB1* の mRNA 発現量を低下させる [25]。また、これらの脂肪酸合成酵素の活性も低下させると報告がある [26]。

我々は SREBP1 の転写調節するインスリンやレプチンに関連した因子の解析をおこなった。核内移行した pAkt のタンパク質発現量は、CR 群の 3.5 ヶ月齢で特に高かった。一方、レプチンのタンパク質発現量は、CR 群の全月齢で低かった。また、レプチンにより発現が低下するという報告がある *LaminB1* のタンパク質発現量は、CR 群の全月齢で高く、レプチンのタンパク質発現量と相関していた。

以上より、CR が脂質代謝に及ぼす影響は、CR の期間によって異なることが明らかになった。短期の CR ではインスリン感受性の亢進により、pAkt の核内移行が増加し、SREBP1c の転写活性を増強する。一方、長期の CR では、レプチンの低下により、SREBP1c の転写活性を増強すると考えられる。よって、CR による WAT での脂質代謝は、インスリンとレプチンが協調して、発現および転写調節される SREBP1c に強く依存することを示唆する (図 3)。

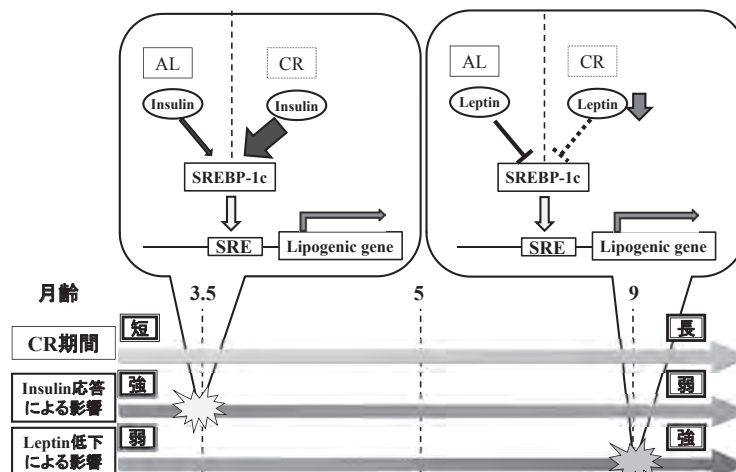


図3 CRによる脂質代謝の経時的変化

おわりに

本研究により、これまで未解明であったCRによる脂質代謝活性化の分子メカニズムの一端を明らかにした。また、CRの期間による経時的な脂質代謝の変化を明らかにした。今後は、CRによる脂肪分解やエネルギー代謝において重要な役割を担うミトコンドリア機能の解析に取り組みたいと考えている。

参考文献

1. McCay, C.M., Cromwell, M.F. and Maynard, L.A. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 10: 63-79, 1935
2. Sohal, R.S. and Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63, 1996.
3. Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126: 913-922, 2005.
4. Colman, R.J., Anderson, R.M. and Johnson, S. C. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-204, 2009.
5. Lanza, I.R. and Nair, K.S. Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflugers Arch* 459: 277-289, 2010.
6. Bruss, M. D., Khambatta, C. F. and Ruby, M. A. et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E108-16, 2010.
7. López-Lluch, G., Hunt, N. and Jones, B. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1768-1773, 2006.
8. Nisoli, E., Tonello, C. and Cardile, A. et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.
9. Okita, N., Hayashida, Y. and Kojima, Y. et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev.* 133: 255-66, 2012.
10. Ouchi, N., Parker, J. L. and Lugus, J. J. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 11: 85-97, 2012.
11. Bordone, L. and Guarente, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:298-305, 2005.
12. Higami, Y., Pugh, T. D. and Page, G. P. et al. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J.* 18:415-7, 2004.
13. Zhu, M., Lee, G. D. and Ding, L. et al. Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and caloric restriction. *Exp Gerontol.* 42: 733-44, 2007.
14. Zhu, M., Miura, J. and Lu, L. X. et al. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol.* 39: 1049-59, 2004.
15. Brennan, A. M. and Mantzoros, C. S. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2: 318-27, 2006.
16. Osborne, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275: 32379-32382, 2000.
17. Amemiya-Kudo, M., Shimano, H. and Hasty, A. H. et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res.* 43: 1220-35, 2002
18. Eberlé, D., Hegarty, B. and Bossard, P. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86:839-48, 2004
19. Im, S. S., Yousef, L. and Blaschitz, C. et al. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13: 540-549, 2011.
20. Xiao, X. and Song, B. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 45: 2-10, 2013.
21. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2: 282-6, 2001.
22. Yellaturu, C. R., Deng, X., Cagen, L. M. and Wilcox, H. G. et al. Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J. Biol. Chem.* 284: 7518-7532, 2009.
23. Yoshikawa, T., Shimano, H. and Amemiya-Kudo, M. et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2991-3000, 2001.
24. Liu, X., Qiao, A. and Ke, Y. et al. FoxO1 represses LXR α -mediated transcriptional activity of SREBP-1c promoter in HepG2 cells. *FEBS Lett.* 584: 4330-4, 2001.
25. Soukas, A., Cohen, P. and Socci, N.D. et al. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 14: 963-80, 2000.
26. Swierczynski, J. Leptin and age-related down-regulation of lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *J Physiol Pharmacol.* 57: 85-102, 2006.