

機関番号：12102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790860
 研究課題名（和文） 海馬におけるカンナビノイド受容体を介した脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割の解明
 研究課題名（英文） The role of fatty acid elongation enzyme Elovl6 through cannabinoid receptor in a hippocampus
 研究代表者
 石井 清朗（ISHII KIYOAKI）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
 研究者番号：80419150

研究成果の概要（和文）：中枢性のエネルギーホメオスタシスがどのような遺伝子やシグナルを介してこのような活動に関わっているのかを明らかにすることは、全身のエネルギー代謝を理解するために必須である。今回、Elovl6 KO マウスの海馬を中心に解析を行った結果、グリア細胞および神経細胞の増殖や分化への影響がみられた。また、KO マウスの海馬で内因性カンナビノイド受容体のアゴニスト、2-AG 量が減少していることから、この細胞への影響は 2-AG を介した、カンナビノイドカスケードがかかわっている可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Influence to proliferation and differentiation was observed by a glia cell and a nerve cell of Elovl6 KO mouse hippocampus. Because 2-AG amount of the endogenous cannabinoid receptor agonist decreases by a hippocampus of KO mouse, a possibility that cannabinoid cascade through 2-AG can consider.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：カンナビノイド、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高脂血症、動脈硬化、肥満といったメタボリックシンドロームの基礎疾患の背景にあるのはエネルギー代謝である。そしてこの代謝を調節しているのが脳であり、食

欲、嗜好、行動を司る中枢性のエネルギーホメオスタシスがどのような遺伝子やシグナルを介してこのような活動に関わっているのかを明らかにすることは、全身のエネルギー代謝を理解するために必須である。申請者

の研究室ではこれまで特に未解明部分の多い脂肪酸・中性脂肪合成に関わる酵素群を中心に研究を行い、作成した炭素数 12–16 の飽和・モノ不飽和脂肪酸を基質とする脂肪酸伸長酵素 Elov16KO マウスには脂肪酸組成の変化がエネルギー代謝遺伝子発現に重要な役割を持つことを示した。加えて野生型マウスにおいて、脳での Elov16 の発現が他の臓器に比べて多いこと、Elov16 KO マウスの脳機能の障害、特に海馬における機能、シグナル伝達系になんらかの変化があると示唆される結果が得られた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エネルギー代謝に重要な役割を持つ脂肪酸組成の変化が中枢神経系においても重要な生理的役割を持つという仮説を証明し、これに基づいた新しいメタボリックシンドローム治療法開発の基盤を構築することである。具体的には Elov16 KO マウスの海馬を用い、カンナビノイド受容体カスケードに注目して、どのようなシグナル伝達経路により脂肪酸組成の変化が脳へ影響を与えているのかを明確にする。

3. 研究の方法

脳切片の染色

Elov16 KO マウス 3~4 週齢を用いた。脳を採取し、4%パラフォルムアルデヒドで固定した。エタノールで脱水し、キシレン、パラフィンの順に置換して包埋を行った。その後、トリミングを行い、ミクロトームで切片を切り出し、スライドガラスに張り付けた。このサンプルを使って、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とクリューバー・バレラ (KB) 染色を行った。免疫染色はキシレンとエタノールによりパラフィンを除去した後、一次抗体 glia fibrillary acidic protein (GFAP) と

microtubule associated protein 2 (MAP2)、二次抗体 Alexa によって染色した。また核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) によって染色した。

海馬のプライマリーカルチャー

ラットおよびマウス胎児は E17 の海馬を単離し、培養した。血清濃度は段階を経て、最終的には 0%とした。染色はパラフォルムアルデヒドで固定した後、GFAP および MAP2 抗体を用いて行った。

2-AG の定量

Elov16 KO マウス 3~4 週齢を用いた。脳から海馬を採取し、凍結組織片粉砕を行った後、アセトニトリルにより脂質画分抽出した。このサンプルを固相抽出カートリッジにより前処理し、LC-MS/MS を行い定量した。標準物質および内部標準物質にはそれぞれ、2-AG-d8 および重水素置換体を用いた。

4. 研究成果

Elov16 KO マウスの行動解析から海馬における機能異常が推測されたことから、海馬を中心に解析を行った。4 週齢の KO マウスの海馬重量を WT と比べると KO マウスの方が有意に重いことが分かった。この原因を調べるためにグリア細胞のマーカー GFAP および、神経細胞マーカー MAP2 を用いて免疫染色を行うと、グリア細胞が KO マウスで多くみられることが分かった。また、ラット海馬のプライマリーカルチャーに Elov16 の過剰発現を行うと神経細胞の突起の伸長が抑制されることも分かった。Elov16 の働きを阻害すると、パルミトレイン酸からオレイン酸への経路が遮断されるため、この下流にあるジアシルグリセロール (DG) と 2-AG の合成も阻害されてしまう。この 2-AG は細胞の増殖や

分化に大きな影響を与えていることが知られているため、今回の Elov16 KO マウスの海馬においても 2-AG の値を LC-MS/MS によって定量した。その結果、KO マウスで 2-AG 量が有意に減っていることが分かった。したがって、Elov16 KO マウスにおけるグリア細胞および神経細胞の増殖や分化の変化は 2-AG を介した、カンナビノイドカスケードがかかわっている可能性が考えられる。

海馬のシグナル伝達系の中心にあるのが Ca^{2+} シグナル系であり、 Ca^{2+} 濃度の変化は遺伝子発現、シナプス間の伝達や神経突起の伸長といった海馬の機能を制御していることが知られている。そこでこの Ca^{2+} シグナル系と Elov16 を繋ぐカギとして注目される分子が内因性カンナビノイド受容体リガンド、2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) である。海馬では内因性カンナビノイド 1 受容体 (CB1) が多く発現し記憶、学習といった脳の高次機能調節に関与していることは広く知られている。Elov16 KO マウスではパルミトレイン酸からオレイン酸への経路が遮断されるため、この下流にあるジアシルグリセロール (DG) と 2-AG の合成も阻害されてしまう。CB1 は 7 回膜貫通型の G 蛋白結合型受容体であり、共役している G タンパク質 (Go 又は Gi) を介して電位依存性カルシウムチャンネルを阻害することにより神経伝達物質の放出を抑制して、結果神経興奮を抑えるという経路が示されている。近年、2-AG がラット海馬スライスの長期増強 (LTP) を抑制することや視床下部における食欲の調節に影響を与えていることが発表され、脳神経系において 2-AG が生理的役割を持つことが明らかとなってきた。しかし内因性カンナビノイド受容体リガンドの最も有力な候補である 2-AG が、自らの合成系である脂質代謝やエネルギー代謝の影響を受けて、どの

ようなシグナル伝達系を使って生理的役割をはたすのかということはほとんど分かっていなかった。しかし今回の研究で、Elov16 がこの系に影響を与えている可能性が出てきた。

これまでメタボリックシンドロームの基礎疾患で注目されてきたのはもっぱら脂肪酸の量の問題であった。しかし申請者の研究室で開発された Elov16 KO マウスの研究により、脂肪酸の種類もメタボリックシンドロームに大きな影響を与えていることが明らかとなった。さらに同マウスの表現系から脳のエネルギー代謝や学習機能に脂肪酸組成の影響があることが分かった。今研究の特色は脂肪酸伸長酵素 Elov16 による海馬機能への役割が明らかになると共に、脂肪酸種と脳の新たな関係を示すことが出来ることである。加えて内因性カンナビノイドがどのような生理的現象によって合成され、また合成された内因性リガンドがどのような生理的現象を起こすのかというより一般的な問題にも答えることができる。このことは内因性カンナビノイドと受容体、そして脂肪酸伸長酵素が神経系、炎症・免疫系、血管系、生殖系においても発現しており、種々の重要な役割を担っていることが示唆されていることから、一つの系統だけでなく多臓器間の相互作用を明らかにすることへ発展することが期待され、メタボリックシンドロームといった全身におよぶ疾患の治療への指針を得ることができると考えられる。

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)

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

①Danno H, Ishii KA, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, Furusawa M, Kumadaki S, Watanabe K, Shimizu H, Matsuzaka T, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shiman

o H. The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha. Biochemical and biophysical research communications 査読あり 391(2) 2010 1222-1227

② Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Urayama O, Yamada N, Shimano H. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. Biochemical and biophysical research communications 査読あり 385(4) 2009 492-496

③ 石井清朗、池田恭治 PGC-1 β と鉄の協調作用による破骨細胞の活性化 細胞工学 査読なし 28 2009 584-585

〔学会発表〕（計 1 件）

石井清朗 ミトコンドリア生合成と破骨細胞活性化における PGC-1 β と鉄取り込みの協調作用 細胞シグナル時空間制御機構研究会 2009 年 4 月 25 日 東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井清朗 (ISHII KIYOAKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：80419150