

脂肪細胞で生じる活性酸素種の標的分子の同定と
抗酸化食品成分による制御

三重大学大学院生物資源学研究科・准教授 青木 直人

■ 目的

過度に脂肪を蓄積した脂肪細胞は活性酸素種(reactive oxygen species:ROS)の主たる発生源であり、脂肪細胞に機能不全をもたらす主たる要因の一つとして数えられる。脂肪細胞内で ROS を適切に制御出来れば脂肪細胞の機能改善、メタボリックシンドロームの予防・改善につながると期待できるが、ROS の標的分子、作用機序など未解明な部分が多い。そこで本申請課題では、ビオチン化システインをプローブとして ROS 標的タンパク質を同定することを目的とした。また同定されたタンパク質の酸化が、緑茶カテキン(EGCG)のような抗酸化成分により軽減されるかどうか併せて検討した。

■ 方法

3T3-L1 脂肪細胞を終濃度 100 μ M のビオチン化システインを含む培地でインキュベーションした後溶解し、ストレプトアビジン-Horseradish Peroxidase(HRP)を用いたウエスタンブロット解析に供した。化学発光の撮影には Light capture(ATTO)を用いた。ビオチン化タンパク質の精製には Dynabeads M-280 Streptavidin(ベリタス)を用いた。精製したタンパク質は SDS-PAGE で分画後、ゲルよりタンパク質を抽出し、トリプシンで分解した後、分解物を直接液体クロマトグラフィーによる分画、質量分析装置による解析に用いた。

■ 結果および考察

ビオチン化システインを用いることにより、多くのタンパク質が 3T3-L1 脂肪細胞内で酸化されることが明らかとなった。これらのタンパク質には N-アセチルシステイン(NAC)あるいは H₂O₂ による前処理により明確に変動するものもあった。さらに EGCG で前処理したところ多くのタンパク質のビオチン化が減少した。ビオチン化タンパク質を精製してプロテオミクス解析したところ、24 種のタンパク質が同定された。同定されたタンパク質には脂肪細胞特異的 Fatty acid binding protein 4(FABP4)も含まれていた。FABP4 のビオチン化はウエスタンブロットにより確認され、その程度は EGCG により軽減されることも明らかとなった。FABP4 にはシステイン残基が二つ含まれる。今後は FABP4 が酸化された場合にそれが持つ生物学的機能に変化が及ぼされるかどうか検討する必要がある。また FABP4 以外に同定されたタンパク質についても酸化による機能変化を調べることにより、脂肪細胞内で生じる ROS と脂肪細胞の機能不全の因果関係が明らかになると期待される。

■ 結語

ビオチン化システインプローブを用いて脂肪細胞内で生じる ROS 標的タンパク質が増加することを明らかとした。抗酸化成分、酸化成分によりビオチン化の程度、すなわち酸化レベルの変化もモニターすることが出来た。ビオチン化システインによりビオチン化されたタンパク質をプロテオミクス解析により網羅した結果、細胞骨格関連タンパク質、各種酵素タンパク質の他に脂肪細胞特異的脂肪酸結合タンパク質 FABP4 が見出された。実際 FABP4 はビオチン化していること、その割合は抗酸化成分 EGCG により減少することも明らかとなった。