

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト血清からのアディポネクチン多量体の選択的精製とその
生理的役割

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 羽田 裕亮

アディポネクチン(30kDa adipocyte complement-related protein; Acrp30 とも呼ばれる)は脂肪細胞から分泌されるホルモンで、糖と脂質の代謝制御に重要な役割を担っている。アディポネクチンの低下は SNP などの遺伝素因と肥満や高脂肪食などの環境因子によって引き起こされる。アディポネクチンの低下は肥満によるアディポネクチン受容体のダウンレギュレーションの結果としても起こる。これらアディポネクチンの低下はインスリン抵抗性や 2 型糖尿病、メタボリックシンドローム、動脈硬化の進展に重要な役割を担っている事がわかっている。

アディポネクチンは 230 のアミノ酸からなり、前駆体では N 末端に 16-18 アミノ酸のシグナル配列を持つ。構造的には complement 1q family に属しており、成熟タンパクの N 末端約 20 アミノ酸は非コラーゲン構造で、続く 66 アミノ酸がコラーゲンドメイン、その後 C 末端までの 137 アミノ酸が globular ドメインを構成する。アディポネクチンは AMP-activated protein kinase (AMPK) を、リン酸化を介して活性化させ、骨格筋や肝臓で糖取り込みと脂肪酸 β 酸化を亢進させている。AMPK は運動時などに活性化され、骨格筋においては糖取り込みと脂肪酸 β 酸化を同時に亢進させ、肝臓においては糖新生を抑制する事が知られている酵素である。アディポネクチンにより AMPK が活性化されると骨格筋において糖取り込みや脂肪酸 β 酸化が亢進し、肝臓においては糖新生に関わる酵素の発現を減少させ、これらの組織内の中性脂肪含量を減少させ、血糖値を減少させる事が示唆されている。また AMPK のドミナントネガティブ AMPK の *in vitro* や *in vivo* の発現実験から、アディポネクチンのそれぞれの作用が減弱、消失する事から、実際にアディポネクチンが AMPK 経路を介して、糖脂質代謝を制御している事と考えられている。

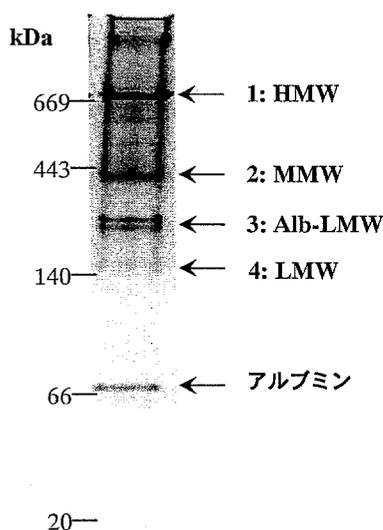
アディポネクチンはいくつかの多量体構造を取る事が知られており、その構造はこれまでゲルフィルトレー

ションや velocity gradient methods などにより解析されてきた。私の所属する研究室では、アディポネクチンの多量体は非加熱非還元下の SDS-PAGE により分離できる事を報告している。ヒトやマウスの血清中のアディポネクチンは 3 量体から high molecular weight (HMW) 多量体まで幅広く存在する。ヒトアディポネクチン変異のうち、G84R と G90S の変異は糖尿病と低アディポネクチン血症を来すが、この変異では HMW 多量体が形成しない。こういった結果から、それぞれの多量体が別の機能を持っている可能性がある事を、私の所属する研究室では以前報告している。しかしながら各多量体の正確な機能については十分に知られてはいなかった。

今回、抗アディポネクチン抗体カラム、ゼラチンカラム、ゲル濾過カラムを用いてヒト血清中のアディポネクチンを選択的に精製した。ヒト血清から抗アディポネクチン抗体で得られた結合画分をアルブミン抗体カラムへの結合画分と非結合画分に分離し、さらにゼラチンアフィニティカラムの NaCl 濃度を変えることによる分離と、ゲル濾過カラムによる分離で、4 つの画分に分離する事が出来た。

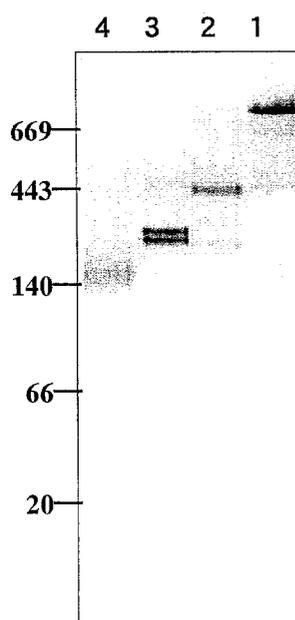
このうち、不明なタンパクと結合している多量体画分がある事を見出した。N 末端アミノ酸解析によりその結合タンパクがアルブミンであると判明した。さらに、還元処理などによりアルブミンがアディポネクチン 3 量体とジスルフィド結合している事が判明した。BS3 で架橋して行った泳動により各多量体の分子量を概算し、アディポネクチンの単量体が約 30kDa、アルブミンが約 67kDa である事を利用して、それぞれを 3 量体 (LMW: low molecular weight)、アルブミン結合 3 量体 (Alb-LMW: Albumin-binding low molecular weight)、6 量体 (MMW: middle molecular weight)、HMW (high molecular weight) と同定する事が出来た。多量体に対して pH を低下させる操作を行う事で多量体を分解する事が出来るが、HMW は中間体として MMW を経由して 2 量体に分解したため、HMW が 12 量体か更に大きい多量体である可能性が示された。

ヒト血清から分離したアディポネクチン



CBB染色
非加熱非還元

精製画分

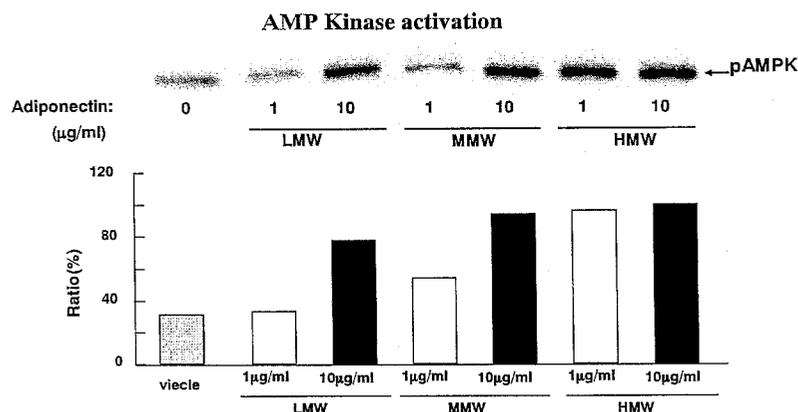


CBB染色

native-PAGE

これらの多量体毎の活性の違いを測定するために C2C12 細胞を用いた実験を行った。アディポネクチンの受容体はこれまでにアディポネクチン R1 受容体 (AdipoR1) とアディポネクチン R2 受容体 (AdipoR2) の 2 種類が知られており、C2C12 細胞の膜画分は AdipoR1 を多く発現して、AdipoR2 はあまり発現していない事が知られている。今回、精製された HMW、MMW、LMW アディポネクチン多量体を用いて、C2C12 細胞の膜画

分への結合能を検討したところ、HMWで最も強く結合する事が示された。続いて AMPK の活性化能を調べたところ、HMW がもっとも高い値を示した。これらの結果により血清中の HMW アディポネクチンの量が総アディポネクチンよりもインスリン抵抗性に強く関わっている可能性が示唆された。



アディポネクチン多量体の制御機構についてはいまだ未知の部分が多く残されている。今回の実験により HMW の生理活性が最も強く現れていることが示唆された。

肥満や糖尿病といった状態では HMW の比率が低下しており、チアゾリジン誘導体や食事制限により上昇することが認められており、アディポネクチンの測定に当たって総量とあわせて多量体の構成比を測定することがインスリン抵抗性などをよりよく推定することにつながり、治療効果の判定などにも有用となりうると考えられた。