

アポリポ蛋白遺伝子の転写調節に及ぼす 牛乳中に含有される各種脂肪酸の作用

委託研究機関：国立栄養研究所病態栄養部

研究代表者：松本明世

共同研究者：長縄 聡, 菊屋 恵理子, 土屋 建一

研究目的

心筋梗塞や脳卒中の主因は動脈硬化症であり、日常の食事と密接な関連のある病態である。食事由来の多価不飽和脂肪酸が血清脂質レベルを低下させる作用を持ち、高脂血症の治療・予防に役立つことが知られている。一方、パルミチン酸など飽和脂肪酸は血中のコレステロール値を上昇させるとされている。しかし、これら脂肪酸個々の脂質代謝に対する作用機構については明かにされていない。

我々はこれまでに、リポ蛋白代謝に対する食事性多価不飽和脂肪酸の効果について、ラットを用いて、動物脂・植物油・魚油により飼育し、アポリポ蛋白遺伝子の mRNA 発現量の差異を解析し、魚油がアポ A I およびアポ B の発現量を抑制することを見だし報告した。

本研究では、各種脂肪酸のリポ蛋白代謝に対する作用について、アポリポ蛋白遺伝子の転写制御にあたえる効果をメッセンジャー RNA (mRNA) レベルで解析することにより、作用メカニズムを明かにすることを目的とした。

これまで、リポ蛋白代謝に与える脂肪酸の作用を調べる研究は、人間を対象とする場合を含め、動物固体に食餌から食品あるいは精製油として脂肪酸を与えたため、得られた結果には動物の固体差・体内における代謝系の影響あるいは投与した脂肪酸が混合物であることなどの影響が加わり、解釈が複雑であった。しかし本研究では、肝癌由来の培養細胞 (HepG2) 系を用いることにより、一定の条件下、代謝系を単純化したもので実験を行い、純化された単一の脂肪酸のリポ蛋白代謝に与える作用を解析した。さらに、アポリポ蛋白遺伝子の転写にあたえる制御作用について、クローン化された cDNA をプローブに用い、ノーザンブロット法により

mRNA の発現レベルで解析することにより、転写調節に与える各種脂肪酸の作用および作用メカニズムを検討した。

方 法

無血清培地によるヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養条件

細胞はヒト肝癌由来の細胞系 HepG2 を用い、10% 牛胎仔血清 (FBS) を含む α -MEM 培地、37℃、5% CO₂ の条件下 3 日間の培養後、さらに FBS(-) の α -MEM 培地で 16 時間前培養を行い、培地由来の脂肪酸の影響を除いた細胞系を実験に供した。この培養条件によりディッシュ当りの細胞数は 5×10^6 であった。

脂肪酸 (FA) はステアリン酸 (18:0, SA), オレイン酸 (18:1, OA), リノール酸 (18:2, LA) およびエイコサペンタエン酸 (20:5, EPA) それぞれのエチルエステル (純度 > 99%) を用いた。各脂肪酸は 0.2% の脂肪酸を含まない牛血清アルブミン (BSA) でエマルジョンとした後、FBS(-) α -MEM 培地で 0.02% BSA, $\sim 750 \mu\text{M}$ FA となるように希釈し、細胞に対し FA 負荷 (本培養) を行った。また、実験は 0.002% BSA, $0 \mu\text{M}$ α -MEM 培地をコントロールとし、各条件当り 3 ディッシュとして行った。

全 RNA の調製とアポ蛋白 mRNA 量の解析法

各細胞から酸性グアニジンチオシアネート法により全 RNA を調製し、アポ蛋白 mRNA 量は、アポ A I cDNA, アポ B cDNA をプローブとして、ノーザンブロット法により分析し、得られたオートラジオグラムよりビデオデンストメーターを用いて、アポ蛋白遺伝子より転写された mRNA 量を解析した。

結果および考察

EPA を用いて、アポ A I, アポ B 遺伝子発現量に対する負荷濃度と負荷時間の影響を検討した。EPA $250 \mu\text{M}$ とし、本培養時間を 1 ~ 24 時間まで変えると、アポ A I mRNA 量はコントロールと比較し、培養 1 時間から減少し、6 時間では 70%, 12 時間では 90% 以下に減少した。また、24 時間培養の減少率は、12 時間培養と同等であった。一方、培養時間を 6 時間とし、EPA 濃度を変化させると、アポ A I

mRNA量はコントロールと比較しEPA50 μ Mで30%, 100 μ Mで50%, 250 μ Mで70%以下に減少し, 750 μ Mでは85%まで減少した。アポB mRNA発現量はアポA I発現量よりも減少率が大きく, 50 μ Mで70%, 250 μ Mでは90%以下に減少した。

さらに, アポ蛋白遺伝子発現調節に対する脂肪酸の不飽和度の違いによる影響を調べるため, 250 μ M SA, OA, LAおよびEPAについて6時間培養で検討した。アポA I mRNA発現量はコントロールを100%とすると, SAは81%, OAは42%, LAは30%およびEPAでは32%となり, 不飽和度の増加と共に発現量の減少が大きくなった。アポB mRNA発現量はコントロールを100%とすると, SAは166%, OAは121%, LAでは31%およびEPAは4.9%となった。このようにアポB遺伝子の発現に対し, SAとOAは発現量を増加させ, LAとEPAは発現量を減少させることが示された。以上の結果より, 不飽和度の異なる脂肪酸は, アポA I遺伝子とアポB遺伝子の発現調節にそれぞれ異なった作用を持つことが示され, 飽和脂肪酸であるステアリン酸はアポBの発現量を増加させることから, 肝臓における超低密度リポ蛋白(VLDL)系の合成を亢進させると考えられ, 飽和脂肪酸による血清脂質レベルの上昇はVLDLの合成亢進が強く影響すると考えられる。一方, リノール酸やエイコサペンタエン酸は, アポBの発現を強く抑制することから, VLDL合成の抑制が示唆され, この作用により血清脂質レベルを低下させると考えられる。

結 論

ヒト肝癌由来のHepG2を用いた培養細胞系により, 不飽和度の異なる脂肪酸のアポ蛋白遺伝子の発現調節に対する作用を検討した結果, 各脂肪酸はアポA I, アポB遺伝子に対し異なった作用を持つことが示された。さらにこの実験系は, 鎖長の異なる他の脂肪酸の作用を解析するために有用なものと考えられ, 今後他の低級脂肪酸や不飽和度の異なる脂肪酸の作用についても検討する予定である。