
デザインペプチドを用いた脂質分解による脂肪細胞からの脂肪酸、グリセロールの分離

Separation of glycerol and fatty acids from adipocytes by lipid hydrolysis using a designed peptide

研究代表者 神戸大学理学研究科学術研究員 飯田 禎弘

(A) 研究の目的

近年、カロリー摂取量の増加や運動不足の増加、食生活の変化により肥満になる人口が増えている。2017 年の「New England Journal of Medicine」によると、過体重の人は世界全体で約 22 億人、肥満に該当する人は約 7 億 1200 万人と推定されている。肥満自体は太っている状態であり疾病を意味するものではないが、肥満に起因、関連する健康障害を有するか、そうした健康障害が予測される内臓脂肪が過剰に蓄積した時、減量治療が必要とする肥満症になる。

そこで脂質を分解するペプチドを設計することで、脂肪細胞内の脂肪酸、グリセロールを脂肪滴から遊離させ、肥満を解消する新たな方法を開拓することを目的とする。

(B) 研究の内容、成果

これまでの研究で私が設計した脂質分解能を有する人工ペプチドのアミノ酸配列を基に、機能部位を残したまま配列を短くして、膜透過部位を挿入した新規デザインペプチド me5fR6 を設計した。

まずこのペプチドについて CD(円

二色性)測定を行い、二次構造を調べた。その結果、図 1 で示すようなスペクトルが得られ、ランダムコイル構造を取っていることが分かった。これま

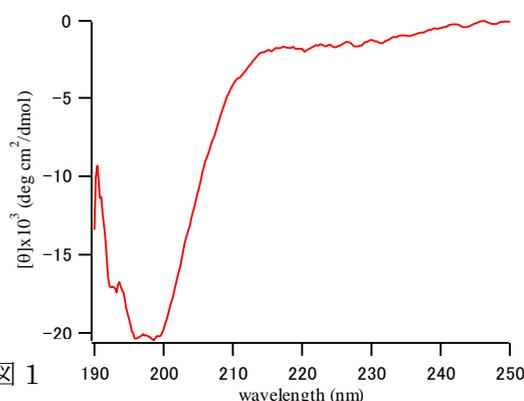


図 1

での研究で得られたデザインペプチドとは活性部位の配列は同じであるが、二次構造が異なるため分解能力に違いが出るのが考えられる。ただ、私の今までの研究より、ランダムコイル構造を有する同様なデザインペプチドが、加水分解能力が上がっている例もあるので、どうなるかは興味深いところである。

次にパルミチン酸とオレイン酸、グリセロールから成るトリグリセリド (POP) を用いて溶液中での脂質分解能の実験を行った。その結果を図 2 に示す。脂質を分解しグリセロールが生成されると、グリセロール検出試薬によって 540nm 付近にピークが見られるが、このデザインペプチドでは分解し

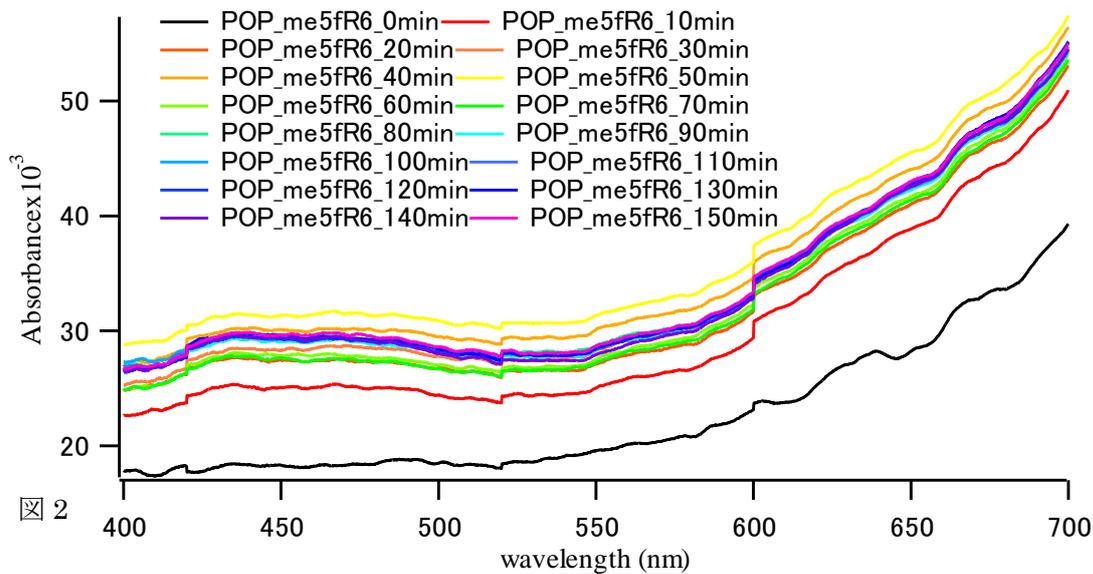


図 2

ている様子が見られなかった。その後の実験でこの活性部位の配列を含むデザインペプチドが、グリセロール検出試薬を阻害することが分かり、一概に分解していないとは言えない。

そこで次に、脂肪細胞内に存在する脂肪滴を模すためにリン脂質でトリグリセリドを覆ったミセルを作製し、それに対してのデザインペプチドの分解能または破壊能を蛍光分光装置による光散乱測定で調査した。その結果を図 3 に示す。赤で示したのがミセ

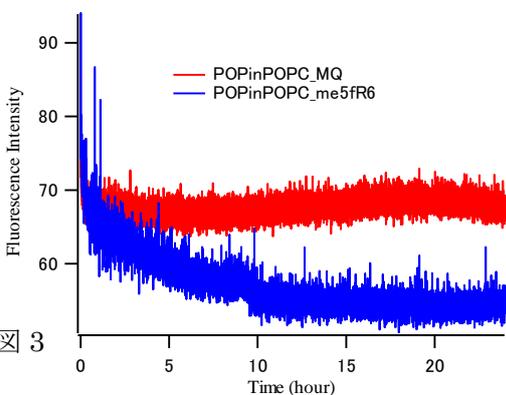


図 3

ルのみで、青で示したものがデザインペプチドをミセルに混合したものである。この結果より、デザインペプチ

ドを加えたものは散乱強度が減った、つまりミセルの大きさが小さくなったことを示す。すなわち、本研究でデザインしたペプチドは脂肪滴を分解または破壊する能力を有していることが示唆された。

最後にこのデザインペプチドを用いて脂肪細胞に対して投与し、脂質分解によって脂肪細胞から脂肪酸とグリセロールを分離できるかを調べた。ラット初代内臓脂肪細胞をプレートに播種し、培養 6 日目(d6)まで培養した。6 日目に培養上清を回収した後、デザインペプチド me5fR6 を最終濃度 $100 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ になるように添加した。また、比較のため PBS を加えたものも用意した。これらを 2 日間培養し、8 日目(d8)に培養上清を回収したのち、オイルレッド O 染色を行った。回収した培養上清にグリセロール検出試薬を使用し、脂肪分解によって生成、分離されたグリセロールを検出した。

まずオイルレッド O 染色の結果を図 4、図 5 に示す。オイルレッド O 染

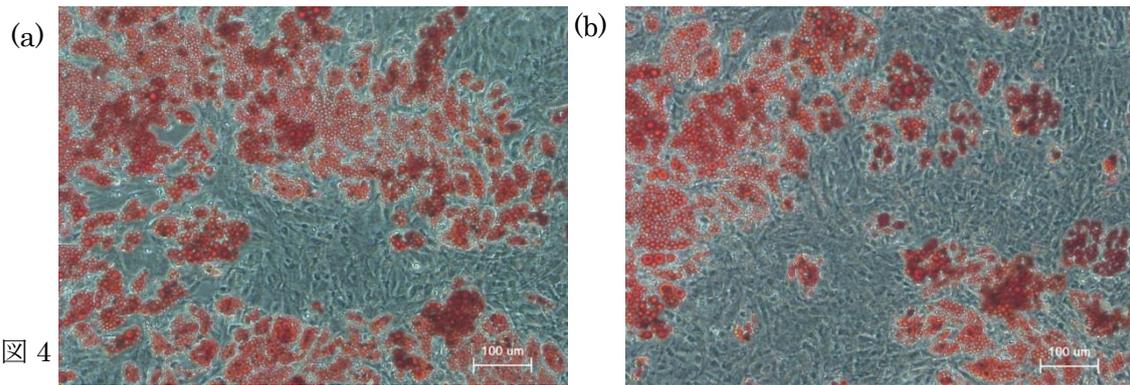


図 4

PBS

me5fR6 100 μ M

色は脂肪細胞の脂肪滴を赤く着色するものである。図 4 の顕微鏡観察画像より、デザインペプチドを加えたもののほうが PBS(生理食塩水)を加えたものよりも赤色が少ないように見える。この染色をイソプロパノールで溶解し半定量化したものを図 5 に示す。

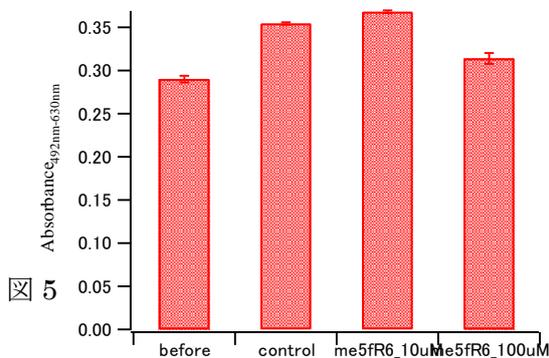


図 5

この図の棒グラフが低いほどオイルレッド O が少ない、つまり脂肪滴が少なくなっていることを示す。このグラフから、一番右のデザインペプチドを 100 μ M 加えたものは control (PBS)を加えたものよりも小さくなっており、このペプチドが脂肪滴を少なくしていることが示された。

次に培養上清にグリセロール検出試薬を使用した結果を図 6 に示す。このグラフでは棒グラフが大きいほど

脂質が分解され、グリセロールが生成されていることを示唆する。この図の

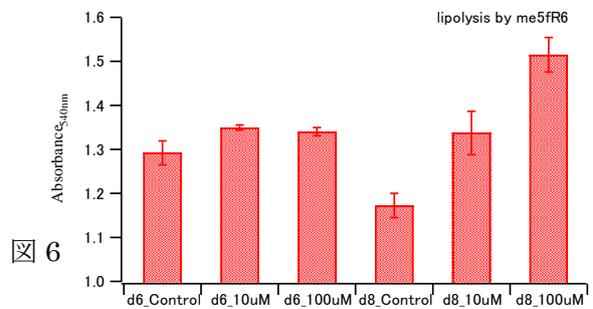


図 6

左 3 つが 6 日目のグリセロール量を、右 3 つが 8 日目のグリセロール量を示す。また、それぞれ左から PBS、me5fR6 10 μ M、me5fR6 100 μ M を加えたものとなっている。6 日目までの培養上清にもグリセロールが生成されている結果だが、これは培養中に死んだ細胞由来や自然に発生したもの、脂肪細胞を播種するときに細胞の保存のために使用していたものなどが存在していたと考えられるので、この d6 は無視して、d8 の結果のみでグリセロールの分離生成が議論できるものと考えられる。その結果、PBS を加えたものよりも明らかにデザインペプチドを 10 μ M、100 μ M を加えたものが多くグリセロールを生成して

いることが言える。この結果を、グリセロール検出試薬を用いてグリセロールの検量線を作成したものに対して当てはめて、デザインペプチドが精製したグリセロールの濃度を算出した。計算の結果、PBS: 8.31mg/L、me5fR6 10 μ M: 9.59mg/L、me5fR6 100 μ M: 10.97mg/L の濃度であった。この値を引き算しデザインペプチドの効果によるグリセロール生成量を出すと、2.66mg/L となり換算すると 29 μ M となる。この分解量は有意な差であると考えられる。また、膜透過部位を付与したこのデザインペプチドは細胞外から細胞の中へ侵入し脂肪滴の脂質を分解してグリセロールと脂肪酸を細胞外に分離することができたと言える。ここで、溶液中での脂質分解実験では脂質を分解していないとみられる結果だったのに対して、脂肪細胞を用いた実験では脂質を分解している結果になったことに関しては、培地中や細胞内では分子が夾雑している環境になっているので、ペプチドの構造が変化し適切な構造を取ったのではないかと考えられる。

まとめると、本研究で開発したデザインペプチド me5fR6 は脂肪細胞内に侵入し脂肪滴の脂質を分解して、グリセロールと脂肪酸に分離することに成功した。

(C) 今後の研究の方向、課題

今の段階では脂肪の分解量がまだ少ないと考えられるので、もっと多くの脂肪を分解することができること

が課題に挙げられる。そのためには、溶液中での脂質分解が見られることが必要になってくると考えられる。なので、今後の方向性としては、今回のデザインペプチドを基に、膜透過部位を維持しつつ、今までの研究で得られていたような二次構造を有するペプチドを設計していく。

(D) 成果の発表、論文等

特になし