

3T3-L1 脂肪細胞分化における亜鉛およびバナジウムの影響

高橋 栄二, 鳥居 伸一郎, 松井 徹, 矢野 秀雄

京都大学大学院農学研究科・動物栄養科学分野

Effect of zinc and vanadium on 3T3-L1 adipocyte differentiation

Eiji Takahashi, Shin-ichiro Torii, Tohru Matsui and Hideo Yano

Laboratory of Animal Nutrition, Graduated School of Agriculture, Kyoto University Kyoto 606-8502, Japan

Zinc and vanadium have been reported to possess insulin-mimetic activity on various types of cells. 3T3-L1 preadipocyte which is derived from mouse can differentiate into adipocyte by several stimulators including insulin. We examined the stimulative effects of zinc and vanadium on the differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. The supplementation of zinc during day 0-2 after confluence increased GPDH activity (a parameter of adipocyte differentiation) on day 8. The addition of zinc to 3T3-L1 cells for day 2-8 also enhanced GPDH activity. However no effect was observed when zinc was supplemented to fully differentiated 3T3-L1 adipocytes. Vanadium also increased GPDH activity in dose dependent manner when added for day 2-8.

3T3-L1 細胞はマウス由来の脂肪前駆細胞株であり、インスリン等の作用を受け脂肪細胞へ分化する。一方、一部の微量元素はインスリン様作用またはインスリン増強作用を有することが報告されている。例えば、in vitro において亜鉛はラット脂肪細胞でグルコース取り込みを促進し¹⁾、また、糖尿病ラットの血糖値を低下させることが報告されている²⁾。バナジウムは細胞質チロシンキナーゼ活性化作用を有し³⁾、糖尿病患者のインスリン感受性を改善することが示されている⁴⁾。これらの微量元素がそのインスリン様作用またはインスリン増強作用により脂肪細胞分化を促進するならば、微量元素の摂取の多寡が脂肪組織の発達に影響を及ぼしている可能性がある。そこで、本実験は亜鉛およびバナジウムを3T3-L1 細胞の培地に添加し、脂肪細胞分化に及ぼす影響について検討した。

実験方法

3T3-L1 細胞を5%ウシ胎仔血清(FBS)を含むDMEMで培養を開始した。対照となる培養条件としては、コンフルエント後、0.25 μ M デキサメタゾン(DEX)、0.5mM メチルイソブチルキサンチン(MIX)および10 μ g/ml インスリンで分化誘導した。分化誘導処理48時間目からインスリン(5 μ g/ml)のみを

添加し、その後6日間培養し、脂肪細胞分化の指標として細胞質グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH, EC 1.1.1.8) 活性を測定した⁵⁾。また、この対照処理におけるインスリンを亜鉛またはバナジウムと置き換えて培養を行った。培地に添加した亜鉛およびバナジウムは $ZnCl_2$ および $VOSO_4 \cdot nH_2O$ ($n=3\sim4$) を用いた。

結果と考察

コンフルエント後2日間の分化誘導処理を DEX, MIX および亜鉛で行い、その後6日間培養した場合の GPDH 活性を Fig. 1 に示した。亜鉛の添加時には、インスリン添加と比較し GPDH 活性は低かったが、DEX, MIX のみで分化誘導処理した時よりも高い GPDH 活性が認められた。

DEX, MIX およびインスリンで分化誘導処理後48時間目からインスリンの代わりに亜鉛を培養終了まで添加した結果を Fig. 2 に示した。亜鉛添加により、無添加と比較して GPDH 活性の上昇が見られ、インスリンを添加した場合と同程度の高い GPDH 活性が得られた。これらの結果から、亜鉛は脂肪細胞分化の初期 (分化誘導処理時) および後期のいずれにおいても分化を促進することが示唆された。

Fig. 3 は分化誘導処理後48時間目からインスリンの存在下で亜鉛を添加して6日間培養した結果を示した。比較的高濃度 ($5\sim10\mu g/ml$) のインスリン存在下で亜鉛による GPDH 活性の上昇効果が認められた。亜鉛は *in vitro* においてブタイインスリンに結合すること⁶⁾、ヒトインスリンにおいて亜鉛が結合することにより活性酸素による酸化を抑制する安定化作用を有すること⁷⁾、およびウシインスリンに結合することでインスリンの作用を増強する⁸⁾ ことがそれぞれ *in vitro* で報告されている。Fig. 3 で示し

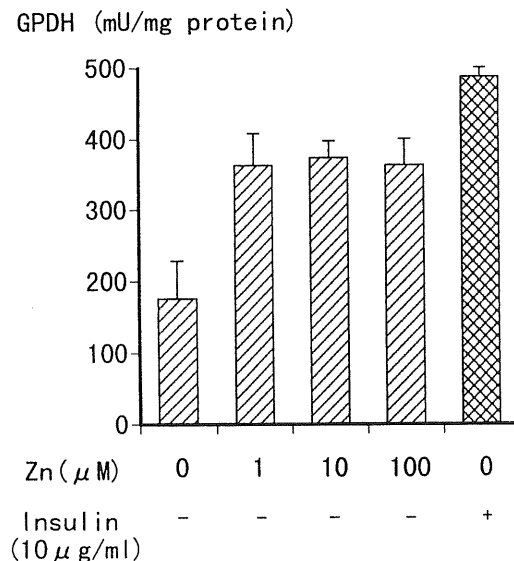


Fig. 1 Effect of zinc supplementation on GPDH activity of 3T3-L1 cells in the early stage of differentiation.

Adipocyte differentiation was induced by DEX, MIX and zinc for 48 hours and then the cells were incubated with insulin for 6 days. Values are means \pm S.D. for 3 replications.

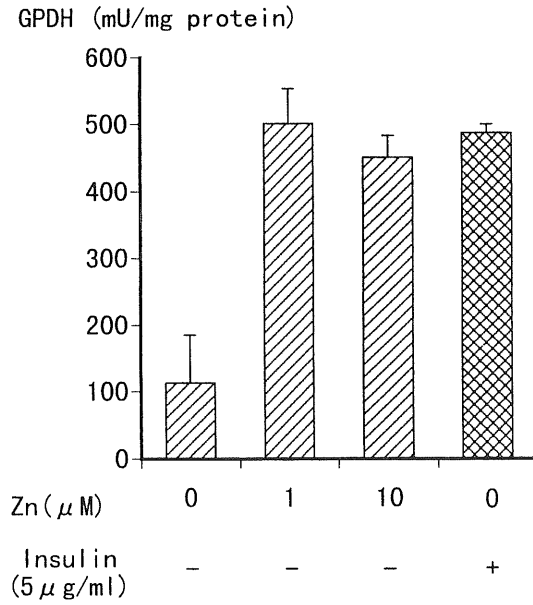


Fig. 2 Effect of zinc supplementation on GPDH activity of 3T3-L1 cells in the late stage of differentiation.

After treatment with DEX, MIX and insulin for 48 hours, zinc was added to the medium without insulin for 6 days. Values are means \pm S.D. for 3 replications.

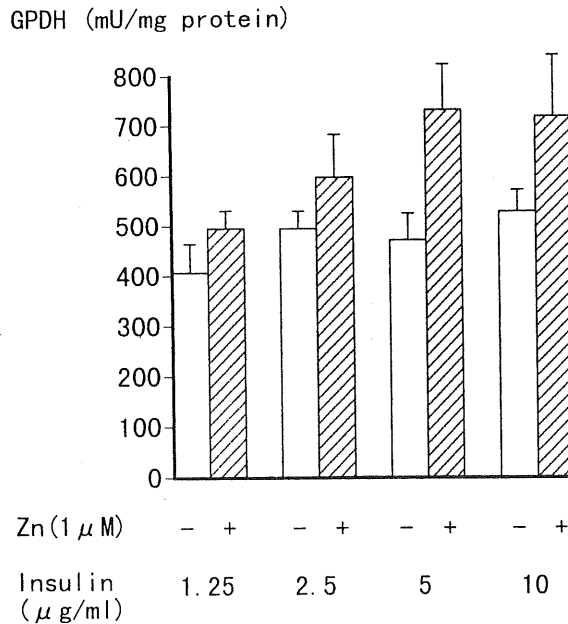


Fig. 3 Effect of supplementation of zinc with insulin on GPDH activity of 3T3-L1 cells in the late stage of differentiation.

3T3-L1 cells were treated with DEX, MIX and insulin for 48 hours and then incubated in the presence of insulin and zinc (1μ M) for 6 days. Values are means \pm S.D. for 3 replications.

た高濃度のインスリン存在下で亜鉛添加による脂肪細胞分化の促進はこのように結合することでインスリンを安定化させ、その作用を増強させた結果である可能性が考えられる。一方、Fig. 1 および 2 ではインスリンを添加しない条件下であるが亜鉛の添加により GPDH 活性の上昇が認められたことから、亜鉛はインスリンの作用を増強させるのとは別のメカニズムにより GPDH 活性を上昇させたと思われる。その一つとして亜鉛のインスリン様作用¹⁾ による可能性が考えられる。

Fig. 4 はすでに分化を完了した脂肪細胞における亜鉛の影響を検討した結果である。DEX, MIX およびインスリンで分化誘導処理し、分化誘導後48時間目からインスリンを添加して6日間培養し、ほぼすべての細胞を脂肪細胞に分化させた。その後インスリンを除くとともに亜鉛を8日間添加した。インスリン添加により GPDH 活性の上昇が得られたが、亜鉛添加による GPDH 活性の明らかな変化は認められなかった。このことから、亜鉛は脂肪前駆細胞に作用して分化を促進するが、脂肪細胞の分化の維持には影響しないと考えられる。

Fig. 5 にバナジウムが脂肪細胞分化に及ぼす影響を示した。3T3-L1 細胞を DEX, MIX, インスリンで分化誘導処理し、分化誘導処理後48時間目からインスリンの代わりにバナジウムを添加した培地で6日間培養した。バナジウムを添加することにより、濃度依存的に GPDH 活性の上昇が認められた。バナジウムがどのようなメカニズムにより脂肪細胞分化を促進するかは明らかではないが、*in vitro* においてバナジウムは細胞質チロシンキナーゼ活性化を介してラット脂肪細胞で脂質合成を促進することが報告されている⁴⁾。そこでバナジウムにより活性化される細胞質チロシンキナーゼと脂肪細胞分化が関連していることも考えられる。

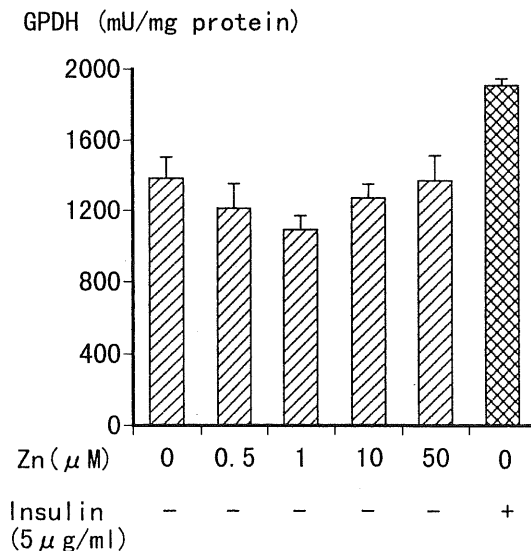


Fig. 4 Effect of zinc supplementation on GPDH activity of differentiated 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were treated with DEX, MIX and insulin for 48 hours and incubated with insulin for 6 days. Then the cells were exposed to zinc for 8 days. Values are means \pm S.D. for 3 replications.

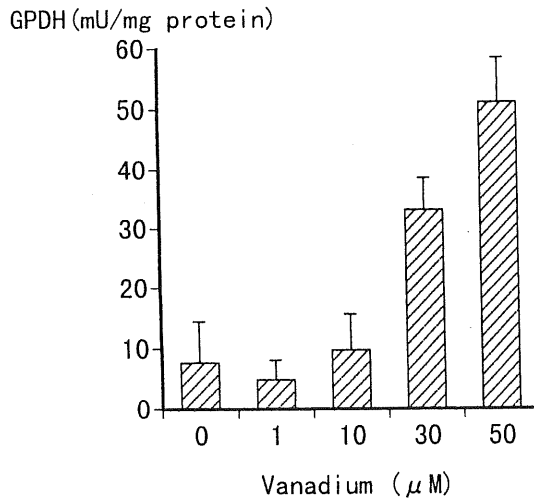


Fig. 5 Effect of vanadium on GPDH activity of 3T3-L1 cells in the late stage of differentiation.

Cells were treated with DEX,MIX and insulin for 48 hours, and then vanadium was added for 6 days. Values are means \pm S.D. for 3 replications.

本実験の結果から、亜鉛およびバナジウムは脂肪細胞分化を促進することが *in vitro* で示された。In vivo においても、亜鉛およびバナジウムの摂取の多寡が脂肪細胞分化への影響を介して脂肪組織の形成に関わっている可能性が推察される。

参 考 文 献

- 1) May, J. M and C. S, Contoreggi (1982) J. Biol. Chem. 257 : 4362-4368
- 2) Shisheva, A., D, Gefel and Y, Shechter (1992) Diabetes. 41 : 982-988
- 3) Shisheva, A and Y, Shechter (1993) J. Biol. Chem. 268 : 6463-6469
- 4) Halberstam, M., N, Cohen., P, Shlimovich., L, Rossetti and H, Shamon (1996) Diabetes. 45 : 659-666
- 5) Wise, L. S and H. Green (1979) J. Biol. Chem. 254 : 273-275
- 6) Coffman, F. D and M. F Dunn (1988) Biochemistry. 27 : 6179-6187
- 7) Faure, P., J-L, Lanfond., C, Coudray., E, Rossini., S, Halimi., A, Favier and D, Blache (1994) Biochem. Biophys. Acta. 1209 : 260-264
- 8) Arquilia, E. R., P, Thiene., T, Brugman., W, Ruess and R, Sugiyama (1978) Biochem. J. 175 : 289-297