

亜鉛の脂肪細胞分化促進作用に及ぼす一酸化窒素 (NO) の役割

田中真哉, 高橋栄二, 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*)

Role of Nitric Oxide (NO) on Zinc-promoted Adipocyte Differentiation

Shinya TANAKA, Eiji TAKAHASHI, Tohru MATSUI and Hideo YANO

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

We have reported that zinc promotes differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The objective of the present experiment was to investigate the effect of zinc on NO production and the effect of NO on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. NO metabolites concentration was decreased by the addition of 1 μ M zinc into the medium. NO donors such as SNP and NOC18 suppressed glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) activity, a marker of adipocyte differentiation, in dose-dependent manner. A NOS inhibitor (L-NAME) significantly increased GPDH activity. These results suggested that preadipocytes produced NO during differentiation, NO autocrinally inhibited adipocyte differentiation, and zinc promoted adipocyte differentiation through inhibiting NO production of preadipocytes.

我々は、スィスマウス胎児由来の脂肪前駆細胞株である3T3-L1細胞の培地へ亜鉛を添加すると脂肪細胞への分化が促進されることを報告した¹⁾。亜鉛は無細胞系において一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性を抑制することが報告されており²⁾、亜鉛の脂肪細胞分化促進作用に一酸化窒素 (NO) が関与している可能性が考えられる。NOは循環系、神経系の情報伝達に関するだけでなく、感染、炎症、免疫反応に対しても機能を有し、細胞の増殖や分化、さらにはアポトーシスの制御、発癌などの幅広い生命現象に関わっていることが明らかにされつつある³⁾。脂肪組織に関する研究では、ラットにNOS阻害剤を摂取させると、脂肪蓄積が上昇し、NO供与体を摂取させると脂肪組織重量が減少することが報告されている^{4),5)}。また、ラットの白色脂肪組織においてNOSが発現し、NOが産生されていることが報告されている⁶⁾。

本試験では、亜鉛が3T3-L1細胞の分化期におけるNO産生に及ぼす影響、NO供与体およびNOS阻害

* 所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

剤が3T3-L1細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

3T3-L1脂肪前駆細胞を12-well multi-plateに 1×10^4 個/cm²の密度で播種し、5%ウシ胎児血清、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシンを含むDulbecco's Modification of Eagle's Mediumを用いて培養した。播種約7日後にコンフルエント状態を確認した後、培地に0.25 μ Mデキサメタゾン(DEX)、0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン(MIX)および10 μ g/mlインスリンを添加し、分化誘導処理を48時間行った。分化誘導処理以後はDEX、MIXおよびインスリンを除き、塩化亜鉛を添加した。分化誘導処理後4日目および6日目に培地中のNOの代謝産物であるNO₂+NO₃濃度をグリース法により測定した⁷⁾。また、同様に分化誘導処理以後にNO供与体であるsodium nitroprusside(SNP)および2,2'-(hydroxynitrososohydrazono) bis-ethanamine(NOC18)、NOS阻害剤であるN^w-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride(L-NAME)を添加し、5 μ g/mlインスリンと共に培養終了まで添加した。分化誘導処理後8日目に脂肪細胞分化の指標として、細胞のグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPDH)活性を測定した⁸⁾。

なお、培養は37 $^{\circ}$ C、5%CO₂・95%空気の気相中で行い、培地は2日おきに新しいものと交換した。統計処理はStudent's t-testを用いた。

結果および考察

亜鉛添加が3T3-L1細胞のNO産生に及ぼす影響

分化誘導処理後4日目では、亜鉛添加により濃度依存的にNO代謝産物濃度が減少する傾向が認められ、分化誘導後6日目では、1 μ Mの亜鉛添加でNO代謝産物濃度は有意に減少した(Fig. 1)。また、このときの脂肪細胞分化は、亜鉛添加により促進されていた。

この結果から、亜鉛は3T3-L1細胞によるNO産生を抑制することが示唆された。

NO供与体が脂肪細胞分化に及ぼす影響

SNP添加によりGPDH活性は0.1から100 μ Mの濃度で、濃度依存的にGPDH活性を減少させた(Fig. 2)。また、NOC18添加によってもGPDH活性は濃度依存的に減少し、100 μ Mの濃度添加時では著しく減少した(Fig. 3)。これらの結果から、NOは3T3-L1細胞の脂肪細胞分化を抑制することが示された。

NOS阻害剤が脂肪細胞分化に及ぼす影響

100 μ MのL-NAME添加により有意にGPDH活性は上昇し、1 μ Mから50 μ Mの濃度でGPDH活性が上昇する傾向が認められた(Fig. 4)。この結果より、3T3-L1細胞においてNOが産生され、その産生を阻害することで分化が促進されることが示された。

以上の結果から、3T3-L1脂肪前駆細胞はNOを産生すること、亜鉛はそのNO産生を抑制すること、NOは脂肪細胞への分化を抑制することが示唆された。

さらに、亜鉛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おり、亜鉛は

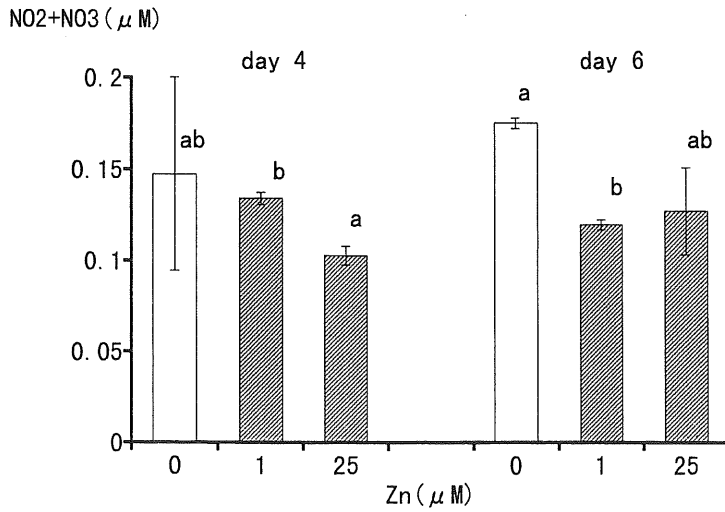


Fig. 1 Effect of NO production of 3T3-L1 cells during differentiation.

Cells were treated with DEX, MIX, and insulin for 48 hours, and then zinc was added. NO concentration in the medium was determined at 4 and 6 day after adipogenic treatment.

Values are means \pm SD for duplication. a,b; different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

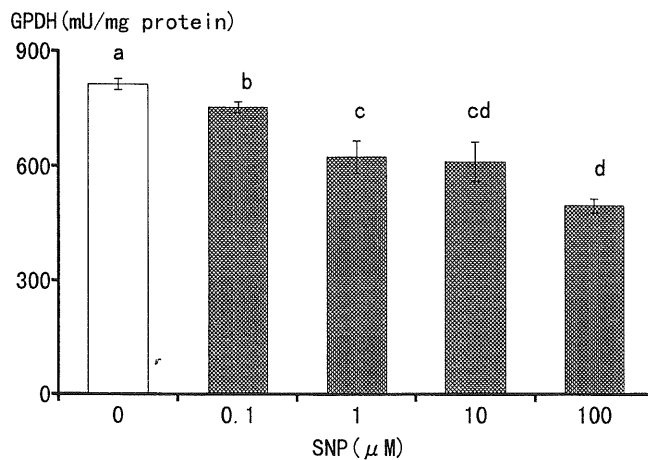


Fig. 2 Effect of NO donor (SNP) on GPDH activity of 3T3-L1 cells.

Cells were treated with DEX, MIX, and insulin for 48 hours, and then SNP was added for 6 days.

Values are means \pm SD for triplication. a-d; different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

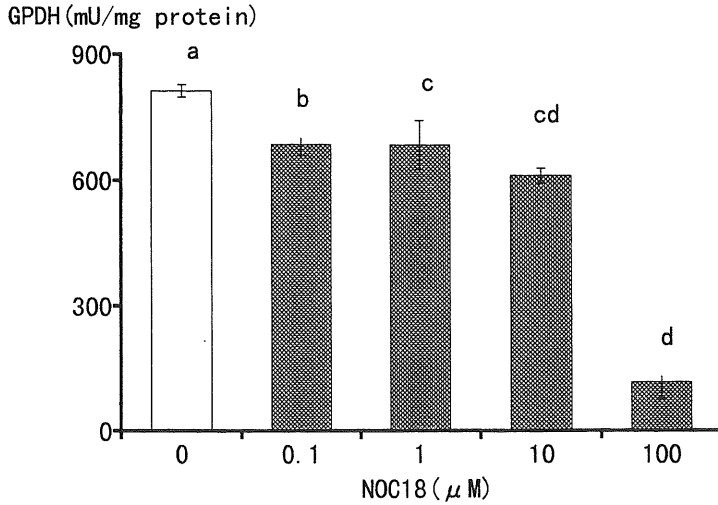


Fig. 3 Effect of NO donor (NOC18) on GPDH activity of 3T3-L1 cells. Cells were treated with DEX, MIX, and insulin for 48 hours, and then NOC18 was added for 6 days. Values are means \pm SD for triplication. a-c; different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

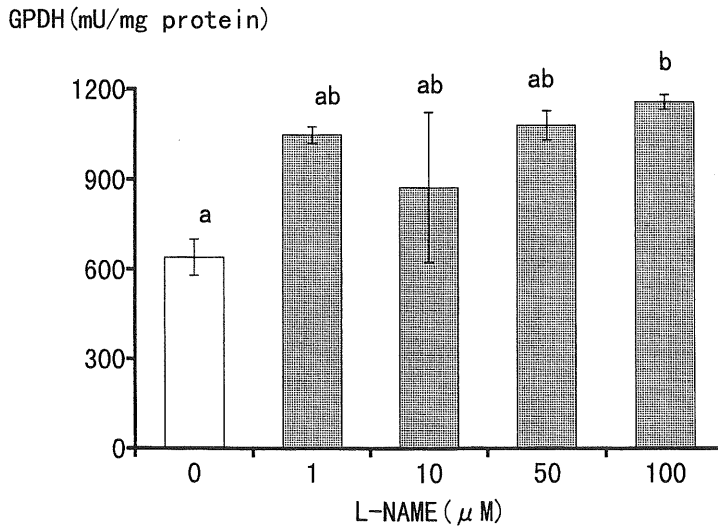


Fig. 4 Effect of NOS inhibitor (L-NAME) on GPDH activity of 3T3-L1 cells. Cells were treated with DEX, MIX, and insulin for 48 hours, and then L-NAME was added for 6 days. Values are means \pm SD for triplication. a,b; different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

培養ラット脂肪細胞におけるグルコース取り込みを促進し、 β -アゴニストにより刺激される脂肪分解を抑制することが報告されている⁹⁾。一方、培養ラット脂肪細胞へのNO供与体の添加は、脂肪分解を促進することが報告されており¹⁰⁾、これらの亜鉛の作用にもNOが関与している可能性が考えられる。

3T3-L1脂肪前駆細胞においてNOSが発現しているという報告はないが、分化した3T3-L1脂肪細胞において、リポ多糖(LPS)や炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α 、インターフェロン- γ によって誘導型NOS(iNOS)が発現することが報告されている¹¹⁾。また、ラットの白色脂肪組織では、LPSによって刺激しなくてもiNOSが発現していることが報告されている⁶⁾。本試験において培地中のNO代謝産物濃度が亜鉛添加により減少すること、およびNOS阻害剤を添加することにより、脂肪細胞分化が促進されたことから、分化期の3T3-L1細胞においてNOSが発現していることが推察され、そこで、亜鉛は脂肪前駆細胞におけるNO産生を抑制することにより分化を促進すると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 高橋栄二, 鳥居伸一郎, 松井徹, 矢野秀雄 (1998) 微量栄養素研究 15 : 47-51
- 2) Persechini, A., K. McMillan and B.S.S. Masters (1995) Biochemistry 34 : 15091-15095
- 3) 赤池孝章 (1999) 組織細胞工学 25 : 4-8
- 4) Khedara, A., Y. Kawai, J. Kayashita and N. Kato (1996) J. Nutr. 126 : 2563-2567
- 5) 加藤範久, 後藤剛史 (1999) 第16回微量栄養素研究会シンポジウム講演要旨集 p.15
- 6) Ribiere, C., A.M. Jaubert, N. Gaudiot, D. Sabourault, M.L. Marcus, J.L. Boucher, D. Denis-Henriot, and Y. Giudicelli (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 222, 713-717
- 7) Green, L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum (1982) Anal. Biochem. 126 : 131-138
- 8) 森川実 (1992) 組織培養の技術. 第二版. p.113 朝倉書店. 東京.
- 9) May, J.M., and C. S. Contoreggi (1982) J. Biol. Chem. 257 : 4362-4368
- 10) Gaudiot, N., A. M. Jaubert, E. Charbonnier, D. Sabourault, D. Lacasa, Y. Giudicelli, and C. Ribiere (1998) J. Biol. Chem. 273 : 13475-13481
- 11) Kapur, S., B. Marcotte, and A. Marette (1999) Am. J. Physiol. 276 : E635-641