

アスコルビン酸リン酸による 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化促進作用のメカニズムの検討

末長 将志, 河内 浩行, 松井 徹
(京大院・農・動物栄養*)

Molecular Mechanisms of Ascorbate Phosphate on Differentiation in 3T3-L1 Preadipocytes

Masashi SUENAGA, Hiroyuki KAWACHI and Tohru MATSUI
Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Adipocyte differentiation is primarily regulated by a cascade of transcription factors, including CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Ascorbic acid was reported to promote the adipocyte differentiation. However, its detail mechanism has not been clarified. In the present experiment, we investigated the molecular mechanism of ascorbate phosphate on differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. Treatment with ascorbate phosphate enhanced the induction of some markers of adipocyte differentiation such as glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity and triglyceride accumulation. Gene expression of PPAR γ and C/EBP α were increased by ascorbate phosphate treatment. Moreover, gene expression of C/EBP β , expressing at early stage in adipogenesis, was also stimulated by ascorbate phosphate. These results suggest that ascorbic acid promotes adipocyte differentiation at least via affecting C/EBP β expression level at the early phase of differentiation.

3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた試験において、アスコルビン酸は、脂肪前駆細胞の分化を促進し、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPDH) 活性やトリグリセリド (TG) の細胞内蓄積を増加させる¹⁾。脂肪細胞分化の重要な転写因子としては C/EBP ファミリーと PPAR γ があげられる²⁾。C/EBP ファミリーは N 末端より転写活性化領域、DNA 結合領域、ロイシンジッパー領域からなる転写因子で、C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , CHOP の 6 種類が同定されており、中でも脂肪細胞分化においては C/EBP α , β が重要であると考えられている。PPAR γ はリガンド依存性転写因子であり、核内転写因子であるレチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成することで、転写因子としての機能単位を構成する。また、その遺伝子配列のプロモーター領域中に C/EBP 応答配列を有している³⁾。培養系の脂肪細胞分化過程ではまず初期に C/EBP β が発現し、PPAR γ , C/EBP α の発現を誘導する。PPAR γ と C/EBP α は相互に発現を誘導、活性を高め、最終的に PPAR γ が脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘導し脂肪細胞分化を誘導する⁴⁾。一方、アスコルビン酸がこれらの転写因子の発現や活性にどのように関わっているかなどについては不明

である。そこで本試験ではアスコルビン酸供与体として安定型とされ、アスコルビン酸とほぼ同程度の生物活性を有するアスコルビン酸リン酸を用いて 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化における影響のメカニズムを分子生物学的手法により検討した。

実験方法

1. 細胞培養

マウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞を 1×10^4 個/mL の密度で 12 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO₂ 環境下のインキュベーター内において 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で培養した。コンフルエント 2 日後、0.25 μ M デキサメタゾン (DEX), 0.5 mM メチル-3-イソブチルキサンチン (MIX), 10 μ g/mL インスリンを加えた分化誘導培地に交換し、2 日間培養を続けた。その後 5 μ g/mL インスリンを加えた 10% FBS 含有 DMEM で 6 日間培養を行った。アスコルビン酸としては安定型とされるアスコルビン酸リン酸を用い、あらかじめ DMEM に溶かして濃度調整し凍結保存し

*所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)
TEL: +81-75-753-6056 FAX: +81-75-753-6344

たものを分化誘導時から培養終了時まで DMEM に直接添加した。

2. 脂肪細胞分化の評価

1) Oil Red O 染色

3T3-L1 脂肪前駆細胞を 50 μM のアスコルビン酸リン酸で処理を行い分化誘導後 8 日目に冷 10% ホルマリン / Ca:Mg フリーリン酸バッファー溶液で固定した。その後 0.5% Oil Red O 染色液を用いて脂肪滴の染色を行った。

2) GPDH 比活性および TG 濃度

3T3-L1 脂肪前駆細胞を 10, 50, 100 μM のアスコルビン酸リン酸で処理を行い分化誘導 8 日後, 0.1 M トリス-EDTA を用いて細胞抽出後, 分析まで -80°C 保存した。脂肪細胞分化の指標として GPDH 活性を Green と Wise の方法⁵⁾により測定した。併せてタンパク質量を Lowry 法⁶⁾により測定し, タンパク質量にて補正した GPDH 比活性を求めた。また, 細胞抽出液をトリグリセライド E-テストワコーを用い, TG 濃度を測定, タンパク質量にて補正した。

3. 半定量 RT-PCR 法

3T3-L1 脂肪前駆細胞を 50 μM のアスコルビン酸リン酸で処理した。分化誘導開始前 (0 日) および開始 0.5, 1, 2, 4, 6, ならびに 8 日後に Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法により RNA 抽出を行った。試料中 RNA 量

は 260 nm の吸光度を測定し定量した。各試料中 RNA 量をもとに RT-PCR 法で遺伝子発現を半定量的に測定した。cDNA 合成には市販のキット TaKaRa PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 を用いた。各遺伝子発現量は 18SrRNA の発現量で補正し, 分化誘導開始前 (0 日) を 100 とし相対値で表わした。

結果と考察

1. アスコルビン酸リン酸添加が 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化に及ぼす影響

3T3-L1 脂肪前駆細胞にアスコルビン酸リン酸を 50 μM で添加し, 脂肪細胞分化を Oil Red O 染色を行い評価した。アスコルビン酸リン酸処理区は染色部分の増加が認められ脂肪滴量の増加が示唆された (Fig. 1A)。また添加濃度を 10, 50, 100 μM とすると, すべての処理区で GPDH 比活性, TG 濃度ともに対照区に比べ有意に増加した (Fig. 1B, C)。以上のことからアスコルビン酸は 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化を促進するといえる。この結果は Kawada らの報告¹⁾と一致した。脂肪前駆細胞培養に培地として用いられる DMEM にはアスコルビン酸は含まれていない。したがって本試験の対照培養液に含まれるアスコルビン酸は FBS 由来である。FBS のアスコルビン酸濃度を調べたところ 10~12 μM と低値であった (未発表)。したがって, 本試験の対照培養液中のアスコルビン酸濃度は 1 μM 程度

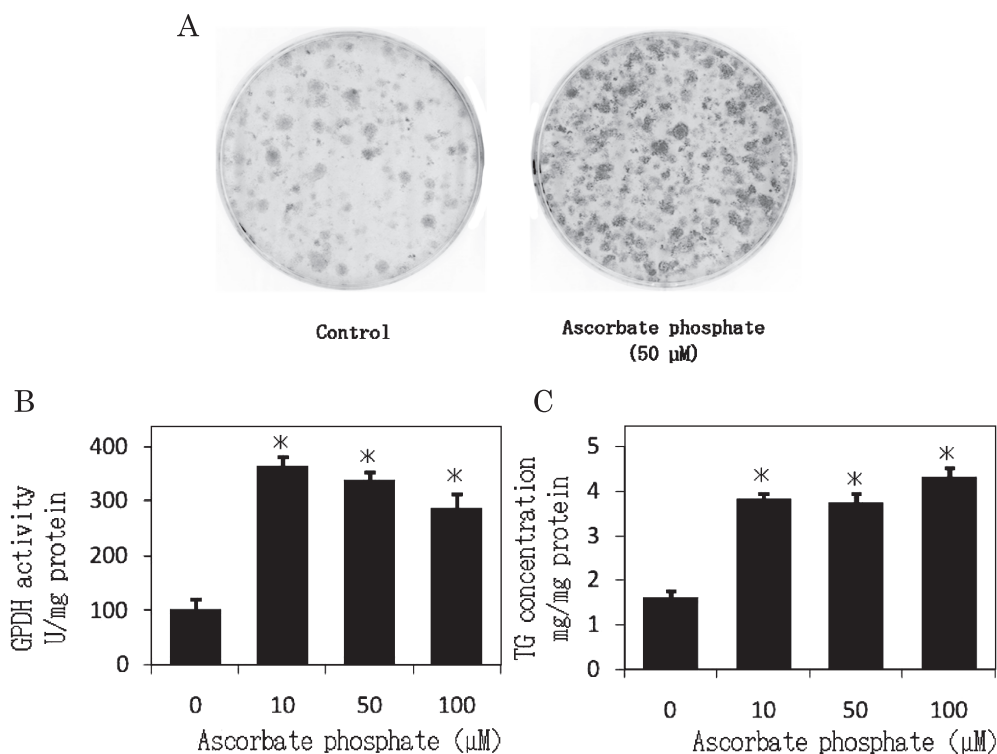


Fig. 1 Effect of ascorbate phosphate on differentiation of 3T3-L1 cells.

Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with or without ascorbate phosphate for 8 days. The assays were performed on differentiated adipocytes (day 8). (A) Intracellular lipid was stained with Oil Red O. (B) GPDH activity (C) Intracellular triglyceride concentration. The bars represent mean values \pm SD for 4 wells. * $P < 0.05$ vs. cultures treated without ascorbate phosphate.

である。本試験ではGPDH比活性、TG濃度ともにアスコルビン酸リン酸に対する用量反応は認められず、最少量（10 μM ）の添加で、GPDH比活性、TG濃度はほぼ最大になった。ヒトの正常な血漿中ビタミンC濃度は28~40 μM であり、潜在的なビタミンC欠乏時には11~28 μM 、欠乏時には11 μM を下回る⁷⁾。したがって、明らかなビタミンC欠乏時には生体内での脂肪細胞分化が十分に誘導されない可能性が考えられるが、潜在的な欠乏では脂肪細胞分化は変化しない可能性が示唆された。

2. アスコルビン酸リン酸添加がC/EBP β , PPAR γ , C/EBP α の発現に及ぼす影響

3T3-L1脂肪前駆細胞分化にはPPAR γ やC/EBPsなどの転写因子が深く関わっている²⁾。分化誘導に用いられるMIXを培地に添加すると約4時間後にC/EBP β 発現が誘導される。さらに24から48時間後にC/EBP β はPPAR γ とC/EBP α 発現を誘導し、互いに発現を促進し合いながら、これら転写因子が直接・間接的にGPDHやadipocyte fatty acid binding protein 2といった脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘導する⁸⁾。そのためPPAR γ , C/EBP α は脂肪細胞分化におけるマスターレギュレーターとされている³⁾。分化誘導時からアスコルビン酸リン酸を50 μM で添加処理し、経時的に脂肪細胞分化に関連する転写因子のmRNA発現量を測定した。C/EBP β のmRNA発現量は対照区と比べアスコルビン酸リン酸処理区の0.5日目に有意

に増加した (Fig. 2A)。次にC/EBP β の下流に位置するPPAR γ のmRNA発現量の変化を調べたところ、アスコルビン酸リン酸処理区で対照区と比べ6日目のみ有意な発現量増加が見られた (Fig. 2B)。そこでPPAR γ と相互に発現が活性化されるC/EBP α のmRNA発現量を調べたところ、アスコルビン酸リン酸処理区の8日目において対照区と比べ有意に発現量が増加した (Fig. 2C)。これらの結果はアスコルビン酸がC/EBP β 発現を増強することによって分化が促進されることを示唆している。

アスコルビン酸はコラーゲン合成を促進するとの報告がある^{9,10)}。3T3-L1脂肪前駆細胞と同じ中胚葉由来細胞であるMC3T3-E1骨芽細胞において、アスコルビン酸によるI型コラーゲンの合成促進が、骨芽細胞特異的転写因子を活性化することで骨芽細胞分化を誘導することが報告されている¹¹⁾。TangとLane⁸⁾によると、脂肪前駆細胞では分化誘導により生じるclonal expansionの開始時にC/EBP β が動原体のサテライトDNAにあるC/EBP結合配列に結合する。また、C/EBP β がリン酸化されることがC/EBP β のDNA結合能ならびに分化促進能獲得に不可欠であることが報告されている¹²⁾。脂肪前駆細胞においても、アスコルビン酸によるコラーゲン合成促進が分化促進に関与していることが示唆されている¹³⁾。したがって、アスコルビン酸によるコラーゲン合成促進がC/EBP β の発現増強を介して脂肪細胞分化を促進する可能性がある。本試験において、対照区の各転写因子の経時的発現量の推移は過去の報

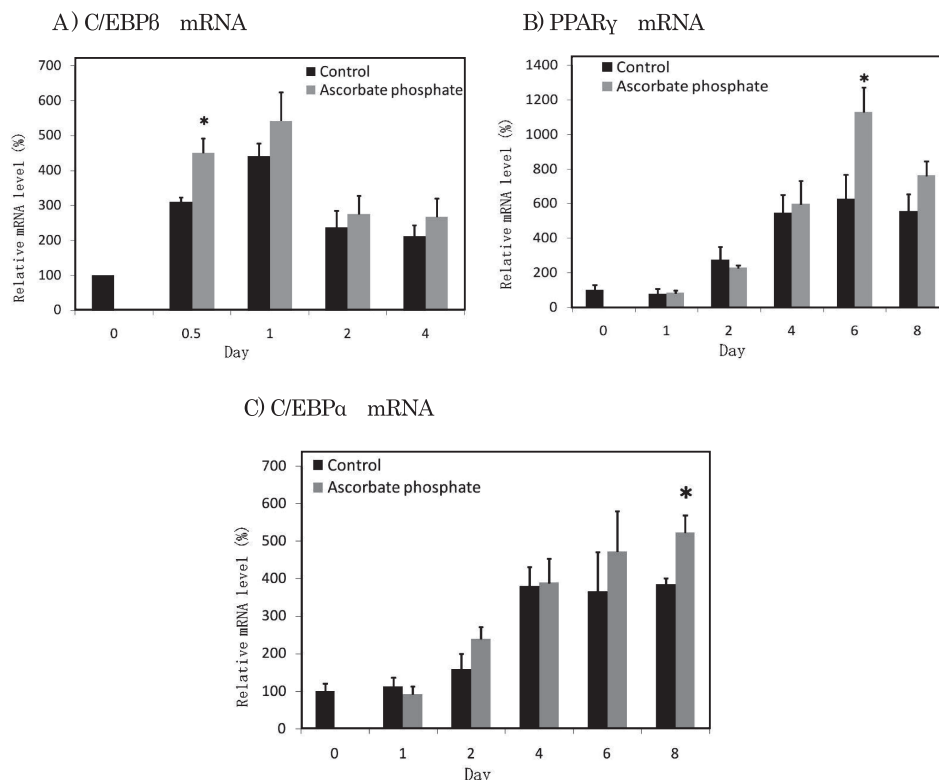


Fig. 2 Effect of ascorbate phosphate on gene expression patterns of adipogenic transcription factors during adipogenesis. Two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with or without 50 μM ascorbate phosphate for 8 days. The expression levels of (A) C/EBP β (B) PPAR γ (C) C/EBP α were estimated by semi-quantitative RT-PCR and normalized with respect to the 18S rRNA expression level. The relative gene expression is presented as the ratio of expression level on day 0. The bars represent mean values \pm SD for 4 or 3 wells. * P < 0.05 vs. cultures treated without ascorbate phosphate.

告と一致している⁴⁾。しかし、アスコルビン酸リン酸処理による効果は各転写因子の発現ピーク時付近でしかみられていないのでその影響は必ずしも強いとは言えない。また、C/EBP β の発現増加が直接PPAR γ やC/EBP α の発現増加につながるとは限らない。分化誘導から2日目までを前期、分化誘導2日目から8日目を後期とし、期間を前後に分けてアスコルビン酸リン酸を添加したところ、どちらの期間もGPDH比活性、TG濃度が有意に上昇した(未発表)。したがってアスコルビン酸リン酸の作用点は他にも複数あると考えられることから、C/EBP β のリン酸化など別経路やC/EBP β を介さない経路に対するアスコルビン酸リン酸処理効果の検討が必要だと考えられる。

結論として、本試験ではアスコルビン酸リン酸はC/EBP β の発現量増加を介して脂肪前駆細胞分化の促進したことが示された。しかしながらそのメカニズムは完全には解明されておらず、さらなる分子生物学レベルでの検討が必要である。

参考文献

- 1) Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E (1990) Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology* 96: 323–326.
- 2) Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews* 78: 783–809.
- 3) Tang QQ, Jiang MS, Lane MD (1999) Repressive effect of Sp1 on the C/EBP α gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 19: 4855–4865.
- 4) Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes and Development* 5: 1538–1552.
- 5) Green H, Wise LS (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 254: 273–275.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- 7) 最新栄養学第9版－専門領域の最新情報－(2007) 建帛社、東京：pp. 235–244.
- 8) Tang QQ, Lane MD (1999) Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocytes differentiation. *Genes and Development* 13: 2231–2241.
- 9) 日本ビタミン学会(1994) ビタミンの辞典、朝倉書店、東京：pp. 354–388.
- 10) Tajima R, Kawaguchi N, Horino Y, Takahashi Y, Toriyama K, Inou K, Torii S, Kitagawa Y (2001) Hypoxic enhancement of type IV collagen secretion accelerates adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1540: 179–187.
- 11) Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT (1998) Role of the α 2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 273: 32988–32994.
- 12) Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, Lane MD (2005) Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3 β is required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9766–9771.
- 13) Ono M, Aratani Y, Kitagawa I, Kitagawa Y (1990) Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Experimental Cell Research* 187: 309–314.