

GABA による摂食行動調節機構

ヒノイ

檜井 栄一

金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授

緒 言

現代の先進社会においては、エネルギーの過剰摂取と運動不足が常態化しており、肥満やメタボリックシンドローム患者およびその予備軍は、近年世界的に急増している。これに深く関与しているのが脂肪細胞である。脂肪細胞は脂肪組織に主に存在し、摂取したエネルギーを中性脂肪として細胞内に蓄積して必要に応じて全身に再供給するエネルギー代謝のための器官であるが、近年、この脂肪細胞が生理状況に応じて様々な内分泌因子(アディポサイトカイン)を産生、分泌し、糖・脂質代謝、動脈壁の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。肥満、脂肪蓄積によるアディポサイトカインの産生異常が、糖尿病、脂質異常症、高血圧症、動脈硬化症を引き起こすことも報告されている¹⁾。

一方、 γ -アミノ酪酸(GABA)は、哺乳動物の中樞神経に高濃度存在する抑制性神経伝達物質として知られ、中樞のGABA シナプスでは抑制性情報伝達を担う。すなわち、中樞のGABAは主にGlutamateからGlutamic acid decarboxylase(GAD)により合成され、神経終末のシナプス小胞に蓄えられる。小胞に蓄えられたGABAは、刺激に応じて前シナプスからシナプス間隙に放出された後、後シナプス膜状に存在するGABA受容体を介して抑制性シナプス後電位を発生する。シナプス間隙に放出されたGABAは、やがて神経細胞やグリア細胞に存在するGABAトランスポーターにより細胞内に取り込まれ、その作用を終える。中樞神経において、GABAの抑制作用が毒物や薬物により傷害されると、神経の異常興奮や痙攣症状を引き起こされる。さらに、GAD活性阻害などにより中樞でGABA濃度が低下する状況下では、興奮性の上昇と痙攣症状が誘発される²⁾。近年我々は末梢組織である骨組織(骨芽細胞)や軟骨組織(軟骨細胞)において、GABAによるシグナル伝達機構の存在を見出し、これら細胞の分化および成熟を調節する可能性について報告してきた^{3),4)}。しかしながら、起源を同じくする脂肪細胞

におけるGABAシグナリング分子発現の可能性については、ほとんど解析されていないのが現状である。そこで本研究では、この脂肪細胞に注目し、GABAシグナリング機構の存在と、脂肪細胞におけるその機能についての検討を行った。

実験方法

異なる期間培養したマウス由来前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞およびマウス内臓脂肪組織からtotal RNAを回収し、GABAシグナル関連分子の発現についてRT-PCR法を用いて解析した。また、GABA_B受容体アゴニストおよびアンタゴニストを3T3-L1細胞に持続的に曝露し、細胞成熟への影響を細胞内に蓄積した中性脂肪を染色するOil red O染色を用いて評価した。さらに、GABA_BR1サブユニット欠損マウスを用いて、野生型および欠損マウス由来の初代培養脂肪細胞を培養し、RT-PCR法により脂肪細胞特異的遺伝子の発現について検討を行った。また、野生型および欠損マウスから抽出した内臓脂肪組織について、体重当たりの組織重量の比較、RT-PCR法による脂肪細胞特異的遺伝子の発現の検討を行った。GABA_BR1サブユニット欠損マウスを用いてELISA法による血中leptin濃度の測定、食糧摂取量の比較も行った。

結 果

1. GABAシグナル分子の発現解析

脂肪細胞における各種GABAシグナル関連分子の発現を解析するために、各日数培養した3T3-L1細胞および雄性マウス精巣周囲の内臓脂肪組織について、GABA_A、GABA_B、GABA_C受容体の各サブユニット、GABA合成酵素であるGADおよびGABAトランスポーター(GAT)を特異的に認識するプライマーを用いてRT-PCRを行った。3T3-L1細胞に関してはいずれの培養日数においてもGABA_A受容体のサブユニットのmRNA発現は認めら

れなかった。脂肪組織に関しても同様の結果を得た。同じくイオノトロピック型である GABA_C 受容体について同様の解析を行ったところ、培養 8 日目の 3T3-L1 細胞において $\rho 1$ 、 $\rho 2$ サブユニットの mRNA 発現は確認されたが、 $\rho 3$ サブユニットに関してはいずれの培養日数においてもその発現は確認されなかった。脂肪組織においては、 $\rho 1$ 、 $\rho 2$ 、 $\rho 3$ の発現が確認された。メタボトロピック型 GABA_B 受容体についても RT-PCR を行った結果、GABA_BR1 サブユニットの mRNA 発現はいずれの培養日数の 3T3-L1 細胞においても観察されたのに対し、GABA_B R2 サブユニットの mRNA 発現は観察されな

かった (図 1)。脂肪組織においても同様の結果を得た。GAD および GAT についても同様の検討を行ったところ、それらの mRNA 発現は 3T3-L1 細胞および脂肪組織の両方で確認されなかった。

2. GABA_B 受容体機能解析

3T3-L1 細胞および脂肪組織において発現の確認された GABA_BR1 サブユニットが形成する GABA_B 受容体への刺激が、脂肪細胞の分化に与える影響を検討した。3T3-L1 細胞を 8 日間および 16 日間持続的に、GABA_B 受容体アゴニストである Baclofen およびアンタゴニス

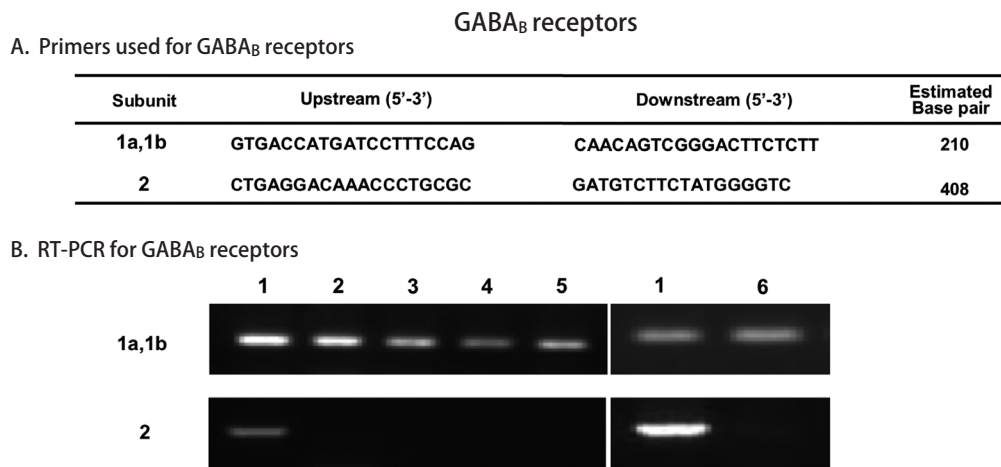


図 1 Expression of metabotropic GABA_B receptor subunits in 3T3-L1 and fat tissue
(A) Primers used for GABA_B receptor subunits. (B) RT-PCR for GABA_B receptor subunits.

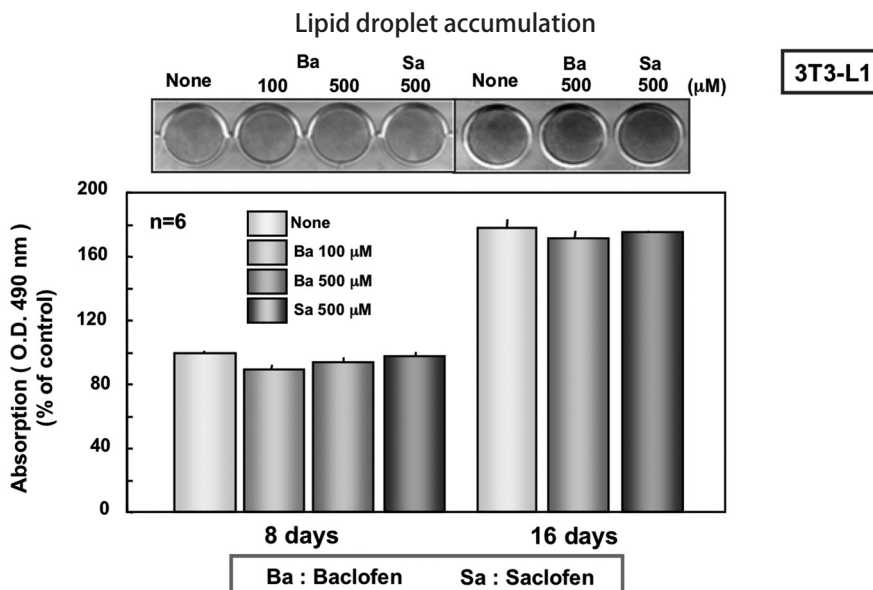


図 2 Lipid droplet accumulation
3T3-L1 cells were cultured for 8 to 16 days, in either the presence or absence of the GABA_B R agonist baclofen and the antagonist saclofen, followed by Oil red O staining.

トの Saclofen に曝露し、細胞内中性脂肪蓄積量を Oil red O 染色を用いてその染色性を評価した。その結果、Baclofen および Saclofen による Oil red O 染色性に著大な変化は認められなかった (図 2)。続いて、GABA_B R2 サブユニットが存在せず GABA_B R1 サブユニットが単独で発現している脂肪細胞において、GABA_B 受容体の機能的発現を確認するために、GABA_B 受容体の代表的な機能の一つである cAMP 応答性について検討した。3T3-L1 細胞を播種後 20-24 時間目に、レポーターとして転写制御因子 CREB の結合配列である CRE 配列をもつプラスミドを細胞に導入させてから、Baclofen およびアンタゴニストの CPG46381 を 24 時間曝露し、Forskolin により上昇させた CRE 転写活性の変動を Luciferase assay により測定した。その結果、Baclofen および CPG46381 はともに CRE の転写活性に有意な影響を与えなかった。

3. GABA_BR1 欠損マウスの表現系解析

野生型マウスと GABA_B R1 欠損マウスからそれぞれ mouse embryonic fibroblast (MEF) を調製し、白色脂肪細胞へと分化誘導を行った。そして、各培養日数において Oil Red O 染色を行ったが、両者の脂肪細胞分化程度には有意な変化は認められなかった。次に、各日数培

養した MEF 細胞から mRNA を抽出し、脂肪細胞特異的遺伝子の発現を解析した。その結果、脂肪細胞分化過程に重要な転写因子である PPAR γ と C/EBP α においては有意な変化は認められなかったが、アディポサイトカインのひとつである leptin が、野生型マウスに比べ GABA_B R1 欠損マウスで有意に低下していた。さらに生後 4 週目のマウス内臓脂肪組織においても、GABA_B R1 欠損マウスで leptin の mRNA 発現の有意な減少が確認され (図 3)、血中 leptin 濃度も GABA_B R1 欠損マウスに

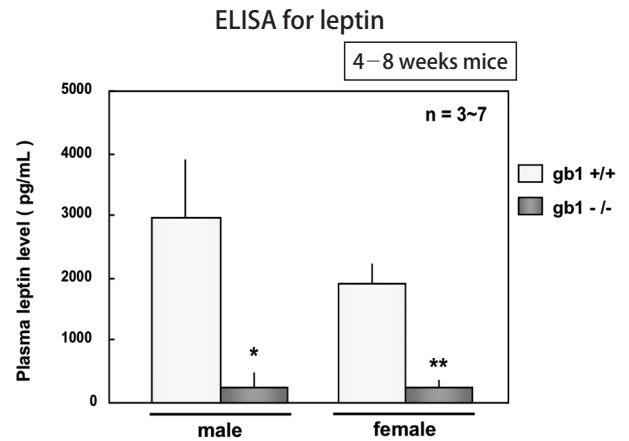


図 4 Plasma leptin level

Plasma was collected from blood of wild-type and GABA_B-null mice, followed by measurement of plasma leptin level using ELISA.

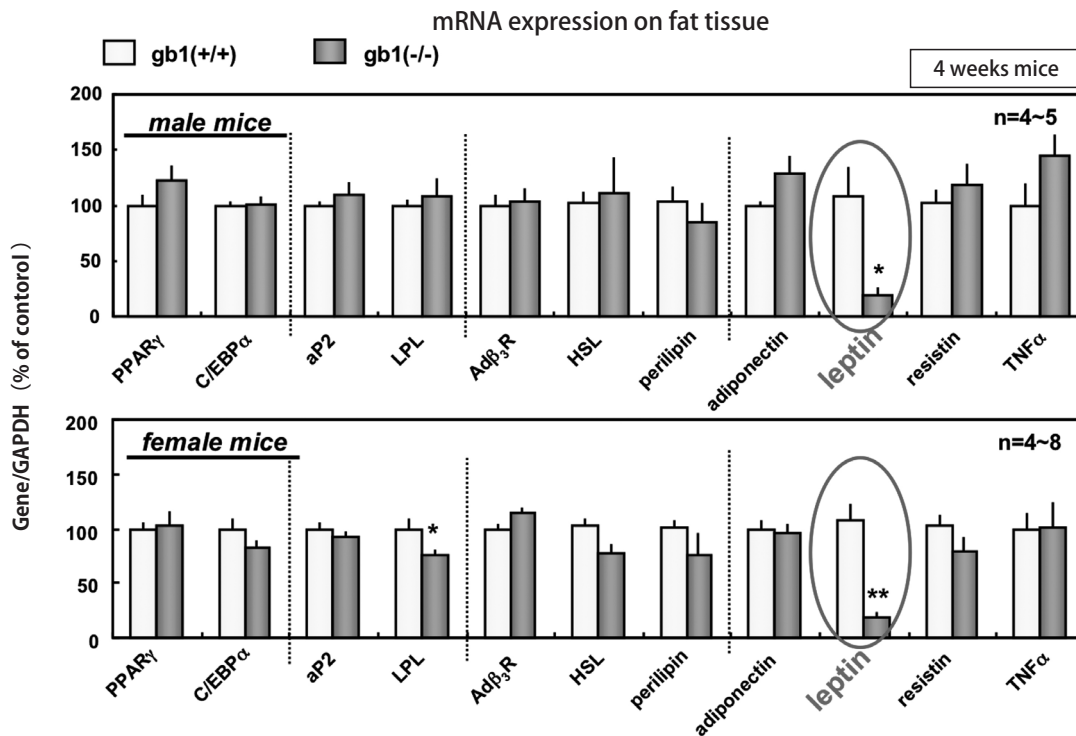


図 3 Expression of adipocyte specific genes in mouse visceral fat tissue

Total RNA was extracted from mouse visceral fat tissue, followed by RT-PCR or real-time PCR using specific primers.

において有意に低下していた(図4)。一方で、食糧摂取量は GABA_B R1 欠損マウスで増加していた。さらに体重および内臓脂肪重量は GABA_B R1 欠損マウスで減少していることが確認された。

考 察

本研究結果より、脂肪組織の中心的な存在である脂肪細胞に発現する GABA_B R1 サブユニットは、G タンパク質共役型受容体として機能するのではなく、摂食行動やエネルギー代謝に重要な leptin の発現調節に関与する重要な因子である可能性が示された。また、GABA_B R1 サブユニット欠損マウスでは内臓脂肪組織特異的な重量の減少が認められたが、leptin 低下との因果関係の有無およびそのメカニズムは今後明らかにしなければならない重要な課題であり、大変興味深いものでもある。

現代社会において、肥満患者の急激な増加は一つの社会的問題となっており、近い将来、自分自身にも襲い掛かりうる問題である。本研究は、肥満研究における新たな視点から展開されたものである。今後の展開によっては、脂肪組織だけでなく他の組織における GABA_B R1 サブユニットの重要な機能の解明に結びつく可能性も秘めている。今後のさらなる解析が、肥満やメタボリックシンドロームのような生活習慣病の予防や治療に新たな展望をもたらすことを期待したい。

要 約

1. 脂肪細胞には GABA_B 受容体を形成する 2 つのサブユニットのうち GABA_B R1 サブユニットのみが単独で発現しているが、この GABA_B R1 サブユニットは G タンパク質共役型の受容体としての機能は有していない。
2. 脂肪細胞に発現する GABA_B R1 サブユニットは、leptin の発現制御に関与している。
3. GABA_B R1 サブユニット欠損マウスでは、血中 leptin 濃度が低下し、それにとまって食糧摂取量が増加する。
4. GABA_B R1 サブユニット欠損マウスにおいて、内臓脂肪組織は減少している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

また、研究遂行に多大なるご支援やご助言を頂きました金沢大学医薬保健研究域薬学系・薬物学研究室の米田幸雄博士に深く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) E.D. Rosen and B.M. Spiegelman: *Nature*, **444**, 847-853, 2006.
- 2) I. Mody, et al.: *Trend Neurosci.* **17**, 517-525, 1994.
- 3) S. Fujimori, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1445-1452, 2002.
- 4) S. Fujimori, et al.: *Eur. J. Pharmacol.* **550**, 24-32, 2006.