

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14864

研究課題名(和文)糖負荷後のマウス肝臓の非定常代謝フラックス解析

研究課題名(英文)Metabolic flux analysis for the liver of mice administered with glucose

研究代表者

大野 聡 (Ohno, Satoshi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：60755734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非定常状態における臓器を対象とした代謝フラックス解析および代謝調節解析手法を新規に開発した。糖負荷後のマウスの肝臓について、非定常代謝フラックス解析および代謝調節解析を実施した結果、飢餓時の肝臓の糖新生フラックスは大きいものに対して、糖負荷後の肝臓の解糖フラックスは小さかった。さらに、野生型と肥満型マウスの代謝の違いは、多くの反応が酵素量に依存する一方で、グリコーゲン代謝の反応は基質・生成物代謝物量に依存していた。また、上記で開発した手法を脂肪培養細胞への適用し、インスリンにより脂肪細胞ではGlut4の細移行により解糖系が活性化する一方で、TCA回路は変化しないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、世界に先駆けて、生体内臓器の非定常フラックス推定手法の基盤技術を確立することにある。確立する技術を用いれば、他の組織・疾患モデルマウス・食餌の組成・薬剤に関する代謝応答をフラックスレベルで詳細に計測することが可能となるため、医学や生理学の分野全体に渡る代謝研究の加速が期待できる。また、生物工学においても、同一の培養槽で複数種の微生物が存在する共培養プロセスは、血液と複数の臓器が存在する系と同様なので、本研究と同じ手法が利用可能だと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed novel methods for organs to estimate metabolic fluxes in a non-steady-state condition and to analyze the regulation of the flux. We applied the developed methods to the liver of mice administered with glucose. We found that the gluconeogenesis flux in the livers during starvation was much larger than the glycolytic flux in the liver after glucose administration. Furthermore, the differences in metabolic flux between wild-type and obese mice were dependent on amounts of enzymes for most reactions, while a few reactions including glycogen metabolism showed flux differences between wild-type and obese mice dependent on amounts of substrate and product metabolites.

In addition, we also applied the method developed above to adipocyte cell lines and found that insulin activated the glycolytic flux in adipocytes by translocation of Glut4, while fluxes through TCA cycle remained almost constant.

研究分野：代謝工学・システム生物学

キーワード：代謝フラックス解析 メタボローム分析 プロテオーム分析

1. 研究開始当初の背景

代謝工学の技術発展が著しく、他分野への応用が加速している。元来は生物学への応用が目指され、微生物代謝の代謝フラックス(反応速度)の推定や、シミュレーションに基づく微生物育種が行われてきた(Becker et al., Metab. Eng., 2011)。近年では、生理学・医学への応用が進み、がん細胞特有の代謝などが解明されつつある(Vander Heiden et al., Nature Rev. Drug Discov., 2011)。代謝物の物質収支や酵素反応の速度論に基づく理論体系から、マウスやヒトの代謝に関する新たな知見や新規創薬戦略を獲得できることが期待されている。

代謝工学の基盤技術として、代謝フラックス解析がある。1990年代より発展した代謝フラックス解析は、炭素同位体 ^{13}C で標識した代謝物のメタローム分析と、代謝反応における炭素原子の移動を表現するシミュレーションから、各反応の代謝フラックスを推定する技術である。解糖とグリコーゲン合成のフラックス比やエネルギーの需要と供給のバランスなどが議論可能となるだけでなく、代謝物量や酵素量からは議論が難しい、代謝経路の律速や組織間相互作用の評価につながる知見が期待できる。

しかしながら、従来の代謝フラックス解析手法は適用できる系に限られていた。従来の適用対象は、代謝が定常状態にある微生物が中心であり、マウスの肝臓など生体内臓器や非定常状態の代謝は、その複雑さから適用が困難である。安定同位体を用いたトレーサー実験は古くから行われているが、フラックスに関しては定性的な議論にとどまっておき、代謝状態とその調節を定量的に理解するには不十分である。生理学・医学の分野では、薬剤や食餌の投与に伴う非定常な代謝の定量的な理解が望まれているため、従来の代謝フラックス解析法の拡張が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非定常状態にある生体内臓器の代謝フラックス推定法を新規に開発し、グルコース負荷後のマウス肝臓の代謝フラックスを推定することである(図1)。野生型および肥満モデルマウスに対して、 ^{13}C -グルコースを経口投与し、肝臓のメタローム分析および計算機上のシミュレーションを行うことで、以下の3点を達成することを目指した。

- (i) グルコース負荷に対する肝代謝の動的な応答をフラックスレベルで解明すること
- (ii) 野生型および肥満モデルマウスを比較し、肥満に伴う肝代謝異常をフラックスから解明すること
- (iii) 酵素量(プロテオーム)を同時に計測し、フラックスを統合した代謝調節解析を行うことで、各反応のフラックスの調節要因を定量的に評価すること

3. 研究の方法

(1) 野生型および肥満モデルマウスへのグルコース負荷実験

代謝フラックス解析では、 ^{13}C 炭素源由来の代謝物同位体をよく説明するフラックスを推定する。実験に関して、野生型および肥満モデルマウスに対して、 $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルコースを経口投与し、0-90分後の肝臓および血液を採取した。代謝酵素をメタノール等を用いて迅速に失活させた後に、キャピラリー電気泳動質量分析器(CE-MS)でメタローム分析を行った。これにより、中心炭素代謝の30種程度の代謝物について、濃度および同位体割合を獲得した。またプロテオーム分析として、酵素も高速液体クロマトグラム質量分析器(LC-MS)で定量した。実験は東京大学の黒田真也教授と協力して行った。

(2) 肝代謝の非定常フラックス解析

フラックスを入力とし、各細胞内代謝物の濃度および同位体割合を出力とする代謝モデルを構築した。反応に伴う炭素の移動を加味し、代謝物濃度および質量同位体割合の経時変化をシミュレート可能な常微分方程式モデルを構築した。生体内肝臓の状態を再現するため、血液と肝臓を統合した代謝ネットワークを対象とした。古くからフラックス解析が適用されてきた微生物や培養細胞と異なり、生体内の肝臓では、その外部環境(血液)も動的に変動する。そこで、血液の一部に肝臓および他臓器の区画を構成することで、生体内の代謝ネットワークを定義し、投与グルコースが血液を介して肝臓に流入する状況を再現した。

実験とシミュレーションの代謝物濃度および同位体割合の時系列データについて、残差二乗和を最小化し、代謝フラックスを推定する。代謝フラックスは区分線形関数として近似的に表現

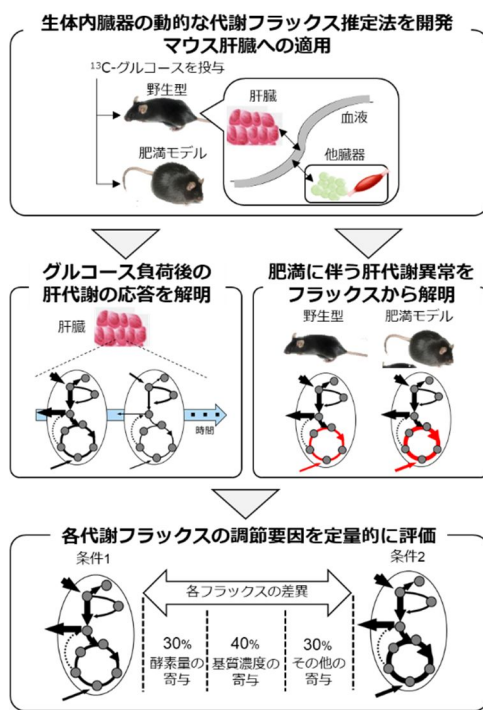


図1. 研究概要

した。フラックスや時間区間を分割する時間および時間区間数等をパラメータとして、上記した残差二乗和を最小化することで推定した。

(3) 代謝調節解析

メタボローム・プロテオームデータと推定したフラックスを統合し、代謝調節解析を行った。各フラックスを反応速度論に基づき記述し、フラックスの時間変化または野生型と肥満モデルマウスとの差異を、酵素量・基質代謝物量・その他の寄与で記述した。

4. 研究成果

¹³C-グルコース投与後のマウスにおける肝臓・血漿について、質量分析器によるメタボローム計測を行った。野生型マウスと比較して肥満モデルマウスでは、解糖系代謝物はその濃度が高く¹³C 標識されるのが遅い傾向がみられ、野生型と肥満モデルマウスの代謝の違いが示唆された。

メタボロームデータを用いて、代謝フラックス解析を実施した。その結果、飢餓時における肝臓の糖新生のフラックスは比較的大きいのに対して、糖負荷後の肝臓の解糖のフラックスは小さかった。従来、肝臓は血中糖濃度に応じて糖新生と解糖を切り替えていると考えられていたが、実際には解糖はほとんど行われておらず、糖新生フラックスが変化しているだけであることが本研究で明らかになった。一方で、TCA 回路のフラックスに関しては、糖負荷の前後では大きな変化はなく、TCA 回路および電子伝達系におけるエネルギー生産は血糖値に依存しないことが示唆された。また、野生型マウスと肥満モデルマウスを比較すると、飢餓時の糖新生のフラックスは肥満モデルマウスの方が大きいのに対して、糖負荷後の解糖のフラックスは野生型マウスと肥満モデルマウスで大きな違いがなく、肥満に伴う代謝異常は解糖能の低下よりもむしろ糖新生能の亢進であることが示唆された。

マウス肝臓のプロテオーム分析結果では、糖新生に関わる酵素の量は野生型マウスより肥満モデルマウスの方が高かった。上記したメタボローム・フラックスデータとプロテオームデータを統合すると、肥満モデルマウスでは糖新生に関わる代謝物濃度・フラックス・酵素量がいずれも野生型よりも大きく、これだけでは肥満モデルマウスにおける糖新生フラックスの亢進の原因が議論できない。そこで、メタボローム・フラックス・プロテオームデータを統合した代謝調節解析を実施した。その結果、飢餓時における野生型と肥満型マウスの糖新生フラックスの違いは、多くの反応が酵素量に依存する一方で、グリコーゲン代謝に含まれる phosphoglucomutase 1 (Pgm1) が触媒する反応は基質・生成物代謝物量に依存することが明らかになった。

また、上記で開発した代謝フラックス解析手法と代謝調節解析手法を脂肪培養細胞への適用し、インスリン刺激により脂肪細胞では glucose transporter type 4 (Glut4) の細胞膜への局在化により解糖系が活性化する一方で、TCA 回路のフラックスはほとんど変化しないことを明らかにした。また、インスリン刺激により脂肪酸合成が活性化され、それは glucose 6-phosphate または fructose 6-phosphate による ATP citrate lyase (Acly) 反応の活性化によってアロステリックに調節されることが示された。しかしながら、Glut4, Acly を除く糖代謝反応のほとんどは、基質・生成物量によって調節されていた。したがって、インスリン刺激下の脂肪細胞の糖代謝経路は、Glut4 や Acly のような少数のカギとなる酵素のみを酵素リン酸化またはアロステリックで調節することだけで、糖代謝全体を調節していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 James R. Krycer, Satoshi Ohnoら全21名	4. 巻 21
2. 論文標題 Dynamic Metabolomics Reveals that Insulin Primes the Adipocyte for Glucose Metabolism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3536 ~ 3547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yugi Katsuyuki, Ohno Satoshi, Krycer James R., James David E., Kuroda Shinya	4. 巻 15
2. 論文標題 Rate-oriented trans-omics: integration of multiple omic data on the basis of reaction kinetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Systems Biology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coisb.2019.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Quek Lake-Ee, Krycer James R., Ohno Satoshi, Yugi Katsuyuki, Fazakerley Daniel J., Scalzo Richard, Elkington Sarah D., Dai Ziwei, Hirayama Akiyoshi, Ikeda Satsuki, Shoji Futaba, Suzuki Kumi, Locasale Jason W., Soga Tomoyoshi, James David E., Kuroda Shinya	4. 巻 23
2. 論文標題 Dynamic 13C Flux Analysis Captures the Reorganization of Adipocyte Glucose Metabolism in Response to Insulin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100855 ~ 100855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Satoshi Ohno, Lake-Ee Quek, James R. Krycer, Katsuyuki Yugi, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, David E. James, Shinya Kuroda
2. 発表標題 13C-based dynamic metabolic flux analysis in insulin-stimulated adipocyte cell lines and systematic evaluation of regulation on the metabolism
3. 学会等名 Metabolic Engineering 12 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 聡
2. 発表標題 インスリン刺激下の脂肪細胞の代謝フラックスおよびその調節の数理解析
3. 学会等名 第4回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野 聡
2. 発表標題 代謝システムの理解と応用に向けた数理解析
3. 学会等名 日本生物工学会【研究部会】バイオインフォマティクス相談部会 第一回勉強会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Ohno, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, David E. James, Shinya Kuroda
2. 発表標題 Regulation of metabolic fluxes in adipocytes with insulin
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Ohno, Lake-Ee Quek, James R. Krycer, Katsuyuki Yugi, Akiyoshi Hirayama, Tomoyoshi Soga, David E. James, Shinya Kuroda
2. 発表標題 Metabolic flux changes over time and the regulatory mechanisms in insulin-stimulated adipocytes
3. 学会等名 20th International Conference On Systems Biology (ICSB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----