

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19765

研究課題名（和文）リン酸化TRAP法を用いた視床下部によるビタミンB群の新規恒常性制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of vitamin B1 sensing mechanism in the hypothalamus

研究代表者

中島 健一郎（Nakajima, Ken-ichiro）

生理学研究所・生体機能調節研究領域・准教授

研究者番号：70554492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：様々な食品成分の中でも微量必須栄養素であるビタミンは、脳内にその感知メカニズムがあるのか、また、恒常性を保つ仕組みがあるのかは不明である。そこで、本研究では摂食中枢として知られる視床下部およびその周辺においてエネルギー産生において重要な役割を担うビタミンB1の受容に関わる神経細胞を特定するため研究を実施した。その結果、ビタミンB1欠乏およびそこから回復に連動して、食欲不振や食欲回復が起こり、脳内の摂食調節メカニズムとビタミンB1レベルの間に何らかの関連があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内に糖・脂肪酸・アミノ酸を感知する仕組みがあるのに対し、ビタミンB群・Cなどの水溶性ビタミンを感知する仕組みがあるのか、またあるとすれば、どのような仕組みなのかは、あまり調べられてこなかった。これは、これら成分の生体機能性が100年以上にもわたる疫学・栄養学研究から明らかにされてきたこととは非常に対照的である。ビタミンB1の様々な健康作用がすでに知られていることを考えると、本研究のように脳内のビタミン受容機構の存在を調べることで、その実際の作用機序を解明できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Among various food factors, it has been unclear whether the brain sense vitamins to maintain their homeostasis. To investigate a role of the central nervous system in modulating vitamin levels, we looked for key neurons sensing vitamin B1 that play a key role in energy metabolism. We found that the activity in some parts of feeding-related brain area correlate with vitamin B1 levels.

研究分野：神経科学

キーワード：brain vitamin B1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳の基底に存在する視床下部は脳全体から見ると非常に小さい部位であるが、摂食や全身のエネルギー代謝調節の中心的な役割を担う。また、視床下部は摂取した食品成分の情報を大きく以下の3つの経路を介して受け取ると考えられる。

- (1) 末梢臓器と中枢を結ぶ自律神経性の伝達
- (2) 肝臓・膵臓・腸・筋肉などの代謝臓器より分泌されるホルモンによる伝達
- (3) 腸管から吸収された食品因子およびその代謝産物そのものの直接の作用

食物は炭水化物・脂肪・タンパク質などの3大栄養素に加えてミネラルやビタミンなど微量必須栄養素からなる。これまでの多くの研究により3大栄養素を構成する糖・脂肪酸・アミノ酸については以下2つのことがわかっている。

- (1) 一部の視床下部神経の活動を活性化または抑制すること
- (2) 脳および様々な末梢臓器により、これら成分の体内濃度を維持する仕組み(生体恒常性の維持)があること

微量必須栄養素については、例えば、脂溶性ビタミンであるAやEは肝臓に貯蔵され、生体恒常性が維持されると考えられている。その一方、体外に排出されやすいBやCなど水溶性ビタミンについては、これらをそもそも感知するのか、また感知するとすれば、どのような仕組みによるのかは、よくわかっていない状況であった。

また、ビタミンの生体機能性は100年以上にもわたる疫学・栄養学研究から明らかにされてきたが、その感知メカニズムや体内恒常性制御機構についての研究は限定的であった。

## 2. 研究の目的

鈴木梅太郎博士が抗脚気成分としてビタミンB1を米ぬかから発見したこと、そして、後世これがチアミンニリン酸としてピルビン酸の分解に関与することが解明されたことを契機に、ビタミンB1をはじめとしたビタミンB群の健康への影響の大きさは広く理解されている。

そこで、筆者はビタミンB群の成分のうち代表的なビタミンB1について以下の2つの性質に注目した。

- (1) 腸管に存在するトランスポーターにより吸収された後、体内の様々な細胞においてTCAサイクルを構成する複数の酵素の補酵素として機能(図1)、糖代謝やエネルギー産生に置いて重要な役割を果たすこと
- (2) 運動中の筋肉や脳などエネルギーを大量に消費する臓器で盛んに消費されること

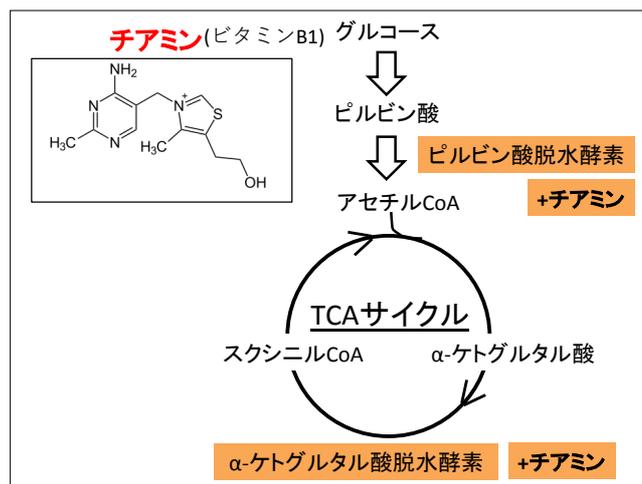


図1 糖代謝におけるビタミンB1の重要性

筆者は、これらの性質に加え、中枢神経系は基本的にグルコースを唯一の栄養源とすることをふまえ、エネルギー恒常性の制御中枢である視床下部がビタミンB群の恒常性維持にも関わるという仮説をたてた。

本研究では、この仮説を検証するため、ビタミンB1欠乏マウスモデルおよびこのマウスにビタミンB1を再投与した条件において、リン酸化TRAP法(活性化した神経細胞内ではリボソームのS6サブユニットがリン酸化されることから、活性化した神経細胞内のリボソームとそれに結合しているmRNAを抗リン酸化S6抗体により免疫沈降により精製し、RNA-seq解析により遺伝子

プロフィールを調べる手法)を用いることで視床下部およびその周辺部位においてビタミン B1 の欠乏・感知に関与する神経の探索を目指した。

脳による微量必須栄養成分の感知およびそれに伴う全身の代謝制御メカニズムは健康に大きな影響を与えるため、水溶性ビタミンの生体恒常性の制御システムという新しい観点から、健康科学分野への貢献を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗体染色

リン酸化 TRAP 法を実施するための最適条件を検討するため、これまでに著者らが検証したことのある味覚刺激に伴う神経活動の変化を抗体染色により評価した(Fu et al., Nat Commun. 2019)。300 mM ショ糖溶液(甘味)または 10 mM デナトニウム溶液(苦味)を C57BL/6J 雄マウスに摂取させ、90 分経過後に還流固定を実施した。脳サンプルから薄切片を作製し、浮遊法により、神経活動マーカー分子としてよく用いられる c-fos 抗体と、リン酸化 S6 リボソームタンパク質に対する抗体を用いた蛍光 2 重免疫染色を実施した。

#### (2) ビタミン B1 欠乏マウスの摂食アッセイ

ビタミン B1 のみを取り除いた固形餌を個飼いにした C57BL/6J 雄マウスに摂取させた。体重および餌の摂取量と体重を 10-14 日間にわたり継続的に測定した。その後、還流固定を実施した後に脳切片を作製し、抗体染色を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) c-fos 抗体およびリン酸化 S6 抗体による 2 重免疫染色

味溶液を摂取させたマウスにおいて脳切片を評価したところ、甘味刺激・苦味刺激のいずれの場合にも視床下部において c-fos の発現は見られるもののリン酸化リボソームの発現は多くは観察されなかった(図 2 左に甘味刺激時の視床下部の例を示す・ほとんどが緑の c-fos の陽性細胞のみ)。

対照的に、扁桃体中心核の神経細胞においては基本的に同じ細胞が c-fos(緑)およびリン酸化リボソーム(赤)を発現していることが明らかになった(図 2 右)。このため、リン酸化 TRAP 法ではなく、c-fos のプロモーター活性を用いて活動中の神経細胞を調べることのできる Fos-2a-iCreER ノックインマウス(Allen et al, Science, 2017)を用いた実験を現在検討中である。

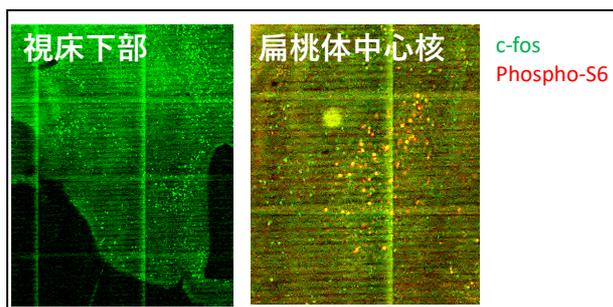


図2 甘味刺激による神経応答マーカーの発現

#### (2) ビタミン B1 欠乏マウスの摂食アッセイ

ビタミン B1 欠乏餌を与えたマウスでは餌を与え始めて 10 日前後から徐々に 1 日あたりの摂食量が低下し、最終的には図 3 に示すように 1 日当たりの摂食量が約 1/3 となった。また、それに伴い体重の低下も観察された(図 3)。一方、この状態のマウスにビタミン B1 を摂取させたところ、速やかに食欲が回復し、餌を摂取するようになった。現在、ビタミン B1 欠乏マウスと B1 を再投与したマウスの脳切片を作製するとともに視床下部およびその周囲における c-fos の発現を評価中である。

味覚刺激実験において、視床下部では c-fos の発現は見られるものの、S6 サブユニットのリン酸化があまり観察されなかったのに対し、扁桃体中心核では両者がよく重なることは、部位によって神経の性質や発現分子の種類の違いによる可能性が考えられる。

今後、c-fos 発現神経を遺伝学的に可視化・操作可能な Fos-2a-iCreER ノックインマウスを使用し、ビタミン B1 の欠乏や摂取に関わる神経の同定を目指したい。

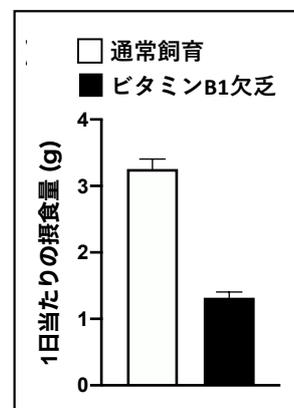


図3 ビタミンB1欠乏に伴う摂食量の低下

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 中島 健一郎	4. 巻 56
2. 論文標題 「摂食行動を制御する脳内神経システム」脳研究による食品機能性の理解	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 255-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.56.255">https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.56.255</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fu O, Iwai Y, Kondoh K, Misaka T, Minokoshi Y, Nakajima K	4. 巻 27
2. 論文標題 SatB2-Expressing Neurons in the Parabrachial Nucleus Encode Sweet Taste	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1650-1656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.04.040	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 -

1. 著者名 Fu O, Iwai Y, Narukawa M, Ishikawa WA, Ishii KK, Murata K, Yoshimura Y, Touhara K, Misaka T, Minokoshi Y, Nakajima K	4. 巻 8
2. 論文標題 Hypothalamic neuronal circuits regulating hunger-induced taste modification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12478-x	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中島 健一郎、傅 欧、岩井 優、近藤 邦生、箕越 靖彦、三坂 巧
2. 発表標題 脳幹で甘味を伝達する神経の特定
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichiro Nakajima, Ou Fu, Yuu Iwai, Kunio Kondoh, Takumi Misaka, Yasuhiko Minokoshi
2. 発表標題 SatB2-Expressing neurons in the parabrachial nucleus encodes sweet taste
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 健一朗、傅 欧、成川 真隆、三坂 巧、箕越 靖彦
2. 発表標題 視床下部摂食促進神経を起点とした生理状態依存的な味覚調節機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima K, Fu O, Iwai, Y, Kondoh K, Misaka T, Minokoshi Y
2. 発表標題 Genetic identification of sweet taste neurons in the mouse brainstem
3. 学会等名 The 48th NAITO Conference on Integrated Sensory Sciences: Pain, Itch, Smell, and Taste (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
---------------------------	-----------------------	----