

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 2 月 20 日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20248014
 研究課題名（和文）次世代型生体調節因子としてのアミノ酸の新規機能性の探索と有効性の検証
 研究課題名（英文）Search for Novel Functionalities of Amino Acids as Bio-regulatory Factors and Verification of Their Usefulness
 研究代表者
 門脇 基二（カドワキ モトニ）
 新潟大学・自然科学系・教授
 研究者番号：90126029

研究成果の概要（和文）：

アミノ酸のシグナル伝達と細胞応答に関する共同研究が、主にトランスクリプトミクスによる網羅的解析を用いて実施された。その結果、栄養素としてではない、情報分子としてのアミノ酸の機能性が、タンパク質合成と分解に関する遺伝子発現とオートファジーの制御、糖代謝と脂質代謝の制御、神経組織におけるセリン有効性の情報伝達に関連して解析され、多様なアミノ酸の複雑な情報ネットワーク構造の一端が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Collaborative works on the signal transduction and cell response to amino acids were undertaken mainly by using DNA microarray analysis. Thus, functionalities of amino acids, not as nutrients, but as signaling molecules, were analyzed regarding the regulation of protein synthesis and degradation, *i.e.*, gene expression and autophagy, the regulations of carbohydrate metabolism and lipid metabolism, and a signaling mechanism of serine availability in the neuronal tissues. Complex information network structures of a variety of amino acids were partially clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2009年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

研究分野： 栄養生化学

科研費の分科・細目： 分科：農芸化学、細目：食品科学

キーワード：アミノ酸、マイクロアレイ、発現制御、栄養学、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

本課題は、異なる実験系を持つ研究者が共同で、アミノ酸の生体内での細胞応答と情報伝達ネットワーク構造をオミックス技術で網羅的に解析することにより、安全な次世代型生体調節因子としてのアミノ酸の新規機能性とその有効性を検証するための基礎的データベースの構築

を目指すものである。

2. 研究の目的

(1) オートファジーを調節するアミノ酸のシグナル経路の解析（門脇 基二、藤村 忍）
 タンパク質ターンオーバーを支配するタンパク質分解の最大の機構はオートファジーである

が、その主要な生理的調節機構はアミノ酸によるものである。従って、アミノ酸による調節機構の解明が待たれる所であるが、その詳細はまだ不明である。そこで、今回、アミノ酸の種類による情報伝達系の違いを健闘するとともに遺伝子発現レベルと細胞質タンパク質活性化レベルでの二重の調節系の存在も明らかになってきたことから、トランスクリプトミクス解析とタンパク質活性化との比較解析を実施する。

(2) アミノ酸による遺伝子転写制御の情報経路の解析(加藤久典) 信号因子としてのアミノ酸の機能を詳細に明らかにし、さらにその情報伝達経路を明確にすることを目的として、主に培養細胞を用い、アミノ酸欠乏が遺伝子発現やタンパク質量に及ぼす影響を網羅的に解析することを試みた。まず、動物でのリジン(Lys)・スレオニン(Thr)欠乏の影響を以前より明確に解析するため、DNA マイクロアレイ解析を行った。この際、アミノ酸の欠乏を最も鋭敏に反映する正規化手法の選択も行えたと考えた。

次に、肝ガン系の培養細胞である HepG2 を用い、Lys、Thr、メチオニン(Met)のそれぞれの欠乏処理を行った後に、DNA マイクロアレイ解析およびプロテオーム解析を行い、これらのアミノ酸の欠乏に共通な機構や特異的な機構について幅広く明らかにすることを試みた。

(3) イソロイシンの糖代謝調節機能(吉澤史昭)

アミノ酸のなかでも分岐鎖アミノ酸、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)は、生体の代謝を調節する栄養シグナル分子として機能することが知られている。これまでの研究で、Ile は肝臓での糖新生抑制と骨格筋への糖取り込み促進により血糖値を低下させるシグナルとしての機能を持ち、また Leu は骨格筋において翻訳開始段階を刺激してタンパク質合成を促進するシグナルとしての機能を持っており、それぞれ栄養シグナル分子として異なる機能をもつことが示唆されている。本研究、Leu と Ile により調節される肝臓および骨格筋の遺伝子群をトランスクリプトミクスにより解析比較することで、代謝異常症の予防や代謝の正常化に有効に利用するための重要な基礎情報を得ることを目的とした。

(4) 含硫アミノ酸の脂質代謝制御機構(小田裕昭) 複数のアミノ酸が脂質代謝、コレステロール代謝を制御することが知られているが、その中で含硫アミノ酸に強い作用があることが知られている。その作用機構は必ずしも明らかにされておらず、細胞内レドックスや、調節タンパク質のリン酸化・脱リン酸化が関与することを担者らは最近の研究で明らかにしてきた。単一アミノ酸が、細胞内でグローバルな遺伝子発現変動を引き起こした結果、コレステロール代謝が変動することが推測されるようになった。本研究では、その全体像をつかむため、トランスクリプトーム解析によりグローバルな遺伝子発現変動を調べ、含硫アミノ酸の有効性の分子

的基盤を確立する。

(5) セリン(Ser)に応答する情報伝達経路と遺伝子発現制御系の解明(古屋茂樹) 可欠アミノ酸である Ser の合成能欠損導く個体と細胞レベルでの表現型変化と、それを支配する分子機序の解明から、可欠アミノ酸合成の生理的意義とその代謝恒常性の制御機構解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) (門脇 基二、藤村 忍) まず、培養肝細胞 H-4-II-E 細胞を用い、Leu、グルタミン(Gln)、アルギニン(Arg)の3種のアミノ酸によるオートファジー調節を細胞質 LC3 比法で比較検討した。情報伝達経路として、mTOR, p38^{MAP} kinase, NOS 等の細胞内シグナリング経路について、特異的阻害剤などの活用により、各アミノ酸のオートファジーの調節経路を推定した。また、遺伝子発現レベルでのアミノ酸による調節の可能性を調べるため、LC3 mRNA を定量的 PCR 法、並びに DNA マイクロアレイ法による網羅的解析により他のオートファジー関連遺伝子についても、応答を追跡した。

(2) (加藤久典) アミノ酸欠乏による生体への影響を網羅的に調べるため、まずラットにアミノ酸欠乏食を与え、肝臓における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。Lys および Thr 欠乏飼料であるグルテン食、あるいは無タンパク質食、対照のカゼイン食を一週間摂取させたラットについて、肝臓の DNA マイクロアレイ解析を行った。

次に細胞レベルでのアミノ酸欠乏の影響を詳細に解明するため、HepG2 細胞を通常の DMEM 培地、または Lys、Thr、Met 欠乏の DMEM 培地で 3 時間、および 12 時間処理をし、細胞を回収した。調製した RNA を DNA マイクロアレイ解析

(GeneChip, Human Genome U133 Plus 2.0) に供した。また、タンパク質を 2 次元電気泳動にて分離し、蛍光染色によりアミノ酸欠乏で量が変動するスポットを同定した。有意な変動を示したスポットを切り出し、ゲル内消化後 TOF-MS によるタンパク質同定を行った。

PEPCK2 遺伝子のアミノ酸欠乏による発現上昇機構を探るため、HepG2 細胞におけるレポーターアッセイを行った。同遺伝子のプロモーター領域には GCN2 経路によるアミノ酸応答配列様の配列が認められた(-239 付近)。そこでこの部分を含む、あるいは含まない上流領域について、またこの配列に変異を入れたものについて、アミノ酸欠乏の影響を調べた。

一方、DNA マイクロアレイ解析において、mTOR 経路周辺の変動も見られたので、アミノ酸欠乏による mTOR 制御機構を解析するため、hVps34 および p150 について、HEK293 細胞でのノックダウンを行い、全アミノ酸欠乏処理後に、2 時間のアミノ酸再添加処理に対する応答がどのように変化するかを、mTOR の下流因子である S6K のリン酸化を指標に調べた。

(3) (吉澤史昭)

動物実験 18時間絶食させた5週齢のWistar系雄ラットを3群に分け、1群はそのまま屠殺してControl群とした。残る2群には、IleあるいはLeuを体重100gあたり135mg経口投与して3時間後にエーテル麻酔下の腹下大静脈から全血を採血して屠殺した後(順にIsoleucine群、Leucine群)肝臓、左右の腓腹筋を摘出して分析まで-80℃で保存した。

トランスクリプトーム解析 肝臓および腓腹筋から定法によりmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析(GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array, Affymetrix社)と定量PCRのサンプルとして用いた。階層的クラスター解析は、Affymetrix社がサイト上で公開しているGene OntologyのうちBiological Processに基づいて目的の遺伝子群を抽出して、統計解析ソフト「R」のpv-crustを用いた。Pathway解析はソフトウェアIngenuity Pathways Analysisを用いて行った。

プロテオーム解析 肝臓から常法に従ってタンパク質を調製し、二次元電気泳動を用いて発現量の変化するタンパク質を検索し、発現量の変化したスポットを切り出し、ゲル内消化法でペプチドに分解し、質量分析法によって同定した。同定は、ペプチドフィンガープリント法、ならびにタンデムマス解析により得られた部分ペプチド配列を用い、データベース解析によって行なった。

(4)(小田裕昭) Met、シスチン(Cys)、タウリン(Tau)をラットに摂取させ、脂質代謝変動(血中コレステロール、血中中性脂質、肝臓脂質)を検討し、遺伝子発現変動をトランスクリプトーム解析により明らかにする。その解析によりアミノ酸シグナルがどのような経路であるか推定した。

アミノ酸のシグナル伝達機構を解明する目的で、初代培養肝細胞に様々なアミノ酸を添加して遺伝子発現の変動を検討した。

(5)(古屋茂樹) 細胞内で解糖系中間体3-ホスホグリセリン酸からSer合成を開始する酵素3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素(Phgdh)をコードする遺伝子を脳特異的に不活性化したKOマウス海馬及び、全身性Phgdh KOマウスより樹立した線維芽細胞(KO-MEF)を用い、遺伝子変異による組織および細胞内でのSer欠乏が惹起する分子細胞生物学的表現型とその機序について、マイクロアレイを中心とした網羅的解析を行なった。

4. 研究成果

(1)(門脇基二、藤村忍) オートファジーのアミノ酸による抑制作用は通常10分程度の大変急激なものである。従って、その作用点は従来遺伝子レベルではなく、細胞内でのリン酸化を始めとする急速なシグナリング機構によると考えられてきた。特に、調節性のアミノ酸の代表としてLeuの単独作用がよく知られているが、mTOR経路である可能性を検討すべく、阻

害剤ラパマイシンとmTORの基質であるS6Kのリン酸化で調べたところ、Leuは確かにmTORに作用するが、その作用は下流のオートファジー、LC3比に影響を与えることはなかった。従って、タンパク質合成の調節経路と異なり、少なくとも肝細胞では、LeuはmTOR経路を使わないことが判明した。次にGlnはp38^{MAP} kinaseを経由するという報告があるが、この場合もp38^{MAP} kinaseのリン酸化までは届くがその下流にまで届かなかった。さらにArgについて調べたところ、NOS阻害剤により、明確にオートファジーの抑制が解除され、ArgはNO経路を経由して作用することが推定された(ラパマイシンによる阻害は受けない)。以上のように、アミノ酸は個別のアミノ酸ごとに異なるシグナリング経路が作用していることが明らかになった。

また、これまでアミノ酸がオートファジーを転写レベルで調節することは予想されなかったが、オートファジーマーカーであるLC3 mRNAを飢餓培地上での細胞で有意に抑制することが認められた。これは総アミノ酸で認められた作用であるが、網羅的解析により、複数のオートファジー関連遺伝子の変動が観察された。この応答は一樣なものではなく、再現性の点からまだ明確なグループ分けができていない。今後、この数時間を要するより緩慢な遺伝子レベルの調節について、その生理的意義付けも含めて、検討を継続していく。

(2)(加藤久典) HepG2細胞をLys、Thr、Met欠乏の培地で3ないし12時間処理し、遺伝子発現プロファイルを解析したところ、GCN2経路およびその標的遺伝子の共通な変化として、ATF4、ATF3、CHOP、asparagine synthase、IGFBNP-1等の発現上昇が見られ、これまでに見出されているLeu欠乏や全アミノ酸欠乏での結果と同様であることがわかった。また、酸化系の亢進や脂肪酸合成の低下は3つのアミノ酸欠乏に共通な変動であった。さらに、Met欠乏に特異的なメチル基転移経路の変化が見出された。一方、mTOR関連では、mTOR活性の調節因子として知られるRaptorやRictorの発現がLysやThrの欠乏で増加していることが見出された。

プロテオーム解析では、酸化ストレス応答や、プロテアソーム系関連のタンパク質の変化が目立っていた。糖新生酵素PEPCK2は、これまで分岐アノ酸欠乏により遺伝子発現が亢進することを見出しているが、Lys欠乏、Thr欠乏においても量が増加するタンパク質として同定された。これはDNAマイクロアレイ解析の結果とも一致していた。

そこで、次にPEPCK2遺伝子の発現制御機構を詳細に解析することにした。レポーターアッセイの結果、アミノ酸応答配列様配列を含むコンストラクトはアミノ酸欠乏に相当して発現が上昇するが、これを含まない、あるいは変異させたコンストラクトではアミノ酸欠乏への応答能を失っていた。同遺伝子の制御に参与する

転写因子を明らかにするため各転写因子を強発現させたところ、ATF4 には強い誘導効果が、ATF3 には抑制効果が、C/EBPβには作用が無いことが明らかとなった。ChIP アッセイの結果、アミノ酸欠乏では、同遺伝子プロモーター領域への ATF3 と ATF4 の結合増加が認められ、両者が拮抗しながら、同遺伝子の活性を調節していることが示唆された。HEK293T 細胞において、hVps34 および p150 のノックダウンの影響を調べたところ、これらのノックダウンによりアミノ酸の再添加による mTOR の活性化が見られなくなった。

さらに mTOR 経路によるアミノ酸感知機構の詳細を解析するため hVps34 や p150 タンパク質の様々な変異体を作成して過剰発現させたところ、hVps34 では予想に反して、何れのドメインの欠失もアミノ酸への応答を増強させた。各ドメインが他の因子との相互作用において抑制的に作用している可能性が考えられた。一方、p150 に関しては、キナーゼ、HEATWD40 の欠失により mTOR 活性が低下することが明らかとなった。

なお、以上の解析から得られたトランスクリプトームデータに関しては、ニュートリゲノミクスデータベースに追加を行い、リファレンスデータとしての利用に供した。

(3) (吉澤史昭)

変化したプロセットの数 経口投与によって変化した遺伝子は、肝臓では Isoleucine 群よりも Leucine 群の方が多く、骨格筋では Leucine 群よりも Isoleucine 群の方が多かった。経口投与によって変化した遺伝子の数だけに注目すれば、遺伝子群の発現調節に与える影響は、肝臓では Leu の方が Ile よりも大きく、骨格筋では Ile の方が Leu よりも大きいものと考えられる。

階層的クラスター解析 階層的クラスター解析とは、似ているものを集めて分類して、共通した特性によってグループに分け、その中から意味のあるものを発見する多変量解析のひとつである。肝臓あるいは骨格筋における Isoleucine 群または Leucine 群の「全遺伝子群」(31099 個)をはじめとする 9 種の遺伝子群についてそれぞれクラスター解析を行った結果、Leucine 群の肝臓の「全遺伝子」、「glucose metabolism」、「protein biosynthesis or proteolysis」、「protein metabolism」、「lipid metabolism」の遺伝子群、Isoleucine 群の骨格筋の「glycolysis」、「protein metabolism」の遺伝子群は Control 群とは別のクラスターに分かれたため、これらの遺伝子群は Leu、Ile 経口投与によって影響を受けたと考えられる。

Leucine 群の肝臓における「lipid metabolism」の遺伝子群に注目した解析

脂肪酸分解に関わる遺伝子 Ppar-、Cpt-1、Cpt-1 が有意に減少しており、また、脂肪酸合成を促進する Srebf1 が有意に増加していた。このことから Leu 経口投与により肝臓では脂肪酸

分解が抑制され、脂肪酸合成が促進されることが示唆された。さらに脂肪酸代謝の鍵となる Srebf1 について Pathway 解析を行った結果、Srebf1 の下流・上流ともに多くの遺伝子が変化していた。

Ile の糖新生抑制作用に注目した解析

Ile は糖新生の律速酵素の発現を抑制することがこれまでに明らかにされている。肝臓において、Ile 投与の影響はクラスター解析では確認できなかったが、定量 PCR で糖新生の律速酵素である glucose-6-phosphatase

(G6pc)、fructose-1,6-bisphosphatase (Fbp1)、phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1)、pyruvate carboxylase (Pc) の発現量を測定した。Ile 経口投与によって G6pc、Pck1、Pc の発現量が有意に減少し、また Leu 経口投与によって Pck1、Pc の発現量が有意に減少した。そこでこれらの遺伝子について、Pathway 解析を行ったところ、G6pc と Pck1 の上流に位置する遺伝子の発現が変化していた。

G6pc について、変化した上流の遺伝子のうち、Isoleucine 群では Ppargc1a が、Leucine 群では Elovl5、Gck が特異的であった。Pck1 について、変化した上流の遺伝子のうち、Isoleucine 群では Ppargc1a が、Leucine 群では Nr3c1、Atf3、Elovl5、Gck、Plin2、Ahr、Myc が特異的であった。これらの結果から Isoleucine 群、Leucine 群で異なる分子を介した G6pc、Pck1 の発現調節 Pathway が存在することが示唆され、この差異が Ile 特異的な血糖値低下作用をもたらす一因になっていると考えられる。

Ile 投与後の肝臓のプロテオームの解析

Ile 経口投与後の肝臓のプロテオームを解析した結果、Ile 投与によって糖代謝に関わる 2 つの酵素 (Alpha-enolase、mitochondrial aldehyde dehydrogenase) のリン酸化が増加し、1 つの酵素 (pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit) の発現増加が確認された。これらの変化はいずれも解糖を抑制する。

【結論】トランスクリプトーム解析によって、Leu は脂質代謝を調節する栄養シグナル分子としても機能することが示唆された。また、トランスクリプトーム解析の結果から Ile が骨格筋での解糖を調節する機能を有することが新たに示され、さらにプロテオーム解析の結果から Ile は肝臓の糖代謝に関わる酵素の活性および発現を調節することが示され、これまでの研究で示唆されていた Ile の肝臓および骨格筋での糖代謝調節シグナルとしての機能を裏付ける新たな証拠を得ることができた。

(4) (小田裕昭) ラットに Tau を添加した食餌を与え、肝臓の RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行い、バイオフィンクシオン解析、パスウェイ解析、ネットワーク解析を行った。その結果、脂質代謝、糖質代謝、薬物代謝の変動が確認され、その作用は NROB2 を介する経路によって制御されていることが明らかになった。

また、Tau、Gly、Lys、Gln、Val、Ala、Met、Ser などのアミノ酸を添加した初代培養肝細胞では、数百の遺伝子の変動が見られ、一部ラット個体での遺伝子変動を説明するものから新たな遺伝子の変動も見られた。

(5) (古屋茂樹) Ser 合成酵素 Phgdh を脳特異的に KO したマウス脳海馬のマイクロアレイ解析より、特徴的な遺伝子発現変化を同定した。機能カテゴリー解析より、翻訳調節、分子輸送、がん、細胞増殖、情報伝達などに関わる遺伝子が選択的に変化している事が明らかとなった。これらには既に全身性 Phgdh KO マウス胚組織で同定されていた Ser 欠乏に特徴的に応答する複数の遺伝子が発現誘導されていた。すなわち発達段階を越えて Ser 欠乏によって共通に応答する一群の遺伝子の存在が明らかとなった。その応答に関わる詳細な分子機序を明らかにすることを目的に、全身性 Phgdh KO マウスから不死化 KO-MEF の樹立に成功した。KO-MEF は 10% 仔牛血清とアミノ酸を十分に含む培地では野生型と同様の増殖能を示すが、血清濃度を 1% に低下させ、Ser を含まない制限培地で培養すると、速やかに増殖を停止した。この増殖抑制は Phgdh KO マウスに観察される脳及び他臓器の成長遅滞表現型を細胞レベルで再現したものと判断した。そこでグループ内共同研究として、この Ser 制限条件でマイクロアレイによる KO-MEF の網羅的遺伝子発現解析を行ない、制限後 6 時間で統計的に有意な 2 倍以上または 1/2 以下の発現変化を示した約 930 の遺伝子を同定した。これらには KO 胚組織で発現変化している翻訳調節関連遺伝子等が含まれており、さらに各種ストレス応答、炎症惹起、糖質・脂質代謝制御等のカテゴリーに属す遺伝子の顕著な発現変化が QRT-PCR による確認実験で示された。また、これらの遺伝子応答に関わる経路として、全般的なアミノ酸欠乏によって活性化する GCN2-eIF2-ATF4 経路による制御に加え、細胞死や炎症反応に関わる遺伝子については Ser の枯渇によって産生される異常スフィンゴ脂質によって転写誘導されることを見出した。以上の結果より、Ser の欠乏は GCN2-eIF2-ATF4 経路だけでなく異常スフィンゴ脂質を介した細胞内情報伝達系も活性化し、翻訳抑制や発達遅滞、さらには炎症反応を惹起する原因となることが明らかとなった。すなわち Ser は、これらの病的状態を予防する可欠アミノ酸として重要な代謝的役割を担うことが示された。これらの共同研究成果について現在原著論文を作成している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

- 1) Takahashi, S., Masuda, J., Shimagami, H., Ohta, Y., Kanda, T., Saito, K. and Kato, H. Mild caloric restriction up-regulates the expression of prohibitin: A proteome study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 462-467 (2011) (査読あり)
- 2) Chijimatsu, T., Umeki, M., Okuda, Y., Yamada, K., Oda, H. and Mochizuki, S. The fat and protein fractions of freshwater clam (*Corbicula fluminea*)

- extract reduce serum cholesterol, and enhance bile acid biosynthesis and sterol excretion in hypercholesterolaemic rats fed a high -cholesterol diet. *Brit. J. Nutr.* **105**, 526-534. (2011) (査読あり)
- 3) Regulation of muscular glutamate metabolism by high-protein diet in broiler chicks. Kobayashi, H., Eguchi, A., Takano, W., Shibata, M., Kadowaki, M., and Fujimura, S. *Anim. Sci. J.*, **82**: 86-92 (2011) (査読あり)
 - 4) Otani, L., Sugimoto, N., Kaji, M., Murai, M., Chang, S.-J., Kato, H. and Murakami, T. Role of the renin- angiotensin- aldosterone system in the enhancement of salt sensitivity caused by prenatal protein restriction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* in press (2011) (査読あり)
 - 5) Otani, L., Ogawa, S., Zhao, Z., Nakazawa, K., Umehara, S., Yoshimura, E., Chang, S.-J. and Kato, H. An Optimized Method for the Determination of Free L-Cysteine in Rat Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Using the Derivatization Reagent 4-Aminosulfonyl- 7-Fluoro- 2,1,3- Benzoxadiazole. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2011) (査読あり)
 - 6) Vitamin E as a novel enhancer of macroautophagy in rat hepatocytes and H4-II-E cells. Karim, MR., Fujimura, S., and Kadowaki, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**: 981-987 (2010) (査読あり)
 - 7) Improvement in the *In Vivo* Digestibility of Rice Protein by Alkali Extraction is Due to Structural Changes in Prolamin/Protein Body-I Particle. Kubota, M., Saito, Y., Masumura, T., Kumagai, T., Watanabe, R., Fujimura, S., and Kadowaki, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** : 614-619 (2010) (査読あり)
 - 8) Toyoshima, Y, Tokita, R., Ohne, Y., Hakuno, F., Noguchi, T., Minami, S., Kato, H. and Takahashi, S.I. Dietary protein deprivation up-regulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *J. Mol. Endocrinol.* 45, 329-340 (2010) (査読あり)
 - 9) Kamei, A., Watanabe, Y., Ishijima, T., Uehara, M., Arai, S., Kato, H., Nakai, Y. and Abe, K. Dietary iron deficiency induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiol. Genomics*, **42**, 149-156 (2010) (査読あり)
 - 10) 吉澤史昭, 分枝鎖アミノ酸の代謝調節因子としての機能, 栄養生理研究会報, 54, 9-20 (2010) (査読あり)
 - 11) Hashizume, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Uematsu, R., Matsumura, S., Chatani, F. and Oda, H. Advantages of human hepatocyte-derived transformants expressing a series of human cytochrome P-450 isoforms for genotoxicity

- examination. *Toxicol. Sci.* **116**, 488-497. (2010) (査読あり)
- 12) Yang, JH., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, O.M., Tomonaga, S., Azuma, N., Watanabe, M., Hamase, K., Zaitsu, K., Machida, T., Messing, A., Itohara, S., Hirabayashi, Y., Furuya, S. Brain-specific *Phgdh* deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an NMDA receptor co-agonist, in adult brain. *J. Biol. Chem.* **285**, 41380-41390. (2010) (査読あり)
- 13) 古屋 茂樹. 遺伝性セリン合成不全疾患モデルマウスの脳内遊離アミノ酸組成に及ぼす大豆ペプチド摂取効果の定量的検討, 大豆タンパク質研究, **13**, 109-115. (2010) (査読なし)
- 14) 古屋 茂樹. アミノ酸研究の最前線 1, 外科と代謝・栄養, **44**, 65-71. (2010) (査読なし)
- 15) Effects of Rice Proteins from Two Cultivars, *Koshihikari* and *Shunyo*, on Hepatic Cholesterol Secretion by Isolated Perfused Livers of Rats fed Cholesterol-Enriched Diets. Yang, L., and Kadowaki, M., *Ann. Nutr. Metab.*, **54**: 283-290 (2009) (査読あり)
- 16) Superiority of Alkali-Extracted Rice Protein in Bioavailability to Starch Degraded Rice Protein Comes from Digestion of Prolamin in Growing Rats. Kumagai, T., Watanabe, R., Saito, M., Watanabe, T., Kubota, M., and Kadowaki, M. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **55** :170-177 (2009) (査読あり)
- 17) Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy. Kadowaki, M., Karim, MR. *Methods in Enzymology, Vol.452*, "Autophagy in Mammalian Systems, Part B", ed. Klionsky, D.J., Academic Press, San Diego, pp.199-213 (2009) (査読あり)
- 18) Chijimatsu, T., Tatsuguchi, I., Oda, H. and Mochizuki, S. A freshwater clam (*Corbicula fluminea*) extract reduces cholesterol level and hepatic lipids in normal rats and xenobiotics-induced hypercholesterolemic rats. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3108-3112. (2009) (査読あり)
- 19) Hashizume, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Matsumura, S., Chatani, F. and Oda, H. In vitro micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutation Res.*, **677**, 1-7. (2009) (査読あり)
- 20) Yamajuku, D., Okubo, S., Haruma, T., Inagaki, T., Okuda, Y., Kojima T, Noutomi, K., Hashimoto, S. and Oda, H. Regular feeding plays an important role in cholesterol homeostasis through the liver circadian clock. *Circulation Res.*, **105**, 545-548. (2009) (査読あり)
- 21) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. (Review) Klionsky, DL, Kadowaki, M., et al. *Autophagy* , **4**: 151-175 (2008) (査読あり)
- 22) Regulation of taste-active components of meat by dietary branched-chain amino acids: effects of branched-chain amino acid antagonism. Imanari, M., Kadowaki, M., Fujimura, S. *Br. Poultry Sci.*, **49**(3): 299-307 (2008) (査読あり)
- [学会発表](計 44 件)
- [図書](計 3 件)
- 1) 加藤久典 網羅的遺伝子発現解析を利用した食品の安全性評価、「食の安全科学の展開 - 食のリスク予測と制御に向けて」(東京大学食の安全研究センター編) シーエムシー出版、pp98-102 (2010)
- 2) 加藤久典、斉藤憲司 食品データベース(第4章 食品分野への応用)「バイオチップ実用化ハンドブック」(金子周一、堀池靖浩 編) エヌ・ティー・エス、pp346-352、(2010)
- 3) 加藤久典 窒素化合物の代謝「現代栄養学を理解するための分子生物学入門」, 光生館、pp106-114 (2010)
- [その他]
- 1) ニュートリゲノミクスデータベース：
<http://nutrigenomics.jp/>
- 2) KEGGLE パスウェイ解析ツール：
<http://keggle.jp/>
- 3) 第65回日本栄養・食糧学会大会イブニング・セミナー「栄養機能ゲノミクス研究会：DNAマイクロアレイをどのように使いこなすか？」を開催(2010年5月、徳島)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
門脇 基二 (KADOWAKI MOTONI)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：90126029
- (2) 研究分担者
加藤 久典 (KATO HISANORI)
東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授
研究者番号：40211164
吉澤 史昭 (YOSHIZAWA FUMIAKI)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：10269243
小田 裕昭 (ODA HIROAKI)
名古屋大学・生命農学研究科・准教授
研究者番号：20204208
古屋 茂樹 (FURUYA SHIGEKI)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：00222274
藤村 忍 (FUJIMURA SHINOBU)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：20282999