

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780134

研究課題名（和文） タンパク質栄養状態の悪化による肝臓のインスリン活性増強機構の  
解明とその生理的意義研究課題名（英文） Mechanism of the enhancement of hepatic insulin action induced by  
protein malnutrition

研究代表者

鈴木 由香（SUZUKI TOYOSHIMA YUKA）

日本医科大学・老人病研究所・助教

研究者番号：70516070

研究成果の概要（和文）：タンパク質栄養状態が悪化すると、肝臓に脂質が蓄積するが、これはインスリン活性の増強と迅速に連動して起こることが明らかとなった。また、白色脂肪組織では、肝臓とは異なり、タンパク質栄養状態の悪化に反応してインスリン活性が低下することがわかった。これまでの結果を合わせて、「タンパク質栄養状態の悪化によって余剰となったエネルギーは、臓器特異的なインスリンシグナルの修飾を介して、白色脂肪組織ではなく、肝臓に優先的に取り込まれて、脂質となって蓄積される」という機構が稼働していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Protein malnutrition induces lipid accumulation in the liver, which was linked with the enhancement of insulin signaling in the liver. Furthermore, in contrast to the liver, in white adipose tissue (WAT), protein malnutrition suppresses insulin action. Taken together with our results, when energy utilization is reduced under protein malnutrition, energy that is not utilized is preferentially incorporated into the liver and synthesized to lipids. The enhancement of insulin signaling in the liver and the suppression of insulin signaling in WAT may play important roles in the preferential distribution of lipids in the liver during protein malnutrition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：インスリン・肝臓・タンパク質栄養

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の出身研究室を含めた複数のグループは、タンパク質栄養状態の悪化が成長遅滞を引き起こす機構について研究を進めて

きた。その結果、タンパク質栄養状態の悪化は、インスリン様成長因子（IGF）量の減少および IGF 活性の低下を介して、筋肉などの標的細胞でのタンパク質合成を抑制し、動物

の成長遅滞、成熟後の筋肉萎縮などを引き起こすことが明らかとなった [Takahashi S *et al*, *Br. J. Nutr.* **63**: 521 (1990)、Thissen JP, *et al*, *Endocr Rev.* **15**: 80 (1994)]。しかし、これまでの研究では、タンパク質栄養状態の悪化に応答したタンパク質代謝の制御機構の解明に留まっており、タンパク質栄養状態に応じて変動する代謝の連携システムを明らかにするためには、糖・脂質代謝を含めた物質代謝の総合的な制御システムを明らかにすることが必要である。

そこで、申請者は、タンパク質栄養状態の悪化に応答した糖・脂質代謝の変動について検討を始めた。その結果、タンパク質栄養状態の悪化は、グルコースに反応したインスリン分泌を抑制するにもかかわらず、血糖値を正常に維持していることがわかった。さらに、肝臓において糖新生を抑制すること、脂質合成を促進して脂質蓄積量を増加させることを明らかにした [*Growth Horm IGF Res.* **18**: S23 (2008)]。これらの現象は、低タンパク質食摂取時の肝臓におけるインスリン感受性の上昇を示唆している。

次に、低タンパク質食摂取が肝臓のインスリンシグナルを増強するか調べた。インスリンは細胞膜上の受容体に結合すると、受容体が活性化し、これがインスリン受容体基質 (IRS) をチロシンリン酸化する。引き続き、チロシンリン酸化された IRS に PI3 キナーゼ p85 制御サブユニットが結合することで、PI3 キナーゼ経路が活性化され、インスリン特有の生理作用を発揮する。実験の結果、肝臓の IRS-2 量が増加し、そのチロシンリン酸化、PI3 キナーゼ p85 制御サブユニットとの結合量も増加していた。このことから、低タンパク質食は、IRS-2 を介したシグナルを上昇させることがわかった。さらに、PI3 キナーゼの下流に存在するシグナル因子につい

て調べたところ、低タンパク質食摂取によってラパマイシン標的タンパク質 (mTOR) によってリン酸化される翻訳抑制因子 4E-BP1 の量およびリン酸化も増加していたことから、低タンパク質食摂取が mTOR を介したシグナルを上昇させることを確認できた。

以上の結果をまとめると、「タンパク質栄養状態の悪化は、肝臓において IRS-2 や mTOR を介したインスリンシグナルの増強を引き起こす。その結果、糖新生を抑制し、脂質合成を亢進する」と考えられる。この因果関係を証明することは、タンパク質栄養状態の悪化に反応したタンパク質・糖・脂質代謝の連携機構を明らかにする上で不可欠である。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、タンパク質栄養状態の悪化がどのような機構を介して肝臓の IRS-2 量を増加させるか、タンパク質栄養状態の悪化に反応した IRS-2 や 4E-BP1 量の増加が糖・脂質代謝の制御にどのような役割を果たすかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- 1) 低タンパク質食を給餌したラットの肝臓より total RNA を調製し、IRS-2 の mRNA 量を real-time PCR 法で測定した。
- 2) 低タンパク質食を給餌したラットの血中の内分泌・代謝指標、肝臓のインスリンシグナルや脂質蓄積量の変動を経時的に追跡、あるいは、低タンパク質食を給餌したラットに十分なタンパク質量を含む食餌 (標準食) を再給餌した際の血中の内分泌・代謝指標、肝臓のインスリンシグナルや脂質蓄積量の変動を経時的に追跡し、肝臓への脂質蓄積機構に検討を加えた。

- 3) 低タンパク質給餌が、肝臓以外の代表的なインスリン標的組織である骨格筋と白色脂肪組織におけるインスリンシグナルに及ぼす影響を検討した。
- 4) タンパク質栄養状態の悪化による肝臓 IRS-2量の増加の生理的意義を明らかにするために必須な肝臓IRS-2をノックダウンした動物モデルの作製を試みた。

#### 4. 研究成果

1) 成長期のラットに低タンパク質食を給餌すると、肝臓の IRS-2 タンパク質量は増加するが、IRS-2 mRNA 量は変化しなかった。したがって、タンパク質栄養状態の悪化に应答して肝臓 IRS-2 は、転写後に調節を受けて、その量が増加することがわかった。

2) 成長期のラットに低タンパク質食を給餌すると、IGF-I の産生が抑制されるなどして IGF 活性が低下し、成長遅滞が起こる。この際、肝臓ではインスリンシグナルが増強され、これを反映して脂質合成が亢進し、中性脂肪 (TG) が蓄積することを明らかにしてきた。そこで、成長期のラットに低タンパク質食を給餌し、血中内分泌・代謝指標、肝臓のインスリンシグナル、TG 量などを経時的に測定した。その結果、低タンパク質食給餌 2 日目に、血中 IGF-I 濃度の低下が有意となり、4 日目以降有意な体重低下が観察された。一方、肝臓の IRS-2 量の増加は、低タンパク質給餌 4 日目から有意に観察された。肝臓 TG 量の増加は、低タンパク質食給餌 2 日目より有意となり、4 日目以降に顕著となった。以上をまとめると、低タンパク質食給餌に应答して、給餌 2 日以内に血中 IGF-I 濃度の低下、摂食に应答したインスリン分泌の抑制が起こる。この期間に肝臓 TG 量の増加が始まり、4 日目以降に起こるインスリンシグナルの増強を反映して TG 量の蓄積が顕著となると結論した。

さらに、低タンパク質食を給餌したラットに十分なタンパク質量を含む食餌 (標準食) を再給餌した際の、血中内分泌・代謝指標、肝臓のインスリンシグナル、TG 量などを経時的に測定した。その結果、標準食を再給餌 2 日目に、低タンパク質食給餌によって低下していた血中 IGF-I 濃度が有意に上昇し、8 日目以降に低タンパク質食給餌によって遅滞した成長の回復が観察された。同時に、標準食再給餌 2 日目に、低下していた血中インスリン濃度も有意に上昇した。一方、低タンパク質栄養状態で増加した肝臓の IRS-2 のチロシンリン酸化は、標準食再給餌 2 日目に有意に減少し、同じく増加した 4E-BP1 のリン酸化は標準食再給餌 4 日目に有意に減少した。肝臓の TG 蓄積は、標準食給餌 2 日目以降、有意に低下した。以上の結果から、低タンパク質食を 14 日間給餌して起こる血中 IGF-I 濃度・インスリン濃度の低下、インスリンシグナルの増強と脂質蓄積は、標準食再給餌 2 日目以内に回復すると結論した。

これまでの結果をあわせて、タンパク質栄養状態に应答した脂質蓄積は、インスリン様活性と迅速に連動していることを強く示唆していた。

3) 低タンパク質食を給餌した成長期のラットの骨格筋もしくは白色脂肪組織を用いて、インスリンの細胞内シグナル因子の変動を測定した。

骨格筋では、低タンパク質食給餌によって、インスリンの細胞内シグナル因子はいずれもあまり変化しなかった。

それに対して、白色脂肪組織では、低タンパク質食給餌によってインスリン受容体のチロシンリン酸化、IRS-1の量およびチロシンリン酸化が減少していた。さらに、白色脂肪組織から単離した脂肪細胞を用いて糖取り込み量を測定したところ、低タンパク質食給餌によってインスリン依存的な糖取り込みが抑制されていた。以上の結果から、低タンパク質食給餌によって、肝臓とは反対に、白色脂肪組織ではインスリン活性が抑制されているこ

とが明らかになった。

これまでの結果を合わせて、「タンパク質栄養状態の悪化で余剰となったエネルギー源は、臓器特異的なインスリンシグナルの修飾を介して、白色脂肪組織ではなく、肝臓に脂質となって蓄積される」という機構が稼働していると考えられた。

4) 肝臓 IRS-2 をノックダウンした動物モデルの作製をするために、まず IRS-2 に対する shRNA 発現アデノウイルスの作製を試みた。当初の予定よりウイルス作製に時間を要したが、作製したアデノウイルスを培養細胞に感染させたところ、IRS-2 のノックダウンが確認できた。今後、得られたウイルスを濃縮・精製をして、さらに高力価なウイルスを獲得し、それを低タンパク質食給餌したラットもしくはマウスに投与して、肝臓 IRS-2 のノックダウンをした際の糖・脂質代謝を検討し、タンパク質栄養状態の悪化に应答した IRS-2 量の増加の生理的役割を明らかにしていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yuka Toyoshima, Reiko Tokita, Yoichiro Ohne, Fumihiko Hakuno, Tadashi Noguchi, Shiro Minami, Hisanori Kato, Shin-Ichiro Takahashi, Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *Journal of Molecular Endocrinology*, 査読有り、45、329–340、2010  
DOI: 10.1677/JME-10-0102

[学会発表] (計 5 件)

- ① 豊島 由香、低タンパク質食を給餌したラット肝臓に中性脂肪蓄積を引き起こす内分泌系およびインスリンシグナルの変動、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、平成 23 年 5 月 14 日、東京
- ② Yuka Toyoshima、Suppression of insulin signaling in white adipose tissues contributes to preferential lipid accumulation in rat liver under protein malnutrition、5th International Congress of the GRS-IGF Society、平成 22 年 10 月 6 日、New York、USA、Oral Presentation に選ばれた。
- ③ 豊島 由香、低タンパク質栄養状態に应答して起こる脂肪蓄積の臓器特異的調節、第 64 回日本栄養・食糧学会大会、平成 22 年 5 月 23 日、徳島
- ④ Yuka Toyoshima、Effects of protein restriction on insulin signals in liver, muscle, and adipose tissues of rats in response to endogenous insulin、19th International Congress of Nutrition (ICN 2009)、平成 21 年 10 月 4~9 日、タイ・バンコク、Distinguished poster に選ばれた。
- ⑤ 豊島 由香、低タンパク質食給餌に应答した肝臓のインスリンシグナルの増強と脂肪蓄積、第 63 回日本栄養・食糧学会大会、平成 21 年 5 月 22 日、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 由香 (SUZUKI TOYOSHIMA YUKA)

日本医科大学・老人病研究所・助教

研究者番号：70516070

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者