

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08542

研究課題名(和文) グルコース/フルクトース代謝のデカップリングによる疾患の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of metabolic disorders caused by de-coupling Glucose/Fructose metabolism.

研究代表者

満島 勝 (Mitsushima, Masaru)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・分子代謝制御研究部上級研究員

研究者番号：40621107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：作製した全身性AldoBK0マウスは、フルクトース投与により重度の低血糖を呈し、HFIモデルマウスであることを確認した。本効果には酵素活性が必要であり、メタボローム解析では、K0マウスの肝臓においてF1Pの劇的な増加と様々な中間代謝産物の変化を確認した。AldoBK0マウスは耐糖能、インスリン感受性が改善し、糖新生の抑制が見られた。AldoBK0の初代培養肝細胞ではフルクトースの添加により細胞内ATPの減少とAMPKの活性化がみられたが、AMPK阻害では糖新生は回復しなかった。K0マウスの肝細胞に蓄積したF1Pが、AldoAおよびFBPase1に結合しその活性を阻害する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

本研究において希少遺伝子疾患であるフルクトース不耐症の解析マウスモデルを確立し、その分子機構がアルドラーゼの酵素活性に依存していること、更にはその際肝細胞内で蓄積するフルクトース1リン酸が本疾患の原因であり、細胞内においてATPの枯渇をもたらすと同時に、重要な解糖系、糖新生系酵素であるAldolaseA、FBPaseと結合しその活性を阻害することを明らかにした。AldolaseBは肥満と共に発現が亢進する一方、発現低下がHCCの促進につながるなどが報告されており、それらの疾患の研究においても有益な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：The systemic AldoBK0 mice, which we generated, showed severe hypoglycemia when administered fructose intraperitoneally, which confirmed to be HFI model mice. This effect requires enzymatic activity of AldoB, and metabolomics analysis confirmed a dramatic increase in F1P and changes in various intermediate metabolites in the liver of K0 mice. AldoBK0 mice showed improved glucose tolerance and insulin sensitivity, and suppressed gluconeogenesis. In primary cultured AldoBK0 hepatocytes, the addition of fructose reduced intracellular ATP and activated AMPK, however AMPK inhibition did not restore gluconeogenesis. We revealed that F1P, accumulated in the hepatocytes of K0 mice, binds to AldoA and FBPase1 and inhibits their activity.

研究分野：分子細胞生物学、分子糖尿病学

キーワード：フルクトース代謝 AldolaseB グルコース代謝 HFI メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常を合併するメタボリックシンドロームの人口が世界的に増加している。メタボリックシンドロームの進行は、動脈硬化を促進し、心筋梗塞、脳梗塞などの重篤な疾患を引き起こすリスクを増大させることから、メタボリックシンドロームの解消は社会的大きな関心の一つとなっている。更に近年、砂糖や異性化糖などの甘味料に含まれるフルクトースがそれら代謝疾患の増悪因子であることが明らかになってきた。フルクトースはグルコース同様に C6 の炭素骨格を持つ単糖であり、小腸で吸収された後肝臓で代謝される。グルコースが肝臓内で一度フルクトースに異性化された後 Aldolase A/B により代謝される一方、フルクトースは直接 Aldolase B によって代謝される。そのため、グルコースに比べるとフルクトースは代謝され易い単糖であるといえる。一方で、グルコースは代謝産物が、グリコーゲン合成や核酸合成の材料として使われるのに対して、フルクトースは脂肪酸や中性脂肪を合成し易いことが知られており、共通の代謝経路に加え、それぞれの特異的な代謝経路が存在する。これまでに、Aldolase A は解糖系でのみ機能し、Aldolase B はフルクトース分解経路と解糖系の両方で機能すると考えられてきた (図 1)。

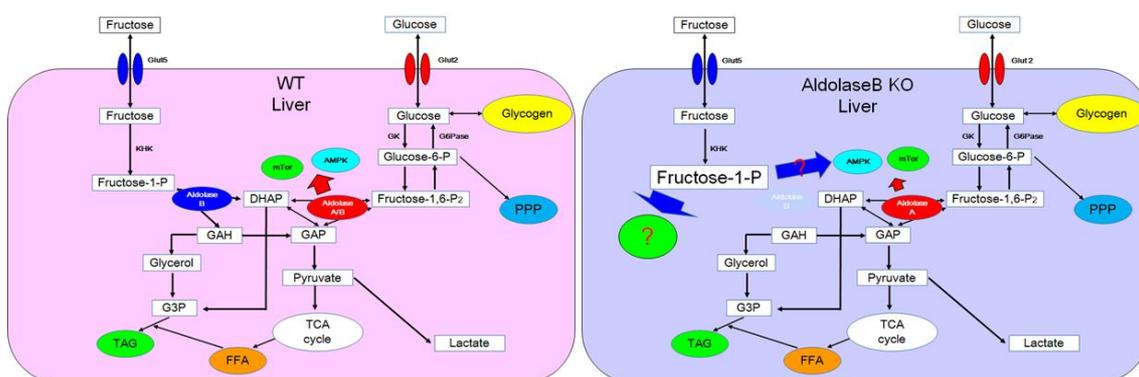


図1: 肝臓におけるグルコース/フルクトース代謝経路

Aldolase A が全身性に発現するのに対して、Aldolase B の発現は吸収組織である小腸、代謝組織である肝臓、そして排出組織である腎臓に限局されている。このことは、フルクトース代謝を限局された組織で行わなければならない理由が存在することを意味している。実際に、本邦では少ないが、欧米では遺伝性のフルクトース不耐症 (HFI) の原因に Aldolase B 遺伝子変異が知られている。Aldolase B の活性不全によるフルクトース代謝産物 (フルクトース 1 リン酸: F1P) の蓄積が、肝臓や腎臓において細胞障害毒性を示すことと考えられている。では、F1P の作用点は何か? との問いに対しては、以前からリン酸消費による細胞内の ATP 枯渇という間接的な原因が提起されているが、F1P の直接の作用点があるかは不明である。実際 HFI 患者はフルクトース摂取により、嘔吐、腹痛、乳酸アシドーシス、高尿酸血症、低血糖等の症状を示し、昏睡や最悪の場合死に至る。低血糖の原因は糖新生の抑制であると考えられるが、その詳しい作用機序は分かっていない。つまりは、フルクトースはグルコース同様にエネルギー源として使用することはできるが、代謝不全によって毒ともなりうる。我々はまず、Aldolase B KO マウスを作製し、細胞内の F1P の作用点を明らかにし、HFI の分子機序を明らかにできるのではないかと考えられる。また、メタボリックシンドロームにおける Aldolase B の活性がどのように変遷していくかは不明である。フルクトース代謝不全による細胞毒性がメタボリックシンドロームの病態にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることはメタボリックシンドロームの治療標的になりうると思われる。

2. 研究の目的

申請者らは肥満、糖尿病という病態を、絶食シグナルの制御異常との観点より GCN5-CITED2-PKA シグナルモジュールを明らかにし、それらが発現を制御する代謝関連遺伝子が広範に及ぶこと明らかにしてきた (Sakai, Nat. Med., 2012)。本研究ではその中より、近年メタボリックシンドローム発症への関与が明らかになってきたフルクトース代謝経路の必須酵素 Aldolase B に着目した。Aldolase B の機能不全はフルクトース不耐症の原因の一つとして知られており、フルクトース摂取により重篤な症状を引き起こすが、原因である細胞性障害の分子実体は不明な点が多い。我々は、Aldolase B KO マウスを用いることでフルクトース不耐症の分子機序の解明を目指す。また、近年海外のグループから Aldolase A がグルコースの代謝産物、フルクトース 1,6 ビスリン酸を認識し栄養センサーとして機能しているとの興味深い研究結果が報告された (Zhang, Nature, 2018)。我々は、グルコース同様に Aldolase B がフルクトースを代謝すると

もに、フルクトースセンサーとして機能のではないかと考えた。つまり、Aldolase A/B はそれぞれ独立してグルコース、フルクトースを代謝するのではなく、協調ながら糖を感知し代謝している可能性が考えられた。そのため、Aldolase B KO マウスを作製し、グルコース、フルクトース代謝がデカップルすることで引き起こされる病態の実体を明らかにすることを目指している。また、前述の新規モジュールは絶食応答性に機能するが、糖尿病等のメタボリックシンドローム状態でも発現が亢進しその下流の制御に参与していることを明らかにしている (Sakai, Nat. Commun., 2016)。つまり、グルコース/フルクトース代謝とこれらの絶食シグナルとのクロストークを足掛かりにして、メタボリックシンドロームにおける糖/脂質代謝制御破綻のメカニズムにも迫ることができると考えられる。

3. 研究の方法

Fructose 不耐症の分子基盤の解明

申請者が独自に作製した Aldolase B KO マウスを用いてフルクトース摂取が個体の表現型に与える効果を検討する。低濃度の 1%フルクトースを含む餌で飼育した場合、慢性的なフルクトース摂取に伴い、KO マウスの成長不全が確認できた (図 2-1)。さらに、急性のフルクトース応答を確認するため、絶食とした野生型、Aldolase B KO マウスにフルクトースを腹腔より投与したところ、野生型では糖新生と考えられる血糖の上昇がみられた一方、Aldolase B KO マウスでは急速な血糖の減少がみられた (図 2-2)。したがって我々が作製した Aldolase B KO マウスは、ヒトでみられるフルクトース不耐症のモデルマウスであることが確認できた。



図2-1: 1%フルクトース食餌負荷マウス

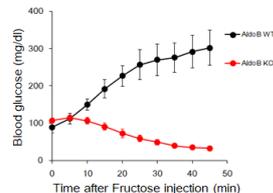


図2-2: フルクトース負荷後の血糖変化

1. マウスへのフルクトース負荷に対する肝臓での解析

野生型、KO マウスの絶食時にフルクトースを腹腔内投与し、低血糖前後での肝臓を採取し、遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析により、関与する細胞内シグナル伝達をウェスタンブロット解析により、代謝産物の変化をメタボローム解析により明らかにする。同時に、1%フルクトースを含む食餌で飼育した時の成長障害の原因を検討するため、肝臓における、遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析により、代謝産物の変化をメタボローム解析により明らかにする。

2. 初代培養肝細胞を用いたフルクトース不耐症の解析

野生型、KO マウスより初代培養肝細胞を採取しフルクトース添加後の、遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析により、関与する細胞内シグナル伝達をウェスタンブロット解析により、代謝産物の変化をメタボローム解析により明らかにする。

3. フルクトース不耐症モデルで変化のみられる代謝経路の F1P の標的の同定

F1P は解糖系、糖新生系路における中間代謝産物であるため、F1P を基質とする Aldolase A/B/C および FBPase、PFK1/2 がその標的と考えられる。そこで、これらの分子が実際に結合するかを結合実験により検討する。また、結合が見られた場合、それらの酵素活性に与える F1P の効果を検討する。

メタボリックシンドロームへの影響の検討

WT、KO マウスを 食餌負荷、*ob/ob* バックグラウンドの導入等によりメタボリックシンドローム条件下でのフルクトース代謝の意義を、代謝表現型、メタボローム解析により代謝物の変化等を検討する。また、Aldolase B^{Flox/Flox} マウスの樹立ができれば、メタボリックシンドローム発症前、中、後期に分けて Aldolase B を時期特異的に KO することで、症状に与えるフルクトース代謝の効果を検討する。

4. 研究成果

1. マウスへのフルクトース負荷に対する肝臓の解析

先行研究より本研究部で作製した全身性の Aldolase B KO マウスにフルクトースを腹腔内投与した場合、急性の血糖低下が確認できている。本症状はヒト Aldolase B 欠損症と同じであった。

そこで、このフルクトース依存的な血糖低下への Aldolase B の酵素活性が必要であるかを確認するため、アデノウイルスで野生型および酵素活性欠失型の Aldolase B を肝臓に発現させ、フルクトース負荷試験を行った結果、血糖低下効果に Aldolase B の酵素活性が重要であることが明らかになった (図3)。これまでに、Aldolase B 欠損によるフルクトース負荷による血糖低下は上流の KHK 阻害により改善することが報告されており、我々の結果と照らし合わせると、フルクトース代謝産物のフルクトース 1リン酸の代謝不全が本

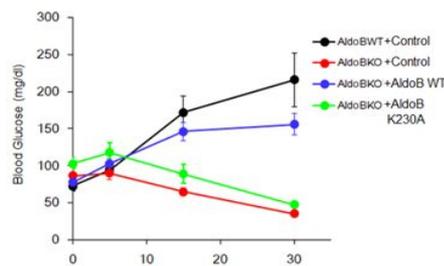


図3: AldoBWT, KOマウスへのフルクトース負荷試験のレスキュー実験

症状の原因と考えられた。同時に野生型、Aldolase Bノックアウトマウスにフルクトース負荷した時の肝臓のメタボローム解析を行った結果、実際にF1Pの劇的な増加がみられるとともに、複数の核酸代謝産物の増加や、多くのアミノ酸の増加を確認した。現在もこれらの意義について検討している。

2. 初代培養肝細胞を用いたフルクトース不耐症の解析

先行研究で、パーコール濃度を改良することでAldolase B KOマウスの肝臓から初代培養肝細胞の採取方法を確立した。そこで、野生型、Aldolase B KO初代培養肝細胞にフルクトース刺激をして、細胞内の変化を検討したところ、Aldolase B KOでは特異的に細胞内ATPの減少とAMPKの活性化がみられ、乳酸を基質とした糖産生も抑制された。この時細胞内のATP濃度を測定すると野生型と比べ顕著な減少がみられた。アデノウイルスにより野生型、機能欠損型のAldolase Bを発現させたところ、個体同様にそれらの効果にはAldolase Bの酵素活性が必要であることが

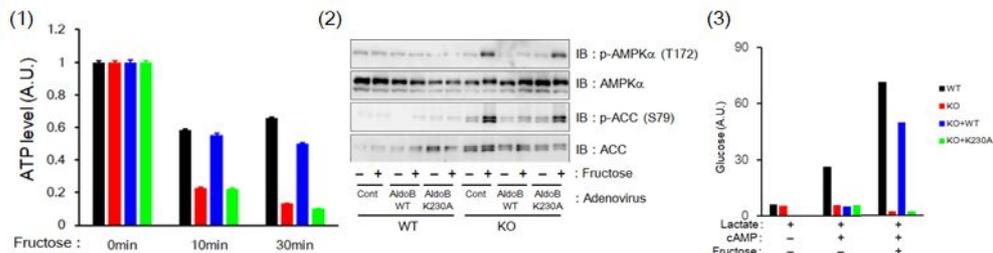


図4: AldoB WT, KOマウスより初代培養肝細胞を採取し、Adenovirus-Controlあるいは-AldoB(WT, K230A)を感染させ血清飢餓(16時間)後、Fructoseを添加後の、(1)細胞内ATP量、(2)細胞内シグナルをWestern Blotにて確認した。(3)同様に細胞を調整し、グルコースを含まない培地に糖新生基質として乳酸(20 mM)を加え、更にcAMPとFructoseを添加して6時間培養し、上清を採取してグルコース濃度を測定した。

分かった(図4: 1-3)。

次にAMPKの阻害剤を用いて糖新生への効果を検討したところ、AMPK阻害ではフルクトース依存性的な糖新生の阻害は抑制されなかった。そこで、細胞内で蓄積がみられたF1Pに標的分子の検討を行ったところ、Aldolase AがF1Pと結合することが分かった。更に、F1PはAldolase AおよびFBPase1の活性を濃度依存的に阻害された(図5)ことから、AldoB欠損におけるフルクトース負荷時の低血糖の一つの原因としてF1Pによる糖新生の阻害にあると考えられた。

3. Aldolase Bノックアウトマウスの解析

Aldolase B KOマウスの代謝表現型について解析を行った。フルクトース除去食飼育条件下で経口ブドウ糖負荷による耐糖能試験、インスリン皮下投与によるインスリン感受性試験、また肝糖新生能を皮下投与によるピルビン酸負荷試験、グリセロール負荷試験、グルカゴン負荷試験をそれぞれ行った(図6)。驚いたことに、Aldolase B KOマウスでは耐糖能が改善しており、初期血中インスリン値に変化がないことからインスリン感受性の改善が推測された。予想通り、インスリン感受性試験によりAldolase B KOマウスではインスリン感受性の改善がみられた。また、グルカゴン負荷試験では両群には大きな差が見られなかったが、糖新生基質を投与した場合においてAldolase B KOマウスでは血糖上昇が抑えられていた。この可能性として、Aldolase Bが糖新生の重要な酵素として機能すること、インスリン感受性の改善により糖新生が抑制されたこと、などが考えられた。また、絶食時肝臓における様々な遺伝子の発現をq-PCRにより確認したところ、Aldolase B KOマウスの肝臓では摂食時に発現が高い多くの遺伝子がコントロールに比べ高い発現を示していた。このことは、Aldolase B欠損により絶食肝においてもインスリン応答性遺伝子の発現が促進されていることを示唆するものであり、今後そのメカニズムを解析する予定である。

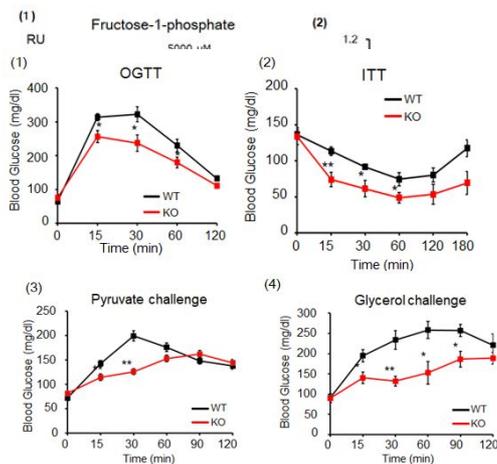


図6: AldolaseB KOマウスの各種負荷試験。(1) OGTT、(2) ITT、(3) PTT、(4) Glycerol ITT

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 満島勝、松川隼也、長沼孝雄、松本道宏
2. 発表標題 マウスモデルを用いた遺伝性果糖不耐症における果糖誘導性低血糖の分子機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------