

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660116

研究課題名(和文) タンパク質飢餓への適応と生存維持における肝臓セリン合成を介した臓器関連の分子機構

研究課題名(英文) Physiological roles of liver de novo serine biosynthesis in adaptation to protein starvation

研究代表者

古屋 茂樹 (FURUYA, Shigeki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00222274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、全身レベルでのタンパク質栄養の不足・飢餓に適応して生存を維持する応答機構における肝臓でのde novoセリン合成の必須性を、セリン合成酵素Phgdhの肝臓特異的なKOマウスを用いることで解明を目指した。de novoセリン合成系を担うリン酸化経路を構成する酵素Phgdh, Psat1およびPspの発現は、摂取するタンパク質の栄養状態に敏感に反応し、タンパク質飢餓の際には高レベルに誘導されることが知られている。この応答がタンパク質飢餓への適応と生存維持に果たす役割を、特に肝臓でのアミノ酸代謝恒常性と遺伝子発現反応、さらに腸管との臓器間機能連関を基軸に解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reveal the physiological role for de novo serine synthase in the liver in response to protein starvation. The enzymes Phgdh, Psat1 and Psp constituting the phosphorylated pathway responsible for de novo serine synthesis is shown to be induced substantially in the liver under a protein-starved nutritional condition. However, its physiological significance remains unexplored. In this study, using a liver-specific Phgdh KO mice, we examined effect of protein-free diet on metabolic homeostasis of amino acids including serine, gene/protein expression, and organ interaction, especially liver-intestine interaction.

研究分野：分子栄養学

キーワード：セリン Phgdh リン酸化経路 肝臓 小腸 KOマウス

## 1. 研究開始当初の背景

栄養飢餓への個体レベルでの適応・生存戦略を理解することは、現代においても重要な研究課題である。未だ発展途上国には約8億人にも及ぶ栄養失調に苛まれる人々が存在している (FAO report, 2013)。先進国においては高脂肪・高カロリー食による生活習慣病患者の増加が危惧される一方で、例えば我が国では急性/慢性疾患治療中にある高齢患者の低栄養状態は40%近くに及ぶとの試算があり、その治癒率、合併症発症率や死亡率に悪影響を及ぼし続けている。低栄養状態はタンパク質・エネルギー不足とタンパク質不足に大別されるが、現実にはその混合型が多い。低栄養状態に陥ると、ヒトを含む動物は代謝的な適応応答の発動により個体の生存維持を図り、肝臓、筋肉、脂肪組織などの協調によって生存維持に必要なエネルギーやアミノ酸等の代謝成分を作り出す。肝臓は低栄養状態への適応に重要な役割を果たし、無タンパク質/高炭水化物食をラット等に摂取させると速やかに肝臓のみでリン酸化経路として知られる *de novo* セリン合成系酵素の活性が劇的に上昇することが1970年代には既に報告されている。セリンはタンパク質合成の前駆体であるだけに留まらず、グリシンやシステイン等の他非必須アミノ酸の合成にも必要であり、さらにはグリセリン脂質やスフィンゴ脂質の合成、テトラヒドロ葉酸への1炭素供与等、生体構成分子の合成に必須のアミノ酸である。タンパク質欠乏時の肝臓特異的な *de novo* セリン合成経路の酵素誘導は、末梢組織での非必須アミノ酸不足を解消するための応答と理解されてきた。しかしこれまでに個体レベルでの飢餓に対する適応応答における肝臓特異的な *de novo* セリン合成経路の必要性は不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究は、タンパク質栄養の不足・飢餓に適応し生存を維持する個体応答機構における肝臓における *de novo* セリン合成の必要性を、主に肝臓と腸管の臓器連関を基軸に分子レベルで解明する事を目的としている。動物における *de novo* セリン合成は、リン酸化経路と呼ばれる解糖系中間体3ホスホグリセリン酸からの3段階の酵素反応によって担われる。肝臓はタンパク質栄養状態に敏感に応答する臓器であり、無タンパク質食の給餌によりリン酸化経路を構成する3つの酵素はいずれも高レベルに誘導される。そこでタンパク質栄養欠乏時における肝臓 *de novo* セリン合成の栄養生理学的意義を解明するために、リン酸化経路初発酵素である3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (Phgdh) を肝臓実質細胞特異的に不活性化させた *Phgdh* KO マウスに無タンパク質食を給餌し、その影響の表現型解析を行った。予備的検討から同 KO マウスへの無タンパク質食の給餌の継続により腸管機能の異常が誘発されるケースを見いだしていたため、特に全身レベルでのタンパク質飢餓時の肝臓-腸管の機能連関に着目した。また、肝臓は全身レベルの代謝恒常性の維持における中核的臓

器であるため、肝臓代謝機能を担う実質細胞での *Phgdh* 不活性化によるセリン合成欠損が、肝臓代謝機能にもたらす影響についても解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 肝臓実質細胞特異的 *Phgdh* KO マウスの作製

肝臓実質細胞特異的 *Phgdh* KO マウスは *Phgdh*<sup>fllox/fllox</sup> マウスにアルブミン遺伝子 (Alb) 制御下でDNA組み換え酵素Creを発現する *Alb-Cre* transgene を *Alb-Cre* TG マウスと交配することにより導入し、その後 *Phgdh* アリルを再度交配で *Phgdh*<sup>fllox/fllox</sup> にすることによって作製した。作製した肝臓実質細胞特異的 *Phgdh* KO マウス (*Alb-Cre:Phgdh*<sup>fllox/fllox</sup>) (以下 LKO マウスと略す) の生化学的特性について、同腹の *Phgdh*<sup>fllox/fllox</sup> 個体 (Floxed マウス) を正常対照として解析を行った。LKO マウスは胎生致死にならずに期待されるメンデルの法則に従って出生し、生後も成長遅滞等を含む外見上の異常な所見は認められなかった。

## (2) 無タンパク質食給餌

無タンパク質食 (カゼイン 0%, ショ糖 36.5%) (Test Diet 5765, PMI Nutrition International) および通常食 (カゼイン 21%, ショ糖 15%, メチオニン 0.15%) を 8~9 週齢の雄性 LKO マウスおよび Floxed マウスに給餌した。摂食量と体重を測定した。雄性野生型マウス (C57BL6) についても同様の実験を行った。なお本項目を所属機関における動物実験計画に申請した際に、全学動物実験委員会より開始時体重から20%の減少が生じた段階を人道的エンドポイントと設定して実験中止することが承認条件とされた。そのため無タンパク質給餌下で LKO マウスの体重変化を経時的に検討したところ、給餌後概ね2週間前後で体重が約20%低下に達し、腸管機能や生存率に顕著な影響や変化が現れる前に実験を中止しなくてはならないことが確定した。以後の実験では、この人道的エンドポイントまで無タンパク質食給餌を続け、肝臓、小腸ならびに他末梢臓器、および血液を採取してアミノ酸分析および遺伝子発現解析に供した。

## (3) 同マウスの生化学・分子生物学的的解析

無タンパク質食摂取による栄養介入を行わない通常の摂餌条件で飼育した LKO マウスおよび Floxed マウスについて *Phgdh* 遺伝子の発現およびインスリン/IGF 応答経路の構成分子や炎症反応関連因子について発現解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 肝臓実質細胞特異的 *Phgdh* 遺伝子不活性化によるアミノ酸代謝変化

まず LKO マウス肝臓における *Phgdh* 遺伝子不活性化を、ゲノム DNA の PCR により null アリルの存在を検出することによって確認した。また *Phgdh* mRNA を QRT-PCR 法により定量することで、肝臓全体で同腹 Floxed マウス (正常対照) に比べ 40% レベルに低下していることを確認した。さらにウエスタンブロット法によりタンパク質レベルでの量的変化を検討すると、Floxed マウス肝臓に対し 60% レベルの発現を維持していた。これらの結果は *Phgdh* が肝臓では実質細胞だけで無く非実質細胞においても発現しており、それを反映したものと判断した。

次に肝臓のアミノ酸分析を行う事で、*Phgdh* 不活性化のアミノ酸代謝への影響を評価した。通常の給餌条件で LKO 肝臓のアミノ酸分析を行うと遊離セリン含量は Floxed マウスとほぼ同レベルであり、量的低下を検出できなかった。他アミノ酸についても有意な変化を示す分子種は無かった。また血清中の遊離アミノ酸濃度を測定すると、セリンは Floxed マウスと同レベルであった。他アミノ酸で有意な変を示す分子種は無かった。このプロファイルより、LKO マウスにおいては他臓器からセリンが代償的に肝臓へ供給されている可能性が推定された。そのため肝臓以外の主な末梢臓器の遊離アミノ酸分析を行った。その結果、LKO マウス腎臓では Floxed マウスに比べ遊離セリン濃度が顕著 ( $p = 0.007$ ) に増加していることが明らかとなった。同じく筋肉を検討したところ、腓腹筋とヒラメ筋では増加傾向を示した。腎臓は *Phgdh* mRNA の発現レベルが筋肉より高いことが報告されており (Klomp et al, 2000), 今回のマウスのアミノ酸分析でも正常対照とした Floxed マウスでは腎臓のセリン含量は肝臓や腓腹筋よりも高値であった。さらに LKO マウス腎臓では *Phgdh* タンパク質も有意に ( $p < 0.05$ ) 増加していた。そのため LKO マウス腎臓での遊離セリン含量の顕著な増加は、一種の代謝的代償作用であり、LKO マウス肝臓実質細胞や血中での遊離セリンレベルの維持に貢献しているものと推定された。

(2) 無タンパク質食給餌後の分子表現型解析

上記 (1) による解析から LKO マウス肝臓や血中ではセリン欠乏状態になっていないことが明らかとなった。しかし無タンパク質食を摂餌した際の応答は、臓器相関や遺伝子/タンパク質発現も含め不明であったため、以後の解析を行った。無タンパク質食の給餌により、LKO, Flox, 野生型の体重は速やかに減少したが、各遺伝子型で減少量に有意な違いは認められず、11~14 日間の給餌で 20% 減少した。無タンパク質食の総摂食量についても各遺伝子型に違いは認められなかった。体重が 20% 減少した人道的エンドポイントに達した段階では下痢等の腸管機能異常を示す所見は得られなかった。アミノ酸分析から、野生型と Floxed マウスの肝臓においては通常食群の肝臓に比べ、遊離セリン濃度のそれ

ぞれ顕著な増加を認めたが、LKO マウスでは弱い増加であり、量的減少は観察されなかった。特筆すべき変化として、LKO マウスの無タンパク質食給餌群の肝臓では、グリシンが通常食群に比べ有意に減少していた。そのため、LKO マウス肝臓ではグリシンからセリンヒドロキシメチル転移酵素 (Serine hydroxymethyltransferase 1/2: Shmt1/2) によってセリンに変換することで、そのレベルを維持しているものと推定された。一方で小腸 (空腸) の遊離アミノ酸分析を行ったが、遊離セリン含量は全ての遺伝子型で無タンパク質食群と通常食群の間に有意な違いを認めず、セリン欠乏状態に陥っていないと判断された。グリシンについては、Floxed マウスの無タンパク質食群においてのみ有意な量的減少を見いだした。*Phgdh* mRNA レベルも各遺伝子型で摂餌条件による有意な違いは認められなかった。

この条件で、小腸の機能変化について、小腸幹細胞マーカーの発現量を比較することで上皮細胞の再生状態評価を試みた。具体的には古典的マーカーである Leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5 (*Lgr5*) に加え Pleckstrin homology like domain, family A, member 1 (*Phlda1*), および Olfactomedin 4 (*Olfm4*) (Zhang and Huang, 2013) の発現について検討した。しかし、結果としてはいずれの小腸幹細胞マーカーも、無タンパク質食給餌条件による LKO マウスおよび正常対照での小腸における発現量に有意な違いは認められなかった。

以上の結果を総合すると、肝臓は実質細胞で *Phgdh* を欠損した条件で無タンパク質食を摂取すると、グリシンから Shmt1/2 によりセリンを合成してそのレベルを維持していると推定された。肝臓実質細胞で *Phgdh* 遺伝子を不活性化しても、無タンパク質食摂食時には小腸のセリン含量は維持され、当初の予想とは異なり小腸幹細胞の増殖や分化に与える影響は少ないものと結論された。

(3) LKO マウス肝臓における他の分子変化

上記 (1) および (2) から、肝臓でのリン酸化経路による *de novo* セリン合成が低タンパク質栄養摂取時の小腸幹細胞再生機能へ寄与する可能性は低いことが明らかになった。一方で LKO マウスは加齢に伴い体重が増加するとの予備的知見を得ている。そこで LKO マウス肝臓内での分子変化についても平行して解析を進め、インスリン/IGF 応答経路の複数の構成分子についてリン酸化レベルの変化を見いだした。これらの翻訳後修飾変化はインスリン抵抗性の指標となっていることから、肝臓実質細胞での *Phgdh* 不活性化がインスリン抵抗性を惹起している可能性が示唆され

た。その上流分子機序についても検討を行い、炎症反応に応答する転写因子XおよびYのそれぞれ発現増加と活性化(リン酸化亢進)を見いだした。これらの結果を受けて、現在 LKO マウス肝臓内での炎症応答惹起の可能性について解析を進めている。

以上の(1)～(3)の成果について取りまとめており、英文原著論文作成を行っている。

#### 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 古屋 茂樹, 佐矢野 智子, 江崎 加代子, 個体発生と高次機能制御における *de novo* セリン合成の必須性. 特集「アミノ酸機能のニューパラダイム」, 生化学, 14, 372-381 (2014)  
[査読無]

[学会発表] (計 8件)

- ① 毛利 紳哉, 森安 一樹, 江崎 加代子, 田代 康介, 平林 義雄, 古屋 茂樹, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 29 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌市
- ② 森安 一樹, 江崎 加代子, 毛利 紳哉, 平林 義雄, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会第 9 回学術大会, 2015 年 10 月 24 日, 滋賀県立大学, 彦根市
- ③ 江崎 加代子, 佐矢野 智子, 赤木 巧, 吉川 武男, 平林 義雄, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会第 9 回学術大会, 2015 年 10 月 24 日, 滋賀県立大学, 彦根市
- ④ 毛利 紳哉, 江崎 加代子, 森安 一樹, 古屋 茂樹, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 2015 年 6 月 27 日, 北九州国際会議場, 北九州市
- ⑤ Shinya Mohri, Kayoko Esaki, Kazuki Moriyasu, Takashi Ichinose, Yasuhiro Shimizu, Yutaka Kawarabayashi, Yoshio Hirabayashi, Shigeki Furuya, Various metabolic changes caused by liver-specific *Phgdh* deletion in mice, 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), 2015 年 5 月 16 日, パシフィコ横浜, 横浜市
- ⑥ 森安 一樹, 江崎 加代子, 市瀬 嵩志, 毛利 紳哉, 平林 義雄, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会第 8 回学術大会, 2014 年 11 月 9 日, 東京農業大学, 世田谷区
- ⑦ 阿比留 舞子, 佐矢野 智子, 川野 裕輝, 古屋 茂樹, 日本アミノ酸学会第 8 回学術大会, 2014 年 11 月 9 日, 東京農業大学, 世田谷区
- ⑧ 阿比留 舞子, 佐矢野 智子, 有本 八潮, 古屋 茂樹, 日本農芸化学会西日本支部平成 26 年大会, 2014 年 9 月 19 日, 佐賀大学, 佐賀市

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~kinou/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 茂樹 (FURUYA, Shigeki)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 00222274

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )