

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 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780116

研究課題名（和文）アミノ酸による新たな脂肪細胞機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Study of a novel regulatory mechanism for the control of adipocyte functions by amino acids

研究代表者

後藤 剛（GOTO TSUYOSHI）

京都大学・生理化学研究ユニット・特定助教

研究者番号：10550311

研究成果の概要（和文）：

分岐鎖アミノ酸であるロイシンがインスリン非存在下において、脂肪細胞への糖取込みを抑制し、脂肪蓄積を抑制する一方、インスリン存在下では、脂肪細胞への脂肪酸取込みを亢進させることが明らかとなった。また、肥満モデルマウスに対するロイシン投与は糖質代謝改善作用を有することが示唆された。これらの結果より、ロイシンは生体の栄養状態に応じ、脂肪組織などに作用し、生体全体の代謝調節機能を担うことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the absence of insulin, leucine, one of branched-chain amino acids, suppresses triglyceride accumulation via the inhibition of glucose uptake in adipocytes, whereas it promotes the uptake of fatty acids in adipocytes in the presence of insulin. Moreover, the treatment for obese mice with leucine seems to improve the carbohydrate metabolism. These results indicated that leucine regulates whole body energy metabolism by the action on the organs, including white adipose tissue, depending on the nutrient state.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：食品機能，脂肪細胞，分岐鎖アミノ酸，ロイシン，肥満

1. 研究開始当初の背景

過栄養・運動不足に伴う脂肪組織の過剰蓄積はメタボリックシンドロームの発症基盤となり、その増加は世界的な健康問題となっている。過栄養の研究では、食餌性の脂質や

糖質に関心が向けられることが多いが、高カロリー食の摂取は、タンパク質摂取量の増加を来すことが多く、肥満状態では多くの血中アミノ酸レベルが変化することが知られている。脂肪組織を構成する脂肪細胞はアディ

ポサイトカインと総称される種々の生理活性物質の分泌を介し、生体の代謝調節において非常に重要な役割を担っている。アルギニンなど特定のアミノ酸摂取時に脂肪組織の遺伝子発現に変化が起こっていることが示唆されている。これらのアミノ酸摂取は血中アミノ酸レベルの変動を来し、直接脂肪細胞に作用している可能性があるが、アミノ酸と脂肪細胞機能に関する研究は少なく、未解明な部分が多かった。

2. 研究の目的

アミノ酸は糖質・脂質と並ぶ三大栄養素であるにも関わらず、従来の肥満研究において糖質や脂質に比べ目を向けられることが少なかった。本研究では、そのアミノ酸に着目し、アミノ酸が脂肪組織を構成する脂肪細胞の機能に与える影響について検討し、アミノ酸と脂肪組織機能の新たな接点を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養脂肪細胞を用いた、中性脂肪蓄積量の検討

培養脂肪細胞として、マウス由来の前駆脂肪細胞、3T3-L1 を分化誘導した細胞を用いた。3T3-L1 細胞に対し、常法に従い分化誘導処理 (dexamethasone, isobutylmethylxanthine, insulin 刺激) を行なった場合と、insulin 非添加な環境下で分化誘導処理 (dexamethasone, isobutylmethylxanthine 刺激) を行なった場合のそれぞれにおいて、中性脂肪蓄積量に対して、各アミノ酸添加が与える影響について検討した。

(2) 培養脂肪細胞を用いた、糖取込み能、脂肪分解活性の検討

3T3-L1 細胞における糖取込み能は、 $[^3\text{H}]$ ラベルした 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) の 10 分間の取込み量を評価した。脂肪分解活性は、20 時間の間に培養上清に放出される脂肪酸量により評価した。糖取込み能、脂肪分解活性とも細胞内のタンパク質量によって補正した。

(3) 培養脂肪細胞を用いた、脂肪酸代謝の検討

脂肪細胞の脂肪酸代謝に分岐鎖アミノ酸が与える影響について検討を行うため、250 μM の palmitic acid を含む脂肪酸高含有培地を用いて、検討を行なった。脂肪酸高含有培地下での中性脂肪蓄積量、および $[^{14}\text{C}]$ ラベルした palmitic acid の取込み能について評価し

た。

(4) 脂肪細胞エネルギー代謝関連遺伝子発現の検討

3T3-L1 細胞をインスリン添加、非添加条件下で分化誘導し、分岐鎖アミノ酸添加が、脂肪細胞において糖・脂質代謝に関わる遺伝子の発現に与える影響について評価した。遺伝子発現量は定量的 RT-PCR 方によって評価した。標的遺伝子の発現量は、内部標準である、36B4 遺伝子の発現量によって補正した。

(5) ロイシン摂取が肥満に伴う代謝異常症に与える影響の検討

肥満モデルマウスである KK-Ay マウス (6 週齢、雌) を、高脂肪食、および 2% ロイシン含有高脂肪食下で 35 日間飼育した。飼育開始 20 日目に糖負荷試験を行い、飼育開始 35 日目に屠殺、解剖し、各組織重量を測定した。

4. 研究成果

(1) 培養脂肪細胞を用いた、中性脂肪蓄積量の検討

種々のアミノ酸添加が 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪蓄積に与える影響について検討したが、インスリン存在下では、変化を来すアミノ酸は得られなかった。そこで、インスリン非添加条件にて再検討を行なった。その結果、分岐鎖アミノ酸の 1 種であるロイシン添加時に 3T3-L1 細胞の中性脂肪蓄積量が有意に低下することを見出した。このような作用は他の分岐鎖アミノ酸であるバリン、イソロイシンには認められなかった。ロイシン添加による中性脂肪蓄積抑制作用はロイシン濃度依存的であり、ロイシン濃度が 250 μM 程度より、作用が認められた。また、ロイシンによる中性脂肪蓄積抑制作用はインスリン添加濃度依存的に減少し、インスリン添加濃度が 75 ng/mL 以上ではその作用が認められなかった。また、インスリンシグナル経路に関与する因子として、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)、および PKC (protein kinase C) の関与について検討したところ、ロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用は、PKC 阻害剤 (GF109203X) の影響を受けなかったが、PI3K 阻害剤 (LY294002) の存在下では消失することが明らかになった。

(2) 培養脂肪細胞を用いた、糖取込み能、脂肪分解活性の検討

4-1. において認められたロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用について更に検討したところ、ロイシンはインスリン非存在下で、脂肪細胞の糖取込み能を低下させることが明

らかになった。ロイシンによる糖取込み抑制作用はインスリン存在下では認められなかった。この結果より、ロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用の一因として、糖取込みの抑制作用が寄与しているものと考えられた。さらに、脂肪細胞における脂肪分解活性に対するロイシンの作用を検討したが、ロイシン添加による脂肪分解活性の変化は認められなかった。

(3) 培養脂肪細胞を用いた、脂肪酸代謝の検討

ロイシンの中性脂肪蓄積抑制作用に対する脂質の関与について、脂肪酸高含有培地を用いて検討を行なった。興味深いことに、脂肪酸高含有培地での培養下では、インスリン非添加時のロイシンによる中性脂肪蓄積抑制作用は認められなかった。一方、インスリン存在下において、脂肪酸高含有培地での培養時にロイシンは脂肪細胞の中性脂肪蓄積を亢進させた。そこで、脂肪細胞における脂肪酸取込み能を検討すると、インスリン存在下においてのみ、ロイシン添加によって脂肪酸取込み能が増強されることが明らかとなった。以上の結果より、ロイシンは脂肪酸が豊富に存在するような条件下では、脂肪細胞において、脂肪酸取込みを誘導し、中性脂肪蓄積量を増大させることが示唆された。

(4) 脂肪細胞エネルギー代謝関連遺伝子発現の検討

ロイシンが脂肪細胞の糖・脂質代謝に影響することが示唆されたことから、ロイシン添加時の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現変化について検討を行なった。インスリン非存在下では、ロイシン添加による遺伝子発現の変化は認められなかったが、インスリン存在下では、インスリン依存的な糖輸送に関わる GLUT4 や細胞内の脂肪酸輸送に関与する aP2、VLDL からの脂肪酸取込みに関わる LPL、脂肪細胞から分泌される代表的なホルモンである leptin の発現量がロイシンによって亢進することが示された。ここでロイシンによる発現亢進が認められた遺伝子群はいずれも脂肪細胞分化に伴い発現が上昇することが知られる遺伝子であることから、ロイシンによって脂肪細胞分化過程が促進した可能性が考えられた。また、ロイシンによる aP2 遺伝子発現誘導は、PI3K 阻害剤の影響は受けず、PKC 阻害剤によって消失した。

(5) ロイシン摂取が肥満に伴う代謝異常症に与える影響の検討

ロイシン添加によって、脂肪細胞機能に変化が認められた。脂肪細胞は生体のエネルギー代謝において極めて重要な役割を担っているため、ロイシン摂取がエネルギー代謝に

与える影響について検討した。ここでは、肥満によって生じたエネルギー代謝の破綻状態に対するロイシンの作用を検討するため、肥満モデルマウスを用いた実験を行なった。肥満モデルマウスである KK-Ay マウスに対し、高脂肪食を負荷し、ロイシン摂取の影響を検討したところ、ロイシン摂取群において血糖値の低下、および耐糖能異常の改善が認められた。これより、ロイシンの摂取は、肥満に伴う代謝異常症に対し、有効であることが示唆された。一方で、脂肪組織重量や脂肪細胞サイズの変化は認められなかったため、本作用がロイシンの直接的な脂肪細胞に対する作用によるものかどうかについては、さらなる検討が必要であると考えられた。

以上のように、ロイシンは生体の栄養状態、エネルギー基質の状態に応じて、脂肪細胞機能を変化させることが示唆された。その作用はインスリンシグナル経路との深く関係していることが推察された。本実験で使用したロイシン濃度は、特定の食事摂取後の血中濃度として報告されている濃度の範囲内であり、ヒトの体内でも本研究で認められた現象が起こっている可能性は充分にある。今回の動物実験の成績のみでは判断できないが、脂肪細胞に対するロイシンの作用によって、肥満に伴う代謝異常症の予防・改善が成される可能性も考えられる。

本研究結果は、肥満に伴う生活習慣病の発症において重要な脂肪細胞機能が三大栄養素の一つであるアミノ酸によって制御されることを示したものであり、肥満に伴う代謝異常症の食餌による予防・改善戦略創出の一助となることが期待される。

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 4 件)

1. Goto T, Teraminami A, Lee JY, Ohyama K, Funakoshi K, Kim YI, Hirai S, Uemura T, Yu R, Takahashi N, Kawada T. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *J Nutr Biochem.* in press. DOI, 10.1016/j.jnutbio.2011.04.001 査読有

2. Goto T, Kim YI, Funakoshi K, Teraminami A, Uemura T, Hirai S, Lee JY, Makishima M, Nakata R, Inoue H, Senju H, Matsunaga M, Horio F, Takahashi N, Kawada T. Farnesol, an

isoprenoid, improves metabolic abnormalities in mice via both PPAR α -dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 301(5):E1022-E1032. DOI, 10.1152/ajpendo.00061.2011 査読有

3. **Goto T**, Nagai H, Egawa K, Kim YI, Kato S, Taimatsu A, Sakamoto T, Ebisu S, Hohsaka T, Miyagawa H, Murakami S, Takahashi N, Kawada T. Farnesyl pyrophosphate regulates adipocyte functions as an endogenous PPAR γ agonist. *Biochem J.* 2011 438(1):111-119. DOI, 10.1042/BJ20101939 査読有

4. **Goto T**, Lee JY, Teraminami A, Kim YI, Hirai S, Uemura T, Inoue H, Takahashi N, Kawada T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Lipid Res.* 2011 52(5):873-884. DOI, 10.1194/jlr.M011320 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. **後藤剛**、高橋信之、河田照雄 イソプレノイドによるエネルギー代謝調節機構 農芸化学会 2012 年度大会 京都女子大学 2012 年3月25日

2. 安芝英、**後藤剛**、高橋春弥、永井宏幸、金英一、高橋信之、河田照雄 *Phytol* およびその代謝物が糖・脂質代謝異常に及ぼす影響 農芸化学会 2012 年度大会 京都女子大学 2012 年3月24日

3. **後藤剛**、永井宏幸、江川香、金英一、加藤壮太、泰松暁、坂本智弥、恵比須省吾、方坂貴弘、高橋信之、河田照雄 ファルネシルニリン酸は内因性 PPAR γ アゴニストとして、脂肪細胞機能を調節する 第32回日本肥満学会 淡路夢舞台国際会議場 2011 年9月23日

4. **後藤剛**、堀田真由香、西田典久、長友暁史、松浦洋一、長岡利 ローズヒップポリフェノール (tiliroside) の腸管における糖質代謝改善作用機構の解析 第65回日本栄養・食糧学会大会 お茶の水女子大学 2011 年5月15日

〔図書〕(計1件)

1. **後藤剛**、李周容、高橋信之、河田照雄 日本臨牀社 日本臨牀 2011 年増刊号-メタボリックシンドローム (第2版):3.メタボリックシンドローム発症基盤としての脂肪細胞機能異常 1)脂肪細胞のライフサイクルとその

制御因子 p201-205 2011 年

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 剛 (GOTO TSUYOSHI)
京都大学・生理化学研究ユニット・特定助教
研究者番号: 10550311

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし