

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：12501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659147
 研究課題名（和文） アミノ酸による遺伝子制御

研究課題名（英文） Gene regulation by amino acids

研究代表者

瀧口 正樹 (TAKIGUCHI MASAKI)
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：40179578

研究成果の概要（和文）：夜行性のマウスを通常食にて飼育すると、休眠絶食期である明期に、肝臓において、アミノ酸からグルコースを合成する糖新生系が活性化される。今回、高タンパク質食にてマウスを飼育すると、糖新生系酵素の mRNA レベルが、通常食に比べ活動摂食期の暗期を中心に、上昇することを明らかにした。また、コルチコステロンの血中レベルには著変が認められなかったのに対し、グルカゴンは高タンパク質食の摂食期に顕著な上昇を示し、食餌アミノ酸に応答した糖新生系酵素遺伝子の活性化を媒介する液性因子の候補と考えられた。

研究成果の概要（英文）： In the liver of nocturnal mice fed on the standard diet, the gluconeogenic pathway, which synthesizes glucose from amino acids, is activated during the resting-fasting phase i.e. the light period. Here, we showed that in the liver of mice fed on high protein diets, compared to the standard diet, mRNA levels of gluconeogenic enzymes were increased during the acting-feeding phase i.e. the dark period. While corticosterone levels in the plasma showed no apparent change, glucagon increased prominently during the feeding phase of high protein diets, and was regarded as a candidate for the humoral factor that mediates the activation of gluconeogenic enzyme genes in response to dietary amino acids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖、分化、代謝、癌等の多様な生命現象において、アミノ酸濃度に応答した遺伝子発現の変動は重要な調節点である。アミノ酸はタンパク質の構成成分であるほか、核酸、グルコース、脂肪、ヘム、ホルモン、神経伝達物質など多様な生体物質の原料となる。また、それ自体、神経伝達物質であるなど様々な生理機能の調節物質として作用するが、細胞内アミノ酸濃度に応答した遺伝子発現調節機構は多くが

未解明である。

我々は、従来からオルニチンサイクル酵素遺伝子の転写調節機構の研究を行ってきた (Takiguchi, M. & Mori, M. 1995 *Biochem. J.* **312**, 649 に総説)。同サイクルは肝臓においてアミノ酸代謝により生じる有毒なアンモニアを尿素へと変換して解毒する代謝酵素系であり、5種類の酵素によって構成されている。早くも1962年 R. T. Schimke (*J. Biol. Chem.* **237**, 459) は、ラット体内にアミノ酸過剰をもたらす高タンパク質食が同酵素群を誘導

するとの当時驚異的な発見をした。我々は近年、マウス肝臓における遺伝子発現の日周リズムの解析を行い (Sakao, E. et al. 2003 *J. Biol. Chem.* **278**, 30450; Ishihara, A. et al. 2007 *J. Biol. Rhythms* **22**, 324; Matsumoto, E. et al. 2010 *J. Biol. Chem.* **285**, 33028), 高タンパク質食が夜行性マウスの活動摂食期に相当する暗期の後半にオルニチンサイクル酵素 mRNA を著しく誘導することを明らかにした (未発表)。このことは、アミノ酸はより直接的にオルニチンサイクル酵素遺伝子を活性化することを示唆するものと考えられた。

これに関連し、アミノ酸を原料としてグルコース合成を行う糖新生系酵素遺伝子の高タンパク質食による調節に関心が持たれた。一般に、アミノ酸からの糖新生の日周リズムは休眠絶食期 (昼行性のヒトでは暗期、夜行性のマウスでは明期) の後半に亢進する。ただし、これは通常食 (マウスでは概ね 25-30%タンパク質-55%糖質) を摂取した場合であり、60%タンパク質-20%糖質の様な高タンパク質-低糖質食を摂取した場合には、活動摂食期にもアミノ酸からの糖新生が活性化されると予想された。

2. 研究の目的

アミノ酸濃度に応答した遺伝子発現の調節機構の研究は長年月の歴史を有するにもかかわらず、今日まで解明に至らず非常に挑戦的な課題である。我々は、マウス肝臓のオルニチンサイクル酵素遺伝子の日周リズム性発現が高タンパク質食の摂食期に特異的に上昇することを明らかにした。アンモニア解毒系であるオルニチンサイクル酵素遺伝子は、アミノ酸に由来するアンモニアによる制御も受けている可能性があるのに対し、糖新生系酵素遺伝子の制御においては、グルコースの原料としてのアミノ酸の効果がより純粹に現れると考えられる。本研究は、糖新生系酵素遺伝子の日周性発現リズムに対する高タンパク質食の効果を調べ、さらにそれを媒介する液性因子の候補を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの飼育と実験は、千葉大学動物実験実施規程に準拠して行った。6週齢オス C57BL/6 マウスは日本クレアから購入した。同マウスを 12 時間 : 12 時間の明暗サイクル [点灯時を Zeitgeber time (ZT) 0 時、消灯時を ZT12 時と称する]、室温 24 ± 1 °C、通常食 [CE-2 (クレア) : 55%糖質, 5%脂肪, 28%タンパク質] 自由摂食下にて少なくとも 2 週間飼育した後、同食を継続、あるいは

種々の飼料を 1 週間与えた。無タンパク質固形食はクレアに依託調製した。15%大豆タンパク質食、60%大豆タンパク質食、60%ミルクカゼイン食は以下の様に調製した : 60 °C の水に澱粉を溶解してペースト状にし、これに等の他の成分を加えてパテ状にして整形、固化させた。

各種食餌にて 1 週間飼育し、4 時間ごと (ZT 3, 7, 11, 15, 19, 23 時) に各 3 匹のマウスから肝臓を採取した。全 RNA を、酸-グアニジンチオシアネート-フェノール/クロロホルム法または TRIzol 試薬 (Invitrogen Corporation) を用いて調製し、以下の様にノザン解析に供した。RNA を、ホルムアルデヒド変性アガロース (1%) ゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンにブロットした。ジゴキシゲニン標識 RNA プローブは、各 cDNA クローンを鋳型として試験管内転写キット (Roche Diagnostics) を用いて合成した。ハイブリダイゼーション、洗浄、化学発光検出は、Roche Diagnostics 推奨のプロトコールに準拠した。

肝臓採取時に同時に、EDTA を血液凝固防止剤としてマウス腹部大静脈より採血を行い、遠心分離により血漿を調製した。血漿中のグルカゴン、インスリンを Bio-Plex サスペンションビーズアレイキット (Bio-Rad)、コルチコステロンを ELISA キット (Assaypro) を用いて測定した。

4. 研究成果

マウスを 12 時間 : 12 時間の明暗サイクル、各種食餌自由摂食条件下にて 1 週間飼育後、4 時間ごと (ZT 3, 7, 11, 15, 19, 23 時) に肝臓を採取し、糖新生系の律速酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、最終段酵素 glucose 6-phosphatase (G6Pase) およびアミノ酸から炭素骨格を産出する tyrosine aminotransferase (TAT) の mRNA レベルの変動を調べた。通常食、無タンパク質食、低タンパク質食 (15%大豆タンパク質食) に比べ高タンパク質食 (60%大豆タンパク質食あるいは 60%カゼイン食あるいは) では摂食期 (暗期 ZT15, 19, 23 時) を中心に、いずれの mRNA レベルにも明らかな上昇が見られた。

また、同様の 4 時間ごとに腹部大静脈より採血し、糖新生を活性化するホルモンの血中レベルの変動を調べたところ、コルチコステロンでは著変が認められなかったのに対し、グルカゴンでは高タンパク質食の摂食期に顕著な上昇が見られた。一方、糖新生を抑制するインスリンでは、無タンパク質食で全日にわたる顕著な低下が見られた以外には、糖新生系酵素 mRNA レベルの変動を説明する明らかな変化は認められなかった。従って、グルカゴンが食餌アミノ酸に応答した糖新

生系酵素遺伝子の活性化を媒介する液性因子の有力な候補であると考えられた。

今後、高タンパク質食による肝臓での糖新生系酵素遺伝子の活性化が、主にグルカゴンの効果で説明しうるか否か、さらに、これと協調して、肝細胞におけるアミノ酸濃度の上昇等が寄与するか否か、等の検討が課題である。

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) Matsutani, T., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Oide, T., Kunimatsu, M., Saeki, N., and Iwadate, Y. Autologous antibody to src-homology 3-domain GRB2-like 1 specifically increases in the sera of patients with low-grade gliomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, art. no. 85 (2012) doi:10.1186/1756-9966-31-85 査読有
- (2) Hiwasa, T., Utsumi, T., Yasuraoka, M., Hanamura, N., Shimada, H., Nakajima, H., Kitagawa, M., Iwadate, Y., Goto, K.I., Takeda, A., Ohtsuka, K., Ariga, H., and Takiguchi, M. Functional similarity of anticancer drugs by MTT Bioassay. *J. Cancer Sci. Therapy* **3**, 250-255 (2011) 査読有
- (3) Kagaya, A., Shimada, H., Shiratori, T., Kuboshima, M., Nakashima-Fujita, K., Yasuraoka, M., Nishimori, T., Kurei, S., Hachiya, T., Murakami, A., Tamura, Y., Nomura, F., Ochiai, T., Matsubara, H., Takiguchi, M., and Hiwasa, T. Identification of a novel SEREX antigen family, ECSA, in esophageal squamous cell carcinoma. *Proteome Sci.* **9**, art. no. 1477 (2011) doi:10.1186/1477-5956-9-31 査読有
- (4) Nabeya, Y., Suzuki, T., Furuya, A., Koide, N., Ohkoshi, M., Takiguchi, M., Ochiai, T., Matsubara, H., and Hiwasa, T. Calpain regulates thymidylate synthase-5-fluoro-dUMP complex levels associated with response to 5-fluorouracil in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* **102**, 1509-1515 (2011) 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 日和佐 隆樹 (発表者), 張 曉萌, 薦田 操, 瀧口 正樹, 森 雅裕, 鵜沢 顕之, 武藤 真弓, 桑原 聡, 竹本 稔, 小林 一貴, 横手 幸太郎, 青墳 章代, 和田 猛, 吉川 由利子, 片山 薫, 町

田 利生, 土居 洋文, 工藤 孝, 中村 利華, 富吉 郷, 新免 奈津子, 吉田 涼, 太田 優子, 黒田 英行, 脳梗塞と糖尿病の診断に有用な血清抗体マーカーの同定, 第35回日本分子生物学会年会, 2012.12.14, 福岡

- ② 日和佐 隆樹 (発表者), 劉 天玲, 島田 英昭, 松原 久裕, 瀧口 正樹, アルファライザ法による食道癌 SEREX 抗原の再評価, 第85回日本生化学会大会, 2012.12.16, 福岡
- ③ 日和佐 隆樹 (発表者), 國松 己歳, 伊藤 舞, 小越 朱根, 張 曉萌, 町田 利生, 中村 利華, 富吉 郷, 新免 奈津子, 吉田 涼, 太田 優子, 黒田 英行, 瀧口 正樹, 脳梗塞関連ペプチドアレイ法を用いた動脈硬化血清抗体マーカーの探索, 第84回日本生化学会大会, 2011.9.24, 横浜

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: 整長 cDNA 由来両鎖 cRNA サブトラクション方法

発明者: 瀧口 正樹, 岩瀬 克郎, 大塚 里子, 坂尾 詠子, 宮内 修

権利者: 瀧口 正樹, 岩瀬 克郎

種類: 特許

番号: 特許第 5048915 号

取得年月日: 2012 年 7 月 27 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/seika1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧口 正樹 (TAKIGUCHI MASAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 40179578

(2) 連携研究者

松本 絵里子 (MATSUMOTO ERIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・技術職員

研究者番号: 20422256

(3) 研究協力者

岩瀬 克郎 (IWASE KATSURO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 80322030

(4) 研究協力者

大平 綾乃 (OOHIRA AYANO)

千葉大学・大学院医学研究院・技術補佐員

(5) 研究協力者

有田 恵美子 (ARITA EMIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・技術補佐
員

(6) 研究協力者

平良 暁子 (TAIRA AKIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・博士課程
大学院生