

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450157

研究課題名(和文) 可欠アミノ酸の代謝要求量と de novo 合成に関する研究

研究課題名(英文) Studies of metabolic demands and de novo synthesis of dispensable amino acids

研究代表者

金本 龍平 (Ryuhei, Kanamoto)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70147297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：可欠アミノ酸の代謝要求量と de novo 合成の関係を明らかにする事を目的に、de novo 合成の必須性が明らかにされているセリンに着目し、様々な臓器におけるセリン濃度とセリン合成の律速酵素である PHGDH の発現を異なる栄養状態と糖尿病ラットにおいて解析した。その結果、セリン濃度に最も大きく影響するのはタンパク質栄養であることが示された。また、糖尿病ラットでは血漿、肝臓、腎臓のセリン濃度が顕著に減少した。一方、PHGDH は解析した全ての臓器で発現しており、肝臓、小腸、筋肉ではタンパク質栄養に応答し変動するが、PHGDH の発現量と臓器のセリン濃度との相関は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Serine is a typical dispensable amino acid and known essentiality of its de novo synthesis. To clarify the metabolic demand of dispensable amino and its de novo synthesis, serine concentration and expression of PHGDH, the rate limiting enzyme of serine synthesis, was determined in several tissues of rat under different nutritional conditions and diabetes. The result shows that the protein nutrition most significantly affected the serine concentrations in tissues and plasma. It is found that serine concentration of liver, intestine and muscle was significantly decreased in diabetes rat. PHGDH was demonstrated to express ubiquitously in tissues investigated and the expression in liver, intestine and muscle was changed in response to protein nutrition. However, the clear relation between the expression of PHGDH and serine concentrations of tissues was not demonstrated.

研究分野：農学

キーワード：可欠アミノ酸 セリン合成 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 タンパク質栄養 タンパク質必要量
組織特異的発現 ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 可欠アミノ酸は体内で合成されるため必ずしも食事から摂取する必要の無いアミノ酸と定義されるが、この定義は小動物の成長を指標として定められたものであり、疾病や加齢、ストレス状態など様々な生理状態において生体の機能を十分に発揮出来る要求量を賄うだけの合成能力があるのか否かについて信頼できる情報はほとんど無い。また、各組織への供給がどのようになされているかについても研究されていない。本研究は、可欠アミノ酸を「必須性でないがゆえに必須である」、つまり、食餌からの供給によってその代謝要求量を満たせないアミノ酸、食餌からの供給に依存できないアミノ酸と言う概念から捉え、証明しようとするものであり、これにより可欠アミノ酸研究に新たな展開が期待できる。

(2) 近年、がん細胞にセリン合成の律速酵素である 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (PHGDH) の増幅が認められることや、破骨細胞の分化にセリンの de novo 合成が必須であることが報告され、これをターゲットとした治療法や食餌療法などの開発が期待される。様々な生理状態において可欠アミノ酸の組織特異的な代謝要求量や供給形態が明らかになれば、このような療法に必須の基本情報を与えるだけでなく、生活環境や加齢などによる生理状態の変化に即した、可欠アミノ酸の健康維持・増進への利用が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 私たちは成長期ラットと成熟ラットを用いたタンパク質必要量に関する研究から、ラット肝臓でセリン合成の律速酵素である 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (PHGDH) やセリンを分解するセリン脱水素酵素 (SDH) がタンパク質必要量を境に切り替わり、必要量以上では抑制され、必要量以下の低タンパク質栄養状態では顕著に誘導されることを見出している (金本龍平 他、アミノ酸研究 (2008)、2、131-136) そこで、本研究では他の臓器における PHGDH の発現とタンパク質必要量との関連を明らかにする事を目的とした。

(2) セリンは解糖系の中間代謝物である 3-ホスホグリセリン酸から合成される。そこで、低糖質食 (高脂肪食) を与え、タンパク質以外の他のマクロ栄養素が可欠アミノ酸代謝に及ぼす影響を明らかにする事を目的に、各組織における PHGDH 発現とセリンを始め組織アミノ酸含量を検討した。

(3) さらに、タンパク質含量の異なる低糖質食を与え、低糖質食におけるタンパク質栄養の影響も検討した。

(4) 疾病が可欠アミノ酸代謝におよぼす影響を明らかにする事を目的に、病態モデルとしてストレプトゾトシン投与による 1 型糖尿病

ラットを作成し、各組織におけるアミノ酸濃度と PHGDH の発現を検討した。

3. 研究の方法

(1) ラットの飼育

5 週齢あるいは 6 ヶ月齢の SD 系雄ラット (日本 SLC) を用いた。ラットは個別にゲージに入れ、明暗サイクル 12 時間 (08:00-20:00)、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 恒温の条件で飼育した。基本飼料の組成は 1kg 当たりカゼイン 240g、コーンスターチ 600g、コーンオイル 50g、ミネラル混合 50g、ビタミン混合 10g、セルロース 50g である (カロリー%でタンパク質 25%、炭水化物 63%、脂質 12%となる)。低炭水化物食 (高脂肪食) を調製するときはラードを用いた。なお、タンパク質および炭水化物含量の表示はカロリー%を用いた。

予備飼育を基本飼料を用い 3 日間行った後、それぞれの実験食に切り替え 10 日間飼育した。イソフルラン麻酔下で開腹し大静脈より採血した後、放血死させ各種臓器を採取した。血液から血漿を調製し、採取した臓器ともども解析に供するまで -80°C で保存した。

(2) 糖尿病ラットの作成。

10 週齢のラットにストレプトゾトシン (50mg/kg) を尾静脈に投与し基本食で 10 日間飼育した後、尾静脈より採血し血糖値を測定した。血糖値が 500mg/dl 以上のラットから試料を採取し解析した。採取した試料は解析に供するまで -80°C で保存した。

(3) 試料の解析

① PHGDH および SDH の mRNA 発現量は PCR 法で、タンパク質発現量はウェスタンブロット法を用い、既報の方法に従って行った (Yoshimura R, Kanamoto R et.al, J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 61:441-448, 2015)。なお、PCR ではアクチンの発現量を、ウェスタンブロットではグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 発現量を内部標準として用い、それぞれの発現量を補正した。ウェスタンブロットのバンドは蛍光イメージアナライザーで定量化した。

② アミノ酸分析は血漿および臓器ホモジネートに、当量の 10% トリクロロ酢酸を加え遠心により除タンパクした上澄みを、遠心濃縮機で減圧乾固した後、フェニルイソチオシアネートを用いてアミノ酸をフェニルイソチオカルバニル誘導体とし、逆相 HPLC にて分析した。

4. 研究成果

(1) タンパク質栄養が各種臓器における PHGDH の発現および影響
5 週齢のラットにカゼイン含量 6、25、50% (カロリー%) の餌を与え 10 日間飼育したラットの各種臓器における PHGDH の mRNA とタンパク質発現量を図 1 に示す。図から mRNA 発現量

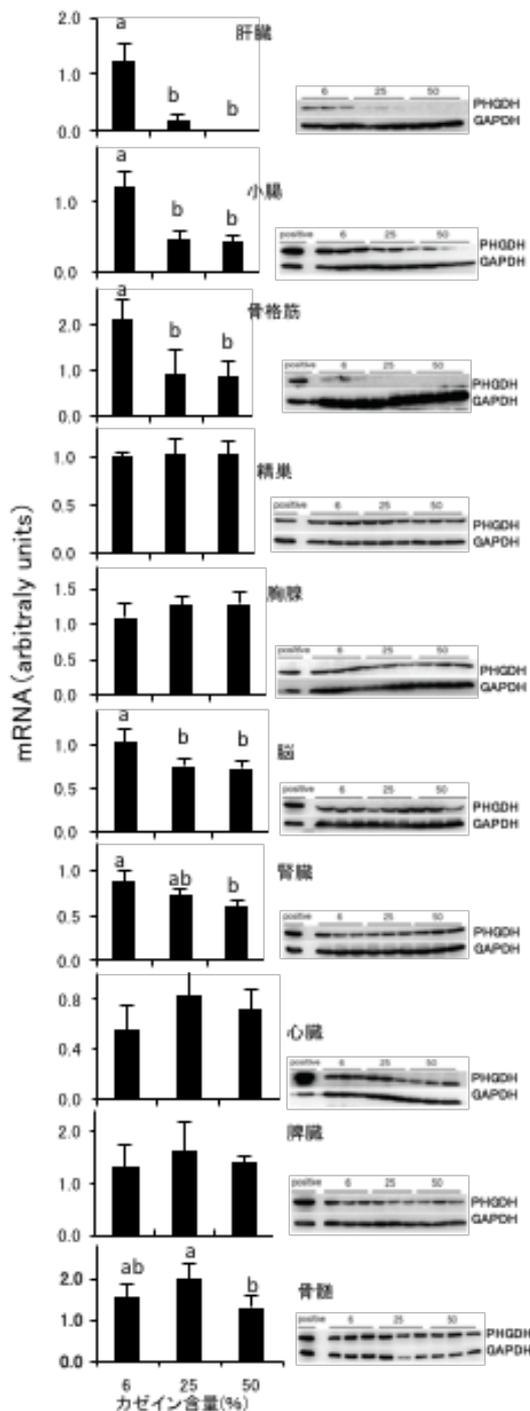


図1 カゼイン含量が6, 25, 50%の食餌で10日間飼育したラットの各種臓器におけるPHGDH mRNAとタンパク質発現量

とタンパク質発現量は、ほぼ一致していることが示された。解析した臓器のうち骨格筋と小腸が肝臓と同様にタンパク質栄養に応答して必要量以上のタンパク質食でその発現が抑制されるが、他の臓器はタンパク質栄養の影響を受けないことが明らかとなった。また、ここでは示していないがウェスタンブロットのバンドを蛍光イメージアナライザーで定量し、6%タンパク質食で飼育したラットの肝臓での PHGDH タンパク質発現量 (図では positive と示している) と比較すると、骨格筋における発現量は 1/20 と最も低く、精巣と

骨髄はおよそ 1.5 倍と高い発現量を示した。その他の臓器は 0.4~0.8 倍であった。なお、同様の実験を 6 ヶ月齢のラットを用いて行った。6 ヶ月齢のラットのタンパク質必要量は 10%カゼイン食で満たされるため、カゼイン含量 3, 10, 25% の食餌を与え解析した。その結果は 5 週齢ラットと同様に肝臓、小腸、骨格筋の発現はタンパク質必要量に応じて変化するが、他の臓器はタンパク質栄養の影響を受けないことが示された。

(2) アミノ酸代謝に及ぼす低糖質食 (高脂肪食) 摂取の影響

① セリンを始め可欠アミノの炭素骨格は糖代謝の中間代謝物質より供給されるため、食餌のカゼイン含量を 25% に固定し、糖質含量を 63% の基本食と 5% の低糖質食を与えて飼育し、各組織の PHGDH 発現量と肝臓の SDH 発現量、および各組織のアミノ酸含量を解析し、その影響を解析した。

摂取エネルギー量と体重増加量は基本食と低糖質食で差はなかったが空腹時の血糖値は低糖質食でむしろ高値を示し (156 ± 4mg/dL vs. 174 ± 4mg/dL, P<0.05), 副睾丸脂肪重量も増加していた (1.22 ± 0.12g vs. 1.57 ± 0.12g, P<0.05)。

表 1 に血漿と各組織の総アミノ酸濃度と不可欠、可欠アミノ酸の割合を示す。総アミノ酸濃度は低糖質食の影響は殆ど受けないが、血漿と脾臓では不可欠アミノ酸の割合が増加し可欠アミノ酸の割合が減少していた。

表1 低糖質食 (5%) で飼育したラットの血漿 (上段) および組織の総アミノ酸濃度と不可欠、可欠アミノ酸濃度の割合 (下段)

	Indispensable		Dispensable		Total	
	63%	5%	63%	5%	63%	5%
	(μmol/L)					
	39 ± 0	43 ± 0*	61 ± 0	57 ± 0*	2200 ± 0	2200 ± 100
	Indispensable		Dispensable		Total	
	63%	5%	63%	5%	63%	5%
	(μmol/kg)					
Pancreas	18 ± 0	21 ± 0*	82 ± 0	79 ± 0*	18500 ± 900	21100 ± 1000
Liver	25 ± 1	27 ± 1	75 ± 1	73 ± 1	20200 ± 2600	18300 ± 100
Spleen	22 ± 1	22 ± 0	78 ± 1	78 ± 0	16300 ± 900	15200 ± 600
Kidney	31 ± 0	31 ± 1	69 ± 0	69 ± 1	88100 ± 9400	80400 ± 8700
Fat	29 ± 3	31 ± 1	71 ± 3	69 ± 1	1700 ± 500	1100 ± 200
Testis	23 ± 0	23 ± 0	77 ± 0	77 ± 0	12400 ± 1800	13700 ± 600
Intestine	30 ± 1	30 ± 2	70 ± 1	70 ± 2	21600 ± 3800	20800 ± 3700
Muscle	24 ± 1	25 ± 1	76 ± 1	75 ± 1	37900 ± 2500	34000 ± 5300
Brain	22 ± 1	22 ± 3	78 ± 1	78 ± 3	19600 ± 2000	21000 ± 1100

(*p<0.05, two-tailed Student's t-test)

また、各組織における PHGDH の発現 (図 2) とセリン濃度 (表 2) に変化は見られなかった。このことからタンパク質を必要量摂取していれば少なくとも 5% という低糖質でも臓器におけるアミノ酸のホメオスタシスはほぼ維持されることが示唆される。

ところで SDH は健康時には殆どその発現は見られないが、飢餓および糖尿病時に肝臓と腎臓に特異的に誘導され、肝臓では高タンパク質摂取時にも誘導されることが知られており糖新生に関与していると考えられている。

表2 低糖質食 (5%) で飼育したラットの血漿 (上段) および組織 (下段) のセリン濃度

	Carbohydrate(calorie%)	
	63%	5%
	(μmol/L)	
Plasma	122 ± 4	130 ± 11
	(μmol/kg)	
Pancreas	518 ± 30	614 ± 122
Liver	571 ± 106	435 ± 106
Spleen	531 ± 34	530 ± 12
Kidney	6139 ± 722	5540 ± 655
Fat	87 ± 40	63 ± 12
Testis	267 ± 60	267 ± 4
Intestine	931 ± 277	916 ± 261
Muscle	1183 ± 98	1357 ± 380
Brain	508 ± 38	537 ± 114

(*p<0.05, two-tailed Student's t-test)

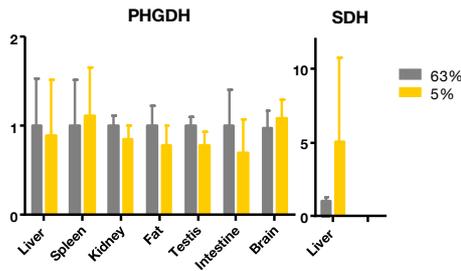


図2 低糖質食 (5%) で飼育したラットの各種臓器におけるPHGDH mRNAと肝臓におけるSDH mRNAの発現量

興味深いことに今回低糖質時にも肝臓で誘導されることが示された (図 2)。しかし、上述の生理状態では数十倍誘導されるのに対し 7 倍程度なので生理的影響は大きくないと考えられるが、血糖値が上昇し血漿の可欠アミノ酸が減少していることを考え合わせると低糖質時でタンパク質が必要量を満たしていれば、糖新生が更新されることを示唆している。一方、摂取するタンパク質量が同じにもかかわらず血漿の不可欠アミノ酸濃度が増加し、またエネルギー摂取量が同じであるにもかかわらず脂肪組織重量が増加することを考えるとタンパク質の利用効率が減少し、アミノ酸の一部が体タンパク質合成に用いられず脂肪合成に用いられていることを示唆している。

② 低糖質摂取時のタンパク質栄養の影響を検討するために糖質含量 5%の低糖質食にカゼイン含量が 6%と 50%となる食餌を与えて飼育し、各組織の PHGDH 発現量と肝臓の SDH 発現量、および各組織のアミノ酸含量を解析し、その影響を解析した。

50%カゼイン食の摂食量と体重増加量は基本食とほぼ同じであったが、6%カゼイン食では摂食量は基本食の 86%と減少し、体重は僅かに増加するもののほぼ変化しなかった。また血糖値は 50%カゼイン食では 181 ± 6mg/dL と有意に高く糖新生の亢進が示唆された。

一方、総アミノ酸濃度は肝臓では 6%カゼイン食に比べ 50%カゼイン食で低くなったが血漿を含め他の臓器では差は認められなかった。また、不可欠アミノ酸の割合は血漿、肝臓、脾臓、精巣で 6%カゼイン食に比べ 50%カゼイン食で高くなったが、膵臓では低くなった (表 3)。

肝臓での PHGDH と SDH の発現はすでに報告したように PHGDH は低タンパク質で、SDH は

表3 低糖質食のタンパク質含量 (6%および50%) がラットの血漿 (上段) および組織 (下段) の総アミノ酸濃度と不可欠、可欠アミノ酸濃度の割合におよぼす影響

	Indispensable		Dispensable		Total	
	6%	50%	6%	50%	6%	50%
	(μmol/L)					
Plasma	39 ± 0	46 ± 1*	61 ± 0	54 ± 1*	1800 ± 0	1900 ± 200
	(μmol/kg)					
Pancreas	20 ± 1	17 ± 1*	80 ± 1	83 ± 1*	19300 ± 800	19600 ± 2000
Liver	20 ± 1	25 ± 1*	80 ± 1	75 ± 1*	22000 ± 600	18500 ± 1300*
Spleen	22 ± 0	24 ± 0*	78 ± 0	76 ± 0*	14900 ± 300	15800 ± 1400
Kidney	28 ± 1	30 ± 1	72 ± 1	70 ± 1	64800 ± 7700	60700 ± 7700
Fat	29 ± 2	30 ± 0	71 ± 2	70 ± 0	1000 ± 100	1000 ± 100
Testis	19 ± 0	21 ± 1*	81 ± 0	79 ± 1*	11700 ± 1600	11500 ± 600
Intestine	29 ± 2	30 ± 4	71 ± 2	70 ± 4	19300 ± 3600	23100 ± 3200
Muscle	25 ± 1	27 ± 1	75 ± 1	73 ± 1	28600 ± 1600	29400 ± 700
Brain	21 ± 3	19 ± 2	79 ± 3	81 ± 2*	19000 ± 2700	19800 ± 1000

(*p<0.05, two-tailed Student's t-test)

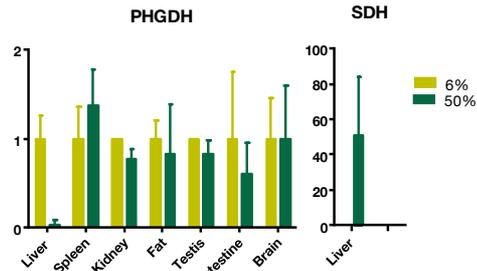


図3 低糖質食のタンパク質含量 (6%および50%) がラットの各種臓器におけるPHGDH mRNAと肝臓におけるSDH mRNAの発現量におよぼす影響

表4 低糖質食のタンパク質含量 (6%および50%) がラットの血漿 (上段) および組織 (下段) のセリン濃度におよぼす影響

	Protein(calorie%)	
	6%	50%
	(μmol/L)	
Plasma	247 ± 9	86 ± 8*
	(μmol/kg)	
Pancreas	1362 ± 65	492 ± 36*
Liver	2897 ± 462	388 ± 99*
Spleen	926 ± 17	527 ± 29*
Kidney	5128 ± 580	4199 ± 637
Fat	85 ± 8	52 ± 1*
Testis	319 ± 49	205 ± 4
Intestine	1167 ± 45	1261 ± 12*
Muscle	2400 ± 162	733 ± 125*
Brain	768 ± 283	640 ± 273

(*p<0.05, two-tailed Student's t-test)

高タンパク質で顕著に誘導される。一方、他の臓器における PHGDH の発現はタンパク質栄養によって影響されなかった (図 3)

血漿および臓器におけるセリン酸濃度は、小腸を除き血漿と解析した臓器のほとんどで、6%カゼイン食に比べ 50%カゼイン食で減少していた (表 4)。特に血漿、肝臓、筋肉で顕著な減少が見られた。肝臓での減少は PHGDH の発現抑制と SDH の発現誘導と見かけ上一致するが他の臓器では PHGDH の発現との相関は認められなかった。これら遺伝子の発現変動が各組織のセリン濃度とどのように関連するのか本実験では明らかではないが、殆どの臓器で総アミノ酸濃度が変化しないこと、アミノ酸のなかでセリン濃度が多く臓器で顕著に変化することから、セリンがタンパク質栄養の変化に対応してアミノ酸ホメオスタシスを維持するために中心的な役割を果たしているのではないかと推察される。

(3) 糖尿病ラットの解析

表5に血漿と各組織の総アミノ酸濃度と不可欠、可欠アミノ酸の割合を示す。血漿、肝臓、

表5 糖尿病ラットの血漿（上段）および組織の総アミノ酸濃度と不可欠、可欠アミノ酸濃度の割合（下段）

	Indispensable		Dispensable		Total	
	Control	Diabetes	Control	Diabetes	Control	Diabetes
	(%)				(μmol/L)	
Plasma	37 ± 1	38 ± 3	63 ± 1	62 ± 3	2200 ± 100	1800 ± 100 *
	Indispensable		Dispensable		Total	
	Control	Diabetes	Control	Diabetes	Control	Diabetes
	(%)				(μmol/kg)	
Pancreas	12 ± 1	8 ± 2*	88 ± 1	92 ± 2*	19100 ± 2200	18300 ± 1700
Liver	24 ± 1	35 ± 2*	76 ± 1	65 ± 2*	24900 ± 2100	19100 ± 700*
Spleen	14 ± 1	12 ± 1*	86 ± 1	88 ± 1*	23400 ± 1700	22500 ± 1000
Kidney	32 ± 2	24 ± 5*	68 ± 2	76 ± 5*	45300 ± 4300	27600 ± 6000*
Fat	25 ± 4	19 ± 2*	75 ± 4	81 ± 2*	700 ± 0	1100 ± 400
Testis	12 ± 1	11 ± 1	88 ± 1	89 ± 1	14400 ± 1700	14400 ± 1100
Intestine	27 ± 3	28 ± 3	73 ± 3	72 ± 3	17800 ± 2200	15700 ± 1800
Muscle	16 ± 2	13 ± 2*	84 ± 2	87 ± 2*	16500 ± 2700	16500 ± 1600
Brain	24 ± 3	24 ± 2	76 ± 3	76 ± 2	20600 ± 1600	20700 ± 1500

(*p<0.05, two-tailed Student's t-test)

腎臓の総アミノ酸濃度は糖尿病で顕著に減少したが、その他の臓器では変化しなかった。しかし、脾臓、膵臓、腎臓、脂肪組織、筋肉では不可欠アミノ酸の割合が減少した。データには示していないが、興味深いことに小腸、精巣、脳の各アミノ酸濃度は糖尿病時においても全くと言って良いほど変化しなかった。図4に各組織のPHGDH mRNA量と肝臓と腎臓に

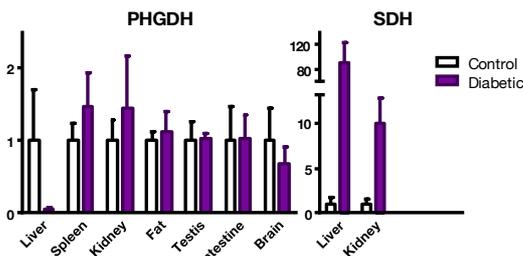


図4 糖尿病ラットの各種臓器におけるPHGDH mRNAと肝臓と腎臓におけるSDH mRNAの発現量

におけるSDH mRNA量を示す。PHGDHのmRNA発現量は肝臓で減少したが他の組織での変化は見られなかった。しかし、基本食におけるPHGDHの発現は低タンパク質食にくらべて著しく低い（図1参照）この変化がもたらす生理的影響は、あまり大きくないと考えられる。一方、肝臓と腎臓のSDHの発現はそれぞれ90倍、10倍と著しく亢進しこれまでの知

表5 糖尿病ラットの血漿（上段）および組織（下段）のセリン濃度

	Control	Diabetes
	(μmol/L)	
Plasma	188 ± 33	149 ± 26*
	Control	Diabetes
	(μmol/kg)	
Pancreas	732 ± 179	536 ± 180
Liver	1128 ± 424	329 ± 73*
Spleen	872 ± 105	779 ± 72
Kidney	2386 ± 113	1369 ± 392*
Fat	51 ± 31	56 ± 22
Testis	332 ± 53	300 ± 42
Intestine	836 ± 115	812 ± 135
Muscle	633 ± 158	675 ± 82
Brain	775 ± 125	724 ± 105

(*p<0.05, two-tailed Student's t-test)

見と考え合わせてセリンの分解が活発に行われていることが示唆される。各組織のセリン濃度をみると肝臓と腎臓でセリンの濃度が著しく減少していることもこのことを指示している（表5）。また、データには示していないが、血漿および各組織のそれぞれの可欠アミノ酸濃度の変化と比較すると、セリン濃度に変化が見られない臓器では総可欠アミノ酸濃度が変化しないことが示された。このことは可欠アミノ酸のホメオスタシスにセリンが中心的な役割を果たしていることを示唆している。

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 Yoshimura, R., Takai, M., Namaki, H., Minami, K., Imamura, W., Kato, H., Kamei, Y., Kanamoto, R. Down Regulation of Asparagine Synthetase and 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase, and the Up-Regulation of Serine Dehydratase in Rat Liver from Intake of Excess Amount of Leucine Are Not Related to Leucine-Caused Amino Acid Imbalance. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 61: 441-448 (2015)

〔学会発表〕（計 2件）

- ① 沈礼信、大日向耕作、金本龍平、糖尿病ラットにおける可欠アミノ酸代謝酵素(AS, PHGDH, SDH)の発現変動 第70回日本栄養食糧学会大会 武庫川女子大学中央キャンパス (2016)
- ② 沈礼信、大日向耕作、金本龍平、低糖質食がアミノ酸代謝に及ぼす影響-各臓器におけるアミノ酸濃度の変化と AS, PHGDH 及び肝臓 SDH の発現-第71回日本栄養食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター (2017)

〔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.sseiri.kais.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金本 龍平 (KANAMOTO, Ryuhei)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：70147297

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：

(4) 研究協力者

(0)