

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04681

研究課題名(和文) 糖代謝とアミノ酸代謝のクロストークにおけるグルカゴンの役割の解明

研究課題名(英文) Exploration of the role of glucagon in the crosstalk between glucose metabolism and amino acid metabolism

研究代表者

林 良敬 (Hayashi, Yoshitaka)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80420363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン発見にノーベル医学・生理学賞が授与された1923年に、グルカゴンは膵臓に含まれる血糖上昇物質として報告された。このような発見の経緯から血糖上昇がグルカゴンの主要な生理作用として広く受け入れられてきた。しかしながら、我々が作成したグルカゴン遺伝子を欠損するマウスの血糖値は正常である一方、血中アミノ酸濃度の上昇を示した。本研究においてグルカゴンによるアミノ酸代謝制御のメカニズムを明らかとしようとした結果、アミノ酸異化、あるいはアミノ酸を糖新生に利用可能な基質へ転換することこそが、グルカゴンの真に特異的な生理作用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルカゴンは血糖値を上げるホルモンであると広く認知され、糖尿病においては血糖値を上昇させることにより病態を悪化させる「悪役」とも考えられてきた。しかしながら、我々が独自に作成したグルカゴンを欠損する動物モデルを詳細に解析した結果、グルカゴンは蛋白質の構成要素であるアミノ酸の血中濃度の維持に必要な不可欠な役割を持つことが明らかとなった。生体におけるアミノ酸代謝の制御のしくみは未解明の部分が多く、我々の成果をさらに展開することにより、糖尿病学・栄養学のみならず生命科学全般に広く影響を及ぼす新しい知見がもたらされることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glucagon was originally reported as a hyperglycemic substance that is present in pancreatic extract in 1923, the year of the Nobel Prize in Physiology or Medicine given to discovery of insulin. Therefore, the major physiological role of glucagon has been considered to raise blood glucose levels. However, mice deficient in glucagon gene, which we have produced, are normoglycemic and displayed increased serum amino acid levels. Our effort has been made to explore mechanisms involved in glucagon-dependent regulation of amino acid metabolism. Several lines of data and evidence are indicating that “truly” specific and physiological role of glucagon is regulation of amino acid catabolism, especially conversion of amino acids to substrates available for gluconeogenesis.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：グルカゴン アミノ酸 糖新生 肝臓 糖尿病 膵臓ランゲルハンス島 エネルギー代謝 蛋白質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

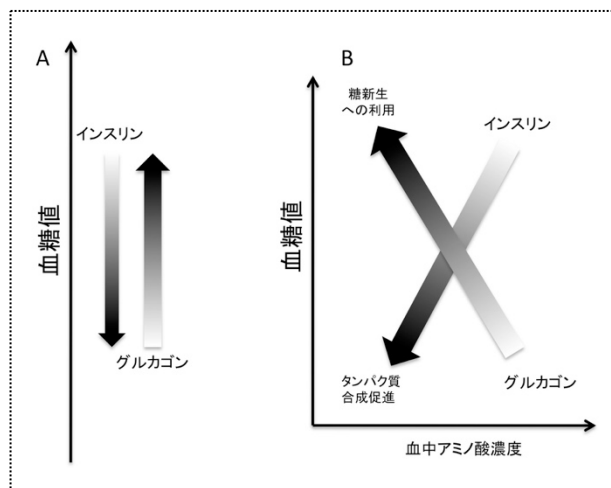
1. 研究開始当初の背景

脳はその利用するエネルギーを主にグルコースに依存しており、生体の恒常性維持において血中グルコース濃度(血糖)の維持は極めて重要である。グルコースはグリコーゲンの分解のほかに、アミノ酸やトリグリセリドを原料とした糖新生により調達される。インスリンが血糖低下作用を示す唯一のホルモンであるのに対して、血糖上昇作用を示すホルモンはグルカゴン・副腎皮質ホルモン・カテコールアミンなど多岐にわたる。

糖や脂質の代謝制御機構に比べると、アミノ酸の代謝制御機構には未解明の部分が多く残されている。多くの動物種は9-10種のアミノ酸を生合成する能力を欠き、必須アミノ酸の摂取が糖新生及び蛋白合成を効率良くおこなう上で重要であるため、従来のアミノ酸代謝研究においては、栄養学的アプローチが主要な手段であった。実際、アミノ酸代謝異常を示す先天性疾患のモデル以外では、遺伝子組換え動物を用いたアミノ酸代謝研究は少ない。

我々はグルカゴン遺伝子を欠損するモデル動物(GCGKO)を作成して、その表現型解析を進めてきた。興味深いことに、GCGKOの成獣はグルカゴン欠損にもかかわらず正常血糖を示す一方、高アミノ酸血症を示す。さらに、肝臓においてアミノ酸を糖新生の基質へ転換する酵素群の遺伝子発現が低下している。これらの結果はグルカゴンの特異的作用は血糖上昇よりアミノ酸燃焼の促進(アミノ酸を糖新生に利用可能な物質へ転換することの促進・アミノ酸異化の促進)にあることを示している。

グルカゴンとインスリンの作用は、一般的には、血糖値をY軸とした右下の概念図Aのような形で理解されてきた。GCGKOの表現型は概念図Aに基づくと捉えにくい。ここでアミノ酸濃度をX軸に加えた概念図Bを設定すると解釈が容易となる。すなわち、①インスリンはブドウ糖を細胞内に取り込み、そのエネルギーとアミノ酸を用いて蛋白質合成を促進する、②グルカゴンはアミノ酸を糖新生の原料へ転換して血糖を上昇させる、③GCGKOではグルカゴン欠損のため、相対的に少ないインスリンで、血糖値が維持される、④GCGKOではインスリン・グルカゴン両者の作用が少ないためアミノ酸利用が低下して血中アミノ酸濃度が上昇する。という捉え方である。逆の角度から見れば、インスリンシグナルの減弱を、高いアミノ酸濃度がmTOR(蛋白合成制御をつかさどり、インスリンシグナルの下流に位置する)を直接活性化することにより代償し、蛋白質合成を維持しているとも考えられる。このように我々のGCGKOの表現型解析結果は、糖代謝とアミノ酸代謝の制御は不可分で、そのクロストークにグルカゴンが関与することを示唆している。しかしながら、このクロストークの実態は明らかでなかった。



2. 研究の目的

本研究においてはGCGKOおよび対照群を用いて、アミノ酸代謝と糖代謝の日周変動・胎生期から離乳期にかけての変遷・蛋白質摂取によるアミノ酸代謝や関連物質の血中濃度の変化などを解析して、グルカゴンによるアミノ酸代謝制御のメカニズムを解明するとともに、生体の恒常性維持における、糖代謝とアミノ酸代謝のクロストークの意義を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

グルカゴン遺伝子欠損マウスと対照マウスにおいて、代謝関連遺伝子発現の日周変動・新生児期～離乳期の変動や、アミノ酸等の血中濃度の変化を解析し、アミノ酸代謝制御の鍵となる遺伝子を選別する。さらに、当該遺伝子を欠損あるいは過剰発現(恒常性もしくは誘導性に発現)する動物モデルを作成し、グルカゴン遺伝子欠損マウスと交配した上で、その糖代謝・アミノ酸代謝・肝臓における遺伝子発現・膵島の形態を解析する。

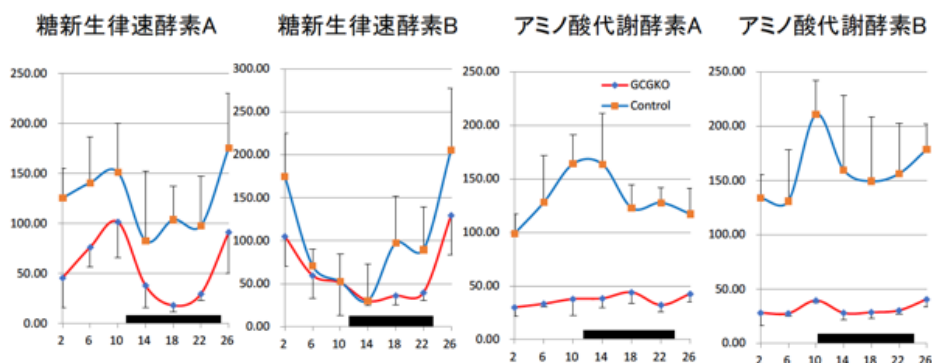
4. 研究成果

グルカゴン遺伝子欠損マウス(GCGKO)と対照マウスの肝臓におけるアミノ酸・糖代謝関連酵素遺伝子の発現の日周変動、胎生期から新生時期にかけての発現の変動の解析、グルカゴン投与により肝臓でのアミノ酸代謝酵素発現がどのように制御されるかについて解析を行った。その結果、GCGKOにおけるアミノ酸代謝関連酵素の発現低下は胎仔期や新生仔期にはみとめられない

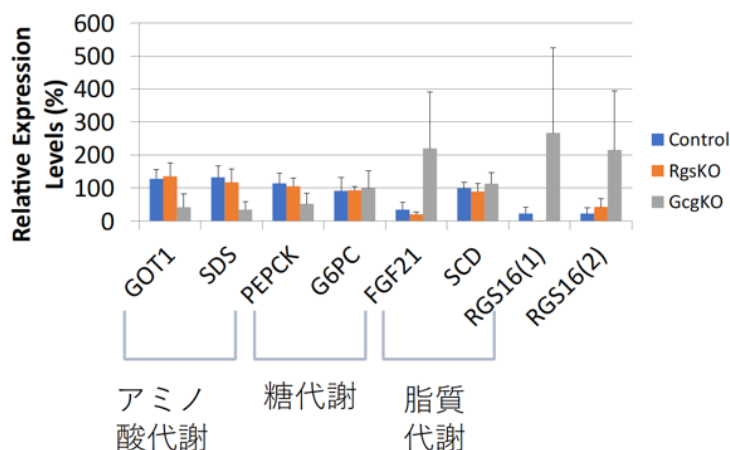
一方で、幼仔期にはみとめられ、さらに離乳期以降には顕著となることが明らかとなった。GCGKOでは膵臓α細胞（GFP発現細胞）の増殖亢進が生直後よりみとめられ、生後二週齢においては過形成が顕著となるが、この解析によりアミノ酸代謝酵素の発現低下とα細胞の過形成の進行の間に関連がある可能性が強く示唆された。

一方、遺伝子発現の日周変動の解析においては、従来グルカゴンにより制御されると考えられてきた糖新生律速酵素の遺伝子の発現はGCGKOと対照群の間で必ずしも明確でない一方で、アミノ酸代謝酵素の発現低下は24時間のあいだ常に明らかに低下していることが明らかとなった（下図）。

GCGKO肝臓における糖新生律速酵素とアミノ酸代謝酵素の遺伝子発現の日内変動



これらの解析の過程で regulator of G-protein signaling 16 (RGS16) の肝臓における発現が GCGKO において上昇していることを見だしたため、RGS16 が GCGKO におけるアミノ酸代謝酵素発現低下に寄与している可能性を検証することとした。この目的のために RGS16 ノックアウトマウスを入手し、グルカゴン・RGS16 ノックアウトダブルノックアウトマウスを交配により得て、その表現型、特に肝臓における遺伝子発現と膵臓ランゲルハンス島の形態を解析した。しかしながら GCGKO と GCG/RGS16 double KO の間では膵臓ランゲルハンス島の形態に明らかかな差は認められず（右図）、また肝臓における遺伝子発現パターンにおいても特筆すべき変化はみとめられなかったため、現時点では RGS16 がグルカゴンによる代謝制御やランゲルハンス島 α 細胞の増殖制御において重要な役割をはたしている可能性は低いと現時点では考えられる。



一方で、GCGKO において発現が著しく低下している遺伝子としてニコチンアミドをメチル化する酵素、nicotinamide N-methyl transferase を同定している。同遺伝子のノックアウトモデルは報告されていなかったため（2018 年当初時点）、全身で同遺伝子の発現を欠損する動物が早期致死となる可能性は十分に考えられた。そこで、cre-loxP システムにより、組織特異的に同遺伝子の発現を欠損する動物モデルを作成する必要があると考え、同モデルの作成を進めている。このモデルの GCGKO との交配や詳細な解析を本研究の当初予定期間である平成 30 年度末までに完遂することは困難であることが予測されたため、新規研究課題として「グルカゴンによるニコチンアミド代謝制御の生体における意義の解明」を最終年度前年度応募し、今後この新課題のもと研究をさらに進める予定である。

これまでの研究において、グルカゴンがアミノ酸代謝の恒常性維持に極めて重要な役割を果たしていることが明確になってきた。これらの結果は部分的に雑誌論文#1 や学会等において発表してきた。近年、海外のグループからもグルカゴン作用の阻害により血中アミノ酸濃度が上昇し、このアミノ酸濃度の上昇が α 細胞の増殖制御において重要であることを示す報告がなされている（Dean ED et al, Cell Metab 2017, Kim J et al, Cell Metab 2017）。

グルカゴン作用の生体における意義の解明は、糖尿病をはじめとするさまざまな代謝疾患の治療に直結する可能性が高い。今後も GCGKO をはじめとする遺伝子欠損モデルにおいて糖代謝・アミノ酸代謝・ニコチンアミド代謝を解析することにより、グルカゴン作用の生体に

おける意義の解明を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1) Hayashi Y, Seino Y: Regulation of amino acid metabolism and alpha cell proliferation by glucagon. *Journal of Diabetes Investigation* 査読あり 9: 464-472, 2018

(2) Suzuki K, Iwasaki K, Murata Y, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Shibue K, Joo E, Sankoda A, Fujiwara Y, Hayashi Y and Inagaki N*: Distribution and hormonal characterization of primary murine L cells throughout the gastrointestinal tract: *Journal of Diabetes Investigation* 査読あり 9: 25-32, 2018

(3) Maekawa R, Seino Y, Ogata H, Murase M, Iida A, Hosokawa K, Joo E, Harada N, Tsunekawa S, Hamada Y, Oiso Y, Inagaki N, Hayashi Y and Arima H: Chronic high-sucrose diet increases fibroblast growth factor 21 production and energy expenditure in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 査読あり 49: 71-79, 2017

(4) Seino Y, Maekawa R, Ogata H, Hayashi Y. Carbohydrate-induced secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読あり 7 (suppl. 1):27-32, 2016

(5) Iida A, Seino Y, Fukami A, Maekawa R, Yabe D, Shimizu S, Kinoshita K, Takagi Y, Izumoto T, Ogata H, Ishikawa K, Ozaki N, Tsunekawa S, Hamada Y, Oiso Y, Arima H, Hayashi Y. Endogenous GIP ameliorates impairment of insulin secretion in proglucagon-deficient mice under moderate beta cell damage induced by streptozotocin. *Diabetologia*, 査読あり 59: 1533-1541, 2016

(6) 林 良敬、高野悠子、前川龍也、清野裕介：グルカゴンの全身作用「増刊：新時代の臨床糖尿病学-より良い血糖管理をめざして-」 日本臨床 査読なし 74(増1): 131-135, 2016

(7) Takagi Y, Kinoshita K, Ozaki N, Seino Y, Murata Y, Oshida Y, Hayashi Y: Mice deficient in proglucagon-derived peptides exhibit glucose intolerance on a high-fat diet but are resistant to obesity. *PLoS One* 査読あり 10(9): e0138322, 2015

(8) Takano Y, Kasai K, Takagishi Y, Kikumori T, Imai T, Murata Y, Hayashi Y: Pancreatic neuroendocrine tumors in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *PLoS One* 査読あり 10(7): e0133812, 2015

(9) 林 良敬：グルカゴンの真の特異的作用は何か？-グルカゴン作用欠損モデルの表現型-「特集：グルカゴン革命 -糖尿病の真の分子病態を追え！-」 実験医学 査読なし 33(6):897-902, 2015.

〔学会発表〕(計 18 件)

① 林 良敬：糖尿病グルカゴン主因論を再考する：グルカゴンの真の特異的生理作用は何か？ 第34回中国地区インスリン研究会、2018.1 岡山

② 林 良敬：基調講演：アミノ酸代謝制御ホルモンとしてのグルカゴン シンポジウム 侵襲下の各疾患における除脂肪体重とタンパク質必要量 第21回日本病態栄養学会年次学術集会、2018.1 京都

③ 林 良敬：グルカゴンとアミノ酸による α 細胞増殖制御、学術講演会-細胞から糖尿病を考える- 2017.9. 東京

④ 林 良敬：グルカゴンによる α 細胞増殖の制御とアミノ酸代謝 *Islet Biology* '17、2017.7. 東京

⑤ 林 良敬、清野裕介、飯田淳史、深見亜矢子、前川龍也、杉山知里、高木佑輔、木下圭太、尾崎信暁、有馬 寛：グルカゴン作用不全とインクレチン シンポジウム インクレチンの可能性について探る 第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5. 名古屋

⑥林 良敬：グルカゴンの特異的生理作用はアミノ酸代謝と α 細胞増殖の制御である シンポジウム Hot topics 第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5.名古屋

⑦前川龍也、高野悠子、清野佑介、村瀬正敏、有馬 寛、林 良敬：高蛋白質食負荷は、グルカゴン分泌増加を介して肝臓のアミノ酸代謝を規定する 第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5.名古屋

⑧小林雅樹、菊池 司、稲垣貴之、三重野園理、宮地 淳、林 良敬、佐々木務、北村忠弘 新規開発測定系を用いた血糖変化に伴うグルカゴン変動の再検証 第60回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5.名古屋

⑨林 良敬：グルカゴンの真の特異的生理作用は何か：グルカゴン遺伝子欠損動物モデルが明らかにしたこと 朝日生命成人病研究所第167回分泌セミナー 2017.2 東京

⑩Hayashi Y: Glucagon is a regulator of amino acid metabolism and alpha cell proliferation. Japan Diabetes Innovation Summit 2016 2016.11. (Kyoto, Japan)

⑪林 良敬：グルカゴン遺伝子欠損マウスが明らかにするグルカゴン作用 第4回北関東グルカゴン研究会、2016.8. 東京

⑫林 良敬：グルカゴンの特異的作用：代謝制御と膵島内分泌細胞増殖制御 第28回「糖尿病と血管合併症 up-to-date」, 2016.6 大阪

⑬前川龍也、清野祐介、尾方秀忠、飯田淳史、村瀬正敏、城尾恵里奈、鈴木和代、原田範雄、細川香里、丹羽靖浩、泉本貴子、恒川 新、濱田洋司、林 良敬、稲垣暢也、有馬寛：高炭水化物食の慢性摂取における GIP 分泌と作用に対する検討第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5. 京都

⑭飯田淳史、清野祐介、前川龍也、村瀬正敏、矢部大介、清水 忍、秋田貴子、恒川 新、濱田洋司、林 良敬、稲垣暢也、有馬寛：DPP-4 阻害薬は、グルカゴン欠損下では膵 β 細胞障害時においても、GIPによるインスリン分泌増強を介して耐糖能を改善させる第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5. 京都

⑮小林雅樹、井田隆徳、菊池 司、林 良敬、佐々木務、北村忠弘：新規開発測定系を用いた血糖変化に伴うグルカゴン分泌動態の解析 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5. 京都

⑯林 良敬：シンポジウム“アミノ酸研究の新展開：細胞シグナルとしての動的制御機構” BMB2015 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会、2015.12 神戸

⑰林 良敬：細胞増殖と代謝の制御におけるグルカゴンの特異的作用、第一回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム、2015.11. 前橋

⑱SEINO Yusuke, IIDA Atsushi, FUKAMI Ayako, OZAKI Nobuaki, HAYASHI Yoshitaka: Glycemic control by islet-derived GIP: Analysis of mice deficient in the glucagon gene. -シンポジウム“膵ホルモンから考える血糖制御破綻のメカニズム-Revisit of islet endocrine function and its dysfunction-” 第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015.5. 下関

〔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：

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小田 裕昭

ローマ字氏名：ODA HIROAKI

研究協力者氏名：清野 祐介

ローマ字氏名：SEINO YUSUKE

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。