

令和元年6月27日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K12346

研究課題名(和文) 肝臓のセリン合成能と肥満との関連性の究明

研究課題名(英文) Comprehensive phenotypic analysis of liver-specific Phgdh deficient mice

研究代表者

濱野 桃子 (Hamano, Momoko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員

研究者番号：40717336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝臓のde novoセリン合成能を低下させたノックアウトマウスを用いて、肝臓におけるセリン合成と肥満を最終表現型とした栄養状態との関連を明らかにし、肝臓におけるセリン合成の栄養生理学的意義の解明することを目指した。肝臓におけるセリン合成酵素Phgdhは定常状態において発現は低いものの、低タンパク食を給餌すると速やかに発現が増加する。しかし、肝臓におけるセリン合成能の栄養生理学的意義は分かっていない。そこで、セリン合成能を低下させたノックアウトマウスを作製し、栄養学的観点から意義を理解するために、ノックアウトマウスの栄養状態を給餌飼料により変化させ、その応答を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は生活習慣病の最大のリスク要因であり、その対策が社会的に急がれている。肥満患者においてアミノ酸のインバランスが起きていることが報告されているが、肥満の結果アミノ酸インバランスが誘導されるのか、アミノ酸インバランスが肥満を誘導するのか分かっていない。さらに、アミノ酸代謝異常やアミノ酸代謝酵素の機能低下が肥満の原因とする報告は未だに少なく集積は不十分である。肥満を表現型とした生体の栄養状態と肝臓におけるセリン合成能の関連を明らかにすることは、代謝性疾患とアミノ酸代謝の関連を新規に定義付ける重要な知見であり、また、肥満の新規治療法の開発にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Previous study shows that the expression of serine synthesis enzyme Phgdh in the liver is maintained low level in steady state, but rapidly upregulated when fed with low protein diet. However, the nutritional and physiological significance of serine synthesis in liver is unknown. We aim to clarify the physiological significance of de novo Ser synthesis in liver, we generated the liver hepatocyte-specific Phgdh KO (LKO) mice. Moreover, we analyzed the comprehensive phenotype of LKO mice under artificially changing in nutritional status.

研究分野：分子栄養学

キーワード：セリン 肝臓 肥満 低タンパク質栄養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は体重増加と体脂肪の過剰蓄積として定義されている。肥満は生活習慣病の最大のリスク要因であり、その対策が社会的に急がれている。肥満は生活習慣病だけでなく、関節炎や睡眠時無呼吸症候群などのさまざまな疾患のリスク要因ともなることから、肥満を予防することは重要である。肥満患者において、アミノ酸代謝が破綻していることや血中のセリン濃度が有意に減少していることが報告されている。肥満患者におけるアミノ酸インバランスは、肥満の結果アミノ酸インバランスが誘導されるのか、アミノ酸インバランスが肥満を誘導するのか因果関係は分かっていない。また、アミノ酸代謝異常やアミノ酸代謝酵素の機能低下が肥満の原因と断定した報告は未だに少ない。

我々は非必須アミノ酸セリンの全身性代謝における重要性を理解するために、肝臓特異的にセリンを合成できない遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、興味深いことに、肝臓でセリン合成能が低下したマウスは 23 週齢以降に体重と脂肪組織の有意な増加が認められ、肥満を呈した。

2. 研究の目的

本研究では、肥満の原因にアミノ酸代謝が関与するのか、また、その因果関係を解明すべく、アミノ酸のうち特にセリンの全身性代謝に着目し、肥満とセリン代謝の関連について検証することを目的とした。全身性のアミノ酸代謝は肝臓が担っており、血中のアミノ酸濃度は肝臓で感知され速やかに応答する機構が発動する。そこで、肝臓におけるセリン合成酵素 Phgdh をノックアウトした肝臓特異的セリン合成不全マウスを作成し、肝臓特異的セリン合成不全マウスに誘発される肥満の原因を明らかにすることとした。

肝臓特異的セリン合成不全マウスは通常飼料により肥満を呈することが分かっていることから、高脂肪飼料により肥満を強制誘発し、通常飼料を給餌した場合と比較した代謝変動を評価した。次いで、通常飼料による飼育では、本マウスの血中セリン濃度が減少しないことが分かったため、セリン欠乏に近い条件にするために離乳後に低タンパク飼料を給餌し、発育や肝臓におけるアミノ酸代謝を遺伝子発現解析を中心に評価した。

3. 研究の方法

(1) 肝臓特異的セリン合成不全マウスの作製

肝臓特異的セリン合成不全マウス(肝実質細胞特異的 Phgdh KO マウス)は Phgdh^{flox/flox} マウス(Floxed 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^{flox/flox} にすることによって作製した。作製した肝実質細胞特異的 Phgdh KO マウス(Alb-Cre::Phgdh^{flox/flox}:LKO マウス)は期待されるメンデルの法則に従って出生し、発育に異常は認められなかった。

(2) 高脂肪飼料給餌

4 週齢オスの Floxed マウス及び LKO マウスを離乳させ、1 週間通常飼料(MF)にて飼育し、体重及び摂食量を測定した。5 週齢で給餌飼料を高脂肪飼料(D12492(Research Diets)、60kcal% 脂肪含有飼料)に切り替え、12 週間飼育した。高脂肪飼料給餌期間は経時的に体重及び摂食量を測定し、エネルギー消費量の低下及びエネルギー摂取量の増加のいずれが肥満の原因であるか解析した。解剖時に肝臓、腎臓、腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、腎周囲脂肪の各組織重量を測定した。さらに、採取した血液の血清生化学検査を行った。

(3) 通常飼料及び低タンパク飼料給餌

4 週齢オスの Floxed マウス及び LKO マウスを離乳させ、1 週間通常飼料(MF)にて飼育した。5 週齢以降通常飼料(コントロール飼料:AIN-93G)及び低タンパク飼料(AIN-93G をベースとした 10%タンパク質含有飼料)を 12 週間給餌した。解剖時に各臓器重量を測定し、採取した血液の血清生化学検査を行った。

4. 研究成果

(1) 高脂肪飼料給餌による体重増加への影響

LKO マウスはセリン合成能を有する Flox マウスと比較して、通常飼料給餌により確認された有意な体重増加は、高脂肪飼料給餌では認められなかった。また、体重あたりの摂食量及び各脂肪組織重量においても群間に有意な変化は認められなかった。さらに、血清生化学検査値の結果から、糖代謝および脂質代謝についてもいずれも変化は認められなかった。通常飼料及び高脂肪飼料のいずれにおいても摂食量は 2 群間で変化は認められなかったことから、肥満の原因としてエネルギー摂取量の増大ではなく基礎代謝量の低下が関与することが推察された。また、高脂肪飼料による顕著な体重増加は認められなかった点について、本実験条件は先行研究で給餌した通常飼料と比して飼料の組成が異なることから、飼料中の糖質:タンパク質:脂質の組成が LKO マウスの体重増加に関与する可能性が示唆された。

(2) 低タンパク飼料給餌による発育への影響

低タンパク飼料の給餌による LKO マウス及び Flox マウスの 2 群いずれも発育不全は認められず通常飼料と同様の成長曲線を示した。また、LKO マウス及び Flox マウスの 2 群間における発育の差も認められなかった。しかし、LKO マウスを母マウスのセリン合成能の有無によって 2 群

に分けて発育を評価した結果、LKO 母マウスから出生した LKO マウスはセリン合成能を有する Flox 母マウスから出生した LKO マウスより体重増加率及び肝重量が有意に低かった。このことから、母マウスのセリン合成能はタンパク質低栄養条件に曝された仔マウスの発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。次いで、通常飼料にて飼育した場合の仔マウスの発育を評価した結果、LKO 母マウスから出生した LKO 仔マウスは低タンパク飼料の給餌で認められた発育不全は認められなかった。以上から、肝臓特異的にセリン合成能が低下した母マウスから出生した仔マウスの発育不全は、低タンパク飼料の長期給餌によるタンパク質栄養不良によって誘発されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hamano M, Haraguchi Y, Sayano T, Zyao C, Arimoto Y, Kawano Y, Moriyasu K, Udono M, Katakura Y, Ogawa T, Kato H, Furuya S, Enhanced vulnerability to oxidative stress and induction of inflammatory gene expression in 3-phosphoglycerate dehydrogenase-deficient fibroblasts. *FEBS Open Bio.* (2018) 8;8(6):914-922. (査読有)

Sayano T, Kawano Y, Kusada W, Arimoto Y, Esaki K, Hamano M, Udono M, Katakura Y, Ogawa T, Kato H, Hirabayashi Y, Furuya S, Adaptive response to l-serine deficiency is mediated by p38 MAPK activation via 1-deoxysphinganine in normal fibroblasts. *FEBS Open Bio.* (2016) 3;6(4):303-316. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

M. Hamano, K. Esaki, K. Moriyasu, S. Mori, Y. Hirabayashi, S. Furuya, IUNS-International Congress of Nutrition 21st, プエノスアイレス, 2017 年 10 月 15 日

濱野桃子、江崎加代子、森安一樹、毛利紳哉、古屋茂樹, 日本アミノ酸学会第 11 回学術大会, 京都府立大学, 2017 年 9 月 30 日

濱野桃子, 佐矢野智子, 小田裕昭, 加藤久典, 古屋茂樹, 日本アミノ酸学会 10 周年記念大会, 東京大学, 2016 年 9 月 11 日

濱野桃子, 佐矢野智子, 有本八潮, 川野裕輝, 鵜殿美弥子, 片倉喜範, 小川拓哉, 加藤久典, 平林義雄, 古屋茂樹, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 北海道札幌市札幌コンベンションセンター, 2016 年 3 月 28 日

〔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: 古屋 茂樹

ローマ字氏名: Shigeki Furuya

所属研究機関名：九州大学

部局名：農学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：00222274

(2)研究協力者

研究協力者氏名：濱田 俊

ローマ字氏名：Shun Hamada

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。