

令和元年5月22日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07747

研究課題名(和文) 低タンパク質栄養による肝臓翻訳抑制因子4E-BP1増加が肝臓脂質蓄積に果たす役割

研究課題名(英文) The physiological significance of eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) on lipid accumulation in rat liver under protein deprivation.

研究代表者

鈴木 由香(豊島由香)(TOYOSHIMA, Yuka)

日本医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：70516070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、私たちは、低タンパク質栄養状態の肝臓において、翻訳抑制因子4E-BP1の量の増加が、脂肪肝の発症に關与していることを明らかにしてきた。そこで、本研究では、低タンパク質栄養状態の肝臓において、4E-BP1量の増加が、どのような分子メカニズムで、脂質蓄積を促進させるのかを検討した。その結果、栄養状態と関係なく、肝臓4E-BP1量を人為的に増加させただけでは、肝中性脂肪量は増加しないこと、低タンパク質栄養状態の肝臓で増加した4E-BP1は、脂肪酸酸化を抑制して、肝臓脂質蓄積を促進させ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

これまで、翻訳抑制因子4E-BP1が糖・脂質代謝を調節しているかは不明であったが、本研究によって、4E-BP1がタンパク質翻訳調節だけでなく、脂質代謝調節を担うことを明らかにすることができた。さらに本研究を発展させれば、翻訳調節を介した新しい肝臓脂質蓄積機構の提唱につながると期待している。また、低栄養によって発症する脂肪肝を“改善”するだけでなく、“予防”するための新しい知見が得られ、我が国で増加の一途をたどっている脂肪肝の罹患率を減らすことに貢献できるとも期待している。

研究成果の概要(英文)：We previously elucidated that protein deprivation increased 4E-BP1 level, leading to fatty liver in rats. In this study, we examined how the increase in 4E-BP1 contributes to lipid accumulation in rat liver under protein deprivation. Overexpression of 4E-BP1 in the liver did not change hepatic triglyceride (TG) level in rats, regardless of nutritional status, suggesting that the increase in 4E-BP1 by itself is insufficient to increase TG level in rat liver. We also found that 4E-BP1 is involved in the suppression of fatty acid oxidation, leading to the increase in TG level in rat liver under protein deprivation. These results suggest that 4E-BP1 could regulate not only translation but also lipid metabolism in rat liver.

研究分野：食品科学

キーワード：肝臓 タンパク質 中性脂肪 翻訳抑制因子 代謝

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

1. 研究開始当初の背景

今日、わが国は飽食状態にあり、栄養過多が肥満やそれに伴う代謝障害を引き起こし、健康を脅かす一因となっている。他方、食生活の乱れやライフスタイルの変化によって、必要な栄養素を十分に摂取できない低栄養も、新たな健康問題となってきている。

栄養過多と低栄養は正反対の栄養状態であるが、いずれも栄養素の摂取量と必要量のアンバランスから生じる。そして両栄養状態ともに、脂肪肝を発症し得る。肝臓に過剰な脂質が蓄積する要因は、糖・脂質代謝制御の異常である。これらの代謝制御の異常に栄養状態が及ぼす影響は大きい。詳細なメカニズムは未知な部分が多い。さらに、栄養過多と低栄養が引き起こす脂肪肝の発症機序の差異も不明である。脂肪肝は、肝炎、肝硬変へと病態が進展して肝不全を招く恐れがあるだけでなく、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の発症リスクを高める。したがって、不適切な栄養状態によって稼動する肝臓脂質蓄積機構を解明することは、医学的・社会的に重要な課題である。

これまでに我々は、低タンパク質食を摂食させたラットの肝臓において、翻訳抑制因子 4E-BP1 の量とリン酸化が増加し、中性脂肪量が増加することを見出した(引用文献、)。さらに、低タンパク質食摂食によって起こる肝臓の 4E-BP1 量およびリン酸化、中性脂肪量の変化を経時的に観察したところ、低タンパク質食を 1 日摂取しただけで 4E-BP1 量が増加し、それ以降に 4E-BP1 のリン酸化が増加し、脂質蓄積が顕著となった。これらの知見から、低タンパク質栄養状態に応答した肝臓 4E-BP1 量の増加が引き金となって、糖・脂質代謝を変動させて、最終的に肝臓に脂質を蓄積させると考えられた。

一般的に、4E-BP1 は、翻訳開始因子 eIF4E と複合体を形成し、タンパク質翻訳を抑制する。また、4E-BP1 は mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の基質であり、活性化された mTORC1 によってリン酸化されると、eIF4E から解離して、タンパク質翻訳を活性化する。近年、mTORC1 経路がタンパク質代謝だけでなく、糖・脂質代謝を調節することが注目され始めてきた(引用文献、)。しかし、mTORC1 の 4E-BP1 を介した糖・脂質代謝制御機構は未知な点が多い。また、4E-BP1 が、mTORC1 による活性調節を受けずに、糖・脂質代謝制御をしているかは不明である。

そこで、低タンパク質食を摂食した際に起こる肝臓 4E-BP1 量の増加が、肝臓脂質蓄積量の増加に関与しているか調べるために、低タンパク質食を摂食させた肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットを用いて検討した。その結果、このラットでは、低タンパク質食摂食によって起こる肝臓の脂質蓄積が抑制された。このことから、低タンパク質栄養状態で起こる肝臓脂質蓄積には、肝臓 4E-BP1 量の増加が必要であることが明らかになった。さらに、低タンパク質栄養状態でなくとも、肝臓において 4E-BP1 が中性脂肪量を調節する可能性を考えて、栄養状態は正常のまま、肝臓 4E-BP1 を発現抑制させた際の肝臓中性脂肪量の変化を調べた。その結果、肝臓 4E-BP1 量を減少させただけでは、肝臓の脂質蓄積は抑制されなかった。したがって、肝臓 4E-BP1 による脂質蓄積制御機構は、肝臓 4E-BP1 量が増加する生理条件下でのみ稼動すると考えられた。

以上の結果を総合すると、「肝臓 4E-BP1 は、その量が増加する特異的な栄養状態において、ある特定のタンパク質の翻訳を抑制する。その結果、糖・脂質代謝が調節されて、肝臓に脂質が蓄積する」と考えられた。これらを明らかにすることは、低タンパク質栄養性脂肪肝の発症メカニズムを明らかにする上で不可欠だけでなく、栄養過多による脂肪肝の発症メカニズムとの差異の解明にもつながると期待され、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、以下の 2 点を明らかとすることを目的とした。

(1) 肝臓 4E-BP1 過剰発現が肝臓脂質蓄積に及ぼす影響の解析

肝臓 4E-BP1 量を人為的に増加させると、栄養状態に関わらず、肝臓中性脂肪量が増加するか明らかにする。

(2) 低タンパク質栄養状態に応答して増加する肝臓 4E-BP1 を介した肝臓脂質蓄積機構の解明

低タンパク質栄養状態に応答した肝臓 4E-BP1 量の増加が、どのような分子メカニズムで、糖・脂質代謝を調節して、肝臓に脂質を蓄積させるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝臓における 4E-BP1 過剰発現が脂質蓄積に及ぼす影響の解析

4E-BP1 を発現する組換えアデノウイルス (Ad) をラットの尾静脈より注入し、感染後 1 ~ 21 日後に麻酔下で肝臓を摘出し、肝臓における 4E-BP1 タンパク質量を測定した。この実験により、ラット肝臓で 4E-BP1 を過剰発現させるのに最適な Ad の投与量や投与期間を決定した。

また、Ad による 4E-BP1 過剰発現が肝臓特異的に起こっているか確認するために、骨格筋や白色脂肪組織などの肝臓以外の臓器における 4E-BP1 タンパク質量を測定した。

さらに、決定した実験条件によって作製した肝臓 4E-BP1 過剰発現ラットに、標準ペレット食を与えた際の肝臓中性脂肪量を測定した。

(2) 低タンパク質栄養状態に应答して増加する肝臓 4E-BP1 を介した肝臓脂質蓄積機構の解明

これまでに、低タンパク質食摂食によって肝臓 4E-BP1-eIF4E 複合体量が増加することを見出していた。このことは、低タンパク質食を摂食した際の肝臓では、4E-BP1 量の増加によって、タンパク質翻訳が抑制されていることを示唆している。そこで、低タンパク質食摂食ラットの肝臓を用いて、4E-BP1 以外の翻訳調節因子のタンパク質量およびそれらの因子と翻訳開始因子 eIF4E で形成する複合体量を測定し、肝全体のタンパク質合成量も測定した。また、低タンパク質食を摂食させた肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットの肝臓でも、同様な検討を行った。

次に、4E-BP1 を介した肝臓脂質蓄積に関わる糖・脂質代謝経路の同定をするために、低タンパク質食を給餌した肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットの肝臓を用いて、脂質代謝調節に関与する因子のタンパク質量を測定した。

4. 研究成果

(1) 肝臓における 4E-BP1 過剰発現が脂質蓄積に及ぼす影響の解析

4E-BP1 発現 Ad をラット尾静脈より注入して肝臓 4E-BP1 過剰発現ラットを作製するには、Ad 投与量は $1 \sim 2 \times 10^9$ プラーク形成ユニット (pfu) で十分であること、Ad 投与期間は 4~7 日が適切であること、4E-BP1 発現 Ad による 4E-BP1 の過剰発現は肝臓特異的であることが明らかとなった。

次に、 2×10^9 pfu の 4E-BP1 発現 Ad をラットの尾静脈より注入し、標準ペレット食を与えて 7 日間飼育して作製した肝臓 4E-BP1 過剰発現ラットの肝臓中性脂肪量を測定した。その結果、肝臓 4E-BP1 過剰発現ラットの肝臓中性脂肪量は、対照ラットの肝臓中性脂肪量と同等であった。したがって、肝臓 4E-BP1 量の増加だけでは、肝臓中性脂肪量は増加しないことが明らかとなった。また、この結果から、低タンパク質栄養状態で起こる肝臓脂肪蓄積には、4E-BP1 以外の因子も関与していることが示唆された。

(2) 低タンパク質栄養状態に应答して増加する肝臓 4E-BP1 を介した肝臓脂質蓄積機構の解明

低タンパク質摂食ラットの肝臓では、対象ラットの肝臓と比べて、eIF4G 量が増加すること、4E-BP1-eIF4E 複合体量は増加するが eIF4G-eIF4E 複合体量は同等であることを明らかにした。さらに、低タンパク質食を摂食させた肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットの肝臓では、低タンパク質食を摂食させた通常ラットの肝臓と比べて、脂質蓄積が抑えられたのと同時に、eIF4G 量の増加や 4E-BP1/eIF4E 複合体量の増加も抑えられていた。一般的に、4E-BP1 は、翻訳開始因子 eIF4E と複合体を形成して、翻訳開始に必要な eIF4E と翻訳開始因子 eIF4G の複合体形成を拮抗阻害し、タンパク質翻訳を抑制する。そして、タンパク質の翻訳が抑制されている際には、4E-BP1/eIF4E 複合体量が増加し、eIF4G/eIF4E 複合体量は減少する。しかし、低タンパク質栄養状態の肝臓では、全体的なタンパク質の翻訳は抑制されておらず、両複合体量が同時に増加する傾向であった。研究成果 (1) の結果を併せて考察すると、低タンパク質食摂食による肝臓中性脂肪量の増加には、4E-BP1 だけでなく eIF4G も関与していることが考えられた。また、これらの知見から、低タンパク質食摂食ラットの肝臓では、4E-BP1 と eIF4G の翻訳調節機能が同時に稼働し、肝の全体的な翻訳レベルを低下させずに、特定のタンパク質の量を変動させて、脂質代謝を調節する結果、脂質が蓄積すると考えられた。

次に、低タンパク質食摂食によって起こる肝臓 4E-BP1 量の増加が、どのような糖・脂質代謝経路を調節して肝臓中性脂肪量を増加させるのか検討するために、肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットに低タンパク質食を摂食させた脂質代謝調節因子のタンパク質量を測定した。その結果、低タンパク質食を給餌した肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットの肝臓では、脂肪酸合成に関わるアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) 1 と脂肪酸合成酵素 (FAS)、脂肪酸の取り込みに関わる CD36 (cluster of differentiation 36)、リポタンパク質の合成に関わる MTP (microsome triglyceride transfer protein)、中性脂肪の分解に関わる ATGL (adipocyte triglyceride lipase) と HSL (hormone-sensitive lipase) のタンパク質量の変化はなかった。その一方で、脂肪酸酸化に関わる CPT1A (carnitine palmitoyltransferase 1A) のタンパク質量は増加した。以上の結果から、低タンパク質栄養状態の肝臓で増加した 4E-BP1 は、脂肪酸酸化を抑えて、肝臓中性脂肪量を増加させることが示唆された。

< 引用文献 >

Yuka Toyoshima, *et al.*, Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *J Mol Endocrinol*, 45:329-340, 2010.

Yuka Toyoshima, *et al.*, Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation in growing rats. *Endocrine J.* 61: 499-512, 2014.

Stephane J H Ricoult, *et al.*, The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep*, 14:242-251, 2013.

Kyoko Tsukiyama-Kohara *et al.*, Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med*, 7:1128-1131, 2001.

Olivier Le Bacquer, *et al.*, Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J Clin Invest*, 117:387-396, 2007.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Hiroki Nishi, Daisuke Yamanaka, Hiroyasu Kamei, Yuki Goda, Mikako Kumano, Yuka Toyoshima, Asako Takenaka, Masato Masuda, Yasushi Nakabayashi, Ryuji Shioya, Naoyuki Kataoka, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Importance of serum amino acid profile for induction of hepatic steatosis under protein malnutrition. *Sci Rep*, 査読有, 8(1):5461. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-23640-8.

Yusuke Taguchi, Yuka Toyoshima*, Reiko Tokita, Hisanori Kato, Shin-Ichiro Takahashi, Shiro Minami. Triglyceride synthesis in hepatocytes isolated from rats fed a low-protein diet is enhanced independently of upregulation of insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 490(3):800-805, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.120. * Corresponding Author

Mami Horiuchi, Tomoya Takeda, Hiroyuki Takanashi, Yori Ozaki-Masuzawa, Yusuke Taguchi, Yuka Toyoshima, Lila Otani, Hisanori Kato, Meri Sone-Yonezawa, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi, Asako Takenaka. Branched-chain amino acid supplementation restores reduced insulinotropic activity of a low-protein diet through the vagus nerve in rats. *Nutr Metab (Lond)*, 査読有, 14:59, 2017. doi: 10.1186/s12986-017-0215-1.

[学会発表](計9件)

田口 雄亮、豊島 由香、時田 玲子、加藤 久典、伯野 史彦、高橋 伸一郎、南 史朗、低タンパク質食摂取によるインスリン様成長因子 (IGF) 抵抗性発生機構の解析、第72回日本栄養食糧学会大会、2018年

長田 悠加、山中 大介、西 宏起、合田 祐貴、熊野 未佳子、豊島 由香、竹中 麻子、片岡 直行、伯野 史彦、高橋 伸一郎、アミノ酸が肝臓のインスリン様成長因子-I 遺伝子発現に及ぼす影響の解析、日本農芸化学会2018年度大会、2018年

Yuka Toyoshima, Reiko Tokita, Yusuke Taguchi, Fumiaki Yoshizawa, Shin-Ichiro Takahashi, Hisanori Kato, Shiro Minami. An increase in 4E-BP1 level mediates to enhance triglyceride accumulation in rat liver under protein malnutrition. IUNS 21th International Congress of Nutrition, 2017

Hiroki Nishi, Daisuke Yamanaka, Hiroyasu Kamei, Yuki Goda, Mikako Kumano, Yuka Toyoshima, Asako Takenaka, Kazuhiro Chida, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Hepatic steatosis induced by amino acid deficiency or by manipulation of the dietary amino acid composition. IUNS 21th International Congress of Nutrition, 2017

熊野 未佳子、西 宏起、山中 大介、合田 祐貴、豊島 由香、竹中 麻子、伯野 史彦、高橋 伸一郎、肝細胞におけるアミノ酸欠乏に応答した糖新生酵素遺伝子の新しい発現抑制機構、第11回日本アミノ酸学会学術大会、2017年

豊島 由香、時田 玲子、田口 雄亮、高橋 伸一郎、加藤 久典、南 史朗、低タンパク質栄養による肝臓脂質蓄積機構-新規メカニズムの探索-、第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年

豊島 由香、低タンパク質栄養によるインスリン活性増強機構とその生理的意義、日本アミノ酸学会10周年記念大会、2016年

田口 雄亮、豊島 由香、時田 玲子、加藤 久典、高橋 伸一郎、南 史朗、低タンパク質食給餌ラットから単離した肝細胞で起こる脂質合成亢進はインスリン非依存的である、第70回日本栄養食糧学会大会、2016年

豊島 由香、時田 玲子、田口 雄亮、高橋 伸一郎、加藤 久典、南 史朗、低タンパク質栄養に応答して起こる褐色脂肪組織の脱共役タンパク質 UCP1 量の増加とエネルギー

消費の亢進、第70回日本栄養食糧学会大会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nms.ac.jp/ig/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

特になし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：加藤 久典

ローマ字氏名：KATO, Hisanori

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。