

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32624

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15194

研究課題名(和文)アンバランスなアミノ酸の経口摂取による摂食抑制の機構解明とその抗肥満への応用検討

研究課題名(英文)Mechanism of food rejection upon amino acid-unbalanced diet

研究代表者

石井 功 (ISHII, Isao)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90292953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスが特定の標準アミノ酸を欠く餌を摂餌する際の摂食拒絶と血中アミノ酸濃度変化の相関を調べた。必須アミノ酸を欠く餌を摂餌したマウスでは、発現までのタイムラグの違いはあれ摂食拒絶(摂餌減少)が観察されたが、それに先立つ当該アミノ酸の血中濃度の低下が観察された。一方、非必須アミノ酸を欠く餌の場合は摂食拒絶は観察されず、当該アミノ酸の血中濃度低下も観察されなかった。そして、非必須アミノ酸のCysを欠く餌を与えた場合に通常では摂食拒絶は起こらないが、Cys生合成系不全(CSE欠損)マウスでは摂食拒絶がおきた。つまり、摂食拒絶が起きるのは9種必須アミノ酸の欠乏時に限らないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the physiological correlation between food rejection behavior and serum amino acid (AA) profiles upon single AA-deficient diets in mice. When fed an essential AA-deprived diet, we observed decreased serum levels of the corresponding AA followed by food rejection (although the time of onset differs among the diets). Meanwhile, when fed a non-essential AA-deprived diet, both food rejection and its preceding serum AA level change were not observed. Furthermore, when fed a non-essential cyst(e)ine-deprived diet, normal (wild-type) mice did not show food rejection as well as serum Cys level decrease; however, genetically-engineered mice deficient in Cys biosynthesis (cystathionine gamma-lyase [CSE]-knockout mice) did show those. These results suggest that food rejection upon AA deprivation from diet could occur when serum levels of any proteinogenic AA are declined.

研究分野：生化学、生理学、動物行動学

キーワード：摂食拒絶 必須アミノ酸 非必須アミノ酸 拒食症

1. 研究開始当初の背景

(同じく哺乳類のマウスと同様)ヒトが食餌から取らねば正常な発育を成し得ない9種の標準(タンパク質を構成する)アミノ酸を必須アミノ酸、そして体内で生合成できる残り11種を非必須アミノ酸と呼ぶ。ヒトは毎日約70-100gのアミノ酸(源)を食餌から取り、ほぼ同量のその代謝物を尿・便中に排泄するが、タンパク質の合成・分解量はそれぞれ約400gと多い。必須アミノ酸を含まない食餌を摂れば、体タンパク質の分解により欠乏する必須アミノ酸種を供給せざるを得なくなる。哺乳動物が必須アミノ酸欠失餌を忌避する(摂食拒絶)行動は、「そのような食餌は危険だから避けるという適応応答」と解釈できる。

我々は先行研究において、標準アミノ酸のそれぞれを欠く無タンパク性の完全アミノ酸配合餌18種(Gln/Glu及びAsn/Aspは同時欠失)を作成し、マウスに2週間与え体重・血中アミノ酸・摂餌量を調べた。その結果、必須アミノ酸欠失餌9種による漸次体重減少(Ile>Val>Thr>Leu>Trp>His>Phe>Met>Lys)とほぼそれに相関する摂餌量の減少、さらに欠失アミノ酸の血中濃度の減少を見出した(Kamata *et al*, Mol Nutr Food Res 58:1309-1321, 2014)。過去の国内外の研究はIleやValなど一部の必須アミノ酸の欠失による摂食抑制効果を調べたのみで、欠失必須アミノ酸種による違い、血中アミノ酸濃度変化との連関についての報告はない。

2. 研究の目的

ヒトの血中アミノ酸組成は毎回の食餌に依らず比較的恒常性を保つといわれるが、それでもやはり生合成できない必須アミノ酸はバランスよく摂取する必要がある。一方で哺乳動物が必須アミノ酸を欠く食餌を忌避する機序については、Gietzenらが2005年に報告した「脳前梨状皮質(Anterior Piriform Cortex: APC)が必須アミノ酸欠乏をそのアミノ酸の空のtRNAの増加として検知し摂食抑制を起こす」説が定説となっている。彼らが想定するように、必須アミノ酸欠失餌を摂り30分以内にまず血中、次いで脳APC中の当該アミノ酸の濃度が低下することなど起こり得るのか、またどのタンパク質構成アミノ酸の濃度低下でも摂食抑制が起きるのか、本研究で検証する。

3. 研究の方法

(1)必須アミノ酸欠失餌投与時の摂餌量減少に先立つ当該アミノ酸血中濃度低下の確認

我々は先行研究において各種必須アミノ酸欠失餌投与後の体重減少と、それとほぼ順位が相関する摂餌量の減少を確認した。絶対に必要なアミノ酸種を確保するためのタンパク質を分解する程度に幾らかの違いがあるにしても、それ以上に摂餌量減少が体重減少に影響するものと推察された。

さらに我々は、各種必須アミノ酸欠失餌投

与2週間後における当該欠失アミノ酸の血中濃度の減少を見出したが、Gietzenらの説によれば摂食量の減少に先立つ当該アミノ酸の血中濃度の減少が起きているはずである。実際体重減少は各種必須アミノ酸欠失餌投与後1日目から既に顕著であることから、必須アミノ酸欠失餌投与後のかなり早期に当該アミノ酸血中濃度低下とそれに伴う摂食量減少が見られるはずであり、それを全9種の必須アミノ酸欠失餌それぞれで検証する。

(2)非必須アミノ酸の血中濃度低下も摂食抑制を誘導するかどうか調べる

いわゆる非必須アミノ酸であっても、その血中濃度低下が摂食抑制に繋がるか調べる。Cystathionine gamma-lyase(CTH)はCys生合成の必須最終酵素であり、我々が作成したCTH欠損マウスにとりCysは必須アミノ酸である。すでに我々は、CTH欠損マウスにCys欠失餌を与えると急性筋原性萎縮を起こして体重減少し、やがて死に至ること、また同マウスの初代培養肝細胞は野生型マウス細胞と異なりCys要求性であることを報告している(Ishii *et al*, J Biol Chem 285:26358-26368, 2010)。同マウスの血中Cys濃度は野生型マウスの8割程度(普通餌時)であるが、Cys欠失餌投与によりさらに下がると予想され、その際の体重減少に先立つ摂食抑制の有無を確認する。

4. 研究成果

本研究課題採択後に昭和薬科大学への異動となり、新しい動物施設でのマウス飼育・実験スペースの確保、マウスの移動と繁殖開始に1年の遅れが生じた。それでも、まず以前に観察した必須アミノ酸欠失による摂食拒絶現象を再確認するところから実験をスタートした。

(1)最も強い摂食拒絶を示したIleの欠失餌(Kamata *et al*, Mol Nutr Food Res 58:1309-1321, 2014)については、先行研究において30分以内の摂食拒絶とそれに先立つ血中Ile濃度の減少を観察していた。そこで、さらにもう二つの必須アミノ酸(LysとMet)の欠失餌について、同様の餌投与後の経時的血中アミノ酸濃度変化を測定した。これらの二つは、必須アミノ酸の中で最も軽度な摂食量減少が観察され、より時間的な余裕を持って血中濃度変化を調べられると考えたからである。Lys欠失餌の場合は血中Lys濃度に減少傾向、そして他のアミノ酸濃度上昇が見られた。そして、Met欠失餌の場合は血中Met濃度に有為な変化は見られなかったが、他のアミノ酸濃度上昇が見られた。

(2)我々が作成したCys生合成不全マウスであるCTH欠損マウスと対照野生型マウスとで、Cys欠失餌に対する摂食拒絶とそれともなう血中Cys濃度変化を調べた。CTH欠損マウスではCysは必須アミノ酸であり、Cys欠失餌投与後の摂食量の低下が2時間後より観察

された。すなわち、必須アミノ酸欠失時の摂食拒絶は、いわゆる9種必須アミノ酸に限らないことが証明された。その一方で、それに伴うCys血中濃度の有為な現象は観察できなかった。血中のCysの多くはタンパク質Cys残基にS-S結合しており、それを還元して刃がしてから測定する必要があるが、そうした手間が増えた結果ばらつきが生じ、それを超える有意差を今回は確認できなかったと考えている。より精度のいい血中Cys濃度測定を行わなければならないと思われる。

以上により、摂食拒絶がいわゆる9種必須アミノ酸に限らず、20種全ての血中アミノ酸濃度の低下により起こりうることを示唆されたが、その完全証明には、他の必須アミノ酸欠失時の測定を含めた更なる実験が必要である。

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11件)

- (1) Szijarto IA, Ishii I, Gollasch M 他(15人中14番目). Cystathionine gamma-lyase-produced hydrogen sulfide controls endothelial NO bioavailability and blood pressure. **Hypertension** (2018) 71:1210-1217. 査読有
- (2) Nakashima F, Ishii I, Uchida K 他(10人中17番目). Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. **Sci Rep** (2018) 8:932. 査読有
- (3) Kamata S, Ishii I. Rapid 2D DIGE proteomic analysis of mouse liver. **Methods Mol Biol** (2018) 1664:153-166. 査読無
- (4) Castelblanco M, Ishii I, Busso N 他(8人中5番目). Hydrogen sulfide inhibits NLRP3 inflammasome and reduces cytokine production both in vitro and in a mouse model of inflammation. **J Biol Chem** (2018) 293:2546-2557. 査読有
- (5) Akiyama M, Ishii I, Kumagai Y 他(7人中6番目). The capture of cadmium by reactive polysulfides attenuates cadmium-induced adaptive responses and hepatotoxicity. **Chem Res Toxicol** (2017) 30:2209-2217. 査読有
- (6) Han SJ, Ishii I, Park KM 他(7人中4番目). Hydrogen sulfide-producing cystathionine gamma-lyase is critical in the progression of kidney fibrosis. **Free Rad Biol Med** (2017) 112:423-432. 査読有
- (7) Takahashi N, Ishii I, Tomizawa K 他(12人中8番目). Reactive sulfur species

regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. **Nucleic Acids Res** (2017) 45:435-445. 査読有

- (8) Gaddam RR, Ishii I, Bhatia M 他(8人中7番目). Cystathionine-gamma-lyase gene deletion protects mice against inflammation and liver sieve injury following polymicrobial sepsis. **Plos one** (2016) 11:e0160521. 査読有
- (9) Sarkar S, Ishii I, Yoo J 他(15人中13番目). Immobilization of the gas signaling molecule H₂S by radioisotopes: detection, quantification, and in vivo imaging. **Angewandte Chemie** (2016) 55:9365-9370. 査読有
- (10) Marko L, Ishii I, Gollasch M 他(13人中11番目). Role of cystathionine gamma-lyase in immediate renal impairment and inflammatory response in acute ischemic injury. **Sci Rep** (2016) 6, 27517. 査読有
- (11) Wedmann R, Ishii I, Filipovic MR 他(20人中13番目). Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. **Chem Sci** (2016) 7:3414-3426. 査読有

[学会発表](計2件)

- (1) Kamata S, Ishii I 他(6人中6番目). Dietary deprivation of each amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. Experimental Biology 2016 (San Diego, USA) 2016年4月
- (2) Kamata S, Ishii I 他(12人中12番目). Dietary deprivation of each amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of NO (仙台市) 2016年5月

[図書](計1件)

- (1) 石井功: 食品成分の変質、食品とアレルギー 第6版 衛生薬学 健康と環境、永沼章、姫野誠一郎、平塚明(編)丸善出版、東京、2018、pp.225-238

[その他]

ホームページ等
<http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/eisei>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

石井 功 (ISHII, Isao)
昭和薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90292953

(2)研究協力者
鎌田 祥太郎 (KAMATA, Shotaro)