

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580150

研究課題名（和文） ストレスに応答した IGFBP-1 遺伝子転写制御の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism underlying transcriptional regulation of IGFBP-1 gene by protein malnutrition and oxidative stress.

研究代表者

竹中 麻子 (TAKENAKA ASAKO)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：40231401

研究成果の概要：

タンパク質栄養状態が悪い「低栄養ストレス」時には、成長期の動物で成長遅滞が生じる。この成長遅滞は、成長を司るホルモンである IGF-I の作用を、IGF 結合タンパク質のひとつである IGFBP-1 が抑制することによって生じる。本研究ではタンパク質低栄養ストレスが IGFBP-1 合成を増加させる機構を分子レベルで解析することを目的として行なった。その結果、1) 栄養ストレスは動物個体において mTOR 経路を不活性化してインスリンによる IGFBP-1 合成抑制を阻害すること、2) 栄養ストレスは動物個体において mTOR 非依存的にも IGFBP-1 合成を促進すること、3) 栄養ストレスによる mTOR 不活性化は酸化ストレスの抑制によって解除できないこと、4) 栄養ストレスによって生じる mTOR 非依存的な IGFBP-1 合成の促進は酸化ストレスによって引き起こされること、を明らかにした。本研究の結果から、タンパク質低栄養のシグナルは一部が酸化ストレスに変換されて動物の成長を制御することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養生化学

1. 研究開始当初の背景

インスリン様成長因子-I (IGF-I) は動物の成長を司るホルモンであり、成長ホルモンや十分な栄養摂取によって合成が促進されることが広く知られている。インスリン様成長因子結合タンパク質 (IGFBP-1) は IGF-I の成長促進作用を抑制する結合タンパク質で、その合成は IGF-I とは逆にエネルギー欠乏やアミ

ノ酸欠乏など栄養状態の低下に伴って増加する。申請者らは、低栄養状態の動物では IGF-I 合成が低下し、さらに IGFBP-1 合成が増加することによって成長が強く抑制されていることを明らかにしてきた [Takenaka, A., et al. *Brit. J. Nutr.*, **69**: 73-82 (1993)、Takenaka, A. et al. *J. Endocrinol.* **150**: 33-41 (1996)]。この機構により、動物は栄養状態の変化をホ

ルモン活性の変化に反映させ、栄養状態に即した成長の制御を行っていると考えられる。低栄養状態に应答したIGF-Iシステムの変動の中でも、IGFBP-1の合成促進は転写レベルでダイナミックに制御されており、低栄養ストレスを生体が認識する系として生理的意義の高いシステムであることを申請者は報告している。[Takenaka A, et al. *J. Endocrinol.* **164**: R11-R16 (2000)、Takenaka A, et al. *J Nutr.* **130**: 2910-2914 (2000)]。

低栄養ストレスに应答したIGFBP-1遺伝子の転写制御機構として、mammalian target of rapamycin (mTOR) を介したシグナル伝達経路の関与が強く示唆される。すなわち、エネルギー欠乏は、細胞内AMP/ATP比の増加として認識され、cAMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化を引き起こす。AMPKによってリン酸化されたtuberous sclerosis protein (TSC) はmTOR活性化因子であるsmall G-protein、Rhebを不活性化 (GDP結合型、すなわち不活性化型になる) し、結果的にmTORの活性を抑制する [Sofer A. et al. *Mol. Cell Biol.* **25**: 5834-5845 (2005)、Cheng S. W. et al. *J. Biol. Chem.* **279**: 15719-15722 (2004)]。同様にアミノ酸欠乏もAMPK活性化を介してmTOR活性化を抑制することが示されているが、その詳細な作用機構はまだ明らかになっていない [Smith E. M. et al. *J. Biol. Chem.* **280**: 18717-18727 (2005)、Long X. et al. *J. Biol. Chem.* **280**: 23433-23436 (2005)]。

一方IGFBP-1 遺伝子発現は炎症性サイトカインによっても誘導されるが、この発現誘導は細胞内活性酸素種 (ROS) の作用であることが示されている [Lang C. H. et al. *Am. J. Physiol.* **39**: G719-G727 (1999)]。申請者はROSによるIGFBP-1合成制御について研究を進める過程で、これまでに、細胞内で発生する特定のROSがインスリン存在下で活性化型 (Ser²⁴⁸リン酸化型) mTOR量を減少させ、IGFBP-1 遺伝子発現を増加させることを明らかにしている [Kimura K, Takenaka A. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**: 16-22 (2007)]。

一連の結果から、申請者は低栄養ストレスと酸化ストレスが共通した機構を介してIGFBP-1 遺伝子発現を制御していると考えられるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ストレスに应答したIGFBP-1遺伝子転写制御の分子機構を解明することを目的とする。低栄養ストレスと酸化ストレスが細胞応答を引き起こす機構の共通性および特異性をそれぞれ解明することで、ストレス

に应答した動物の成長制御の全体像を明らかにすることができるかと期待される。

3. 研究の方法

(1) タンパク質低栄養動物実験

4週令のWistar系オスラット (初体重70~80g) を20匹購入 (日本医科学動物資材研究所) し、市販の固形飼料 (ラット飼料MF、オリエンタル酵母) で5日間予備飼育した。ラットを、20%カゼインを含む餌を与える群 (20C群) (n=10)、5%カゼインを含む餌を与える群 (5C群) (n=10)、無タンパク質食を与える群 (0C群) (n=10) の2群に分け、8日間飼育した。飲料水は自由摂取とし、飼料は0C群には20gを与え、他の群には前日の0C群の摂食量の平均を与える制限摂食を行った。8日目に各群を24時間絶食群 (F群)、24時間絶食後6時間再給餌群 (R群) の2群に分け、解剖を行った。ネンブタール (大日本製薬株式会社) 麻酔下で開腹し、心臓からの採血後、肝臓を摘出した。

各群のラット肝臓のインスリン応答性遺伝子 [glucose-6-phosphatase (G6Pase), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty-acid synthase (FAS), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)] 発現量をリアルタイムPCRにより測定した。また、血漿・肝臓過酸化脂質量、肝臓酸化型および還元型グルタチオン量、肝臓脂質量 [triglyceride (TG)、total cholesterol (TC)、phospholipid (PL)]、血漿コルチコステロン濃度の測定を行った。さらに、肝臓からタンパク質サンプルを調製し、各特異抗体を用いたウェスタンブロット分析によりmTOR量、mTORリン酸化量、mTOR基質 (S6キナーゼ、4EBP1) のタンパク量およびリン酸化量の測定を行なった。

(2) アミノ酸欠乏培地による初代培養肝細胞の培養実験

体重300g前後のWistar系雄ラットを用いて、常法に従って初代培養肝細胞を分離・培養した。血清を含むWE培地で分離後24時間程度培養した細胞を、アミノ酸を含む無血清培地 (α -MEM培地; AA+) と必須アミノ酸を含まない無血清MEM培地 (AA-) でさらに12時間培養した。12時間の培養時には、同時にインスリンの添加/無添加、抗酸化剤 (N-アセチルシステイン) の添加/無添加で培養を行なう実験群を設定した。細胞からtotal RNAを調製して、上述のインスリン応答性遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより測定した。

また、細胞からタンパク質サンプルを調製し、各特異抗体を用いたウェスタンブロット分析により、mTOR 量および mTOR リン酸化量を測定した。

4. 研究成果

(1) 栄養ストレスは動物個体においてmTOR経路を不活性化する: タンパク質低栄養モデルとして、無タンパク質食、5%低タンパク質食で成長期のWistar系雄ラットを7日間飼育し、摂食刺激(インスリン刺激)によるmTORを介した遺伝子(インスリン様成長因子結合タンパク質-1, IGFBP-1)の発現制御を解析した。その結果、通常食摂取ラットではインスリンに応答したmTORリン酸化およびIGFBP-1遺伝子発現抑制がみられたのに対し、栄養ストレス負荷ラットではこの制御が消失していた。したがって、タンパク質低栄養のストレスによって、動物体内でmTOR不活性化を介してIGFBP-1合成が増加することが示された。

(2) 栄養ストレスは動物個体においてmTOR非依存的にIGFBP-1合成を促進する: 無タンパク質食、5%低タンパク質食で成長期のWistar系雄ラットを7日間飼育すると、インスリン刺激がない絶食時にも通常食摂取時と比較してIGFBP-1 mRNA量が増加した。このときmTORタンパク量には差がみられず、mTORリン酸化は生じていなかった。したがって、タンパク質栄養ストレスによってIGFBP-1合成はmTOR非依存的に増加することが示された。

(3) 栄養ストレスによるmTOR不活性化は酸化ストレスの抑制によって解除できない: 無タンパク質食、低タンパク質食摂取ラットではmTOR依存IGFBP-1遺伝子発現制御が消失しており、またグルタチオン量が低下して酸化ストレスマーカーが上昇していた。無タンパク質食に抗酸化物質(α -トコフェロール、アスコルビン酸)を添加して摂取させて酸化ストレスを抑制した場合にも、インスリン刺激に応答したmTORリン酸化抑制やIGFBP-1 mRNA発現抑制の阻害は回復しなかった。したがって、タンパク質低栄養のストレスによって引き起こされるmTOR不活性化とIGFBP-1合成の増加は、酸化ストレスによるものではないことが示された。

また、同様の現象が培養細胞で再現できるかどうかを、ラット初代培養肝細胞で検討した。必須アミノ酸を含むあるいは含まない無血清培地で培養したところ、必須アミノ酸欠乏群ではインスリンによるmTORリン酸化およびIGFBP-1発現抑制が阻害されていた。また、

抗酸化剤の同時添加は、このインスリン作用の阻害を回復できなかった。したがって、タンパク質低栄養のmTOR活性化阻害は、培養細胞系でも生じることが示された。またこの阻害が酸化ストレス非依存的である点も、動物個体と同様であった。

(4) 栄養ストレスによって生じるmTOR非依存的なIGFBP-1合成の促進は酸化ストレスによって引き起こされる: 無タンパク質食、5%低タンパク質食摂取群の絶食時(インスリン刺激がない状態)のIGFBP-1 mRNA量の増加は、飼料への抗酸化物質(α -トコフェロール、アスコルビン酸)の添加によって抑制された。したがって、タンパク質栄養ストレスによるmTOR非依存的IGFBP-1合成の増加は、体内酸化ストレスの上昇を介して生じることが示された。

一連の結果から、低栄養ストレスが生体内で酸化ストレスを介してIGFBP-1遺伝子の転写制御に影響を及ぼしていることが明らかとなった。このことから、栄養ストレスが体内酸化ストレスという分子シグナルに変換されて体タンパク質代謝を制御するという新たな代謝制御機構が示された。さらに、抗酸化物質の摂取が栄養ストレスによる代謝変動を一部改善できる可能性を示した。

一方、低栄養時のIGFBP-1合成制御には、酸化ストレス非依存的なインスリン→mTOR経路が別個に機能していることが示された。低栄養ストレスによって体内に生じるシグナルには複数の経路があることが明らかとなった。

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)

①Okura Y., Tawara S., Kawai E., Kikusui T., and Takenaka A. (2008) Dietary vitamin E deficiency increases anxiety-related behavior in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43S1: 445-448.

[学会発表] (計9件)

①植竹絵梨、勝股快仁、山崎太朗、木村久美、竹中麻子、無タンパク質摂取ラットにおける肝臓インスリン依存性遺伝子発現応答、日本農芸化学会(2008年3月28日、名古屋)

②山崎太朗、竹中麻子、食餌大豆タンパク質の肝臓脂質低下作用機構の解析、日本農芸化学会(2008年3月28日、名古屋)

③浅野有香里、俵怜志、木村久美、竹中麻子、Wistar系ラット体内 α -トコフェロール動態の性差に関する研究、日本栄養・食糧学会（2008年5月3日、坂戸）

④勝股快仁、豊島由香、高橋伸一郎、竹中麻子、加齢動物のインスリン抵抗性と酸化ストレス、日本酸化ストレス学会（2008年6月19日、京都）

⑤小澤貴広、木村久美、竹中麻子、酸化ストレスが転写因子FOXO1に与える影響の解析、日本酸化ストレス学会（2008年6月19日、京都）

⑥Asako Takenaka, Eri Uetake, Takahiro Ozawa, Ami Oyamatsu, Yoshihito Katsumata, Role of oxidative stress on the regulation of IGFBP-1 mRNA in protein-deprived rat liver., Forth International Congress of the GRS and the IGF Society.（2008年9月19日、ジェノバ、イタリア）

⑦寺田裕紀、大橋広弥、野村征司、菊水健史、竹中麻子、ビタミンE欠乏食摂取がラットの不安行動に及ぼす影響、ビタミンE研究会（2009年1月25日、奈良）

⑧小澤貴広、親松亜実、豊島由香、伯野史彦、高橋伸一郎、竹中麻子、低タンパク質食摂取時の酸化ストレスとIGFBP-1 遺伝子発現解析、日本農芸化学会（2009年3月28日、福岡）

⑨勝股快仁、豊島由香、高橋伸一郎、竹中麻子、低タンパク質食摂取が加齢動物のインスリン抵抗性におよぼす影響、日本農芸化学会（2009年3月28日、福岡）

〔図書〕（計1件）

吉田勉監修(2008)「わかりやすい食品化学」、p108-127、p144-157、三共出版

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 麻子 (TAKENAKA ASAKO)
明治大学・農学部・准教授
研究者番号：40231401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし