

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05916

研究課題名(和文)低タンパク質栄養状態の肝臓で増加する翻訳調節因子を介した脂質蓄積機構の解析

研究課題名(英文) Study on the mechanisms by which the translation initiation regulating factors induces lipid accumulation in rat liver under protein deprivation.

研究代表者

豊島 由香 (TOYOSHIMA, Yuka)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：70516070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的なタンパク質の摂取不足は、脂肪肝発症の原因の一つである。これまでの研究成果から、低タンパク質食摂取によって起こる脂肪肝の発症に、肝臓における翻訳抑制因子4E-BP1量の増加が重要な役割を果たすことがわかってきた。また、4E-BP1と拮抗的に翻訳開始を調節する因子eIF4Gの量も増加して、肝脂質蓄積に関与すると考えられた。そこで本研究では、低タンパク質食摂取によって肝臓で増加する4E-BP1とeIF4Gが脂肪肝を発症させる機構の解析を行った。その結果、タンパク質の摂取不足にตอบสนองして肝eIF4Gと4E-BP1は、異なる機構を介して脂質代謝を調節し、脂肪肝を形成させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質の摂取不足にตอบสนองして、翻訳開始因子eIF4Gが、翻訳抑制因子4E-BP1とは異なる機構で脂質代謝調節に関与することを明らかにした。したがって、4E-BP1やeIF4Gは、タンパク質摂取不足による体内のアミノ酸利用の低下と肝脂肪蓄積を結ぶ重要な因子であると考えられた。本研究をさらに発展させて、これらの翻訳開始調節因子の標的因子を同定し、それによって調節される脂質代謝経路を明らかにすることができれば、脂肪肝治療のための新規薬剤の開発が可能となると考えている。また、過栄養による脂肪肝発症メカニズムとの差異もわかれば、発症要因に特化した食事療法の提案も可能となると考えている。

研究成果の概要(英文)：Dietary protein deprivation has been shown to induce fatty liver in animals including human. However, the molecular mechanisms underlying such induction are largely unknown. Our previous studies have elucidated that low-protein diet increases eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), which induces hepatic lipid accumulation in rats. In addition, we found that low-protein diet also increased eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) in the liver, which could be involved in the regulation of lipid metabolism in the liver. In this study, we examined how 4E-BP1 and eIF4G contributes to hepatic lipid accumulation under protein deprivation. Our results indicated that the 4E-BP1 and eIF4G could regulate lipid metabolism in a different manner. Further studies are necessary to determine the details of these mechanisms.

研究分野：栄養生化学

キーワード：タンパク質 翻訳 4E-BP1 eIF4G 肝臓 中性脂肪

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国は飽食状態にある。その一方で、不規則な食生活や過度な食事制限によって必要な栄養素を十分に摂取できない低栄養が、健康を脅かす一因となっている。低栄養は、様々な代謝異常を引き起こすが、その一つが脂肪肝である。脂肪肝は、過食や肥満などの過栄養状態で発症し得ることは広く知られている。他方、脂肪肝が低栄養状態でも発症し得ることはあまり知られていない。脂肪肝は、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、過栄養だけでなく、低栄養による脂肪肝発症機構を解明することも、医学的・社会的に重要な課題である。

これまでに我々は、低タンパク質食摂取が肝臓に過剰な中性脂肪を蓄積させる機構について解析を進めてきた。その過程で、低タンパク質食を与えたラットの肝臓において、翻訳開始調節因子 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) 量が増加し、脂質蓄積量が増加することを見出した(引用文献、)。一般的に 4E-BP1 は、翻訳開始因子 eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) と複合体を形成して、翻訳開始に必要な eIF4E と eIF4G (Eukaryotic translation initiation factor 4G) の複合体形成を拮抗阻害し、タンパク質翻訳を抑制する。また、4E-BP1 は mTORC1 (Mammalian target of rapamycin complex 1) 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 から解離する。解離した eIF4E は eIF4G と複合体を形成し、その結果、タンパク質翻訳が活性化される。

そこで我々は、「低タンパク質栄養状態の肝臓では、4E-BP1 量の増加によって、ある特定のタンパク質の翻訳が抑制される。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」と仮説を立て、これを立証するために、肝臓 4E-BP1 ノックダウンラットに低タンパク質食を与えた際の肝中性脂肪量を検討した。その結果、このラットの肝臓では、次のことが明らかとなった(引用文献)。低タンパク質食摂取による肝臓脂質蓄積が抑えられた。このことから、低タンパク質食摂取によ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わかった。低タンパク質食摂取による肝臓 4E-BP1/eIF4E 複合体量の増加が抑制された。このことから、低タンパク質食を摂取した際の肝臓では、4E-BP1 量の増加によって、タンパク質翻訳が抑制されると考えられた。

さらに、低タンパク質食が 4E-BP1 以外の翻訳開始調節因子に及ぼす影響について調べた。その結果、低タンパク質食摂取によって肝臓 eIF4G 量が増加し、eIF4G/eIF4E 複合体量も増加する傾向にあった。一般に、細胞内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、低タンパク質食を摂取したラットの肝臓では、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。このことから、タンパク質の摂取不足によって、肝臓では、4E-BP1 と eIF4G の翻訳調節機能が同時に稼働し、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ると考えられた。

以上の結果を総合すると、「タンパク質の摂取量が不足すると、肝臓では、4E-BP1 量と eIF4G 量の増加によって、特定のタンパク質の翻訳が選択的に調節される。その結果、糖・脂質代謝が変動して、肝臓に脂質が蓄積する」と考えられた。この仮説を明らかにすることは、低タンパク質食によって誘導される脂肪肝の形成メカニズムを明らかにする上で不可欠だけでなく、過栄養による脂肪肝の形成メカニズムとの差異の解明にもつながると期待されたため、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、次の 2 点を明らかにすることを目的とした。

(1) タンパク質の摂取不足による肝臓 eIF4G 量の増加はどのようなメカニズムで起こるか。

(2) タンパク質の摂取不足によって肝臓で増加する 4E-BP1 と eIF4G はどのようなメカニズムで肝臓に脂質を蓄積させるか。

これらを検討して、低タンパク質栄養状態に応答して増加する肝臓の 4E-BP1 と eIF4G が、糖・脂質代謝調節因子の翻訳を選択的に調節して肝臓に脂質を蓄積させる機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の摂取不足による肝 eIF4G 量増加機構の解析

低タンパク質食摂取による肝 eIF4G 量の増加は、血中アミノ酸濃度の低下によって起こるかを検討するために、ラット肝癌細胞 H4IIE を 20 種類全てのアミノ酸を十分の含む培地 (Full 培地) もしくはアミノ酸を全く含まない培地 (Zero 培地) で培養後、eIF4G を含めた様々な翻訳開始調節因子の量をイムノプロット法で測定した。

(2) タンパク質の摂取不足によって増加する肝 4E-BP1 と eIF4G を介した脂質蓄積機構の解析

低タンパク質食摂取による肝 eIF4G 量の増加が、肝中性脂肪量の調節に直接的に関与するかを明らかにするために、肝 eIF4G を強制発現もしくはノックダウンしたラットモデルの作製を試みた。

低タンパク質食摂取ラットの肝臓では、4E-BP1 や eIF4G の他に、インスリン受容体基質 (IRS)-2 量も増加することが既に分かっていた。そこで、低タンパク質食摂取によって起こる肝脂質蓄積に、これらの因子がどのように関与するかを明らかにするために、IRS-2 欠損ラットに低タンパク質食を与えた際の肝中性脂肪量や、肝臓における 4E-BP1 と eIF4G の量の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) タンパク質の摂取不足による肝 eIF4G 量増加機構の解析

これまで、低タンパク質食摂取によって肝臓における eIF4G 量が増加することは分かっていたが、これが何によって増加するかは不明であった。そこで、アミノ酸欠乏培地 (Zero 培地) で培養したラット肝癌細胞 H4 E を用いて、低タンパク質食摂取による血中アミノ酸濃度の低下が eIF4G 量の増加に関与するか検討した。その結果、Zero 培地で 24 時間培養した細胞の 4E-BP1 と eIF4E の量は、Full 培地で培養した細胞のこれらの量と比べて同程度であった。一方、Zero 培地で 24 時間培養した細胞の eIF4G 量は、Full 培地で培養した細胞と比べて少なかった。

以上の結果から、培地中のアミノ酸が欠乏すると、肝細胞内の eIF4G 量は減少するが、4E-BP1 と eIF4E の量は変化しないことが示唆された。さらに、これまでに得られたラットの実験結果も併せて考察すると、低タンパク質食摂取による肝臓 4E-BP1 と eIF4G 量の増加は、血中アミノ酸濃度の低下を肝細胞が感知して起こる現象ではないと考えられた。

(2) タンパク質の摂取不足によって増加する肝 4E-BP1 と eIF4G を介した脂質蓄積機構の解析

摂取する食餌条件とは関係なく、肝 eIF4G 量を強制的に増加させると肝中性脂肪量が増加するかを検討するために、肝 eIF4G 強制発現ラットの作製を試みた。まず、ラット eIF4G を発現するアデノウイルス (eIF4G Ad) を作製した後、この eIF4G Ad をラット尾静脈より注入、感染させることで、eIF4G を肝特異的に強制発現させることが可能か検討した。その結果、eIF4G Ad を感染させても肝 eIF4G 量の増加は確認できず、肝 eIF4G 強制発現ラットの作製を成功させることはできなかった。

また、低タンパク質食摂取に応答して起こる肝臓 eIF4G の増加を人為的に抑えるための実験系の確立を目指した。まず、ラット eIF4G に対する shRNA (short hairpin RNA) を発現するアデノウイルスの作製した。5 種類のラット eIF4G に対する shRNA を発現するプラスミドを作製し、それらのプラスミドをラット筋芽細胞 L6 の細胞内に遺伝子導入した際に eIF4G がノックダウンされるか検討した。その結果、5 種類のうち 3 種類の shRNA を発現するプラスミドの遺伝子導入によって L6 細胞内の eIF4G 量が減少した。したがって、ラット eIF4G をノックダウンすることが可能な shRNA 配列を決定することはできた。しかし、アデノウイルスの作製までは期間内に終わることができなかった。

我々はこれまでに、組換えアデノウイルスを用いて、4E-BP1 をノックダウンしたラットを作製し、そのラットを用いて、低タンパク質食摂取によって起こる肝脂質蓄積に 4E-BP1 が必要であることを明らかにしてきた (引用文献)。したがって、今後、この実験を継続して、eIF4G のノックダウンが可能な組換えアデノウイルスの作製を成功させることができれば、低タンパク質食を給餌したラットの肝 eIF4G 量の増加を抑えた際の肝中性脂肪量の変化を検討することが可能となると考えている。

低タンパク質食摂取によって肝臓で増加することがわかっている IRS-2、eIF4G、4E-BP1 が、肝中性脂肪量の増加にどのような相互関係を持って関与しているかを検討するために、IRS-2 欠損ラットに低タンパク質食を与えて各種検討を行った。その結果、IRS-2 欠損ラットでは低タンパク質食摂取による肝中性脂肪量の増加が野生型ラットと比べて抑えられることがわかった。また、IRS-2 欠損ラットでは、低タンパク質食摂取による肝 4E-BP1 量の増加は起こるが、肝 eIF4G 量の増加は起こらないことを見出した。これらの結果から、低タンパク質食摂取に応答して増加する肝臓の eIF4G と 4E-BP1 は、独立した異なる機構を介して肝中性脂肪量を調節することが示唆された。

このように、研究期間内に eIF4G の遺伝子改変モデルを構築できなかったが、低タンパク質食摂取によって起こる肝 eIF4G の量増加や中性脂肪量増加に関するメカニズムについて、最低限の成果は得られた。今後、さらに本研究を進展させて、翻訳開始調節因子を介した新たな脂質蓄積機構の解明を目指したいと考えている。

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.

Yuka Toyoshima, *et al.*, A translation repressor, 4E-BP1, regulates the triglyceride level in rat liver during protein deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 318: E636-E645, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Otani Lila, Nishi Hiroki, Koyama Ayaka, Akasaka Yuta, Taguchi Yusuke, Toyoshima Yuka, Yamanaka Daisuke, Hakuno Fumihiko, Jia Huijuan, Takahashi Shin-Ichiro, Kato Hisanori	4. 巻 17
2. 論文標題 Low-arginine and low-protein diets induce hepatic lipid accumulation through different mechanisms in growing rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrition & Metabolism	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12986-020-00477-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyoshima Yuka, Nakamura Katsuyuki, Tokita Reiko, Teramoto Naomi, Sugihara Hidetoshi, Kato Hisanori, Yamanouchi Keitaro, Minami Shiro	4. 巻 295
2. 論文標題 Disruption of insulin receptor substrate-2 impairs growth but not insulin function in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11914 ~ 11927
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakata Tomoko, Toyoshima Yuka, Yagi Takashi, Katsumata Harumi, Tokita Reiko, Minami Shiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Growth hormone increases regulator of calcineurin 1-4 (Rcan1-4) mRNA through c-JUN in rat liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyoshima Yuka, Yoshizawa Fumiaki, Tokita Reiko, Taguchi Yusuke, Takahashi Shin-Ichiro, Kato Hisanori, Minami Shiro	4. 巻 318
2. 論文標題 A translation repressor, 4E-BP1, regulates the triglyceride level in rat liver during protein deprivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E636 ~ E645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00464.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakata Tomoko, Hirano Yoshitaka, Katsumata Harumi, Tokita Reiko, Yagi Takashi, Toyoshima Yuka, Minami Shiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Growth hormone activates X-box binding protein 1 in a sexually dimorphic manner through the extracellular signal-regulated protein kinase and CCAAT/enhancer-binding protein pathway in rat liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 185 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yagi Takashi, Toyoshima Yuka, Tokita Reiko, Taguchi Yusuke, Okamoto Yoshihisa, Takahashi Shin-ichiro, Kato Hisanori, Minami Shiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Low-protein diet enhances adiponectin secretion in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1774 ~ 1781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1621153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 朝重陽菜子、長田悠加、西宏起、山中大介、豊島由香、竹中麻子、片岡直行、伯野史彦、高橋伸一郎
2. 発表標題 アミノ酸欠乏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
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋伸一郎、伯野史彦、山中大介、竹中麻子、豊島由香、中林靖
2. 発表標題 アミノ酸シグナルによる物質代謝制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊島由香、吉澤史昭、時田玲子、田口雄亮、高橋伸一郎、加藤久典、南史朗
2. 発表標題 低タンパク質栄養状態における脂肪肝の発症に翻訳抑制因子4E-BP1が果たす役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会合同大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊島由香
2. 発表標題 タンパク質栄養状態の悪化によって稼働する肝脂質蓄積機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会, 2021年度農芸化学女性研究者賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福嶋沙良、熊野美佳子、西宏起、山中大介、合田祐貴、豊島由香、竹中麻子、片岡直行、伯野史彦、高橋伸一郎
2. 発表標題 肝細胞においてオルニチンがmTOR非依存的にG6Pase遺伝子発現を誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田海登、豊島由香、伯野史彦、高橋伸一郎、竹中麻子
2. 発表標題 低タンパク質食摂取で生じるマウスの成長遅滞はInsulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) 投与により抑制される
3. 学会等名 第13回日本アミノ酸学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島由香、中村克行、時田玲子、田口雄亮、寺本奈保美、杉原英俊、加藤久典、山内啓太郎、南史朗
2. 発表標題 インスリン受容体基質-2欠損ラットは成長障害を起こす
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊島由香、中村克行、竹内志帆、時田玲子、田口雄亮、寺本奈保美、杉原英俊、山内啓太郎、南史朗
2. 発表標題 インスリン受容体基質-1欠損ラットは成長障害とインスリン抵抗性を示す
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋伸一郎、伯野史彦、山中大介、西宏起、合田祐貴、増田正人、片岡直行潮秀樹、宮本崇史、豊島由香、竹中麻子、島野 仁
2. 発表標題 古くて新しいアミノ酸コードの研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木晶子、豊島由香、藤原葉子
2. 発表標題 高脂肪食摂取時にIRS-1欠損は耐糖能異常を惹起し肝脂質蓄積を抑える
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www-w.cf.ocha.ac.jp/ihli/>
<https://www.nms.ac.jp/ig/bumon/seitai/>
<http://shigen.mine.utsunomiya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	時田 玲子 (TOKITA Reiko)		
研究協力者	加藤 久典 (KATO Hisanori)		
研究協力者	南 史朗 (MINAMI Shiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------