

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19064

研究課題名(和文)代謝物質コードによる細胞機能制御メカニズムの理解と制御

研究課題名(英文)Elucidation and manipulation of the regulatory mechanisms of cellular functions by metabolic codes

研究代表者

宮本 崇史(Miyamoto, Takafumi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50740346

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、アミノ酸を起点とする代謝物質群の変動情報を『代謝物質コード』として定義し、代謝物質コードを感知するメカニズムや、その情報が解読されて、特定の表現型に至る背景機序を明らかにすることを目標に研究を行った。その結果、連動性を示すアミノ酸や、アミノ酸によって変動する遺伝子を同定することができた。またアミノ酸シグナルを可視化するため、AMPKおよびmTORC1のバイオセンサーを安定的に発現する細胞株の樹立を進めた。最終的にAMPKバイオセンサーを安定的に発現する細胞株は樹立したが、mTORC1バイオセンサーは、その感度を改良することを優先することとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、どのようなアミノ酸が連動して動いているのか、さらにその動きに伴ってどういった遺伝子の発現レベルが変動するのかを明らかにすることができた。ヒトの代謝物は20万種以上あるが、タンパク質の数は19,969 genes/86,245 transcriptsしかない(Nurk et al. Science. 2022)。そのため、細胞がどのようにして膨大な組み合わせからなる栄養素情報の変化を感知・処理しているのかは、未だ謎に包まれている(Efeyan et al. Nature. 2015)。本研究はこの謎を紐解くための基礎データを提供するものである。

研究成果の概要(英文): In this study, we defined the fluctuation information of a group of metabolites originating from amino acids as the "metabolite code." Our research aimed to elucidate the mechanisms of sensing the metabolite code and deciphering the information that leads to specific phenotypes. As a result, we were able to identify amino acids that demonstrate coherence and genes that vary due to amino acids. Furthermore, we made progress in establishing cell lines that stably express AMPK and mTORC1 biosensors to visualize the amino acid signals. Ultimately, we successfully established a cell line with stable expression of the AMPK biosensor; however, we prioritized improving the sensitivity of the mTORC1 biosensor.

研究分野：栄養学

キーワード：代謝

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はアミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物の総称であり、ヒトでは 20 種類のアミノ酸がタンパク質の構成要素として使われている。近年、がん抑制遺伝子産物である転写因子 p53 が様々なアミノ酸代謝を制御していることや(Miyamoto et al. Sci Adv. 2017; Simabuco et al. Oncotarget. 2018)、アミノ酸ががん細胞の生存戦略等において重要な働きをしていることが報告されてきた (Lieu et al. Exp Mol Med. 2020)。こうした論文では、**特定のアミノ酸に着目し、その増減と表現型の関係性から、各種アミノ酸の機能性を紐解くことが論旨**となっており、実際、多くのアミノ酸について、その多様な機能性が明らかにされてきた(Wu. Amino Acids. 2009)。しかし、ここで重要なことは、全ての代謝経路はつながっているため、**特定のアミノ酸量の増減は、そのアミノ酸以外の代謝物においても量的・質的变化を引き起こす(代謝連動性)**という事実である (Nishi et al. Sci Rep. 2018)。例えばセリン欠乏によって観察される細胞の表現型の一部は、スフィンゴ脂質の 1 種であるセラミドの量的・質的变化によって説明される(Gao et al. Cell Rep. 2018)。このようにアミノ酸研究では、当該アミノ酸のみでは表現型に至る背景機序を完全に説明できないパラドックスが多く存在している(Dioguardi et al. Nutrigenet Nutrigenomics. 2011)。この一因となっているのが『代謝連動性』である。つまり、**特定アミノ酸の量的変化のみに注目するのではなく、そのアミノ酸を起点として変動する代謝プロファイル全体を総体的な情報として捉え、その総体情報に基づいて表現型へ至る背景機序を理解することが、今後のアミノ酸研究において重要**と考えられる。実際、血中アミノ酸 20 種類すべてを使った自己組織化マップ(ニューラルネットワーク)で、肝脂質蓄積量が推定できることが報告されており(Nishi et al. Sci Rep. 2018)、総体情報も生物学的に重要な情報性を有していることが示唆される。しかし、その詳細は解明されていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、アミノ酸を起点とする代謝物質群の変動情報を**代謝物質コード**として定義し、代謝物質コードを感知するメカニズムや、その情報が解読されて、特定の表現型に至る背景機序を明らかにすると共に、それを自在にコントロールすることができる手法を開発することで、代謝物質コードの理解と制御を試みる。本研究成果は、**アミノ酸を起点とした代謝物質の情報性に対する理解や評価法等に対して新しいモダリティをもたらす**ものであり、生命科学領域を大きく変換・転換させる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### (A) 分子生物学的アプローチによるアミノ酸を起点とした代謝物質コードの理解

本研究項目ではまず、アミノ酸の情報性を紐解くために、様々なアミノ酸の組み合わせからなる培養液を作成する。しかし、全ての組み合わせを試すと 1,048,576 パターンとなるため、研究予算の観点から、最終的には肝臓癌由来細胞株を①Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、②DMEM からアミノ酸を除いたもの (Zero)、③Zero に 0.4 mM のアルギニンを追加したもの(Z+Arg)、④Zero に 4 mM のオルニチンを加えたもの(Z+Orn)、⑤Zero に 4 mM のシトルリンを加えたもの(Z+Cit)で細胞を培養し、トランスクリプトームおよびメタボロームの解析を行った。

### (B) 合成生物学的アプローチによるアミノ酸を起点とした代謝物質コードの制御

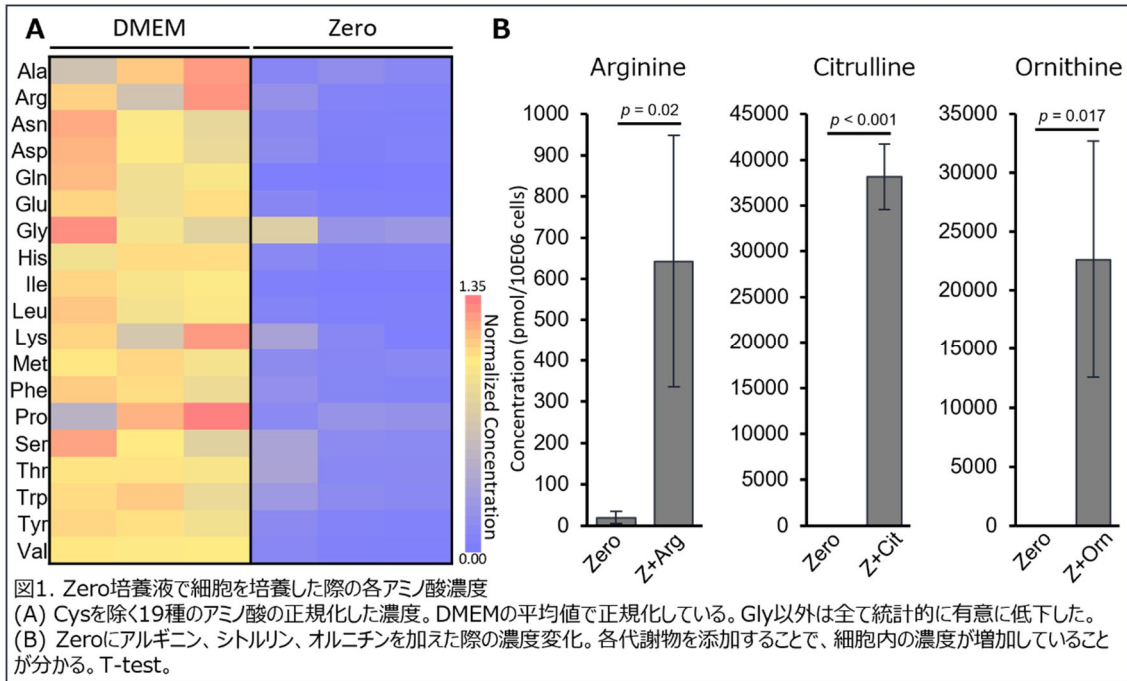
本研究項目では、上記研究項目(A)で同定した代謝物質コードを感知するタンパク質の機能制御を行うことで、**細胞外のアミノ酸環境を変えずに特定の代謝物質コードが入力された時と同様な表現型の再現を試みる**。本研究では、この前段階として、AMPK および mTORC1 のバイオセンサーを安定的に発現する細胞株を樹立した。さらにアミノ酸によって起こる様々な細胞内減少をラベルフリーで可視化できるようにするため、Convolutional Neural Network を用いたデジタルステイン技術と、高解像度な位相差顕

微鏡システムの確立を行った。

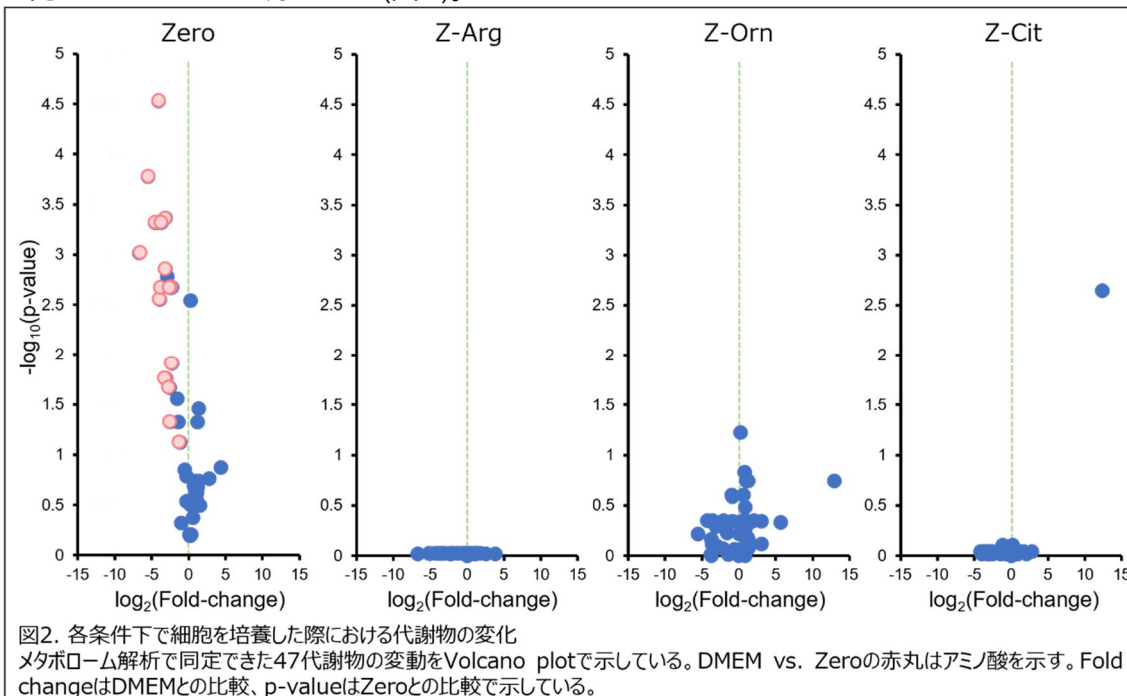
#### 4. 研究成果

##### ①細胞培養液中のアミノ酸量の変化に応答するオミクス情報

本研究ではまず初めに、肝臓癌由来細胞株を DMEM、Zero、Z+Arg、Z+Orn、Z+Cit で 6 時間培養した後にメタボローム解析を行った。その結果、Zero 培地で細胞を培養すると、グリシンを除く他の全てのアミノ酸について、その細胞内濃度が統計的に有意に低下した(図 1A)。さらに Zero 培地にアルギニン、シトルリン、オルニチンを加えた場合は、それぞれ添加した代謝物の細胞内濃度が統計的に有意に増加した(図 1B)。以上から、本研究で用いた培養液 ~ は、想定通りに細胞内のアミノ酸濃度を変えていると考えられた。



次に、培養環境が変わることで統計的に有意に変化する代謝物の同定を試みた。その結果、DMEM からアミノ酸を欠乏させると(Zero)、アミノ酸に加え、Kynurenine など、計 24 の代謝物の濃度が変化することが分かった(図 2)。一方、Zero 培地に代謝物を加えても、今回定量解析ができた代謝物については、統計的に有意な変動がほとんど見られないことが分かった(図 2)。



続いて、アミノ酸間で連動性があるかどうかを検討した。その結果、非常に多くのアミノ酸の量が連動性を以って動いていることが分かった(図 3)。

さらにこの条件下で変動する遺伝子の探索を行った。その結果、解析した 13410 遺伝子の内、DMEM から Zero にすることで 5218 遺伝子(38.9%)、Zero にアルギニンが加わることで 9 遺伝子(0.06%)、Zero にオルニチンが加わることで 2371 遺伝子(17.7%)、Zero にシトルリンが加わることで 1704 遺伝子(12.7%)が統計的に有意に変動することが分かった。現在、その再現性を確認している。

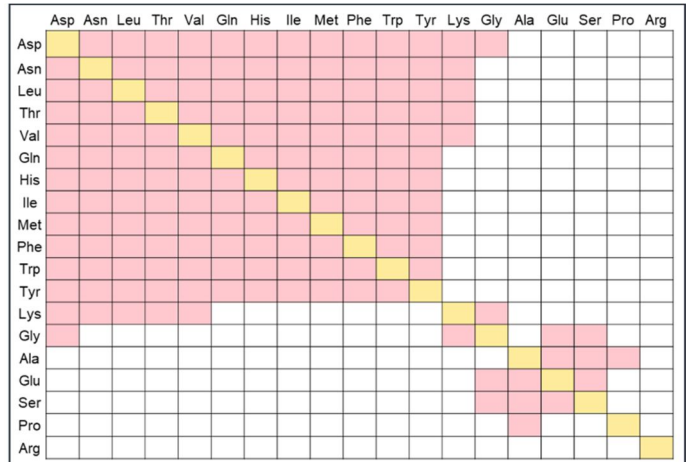


図3. 各アミノ酸の濃度変化における連動性  
15サンプル(各培養条件でn=3)を用いたピアソンの相関係数を示す。  
 $r > |0.8|$ を赤色、 $r = 1$ を黄色で示している。

## ②AMPK または mTORC1 のバイオセンサーを安定的に発現する細胞株の樹立

AMPK または mTORC1 のバイオセンサーを安定的に発現する細胞株を樹立するため、各バイオセンサー(AMPK: Miyamoto et al. Cell Rep. 2015; mTORC1: Zhou et al. Cell Rep. 2015)を PiggyBac Transposon Vector System に挿入し、安定発現細胞株の樹立を試みた。その結果、AMPK のバイオセンサーを安定的に発現する細胞株を樹立することはできたが、mTORC1 のバイオセンサーを安定的に発現する細胞株は樹立するには至らなかった。mTORC1 のバイオセンサーについては、dynamic range を改良してから、再度安定発現細胞株の樹立を試みる予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakagawa Yoshimi, Kumagai Kae, Han Song iee, Mizunoe Yuhei, Araki Masaya, Mizuno Seiya, Ohno Hiroshi, Matsuo Kazuya, Yamada Yasunari, Kim Jun dal, Miyamoto Takafumi, Sekiya Motohiro, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Takahashi Satoru, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Starvation induced transcription factor CREBH negatively governs body growth by controlling GH signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002784RR	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 Kainoh Kenta, Takano Ryo, Sekiya Motohiro, Saito Kenji, Sugasawa Takehito, Ma Yang, Murayama Yuki, Sugano Yoko, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Takeuchi Yoshinori, Yahagi Naoya, Suzuki Hiroaki, Miyamoto Takafumi, Nakagawa Yoshimi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 562
2. 論文標題 CtBP2 confers protection against oxidative stress through interactions with NRF1 and NRF2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 146 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.069	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 Akagi Reiko, Kubo Takanori, Hatori Yuta, Miyamoto Takafumi, Inouye Sachiye	4. 巻 170
2. 論文標題 Heme oxygenase-1 induction by heat shock in rat hepatoma cell line is regulated by the coordinated function of HSF1, NRF2 and BACH1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 501 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab065	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 Miyamoto Takafumi, Han Song-lee, Shimano Hitoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for rapid manipulation of mitochondrial morphology in living cells using inducible counter mitochondrial morphology (iCMM)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100721 ~ 100721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Takafumi, Uosaki Hideki, Mizunoe Yuhei, Han Song-lee, Goto Satoi, Yamanaka Daisuke, Masuda Masato, Yoneyama Yosuke, Nakamura Hideki, Hattori Naoko, Takeuchi Yoshinori, Ohno Hiroshi, Sekiya Motohiro, Matsuzaka Takashi, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Yahagi Naoya, Ito Koichi, Shimano Hitoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Rapid manipulation of mitochondrial morphology in a living cell with iCMM	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100052 ~ 100052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mehrazad Saber Zahra, Takeuchi Yoshinori, Sawada Yoshikazu, Aita Yuichi, Ho Man Hei, Karkoutly Samia, Tao Duhon, Katabami Kyoka, Ye Chen, Murayama Yuki, Shikama Akito, Masuda Yukari, Izumida Yoshihiko, Miyamoto Takafumi, et al.	4. 巻 582
2. 論文標題 High protein diet-induced metabolic changes are transcriptionally regulated via KLF15-dependent and independent pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.027	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 Sekiya Motohiro, Kainoh Kenta, Sugasawa Takehito, Yoshino Ryunosuke, Hirokawa Takatsugu, Tokiwa Hiroaki, Nakano Shogo, Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Takeuchi Yoshinori, Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 The transcriptional corepressor CtBP2 serves as a metabolite sensor orchestrating hepatic glucose and lipid homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26638-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Ken, Kandori Shuya, Sakka Shotaro, Nitta Satoshi, Tanuma Kozaburo, Shiga Masanobu, Nagumo Yoshiyuki, Negoro Hiromitsu, Kojima Takahiro, Mathis Bryan, Shimazui Toru, Watanabe Makoto, Sato Taka-Aki, Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 47
2. 論文標題 ELOVL2 promotes cancer progression by inhibiting cell apoptosis in renal cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.8234	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 Takeuchi Yoshinori, Yahagi Naoya, Aita Yuichi, Mehrazad-Saber Zahra, Ho Man Hei, Huyan Yiren, Murayama Yuki, Shikama Akito, Masuda Yukari, Izumida Yoshihiko, Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Kawakami Yasushi, Shimano Hitoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 FoxO-KLF15 pathway switches the flow of macronutrients under the control of insulin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103446 ~ 103446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okajima Yuka, Matsuzaka Takashi, Miyazaki Shun, Motomura Kaori, Ohno Hiroshi, Sharma Rahul, Shimura Takuya, Istiqamah Nurani, Han Song-lee, Mizunoe Yuhei, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Yatoh Shigeru, Suzuki Hiroaki, Sone Hirohito, Miyamoto Takafumi et al.	4. 巻 1868
2. 論文標題 Morphological and functional adaptation of pancreatic islet blood vessels to insulin resistance is impaired in diabetic db/db mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166339 ~ 166339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2022.166339	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------