

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580135

研究課題名（和文） 絶食時の生体エネルギー恒常性維持における酢酸代謝の重要性

研究課題名（英文） Significance of acetate metabolism in maintaining energy homeostasis during fasting

研究代表者

藤野 貴広 (Fujino Takahiro)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授

研究者番号：40292312

研究成果の概要（和文）：

アセチル CoA シンテターゼ 2 (AceCS2) を欠損する (AceCS2-KO) マウスは長期絶食状態に置くと酢酸を利用できないため低血糖、低体温及び運動持久力の低下を引き起こす。我々は肝臓にのみ AceCS2 発現する mAceCS2-Liv マウスを作製した。mAceCS2-Liv 及び AceCS2-KO マウスを 48 時間絶食させると著しい脂肪肝様の病態を示した。一方、これらのマウスに 0.5% クロフィブレート を 1 週間与えると、脂肪肝の著しい改善効果が観察された。また同時に血糖値、体温及び運動持久力の改善が認められた。これらの結果は、AceCS2-KO マウスに見られる長期絶食下での低血糖、低体温、運動持久力の低下及び脂肪肝の形成は遊離脂肪酸の代謝障害が主要な原因であると示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The mice lacking acetyl-CoA synthetase 2 (AceCS2-KO mice) show hypothermia, hypoglycemia and decreased exercise tolerance under the prolonged fasting due to impaired utilization of acetate. We generated the mice expressing AceCS2 only in liver (mAceCS2-Liv mice). When fasted for 48hrs AceCS2-KO and mAceCS2-Liv mice resulted in fatty liver. However, feeding of chow diet containing 0.5% clofibrate for 1 week to those mice improved fatty liver under the fasting condition. In addition, hypoglycemia, hypothermia and decreased exercise tolerance were also ameliorated. These results suggest that the phenotypes such hypoglycemia, hypothermia, decreased exercise tolerance and fatty liver seen in AceCS2-KO mice under the prolonged fasting caused by impaired metabolism of free fatty acid.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：酢酸、脂肪酸代謝、ケトン体、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

| 高等動物に於いて長期の飢餓状態により

貯蔵グリコーゲンが枯渇すると、脂肪組織より脂肪酸とグリセロールが動員され、脂肪酸は心筋、骨格筋等の β -酸化によってエネルギーを供給すると共に、グリセロールは肝臓や腎臓で糖新生に利用される。脂肪酸はまた、肝臓でアセチル CoA に酸化された後、ケトン体に生成され、直接脂肪酸を利用できない脳にエネルギー源を供給すると考えられてきた。しかし、最近我々は東京大学・酒井寿朗教授との共同研究により、アセチル CoA シンターゼ (AceCS) 2 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、長期飢餓状態における新たな脂肪酸代謝経路の重要性を発見した (Sakakibara et al. (2009) *Cell Metab.*)。高等動物が長期飢餓状態に置かれると脂肪組織より動員された脂肪酸が肝臓に流れ込むみ、ケトン体だけでなく、ペルオキシソーム β -酸化系で酢酸も生成され、肝臓から血中に放出される。この酢酸は心筋、骨格筋や褐色脂肪組織のミトコンドリアに局在する AceCS2 によりアセチル CoA 化されることで、重要なエネルギー源として機能していることが本欠損マウスの解析から明らかとなった。

高等動物における酢酸代謝はほとんど注目されてこなかっただけでなく、そもそも血中を酢酸が流れていること自体を知らない研究者が多い。また、我々を含めたこの分野の研究者でも、酢酸は生理的にケトン体の一つであると考えるのが一般的であった。しかし、AceCS2 欠損マウスを用いた研究により、酢酸にはケトン体や脂肪酸とはオーバーラップしない重要な機能を有していることが示された。そもそも、AceCS は酢酸を主要な基質とする脂肪酸活性化酵素 (ACS) の一つで、高等動物では 2 つのアイソザイム、AceCS1 と AceCS2 の存在が我々によって明らかにされた (Fujino T et al. (2001) *J. Biol. Chem.*)。AceCS は酢酸代謝の初発酵素で、本酵素により酢酸からアセチル CoA に変換されなければ、生体内で酢酸は代謝することが出来ない。AceCS1 は肝臓、腸、脂肪組織、乳腺など、脂質合成の盛んな組織中に高く発現する酵素で、脂肪酸やコレステロール生合成に利用されるアセチル CoA を供給すると考えられている。これに一致して、肝臓の AceCS1 はコレステロールによるステロール調節領域結合タンパク質 (SREBP) を介した発現調節を受ける。一方、AceCS2 は酢酸に対して最も活性が高く、プロピオン酸にも若干の活性を示す酵素で、心臓、骨格筋、腎臓などのミトコンドリア・マトリクス内に局在するが、肝臓には全く発現していない。AceCS2 は長期飢餓状態では心筋や骨格筋で著しい発現誘導を受け、脂肪酸の分解によって肝臓で生じた酢酸からエネルギー産生のためのアセチル CoA を生成していると考えられている。また一方で、

AceCS1 及び AceCS2 が共にアセチル化による修飾を受け、この修飾が酵素活性を調節していることが明らかとなった (Starai VJ et al. (2002) *Science*)。また、これら AceCS の脱アセチル化を SirT1 及び SirT3 が担っていることも判明し、エネルギー代謝における AceCS1 及び AceCS2 の新たな調節機構が示唆された。カロリー摂取の制限は、広い生物種において実験的に老化を延滞させ、寿命を延長させる。近年、NAD 依存性脱アセチル化酵素 (Sirtuins) が老化・寿命の制御に重要な役割を果たしている事が明らかにされた。また Sirtuin は、その酵素活性に NAD を要求することから、エネルギー代謝と老化制御を結びつける重要な役割を果たしていると考えられている。エネルギー代謝におけるタンパク質アセチル化のターゲットの一つとして、現在その調節に注目を集めているのがアセチル CoA シンターゼである。Sirtuin は、ヒストンやガン抑制遺伝子 (p53) の脱アセチル化によるヘテロクロマチン形成を介した遺伝子発現のサイレンシングやゲノム安定性の維持を通して、老化・寿命の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。ほ乳類では、現在までに 7 つの Sirtuin (SirT1~T7) アイソザイムの存在が知られているが、ヒストンや p53 以外の脱アセチル化ターゲットは明らかにされていない。アセチル化 AceCS1 の発見と Sirtuin による活性の調節はエネルギー代謝における AceCS の新たな機能の存在を示唆している。AceCS がアセチル化によって活性が直接調節されている事は大変重要で、Sir による AceCS のアセチル化制御機構の解明は、エネルギー代謝、すなわち酢酸代謝と老化制御を結びつける新たなメカニズムを示す可能性が考えられている。

2. 研究の目的

アセチル CoA シンターゼ (AceCS) 2 遺伝子欠損マウスは絶食状態に置くと、著しい低血糖と共に低体温と運動持久力の低下を引き起こし、48 時間以内に半数以上のマウスが死亡する。不思議なことに、このマウスの血中ケトン体及び遊離脂肪酸濃度は野生型コントロール群と同程度であることから、この表現型は酢酸を利用出来ないことが直接の原因であり、これは脂肪酸やケトン体では補えないことを示した。一方で、ピルビン酸の投与は低血糖と低体温を素早く改善することから、糖新生経路は正常である事が示された。すなわち、長期絶食状態の心筋、骨格筋では、エネルギー源として脂肪酸を優先的に使用することでグルコース消費量を節約していると考えられてきたが、さらに酢酸もグルコースを節約する上で重要なエネルギー源であることが示唆された。しかし、長期

飢餓時に於いては生体エネルギー恒常性を維持する上では、脂肪酸やケトン体だけでなく酢酸も重要であることが示されたが、心筋、骨格筋及び褐色脂肪組織で酢酸を必要とするメカニズムは依然として不明である。本研究課題では AceCS2 欠損マウスの解析で明らかとなった、「飢餓時の生体エネルギー恒常性維持における酢酸代謝の重要性」の基本的なメカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 肝特異的 AceCS2 発現マウスの作製

マウス AceCS2・cDNA をアルブミン・プロモーターの下流に連結し、更に SV40 由来のポリ A 付加シグナルを連結することで、トランスジェニック (Tg) マウス作成用ミニジーンを構築した。ベクター部分を切り離れたミニジーンを受精卵前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植することで、肝特異的 AceCS2 発現 (mAceCS2-Tg) マウスを作製した。ミニジーンがゲノム中に挿入されたマウスは、イントロンを挟む特異的プライマーを用いて選別した。5 系統のマウスが得られ、それぞれを AceCS2 欠損 (AceCS2-KO) マウスと掛け合わせることで肝でのみ AceCS2 を発現するマウス (mAceCS2-Liv マウス) を作製した。

(2) 血清中パラメーターの解析

血清中の酢酸濃度は FID 検出器を備えたキャピラリーカラム式ガスクロマトグラフ装置 (島津製作所) により解析した。カラム温度は 140°C、検出温度は 300°C で行った。血清の前処理段階でヘプタン酸を規定量加えることで内部標準とした。血清中の総及び遊離コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度、トリグリセライド濃度、グルコース濃度、ケトン体濃度はそれぞれコレステロール E-テストワコー、遊離コレステロール E-テストワコー、NEFA C-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー、グルコース CII-テストワコー、オートワコー総ケトン体 (いずれも和光純薬) を用いて測定した。

(3) 動物実験

動物実験は愛媛大学動物実験倫理規定に従って行い、飼育に関しては動物実験倫理委員会にて許可を受けた場所で行った。AceCS2-KO 及び mAceCS2-Liv マウスは室温 25°C、明暗期をそれぞれ 12 時間に設定した飼育室でローデントダイエット EQ (日本 SLC) を用いて飼育した。ペルオキシソーム増殖剤による誘導は、0.5% クロフィブレート (和光純薬) を含むローデントダイエット EQ を 1 週間、自由摂食させることで行った。

(4) ウェスタンブロッティング

組織サンプルはプロテアーゼ阻害剤 (ナカライ) を含む PBS 中で超音波処理し、等量の

2X サンプルバッファーを加えた。100°C で 5 分間、加熱後、ウェスタンブロッティングに供した。タンパク濃度は DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いて測定した。SDS-PAGE 後、ゲル中のタンパク質は PVDF 膜に転写された。膜上の目的タンパク質の検出は特異抗体及びペルオキシダーゼ標識 2 次抗体 (Vector)、化学発光試薬 (和光純薬) によって検出した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア型の酢酸活性化酵素 2 欠損 (AceCS2-KO) マウスは長期絶食状態に置くと、酢酸利用障害のため血中酢酸濃度が著しく上昇し、これと共に低血糖、低体温及び運動持久力の低下を引き起こす。しかし、本マウスの血中脂肪酸及びケトン体濃度は野生型コントロールと比較して有意な違いは見いだされない。そこで、この表現型が血中酢酸濃度上昇による心筋、骨格筋及び褐色脂肪組織のエネルギー代謝障害、すなわち、ケトン体や長鎖脂肪酸の利用障害であるかどうかを解析した。AceCS2 を本来発現していない肝臓で発現するトランスジェニックマウス (mAceCS2-Tg) を作製し、AceCS2-KO マウスと掛け合わせた。この mAceCS2-Liv マウスでは、血中の酢酸濃度はある程度低下したが、AceCS2-KO マウスとほぼ同様、低血糖、低体温及び運動持久力の低下を特徴とする表現型を示した。また、通常飼育環境下での AceCS2 欠損マウスの心拍を解析したところ、野生型と比較して高頻度に不整脈が出現することも明らかとなった。これらの結果は、心筋、骨格筋及び褐色脂肪組織に於ける主要なエネルギー源は酢酸であることが示唆された。さらに、AceCS2 を欠損した雄マウスは不妊で、精子の形態に異常は観察されないことから、精子も運動のエネルギー源として酢酸を利用していることが示唆された。

(2) AceCS2-KO マウスは高カロリー食摂取による肥満誘導に対して抵抗性を示す。そこで mAceCS2-Liv マウスを用いることで AceCS2-KO マウスに見られる肥満抵抗性メカニズムを解析した。高脂肪食負荷において mAceCS2-Liv マウスと AceCS2-KO マウスとの間に体重増加に関する違いは見いだせなかったが、これらマウスを 24~48 時間絶食させると肝臓において著しい脂肪肝様の病態を示し、肝組織切片のオイルレッド O 染色では肝細胞の細胞質に多数の脂肪滴が観察された。また、脂肪蓄積量では明らかに AceCS2-KO マウスよりも mAceCS2-Liv マウスで高かった。一方、AceCS2-Tg マウスの肝臓に脂肪滴はほとんど観察されなかった。これらの結果は末梢組織における酢酸代謝に障害が起きると肝細胞内の内のアセチル CoA を上昇させ、絶食時においても肝脂質合成を亢進又は脂肪

細胞由来の脂肪酸の分解を抑制していることを強く示唆した。また、AceCS2が肝臓以外の組織に於いて酢酸の酸化によるエネルギー産生だけでなく、脂質合成にも深く関わっている可能性を示した。

(3) AceCS2 欠損マウスは普通食飼育下でも血中酢酸濃度が著しく上昇しており、通常の生理的条件下でも脂肪酸は盛んに酢酸へと変換されて代謝されていることが示された。これまでの報告から、ペルオキシソームβ-酸化系が酢酸生成に重要な細胞内小器官であることが示唆されていることから、マウスにフィブラート系薬剤（ペルオキシソーム増殖剤）を投与し、肝臓における脂肪蓄積状態を解析した。0.5%クロフィブレードをmAceCS2-Liv マウスと AceCS2-KO マウスに1週間与えた後、24~48時間絶食後の肝臓組織をオイルレッドO染色で解析した所、脂肪肝様病態の著しい改善効果が観察された。また同時に、血糖値、体温及び運動持久力の改善が認められた。これらの結果は、AceCS2-KO マウスに見られる長期絶食下での低血糖、低体温、運動持久力の低下及び脂肪肝形成は脂肪組織から動員され肝臓に流れ込んだ長鎖脂肪酸の代謝障害が主要な原因であること示唆された。

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2件)

1. Dau P. T., Sakai H., Hirano M., Ishibashi H., Tanaka Y., Kameda K, Fujino T., Kim EY. and Iwata H. Quantitative Analysis of the Interaction of Constitutive Androstane Receptor with Chemicals and Steroid Receptor Coactivator 1 Using Surface Plasmon Resonance Biosensor Systems: A Case Study of the Baikal Seal (*Pusa sibirica*) and the Mouse. *Toxicol Sci.* **131**, 116-127 (2013)

2. Tanaka Y., Komori H., Mori S., Soga Y., Tsubaki T., Terada M., Miyazaki T., Fujino T., Nakamura S., Kanno H., Sawasaki S., Endo Y. and Nose M. Evaluating the role of rheumatoid factors in the development of rheumatoid arthritis in a mouse model with a newly established ELISA system. *Tohoku J. Exp. Med.* **220**, 199-206 (2010)

[学会発表] (計5件)

1. 藤野貴広「中枢神経系におけるアポE含有HDLの生成及び代謝メカニズム」、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月25日、仙台市

2. 藤野貴広「アポEとその関連遺伝子の生物学的意義」、第44回日本動脈硬化学会総会、2012年7月20日、福岡市 (シンポジウム)

3. 藤野貴広、重川庸介、佐藤寛之、能丸幸治、岩田久人「ケラチノサイトのEGFによるダイオキシンの毒性発現抑制メカニズム」、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月25日、京都市

4. 藤野貴広、劉明哲、植田和光、長尾耕治郎「Effect of apoE isoforms on ABCA1-mediated cholesterol efflux」、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月26日、京都市

5. 藤野貴広、劉明哲、植田和光、長尾耕治郎「Effect of apoE isoforms on ABCA1-mediated cholesterol efflux」、第42回日本動脈硬化学会総会、2010年7月15日、岐阜市 (招待講演)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 貴広 (Fujino Takahiro)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授

研究者番号：40292312