

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 5月28日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580140
 研究課題名（和文） タンパク質必要量と可欠アミノ酸の代謝制御に関する研究
 研究課題名（英文） Studies on the regulatory mechanism of dispensable amino acids metabolism in response to protein requirement.
 研究代表者
 金本 龍平（KANAMOTO RYUHEI）
 京都大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：70147297

研究成果の概要（和文）：メチオニンがタンパク質栄養のシグナルとなり肝臓の可欠アミノ酸（セリンとアスパラギン）代謝酵素のタンパク質必要量に応答した発現を制御する可能性が示された。また、新しい栄養環境への適応にはシグナルの継続性（同じ食環境が継続する）が必要であることが示された。さらに、タンパク質栄養への応答性には臓器特異性が有り、可欠アミノ酸の必要量が臓器によって異なることが示された。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that methionine play a signal for protein nutrition and regulates the expression of enzymes of dispensable amino acids synthesis in response to protein nutrition. To adapt for different protein nutrition, consecutive nutritional signal must be required. In addition, the adaptative response of the expression of enzymes to protein nutrition is different in respective organs, suggesting that requirement of dispensable amino acids differ from organ to organ.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学・栄養生化学

キーワード：栄養生化学、アミノ酸代謝、タンパク質必要量、可欠アミノ酸、アミノ酸応答経路

1. 研究開始当初の背景

タンパク質必要量の基本となるのは「制限アミノ酸」の概念であるが、これには可決アミノ酸が全く考慮されていない。可欠アミノ酸は必ずしも食事から摂取する必要がないアミノ酸と定義されるが、これはその供給を食餌に依存せず、常に代謝要求量を満たさなければならないアミノ酸と考えることが出来る。しかし、可決アミノ酸の供給がどのよう

に担保されているかと言う発想からの研究は皆無である。申請者は、タンパク質の「必要量」をキーワードに成長期と成熟期のラットを用いてタンパク質必要量に対する肝臓アミノ酸代謝酵素の応答を解析してきた。その結果、セリン合成の律速酵素である3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素とアスパラギン合成酵素の肝臓における発現が、単に餌のタンパク質含量に依存するだけでなく、必要量

に応答して誘導されることを見出し「それぞれの組織における可決アミノ酸の代謝は、制限アミノ酸の充足率に応答して制御される」と言う仮説を提唱している。本仮説は可決アミノ酸代謝が組織の必要量とそれに対する制限アミノ酸の充足率に応答して極めて合理的になされることを示すもので、これが証明されればタンパク質栄養学に新しい知見を提供すると共に、不可欠アミノ酸のみでは十分な成長が得られないことや、アミノ酸インバランスなど、栄養生理学的によく知られている現象の機構解明への展開が期待される。また、最近アミノ酸がサプリメントとして摂取されているが、過剰摂取による弊害が危惧されるようになり、国際的に安全な摂取量を定めようと議論がなされている。本仮説は、特定のアミノ酸摂取が、遺伝子発現を介して可決アミノ酸代謝をかく乱する可能性をも示唆するものであり、本研究の成果は安全量策定に当たって、分子レベルでの知見を与えるものと期待される。

2. 研究の目的

可決アミノ酸の供給が日常的に起こる栄養環境の変化に対しどのように担保されているのか、これまで顧みられることはほとんどなかった。申請者は、「それぞれの組織における可決アミノ酸の代謝は、制限アミノ酸の充足率に応答して制御される」と言う仮説を提唱している。本研究では、アミノ酸代謝酵素の発現を指標にこの仮説を実証し、その制御に最近培養細胞を用いた研究で見出されたアミノ酸応答(AAR)経路が寄与するか否かを明らかにする事を目的としている。

3. 研究の方法

(1) タンパク質栄養の認識と可欠アミノ酸代謝酵素の発現制御
成熟ラットを無タンパク質食で飼育した後、タンパク質食に切り替えてから PHGDH と AS の mRNA およびタンパク質、ならびに ATF4 タンパク質と eIF2 α のリン酸化レベルの変化を RT-PCR とウェスタンブロット法により測定する。次に、タンパク質含量を段階的に変化させ 12 時間後の発現量を比較する。

(2) タンパク質必要量に応答した PHGDH と AS の発現

成熟ラットに無タンパク質食と 25%カゼイン食を交互に与え、PHGDH と AS の mRNA およびタンパク質を RT-PCR とウェスタンブロット法により測定する。

(3) シグナル分子となるアミノ酸の検索
カゼインを模したアミノ酸混合食を調製し、いずれか 1 種類のアミノ酸を欠失させて与

え、mRNA とタンパク質の発現を比較する。また、門脈にカテーテルを留置し、タンパク質の摂取に伴う門脈血中アミノ酸濃度の経時変化を測定する。

(4) タンパク質栄養と各種臓器における PHGDH、AS の発現

成長期のラットに 6%、25%、50%カゼイン食を与え、肝臓、小腸、骨格筋、精巣、胸腺、脳、腎臓、心臓、脾臓、骨髄における両酵素の mRNA とタンパク質量を測定

4. 研究成果

(1) タンパク質栄養の認識と可欠アミノ酸代謝酵素の発現制御
タンパク質栄養の変化が可欠アミノ酸代謝酵素の発現に与える影響を明らかにするために、成熟ラットを無タンパク質食で飼育し、AS と PHGDH を誘導した後に、25%カゼイン食に切り替え、その後の摂食量と両酵素の mRNA と酵素タンパク質の経時変化を調べた。

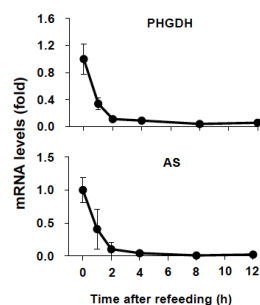


図 1. 摂食後の PHGDH と AS mRNA の経時変化

その結果、驚くべきことに再摂食後 1 時間後にはすでに両酵素とも mRNA レベルの減少が見られ、2 時間後にはすでに 12 時間後と同等のレベルまでにまで発現が抑制されていた (図 1)。また、このときの摂食量をみると、再摂食後 1 時間では 2.3 ± 1.5 g であり、1 日の摂食量およそ 20 g の約 1/10 程度であった (表 1)。

Time after refeeding (hours)	Food cumulative (g)
1	2.3 ± 1.5
2	3.5 ± 1.4
4	7.5 ± 0.8
8	9.2 ± 0.2
12	13.9 ± 5.6

表 1. 摂食量の経時変化

このことは摂取したタンパク質量ではなく、食餌に含まれるタンパク質量の変化を認識して、肝臓での両酵素遺伝子の発現制御のシグナルが摂食後即座に切り替わることを示している。そこで次に、タンパク質量を

変化させて検討した。その結果、図2に示すように、両酵素のmRNAの発現はカゼイン含量に依存して減少し、12%カゼイン食でほぼ抑制された。成熟ラットのタンパク質必要量はカゼイン含量10%の餌で満たされることから、このことから必要量に応じて発現が制御されることが示された。

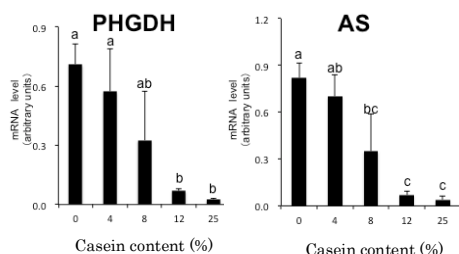


図2. 食餌カゼイン含量と PHGDH と AS mRNA の発現

しかし、このときの酵素タンパク質量は mRNA の変化と一致せず、餌を切り替えてから24時間を経てから、初めてその発現レベルに減少が見られるようになった(図3)。

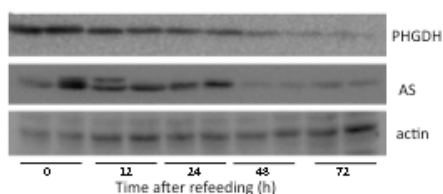


図3. 摂食後の PHGDH と AS タンパク質の経時変化

ところで、培養細胞を用いた実験からアミノ酸飢餓のシグナル伝達経路として、アミノ酸応答(AAR)経路が見出されており、ASはこの経路の標的遺伝子の一つであることが知られている(図4)。

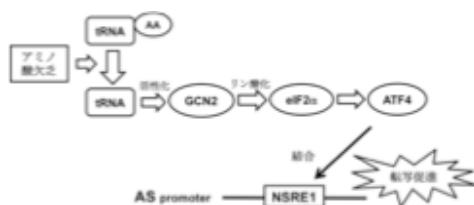


図4. アミノ酸応答(AAR)経路の概略

しかし、この経路が生体内で機能するか否かは知られていない。そこで、ASの発現変動にアミノ酸応答(AAR)経路が関与するか否かを、ASプロモーターに結合する転写因子ATF4と、その上流に位置するeIF2αのリン酸化レベルの変化をそれぞれの抗体を用いたウェスタンブロット法により測定することで検討した。ATF4は肝細胞核の抽出液を調製し検出を試みたが、検出することは出来なかった。一方、eIF2αのリン酸化レベルは、タンパク

質食摂取後12時間でもほとんど変化が見られなかった。これらの結果から、肝臓におけるASの発現制御にAAR経路の関与はないものと考えられた(図5)。

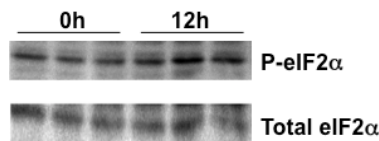


図5. 0%カゼイン食から25%カゼイン食に切り替えた時のeIF2αのリン酸化

(2) タンパク質必要量に応答した PHGDH と AS の発現

これまでの結果から、両酵素の mRNA は餌のタンパク質含量を認識して制御され、必要量以上ではその発現が抑制されることが明らかになった。しかし、酵素タンパク質レベルと mRNA の変化とは一致せず、タンパク質栄養の認識とタンパク質栄養への適応の間にギャップがあることが示された。そこで、次にタンパク質栄養の認識と適応との関連を無タンパク質食とタンパク質食を交互に与えることで調べてみた。

図6は25%カゼイン食と0%カゼイン食を交互に与え1週間後に肝臓における両酵素の mRNA とタンパク質含量を示している。

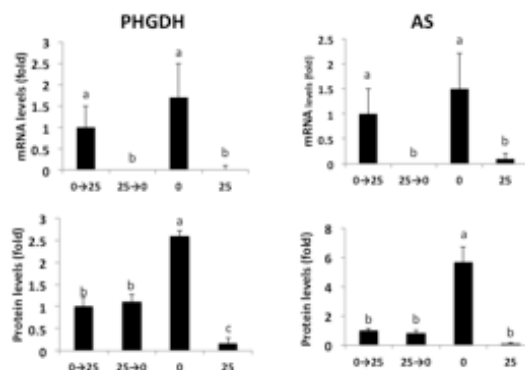


図6. 25%カゼイン食と0%カゼイン食を交互に与えた時の PHGDH と AS の mRNA (上) とタンパク質 (下) の発現量の関係

PHGDH、ASの mRNA は共に0%カゼイン食を与え続けた群では高い発現を示すが、25%カゼイン食を与え続けた群での発現は強く抑制される。一方、0%カゼイン食と25%カゼイン食を交互に与えた群では、最後に0%カゼイン食を与えた場合(0→25)に PHGDH と AS の mRNA の高い発現が見られ、25%カゼイン食を与えた場合(25→0)の発現は抑制された。ASのタンパク質発現量は共に0%カゼイン食を与え続けた群では高い発現を示しましたが、25%カゼイン食を与え続けた群での発現量は非常に低かった。一方、0%カゼイン

食と 25%カゼイン食を交互に与えた群では、屠殺時の mRNA の発現量に関わらず、0%カゼイン食を与え続けた群と 25%カゼイン食を与え続けた群の中間の発現量となり、かつ、両群に差は見られなかった。

次に 0%カゼイン食と 25%カゼイン食を 0→0→25、25→25→0 のように 1 週間与えてから順次と殺し、mRNA とタンパク質量を測定したところ、mRNA の発現量は前日に与えた餌に依存し、0%カゼイン食を与えた時はその発現が増加し、25%カゼイン食を与えた時は減少した。しかしこの間、タンパク質の発現量はほぼ一定で変化せず、かつ 0→0→25%群の方が、25→25→0%群より高い発現量を示めた (図 7)。

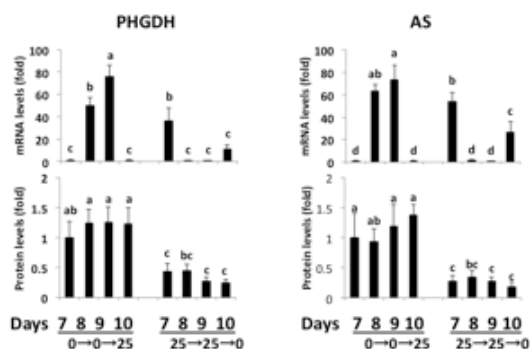


図 7. 25%カゼイン食と 0%カゼイン食を交互に与えた時の PHGDH と AS の mRNA (上) とタンパク質 (下) の発現量の関係

これまでの考えでは、栄養素の代謝酵素は体内の栄養環境の変化に適応してその発現が変動すると考えられてきた。今回の結果は栄養素の摂取量ではなく、餌に含まれる栄養素の含量を認識して発現が制御され、代謝への適応は、そのシグナルが一定期間持続することが必要であることを示している。これは、酵素タンパク質の半減期が mRNA の半減期より長いことによるものと考えられる。近年、栄養素が単に生体の構成素材としてだけではなく、シグナルとしての性質を持つことが明らかにされつつある。しかし、そのほとんどは培養細胞を用いてなされ、摂食にともなうシグナルの性質は未だ知られていない。一般に新しい栄養環境への適応には数日かかることが知られているが、本研究での知見はシグナルとしての栄養素の認識機構と栄養環境への代謝適応機構を分子レベルで初めて示したものである。

(3) シグナル分子となるアミノ酸の検索

次に、アミノ酸がタンパク質栄養のシグナルとなるか否かを検討した。12%のカゼインを模したアミノ酸混合食とその中から 1 種類のアミノ酸を欠失させた餌を調製し、無タンパク質食で AS と PHGDH を誘導したラットに与

え 12 時間後の mRNA レベルを測定した。

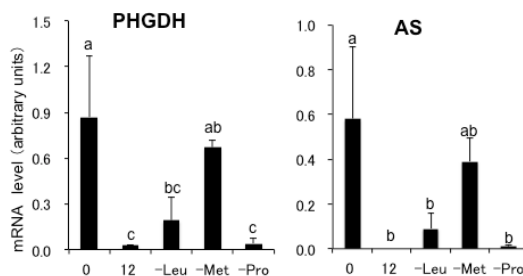


図 8. アミノ酸欠失食を与えたときの PHGDH と AS mRNA の発現

図 8 に結果の一例を示すが、Met を欠失させると無タンパク質食を与えた場合と同様に mRNA の減少は見られなくなった。これと逆にカゼイン食で飼育しておいてから、1 種類のアミノ酸を欠失させた餌を与えところ、やはり Met を欠失させた餌のみが無タンパク質食と同様に AS、PHGDH を誘導した。このような減少は他の不可欠アミノ酸や可欠アミノ酸では見られなかった。以上のことから Met がタンパク質栄養のシグナルとなり、AS と PHGDH の発現を制御する事が示唆された。アミノ酸混合食から 1 種類不可欠アミノ酸を欠失させた食餌の栄養価は、化学価から見ると無タンパク質食と同様 0 となるが、生物価はアミノ酸によって異なることが知られている。つまり、Met を欠失させた餌は無タンパク質食と同様の生物価になるが、Leu を欠失させてもあまり生物価は低下しない。これは Met の代謝要求量が他の不可欠アミノ酸に比して高いことによると考えられる。従って、生物価に最も大きく影響する Met がタンパク質栄養のシグナルとして機能することは十分考えられる。

Met がシグナルとなるなら、Met の血漿濃度が摂食に伴い変動することが考えられる。この可能性を明らかにするため、ラットの肝門脈にカテーテルを留置しフリームービングで採血する方法を開発し、摂食に伴う門脈アミノ酸濃度の経時変化を測定した (図 9)。

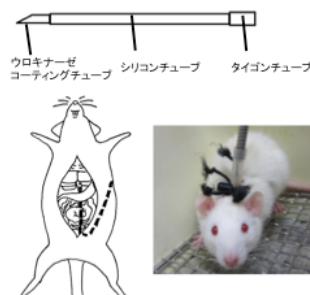


図 9. 門脈カテーテル 血栓を防止するためウロキナーゼコーティングチューブを用いてカテーテルを作成し、腸側から門脈へカテーテルを挿入した。カテーテルは小腸をくぐるようにして腹部前面に通し、背中の皮下を通して後頭部から出し、ハーネスで固定して自動採血装置に接続した。

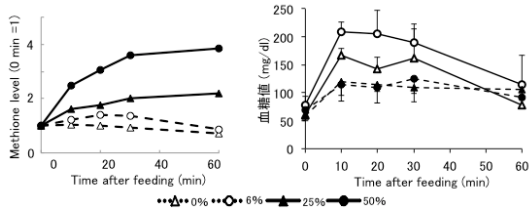


図 10 異なるカゼイン含量の食餌を与えたときの門脈血漿中のメチオニン濃度と血糖値の経時変化

図 10 は 12 時間絶食させた成長期のラットに 0、6、25、50%カゼイン食を与えた後の血糖値と Met の経時変化を示したものである。血糖値は摂食後直ちに上昇し、10 分で最大となるがタンパク質含量の低い（糖質含量が高い）餌ほど、高い値を示し、0%カゼイン食では 50%カゼイン食の約 3 倍となった。一方、Met の濃度も摂食後 10 分ですでに上昇し始め 30 分でほぼプラトーとなる。また、濃度変化はタンパク質含量の多い餌ほど著しく 30 分後には 25%カゼイン食でおおよそ 2 倍、50%カゼイン食では 4 倍となっている。この結果は、摂食後の門脈血 Met の血漿濃度の変化がシグナルとなる可能性を示唆している。

(4) タンパク質栄養と各種臓器における PHGDH、AS の発現

PHGDH と AS は様々な臓器で発現することが報告されている。しかし、それらの臓器における発現とタンパク質栄養の関係は知られていない。そこで、これら臓器の発現がタンパク質栄養によって影響を受けるか否かを成長期のラットに 6%、25%、50%カゼイン食を与え、肝臓、小腸、骨格筋、精巣、胸腺、脳、腎臓、心臓、脾臓、骨髄における両酵素の mRNA とタンパク質量を測定した。その結果、いずれの臓器においても mRNA とタンパク質の発現量はほぼ一致した動きを示したが、臓器によってその発現パターンは異なることが明らかとなった（図 11）。

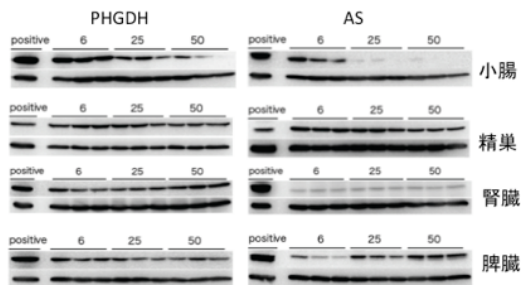


図 11. 異なるカゼイン含量の食餌を与えたときの各臓器における PHGDH と AS タンパク質の発現量。各画像の下段は内部標準として用いたグリセロールデヒド 3 リン酸脱水素酵素の発現量を示す。また、ポジティブコントロールとして、6%カゼイン食を与えたときの肝臓での発現を左端に示している。

例えば小腸と骨格筋は、タンパク質栄養に対し、肝臓と同じ応答を示し、必要量以下の低タンパク質食で誘導され、必要量を超えるとその誘導は抑制された。一方、精巣、胸腺、脳では PHGDH、AS ともタンパク質栄養の影響を受けなかったが、常に 6%カゼイン食の肝臓と同等の強い発現を示した。腎臓と心臓もタンパク質栄養の影響は受けませんが、PHGDH は強く発現するが、AS は弱い発現を示した。興味深いことに、脾臓と骨髄の AS はタンパク質含量の増加に伴いその発現量も高くなったが、PHGDH の発現はタンパク質栄養の影響を受けず常に高い発現を示した。このことは、臓器によってセリンとアスパラギンの必要量が異なり、また、その供給を血液に依存するものと *de novo* に合成するものとに別れることが示唆された。

(5) 今後の展開

本研究の結果は、タンパク質栄養の認識は摂取した栄養素の量ではなく、食事に含まれるタンパク質含量、おそらくは Met 量がシグナルとなり認識される可能性を示唆している。そのシグナルは摂食とともに認識され直ちに代謝酵素の遺伝子の発現を制御するものと考えられる。しかし、mRNA 量の変化に対し、酵素タンパク質の変化は遅れて起こる。このことからタンパク質栄養のシグナルは摂食とともに認識されるが、代謝応答が起こるのは同じ食環境が継続することが必要であることを意味している。つまり質の認識は栄養素の濃度でなされ、量の認識はそのシグナルの継続性でなされると考えることが出来る。このような発想はこれまでの研究にはなく、今後、栄養素の認識と制御機構を解明する上で異なった視点からの新しい展開が期待できる。

肝臓はアミノ酸代謝の中心臓器で有り、アミノ酸代謝酵素が食事からの供給量に依存してその発現を変化させることは合理的である。一方、各臓器における発現は、臓器によって異なることが本研究によって明らかとなった。これは各臓器の必要量に応じて代謝酵素が制御されるという申請者の仮説の一部を証明しているものの、必ずしも制限アミノ酸の充足率に応答するという事ではないことを示している。一方、この知見を基に、臓器特異的なノックアウトあるいはノックダウンの手法を用いた研究を展開すれば、可欠アミノ酸の未知の生理的機能が明らかになるものと期待できる。

近年がん細胞の増殖にセリン、アスパラギンの *de novo* 合成が必須であることが報告され、PHGDH や AS をターゲットとした治療薬が模索されている。本研究結果はこれらの酵素の発現は臓器によって異なることを明らかにしており、治療薬を開発するに当たって有

用な知見を提供するものと考えられる。

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 2 件)

- ① W. Imamura, R. Yoshimura, M. Takai, J. Yamamura, R. Kanamoto, H. Kato, Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: a transcriptomic analysis to identify useful biomarkers, J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 査読有り、 Vol. 59、 2013、 pp. 45-55.
- ② Ryoji YOSHIMURA, Yee Yin HO, Takafumi MIZUSHIGE, Kousaku OHINATA, and Ryuhei KANAMOTO, The Vagotomy Alleviates the Anorectic Effect of an Excess Amount of Dietary Leucine on Rats Fed a Low-protein Diet, Biosci. Biotech. Biochem. 査読有り、 *in press*

[学会発表] (計 11 件)

- ① 金本龍平、タンパク質栄養と可決アミノ酸代謝酵素の発現制御、日本外科代謝栄養学会・日本アミノ酸学会合同シンポジウム、平成 23 年 7 月 8 日、名古屋国際会議場
- ② 中瀬純平 他 2 名、Regulation of the gene expression of dispensable amino acid-metabolic enzymes by ingestion of dietary protein、国際栄養学会議、平成 23 年 7 月 14 日、Suntec Singapore International Convention & Exhibition Centre.
- ③ 吉村亮二 他 3 名、低タンパク質栄養時における Leu 過剰摂取が可欠アミノ酸代謝酵素の発現に与える影響、日本農芸化学会大会、平成 24 年 3 月 24 日、京都女子大学
- ④ 生木 裕也 他 7 名、食餌のメチオニンはラット肝臓におけるアスパラギン合成酵素と 3- ホスホグリセリン酸脱水素酵素の遺伝子発現を制御する、第 6 7 回日本栄養・食糧学会大会、平成 25 年 5 月 25 日、名古屋大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.sseiri.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金本 龍平 (KANAMOTO RYUHEI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70147297

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：
