

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380074

研究課題名(和文) 肝臓・消化管オートファジーの栄養素センシング/シグナリング機構

研究課題名(英文) Nutrient sensing and signaling mechanisms of hepatic and intestinal autophagy

研究代表者

門脇 基二 (Kadowaki, Motoni)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：90126029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内成分を大規模に分解し、再構成に関与するオートファジーについて、栄養と最も関係の深い臓器である肝細胞と消化管を用いて栄養性制御とそのシグナリング機構の詳細を解析した。特にアミノ酸や食品成分での制御機構について、またオートファジーマーカーであるLC3タンパク質や関連分子群のmRNAの制御、さらには寿命遺伝子と言われるサーチュインとの関連づけを行った。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a ubiquitous, intracellular system to degrade and recycle cellular components. The nutritional regulation of autophagy was investigated in rat hepatoma H4-II-E cells and gastrointestinal tracts. Especially, the mechanism of regulation, various signaling mechanisms of each amino acid was proved to be ROS-dependent and -independent. Arginine uses NO pathway and mTOR-independent. The level of mRNA of LC3 molecule, an autophagy marker, and related Atg genes regulated by amino acids was discovered. Anti-oxidative food components, epigallocatechin gallate and resveratrol, stimulated autophagy. Finally, the relationship of amino acid regulation of autophagy with sirtuins, an anti-aging gene, were investigated.

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：オートファジー アミノ酸 肝細胞 LC3 アルギニン 活性酸素種 サーチュイン

1. 研究開始当初の背景

近年爆発的な発展を遂げつつある「オートファジー」分野において、老化、ガン、神経変性疾患等の制御・治療にはその制御機構の解明が最重要課題である。本研究は、特にアミノ酸を中心とする栄養性制御機構の詳細を追求するとともに、老化防止につながるビタミンによる促進性制御、さらに新たに消化管をターゲットにオートファジー制御論の理解と拡大を格段に推進するものである。栄養性制御の場合に最も重要な二大臓器である肝臓と消化管を取り上げる。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞でのオートファジー調節

アミノ酸による抑制的制御機構

一般には「アミノ酸」とひとくくりにはされているが、肝臓では約8種類のアミノ酸が直接の制御作用を持つ。果たしてアミノ酸は共通の調節機構を持つのか、それとも個別のアミノ酸で異なる多様な調節機構を持つのか、詳細を検討する。

(a) アルギニンによる制御機構

本研究室でのオートファジー新定量法である“細胞質 LC3 比法”で再確認したところ、新たな調節性アミノ酸としてアルギニンが同定された。そこで、単独で強い活性を持ち、単一経路の制御機構の決定に有利であることから、NO 経路の可能性を始めとするシグナリング機構を解析する。

(b) アミノ酸シグナリングでの ROS 関与の可能性

近年、栄養飢餓によるオートファジー促進が活性酸素種 (ROS) の発生によるシグナリングであるという考え方が広がってきた。そこで、栄養飢餓とアミノ酸除去という現象はほぼ同義と見なされることから、アミノ酸の添加によるオートファジーの抑制に ROS の産生変動が関与しているか検討する。

(c) アミノ酸の LC3 mRNA 発現段階での調節

現在、オートファジーのアミノ酸調節では細胞質における LC3 の転換反応 (LC3-I 型から LC3-II 型へのリン脂質付加反応) がターゲットとなっているが、これは数分で作用が届く短期的調節と言える。一方、LC3 分子の転写段階での長期の調節もあり得る。このアミノ酸による LC3 mRNA 発現段階での調節を他のオートファジー関連遺伝子群の動きとも合わせて、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討する。

(d) アミノ酸によるオートファジー制御とサーチュインの関与の可能性

“寿命遺伝子”と言われるサーチュインが

オートファジー制御に関与する可能性が議論されているおり、アミノ酸による制御機構にどう関与するのか、アセチル化の関与を検討する。

ビタミン、抗酸化性食品成分による促進的制御機構

老化制御の観点から、オートファジーを促進する食事因子の探索を始めたところ、抗酸化ビタミンであるビタミン C とビタミン E に正常血中濃度で促進活性が認められた。これらの作用が ROS とどのようにリンクしているかを含めて、そのシグナリング機構を追求する。

(2) 消化管でのオートファジー制御

消化管は食事の影響を最大に受ける臓器であり、オートファジーの関与も大きいはずであるが、まだほとんど不明である。消化管は細胞の種類も多く、また絶え間ない細胞増殖やアポトーシスなどの動態の中にあり、大変複雑である。そこで、上記の方法と LC3 の免疫蛍光法を導入し、消化管でのオートファジー定量法を確立する。また、消化管ではいくつかのアミノ酸に細胞増殖、成長、統合、機能に有効性が認められることから、特に Gln と Glu の役割を比較検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞でのオートファジー調節

当研究室での従来の単離肝細胞との比較から Rat hepatoma H4-II-E 細胞は *in vivo* の状態をよく反映していることから、この細胞を用いて、肝細胞での制御機構を解析した。

アミノ酸による抑制的制御機構

オートファジー速度は当研究室で開発した“細胞質 LC3 比法”ですべて定量した (Karim *et al.*, *Autophagy*, 2007)。

(a) アルギニンによる制御機構

まず、多くの論文で報告されている mTORC1 経路を確かめるため、特異的阻害剤ラパマイシンの効果を確認した。その後、NOS 阻害剤であるアミノグアニジン、L-NMMA や NO ドナーである SNAP などで NO 経路の可能性を検討した。

(b) アミノ酸シグナリングでの ROS 関与の可能性

細胞内レドックス状態を測定するため、ROS のうち H_2O_2 を検出する CM-H2DCFCA をプローブとして、Gemini EM 蛍光プレートリーダーで測定した。

(c) アミノ酸の LC3 mRNA 発現段階での調節

これも H4-II-E 細胞を用いたが、栄養飢餓

からアミノ酸の添加による LC3 mRNA の変化を検討した。哺乳動物の LC3 には 3 種のアイソフォームがあるが、ここでは MAP1LC3 β をもとにプライマーを作成して検出した。特に細胞質での LC3 変換反応と誘導時間の比較を行い、両者に因果関係があるか否かについて検討を行う。

(d) アミノ酸によるオートファジー制御とサーチュインの関与の可能性

サーチュイン (特に Sirt1) が脱アセチル化酵素であることから、LC3 タンパク質のアセチル化の状況を抗アセチル化抗体を用いて検討する。

ビタミン、抗酸化食品成分による促進的制御機構

通常の抗酸化剤 (リポ酸、アセチルシステインなど) はオートファジーを抑制するが、抗酸化剤でもあるビタミン C やビタミン E は逆に促進した。これらの作用機構を解析するとともに、又さらに代表的な抗酸化食品成分としてエピガロカテキンガレートやレスベラトロール等のカテキン類も検討を行った。

(2) 消化管でのオートファジー制御

まず、ラット小腸組織切片の観察法で、LC3 の免疫蛍光法を確立する。また、細胞増殖のマーカーとして BrdU による染色やアポトーシス特異抗体の併用により、上皮細胞全体での動態を検出する方法を確立する。その後、生化学的方法である“細胞質 LC3 比法”が小腸粘膜で適用可能かどうかを検討し、組織学的方法と比較する。

4. 研究成果

初年度、当研究室で開発されたオートファジー特異的定量法である細胞質 LC3 比法について、細胞種、細胞分画法、特異抗体の問題など複数の要因により問題が生じ、その解決に半年以上を費やした。

(1) 肝細胞でのオートファジー調節

アミノ酸による抑制的制御機構

(a) アルギニンによる制御機構

一般にアミノ酸のオートファジー作用は mTORC1 や ROS の関与が考えられているが、今回アルギニン単独の作用を調べたところ、mTORC1 や ROS を経由せず、独自の NO 経路を通ることが強く示唆された。同時に、NO ドナーによる調節が下流に新たな JNK1 経路をたどる可能性が別のグループにより報告されている。さらに、肝臓でのオルニチンやシトルリンについて検討したところ、これらのアミノ酸もアルギニン経路でオートファジーを抑制することが証明された。

(b) アミノ酸シグナリングでの ROS 関与の可能性

20 個のアミノ酸すべてについて、個別に ROS 関与について確かめたところ、アミノ酸の種類によって異なる応答をした。Leu, Gln, Trp, Tyr, Ala についてはオートファジー調節に ROS が関与するが、Arg, Pro, Met, Glu は関係しないことが示唆された。アミノ酸の全混合物としては ROS が関与するという結果になるが、個別のアミノ酸では様々な経路をたどることが示唆され、シグナリング経路の多様性が示された。

(c) アミノ酸の LC3 mRNA 発現段階での調節

絶食とアミノ酸添加により、LC3 mRNA は 3-5 時間程度で促進、抑制が証明された。細胞質の LC3 変換反応が数分で起こるのに比べ、明確に異なる調節様式であることが証明された。この時、同時に DNA マイクロアレイ法によりスクリーニングを行ったところ、5 時間の絶食と 2 時間のアミノ酸添加により、ULK1, Atg13, Atg17, Atg101, Vps14, Atg12, Chop, Atf4 などに変動が見られたが、特に 20 倍近くの際立った誘導・抑制応答を示す遺伝子として新たに Trib3 (Tribbles homolog 3) が見いだされた。アミノ酸によるこれら遺伝子群の変動の詳細を今後検討していく。

(d) アミノ酸によるオートファジー制御とサーチュインの関与の可能性

絶食とアミノ酸添加による Sirt1 タンパク質の細胞内での変化について追求したところ、細胞全体での量は顕著な変動は示さなかったが、細胞内の核と細胞質での分布を調べたところ、絶食により細胞質での Sirt1 が減少したことより、細胞質から核への移動が示唆された。さらに LC3 タンパク質のアセチル化を調べたところ、I 型、II 型ともにアセチル化を受けていた。特に際立っていたところとして、当研究室の“細胞質 LC3 比法”で検出する細胞質 LC3-IIs 型のアセチル化が絶食により顕著に低下することが観察された。これまで、LC3 の翻訳後修飾としてはリン脂質化のみと考えられてきたが、新たにアセチル化が調節因子として浮上してきた。

ビタミン、抗酸化性食品成分による促進的制御機構

ビタミン C の促進作用については、酸化型のデヒドロアスコルビン酸も同等の効果を持つこと、またトランスポーター-SVCT の阻害実験などからビタミン C 自体が膜透過せずとも作用することなどから、抗酸化性ではなく別の作用機構であることが推定された。また、エピガロカテキンやレスベラトロールもオートファジー促進作用が示されたが、特に前者では濃度依存の二相性の正負の調節

効果が認められた。

(2) 消化管でのオートファジー制御

今回、小腸での形態的 LC3 検出法はうまく確立に成功しなかった。用いた抗 LC3 抗体の特異性の問題もあり、顕微鏡観察では非特異的蛍光を消去することが出来ず、きちんと定量化できなかった。小腸の粘膜組織での“細胞質 LC3 比法”についても、十分な再現性のある結果が得られず、結論が出せなかった。他方、BrdU による小腸細胞分裂の検出法は確立し、絶食など栄養条件の変化により鋭敏に変動することが確かめられた。けれども目的であるオートファジーと細胞分裂等の細胞内動態の関連付けは達成できなかった。

なお、わが国では初めてオートファジーと老化との関連についてのシンポジウム「寿命延長とオートファジー」を平成 24 年 5 月 20 日に第 66 回日本栄養・食糧学会(東北大学)にて主催し、かつ発表した。

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 11 件)

門脇 基二、アミノ酸によるオートファジー制御、*生化学*、査読なし、Vol. 86, No. 3, 2014, 印刷中。

URL: <http://www.jbsoc.or.jp/journal>

門脇 基二、オートファジーの歴史と栄養学、*化学と生物*、査読なし、Vol. 52, 2014, 249-254。

URL: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kagakutoseibutsu/-char/ja>

Masatoshi Kubota, *et al.*, *In vivo* digestibility of rice prolamin/protein body-I particle is decreased by cooking. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 査読有, Vol. 60, 2014, *in press*.

URL: <http://editors.capj.or.jp/~jnsweb/index.html>

Aileen B. Angcayas, *et al.*, Diversity of amino acid signaling pathways on autophagy regulation: A novel pathway for arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 446, 2014, 8-14.

DOI: [org/10.1016/j.bbrc.2014.01.117](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.117)

Ganzaya Perenlei, *et al.*, Effect of dietary astaxanthin rich yeast, *Phaffia rhodozyma*, on meat quality of the broiler chicken. *Anim. Sci. J.*, 査読有, Vol. 85, 2014, *in press*.

URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291740-0929>

Masatoshi Kubota, *et al.*, Rice protein ameliorates the progression of diabetic

nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *Br. J. Nutr.*, 査読有, 110, 2013, 1211-1219.

DOI: [10.1017/S0007114513000354](https://doi.org/10.1017/S0007114513000354)

Yoshinori Hashizawa, *et al.*, Effect of vitamin E on broiler meat qualities, color, water-holding capacity and shear force value, under heat stress conditions. *Anim. Sci. J.*, 査読有, 84, 2013, 732-736.

URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291740-0929>

Luc Cynober, *et al.*, A proposal for an upper limit of leucine safe intake in healthy adults. *J. Nutr.*, 査読有, 142, 2012, 2249S-2250S.

DOI: [10.3945/jn.112.160853](https://doi.org/10.3945/jn.112.160853)

小林 裕之、他、飼料栄養による筋肉中遊離グルタミン酸量の調節、*栄養生理研究会報*、査読なし, 56, 2012, 1-12.

URL: <http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN0002315X>

Hiroyuki Kobayashi, *et al.*, Regulation of muscular glutamate metabolism by high-protein diet in broiler chicks. *Anim. Sci. J.*, 査読有, 82, 2011, 86-92.

DOI: [10.1111/j.1740-0929.2010.00811.x](https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00811.x)

Lin Yang and Motoni Kadowaki, Addition of methionine to rice protein affects hepatic cholesterol output inducing hypocholesterolemia in rats fed cholesterol-free diets. *J. Med. Food*, 査読有, 14, 2011, 445-453.

DOI: [10.1089/jmf.2010.1405](https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1405)

[学会発表](計 89 件)

シンポジウム招待講演

門脇 基二、アミノ酸によるオートファジー調節の多様なシグナリング、日本栄養・食糧学会大会シンポジウム、2014 年 5 月 31 日(酪農学園大学、北海道)

門脇 基二、オートファジーと栄養学、日本農芸化学会シンポジウム、2014 年 3 月 30 日(明治大学、東京)

Motoni Kadowaki, Amino acids, autophagy, and aging. 8th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition (APCCN2013), 2013 年 6 月 11 日(東京ベイ舞浜クラブリゾート、東京)

門脇 基二、オートファジー調節をめぐるアミノ酸シグナリングの多様性、新アミノ酸分析研究会、2013 年 12 月 2 日(東京大学)

門脇 基二、栄養によるオートファジーの誘導と抗老化、日本栄養・食糧学会大会シンポジウム、2012 年 5 月 20 日(東北大学)

門脇 基二、米胚乳・米糠タンパク質の特性と機能性、日本栄養・食糧学会大会シンポジウム、2012 年 5 月 19 日(東北大学)

門脇 基二、久保田真敏、藤村 忍、米タンパク質の特性と機能性、日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月 29 日(名古屋大学)

Motoni Kadowaki, Regulation of autophagy

by amino acids -Present and Future-, 第
85 回日本生化学会シンポジウム、2012 年 12
月 14 日 (福岡国際会議場)

その他一般講演 81 題

〔図書〕(計 1 件)

鳥居 邦夫、門脇 基二監修、シーエム
シー出版、アミノ酸科学の最前線-基礎研究
を活かした応用戦略-、2014、281p.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 10 件)

名称：糖尿病による脂肪肝及び腎肥大を抑制
する組成及びその製造方法
発明者：門脇基二 他 3 名
権利者：同上
種類：特願
番号：2014-70644
出願年月日：2014 年 3 月 29 日
国内外の別： 国内

名称： タンパク質栄養組成物
発明者：門脇基二 他 5 名
権利者：同上
種類：特願
番号：2013-01797
出願年月日：2013 年 1 月 31 日
国内外の別： 国内

名称：米糠タンパク質を含む糖尿病性腎症進
展抑制用栄養組成物
発明者：門脇基二 他 5 名
権利者：同上
種類：特願
番号：2013-118021
出願年月日：2013 年 6 月 4 日
国内外の別： 国内

名称：カドミウムの蓄積が軽減された米タン
パク質組成物
発明者：門脇基二 他 3 名
権利者：同上
種類：特願
番号：2013-265886
出願年月日：2013 年 12 月 24 日
国内外の別： 国内

名称：米タンパク質を有効成分とする血清
尿酸低下剤
発明者：門脇基二 他 5 名
権利者：同上
種類：特願
番号：2013-265887
出願年月日：2013 年 12 月 24 日
国内外の別： 国内

名称：米粉入りパスタの冷凍・解凍方法及び
冷凍・解凍システム
発明者：比留間直也、門脇基二 他 5 名
権利者：同上
種類：特願
番号：2012-088728
出願年月日：2012 年 4 月 10 日
国内外の別： 国内

名称：米タンパク質組成物の製造方法及び
食品
発明者：藤井幹夫、門脇基二
権利者：同上
種類：特開
番号：2012-16325
公開年月日：2012 年 1 月 26 日
国内外の別： 国内

名称：温度制御により品質が改良された米
タンパク質組成物の製造方法及び食品
発明者：藤井幹夫、門脇基二
権利者：同上
種類：特開
番号：2012-16326
公開年月日：2012 年 1 月 26 日
国内外の別： 国内

名称：米タンパク質組成物とその製造方法
発明者：藤井幹夫、平塚貴政、門脇基二
権利者：同上
種類：国際出願
番号：PCT/JP2012/078660
出願年月日：2012 年 11 月 5 日
国内外の別： 国外

名称：米タンパク質組成物とその製造方法
発明者：藤井幹夫、平塚貴政、門脇基二
権利者：同上
種類：特願
番号：2011-249095
出願年月日：2011 年 11 月 14 日
国内外の別： 国内

取得状況 (計 1 件)

名称：食肉中の遊離グルタミン酸の増加及び
食肉の酸味の抑制方法
発明者：藤村 忍、門脇 基二、他 3 名
権利者：同上
種類：特許
番号：5260101
取得年月日：2013 年
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
門脇 基二 (Kadowaki, Motoni)

新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：90126029

(2)研究分担者

藤村 忍 (Fujimura, Shinobu)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：20282999

(3)連携研究者

加藤 久典 (Kato Hisanori)
東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授
研究者番号：40211164