

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688015

研究課題名(和文)分岐鎖アミノ酸代謝制御による新規肥満症改善策創出に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Basic study on the creation of novel therapeutic approach by the regulation of the metabolism of branched chain amino acids

研究代表者

後藤 剛(Goto, Tsuyoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10550311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満と分岐鎖アミノ酸および他のアミノ酸代謝の関連性について検討を行い、以下のような知見を得た。分岐鎖アミノ酸代謝酵素BCAT2を脂肪組織において欠損させたマウスでは、摂食状態での血中分岐鎖アミノ酸濃度および体脂肪量等の変化は認められず、肥満時の血中分岐鎖アミノ酸濃度の増加は、脂肪組織の分岐鎖アミノ酸代謝能の低下のみによるものではないことが示唆された。また、脂肪細胞分化の鍵因子であるPPAR $\alpha$ のアゴニストは脂肪細胞に作用し、全身のアミノ酸代謝調節に関与することが示唆された。さらに、脂肪組織におけるPPAR $\alpha$ の活性化は、高脂肪食負荷時に血中分岐鎖アミノ酸レベルを低下させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between obesity and amino acids metabolism, including branched-chain amino acids (BCAAs). We showed following findings. 1. Mice lacking Bcat2, a gene related to BCAAs metabolism, in adipose tissue didn't show any changes in non-fasting plasma BCAAs levels and adiposity, suggesting that the increment of plasma BCAAs levels under obesity condition didn't depend only on the down-regulation of BCAAs metabolism in obese adipose tissues. 2. Agonists of PPAR $\alpha$ , a master regulator of adipocyte differentiation, were involved in the regulation of whole body amino acid metabolism via the activation of PPAR $\alpha$  in adipocytes. 3. Activation of PPAR $\alpha$  in adipose tissues lowered plasma BCAAs levels under high-fat diet feeding condition.

研究分野：食品機能学

キーワード：肥満 脂肪組織 分岐鎖アミノ酸 アミノ酸

### 1. 研究開始当初の背景

過栄養の研究では、食餌性の脂質や糖質に関心が向けられることが多い。そのため、糖質、脂質とならぶ三大栄養素であるアミノ酸と過栄養に関する研究はそれほど積極的に行われていない。しかし、高カロリー食摂取はタンパク質摂取量の増加を来することが多く、肥満状態では多くの血中アミノ酸濃度が変化する。分岐鎖アミノ酸(略称 BCAAs、バリン、ロイシン、イソロイシンの3種を指す)は必須アミノ酸であり、食餌タンパク質由来アミノ酸の約 20%を占める。BCAAs 摂取と肥満に伴う代謝異常症との関連性の指摘が散見されるが、統一的な見解が出されるには至っておらず、肥満と BCAAs の関連性の詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

これまでの研究は、「BCAAs 摂取実験に伴う表現型解析」といった性質のものが多く、『なぜ BCAAs 代謝の変動によって、そのような表現型が現れるのか?』といった BCAAs と肥満・肥満に伴う生活習慣病との関連性の根底にある疑問については未解明であり、『BCAAs 摂取が肥満症対策に有用であるか?』という応用利用に極めて重要な疑問についても明確な答えは示されていない。

本研究では、組織特異的な遺伝子改変動物を用いた解析や培養細胞を用いた遺伝子工学的実験、オミックス解析を行い、BCAAs 代謝と肥満に伴う生活習慣病の関係を組織毎に明らかにするとともに、BCAAs 代謝調節機構について検討を行う。これらの検討結果より、BCAAs 代謝制御による新たなメタボリックシンドロームの予防・治療策の提言を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂肪組織特異的 BCAT2 欠損マウスの作成・解析

mitochondrial branched chain aminotransferase (BCAT2)は末梢組織での分岐鎖アミノ酸代謝の初発酵素である。組織特異的 BCAT2 欠損マウスを作成するため、BCAT2 遺伝子領域に Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子座を持つマウス (floxed マウス) の作成を行った。相同組換えベクター構築の後、ES 細胞株へのエレクトロポレーション、薬剤耐性 ES クローンのピックアップ、PCR 解析、Neo プローブによるサザンブロット解析により、相同組換え ES クローンを樹立した。得られた ES クローンよりキメラマウスを作成し、野生型マウスとの交配を経て、F1 ヘテロマウスを得た。F1 ヘテロマウスと CAG-Flp マウスの交配により薬剤耐性遺伝子を除去し、floxed ヘテロマウスを得た。更に floxed ヘテロマウスの交配により、floxed ホモマウスを作製した。得られた floxed

ホモマウスと脂肪細胞特異的に発現する adiponectin 遺伝子のプロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスの交配により、脂肪組織特異的な BCAT2 欠損マウスを得た。得られた BCAT2 欠損マウスについて、普通食摂取下で解剖を行い、得られた血漿中の BCAAs 濃度、グルコース値、中性脂肪値など代謝パラメータについて検討した。さらに、得られた各種組織重量、組織中の遺伝子、タンパク質発現量について検討を行った。

#### (2) PPAR アゴニスト摂取時の BCAAs をはじめとする代謝物変動解析

肥満モデルマウス KK-Ay (5週齢、雄性) に高脂肪食および 0.01% pioglitazone 含有高脂肪食を4週間摂取させ、採血、解剖を行った。血漿中のグルコース値、中性脂肪値について検討した。また、各種組織重量について検討するとともに、単離した脂肪組織中の PPAR 標的遺伝子の発現量を検討した。また血漿中・脂肪組織中の代謝物変化について網羅的な検討を行うため、メタボローム解析を行った。具体的には、血漿、脂肪組織より 80% メタノールにて代謝物の抽出を行い、抽出サンプルに対して、HPLC-Orbitrap-MS を用い、代謝物の一斉分析を行った。得られた分析データは Power Suite を用いて解析を行い、KEGG、Lipid Maps をデータベースとして、代謝物のアノテーションを行った。さらに、実験動物において認められた代謝物変動が脂肪細胞の状態変化を介したものであるか、培養脂肪細胞 3T3-L1 を用いた検討を行った。3T3-L1 細胞を定法により分化誘導処理し、分化誘導後 7 日目の細胞を 0.1 μM pioglitazone で 2 日間処理した。細胞を回収し、UPLC-TOF-MS を用いて、BCAAs を含む各種アミノ酸のターゲット分析を行った。

#### (3) 脂肪組織特異的ヒト型 PPAR 強制発現マウスの作成・解析

脂肪細胞特異的な発現を示す aP2 遺伝子のプロモーター制御下に活性型ヒト PPAR を発現するベクターを構築し、受精卵に導入し、脂肪組織特異的ヒト型 PPAR 強制発現マウス (Tg マウス) の作成を行った。得られたファウンダマウスより F1 マウスを作成し、野生型マウス (WT マウス) と交配させ、実験に用いた。WT マウス、Tg マウスより単離した各種組織を用いて、導入遺伝子の発現確認を行った。発現確認後、WT マウス、Tg マウス (6-7 週齢、雄性) に対し、18 週間高脂肪食を負荷した後、採血・解剖を行い、各種解析を行った。また飼育期間中にはインスリン負荷試験を行った。血液サンプルについては、先の方法でメタボローム解析を行い、変動代謝物について明らかにした。また血中グルコース、インスリン、脂肪酸量について検討を行った。単離した脂肪組織については、組織学的解析および組織中の遊離脂肪酸量の分

析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脂肪組織特異的 BCAT2 欠損マウスの作成・解析

肥満に伴う代謝異常症の発症と深く関連することが知られる脂肪細胞における BCAAs 経路上の酵素群の発現変動について検討した結果、前駆脂肪細胞から脂肪細胞へと分化する過程において、多くの BCAAs 代謝酵素の発現が変動することが明らかになった。その中でも末梢組織における BCAAs 代謝の初発酵素である BCAT2 の発現は脂肪細胞分化に伴い上昇し、脂肪細胞の肥大化に伴い低下することが示唆された。さらに、BCAT2 のタンパク質レベルでの発現について、生体の種々の組織を用いて検討したところ、褐色脂肪組織において特に強い発現を示し、次いで白色脂肪組織、骨格筋において強い発現を示すことが明らかとなった。これらの結果から、脂肪組織における BCAAs 代謝酵素の役割について検討を行うため、作製した脂肪組織特異的 BCAT2 欠損マウスの解析を行った。脂肪組織特異的 BCAT2 欠損マウスでは、骨格筋や肝臓における BCAT2 発現量には変化が認められず、白色・褐色脂肪組織において BCAT2 の発現低下が認められた。しかしながら、脂肪組織特異的 BCAT2 欠損マウスにおける摂食状態での血中 BCAAs 濃度には変化が認められず、通常条件の飼育下では体重等の変化も認められなかった。これらの結果は、肥満時に報告されている血中 BCAAs 濃度の増加は、脂肪組織の BCAAs 代謝能の低下のみによるものではないことを示唆しており、血中 BCAAs レベルの維持においては、脂肪組織以外の組織における BCAAs の代謝変化が重要な役割を担っている可能性があるものと推察された。

##### (2) PPAR アゴニスト摂取時の BCAAs をはじめとする代謝物変動解析

上記実験において、脂肪細胞の状態変化に伴い、BCAAs 代謝能の変化が示唆されたことから脂肪組織の状態と BCAAs の関連性について検討を行うこととした。脂肪細胞分化におけるマスターレギュレーターである PPAR アゴニスト投与時の全身の代謝変化について、メタボローム解析を行った。肥満モデルマウスに対する PPAR アゴニスト投与は高血糖、高中性脂肪血症の改善、脂肪組織重量の増加、脂肪組織における PPAR 標的遺伝子の発現亢進を惹起し、脂肪組織の状態変化が示唆された。本マウスの血中および脂肪組織中代謝物を HPLC-Orbitrap-MS を用いて網羅的解析を行ったところ、血中では 2184 種、脂肪組織中では、748 種の代謝物ピークを得た。これらの代謝物のうち、PPAR アゴニスト投与によって有意に変動した代謝物は、血中、脂肪組織中においてそれぞれ、138 種、43 種存在した。それらのうち、データベース

との照合によって同定された代謝物はそれぞれ、22 種、19 種であった。これらの同定された変動代謝物には多くのアミノ酸が含まれており、血中では BCAAs であるロイシンに加えて、チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、ヒスチジンが PPAR アゴニスト投与によって、増加することが明らかになった(図)。さらに、脂肪組織中においては、リジン、スレオニン、アラニン、フェニルアラニン、ヒスチジンの増加が認められた。そこで、これらの PPAR アゴニスト投与によるアミノ酸量の変動が、脂肪細胞における PPAR の活性化を介したものであるかどうか、培養脂肪細胞 3T3-L1 に PPAR アゴニストを追加し、細胞内アミノ酸量の変動について検討を行った。その結果、PPAR アゴニスト処理によって、脂肪細胞内のロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン、スレオニン、アラニン量が増加することが見出された。以上の結果より、PPAR アゴニスト処理は脂肪細胞の状態変化を介して、BCAAs を含む種々のアミノ酸代謝調節に関与していることが示唆された。これらのアミノ酸代謝変動の一部は、PPAR アゴニスト投与時の代謝異常症の改善作用に寄与している可能性がある。

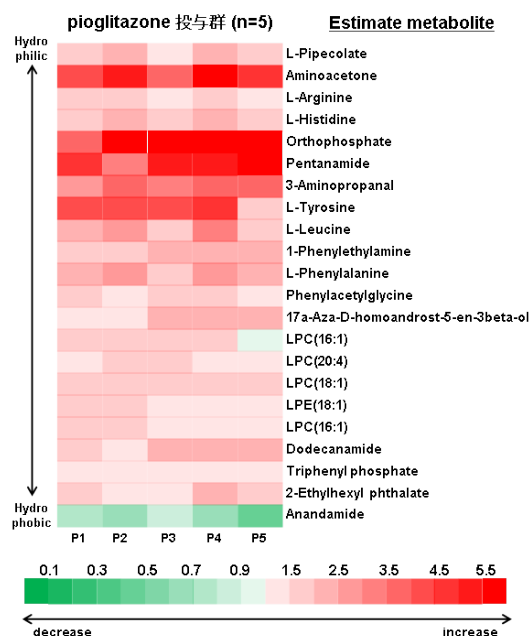


図 PPAR アゴニスト摂取時の血中代謝物の変動解析

##### (3) 脂肪組織特異的ヒト型 PPAR 強制発現マウスの作成・解析

肝臓や骨格筋において脂肪酸化を制御することが知られている PPAR の脂肪細胞での機能について明らかにするため、脂肪細胞特異的な発現を示す aP2 遺伝子プロモーター制御下にヒト型 PPAR を強制発現させるマウス (Tg マウス) を用いて、血中代謝物のメタボローム解析を先の実験と同様に行っ

た。その結果、Tg マウスにおいて、野生型マウス (WT マウス) に比べ、高脂肪摂取下での血中 BCAAs 量が有意に低値を示すことを見出した。これより、脂肪細胞における PPAR の活性化は全身の BCAAs 代謝を制御しうることが示唆された。また、血中 BCAAs 量の増加が肥満状態およびインスリン抵抗性状態において認められることから、Tg マウス、WT マウスに高脂肪食を負荷して肥満を誘導したところ、体重および体脂肪蓄積量には変化が認められなかった。しかしながら、Tg マウスでは脂肪細胞の小型化およびインスリン感受性の亢進が認められた。さらに、Tg マウスでは WT マウスに比して、血中の遊離脂肪酸濃度が低下することが明らかになった。Tg マウスの脂肪組織においては、PPAR 標的遺伝子である脂肪酸酸化関連遺伝子の発現亢進が認められたことから、脂肪組織における PPAR の活性化は全身の BCAA 代謝に変化を来すことが示されたとともに、脂肪組織における PPAR の活性化により、脂肪酸異化が亢進し、インスリン抵抗性が改善することが示唆された。

#### 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 11 件)

以下、すべて査読あり。

Sakamoto T, Nitta T, Maruno K, Yeh YS, Kuwata H, Tomita K, Goto T, Takahashi N, Kawada T. Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 印刷中, 2016. DOI:10.1152/ajpendo.00028.2015.

Goto T, Nakukool S, Yoshitake R, Hanafusa Y, Tokiwa S, Li Y, Sakamoto T, Nitta T, Kim M, Takahashi N, Yu R, Daiyasu H, Seno S, Matsuda H, Kawada T. Proinflammatory cytokine interleukin-1 suppresses cold-induced thermogenesis in adipocytes. *Cytokine.* 77, 2016, 107-114. DOI:10.1016/j.cyto.2015.11.001.

Kim M, Goto T, Yu R, Uchida K, Tominaga M, Kano Y, Takahashi N, Kawada T. Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci Rep.* 5:18013, 2015. DOI:10.1038/srep18013.

Takahashi H, Goto T, Yamazaki Y, Kamakari K, Hirata M, Suzuki H, Shibata D, Nakata R, Inoue H, Takahashi N, Kawada T. Metabolomics reveal 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine production by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Lipid Res.* 56, 2015, 254-265. DOI:10.1194/jlr.M052464.

Takahashi H, Hara H, Goto T, Kamakari K, Wataru N, Mohri S, Takahashi N, Suzuki H, Shibata D, Kawada T. 13-Oxo-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor in adipocytes. *Lipids.* 50, 2015, 3-12. DOI:10.1007/s11745-014-3972-x.

Goto T, Kim YI, Furuzono T, Takahashi N, Yamakuni K, Yang HE, Li Y, Ohue R, Nomura W, Sugawara T, Yu R, Kitamura N, Park SB, Kishino S, Ogawa J, Kawada T. 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPAR and stimulates adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 459, 2015, 597-603. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.154.

Takahashi H, Suzuki H, Suda K, Yamazaki Y, Takino A, Kim YI, Goto T, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Takahashi N, Kawada T. Long-chain free fatty acid profiling analysis by liquid chromatography-mass spectrometry in mouse treated with peroxisome proliferator-activated receptor agonist. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77, 2013 2288-2293. DOI: 10.127/bbb.130572.

Goto T, Mori A, Nagaoka S. Soluble soy protein peptic hydrolysate stimulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Mol Nutr Food Res.* 57, 2013, 1435-1445. DOI:10.1002/mnfr.201200573.

Goto T, Kim YI, Takahashi N, Kawada T. Natural compounds regulate energy metabolism by the modulating the activity of lipid-sensing nuclear receptors. *Mol Nutr Food Res.* 57, 2013, 20-33. DOI:10.1002/mnfr.201200522.

Goto T, Mori A, Nagaoka S. Soluble soy protein peptic hydrolysate stimulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Mol Nutr Food Res.* 57, 2013, 1435-1445. DOI:10.1002/mnfr.201200573.

Goto T, Kim TI, Takahashi N, Kawada T. Natural compounds regulate energy metabolism by the modulating the activity of lipid-sensing nuclear receptors. *Mol Nutr Food Res.* 57, 2013, 20-33. DOI:10.1002/mnfr.201200522.

[学会発表](計 11 件)

Li Y, Goto T, Ikutani R, Lin S, Takahashi N, Takahashi H, Jheng HF, Murakami S, Yu R, Kawada T. Xanthoangerol and 4-hydroxyderrcin suppress obesity-induced inflammatory responses. The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity (国際学会), 2015.10.2-10.4 Nagoya Congress Center (Aichi・Nagoya).

後藤 剛, 高橋 春弥, 高橋 信之, 河田 照雄. 「核内受容体 PPAR 活性化因子による代謝異常改善機構の解析」第 36 回日本肥満学会 (招待講演), 2015.10.2 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

Hanafusa Y, Yoshitake R, Naknukool S, Sakamoto T, Daiyasu H, Seno S, Matsuda H, Goto T, Takahashi N, Kawada T. The effect of IL-1 beta on UCP1 expression in adipocytes. 12th Asian Congress of Nutrition (国際学会), 2015.5.14-5.18 Pacifico Yokohama (Kanagawa・Yokohama).

後藤 剛, 高橋 信之, 河田 照雄. 「外因性因子による褐色脂肪細胞 機能亢進機構の解析」日本農芸化学会 2015 大会, 2015.3.29 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市).

新田 貴大, 坂本 智弥, 丸野 晃嗣, 後藤 剛, 高橋 信之, 河田 照雄. 「肥満に伴い脂肪組織に浸潤したマクロファージがベージュ脂肪細胞発現を抑制する」日本農芸化学会 2015 大会, 2015.3.27 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市).

青木 ゆめこ, 後藤 剛, 高橋 信之, 河田 照雄. 「炎症誘発性一酸化窒素が白色脂肪細胞組織における PPAR 発現に及ぼす作用」第 35 回日本肥満学会, 2014.10.25 シーガイアコンベンションセンター (宮城県・宮崎市).

吉竹 里依子, Naknukool Supaporn, 花房 祐希, 坂本 智弥, 後藤 剛, 高橋 信之, 大安 裕美, 瀬尾 茂人, 松田 秀雄, 河田 照雄. 「IL-1 が白色脂肪細胞における UCP1 発現に及ぼす影響」第 35 回日本肥満学会, 2014.10.25 シーガイアコンベンションセンター (宮城県・宮崎市).

平田 茉莉子, 後藤 剛, 高橋 信之, 伊藤 信行, 河田 照雄. 「PPAR アゴニストの薬理作用における FGF21 の役割」第 35 回日本肥満学会, 2014.10.24 シーガイアコンベンションセンター (宮城県・宮崎市).

平田 茉莉子, 後藤 剛, 新田 貴大, 高橋 信之, 河田 照雄. 「PPARs アゴニストによる白色脂肪組織の褐色化に関する研究」第 68 回日本栄養・食糧学会, 2014.6.1 酪農学園大学 (北海道・江別市).

後藤 剛. 「褐色脂肪細胞機能と食品由来因子 細胞・モデル動物を用いた探索・評価法」第 68 回日本栄養・食糧学会, 2014.5.31 酪農学園大学 (北海道・江別市).

Goto T. Farnesol improves obesity induced metabolic disorders via PPAR dependent and independent pathways. 12th International Congress on Obesity (国際学会), 2014.3.17-3.20 クアラルンプール (マレーシア).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学  
専攻 食品分子機能学分野  
<http://www.foodfunc.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 剛 (GOTO, Tsuyoshi)  
京都大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・  
准教授  
研究者番号: 10550311

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者