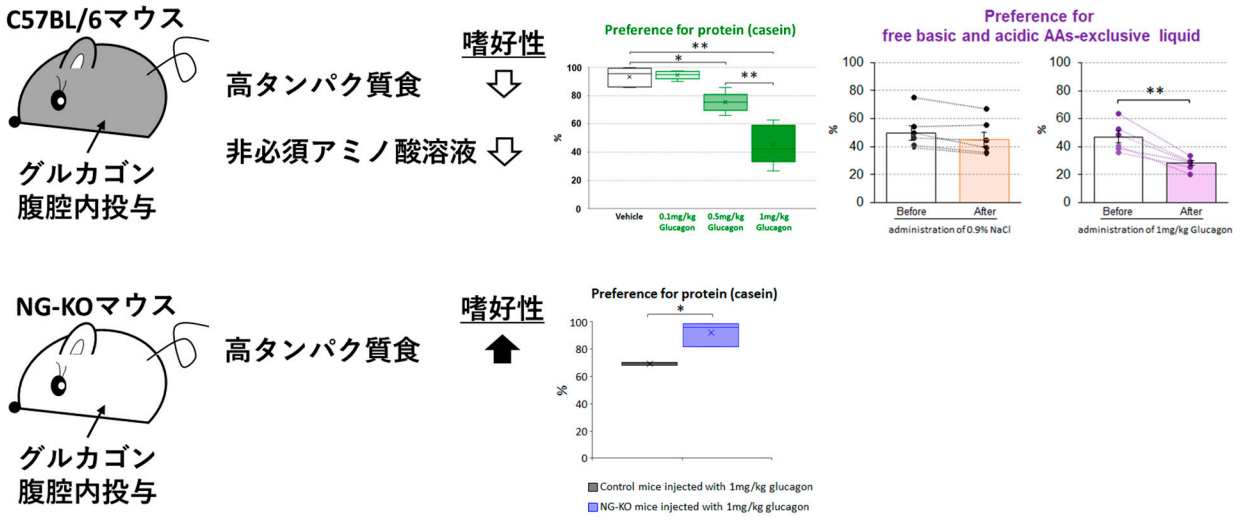
119　タンパク質に対する選択的な摂食調節機構の解明	松居　翔

【目的】ヒトを含む生物は、栄養素を摂取し代謝することで生体の恒常性を維持しており、各栄養素に対する個別の食欲を持っている。生命維持にとって最も重要なタンパク質に対する食欲が、エネルギー摂取とは別個に調節されていることが昔から知られているものの、その調節機序は全く未解明である。タンパク質の需給を脳に伝える代謝性シグナル、および、脳内での調節責任領域のどちらも解明されていない。近年、主に膵臓α細胞で合成・分泌されるグルカゴンの主要かつ特異的生理作用は、アミノ酸代謝の恒常性維持であることが提唱されている。このことから、グルカゴンはアミノ酸の恒常性を維持するために、タンパク質の食欲制御に関わると着想した。そこで本研究では、未解明である「タンパク質に対する食欲」の調節機序を、グルカゴンをツールとして利用して解明することを目的とする。

【方法】9 週齢雄 C57BL/6 マウスに 0.1、0.5、1 mg/kg body weight のグルカゴンを腹腔内（ip）投与し、普通食（NC）vs.高タンパク質食（HP：カゼイン）、高脂肪食（HFD）および高ショ糖食（HSD）の食餌選択試験を行った。次に、9 週齢雄 C57BL/6 マウスに 1 mg/kg body weight のグルカゴンを ip 投与し、経時的な食餌選択（NC vs. HPD）の変化を観察した。さらに、9 週齢雄 C57BL/6 マウスに 1 mg/kg のグルカゴンを ip 投与し、二瓶選択試験を行った。試験溶液には 1%カゼイン中に含まれるアミノ酸組成で作製した必須アミノ酸と非必須アミノ酸溶液を用いた。また、神経特異的に Cre を発現する *Tau-Cre* マウスと *Gcgr*（*glucagon receptor*）*-flox* マウスを交配し、神経特異的 Gcgr ノックアウト（NG-KO）マウスを作製した。作製したマウスを用いて、NC vs. HPD の食餌選択試験を行った。

【結果】0.5、1 mg/kg グルカゴン投与で顕著なタンパク質嗜好性抑制作用が認められた。他方、同様の検証を高ショ糖食、高脂肪食でも行ったが、それらの食餌に対する嗜好性の変化は認められなかった。さらに、グルカゴンによるタンパク質嗜好性効果は、投与してから 10 時間経過後に認められた。二瓶選択試験の結果は、グルカゴン投与で非必須アミノ酸溶液に対する嗜好性抑制作用が認められた。他方、必須アミノ酸溶液に対する嗜好性の変化は認められなかった。また、NG-KO マウスへの 1 mg/kg グルカゴン投与は、グルカゴンによるタンパク質嗜好性抑制効果が認められなかった。

グルカゴンはタンパク質の摂取を調節している



119. タンパク質に対する選択的な摂食調節機構の解明

松居　翔

京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 栄養化学分野

Key words：グルカゴン，タンパク質，非必須アミノ酸，恒常性

緒　言

食物から得られるエネルギーは、糖質、脂肪、タンパク質の 3 つの主要栄養素に由来する。摂取された糖質はグリコーゲンとして、脂肪はトリグリセリドとして体内に貯蔵され、必要に応じて体内に動員することができる。他方、タンパク質はそれらの栄養素とは異なり、体内で貯蔵するための特定の形態をもたない。したがって、タンパク質は継続的に摂取される必要があり、身体にはその摂取行動を調節する機構が備わっていることが考えられる。これまでにマウスやラットに低タンパク質食を与えると、タンパク質の総摂取量を満たすように全体の摂取量が増加することが報告されている［1]。その機序として、脳の General control nonderepressible 2（GCN2）が食物中のアミノ酸のインバランスを感知して必須アミノ酸に対する食欲を調節することが提唱されたが［2]、GCN2 欠損マウスでも必須アミノ酸に対する選択的な食欲が残ることが報告され［3]、この機序仮説は否定された。そのため、タンパク質（アミノ酸）に対する食欲を調節する機序は未解明である。

主に膵臓α細胞で合成・分泌されるグルカゴンは、血糖低下時に分泌が亢進し血糖値を上昇させるホルモンとして知られており、インスリンの拮抗ホルモンとして位置づけられていた。しかしながら近年、グルカゴンの主要かつ特異的な生理作用は、血糖値増加作用ではなくアミノ酸代謝の恒常性維持であることが提唱されている［4]。このことから、グルカゴンはアミノ酸の恒常性を維持するために、タンパク質嗜好性の制御に関わることが予想される。そこで本研究では、グルカゴンをツールとして、「タンパク質に対する嗜好性を制御する機構」の詳細を明らかにすることを目的とする。

方　法

1. 飼育環境

実験室の室温および試験液の温度は 25±1℃に維持し、6:00～18:00 の昼夜サイクルにした。

2. C57BL/6 マウスの食餌選択試験

実験動物は 9 週齢の雄の C57BL/6 マウスを用いた。馴化飼育のために動物は、ポリカーボネートのケージ（日本クレア）に 1 匹ずつ入れ、マルチフィーダ（シンファクトリー）を用いて粉末飼料（CE-2、日本クレア）を 4 日間、自由に摂取させた。馴化飼育後に、マウスに 0.1、0.5、1 mg/kg グルカゴンを腹腔内（ip）投与し、普通食（NC）vs. 高タンパク質食（HPD)、高ショ糖食（HSD）および高脂肪食（HFD）の食餌選択試験を行った。

3. C57BL/6 マウスの二瓶選択試験

実験動物は 9 週齢の雄の C57BL/6 マウスを用いた。馴化飼育のために動物は、ポリカーボネートのケージに 1 匹ずつ入れ、マウス・ラット用微量飲水量測定用給水瓶（シンファクトリー）を 2 本準備し、両方の瓶に水を入れ、3 日間の二瓶選択試験の訓練を行った。餌は、固形の CE-2 を自由摂取させた。馴化飼育後に、マウスに 1 mg/kg グルカゴンを ip 投与し、水 vs. 1%カゼイン溶液中に含まれる必須アミノ酸および非必須アミノ酸溶液の二瓶選択試験を行った。

4. 神経特異的 Gcgr ノックアウトマウスの解析

神経特異的に Cre を発現する *Tau-Cre* マウスと *Gcgr* (*glucagon receptor*) *-flox* マウスを交配し、神経特異的に *Gcgr* が欠損した（NG-KO）マウスを作製した。9 週齢の雄の同マウスは、ポリカーボネートのケージに 1 匹ずつ入れ、マルチフィーダを用いて粉末飼料（CE-2）を 4 日間、自由に摂取させた。馴化飼育後に、同マウスに 1 mg/kg グルカゴンを ip 投与し、NC vs. HPD の食事選択試験を行った。

結　果

1. グルカゴンはタンパク質嗜好性を抑制する（図 1）

C57BL/6 マウスに 0.5、1 mg/kg グルカゴンを ip 投与すると、HPD に対する嗜好性が低下した。他方、HSD および HFD に対する嗜好性に変化は認められなかった。この結果から、グルカゴンはタンパク質特異的に嗜好性を制御することが明らかになった。

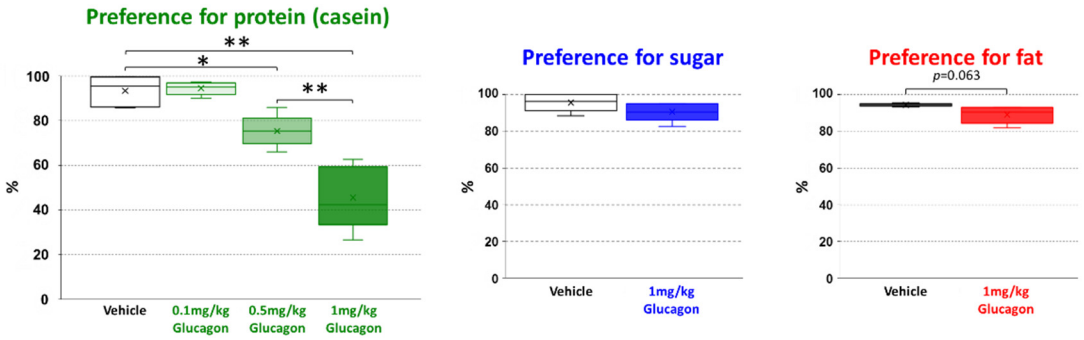


図 1. グルカゴンはタンパク質嗜好性を特異的に抑制する

左）NC vs. HPD。

中央）NC vs. HSD。

右）NC vs. HFD。

N＝5、HPD は *Tukey's test*、HSD と HFD は *Student's t-test*、**p*＜0.05、***p*＜0.01。

2. グルカゴン投与 10 時間後にタンパク質に対する嗜好性が抑制される（図 2）

C57BL/6 マウスに 1 mg/kg グルカゴンを暗期直前（18：00）に投与すると、タンパク質嗜好性抑制効果は翌朝（8：00）に認められ、1 mg/kg のグルカゴンを明期の 8：00 に投与すると、タンパク質嗜好性抑制効果は暗期 18：00 に認められた。この結果から、グルカゴンによるタンパク質嗜好性抑制効果は、10 時間の時間を要することが明らかになった。

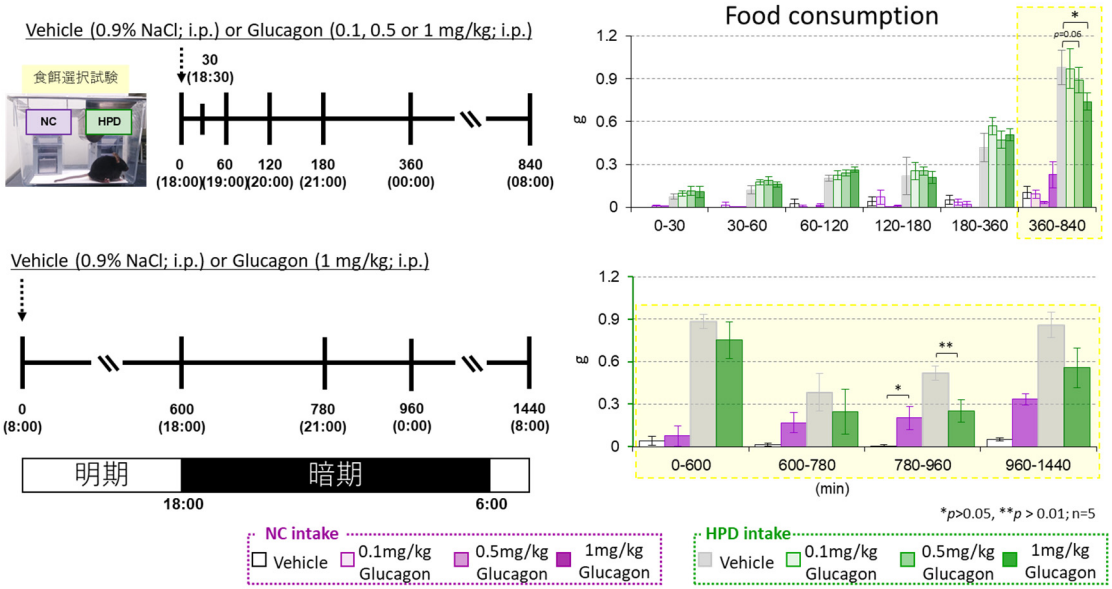


図 2. グルカゴン投与後 10 時間でタンパク質摂取の抑制効果が認められる

上段）暗期（18：00）にグルカゴンを ip 投与。

下段）明期（8：00）にグルカゴンを ip 投与。

N=4、*Tukey's test*、*p<0.05、**p<0.01。

3. グルカゴンは非必須アミノ酸嗜好性を抑制する（図 3）

C57BL/6 マウスに 1 mg/kg のグルカゴンを投与すると、非必須アミノ酸に対する嗜好性が抑制された。他方、必須アミノ酸に対する嗜好性には影響を及ぼさなかった。

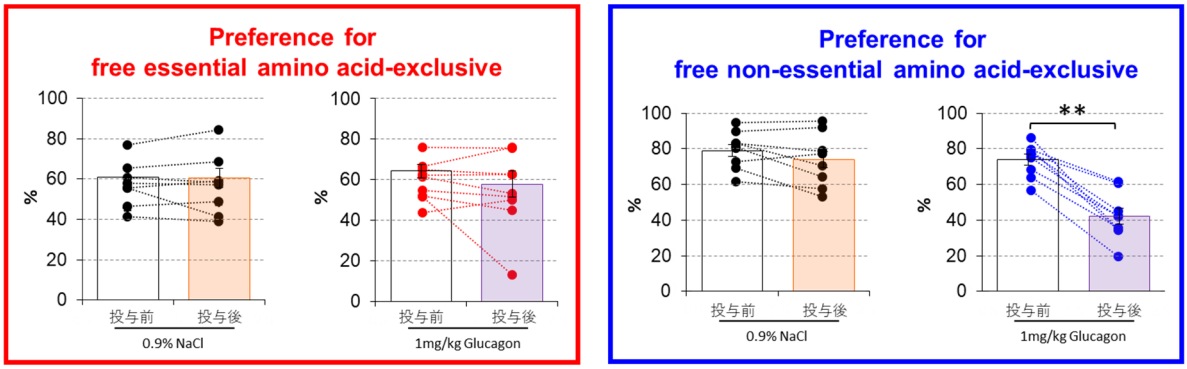


図 3. グルカゴンは非必須アミノ酸特異的に嗜好性を抑制する

左）水 vs. 必須アミノ酸。

右）水 vs. 非必須アミノ酸。N=8、*Paired t-test*、**p<0.01。

4. グルカゴンのタンパク質嗜好性抑制効果は神経特異的 Gcgr ノックアウトマウスでは認められない（図 4）

NG-KO マウスに 1 mg/kg のグルカゴンを投与すると、タンパク質に対する嗜好性が抑制されなかった。そのため、グルカゴンは脳に直接作用することでタンパク質の嗜好性を制御していることが明らかになった。

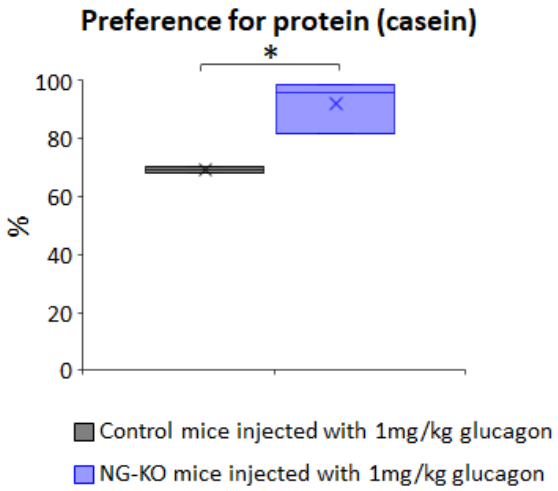


図 4. NG-KO マウスでは、グルカゴン投与によるタンパク質嗜好性抑制効果が認められない
NC vs. HPD の食事選択試験の結果. N＝3. *Student's t-test*, *$p<0.05$.

考　察

近年、グルカゴンの生理作用は、血糖値の上昇作用ではなく、アミノ酸代謝の制御であることが提唱されている [4]。そこで、グルカゴンが食行動にどのような影響を与えるのかを検証した。C57BL/6 マウスに対する 1 mg/kg のグルカゴン投与は、タンパク質に対する嗜好性のみを有意に抑制することが明らかになった。また、その効果はグルカゴンの投与直後ではなく、投与後 10 時間以上を経てから表出することを見出した。さらに、アミノ酸分画容積に対する二瓶選択試験を行った結果、非必須アミノ酸に対する嗜好性を抑制することを明らかにした。そして、グルカゴンの脳への直接作用が表現型に重要であるのかを検証するために、神経特異的にグルカゴン受容体を欠損させた NG-KO マウスを用いて NC vs. HPD の食餌選択試験を行った。その結果、同マウスでは、グルカゴン投与によるタンパク質嗜好性の抑制効果が認められなかった。

これらの結果から、グルカゴンは非必須アミノ酸に対する嗜好性を抑制するが、投与後の作用には時間を要するため、グルカゴンは神経に作用した後に、他臓器に指令を送っている可能性が示唆される。そして、その臓器での代謝変化が再度脳に伝わることで非必須アミノ酸に対する嗜好性を調節していることが予想される。また、他臓器におけるグルカゴンシグナルが非必須アミノ酸の嗜好性を調節する可能性もあるため、各種の代謝関連臓器に特異的なグルカゴン受容体欠損マウスを現在、作製中である。

共同研究者・謝辞

本研究の協同研究者は、群馬大学生体調節研究所分子糖代謝制御分野の藤谷与士夫教授である。

文　献

1） Morrison CD, Laeger T. Protein-dependent regulation of feeding and metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2015 May;26(5):256-62. doi: 10.1016/j.tem.2015.02.008. Epub 2015 Mar 11. PMID: 25771038 DOI: 10.1016/j.tem.2015.02.008

2) Hao S, Sharp JW, Ross-Inta CM, McDaniel BJ, Anthony TG, Wek RC, Cavener DR, McGrath BC, Rudell JB, Koehnle TJ, Gietzen DW. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. Science. 2005 Mar 18;307(5716):1776-8. PMID: 15774759 DOI: 10.1126/science.1104882
3) Leib DE, Knight ZA. Re-examination of Dietary Amino Acid Sensing Reveals a GCN2-Independent Mechanism. Cell Rep. 2015 Nov 10;13(6):1081-1089. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.055. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26526991 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.055
4) Hayashi Y, Seino Y. Regulation of amino acid metabolism and α-cell proliferation by glucagon. J Diabetes Investig. 2018 Jan 3;9(3):464-472. doi: 10.1111/jdi.12797. PMID: 29314731 DOI: 10.1111/jdi.12797