

受賞者

酒井 寿郎

東京大学先端科学技術研究センター 代謝内分泌システム生物医学分野

研究テーマ

抗肥満効果とケトン体代謝におけるミトコンドリア型アセチルCoA合成酵素の機能解析

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

哺乳動物は長期間にわたる栄養不足に耐えうる代謝システムを進化させてきた。食餌が与えられている状態では動物はブドウ糖をメインのエネルギー源として用いる。しかし、絶食、飢餓、低炭水化物食などいわゆるケトジェニックな状態では、脂肪酸とケトン体がおもなエネルギー源として用いられる。ケトン体はおもに脳で使われ、一部は骨格筋や心臓などでも用いられる。ケトン体は肝臓のミトコンドリアで脂肪酸の β 酸化の後にアセチル-CoAから合成される。これまでの報告から、絶食した肝臓での酢酸の濃度は高く、ケトジェニックな状態では、エネルギー源として用いられることが報告されてきた。また、単離ラット初代肝細胞や肝還流実験などから肝臓で酢酸が作られることが知られている。しかしながら、酢酸が、グルコース、ケトン体、脂肪酸に変わりうる燃料であるかについては明らかにされていない。

アセチル-CoA合成酵素(AceCS)は酢酸と-CoAを結合させ、アセチルCoAを合成する酵素である。哺乳動物では2つのAceCSが存在する(1, 2)。1つは細胞質に局在するAceCS 1そしてもう一つはミトコンドリアマトリックスに局在するAceCS 2 (1)である。AceCS 1とAceCS 2はsirtuinファミリーの脱アセチル化酵素SIRT1とSIRT3によって転写後修飾をうける。SIRT1とSIRT3は栄養制限時に発現が上昇し、カロリー制限下での長寿に関与することが報告されている。

AceCS 1は脂肪酸とコレステロールの合成に関与し、主に肝臓や脂肪組織でSREBPによって制御される(2)。一方AceCS 2はクエン酸回路でATP合成に利用される。AceCS 2は骨格筋や心筋に発現し、ケトジェニック状態でその発現は高く誘導される。この転写誘導にはKLF15により制御される。KLF15は糖新生に関与する多くの遺伝子の制御に関与している。

酢酸がケトジェニックな状態で利用されるかを解析するため我々はAceCS 2欠損マウスを作成した。この結果、AceCS 2はケトジェニックな状態ではエネルギー消費に必須であることが判明した(3)。

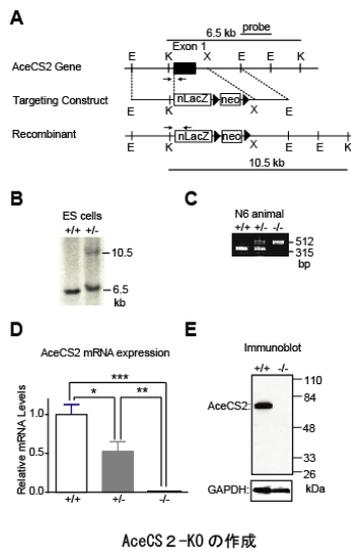
2. 方法

ターゲティングベクターコンストラクション- マウスAceCS2遺伝子は、129/Sv系統のマウスゲノミックファーザーライブラリーからマウスcDNA部分配列を用いたプローブを用いて単離した。AceCS2ターゲティングベクターのコンストラクションは、以下のように作製した。プラスミドは、AceCS1のエキソン1を近位の5.18 kbと遠位の1.75 kbゲノム配列を用いてnLacZカセットに置き換えた。(図2-1A) ロングアームおよび、ショートアームの挿入配列はシーケンシングにより確認した。embryonic stem (ES) 細胞へのトランスフェクションには、ターゲティングベクターをNot I (東洋紡社)により直線化した。

アセチルCoA合成酵素2型遺伝子欠損マウスの作製- ES細胞に直線化したターゲティングベクターをエレクトロポレーションにより、導入し、相同性組換えを起こしたES細胞をサザンブロットティングにより同定した。サザンブロットティングは、Kpn I (東洋紡社)によりゲノムDNAの制限酵素処理を

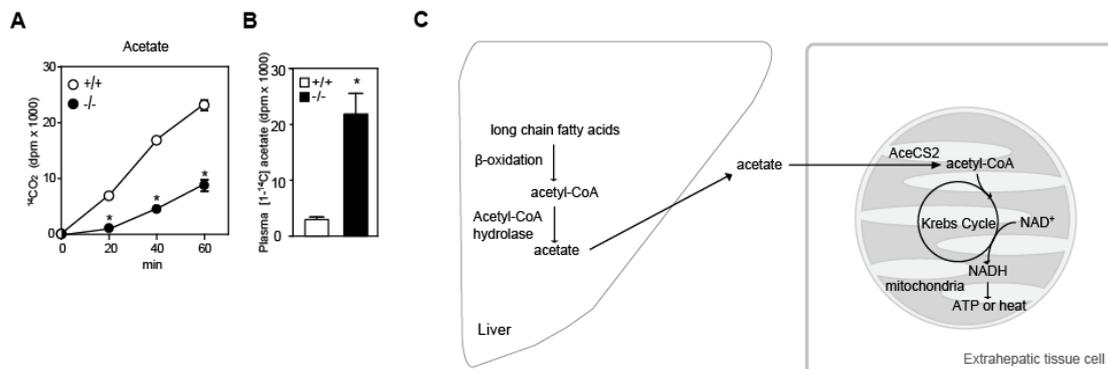
行い、電気泳動、トランスファー後、図2-1Aに示した位置のプロープを用いて検出した。2つのES細胞をC57BL/6Jの胎生3.5日の胚にインジェクションし、キメラマウスを作製した。成育したキメラマウスをC57BL/6Jとかけ合せ、ヘテロのマウスを得た。

実験動物- 129SVJ/ C57BL6J系統のキメラマウスを、6回C57BL/6Jに戻し交配し、得られたN6マウスから、AceCS2ヘテロ同士を交配させ、実験群を得た。実験動物は12時間明暗サイクル、気温23℃の条件下で飼育し、餌（CE2；日本クレア）と水は自由に与えた。高糖高脂肪食負荷を行う場合は、特別配合飼料（オリエンタル酵母）（タンパク質：炭水化物：脂肪=15:27:58（カロリー比））を与えた。また、ケトジェニックダイエット負荷を行う場合には、TD96355（Harlan Teklad社）（タンパク質：炭水化物：脂肪=9.01:0.32:90.66（カロリー比））を与えた。48時間絶食させる場合には、餌を48時間取り除いた。



3. 結果 研究成果

AceCS2^{-/-}マウスでは、授乳期に30-40%の成長障害が生じ、授乳期をすぎると次第に成長は追いつき生後20週までには野生型と体重・体長とも同じになった。このマウスはレプチン欠損のob/obマウスとの掛け合わせでも同様に授乳期の成長障害が生じ、この時期をすぎると成長は次第に追いつくことから、レプチンシグナルとは独立した原因によるものと判明した。さらに、成長ホルモンやインスリン様成長ホルモン値には野生型マウスと比べ同様の値を示し、体重あたりの摂食量、摂食関連ホルモンは野生型と変化は認められなかった。

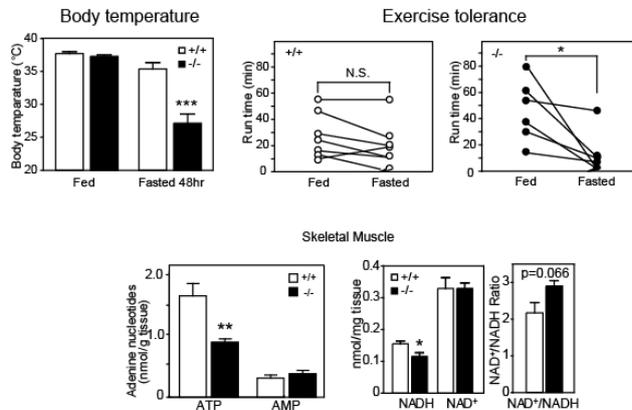


ついで、酢酸が実際に燃料として絶食時に用いられるか否かを解析するために、48時間絶食させた

マウスに $[^{14}\text{C}]$ acetateを副腔に注射し、呼気中に二酸化炭素として排出される $[^{14}\text{C}]$ の量を測定した。するとAceCS 2欠損マウス (*AceCS 2-K0*) は個体レベルでアセートの酸化が極めて減少していることが明となり、実際このマウスは酢酸の活性化が傷害されていることが明かとなった。(A 呼吸中の酢酸の量、B血中の酢酸の量)。

一方ケトン体の代謝に障害は認められなかった (データ示さず)。われわれのこれまでの報告と合わせると(1)、Cの作業仮説図に示すように、酢酸がATPと二酸化炭素になるためにはAceCS 2が必要であることが示された。これまでの報告から、肝臓ではアセチルCoA脱水素酵素によって酢酸が作られ、これが肝臓外の組織で使われる。そして、AceCS 2はこの酢酸を回収してTCAサイクルでATPのエネルギー産生に重要であることを提示された。

絶食によって誘導される低体温・持久運動能力の低下



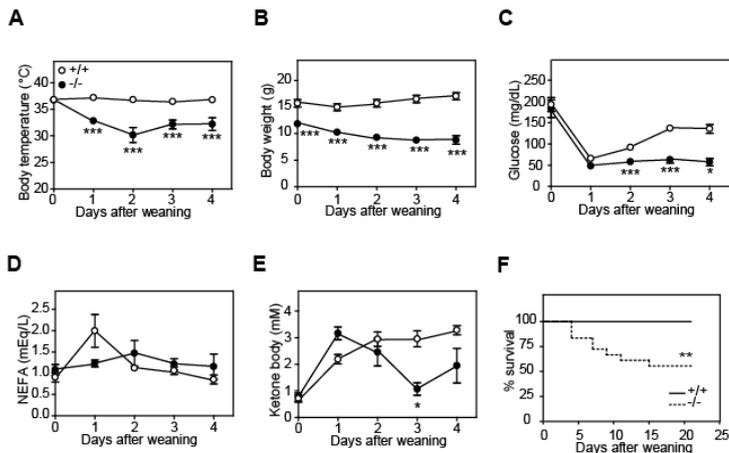
飢餓・長期絶食の際には、*AceCS2*欠損マウスでは、ATP, NADHの産生が低下し、低体温となり、運動能力の低下を来した。

我々は酢酸が必須の燃料であることを見いだした。I et al, *Cell Metabolism*, in press)

ついで、*AceCS 2-K0*は絶食時に低体温を呈し、持久運動能力の低下を呈する- 4 8時間の絶食では*AceCS 2-K0*マウスはコントロールマウスと比べ体温の低下が認められた。しかし寒冷刺激による低体温は認められなかった。トレッドミルによる持久運動テストでは、持久運動能力の低下が認められた。

我々はさらに離乳後間もない4週齢のマウスに低炭水化物・高脂肪食を負荷し、解析を行った。この食餌はグルコースが含まれない食餌であるため、ある意味ブドウ糖吸収利用が極端に阻害された状態(ケトジェニックな状態)を誘導することとなる。離乳直後から低糖高脂肪食を与えると遷延する低血糖、低体温、低体重を呈し、3-4日までに約50%のマウスが死亡した。生き残ったマウスもこの期間全く同様に低血糖、低体温、低体重を呈したが50%は生き残った。遊離脂肪酸、ケトン体は*AceCS2*^{-/-}、*AceCS2*^{+/+}ともに高値で互いの群間に差は認められなかった。

*AceCS 2-K0*マウスは低炭水化物・高脂肪食で低体温・低血糖を呈し、50%が死亡した。



4. 考察 まとめ

ケトジェニックな状態では遊離脂肪酸が血中へと有利今回の我々の研究では、AceCS 2-K0では低炭水化物・高脂肪食では動物は体温を維持することができず、低血糖にもいたった。この上な条件下では持久運動能力は減弱し、野生型やヘテロKOマウスと比べて格段に死亡率が上昇した。AceCS 2-K0マウスは酢酸の酸化が減弱し、その代わりに血中の酢酸濃度は上昇した。大変重要なことに、骨格筋のATPレベルは絶食下で低下していた。このことはAceCSがケトジェニックな状態でのATP供給に重要な役割を演じていることを示している。これらのことから、ケトジェニックな状態では低体温と持久運動能力の低下は酢酸を燃料として利用できないためであることが明らかとなった。血中の酢酸濃度が絶食の方が食餌下よりも高いことも、この可能性を支持するものである。

近年、AceCS 2 遺伝子が成長と肥満に関与することが報告されている。マウス染色体2番は成長と肥満に関与する座で、AceCS 2 は可能性のある18遺伝子の1つとして数えられている。

血中の酢酸濃度が高いにもかかわらず、これによって引き起こされる代謝性アシドーシスが呼吸によって代償されていることも見いだした。AceCS 2-K0マウスは動脈血中の二酸化炭素濃度が低く、血中のPHを中性に保っているのに寄与していた。慢性閉塞性肺障害 (COPD) 患者ではしばしば低体重が認められる。この原因としてCOPD患者ではエネルギー消費が10-20%亢進していることが、あげられている。AceCS 2-K0マウスは過呼吸を呈していることから、呼吸筋の運動が大きいこともこのマウスのエネルギー代謝が亢進している原因にもあげられると考えられる。

我々は以前にAceCS 2 が転写因子KLF15の標的であることを報告した(4)。絶食によって誘導されるAceCS 2 の誘導にはKLF15による転写制御が大きく関与している。AceCS 2-K0マウスと同様に、KLF15欠損マウスもまた、一晩の絶食によって極度の低血糖を呈する。KLF15は絶食時の糖新生をアミノ酸を分解する酵素を制御することによって促進する。我々のデータはKLF15が飢餓時のサバイバル (生存) に2つの機構から重要であることを示している。1つには肝臓における糖新生、そして2つめに、骨格筋と褐色脂肪細胞におけるATPと熱産生である。

Sirtuinはカロリー制限時における健康維持—寿命—に、哺乳動物を含め、種を超えて関与している。SIRT1はNAD⁺のレベルを感知し、複数の組織で代謝の転写制御に機能している。ミトコンドリア

アではSIRT3はAceCS 2を脱アセチル化し、酵素を活性化するの役立っている。SIRT3の蛋白レベルは絶食で誘導されることからSIRT3によるAceCS 2の制御は、カロリー制限によってもたらされる寿命延長に関与する代謝調節の鍵となる可能性もある。S i r t 3は近年Sirt3欠損マウスを用いた研究からATPのレベルを調節するのに必須であることが示されている。我々の今回の研究とあわせて、AceCS 2のSirt3による活性化がATPレベルの維持には重要であることが示唆される。AceCS 2とAceCS 2-KOマウスの研究から今後、ミトコンドリアでのエネルギー代謝と長寿に関する研究が発展することが期待される。

我々の今回の研究で、飢餓や糖尿病のようなケトジェニックな状態ではAceCS 2が生存とエネルギー産生に必須であることを示した。これらの研究および更なる研究で、AceCS 2による代謝が熱産生、エネルギー代謝に重要な役割を持つことが示されていくことが考えられる。

5. 発表論文、参考文献

1. Fujino, T., Kondo, J., Ishikawa, M., Morikawa, K., and Yamamoto, T. T. (2001) *J Biol Chem* **276**(14), 11420-11426
2. Ikeda, Y., Yamamoto, J., Okamura, M., Fujino, T., Takahashi, S., Takeuchi, K., Osborne, T. F., Yamamoto, T. T., Ito, S., and Sakai, J. (2001) *J Biol Chem* **276**(36), 34259-34269
3. Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okamura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T., Hammer, R. E., Kodama, T., Yanagisawa, M., and Sakai, J. (2009) *Cell Metab*, in press
4. Yamamoto, J., Ikeda, Y., Iguchi, H., Fujino, T., Tanaka, T., Asaba, H., Iwasaki, S., Ioka, R. X., Kaneko, I. W., Magoori, K., Takahashi, S., Mori, T., Sakaue, H., Kodama, T., Yanagisawa, M., Yamamoto, T. T., Ito, S., and Sakai, J. (2004) *J Biol Chem* **279**(17), 16954-16962