

博士論文

摂食とエネルギー恒常性に関する研究

—脳を介する末梢器官調節の解析

牛尼 翔太

目次

目次	1
序論	3
1. 高等動物におけるエネルギー恒常性維持機構	
2. 生体が食物から受容する刺激	
3. 脳を介したエネルギー代謝調節	
4. Skn1 遺伝子欠損マウス(Skn1 KO マウス)	
5. 本研究の目的	
第1章 絶食後再給餌によるラット末梢組織における 遺伝子発現変動の網羅的解析	15
緒言	
1. 目的	
2. 材料と手法	
3. 結果	
4. 考察	
第2章 摂食と味覚刺激の関係性の解析	40
緒言	
第1節 味覚刺激が摂食行動に与える影響	42
1. 目的	

2. 材料と手法	
3. 結果	
4. 考察	
第2節 甘味刺激とエネルギー代謝の関連性の解析	54
1. 目的	
2. 材料と手法	
3. 結果	
4. 考察	
第3章 消化管を起点とする新たな臓器間ネットワークの解明	75
緒言	
1. 目的	
2. 材料と手法	
3. 結果	
4. 考察	
総合討論	109
参考文献	117
論文要旨	133
追記	137
謝辞	138

序論

1. 高等動物におけるエネルギー恒常性維持機構

エネルギー代謝とは増殖や成長に必要な栄養素を外界から摂取し、体内で利用可能なアデノシン三リン酸(Adenosine triphosphate; ATP)などの利用可能なエネルギーを産生することであり、生命現象における重要な特徴である。高等動物では、飢餓にも対応できるように、栄養状態の変化に呼応してエネルギー代謝経路を変化させて生命維持を図る複雑なエネルギー恒常性維持機構を持つ。その中でも、摂食は外界から体内に取り入れた食物を分解し栄養素を吸収することでエネルギー代謝の開始点となっているだけでなく、食物の質と量を評価し摂取するエネルギーを調節している。これらの機構が破綻することで、過食や栄養素の代謝異常を介して肥満や糖尿病などの生活習慣病へと繋がるのが指摘されている。本研究は、動物が食物摂取時に、食物から受ける刺激によって生じるエネルギー代謝の変化について様々な観点から検討を行った。

1.1. 栄養状態の変化によって生じる末梢組織における栄養素代謝の変化

動物は、食物を摂取すると口腔、食道を通過した後、胃で一時的に滞留し、十二指腸や小腸などの消化管を経る過程で、グルコースやアミノ酸等体内に吸収可能な化合物の形に消化される。これらの化合物は主に小腸で取り込まれ、門脈から肝臓へ運ばれた後、各組織に運搬され代謝される。これらの化合物を代謝することで、生体の維持や行動など生命活動に必要なエネルギーである ATP を得る。特に哺乳類では十分に摂食を行なっている状態(摂食状態)において、主にグルコースを利用して ATP を産生する。余剰エネルギー源となる栄養素は一部をグリコーゲンに変え肝臓や筋肉に蓄積し、さらに一部は脂肪酸を合成し、トリアシルグリセロール(Triacylglycerol; TG)として白色脂肪組織(White adipose tissue; WAT)に貯蔵する。一方、エネルギーが不足すると、WAT に貯蔵した TG を積極的に分解し、全身に運搬し脂肪酸分解によって ATP を得る。肝臓では糖新生によりグルコースを供給する他、グルコースの代わりにエネルギー源となる脂肪酸由来のケトン体を産生し、各組織へ運搬される。このようにエネルギー源が変化する過程は視床下部などの中枢から放出されるホルモンや、インスリンやグルカゴンなどにより制御され、末梢組織ではホルモンによる刺激などを受けて遺伝子発現が変化する。このような変化は、その個体の栄養状態に呼応して動的に変化させており、この過程をエネルギー恒常性という。エネルギー

恒常性維持機構は、栄養素代謝の中心となる肝臓、脂質を貯蔵し必要なときに供給する WAT、運動により ATP を大量に消費する骨格筋、体熱産生にエネルギーを利用する褐色脂肪組織(Brown adipose tissue; BAT)などの組織が中心となり、脳が全身のエネルギー恒常性を統制していると考えられている。

現在までに、栄養状態の変化に伴って生じる遺伝子発現への影響については多くの研究がなされ[1,2]、その中でも絶食による影響については数多く報告されている。例えば AMP キナーゼ (Adenosine monophosphate-activated protein kinase; AMPK)は、AMP/ATP 比の増大により活性化することで細胞が栄養状態の悪化を感知し、代謝を変化させる機構が提唱されている[3,4]。また、絶食の進行に伴い各組織で発現変動する遺伝子について経時的に解析した報告[5,6]や、絶食によるグルコース恒常性の維持機構の解明[7]など様々な先行研究が行われてきた。しかし一方で、摂食に対して生じる影響についての先行研究は少なく、摂食による Sterol regulatory element binding transcription protein 1(SREBP1)タンパク質の発現変動[1]、数種類の遺伝子発現と酵素活性の経時的な変化[8]や摂食刺激による時計遺伝子の発現変動[9]に関する報告などがあるが、全体像は未知な点が多い。以下に、特にエネルギー恒常性維持機構の中心となる肝臓と WAT についての知見をまとめる。

1.1.1. 肝臓

肝臓は栄養素だけでなく様々な生体を構成する物質の代謝の中心となる組織である。肝臓の総細胞数の 70%が肝実質細胞(肝細胞)で占められ、その他は内皮細胞、伊東細胞、クッパー細胞、ピット細胞などによって構成されている。肝細胞が中心静脈を中心に六角柱状に並んだ小葉構造(肝小葉)を形成し、この肝小葉がさらに集合して肝臓の形態が成されている。胃から肛門に至る消化管の血液は全て門脈に合流するため、脂質以外の吸収された栄養素は全て肝臓に集まる。

肝臓の主な機能として、栄養素代謝(糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝、ビタミン代謝)、血清タンパク質産生、アンモニア解毒、薬物代謝、ビリルビン代謝等が挙げられる。その中で、エネルギー産生に関わりのある栄養素代謝について紹介する。

高血糖時にインスリンが放出されると肝臓ではグリコーゲン合成や解糖が亢進し、糖新生が抑

制される[10]。一方で、絶食時には糖新生が亢進し、不足したグルコースを血中に放出することで血糖値の維持を担う。また、絶食時に重要なエネルギー源となるケトン体の合成も主に肝臓で行われている。

脂質代謝においても肝臓が重要な位置を占めている。十分な栄養素が摂取されている状態では脂肪酸合成が積極的に行われる他、体内で生合成されるコレステロールの大部分が肝臓で産生される。コレステロールは食餌性由来の脂肪酸や内在性脂肪酸から合成された TG を輸送するためにリン脂質、アポリポタンパク質と共に超低密度リポタンパク質(Very low density lipoprotein; VLDL)の形成に利用される。VLDL は血流中に放出され、各末梢組織に脂質を運搬する。絶食状態に陥ると、脂肪組織が蓄積した TG を脂肪酸へと分解し、遊離脂肪酸(Non-esterified fatty acid; NEFA)として放出すると肝臓が取り込み、脂肪酸β酸化により脂肪酸を分解することでエネルギー産生やケトン体の合成を行い、エネルギー恒常性を維持する。アミノ酸代謝も主に肝臓で行われている。アミノ酸の炭素鎖の一部は糖新生の材料となり他、代謝に伴って産生されるアンモニアも尿素回路を介して尿素へと変換される。

1.1.2. 白色脂肪組織(WAT)

WATは食物として摂取した余剰のエネルギーを脂肪として蓄積する“エネルギー貯蔵”の器官であり、精巣上体周囲、腎周囲、皮下など体内に広く分布している。主な機能はエネルギーの貯蔵と放出であり、摂食・絶食の栄養状態やインスリン・グルカゴンなどのホルモンによって調節を受ける。貯蔵には、直接脂肪酸を取り込み TG として貯蔵するほか、インスリン刺激によりグルコーストランスポーターや脂肪酸トランスポーターが誘導され、積極的にグルコースや脂肪酸を取り込み、脂肪酸やグリセリンの合成を行い TG の形で貯蔵する。一方、エピネフリンやグルカゴンの刺激を受けると、ホルモン感受性リパーゼにより脂肪酸が分解され、血中に NEFA を放出し、肝臓や他の末梢臓器におけるエネルギー源を供給する。

近年 WAT はエネルギー蓄積や代謝を行う器官であるだけでなく、摂食抑制を行うレプチン[11]やインスリン感受性を亢進するアディポネクチン[12]を始めとして様々なアディポサイトカインを産生し放出するなど多様な機能を持つことが明らかになってきている。

1.2. 脳による摂食やエネルギー代謝の制御

脳(特に中枢神経系(Central nervous system; CNS))は全身の栄養状態を統合し、摂食行動やエネルギー代謝の制御を行う。摂食に関しては、脳と末梢組織によって受容される食物摂取や栄養状態の変化に関する情報を視床下部弓状核を中心とした摂食中枢で統合し、動物の摂食行動を制御する。カロリー補償性(Caloric compensation)という1日の摂取エネルギーを一定に保とうとする機構[13]があるように、摂食中枢による制御は非常に厳密である。摂食中枢については、視床下部弓状核が摂食関連神経ネットワークの中心となり、摂食行動を促進する神経細胞、摂食行動を抑制する神経細胞が存在し摂食を調節する神経ペプチドを産生している。前者の例としてはニューロペプチド Y(Neuropeptide Y; NPY)やアグーチ関連ペプチド(Agouti-related peptide; AgRP)、後者の例としてはプロオピオメラノコルチン(Proopiomelanocortin; POMC)などが挙げられ、これらの神経ペプチドによって摂食制御が行われている。脳の他の領域も摂食行動に関連する。例えば視床下部腹内側核ではレプチン受容体が豊富に発現していることから摂食行動に重要な働きをしている[14]。また、ラットやマウスに対して制限給餌を行うと、給餌時間に覚醒するようになるという概日リズムの変化が生じるが、この変化には視床下部背内側核が関わることが報告されている[15]。また、摂食制御は脳内の連絡経路だけでなく、栄養素にも影響され、脳室内におけるフルクトース濃度の上昇では摂食が亢進する[16]一方、グルコース[17]や視床下部中のマロニル CoA(Malonyl-CoA) [18]は摂食抑制に働く。

摂食中枢は末梢組織からの情報による影響も受ける。脂肪組織から分泌されるレプチンは弓状核、腹内側核、外側野、腹側被蓋野、背側縫線核に作用し摂食行動の抑制を引き起こす[19]。レプチン欠損マウス(ob/ob マウス)や、レプチン受容体欠損マウス(db/db マウス)はこの機能が低下しているため、摂食量が増加し、肥満を呈する[20]。また、インスリンも弓状核における POMC 神経を活性化することで摂食行動を抑制するため、脳全体や視床下部のインスリン受容体を欠損させると、摂食量増加が生じる[21]。栄養状態に応じて消化管が分泌するインクレチンも摂食制御に関わるものが多い。コレシストキニン(Cholecystokinin; CCK)、ペプチド YY(Peptide YY; PYY)、グルカゴン様ペプチド-1(Glucagon like peptide-1; GLP-1)などの消化管ホルモンは、

摂食によって血中に分泌される他、迷走神経を介して脳に伝達されて摂食行動を抑制する[22]。

胃で産生されるグレリン(Ghrelin)は、胃内容物の十二指腸への運搬を活性化する他、摂食行動の促進に働くインクレチン[23]であり、絶食によって血中に分泌される他、迷走神経を介して脳へと伝達される[24]。血中に放出されたインクレチンは脳延髄における最後野で受容され機能する。この最後野は脳血管関門を欠いているためインクレチンを受容することが可能である。

また脳は、生体内の様々な要素の変化を受容することでエネルギー代謝に対しても積極的な制御を行うことが知られている。脳内におけるグルコースや脂肪酸などを受容する栄養素受容ニューロンは脳幹や視床下部を始めとして脳全体で存在しており、エネルギー恒常性に関わっている。例えば、血糖値は膵臓ランゲルハンス島 β 細胞によって感知される他、視床下部のオレキシンニューロンを始めとした神経細胞でも感知される[25,26]。低血糖時には交感神経を興奮させエピネフリン分泌を亢進し血糖を供給する一方で、高血糖時には膵臓ランゲルハンス島 β 細胞を刺激しインスリンを分泌させる。その感知機構の一つとして視床下部における甘味受容体が関与する可能性が示唆されている[27]。脂肪酸は脳内で神経細胞のエネルギー源とはならないが、脳室内で脂肪酸を投与すると視床下部の Carnitine palmitoyltransferase 1(Cpt1)の発現低下を通じて摂食抑制に加えて肝臓における糖新生の抑制[28,29]や交感神経の作用が減弱しグルコース誘導性のインスリン分泌の亢進[30,31]が生じる。また、視床下部内側基底部ではアミノ酸の一つであるロイシンを受容し、代謝することによって肝臓における糖新生を調節する[32]。ホルモンも脳から末梢組織に大きな影響を与え、脳におけるインスリンは Insulin receptor substrate 2(IRS2)を介して栄養状態の管理と寿命に関わっていることが報告されている[33]。レプチン受容体発現細胞においても IRS2 が発現することが報告され、これを欠損することにより、レプチン受容経路とは独立的に、熱産生や耐糖能の低下を通じて肥満を発症することが報告されている[34]。また、非常に興味深いことに、脳においてもインスリンが発現しており、その機能については未解明であるが、何らかのエネルギー恒常性維持機構に関わっていると考えられている[35]。レプチンの主な機能は摂食抑制ではあるが、交感神経を刺激することによりエピネフリンやノルエピネフリンの分泌が増えることで脂肪燃焼が亢進する作用[36]や、血中グルコースの取り込みを増加させることで血糖値を低下させる作用が報告されている[37]。

2. 生体が食物から受容する刺激

食物摂取の主な目的は栄養素の吸収であるが、生体は食物から様々な刺激を受容している。この受容には5つの感覚(視覚・嗅覚・触覚・味覚・聴覚)が密接に関与している他、胃・小腸などの消化管は摂食した食物が直接接触する器官であるため、食物由来の刺激を受容する機構が数多く存在し、様々な生理作用を引き起こすことが報告されている。

2.1. 感覚刺激

食物は栄養素だけでなく味や香り、見た目なども重要な要素であり、食物の探索や摂食の可否の判断に関連する。例えば、食物摂取前には食物の認識のために視覚や嗅覚が関与する他、摂食時には味覚・嗅覚・触覚が食物から得る情報を受容している。摂食に関連して生じる感覚については以下の様なことが知られている。

2.1.1. 視覚

視覚は食物認識の中で最初に得られることが多い感覚であり、特にヒトにおいては、食物の視覚情報から味や栄養などの予測をすることで、食物摂取の可否の判断を行う[38,39]。近年では、高カロリー食品または低カロリー食品の写真を見た後、味覚刺激を与えると脳の活動が変化する[40]など、味覚など他の感覚との相互作用も存在することが知られている。

2.1.2. 嗅覚

嗅覚は食品由来の香気性成分を鼻に存在する嗅覚受容体を介して脳へと伝達される。げっ歯類では食物の認識には視覚よりも嗅覚が重視される[41]。摂食前に感じる食物の香り(orthonasal)を認識する他、摂食中には喉の奥から鼻に抜ける香り(retronasal)があり、食品のフレーバーを決定している。また、様々な食品中に含まれる香気成分リナロール((R)-(-)-linalool)にラットを暴露させると血液[42]や視床下部[43]における遺伝子発現変動を伴って拘束ストレスを緩和するなど、感覚と生理現象が深く連携していることが既に報告されている。

2.1.3. 触覚

摂食時の触覚は口腔内で食物を破砕する時(咀嚼)に受容する体性感覚である。マウスにおいて、餌組成や摂食量は同じでも給餌方法(固形または粉末)の違いによって体重増加に大きく影響したことが報告されていること[44]からも、触覚もエネルギー代謝に関連する可能性が浮上している。

2.1.4. 味覚

味覚は口腔内の味覚受容体において受容される5基本味(甘味・苦味・旨味・酸味・塩味)による感覚であり、多くの動物は甘味・旨味を嗜好する一方で、苦味・酸味を忌避する。塩味に対しては低濃度では嗜好する一方で高濃度では忌避する[45]。味覚は、感覚の中でも唯一、摂食時のみに受容されるためエネルギー恒常性との関連性が深いことが考えられる。実際に近年人工甘味料による甘味刺激が体重増加を促すという報告が複数なされている[46]。

2.2. 消化管における刺激受容

胃・小腸などの消化管は摂食した食物が直接接触する器官であるため、食物由来の刺激を受容しエネルギー恒常性に深く関与すると考えられるが、不明な点が多い。これまでに知られている直接栄養素吸収に関わる機構として、小腸上皮細胞(enterocyte)における糖吸収は通常ナトリウム-グルコース共輸送体タンパク1 (Sodium-dependent glucose transporter 1; SGLT1)が恒常的に管腔側に存在し吸収を担うが、摂食によって大量の糖が消化管を通過するとグルコーストランスポーター2 (Glucose transporter 2; GLUT2)が管腔側に膜移行し、吸収を促進することが報告されている[47]。

また、近年では味覚受容体が様々な組織において発現し、胃や小腸などの消化管でも味覚受容体が様々な生理作用に関与することが報告されている[48]。甘味受容体は胃において刷子細胞やグレリン産生細胞と共発現しており、グレリン分泌と関連する可能性が報告されている[49]。また、小腸[50]では、SGLT1が甘味刺激によって発現上昇すること[51,52]、小腸分泌細胞(enteroendocrine cell)に発現し GLP-1、Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)の

分泌を制御し[53]、耐糖能に影響すること[54]が報告されている。近年、肥満[55]や糖尿病[56]によって味覚関連分子の発現パターンが大きく変化していることも報告されている。しかし一方で、糖の吸収量には影響しないという報告も存在する[57]。

苦味受容体 T2Rs ファミリーも様々な組織において多種発現しているが[58]、消化管では分泌細胞 enteroendocrine cell を株化した STC-1 cell において発現し、苦味物質の刺激に対して応答することが確認された[59]。また、T2Rs に生じた変異が GLP-1 の放出に関与し糖代謝に影響することが報告されている[60]。苦味物質をゾンデにより強制投与すると、一時的にグレリン分泌量の上昇から摂食量の増加が見られるが、その後摂食量の低下が生じる[61]。この作用は味覚関連分子 α -gustducin (G \pm gust) 欠損マウスでは効果が消失した。また、キニーネを低濃度で添加した餌 (0.1%) をマウスに対して 80 日間与えると、摂食量や除脂肪重量に変化はないが、脂肪重量の低下を伴った体重低下が生じていた[62]。これらの効果は味覚関連分子 Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (Trpm5) 欠損マウスでは効果が消失していたことから、苦味受容体の関連が示唆されている。

旨味受容体 T1R1 と T1R3 は他の味覚受容体と同様に enteroendocrine cell に発現し、フェニルアラニン、ロイシン、グルタミン酸に応答することに加え、IMP の添加により応答が増強し、これらの応答により CCK 分泌が促進された[63]。胃においてはグルタミン酸受容体 (Metabotropic glutamate receptor 1; mGluR) や G protein-coupled receptor, family C, group 6, member A (GPCR6A) などのアミノ酸受容体も発現しており[64]、旨味刺激 (グルタミン酸) により胃から脳に対する求心性迷走神経を興奮させている[65]。

その他、大腸 enteroendocrine cell において G \pm gust と共役する脂肪酸受容体 G protein-coupled receptor (GPR) 40, 41, 43, 119, 120 や胆汁酸受容体 G-protein-coupled BA receptor 1 (Tgr5) が発現しており、酢酸や酪酸、オレイン酸等の脂肪酸をリガンドとして大腸における GLP-1 分泌に関与することが報告されている[66]。

3. 脳を介したエネルギー代謝調節

上述のような末梢組織における熱産生や脂質分解などのエネルギー調節機構は、末梢組織単独

や末梢組織間ネットワークだけでなく、脳と末梢組織の密接な連携によっても維持されている。摂食などの栄養状態の変化を末梢組織が受容すると、末梢組織から脳に向けて情報が伝達された後に、脳から末梢組織に対してエネルギー代謝を調節するシグナルをホルモンや迷走神経を介して発する[67]。近年、インスリンなどそれ自身が直接末梢組織のエネルギー代謝調節因子となるホルモンでも、脳で受容されることで新たな末梢組織の調節を司る因子になるという機構が報告されている[21]。

また、末梢組織が栄養状態の変化を感知して脳を介して他の臓器に影響を与えるという知見が近年注目されている。例えば、肝臓における Peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ) をアデノウィルスによって発現誘導すると、脳を介したシグナル伝達により WAT における脂質分解が亢進することでエネルギー消費量が上昇する[68]。肝臓グルコースキナーゼ(Glucokinase; Gck)をアデノウィルスによって発現誘導すると、迷走神経を介して脳に情報が伝達された後、交感神経を通り BAT における熱産生の抑制が生じることが報告されている[69]。これらは特定の遺伝子を導入するという強制的に発現誘導した例ではあるが、マウスの系統の違いによる肥満の素因と Gck の発現量が相関していること、絶食による脂肪分解シグナルは肝臓中グリコーゲン含量によることも報告されており[70]、生体では脳による直接的な感知機構が存在しているだけでなく、末梢組織において受容された栄養状態の変化が脳を介し、他の末梢組織の代謝を変える機構も重要な役割を果たしていると考えられる。

4. Skn1 遺伝子欠損マウス(Skn1 KO マウス)

Skn1(POU class 2 homeobox 3; Pou2f3)は POU ドメインを持つ転写因子であり、Skn-1a と Skn-1i の 2 つのサブタイプを持つ遺伝子である。皮膚の角化細胞由来でクローニングされた遺伝子であり[71]、角化細胞の分化を促進していることが報告されている[72,73]。RT-PCR による発現分布解析により、精巣及び 14.5 日胚(14.5d embryo)に発現が見られたが、脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓には発現が見られなかった[74]。別の報告では RT-PCR による発現分布解析で最も発現量が高かった組織は皮膚であった一方、脳、心臓、肺、筋肉、肝臓では発現していないことを確認し、RNase protection assay では胸腺間質、皮膚、胃、小腸、精巣での発現が確認されている

[75]。Skn-1i は POU ドメインによる DNA 結合領域が N 末端の配列によって隠されてしまっているため DNA が結合できないことから、Skn-1a とは機能が異なることが報告されている[71]。

当研究室で作製されたノックアウトマウス[76]は Skn-1a / Skn-1i に共通したエクソンを欠損させていること(図 0-1 A)から、本論文では Skn1 KO マウスとして表記した。味蕾では Skn-1a のサブタイプを発現しており(図 0-1 B)、*in situ hybridization* 法による解析の結果、Skn-1a は味蕾において Trpm5 と共発現していた(図 0-1 C)。Trpm5 は味蕾の味細胞を電子顕微鏡観察に基づき 4 種類に分けた[77]中の Type II 味蕾細胞のマーカ分子として知られている[78]。この Type II 味蕾細胞には甘味・旨味・苦味受容体を発現することから、甘味・旨味受容体のサブユニットである Taste receptor, type 1, member 3(T1R3)や苦味受容体の一つである Taste receptor type 2, member 5(T2R5)とも共発現していた(図 0-2 A)。しかし、Type III 味蕾細胞で発現する酸味受容体 Polycystic kidney disease 2-like 1 protein(Pkd211)や Type I 味蕾細胞で発現する Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2(NTPDase2)とは共発現していなかった。

Skn1 遺伝子の欠損により甘味受容体(Taste receptor, type 1, member 2; T1R2 + T1R3)・旨味受容体(Taste receptor, type 1, member 1; T1R1 + T1R3)、苦味受容体(Taste receptor type 2; T2Rs)及び Type II 味蕾細胞における味覚受容機構に関わる味覚関連分子(Phospholipase C, beta 2; Plcb2)や Gagust、Trpm5 の発現が消失していた。Type II 味蕾細胞が消失したことを示す一方で、それらの細胞に相当する数の酸味受容体を発現する Type III 味蕾細胞が増加していた(図 0-2 B)。以上の結果より、甘味・旨味・苦味細胞(Type II 味蕾細胞)と酸味細胞(Type III 味蕾細胞)は共通の前駆細胞から分化し、Skn1 がその分化に寄与していることが示唆された。Skn1 KO マウスは甘味・旨味・苦味刺激に対する神経応答が消失していた他、2 瓶選択試験による行動学的解析でも甘味・旨味に対する嗜好性及び苦味に対する忌避性が消失していたことから、これらの味を知覚できていない(図 0-2 C)。酸味及び塩味に対する応答は正常であった。Skn1 KO マウスは味蕾細胞の分化機構の一端を解き明かした最初の例であるが、さらに甘味・苦味・旨味を感じない味盲モデルマウスとして味覚行動解析などに使用することが期待されている[76]。

また、哺乳類には鼻腔などの上皮組織において Solitary chemosensory cell という化学刺激受容細胞が存在し[79]、苦味受容体 T2Rs を始めとして味覚関連分子が発現することが知られている

[80]。また、味覚受容体 T1R3 も発現していることが報告されている[81]が、その分化にも Skn1 が関与していることが報告されている[82]。

5. 本研究の目的

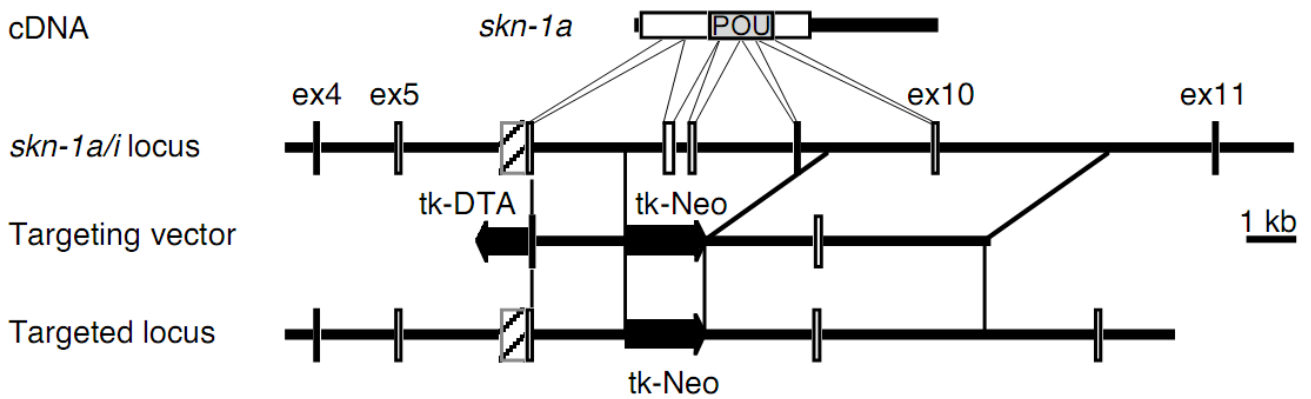
本研究は、摂食時に生じるエネルギー恒常性維持機構の一端を解明することを目的として、食物から受ける刺激がエネルギー恒常性に与える影響について栄養学的な観点に加え、味覚刺激や消化管に対する刺激など様々な観点から解析した。

第1章では、栄養学的な観点から、摂食が肝臓や WAT の遺伝子発現に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に捉えることを目的とした。さらに、給餌時間を変えた複数の群を設定して、時系列解析を行うことで給餌時間に依存した絶食状態からの復元の流れを経時的に解明することを試みた。さらに、その中で新たに摂食によって変動することを見出した生理機能関連タンパク質についてイムノブロットイングなどの手法を用いて詳細な解析を行った。

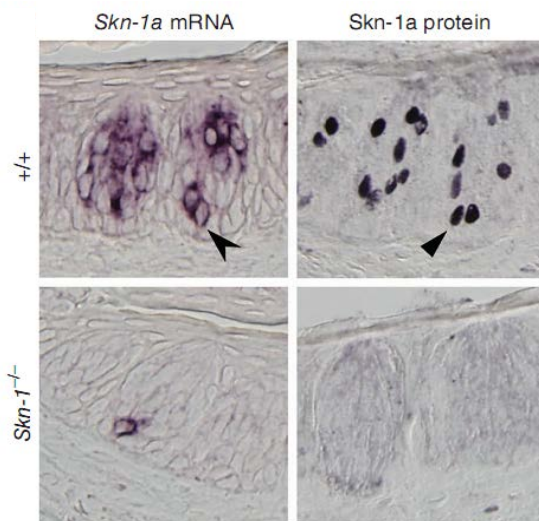
第2章では、摂食と味覚刺激の関係性の解析として、摂食時に受容する味覚とエネルギー恒常性維持機構の関係を解明することを目的とした。味覚刺激を与えた時の摂食量や食物選択など行動学的なアプローチに加え、甘味刺激が直接的に肝臓におけるエネルギー代謝に影響を与えるかについて DNA マイクロアレイによる網羅的解析から検討を行った。

第3章では、消化管が食物から受容する刺激とエネルギー恒常性維持機構の関係性を明らかにすることを目的として、Skn1 KO マウスをモデルマウスとして解析を行った。Skn1KO マウスは低体重を示す等エネルギー恒常性維持機構が破綻したマウスであることを明らかにしたことに加え、消化管を起点とする脳を介した新たなエネルギー恒常性機構の存在について解析した。

(A)



(B)



(C)

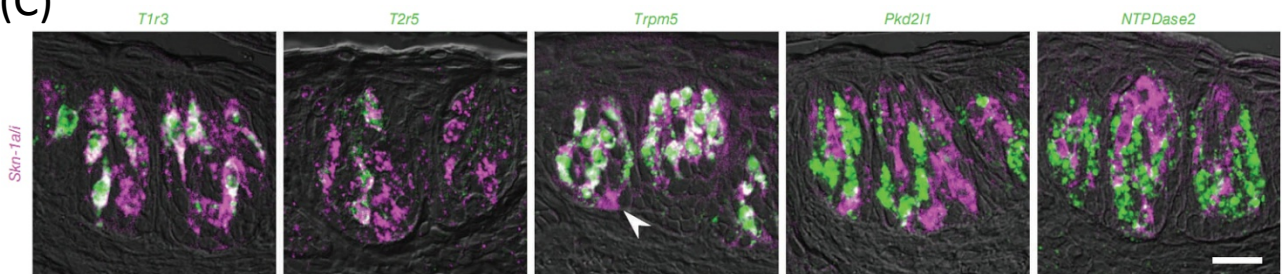


図0-1. Skn1 KOマウスの作出と味覚関連分子との共発現

(A) ターゲティングベクターの構造図

Skn-1a/i 共通部分を組み替えたため、*Skn1* として表記した。

(B) *Skn-1a* の *in situ* hybridization と免疫染色

味蕾では *Skn-1a* を発現しており、基底部に近い未分化の細胞にも発現している(矢印)

(C) 既知味覚関連分子との共発現

Type II 味蕾細胞に発現し、T1R3, T2R5, Trpm5 とは共発現していたが、Pkd211, NTPDase2 とは共発現していなかった

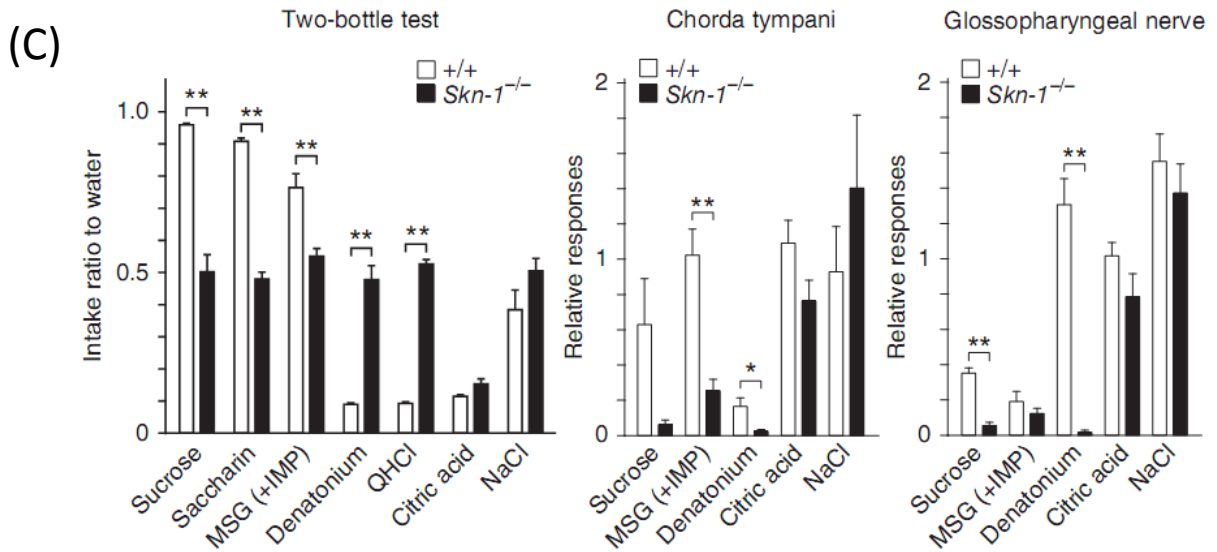
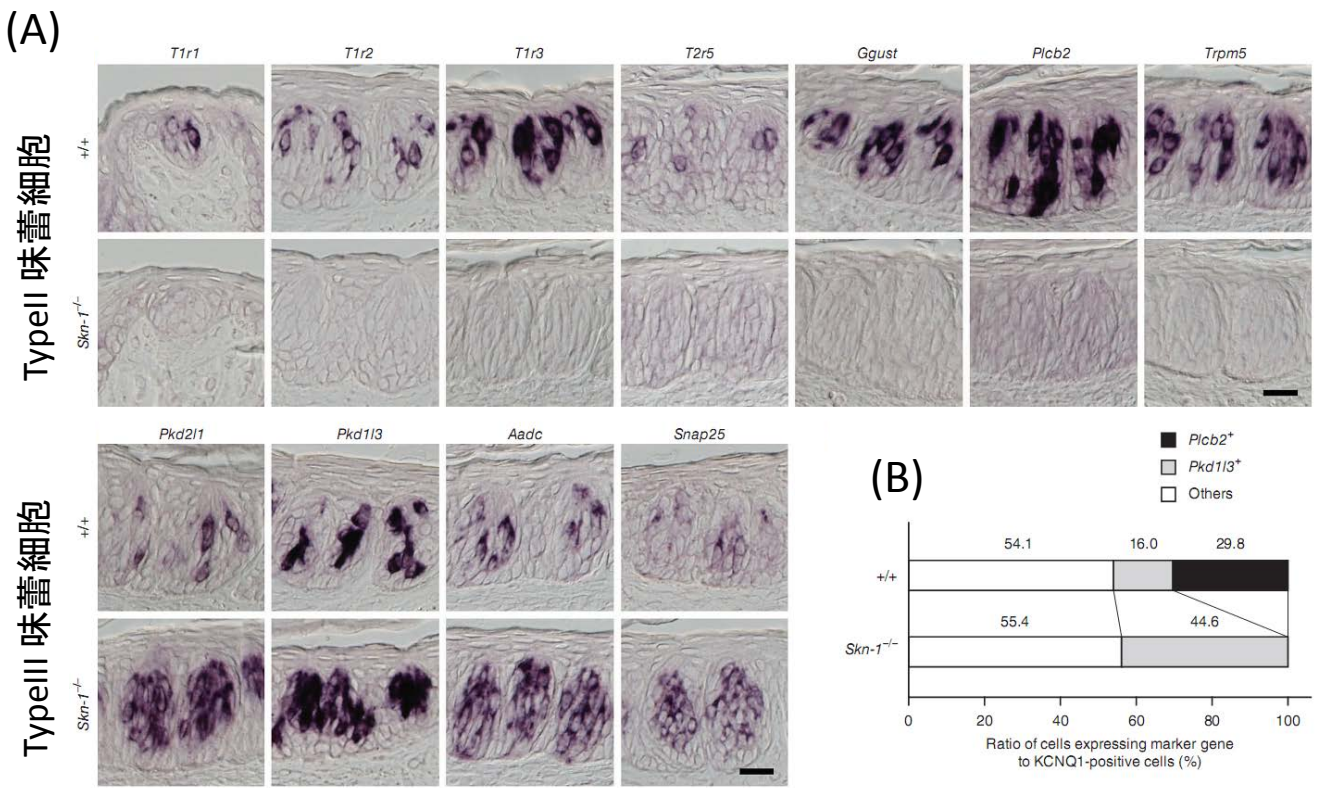


図0-2. Skn1 KOマウスの表現型

(A) Skn1 KOマウスにおける味蕾細胞マーカー遺伝子の発現変化

Type II 味蕾細胞に発現する遺伝子は消失した(上段)が、Type III 味蕾細胞に発現する遺伝子には変化が見られなかった(下段)。

(B) Skn1 KOマウスの味蕾における細胞種の割合

Type II 味蕾細胞(Plcb2陽性細胞)の約30%が消失した分、Type III 味蕾細胞(Pkd1l3陽性細胞)が約15%から約45%に増加した。

(C) Skn1 KOマウスの嗜好性行動試験と神経応答

行動試験を行うと甘・旨味に対する嗜好性や、苦味に対する忌避性が消失した。塩・酸味に対する嗜好性は正常であった。神経応答では甘・旨・苦味に対する応答が消失していた。

第 1 章

絶食後再給餌によるラット末梢組織 における遺伝子発現変動の網羅的解析

緒言

動物は生体内の栄養状態の変化に呼応して肝臓や脂肪組織、筋肉などを中心にエネルギー恒常性を維持する。摂食により栄養素が十分に摂り入れられている状態では主に糖質をエネルギー源として利用し、余剰分を脂肪として蓄積する。絶食により栄養状態が悪化すると、蓄積していた脂肪を利用する。これらの変化はホルモン等による調節を受け、遺伝子発現の変動を伴う。絶食時の代謝変化については数多く報告されているが、摂食時に栄養素が吸収されて生じる変化(本章では摂食応答と定義する)については報告が少なく、その全体像は未解明である。この原因は、先行研究において絶食による影響の解析では自由摂食状態から餌を抜くことで絶食を行っているものが多いが、摂食応答に関する実験では個体が最後に摂食した時刻の違いにより個体差が生じるためであると考えられる。特に、短時間における栄養状態の変化を捉える研究ではこの個体差が大きな影響をおよぼすことが予想された。そこで、毎日一定の時間のみ給餌を行う制限給餌を採用することで動物の個体間の摂食パターンを揃え、よりばらつきの少ない摂食応答を捉えることで解像度の高い解析の実現を目指した。

本章では、生体が摂食によって受ける影響を栄養学的な面から捉えるとともに、複数のタイムポイントで DNA マイクロアレイ解析を行うことで、経時的かつ網羅的に捉えた。

1. 目的

摂食によってエネルギー代謝がいつ、どのように変化するか、エネルギー代謝以外にも摂食に伴って生じる生理機能の変化の全体像を解明することを目的とした。飼育条件や解析を行うタイムポイントの条件検討を行った上で、DNA マイクロアレイを用いて網羅的且つ経時的な遺伝子発現変動解析を行った。

2. 材料と手法

2.1. 被験動物

6 週齢 Wistar 系雄性ラットを日本エスエルシー株式会社(Hamamatsu, Japan)から購入した。

2.2. 動物飼育

明暗周期が 12 時間ごとに自動的に切り替わり(8:00~20:00 が明期)、室温(22±1°C)、湿度が一定に保たれた飼育室で飼育を行った。5 連ケージで 1 頭ずつ単独飼育を行い、餌はラボ MR ブリーダー固形飼料(Nosan Corporation., Kanagawa, Japan)を使用した。

自由摂食で飼育を 2 日間行い、飼育開始後 2 日目 16:00 に餌を抜いた。その後 8 日間は、既報の手法[83]を参考にして 1 日 10 : 00~16:00 のみ給餌を行う制限給餌を行った(図 1-1 A)。飼育期間中は自由に水を摂取できる状態にした。制限給餌期間に 1 時間に 1 回ずつ摂食量(給餌量－餌残量)の測定を行った。さらに、各個体の体重は給餌開始時刻の 10:00、給餌終了時刻の 16:00 の 1 日 2 回測定を行った。解剖前日に群ごとの体重が近くなるように平均及び分散を考慮してラットを 4 群に分け、図 1-1 B の飼育スケジュールに従って、解剖前 1 時間再給餌を行った群(1 hour-refeeding; 1hR 群),3 時間再給餌を行った群(3hR 群),6 時間再給餌を行った群(6hR 群)と、解剖前 24 時間絶食状態にさせた群(24 hour-fasting; 24 hF 群)の計 4 群を作製した(各群 n = 5)。

また、制限給餌を行わずに自由摂食状態で飼育し、解剖まで自由摂食状態を維持した *Ad libitum* 群と解剖前 24 時間絶食状態にさせた *Ad libitum* + 24 hF 群も作製した(各群 n = 5)。

解剖では 5 µg/µl ペントバルビタール溶液をラットに腹腔内投与(50 mg/kg BW)し、ラットを完

全に眠らせた。さらに 10 μ l ずつヘパリン(Mochida Pharmaceutial Co., Tokyo, Japan)を分注した 2 ml チューブと空の 2 ml チューブにそれぞれ頸動脈より採血した後、放血させて安楽死させた。その後開腹して、肝臓と精巣上体 WAT を摘出した。摘出した臓器は一度氷冷した生理食塩水ですすいだ後に、液体窒素で凍結させ、その後 -80°C で保管した。肝臓は第二葉より 5 mm 角程度のブロックを切り取り、1 ml の Ambion® RNAlater(Life technologies Inc., Tokyo, Japan)に浸漬し、一晩 4°C で保存した。その後、RNA later を除去し、サンプル使用時まで -80°C で保存した。

血漿はヘパリン入りチューブに採取した血液サンプルを 4°C 、 $1,500 \times g$ で 10 分遠心後、上清を回収し、この作業を 2 回行い調製した。血清は採血後 1 時間室温静置後、 $830 \times g$ で 10 分遠心後、上清を回収して調製した。

2.3. 血中生化学データの測定

2.3.1. 血糖値・遊離脂肪酸(NEFA)・インスリン測定

血漿血糖値はグルコース C II -テストワコー(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、血清遊離脂肪酸(NEFA)は NEFA C-テストワコー(Wako Pure Chemical Industries)を用いて測定した。血漿インスリンはインスリン測定キット(Morinaga Institute of Biologinal Science Inc., Yokohama, Japan)、血清中インターフェロン γ (Interferon- γ ; IFN- γ)濃度の測定は、Quantikine® Rat IFN- γ ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, US)を用いて測定した。それぞれの吸光度測定は Flexstation 3 (Molecular Devices Corporation., Tokyo, Japan)を用いて行なった。

2.3.2. 血漿データの受託解析

その他の血漿成分を長浜ライフサイエンスラボラトリー(Shiga, Japan)に委託して測定した。測定項目は血中アルブミン(Albumin; ALB)、総コレステロール(Total cholesterol; T-CHO)、遊離型コレステロール(Free cholesterol; F-CHO)、エステル型コレステロール(Cholesteryl esters; E-CHO)、トリアシルグリセロール(TG)、リン脂質(Phospholipid; PL)、LDL コレステロール(Low density lipoprotein cholesterol; LDL-C)、HDL コレステロール(High density lipoprotein

cholesterol; HDL-C)、総脂質(Total lipid; TL)、総ケトン体(Total ketone body; T-KB)である。

2.4. DNA マイクロアレイ実験の流れ

2.4.1. 肝臓サンプルの total RNA 抽出のための前処理

2.1.で RNA later に浸漬後、 -80°C で保管した肝臓サンプルを 2 ml の TRIzol に移し、ポリトロンホモジナイザー(Kinematica, Lucerne, Switzerland)により破碎・混和し、氷冷した。

2.4.2. WAT サンプルの total RNA 抽出のための前処理

2.1.で液体窒素による凍結後、 -80°C で保管した WAT サンプルを乳棒・乳鉢を用いて液体窒素存在下で破碎した。さらに、液体窒素を飛ばしてサンプル重量を測定後、サンプル 50 mg あたり TRIzol 1 ml の割合で加え、よく混和した。

2.4.3. ラット臓器から total RNA の抽出

各組織の total RNA を TRIzol のプロトコールにしたがって抽出し、260 nm における吸光度測定、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。また、RNeasy mini kit (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan)を用いて精製し、RNase-free DNase set(QIAGEN K.K.)を用いて DNase I 処理を行った。最後に、260 nm における吸光度測定、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、total RNA の抽出量や質を確認した。

2.4.4. DNA マイクロアレイ

24hF、1hR、3hR、6hR の各群($n = 5$)からインスリン値が平均から近い 4 個体を選別して DNA マイクロアレイに供した。ターゲット(DNA マイクロアレイ用サンプル)の調製は GeneChip 3'IVT Expression Kit (Affymetrix Inc., California, US)を用いて、Affymetrix 社のマニュアルに従って行った。すなわち、精製済み total RNA 100 ng から、1 本鎖 cDNA に逆転写後、相補鎖を合成し 2 本鎖 cDNA を作製した。さらに、この 2 本鎖 cDNA を鋳型として *in vitro* 転写反応を行い、ビオチン化 aRNA を合成した。磁気ビーズである RNA Binding Beads を用いた精製を行った。260

nm における吸光度測定、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を用いて濃度、aRNA の伸長度を確認した後、Fragment Buffer を用いて aRNA を 35~200 base に断片化した。

Affymetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array のマイクロアレイチップ(Affymetrix Inc.) に 12.5 µg の aRNA 断片を含むハイブリダイゼーションミックスを注入し、45°C で 16 時間ハイブリダイズした。GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit(Affymetrix Inc.)を用いて洗浄、フィコエリスリン標識化したストレプトアビジンをビオチン化 aRNA に結合させて、蛍光シグナルの読み取りを行い、CEL ファイルを取得した。一連の作業は GeneChip® System(Affymetrix Inc.)および Affymetrix Genechip® Command Console(Affymetrix Inc.)を用いて操作を行った。

2.5. DNA マイクロアレイデータ解析

2.5.1. DNA マイクロアレイデータの正規化

DNA マイクロアレイで取得した CEL ファイルはまず統計解析言語環境 R [84]や Bioconductor [85]を用いてデータの正規化を行なった。正規化には、Microarray analysis suite 5.0 (MAS5) [86]、Robust multiarray average (RMA) [87]、quantile Factor analysis for robust microarray summarization (qFARMS) [88,89]、Distribution free weighted method (DFW) [90]の 4 つの手法を用いた。

正規化したマイクロアレイデータを用いてサンプル間クラスタリング解析を行い、最も明確に群ごとにクラスターが分離した正規化手法を採用し、その後の解析に用いた。サンプル間クラスタリングには R に実装されているクラスター解析関数 hclust を用いた。パラメータとして発現ベクトル間の類似度は相関係数距離、クラスターをまとめる方法は平均連結法を設定した。

2.5.2. 発現変動プローブセットの抽出

24hF 群と各給餌群のサンプル間で Rank products 法[91]を用いた二群間比較を行い、発現変動プローブセットの抽出を行った。Rank products 法は本研究で採用した DFW と qFARMS に対して最も発現変動遺伝子の検出率が高いことが報告されている [92]。二群間比較を行った後、Benjamini and Hochberg の False discovery rate (FDR) [93]で多重比較検定を行い、発現上昇と

発現低下それぞれについて $FDR < 0.05$ を満たすプローブセットを発現変動プローブセットとして抽出した。

2.5.3. 機能解析

遺伝子を機能で分類したデータベース Gene Ontology(GO)の中で、生物学的機能で分類した Biological Process を利用した機能解析を行った。ウェブツール The Database for Annotation, Visualization and Integrated discovery(DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [94,95]を用いて各組織での発現変動プローブセットをサブセットとして解析を行った。マイクロアレイに搭載されている全プローブセットを基準として発現変動プローブセットが持つ機能が濃縮されているか有意差検定(Enrichment analysis)を行い、 FDR [93]で補正した EASE Score < 0.05 を満たす GO term を抽出した。さらに、GO term には階層性があるため、ウェブツール Quick GO [96,97] (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)を利用して、DAVID より抽出された GO term 間の階層関係を相関チャートで図示した。

2.6. イムノブロットイング

2.6.1. 使用した抗体

免疫プロテアソーム構成タンパク質 PSMB9($\beta 1i$)、PSMB10($\beta 2i$)、PSMB8($\beta 5i$)に対する抗体 (anti- $\beta 1i$, anti- $\beta 2i$, anti- $\beta 5i$)を Enzo Life Sciences Inc. (New York, US) より購入した。しかし anti- $\beta 2i$ は肝臓抽出液に対するイムノブロットイングで複数のバンドを形成していたため、不適であると判断し本解析では使用しなかった。

2.6.2. サンプルの調製

-80°C で凍結した臓器サンプルを、クライオプレス(MICROTEC CO, LTD., Chiba, Japan)を用いて粉碎し、1% (v/v) の protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Corporation., Missouri, US)を含む 1 mL の Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol)を加え、氷上で直ちにポリトロンホモジナイザーで 20,000 rpm、1

分間ホモジナイズした。4°C、13,200 ×g、10 分間遠心後、上清を分注して-30°C で保存した。

2.6.3. SDS-PAGE 及びメンブレンへのトランスファー

Laemmliの方法[98]に従ってSDS-PAGEを行った後、転写バッファー(0.1 M Tris, 0.19 M glycine)に浸し、15 分間振とうした。セミドライ型転写装置(BIO CRAFT, Tokyo, Japan)を用いてゲル 1 cm² あたり 2 mAの電流(constant current)で 90 分間PVDF膜への転写を行った。マーカ一部分のメンブレンを切り取り、CBB染色を行い、残りのメンブレンは抗体反応を行った。

2.6.4. 抗体反応

PVDF 膜を、5%スキムミルク/ TBS (Tris-buffered saline, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl)に室温で 1 時間浸しブロッキングを行った。各標的タンパク質に対する抗体を 1000 倍希釈した 1 次抗体溶液 (溶媒 : 5%スキムミルク/ TBS) を調製し、4°C で 1 晩反応させた。1 次抗体反応終了後メンブレンを 0.05% Tween 20/ TBS で室温、10 分間振とうを 3 回繰り返した。Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE Healthcare., Buckinghamshire, UK) を 1000 倍希釈した酵素標識 2 次抗体溶液 (溶媒 : 0.05% Tween 20/ 5%スキムミルク/ TBS) を調製し、抗体によって最適化した条件 (室温で 30 分~1 時間程度) で 2 次抗体反応させた。その後 0.05% Tween 20/TBS で室温、10 分間振とうを 3 回繰り返した。Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus 基質(Perkin Elmer, Massachusetts, US)を用いて発光させ、1 分間放置した後、Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (FUJIFILM Corporation., Tokyo, Japan) で検出した。

3. 結果

3.1. ラット制限給餌条件下における摂食行動

6 時間の制限給餌期間において 1 時間ごとに摂食量の測定を行った(図 1-2)。その結果、ラットの摂食は主に給餌開始後 1 時間に集中しており、6 時間での摂食量の約 45%を占めていた。その

後は各タイムポイントとも 6 時間で摂食する量の約 10%であった。ラットの行動観察からも給餌後約 1 時間に摂食行動が集中していることを確認した。

3.2. 体重と血液生化学データ

解剖時の体重は給餌時間に依存して増加していた(表 1-1)。さらに、解剖前日からの体重増加量も摂食時間が短い群(24hF 群, 1hR 群, 3hR 群)では減少する一方で、摂食時間が長い群(6hR 群)では体重は増加し給餌時間に依存していた。次に、採取した血漿、血清を利用して個体の血液生化学データの測定を行った。脂質、糖質、タンパク質に関する項目を中心に測定した結果、TL, TG, PL, ALB, 血糖値は摂食により濃度が上昇していた。一方で、NEFA, T-KB は摂食直後の 1hR 群から濃度が低下していた。T-CHO, F-CHO, E-CHO, LDL-C, HDL-C に関しては有意差がなかったが、LDL-C は 24hF 群と 3hR 群、6hR 群の比較では上昇傾向(それぞれ $p < 0.1$)が確認された。血漿中インスリン濃度は 1hR 群から給餌時間依存的に増加しており、給餌時間が長くなると栄養素の吸収が進み体内に栄養素が流入するため、インスリンを上昇させることで血糖値の維持機構が働いている可能性が考えられた。血漿中インスリン濃度が各群の平均に近い 4 個体を選抜し、肝臓と WAT を DNA マイクロアレイ解析に供した。

3.3. 絶食後再給餌がラット肝臓の遺伝子発現に与える影響

3.3.1. 遺伝子発現プロファイルによるクラスタリング

DFW で正規化したマイクロアレイデータによるサンプル間クラスタリングでは、1hR 群の 1 つの 1hR_5 が 3hR 群のクラスターに入っていた以外は群ごとにクラスターを形成しており、遺伝子発現プロファイルは摂食開始からの時間経過に依存して変化することが示唆された(図 1-3)。興味深いことに、24hF 群と 1hR 群、3hR 群と 6hR 群が大きなクラスターを形成しており、摂食前期と後期の 2 つに分かれることが示された。

以下の解析は、24hF 群を基準として各タイムポイントの時系列的な変化を解析するために、24hF 群に対して各給餌群をそれぞれ二群間比較で解析を行った。

3.3.2. 24hF 群と各給餌群の二群間比較

各タイムポイントにおける発現変動プローブセットを抽出するため、Rank products 法を用いて 24hF 群と各給餌群間(1hR,3hR,6hR)の二群間比較を行い、24hF 群に対して各給餌群で有意に発現変動(FDR < 0.05)したプローブセットを抽出した。その結果、1hR 群では 24hF 群と比較して発現上昇したプローブセットが 1187 (1hR_up)、発現低下したプローブセットが 1076 (1hR_down)抽出された。3hR 群では発現上昇したプローブセットが 1374 (3hR_up)、発現低下したプローブセットが 1242 (3hR_down)抽出された。6hR 群では発現上昇したプローブセットが 1460 (6hR_up)、発現低下したプローブセットが 1391 (6hR_down)抽出された。

続いてウェブツール DAVID を用いた機能解析を行い、FDR 補正した EASE Score < 0.05 を満たす有意に濃縮された GO term を抽出し、Quick GO で最下層に表示された GO term を中心に示した。その結果、エネルギー代謝に関する GO term が多く抽出された。発現上昇プローブセット(遺伝子)群からは解糖(6hR 群)やモノカルボン酸代謝(6hR 群)やコレステロール生合成(3hR 群,6hR 群)に関する GO term が抽出された(表 1-2)。発現低下遺伝子群からはβ酸化に関わる GO term(6hR 群)が抽出された(表 1-3)。糖新生に関する GO term は抽出されなかった。

エネルギー代謝に関する GO term 以外には、給餌開始直後の 1hR 群において RNA の代謝や修飾など遺伝子発現に関わる遺伝子の発現上昇が見られた。また、摂食の進行と共に酸化還元に関わる GO term やタンパク質のターンオーバーに関わる GO term が抽出された。また、プロテアソームタンパク質異化経路、ユビキチン依存的タンパク質異化経路、ユビキチンリガーゼ活性など、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解経路に関わる GO term が発現上昇遺伝子群の中に多く含まれていることを発見した(表 1-2)。一方、発現低下遺伝子群から抽出された GO term の中には、抗体産生に関わる免疫関連や刺激応答が含まれていた。3hR 群や 6hR 群では発現上昇遺伝子群の GO term として抽出されたコレステロール生合成や脂質代謝が、摂食開始直後の 1hR 群では発現低下遺伝子群の GO term として抽出されていた(表 1-3)。

GO term による機能解析の結果から、1hR 群では遺伝子発現に関わる遺伝子の発現変動が見られる一方、糖質や脂質など具体的な物質の代謝に関わる遺伝子群の発現変動は抽出されなかった。給餌時間が長くなると栄養素代謝関連の GO term が抽出され、解糖・脂肪酸合成関連遺伝子群の

発現亢進とβ酸化関連遺伝子群の発現低下が推定された。また、本研究で新たにプロテアソーム系タンパク質分解やタンパク質折りたたみのようなターンオーバーの機能が摂食と関連することや、給餌開始直後の 1hR 群で免疫系やコレステロール合成遺伝子の発現低下などが明らかにした。

以下に注目した機能ごとの詳細な解析を行った。

3.3.3. 糖代謝

6hR 群でグルコース代謝に関わる GO term が抽出されたが、発現変動が生じるタイムポイントは各遺伝子で異なっていた。解糖関連遺伝子を詳細に調べた結果、グルコースをリン酸化するグルコキナーゼ(Gck)は 1hR 群から発現上昇していた(図 1-4, 表 1-4)。その他には 1hR 群で発現上昇する遺伝子は少なく、3hR 群から多くの遺伝子が発現上昇していた。さらに、摂食応答の進行により 6hR 群では、3hR 群よりもさらに多くの解糖関連遺伝子の発現上昇が見られ、時間を経るごとに発現亢進する解糖関連遺伝子の増加が見られた。しかし、律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ(Phosphofluctkinase; Pfk)に関しては全タイムポイントにおいて発現変動は確認されなかった。

糖新生に関連する GO term は抽出されなかった。糖新生経路に関連する多くの遺伝子は解糖と重複するため、糖新生経路のみに関与する遺伝子について解析を行ったところ、多くが 1hR 群から発現低下していた(図 1-4, 表 1-4)。特に糖新生経路の中で不可逆反応を担う糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(Phosphoenolpyruvate carboxykinase; Pck1)やグルコース 6 リン酸フォスファターゼ(Glucose 6 phasphatase; G6Pase)に関しても 1hR 群から発現低下が見られ、糖新生経路は摂食後速やかに抑制されることが示唆された。

肝臓は余剰のグルコースを利用してグリコーゲン合成を盛んに行う臓器であるため、グリコーゲン代謝関連遺伝子の発現変動についても解析を行った。その結果、グリコーゲン合成酵素 2 (Glycogen synthase 2; Gys2)の発現は、1hR 群では一過的に発現低下したが、3hR 群以降は発現変動していなかった。しかし、グリコーゲン合成酵素リン酸化酵素 3b(Glycogen synthase kinase 3b; Gsk3b)は発現上昇しており、Gys2 は Gsk3b によりリン酸化を受けることで不活性化することからこの Gsk3b の発現亢進によりグリコーゲン合成が抑制されたことが考えられる。グリコーゲン分解に関わるグリコーゲンホスホリラーゼ(Glycogen phosphorylase; Pyg1)の発現は 1hR 群

で低下していたがその後発現上昇しており、3hR 群や 6hR 群ではグリコーゲンの分解も起きている可能性が示唆された。

3.3.4. 脂質代謝

脂肪酸代謝関連遺伝子群は GO term “monocarboxylic acid metabolic process”に含まれており、1hR 群と 3hR 群では発現低下遺伝子群、6hR 群では発現上昇遺伝子群より GO term として抽出された。特に 6hR 群では、脂肪酸分解の変化を直接示す GO term “fatty acid oxidation”が抽出された。脂肪酸合成関連遺伝子は、1hR 群では脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase; Fasn)の発現上昇が見られたが、律速酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ α (Acetyl-CoA carboxylase alpha; Acaca)は発現低下が見られた(図 1-5, 表 1-5)。Fasn 以外に 1hR で発現上昇した脂質合成関連遺伝子は少なかったが、3hR 群からは、発現上昇する遺伝子が多く確認された。脂肪酸生合成以外にも脂肪酸不飽和化酵素(Fatty acid desaturase; Fads1/2)や長鎖脂肪酸伸長酵素 5/6 (Elongation of long chain fatty acid 5/6; Elovl 5/6)が含まれていた。脂肪酸分解に関しては律速酵素カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(Cpt1a)が 1hR 群から発現低下していたが、その他の遺伝子に関しては給餌時間依存的に発現低下する遺伝子が増加した(図 1-5, 表 1-5)。

コレステロール合成は GO term の解析では 1hR 群では発現低下遺伝子群、3hR 群からは発現上昇遺伝子群から抽出された。具体的な遺伝子発現変動を解析したところ、コレステロール生合成の律速酵素ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ(Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; Hmgcr)は 1hR 群から発現上昇していた。その他の多くの遺伝子は 1hR 群で発現低下しているが、その後 3hR 群から発現上昇に転じる遺伝子が多かった(図 1-6, 表 1-6)。この結果より、コレステロール合成は 1hR 群では低下するが、3hR 群からは上昇する可能性が示唆された。

3.3.5. プロテアソーム系タンパク質分解関連遺伝子

3hR 群及び 6hR 群においてプロテアソームやユビキチンリガーゼなどユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解を示す GO term が多く抽出された。発現変動遺伝子を詳細に解析したところ、26S プロテアソーム構成要素を担う遺伝子が多く含まれていた(表 1-7)。さらに、これらの中

には免疫プロテアソーム関連遺伝子が含まれていた。免疫プロテアソームは、構成的に発現している 26S プロテアソーム構成遺伝子の一部($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$)が IFN- γ に誘導される 3つのホモログのタンパク質($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$)に置換したものであり(図 1-7 A)、細胞内に侵入した細菌やウイルスなどのタンパク質をユビキチン化して分解し、抗原提示用ペプチドを産生し内因性抗原提示機構を持つ[99]。これら 3つの免疫プロテアソーム構成サブユニット遺伝子は免疫関連の GO term にも共通して含まれており、1hR 群で発現低下が見られたが、6hR 群では発現上昇した遺伝子として抽出された。さらに免疫プロテアソーム構成遺伝子と同様に IFN- γ に誘導され、免疫プロテアソームの調節サブユニットになる 28S 複合体構成要素の一つである PA28a も発現上昇傾向(FDR < 0.053)が見られた。

3.3.6. 摂食に伴う免疫プロテアソームの発現亢進

免疫プロテアソーム関連遺伝子 $\beta 1i$, $\beta 5i$ のタンパク質発現量をイムノブロットィングにより解析した結果、これら 2つのタンパク質発現量が上昇していることを確認した(図 1-7 B)。

免疫プロテアソーム構成サブユニット($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$)は IFN- γ によって誘導される[100,101]ため、血清 IFN- γ 濃度を測定した結果、制限給餌を行った 6hR 群と 24hF 群と比較すると有意差はなかったものの、24hF 群に比べ 6hR 群で上昇傾向が見られた(図 1-8 A)。さらに、7 週齢 Wistar 雄性ラットを制限給餌せずに飼育し、解剖まで自由摂食させた群(*Ad libtum* 群)と解剖前 24 時間絶食処理を行った(*Ad libtum* + 24hF 群)の 2 群に分けて IFN- γ 濃度の測定を行った。その結果、*Ad libtum* 群は *Ad libtum* + 24hF 群と比較して IFN- γ 濃度が有意に高値を示した (図 1-8 B)。

3.4. 絶食後再給餌がラット白色脂肪組織の遺伝子発現に与える影響

3.4.1. 遺伝子発現プロファイルによるクラスタリング

qFARMS で正規化したマイクロアレイデータを用いてサンプル間クラスタリングを行った結果、3hR_2 が全クラスターから大きく外れていた以外は群ごとにクラスターを形成しており、遺伝子発現プロファイルは再給餌時間依存的に変化することが示唆された(図 1-9)。また 24hF 群と 1hR 群、3hR 群と 6hR 群がクラスターを形成しており、肝臓と同じトポロジーを示した。以降の

解析は、肝臓同様に 24hF 群に対する各給餌群について二群間比較を行い、時系列解析を行った。

3.4.2. 24hF 群と各給餌群の二群間比較

肝臓同様に、Rank products 法を用いて 24hF 群と各給餌群(1hR 群, 3hR 群, 6hR 群)の二群間比較を行い、発現変動遺伝子を抽出した。その結果、1hR 群では 24hF 群と比較して発現上昇したプローブセットが 719 (1hR_up)、発現低下したプローブセットが 529 (1hR_down)抽出された。3hR 群では発現上昇したプローブセットが 730 (3hR_up)、発現低下したプローブセットが 702 (3hR_down)抽出された。6hR 群では発現上昇したプローブセットが 1186 (6hR_up)、発現低下したプローブセットが 1144 (6hR_down)抽出された。

DAVID を用いた機能解析を行い GO term を抽出後、Quick GO で最下層に表示された GO term を中心に示した。抽出された GO term には糖質・脂質代謝などエネルギー代謝関連 GO term が含まれていた。発現上昇遺伝子群からはコレステロール合成、グルコース代謝、物質輸送、RNA プロセッシングなどの GO term 抽出された(表 1-8)。また、発現低下遺伝子群からは刺激応答、アポトーシス、免疫関連の GO term が抽出された(表 1-9)。この結果より、WAT でもエネルギー代謝に加え、様々な生理機能変動している可能性が示唆された。以下に注目した機能ごとの詳細な解析を行った。

3.4.3. 糖代謝

グルコース代謝関連遺伝子群の発現亢進を示す GO term は 6hR 群で抽出され、その詳細な遺伝子発現を解析した(表 1-10)。解糖やペントースリン酸経路に直接関与する遺伝子に加えて転写因子やアディポサイトカインであるレプチンが含まれていた。インスリン刺激により誘導されるグルコーストランスポーター4(Glucose transporter 4;Glut4)やヘキソキナーゼ 2(Hexokinase 2; Hk2)の発現上昇が見られた。6hR 群で発現変動している遺伝子が多かったが、その中には 1hR 群から 6hR 群まで全てのタイムポイントで発現変動が認められる遺伝子も多かった。

3.4.4. 脂質代謝

発現上昇遺伝子群からコレステロールなどの脂質生合成関連 GO term が 3hR 群から抽出され

た。脂肪酸合成関連遺伝子では律速酵素 *Acaca* の発現上昇が 1hR 群と 6hR 群、*Fasn* では 6hR 群でみられ、肝臓と同様に伸長酵素(*Elovl*)や不飽和化酵素(*Fads*)なども抽出された(表 1-11)。TG 合成関連遺伝子に関してはアシル基転移酵素であるグリセロール 3 リン酸アシルトランスフェラーゼ(*Glycerol-3-phosphate acyltransferase; Gpam*)、アシルグリセロール 3 リン酸アシルトランスフェラーゼ(*1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase; Agpat*)、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(*Diacylglycerol O-acyltransferase; Dgat*)の発現が 1hR 群から上昇しており、WAT では TG 合成が摂食後速やかに亢進していることが示唆された。

コレステロール合成関連遺伝子については律速酵素 *Hmgcr* をはじめいくつかの遺伝子は 1hR 群から発現上昇していたが、他の関連遺伝子の多くは 3hR 群から発現上昇が見られており、給餌時間に依存して発現上昇遺伝子が増えていた。さらに、コレステロール合成を調節する転写因子 (*Sterol regulatory element binding transcription factor 2; Srebf2*)も 3hR 群から発現上昇していた。この結果からも給餌開始 3 時間後からコレステロール合成が亢進していると考えられた。

4. 考察

4.1. 摂食による生化学データの変化に対する考察

制限給餌条件下における摂食行動について考察を行う。1 日 6 時間の制限給餌でも体重の増加が認められたことから十分な栄養摂取ができていると考えられ、給餌時間は妥当だと考えた。また、げっ歯類は自由摂食条件下では暗期に摂食行動が集中する[102,103]ため、給餌時間を暗期に設定することも考えた。しかし、暗期の制限給餌では作業に用いる光がラットのサーカディアンリズムに影響を及ぼす可能性を懸念したため、明期の 6 時間を制限給餌条件とした。全群に対する処理を揃えることで、摂食スケジュールの違いによるサーカディアンリズムへの影響を排除した。

制限給餌条件下における摂食行動は給餌開始後 1 時間に集中し、全摂食量の約 45%を占めた(図 1-2)。給餌間隔の 18 時間が絶食状態であったため、給餌後すぐに摂食を始めたと予想される。また、ラットは制限給餌時間を学習する[104]ため、給餌時間を予測し給餌されるとすぐに摂食を行

うように準備している可能性がある。実際に、制限給餌開始直後に比べて、飼育後半の摂食量は増加し、給餌開始直後の摂食量の割合も増加していた(Data not shown)。

解剖当日は、各群 18 時間以上絶食させることで全個体を絶食状態に揃え、絶食状態からの摂食応答を捉えることを目的にして行った。先行研究では 16 時間の絶食により絶食状態を示す遺伝子発現パターンが得られたことが報告[6]されているため、18 時間以上の絶食は妥当だと考えた。また、本研究では各群で絶食時間は異なるが、数時間の違いが大きな影響を与えないと考え絶食時間の違いを考慮せず、解剖時刻を揃えサーカディアンリズムの影響を除外することを重視した。

体重増加量は、給餌時間に依存して増加していた。解剖時に胃や盲腸などが大きく膨らんでいたことから、摂食により餌と水を摂取したことにより消化管内に蓄積しているためと考えられた。血液生化学データ解析より、血糖値や TG, T-KB, NEFA の変化に関して先行研究[5]と同じ挙動を示すことを確認し、給餌時間に依存した各項目の時系列的な変動を明らかにした。興味深いことに、血糖値は 1hR 群で増加した後、3hR 群以降も一定であり血糖値が一定に保たれていた。この結果は経口グルコース負荷試験を行った先行研究[105]でも 1 時間以内に血糖値が上昇していることが今回得られた結果と一致しており妥当であると考えられる。一方、低血糖時にエネルギー源となる T-KB や NEFA については 1hR 群から低下が見られた。これらの結果から、給餌開始 1 時間で各組織にグルコースが到達し、エネルギー産生が糖代謝を中心に切り替わっている可能性が得られた。摂食後に糖代謝を中心にエネルギー産生を行うことで、T-KB や NEFA 由来のエネルギー産生が必要なくなり、WAT からの脂肪酸放出が抑制されたことが考えられる。摂食により増加する脂質である TG や TL は 3hR 群から変化が見られ、グルコースに比べて応答が遅かった。先行研究[106]でも、絶食後再給餌 1 時間や 2 時間では絶食状態における血中 TG と比べて有意差がないが、3 時間以降で有意に上昇したことが報告がされていることから、今回得られた結果と一致した。脂質は糖質に比べて胃内の滞留時間が長いこと、腸管吸収が緩やかであること、また糖質は吸収されると毛細血管に入るが、脂質はリンパ管を經由して胸管を通り、頸静脈で血中に放出されることなどから、血中の脂質上昇は血糖値の上昇に比べ遅いと推定される。LDL-C に有意差はなかったが 3hR 群から上昇傾向が見られたことから、脂質輸送が亢進している可能性が示唆された。糖質と脂質で血液生化学データの変動時間に差があることは栄養吸収に依存している

可能性がある。

以上の結果より、摂食が集中し、血液生化学データが大きく変化している 1hR 群では、遺伝子発現レベルでも大きな変化が現れていると考え、マイクロアレイ解析を行うタイムポイントとした。また、制限給餌を終了する 6hR 群は先行研究においても、絶食状態からほぼ回復しているタイムポイントとして用いられている[83]ことから、6hR 群を摂食応答が完了しているタイムポイントとして解析することとした。さらに、1hR 群と 6hR 群の間を繋ぐ 3hR 群を解析するタイムポイントとし、経時的且つ網羅的な遺伝子発現解析を行った。

4.2. ラット肝臓における摂食応答解析に関する考察

サンプル間クラスタリングの結果、給餌時間ごとにクラスターを形成し、給餌時間依存的な発現プロファイルの変化が示唆された。さらに、24hF 群と 1hR 群、3hR 群と 6hR 群がクラスターを形成していたことから、給餌開始 1 時間から 3 時間の間に大きく遺伝子発現プロファイルが変化するポイントが存在することが示唆された。

機能解析では、糖質代謝や脂質代謝などエネルギー産生に関連する GO term が抽出されたことに加え、複数のタイムポイントの中で遺伝子発現調節や物質輸送、刺激応答、免疫、タンパク質のターンオーバー、酸化還元作用など、摂食との関連が報告されていない様々な生理機能を示す GO term が抽出された。経時的な観点から 1hR 群では具体的な機能の変化を示す GO term が少なく、給餌時間が長くなるほどより詳細な機能を示す GO term が抽出された。この結果より、機能に関連する遺伝子が一同に変動するのではなく、徐々に発現変動することが示唆された。また、6hR 群ではβ酸化の抑制や解糖の亢進を示す GO term 抽出されており、生体内のエネルギー産生が脂肪酸(β酸化)由来から糖(解糖)由来に変化していることが GO term からも示唆された。従来の摂食や絶食によるエネルギー代謝に関わる知見とも一致していることから、本研究で行った動物実験及びマイクロアレイ解析は生物学的に信頼性の高い結果であることが示唆された。以下に、注目したエネルギー代謝項目及びプロテアソーム関連項目について考察を行う。

4.2.1. 糖代謝

血液中のグルコースはインスリンなどホルモンの調節により一定に維持される一方、肝臓では

グルコーストランスポーター2(GLUT2)を通過し Gck によるリン酸化を受けることで肝臓にグルコースが供給される。肝臓で発現する GLUT2 はインスリン非依存的で常に細胞膜上に存在し、濃度依存的にグルコース取り込むことが報告されている[107]。血漿血糖値及びインスリンは給餌開始 1 時間で上昇していることから、食餌から吸収されたグルコースが摂食開始 1 時間で肝臓に到達していることが予測される。

Gck の遺伝子発現はインスリンによって誘導されることが報告されており[108]、遺伝子発現変動も 1hR 群から発現上昇したと一致した。常に発現する GLUT2 とインスリンで誘導された Gck によって給餌開始 1 時間後には糖取り込みが亢進していると考えられる。律速酵素 Pfk の発現変動はどのタイムポイントにおいても見られなかった。Pfk はフルクトース 2,6 ビスリン酸 (Fructose-2,6-bisphosphate; F2,6BP)濃度[109]や、インスリン刺激[110]によって活性が上昇するため、Pfk が恒常的に発現しインスリンや F2,6BP など転写以外の調節を受けることで生体内の栄養状態の変化に素早く対して対応する可能性が考えられた。

絶食状態で亢進する糖新生はピルビン酸などからグルコースを合成し、他の臓器にグルコースを供給する機構である。本解析で律速酵素 Pck1 などの不可逆酵素は発現低下したが GO term として抽出されなかった。この理由は、糖新生に関わる可逆酵素の多くは解糖と共有し、その多くが発現上昇したため発現低下遺伝子内で濃縮されなかったためであると考えられる。しかし、糖新生経路は Pck1 などの糖新生特異的な不可逆酵素が律速段階であり、これらの遺伝子が発現低下していたこと及び、摂食による栄養素の流入により解糖の亢進が示唆される状況から糖新生の抑制が推察される。また、血糖値は 1hR 群で正常に近いレベルまで上昇していることから、糖新生は抑制されたと推定される。

グリコーゲンは合成と分解の両方が亢進する可能性が示唆された。この結果は、摂食直後は蓄積が少ないため利用は少ないが、時間が経つに連れて蓄積が増えると共に利用が増えてくるためであると考えられる。行動観察からも各個体は給餌開始から 1 時間に摂食行動が集中し、その後は断続的に摂食を行い体内に摂取した栄養素を吸収している状態であると予想される。グリコーゲンは貯蓄されているエネルギーの中でも最も早く利用されることから、体内のエネルギー恒常性を維持するために、体内のグリコーゲンは常に合成と分解が繰り返されている可能性がある。

4.2.2. 脂質代謝

Acaca など脂肪酸合成関連遺伝子は 1hR 群において一時的に発現低下した後、3hR 群より発現上昇するという特徴的な発現変動パターンを示し、給餌後 3 時間から脂肪酸合成が亢進されている可能性が考えられた。これらの遺伝子の中には、脂肪酸生合成以外にも脂肪酸不飽和化や伸長関連遺伝子が含まれており、絶食による脂肪酸分解により変化した組織の脂肪酸組成を再構成している可能性がある。

脂質分解は Cpt1a など多くの遺伝子が 1hR 群から発現低下し、抑制されている傾向にあることがわかった。先行研究[5]においても 8 時間絶食後、3 時間再給餌により Cpt1a は有意に低下した一方、アシル CoA オキシダーゼ 1(Acyl-CoA oxidase 1 palmitoyl; Acox1)遺伝子は発現変動が見られなかったと報告されており、本研究の結果と一致している。前述のように、血糖値の上昇が 1hR 群から生じていたことから、給餌開始後早い段階で脂肪酸由来のエネルギー産生を行う必要がなくなり、脂肪酸 β 酸化が抑制されたと推察される。

コレステロール合成関連遺伝子も 1hR 群特異的に一過的に発現低下した後、3hR 群から発現上昇したことから給餌 3 時間後から亢進することが示唆された。LDL-C 濃度も 3hR 群から上昇傾向が見られ、遺伝子発現変化とタイミングが一致していた。また、コレステロール合成関連遺伝子や Acaca で見られた、1hR 群で一時的に発現低下後、3hR から発現上昇するという発現変動パターンより、特徴的な発現調節機構の存在が示唆され、非常に興味深い結果が得られた。

4.2.3. プロテアソーム系タンパク質分解

プロテアソーム系タンパク質分解はオートファジー等の非特異的なタンパク質分解機構とは異なり、標的タンパク質を特異的にユビキチン化することでタンパク質分解へと導く。生体内では細胞周期、免疫応答、シグナル伝達などに関わっている。本解析より発現上昇遺伝子群にタンパク質分解の中心となる 26S プロテアソーム構成遺伝子が多く含まれていた。この結果から摂食によってプロテアソームの増加が示唆され、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解が亢進していることが予測された。

近年、脂肪組織において絶食により脂肪酸合成律速酵素 *Acaca* がユビキチン-プロテアソーム系経路により分解され、脂肪酸合成を速やかに止めることが報告されている[111]。また、骨格筋も絶食に伴いプロテアソームによるタンパク分解が亢進することが報告されている[112]。一方、本研究の結果から、肝臓ではプロテアソーム系タンパク質分解が摂食応答に関わっている可能性が示唆された。絶食による *Acaca* の分解のように、直接代謝に関わるタンパク質をターゲットとしており、エネルギー代謝に関わる脂肪酸 β 酸化や糖新生の律速酵素を分解することで効率的に代謝をコントロールしている可能性がある。また、栄養状態の改善により肝細胞などが増殖を開始するにあたり、細胞周期の進行にプロテアソーム系タンパク質分解に関わる可能性などがある。このように、プロテアソーム系タンパク質分解が、律速酵素など代謝関連タンパク質を標的とするのであれば、肝臓でもプロテアソーム系タンパク質分解が積極的に代謝を切り替えるスイッチ様の機能を担っている可能性がある。タンパク質分解の標的を同定することで、プロテアソーム系タンパク質分解が代謝に与える影響を明らかにできると考えるが、遺伝子発現からタンパク質分解の亢進や分解される標的タンパク質の同定は難しい。そこで、今後はプロテアソーム系タンパク質分解機構が摂食応答においてどのような役割を担っているか、タンパク質分解を受ける標的タンパク質やユビキチンリガーゼ(E3)を特定するために、プロテアソーム阻害剤やプロテアソーム機構の一部を改変したトランスジェニックマウスなどによる検証実験が必要になると考える。

4.2.4. 免疫プロテアソーム

免疫プロテアソーム構成サブユニット遺伝子($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$)の発現挙動は、免疫関連遺伝子と共に一旦 1hR 群で発現低下した後に、他のプロテアソーム関連遺伝子と共に 6hR 群で発現上昇していた。この挙動は免疫関連やユビキチン-プロテアソーム関連の GO term に共通しており、1hR 群で一過的に発現低下した後、6hR 群で発現上昇する特徴的な発現変動パターンから、摂食による栄養状態の変化に呼応して重要な役割を果たすことが推定された。 $\beta 1i$, $\beta 5i$ を対象とした免疫ブロッティング解析からタンパク質でも発現上昇することが示されたことから、免疫プロテアソームとして機能している可能性が示唆された。

先行研究でも絶食による免疫機能の低下が示されていることから、絶食による血清 IFN- γ 濃度

の低下が、免疫プロテアソームの遺伝子発現を一時的に減少させたと考えられる。その後の摂食により血清中 IFN- γ 濃度が上昇し、免疫プロテアソームの発現が回復したという可能性が考えられた。この結果は、栄養状態の変化に呼応して免疫プロテアソームの遺伝子発現が変化することを示した初めての報告である[113]。

4.2.5. 経時的に特徴的な変化を示す遺伝子発現パターン

肝臓の DNA マイクロアレイ解析より 1hR 群で一過的に発現低下した後、6hR 群で発現上昇したプローブセットが多く抽出された。1hR_down, 6hR_up に共通しているプローブセットは 244 あり、1hR_down に含まれる 1076 プローブセットのうち約 23%を占めていた。244 プローブセットについて機能解析を行った結果、脂質(特にコレステロール)合成関連遺伝子が多く含まれており、これらが特殊な遺伝子発現制御機構を持つと推定された。栄養状態の変化で一時的に発現量が低下し、その後発現上昇している様な発現パターンは先行研究でもピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 4(pyruvate dehydrogenase kinase 4; Pdk4)で報告されていること[114]から、エネルギー代謝関連遺伝子の発現調節には共通する機構が存在することが示唆された。今後、インスリン刺激による脂質関連遺伝子の発現制御機構を解析することで特徴的な遺伝子発現パターンを解明し、摂食によるエネルギー代謝の変化を明らかにすることが期待される。

4.3. ラット WAT における摂食応答解析に関する考察

WAT の遺伝子発現データを用いたサンプル間クラスタリングの結果、肝臓と同じトポロジーを示した。給餌時間依存的な発現プロファイルの変化及び、給餌開始 1 時間から 3 時間の間に大きく遺伝子発現プロファイルが変化するポイントの存在が推察された。肝臓と WAT で給餌時間ごとの遺伝子発現プロファイルの変化が明確であることから、同調している可能性が示唆された。

また、発現変動遺伝子の解析から摂食により WAT 生じる生理的機能の変化を明らかにした。糖質代謝、脂質代謝などエネルギー関連機能に加えて遺伝子発現や物質輸送、刺激応答、免疫、アポトーシスなど様々な生理的機能を示す GO term が抽出され、肝臓と共通する GO term も抽出されたことから、肝臓と WAT で共通した摂食応答機構が存在することが考えられた。以下に、

注目したエネルギー代謝関連項目について考察を行う。

4.3.1. 糖代謝

WATは脂肪細胞で構成されており、細胞機能としてエネルギー代謝を行うため摂食によりグルコース代謝が亢進する。本解析でもグルコース代謝に関わるGO termが抽出されたことから、この知見と一致する。しかし、WATにおいては肝臓と比べて、解糖やペントースリン酸経路など直接代謝に関係する発現上昇遺伝子は少なかった。その他の遺伝子はグルコース代謝を亢進する作用を持つホルモンであるレプチンや、Activating transcription factor 3 (Atf3)や Activating transcription factor 4 (Atf4)の様にエネルギー代謝に関連する転写因子であった。この結果より、肝臓に比べてWATでは摂食によって影響を受けるグルコース代謝に直接関連する遺伝子は少ないことが考えられた。

給餌開始3時間以降においてインスリン刺激により誘導されるGlut4やHk2の発現上昇も見られたこと、その他の遺伝子も3hR群や6hR群から発現変動していたことから、給餌開始3時間以降にグルコースの取り込みや糖代謝が亢進したと考えられた。しかし、GLUT4はインスリン刺激を受けると膜移行するため、発現だけでなく局在を考慮する必要がある。血糖値が給餌開始1時間で通常レベルまで上昇することから、1hR群でGLUT4が膜移行しているのであれば、給餌開始1時間から糖取り込みが亢進している可能性がある。今後組織学的な解析により、WATにおけるグルコースの取り込みが亢進するタイミングを明らかにすることができると考えられる。

4.3.2. 脂質代謝

WATでは脂質合成経路として糖質から脂肪酸合成を行い、TGを合成する(*de novo*合成)経路と、VLDL、カイロミクロンやNEFAなど血流によって運ばれてくる脂質を脂肪酸トランスポーターで取り込みTGを合成する経路の2つがある。解析の結果、*de novo*合成の中心となる脂肪酸合成酵素(Fasn)は6hR群で初めて発現上昇が確認された。さらに、GLUT4が3hR群から発現上昇していたことから、*de novo*合成は摂食直後から始まるわけではないことが示唆された。一方で、脂肪酸トランスポーター1(Fatty acid transporter1; Fatp1)は1hR群のみで発現上昇が確認された。脂肪酸結合タンパク質(Fatty acid binding protein; Fabp5)の上昇も非常に速やかであること

から、摂食直後から脂肪酸を取り込む機能が亢進することが示唆された。**Fatp1** は脂肪組織のインスリン刺激により誘導されることが報告されている[115]。これらの結果より、摂食初期は脂肪酸の取り込みによる脂肪酸合成、主として伸長反応が起こり、次第にグルコースの取り込みが亢進され、*de novo*の脂肪酸合成が上昇することが予想される。

また、コレステロール合成遺伝子の発現が上昇していることからコレステロール合成の亢進が示唆された。体内で合成されるコレステロールの大部分は肝臓によって行われるが、**WAT**でも貯蔵だけでなく合成が行われるなど体内のコレステロール恒常性維持機構の中心的な役割を果たすことが知られている。その他に **WAT** におけるコレステロールの機能として脂肪滴の形成などが挙げられ、摂食により合成された脂肪を蓄積するために利用されていると考えられる。

4.3.3. 解析を行った **WAT** について

近年の研究では、体内に存在する **WAT** の局在部位によって少しずつ機能や遺伝子発現パターンが異なるという報告がある[116]。メタボリックシンドロームに関する研究では腎周囲脂肪が重要であるとの報告もある[117]。**WAT** を全て一括りにせず、各部位の **WAT** に関して解析を行う必要があるかもしれない。しかし、本研究においては現実的に全ての **WAT** について解析を行うことが困難であったため、先行研究で最もよく研究が行われている精巢上体 **WAT** を利用した。今後 **WAT** を解析する際には、どの部位の **WAT** を利用するかは検討すべき項目の一つである。

4.4. 各組織の律速酵素の遺伝子発現調節について

肝臓、**WAT** の両組織で機能解析を行った結果、発現変動遺伝子の多い代謝経路の中でも特に律速酵素が早期から発現変動していた。この結果は、摂食刺激に対する律速酵素の発現制御が他の遺伝子に比べて感度が高く、代謝を切り替えるきっかけになっている可能性を示している。

また、律速酵素遺伝子は他の遺伝子に比べてより早く応答する機構が存在する可能性がある。解糖の律速酵素 **Pfk** は **F2,6BP** 濃度により活性が変化する。また近年、インスリン刺激により **Upstream transcription factor 1(USF1)**のリン酸化状態やアセチル化状態が変化するにより脂肪酸合成の律速酵素の1つである **Fasn** の転写活性が上昇することが報告されている[118]。こ

のように、タンパク質翻訳後修飾レベルで活性が調節されている遺伝子は、転写因子の発現後に下流の遺伝子発現調節を行う機構に比べ、素早い応答が可能であると考えられる。このような発現調節機構は、他の律速酵素でも存在する可能性が高い。遺伝子発現調節機構を解析するにはクロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation; ChIP)や ChIP で得られた DNA 配列を網羅的に同定する ChIP-sequence(ChIP-seq)解析などプロモーターに結合する転写因子から明らかにする手法が挙げられる。遺伝子発現機構を明らかにすることで摂食応答についてより詳細な知見が得られることが期待される。

DNA マイクロアレイ解析では各転写因子とその下流遺伝子との遺伝子発現ネットワークの制御関係を明らかにすることは困難である。しかし、本研究で得られた遺伝子の経時的な発現変動情報はこれらの機構を解明するために非常に重要なデータになると確信している。

4.5. 肝臓と WAT における摂食応答の組織間比較

本研究では摂食応答を時系列的に捉えることで、肝臓と WAT の両組織とも給餌時間に依存して遺伝子発現プロファイルが変化することが示された。さらに 24hF 群と 1hR 群、また 3hR 群と 6hR 群がそれぞれクラスターを形成しているトポロジーは両組織でほぼ同じであった。摂食後 1 時間と 3 時間の間に遺伝子発現の大きく変動するポイントがあることは、時系列的に遺伝子発現プロファイルの解析を行ったことで初めて得ることができた結果である。またこの結果から、摂食応答の大きな変化は肝臓と WAT でほぼ同時に起きていることが示唆された。体内には明暗周期によるサーカディアンリズムとは別に、摂食刺激によって時計遺伝子が発現変動することが報告されている[9]。本研究においても摂食によるインスリンやレプチンなど内分泌系のバランスの変化などが同調因子となり、摂食刺激に応答する時計遺伝子が複数の臓器で同調することにより、機能や代謝の同調した変化が起きている可能性が考えられた。肝臓と WAT の両組織の GO term レベルでの機能解析では差がなかったものの、異なる組織で同じプローブセットの発現変動を比較したところ、WAT に比べ肝臓の方が早く発現変動するプローブセットが 512 であるのに対して、その逆のプローブセットは 76 であり、肝臓の方が WAT より早く応答するものが多かった。転写因子、律速酵素を含むインスリン刺激により発現調節を受ける遺伝子でも肝臓と WAT で発現変

動するタイミングが異なるものが多かった。具体的な遺伝子名を列挙すると、**Acaca** 以外は、**Cpt1**、**Pck1** などのように発現変動するタイミングが肝臓に比べて **WAT** の方が遅いものが多かった。以上の結果より、サンプル間クラスタリングの解析からでは分からないが、各プローブセットを比較した結果、**WAT** より肝臓の方がより早く摂食による栄養状態の変化に応答している可能性が考えられた。

表1-1 体重及び生化学データ

	24hF		1hR		3hR		6hR	
Weight (g)	147 ±	2.5 ^a	150 ±	1.5 ^a	156 ±	4.1 ^a	172 ±	2.7 ^b
Weight gain (g)	-24.5 ±	0.6 ^a	-8.5 ±	0.3 ^b	1.5 ±	1.1 ^c	2.2 ±	0.5 ^d
Plasma Insulin (μg/l)	0.32 ±	0.12 ^a	1.70 ±	0.15 ^b	2.62 ±	0.21 ^c	3.95 ±	0.15 ^d
Plasma glucose (mmol/l)	145.1 ±	6.6 ^a	181.5 ±	10.8 ^b	191.9 ±	6.9 ^b	180.5 ±	5.4 ^{ab}
Total Lipid (mg/dL)	170.0 ±	5.7 ^a	173.3 ±	9.6 ^a	218 ±	15.1 ^b	255 ±	13.8 ^b
Triacylglycerol (mg/dL)	15.6 ±	2.0 ^a	18.2 ±	3.2 ^a	58.4 ±	7.0 ^b	89.0 ±	9.2 ^c
NEFA (mEq/L)	0.44 ±	0.08 ^a	0.29 ±	0.01 ^b	0.25 ±	0.02 ^b	0.24 ±	0.01 ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	66.8 ±	2.9	66.8 ±	2.9	66.6 ±	4.8	67.4 ±	2.2
LDL-Cholesterol (mg/dL)	2.8 ±	0.2	3.2 ±	0.3	4.0 ±	0.4	4.0 ±	0.0
HDL-Cholesterol (mg/dL)	26.2 ±	1.0	27.0 ±	1.3	28.2 ±	2.0	31.4 ±	0.7
Phospholipid (mg/dL)	107 ±	4 ^a	114 ±	4 ^{ab}	129 ±	6 ^{bc}	139 ±	3 ^c
Total ketone body (mmol/l)	1418 ±	228.3 ^a	284.8 ±	15.1 ^b	278 ±	18.7 ^b	328.0 ±	18.1 ^b

体重増加量は解剖24時間前からの体重の変化を示す。

異なるアルファベット(a-d)間には有意差があることを示す。(Tukey-Kramerの多重検定 $p < 0.05$)

血中生化学データは遊離脂肪酸のみ血清より測定し、その他は血漿より測定した。

表1-2 摂食により肝臓で発現上昇する遺伝子の機能

GO ID	GO term	1hR	3hR	6hR
GO:0010467	gene expression	2.37E-02		
GO:0006397	RNA processing	6.87E-02		
GO:0008380	RNA splicing	2.13E-02		
GO:0006457	protein folding		5.06E-03	1.81E-03
GO:0006733	oxidoreduction coenzyme metabolic process		2.43E-02	
GO:0055114	oxidation reduction			4.67E-03
GO:0010033	response to organic substance		1.68E-02	
GO:0006817	phosphate transport			4.14E-02
GO:0009058	biosynthetic process		6.49E-03	
GO:0008610	lipid biosynthetic process		1.58E-02	
GO:0044237	cellular metabolic process			4.45E-09
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process			2.28E-03
GO:0044106	cellular amine metabolic process			1.23E-02
GO:0006629	lipid metabolic process			1.32E-03
GO:0008610	lipid biosynthetic process			1.40E-05
GO:0006694	steroid biosynthetic process			1.57E-05
GO:0016125	sterol metabolic process		1.35E-02	
GO:0008203	cholesterol metabolic process		4.05E-02	1.40E-05
GO:0016126	sterol biosynthetic process		1.52E-02	4.57E-08
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process			1.72E-07
GO:0050810	regulation of steroid biosynthetic process			1.21E-02
GO:0046164	alcohol catabolic process		3.46E-02	
GO:0006082	organic acid metabolic process			5.96E-05
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process		6.65E-04	4.85E-05
GO:0016053	organic acid biosynthetic process			1.28E-03
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process			1.28E-03
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process			7.90E-04
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process			5.38E-04
GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process			6.29E-04
GO:0010498	proteasomal protein catabolic process		3.05E-02	4.41E-06
GO:0043161	proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process		3.05E-02	4.41E-06
GO:0031145	anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process		1.56E-02	5.52E-08
GO:0051438	regulation of ubiquitin-protein ligase activity		1.11E-02	2.08E-07
GO:0051439	regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle		3.07E-02	1.63E-07
GO:0031398	positive regulation of protein ubiquitination		6.65E-03	5.03E-07
GO:0051443	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity		1.33E-02	5.00E-08
GO:0051437	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle		2.42E-02	1.08E-07
GO:0031397	negative regulation of protein ubiquitination		2.85E-03	9.74E-08
GO:0051444	negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity		7.13E-03	6.07E-08
GO:0051436	negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle		1.56E-02	5.52E-08
GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions		1.37E-02	
GO:0006397	mRNA processing		6.98E-03	
GO:0000377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile		1.37E-02	
GO:0000398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome		1.37E-02	
GO:0044275	cellular carbohydrate catabolic process		3.46E-02	
GO:0006006	glucose metabolic process			1.65E-03
GO:0006007	glucose catabolic process			2.29E-04
GO:0006096	glycolysis			4.01E-03
GO:0046907	intracellular transport			5.84E-03
GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress			4.05E-02
GO:0006984	ER-nuclear signaling pathway		3.42E-02	7.81E-03
GO:0006986	response to unfolded protein			1.59E-02
GO:0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response			2.90E-02

BenjaminiのFDRで補正したEASE Scoreを示した。

EASE Scoreの薄字はEASE Score < 0.05を満たさなかった項目を示した。

表1-3 摂食により肝臓で発現低下する遺伝子の機能

GO ID	GO term	1hR	3hR	6hR
GO:0006066	alcohol metabolic process	1.21E-05		
GO:0008610	lipid biosynthetic process	1.42E-02		
GO:0008202	steroid metabolic process	1.20E-04		
GO:0006694	steroid biosynthetic process	7.89E-05		
GO:0016125	sterol metabolic process	5.83E-04		
GO:0008203	cholesterol metabolic process	9.30E-04		
GO:0016126	sterol biosynthetic process	3.50E-05		
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process	3.38E-05		
GO:0006629	lipid metabolic process	1.38E-05	7.61E-05	4.39E-08
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	1.12E-03	2.16E-04	3.25E-08
GO:0006644	phospholipid metabolic process			4.10E-02
GO:0046486	glycerolipid metabolic process			8.13E-03
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	1.75E-02		
GO:0019216	regulation of lipid metabolic process	1.69E-02		
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	8.19E-03	1.08E-02	
GO:0006631	fatty acid metabolic process			1.98E-03
GO:0001676	long-chain fatty acid metabolic process			1.60E-03
GO:0034440	lipid oxidation			9.93E-03
GO:0009062	fatty acid catabolic process			1.73E-03
GO:0019395	fatty acid oxidation			9.93E-03
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation			3.91E-02
GO:0006637	acyl-CoA metabolic process			3.99E-02
GO:0008152	metabolic process	1.05E-03		
GO:0055114	oxidation reduction	2.79E-05		
GO:0050896	response to stimulus	6.31E-04	6.37E-03	
GO:0042221	response to chemical stimulus	2.86E-04	6.49E-03	
GO:0010033	response to organic substance	1.08E-02		
GO:0006950	response to stress	8.65E-03		
GO:0019882	antigen processing and presentation	1.75E-02		
GO:0019884	antigen processing and presentation of exogenous antigen	4.81E-02		

BenjaminiのFDRで補正したEASE Scoreを示した。

表1-4 摂食により肝臓で発現変動する糖代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	1hR	3hR	6hR	Probe ID
解糖					
Gck	glucokinase	up	up	up	1387312_A_AT
Pgm1	phosphoglucomutase 1			up	1369473_AT, 1388634_AT
Gpi	glucose phosphate isomerase		up	up	1371392_AT
Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate	up			1367617_AT
Tpi1	triosephosphate isomerase		up	up	1367603_AT
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		up	up	AFFX_RAT_GAPDH_M_AT, AFX_RAT_GAPDH_5_AT, 1367557_S_AT, AFX_RAT_GAPDH_3_AT
Pgk1	phosphoglycerate kinase	up	up	up	1387361_S_AT
		up	up	up	1388318_AT
Bpgm	2,3-bisphosphoglycerate mutase		up	up	1383551_AT
			up	up	1388544_AT
Eno1	enolase 1		up	up	1367575_AT
Pk1r	pyruvate kinase, liver and RBC	up	up	up	1387263_AT
		down	up	up	1368651_AT
LdhA	lactate dehydrogenase A		up	up	1367586_AT
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta		up	up	1371388_AT
Dlat	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	up	up	up	1388194_AT
Aldh1b1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	down		up	1383472_AT
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	down		up	1375944_AT
Akr1a1	aldo-keto reductase family 1, member A1			up	1398753_AT
糖新生					
Gpt	glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)			down	1387052_at
Pc	pyruvate carboxylase		down		1386917_at
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	down	down	down	1372264_AT
G6pc	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	down	down	down	1370725_A_AT, 1386944_A_AT
グリコーゲン代謝					
Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta	up	up		1370267_at
Gys2	glycogen synthase 2	down			1368328_at
Pygl	phosphorylase, glycogen, liver	down	up	up	1368674_at

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

表1-5 摂食により肝臓で発現変動する脂質代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	1hR	3hR	6hR	Probe ID
脂肪酸合成					
Acaca	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha			up	1387538_AT
		down	up	up	1370893_AT
Fasn	fatty acid synthase	up	up	up	1367708_A_AT, 1367707_AT
Acacb	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	down	down		1373778_AT
Elovl5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)		up	up	1388348_AT
				up	1387630_AT
Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	up	up	up	1388108_AT, 1372318_AT, 1394401_AT
Fads1	fatty acid desaturase 1	down	down	up	1367857_AT
			up	up	1375782_AT
Fads2	fatty acid desaturase 2	down	down		1368453_AT
Scd1	similar to stearyl-coenzyme A desaturase 3; stearyl-Coenzyme A desaturase 1	down	up	up	1370355_AT
Scd	stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)		up	up	1367668_A_AT
Sc4Mol	sterol-C4-methyl oxidase-like	down	up	up	1368275_AT
AcsI3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	down	up	up	1368177_AT
Rnpep	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	down	down		1367987_AT
Mif	macrophage migration inhibitory factor		up	up	1367609_AT
Prkab1	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit		up	up	1386945_A_AT
Tpi1	triosephosphate isomerase 1			up	1367603_AT
脂肪酸分解					
AcsI3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	down	up	up	1368177_AT
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	down	down	down	1367836_AT, 1386946_AT
Acox1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl			down	1367680_AT
Acox3	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl		down	down	1377887_AT
			down		1369734_AT
Ehhadh	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase			down	1368283_AT
Hadha	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase alpha subunit			down	1370164_AT
Acaa2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	down	down	down	1380504_AT
Hadhb	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase beta subunit			down	1367694_AT
Acads	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	down	down		1367828_AT
Acadsb	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain			down	1371775_AT
Gcdh	glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase			down	1397526_AT
Dci	dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)	up	down	down	1367659_S_AT
		down	down	down	1380004_AT
Cyp4A8	cytochrome P450 4X1; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8	down	down	down	1368607_AT
Cyp4A1 /// Cyp4A10	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10		down	down	1368934_AT
Cyp4A2 /// Cyp4A3	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 2; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3			down	1394844_S_AT
Cyp4A3	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 2; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3			down	1370397_AT

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

表1-6 摂食により肝臓で発現変動するコレステロール合成関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	1hR	3hR	6hR	ProbeID
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	down	up		1367932_AT
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	down	down	down	1370310_AT
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase			up	1387848_AT
		up	up	up	1375852_AT
Mvk	mevalonate kinase	down		up	1368232_AT
		down			1387119_AT
Pmvk	phosphomevalonate kinase	down		up	1373243_AT
Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase		up	up	1368020_AT
Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	down	up	up	1388872_AT
		down	up	up	1368878_AT
Fdps	farnesyl diphosphate synthase	down		up	1367667_AT
Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	down		up	1367839_AT, 1389906_AT
Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)			up	1368086_A_AT
		down	up	up	1372973_AT
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51			up	1387020_AT
		down		up	1367979_S_AT
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	down		up	1392988_AT, 1392604_AT
Hsd17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	up	up	up	1387233_AT
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase		up	up	1380601_AT
		down	up	up	1368189_AT
Cyb5R3	cytochrome b5 reductase 3			up	1370808_AT
G6Pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase			up	1367856_AT
Insig2	insulin induced gene 2	up	up	down	1389377_AT
Insig1	similar to Insulin-induced gene 1 protein	down	down	up	1367894_AT

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

表1-7 摂食により肝臓で発現上昇するプロテアソーム構成遺伝子

Gene Symbol	Parts	Gene Name	1hR	3hR	6hR	Probe ID
PSMC2	Rpt1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 2		up	up	1367711_AT
psmc1	Rpt2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1			up	1398792_AT
psmc4	Rpt3	similar to 26S protease regulatory subunit 6B (TAT-binding protein 7) (TBP-7)			up	1398869_AT
psmc6	Rpt4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6; similar to Psmc6 protein	up	up	up	1384323_AT
				up	up	1379850_AT, 1382385_AT
psmd2	Rpn1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2			up	1398858_AT
psmd1	Rpn2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1		up	up	1369992_AT
psmd12	Rpn5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	up	up	up	1392983_AT
psmd6	Rpn7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6			up	1371851_AT
psmd7	Rpn8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7		up		1389245_AT
psmd13	Rpn9	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13			up	1371617_AT
psmd14	Rpn11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	up	up	up	1383429_AT, 1394082_AT
					up	1386073_AT
psmd5		proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	up	up	up	1372267_AT
psmd9		proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9		up	up	1368184_AT, 1368184_AT
psma1	a1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	up	up	up	1398778_AT
psma2	a2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2			up	1398856_AT
psma3	a3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 3; proteasome subunit alpha type 3-like	up		up	1368507_AT
			up	up		1368508_AT
psma4	a4	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4			up	1367837_AT
psma5	a5	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5	up	up	up	1387884_AT
psma6	a6	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6		up		1369930_AT
psma7	a7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 7		up		1371869_AT
psmb6	b1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 6			up	1398777_AT
psmb2	b2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2			up	1398786_AT
psmb3	b3	similar to Proteasome subunit beta type 3 (Proteasome theta chain)			up	1398853_AT
psmb9	b1i	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	down	down	up	1370186_AT
psmb10	b2i	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10	down		up	1374033_AT
psmb8	b5i	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	down	down	up	1367786_AT
psme3	PA28 γ	similar to proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	up	up		1388582_AT

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

表1-8 摂食によりWATで発現上昇する遺伝子の機能

GO ID	GO term	1hR	3hR	6hR
GO:0048511	rhythmic process	3.66E-02		
	circadian rhythm			
GO:0042752	regulation of circadian rhythm			3.84E-02
GO:0019222	regulation of metabolic process	1.40E-03		
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	2.10E-03		
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	2.20E-03		
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	1.84E-03		
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	1.31E-01		
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	7.25E-03		
GO:0010468	regulation of gene expression	3.80E-02		
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	4.00E-03		
GO:0006066	alcohol metabolic process		1.26E-04	4.02E-07
GO:0008202	steroid metabolic process		1.70E-02	2.22E-03
GO:0008610	lipid biosynthetic process		6.14E-04	1.85E-07
GO:0006694	steroid biosynthetic process		4.17E-02	3.00E-04
GO:0016125	sterol metabolic process		5.93E-05	1.90E-07
GO:0016126	sterol biosynthetic process		6.10E-05	6.51E-11
GO:0008203	cholesterol metabolic process		8.20E-05	1.36E-06
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process		6.29E-05	6.22E-10
GO:0044255	cellular lipid metabolic process			2.99E-02
GO:0005996	monosaccharide metabolic process			3.08E-02
GO:0019318	hexose metabolic process			1.24E-02
GO:0006006	glucose metabolic process			1.76E-02
GO:0016070	RNA metabolic process			7.78E-03
GO:0010467	gene expression			6.51E-03
GO:0006396	RNA processing			1.52E-03
GO:0016071	mRNA metabolic process			1.89E-02
GO:0008380	RNA splicing			1.37E-02
GO:0006397	mRNA processing			1.21E-02
GO:0051604	protein maturation			4.51E-02
GO:0006886	intracellular protein transport			8.81E-02
GO:0006605	protein targeting			2.97E-02
GO:0006839	mitochondrial transport			3.42E-03
GO:0033365	protein localization in organelle			3.92E-03
GO:0070585	protein localization in mitochondrion			4.28E-02
GO:0015031	protein transport			1.77E-01
GO:0017038	protein import			9.03E-03
GO:0006626	protein targeting to mitochondrion			4.28E-02
GO:0007006	mitochondrial membrane organization			3.22E-02

BenjaminiのFDRで補正したEASE Scoreを示した。

EASE Scoreの薄字はEASE Score < 0.05を満たさなかった項目を示した。

表1-9 摂食によりWATで発現低下する遺伝子の機能

GO ID	GO term	1hR	3hR	6hR
GO:0050896	response to stimulus	9.08E-03	4.46E-02	
GO:0009605	response to external stimulus	4.59E-03		
GO:0006950	response to stress	2.19E-01		
GO:0009611	response to wounding	1.25E-02		
GO:0042221	response to chemical stimulus		9.59E-02	
GO:0010033	response to organic substance		4.56E-02	
GO:0009607	response to biotic stimulus		3.82E-02	
GO:0002376	immune system process	1.48E-02		
GO:0006955	immune response	3.83E-02		
GO:0010941	regulation of cell death		3.99E-02	
GO:0043067	regulation of programmed cell death		3.67E-02	
GO:0042981	regulation of apoptosis		4.01E-02	
GO:0043068	positive regulation of programmed cell death		3.81E-02	
GO:0043065	positive regulation of apoptosis		4.03E-02	

BenjaminiのFDRで補正したEASE Scoreを示した。

EASE Scoreの薄字はEASE Score < 0.05を満たさなかった項目を示した。

表1-10 摂食によりWATで発現変動する糖代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	1hR	3hR	6hR	Probe ID
Slc2a4 (GLUT4)	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4		up	up	1388958_A_AT
				up	1367989_AT
Hk2	hexokinase 2	up	up	up	1369006_AT, 1383519_AT
Pgam1	similar to Phosphoglycerate mutase 1			up	1386864_AT
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta			up	1371388_AT
Dlat	dihydrolipoamide S-acetyltransferase		up	up	1388194_AT
Pdk2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	up		down	1367892_AT
Pc	pyruvate carboxylase			up	1386917_AT
G6Pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase			up	1367856_AT
Rpia	ribose 5-phosphate isomerase A	up	up	up	1389468_AT
Rpe	ribulose-5-phosphate-3-epimerase			up	1389202_AT
Tkt	transketolase	up	up	up	1376635_AT
Atf3	activating transcription factor 3	up	up	up	1369268_AT
Atf4	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	up	up	up	1367624_AT
Crem	cAMP responsive element modulator	up		up	1378925_AT
				up	1393550_AT
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal			up	1370281_AT
Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	up	up	up	1369560_AT, 1371363_AT, 1378960_AT
Gpd2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial		up	up	1369666_AT, 1387670_AT
Lep	leptin	up	up	up	1387748_AT
Mapk14	mitogen activated protein kinase 14			up	1367697_AT
Pgm3	phosphoglucomutase 3		up	up	1382103_AT
Phka2	phosphorylase kinase alpha 2	up		down	1379072_AT
Ppp1R3B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	up	up	up	1371161_AT, 1384262_AT, 1380125_AT
Ppp1R3C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	up			1373108_AT
Slc37A4	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4		up	up	1386960_AT
Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1			up	1386900_AT

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

表1-11 摂食によりWATで発現変動する脂質関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	1hR	3hR	6hR	Probe ID
Srebf1	sterol regulatory element binding transcription factor 1		up	up	1388426_AT 1371104_AT
Acly	ATP citrate lyase	up	up	up	1367854_AT, 1395841_AT
Acaca	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha			up	1387538_AT
Acacb	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	up		up	1370893_AT
Elovl5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)			up	1373778_AT
Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)		up	up	1388108_AT, 1372318_AT, 1394401_AT
Fads1	fatty acid desaturase 1	down		up	1367857_AT
Fads3	fatty acid desaturase 3			up	1372476_AT
Fasn	fatty acid synthase			up	1367707_AT, 1367708_A_AT
Qk	quaking	up			1375378_AT
Scd	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)		up	up	1388253_AT
		up	up	up	1367668_A_AT
Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial		up	up	1369758_AT, 1382986_AT
		up	up	up	1372452_AT
Agpat4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4			up	1368194_AT
Agpat6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6	up			1390966_AT, 1372919_AT
Agpat9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9			up	1374610_AT
Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	up	up	up	1391045_AT, 1371615_AT
Crls1	cardiolipin synthase 1	up			1379525_AT, 1390717_AT
Etnk1	ethanolamine kinase 1	up	up		1371710_AT 1393151_AT
Mogat2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2		up	up	1383979_AT
Pcyt1A	phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha			up	1389299_AT
Pcyt2	phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine			up	1368100_AT
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	up	up	up	1380643_AT, 1393650_AT, 1391544_AT, 1380013_AT
Acsl3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3		up	up	1368177_AT
Acsl5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5		up	up	1397375_AT 1386926_AT
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal			up	1370281_AT
Impa1	Inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1			up	1398808_AT
Lpcat1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1		up	up	1371923_AT
Lpcat3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3			up	1376813_AT, 1393915_AT
Oprs1	opioid receptor, sigma 1			up	1386918_A_AT
Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)		up	up	1367851_AT
Prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit			up	1369654_AT
Prkab1	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit		up		1386945_A_AT
Pc	pyruvate carboxylase			up	1386917_AT
Sh3Glb1	SH3-domain GRB2-like endophilin B1	up		down	1382007_AT
Star	steroidogenic acute regulatory protein	up	down		1368406_AT

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

表1-12 摂食によりWATで発現変動するコレステロール合成関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	1hR	3hR	6hR	Probe ID
Srebf2	sterol regulatory element binding transcription factor 2		up	up	1371979_AT
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)		up	up	1367932_AT
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	up	up	up	1375852_AT
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase		up	up	1368189_AT
				up	1380601_AT
Pmvk	phosphomevalonate kinase			up	1373243_AT
Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase	up	up	up	1368020_AT
Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1		up	up	1388872_AT, 1368878_AT
Fdps	farnesyl diphosphate synthase		up	up	1367667_AT
Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1			up	1389906_AT
Lss	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)		up	up	1372973_AT
				up	1368086_A_AT
Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase			up	1372012_AT
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	up	up	up	1367979_S_AT
			up	up	1387020_AT
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like		up	up	1392604_AT, 1392988_AT
Hsd17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7			up	1387233_AT
G6Pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase			up	1367856_AT
Prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit			up	1369654_AT
Insig1	similar to Insulin-induced gene 1 protein	up	up	up	1367894_AT

各タイムポイントでFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。



(B)

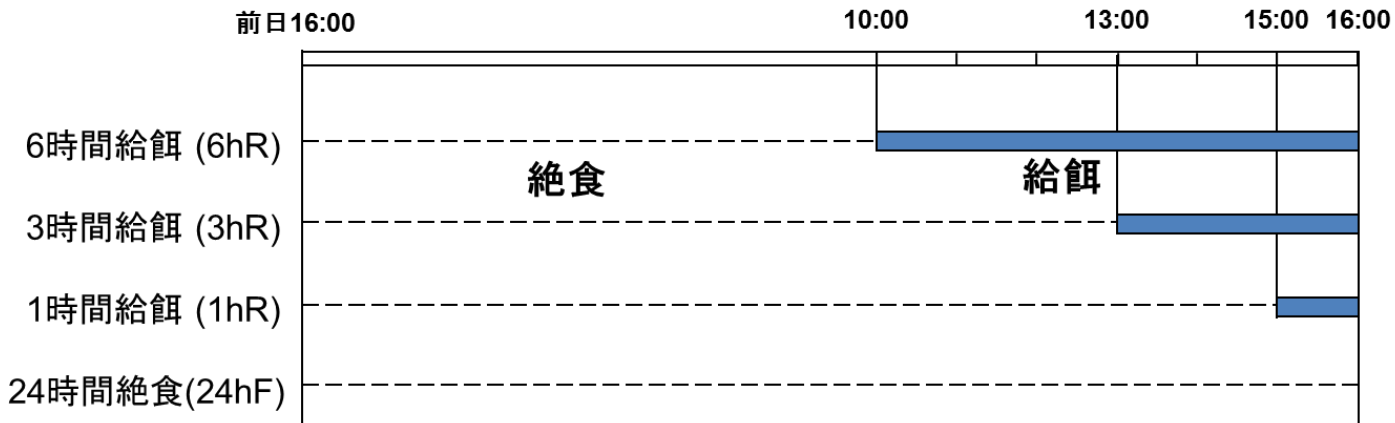


図1-1. 動物実験スケジュール

(A)制限給餌のスケジュール

飼育開始2日間は飼料を自由摂食(赤線)させ、その後8日間は制限給餌を行った。10日目に平均や分散を考慮して群分けを行った。

(B)解剖当日のスケジュール

制限給餌により飼育を行ったラットに対して、解剖前日16時から各群絶食させ(破線)、解剖前1, 3, 6時間前からそれぞれ給餌を行った(青線)群と、24時間絶食させた群を作製した。

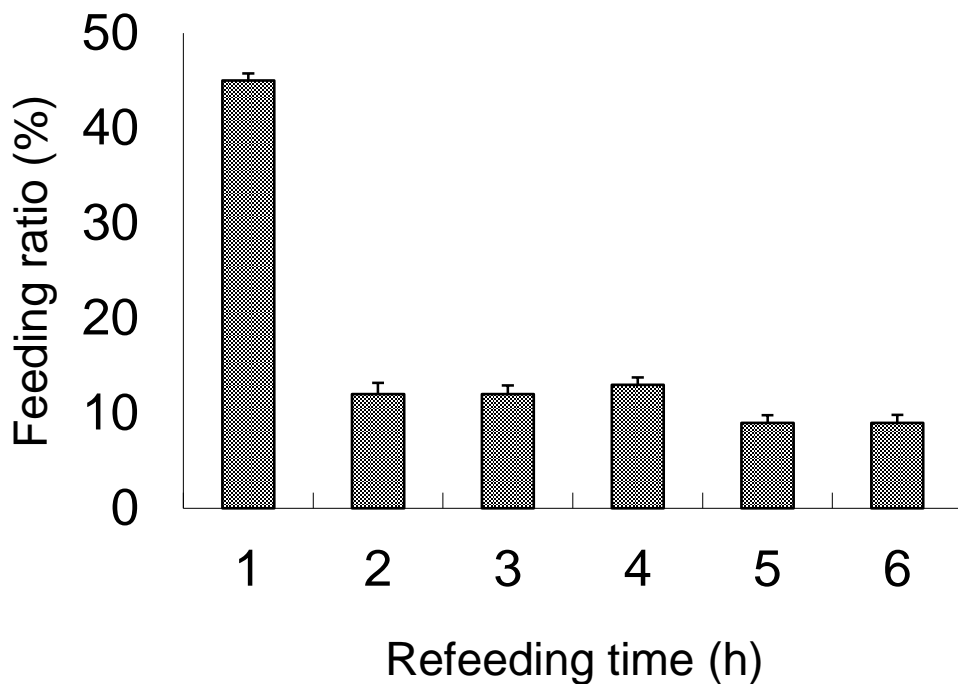


図1-2. 経時的な摂食量の変化

6時間の制限給餌期間において1時間ごとに摂食量の測定を行った($n = 5$)。全摂食量に対する1時間あたりの摂食量を割合で示した。給餌後1時間で全摂食量の約45%を摂食し、その後は約10%ずつ摂食していた。

数値は平均±標準誤差で示した。

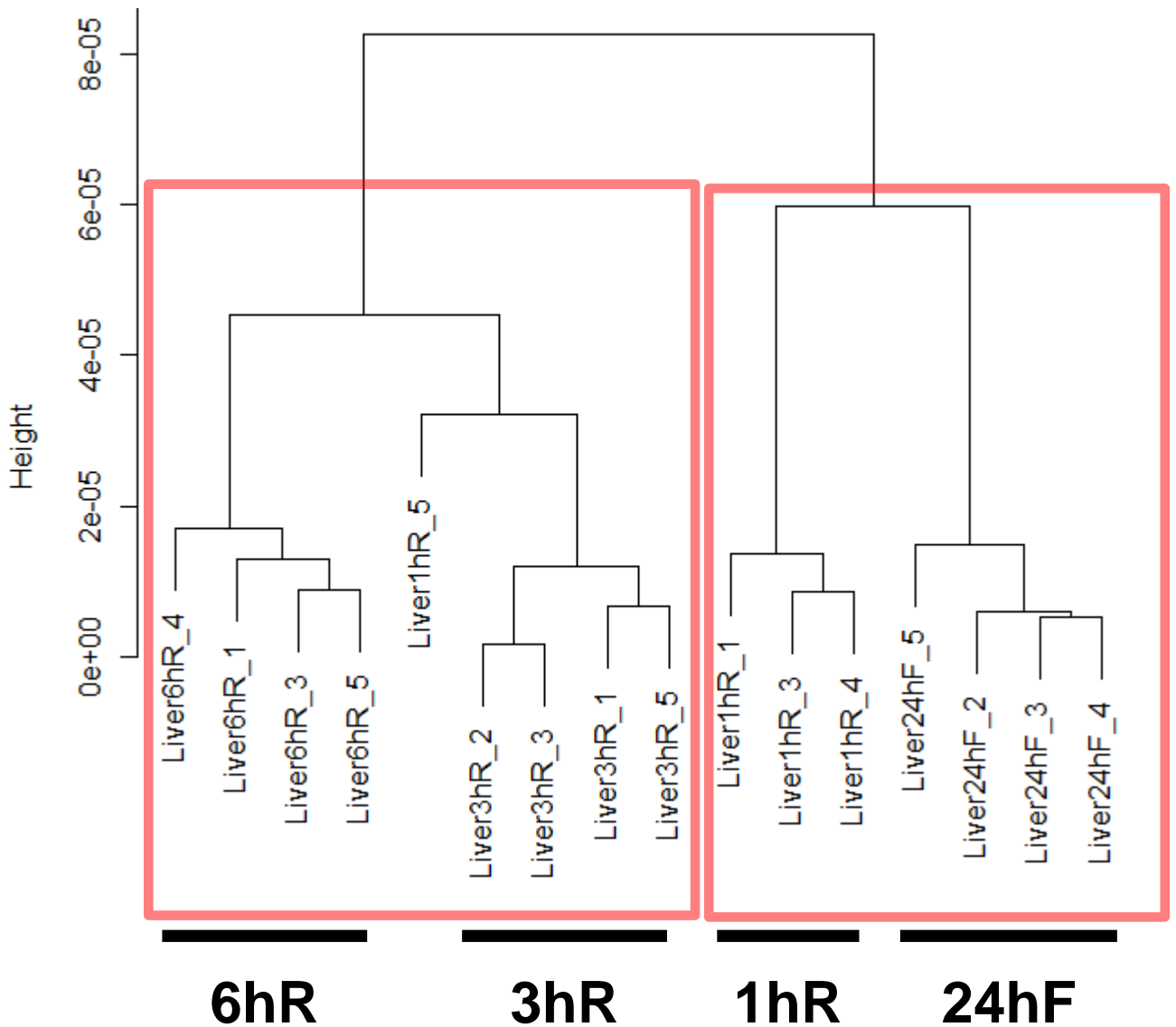


図1-3. DFWで正規化した肝臓マイクロアレイデータのサンプル間クラスタリング

Liver1hR_5のサンプル以外は 給餌時間の違いでクラスターを形成しており、さらに24hFと1hR、3hRと6hRで大きなクラスターを形成していた(赤枠)。

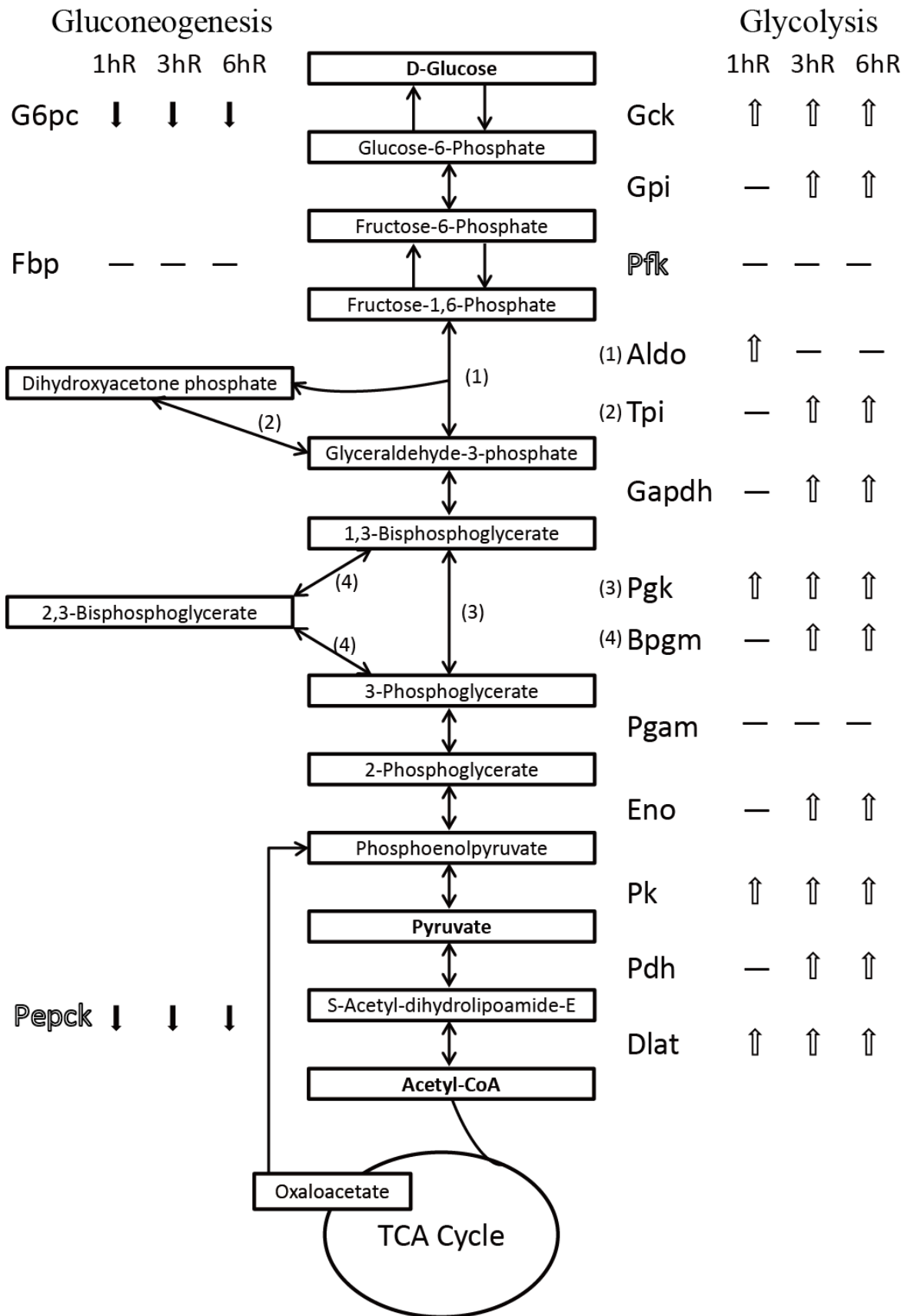


図1-4. 糖代謝経路の遺伝子発現変動

代謝経路に関わる遺伝子の発現変動を矢印で表現した。各代謝における律速酵素は遺伝子名を白抜き文字で表した。

解糖関連遺伝子の多くは摂食時間依存的に発現上昇した一方で、糖新生関連遺伝子は摂食開始直後から全ての遺伝子で発現低下が見られた。

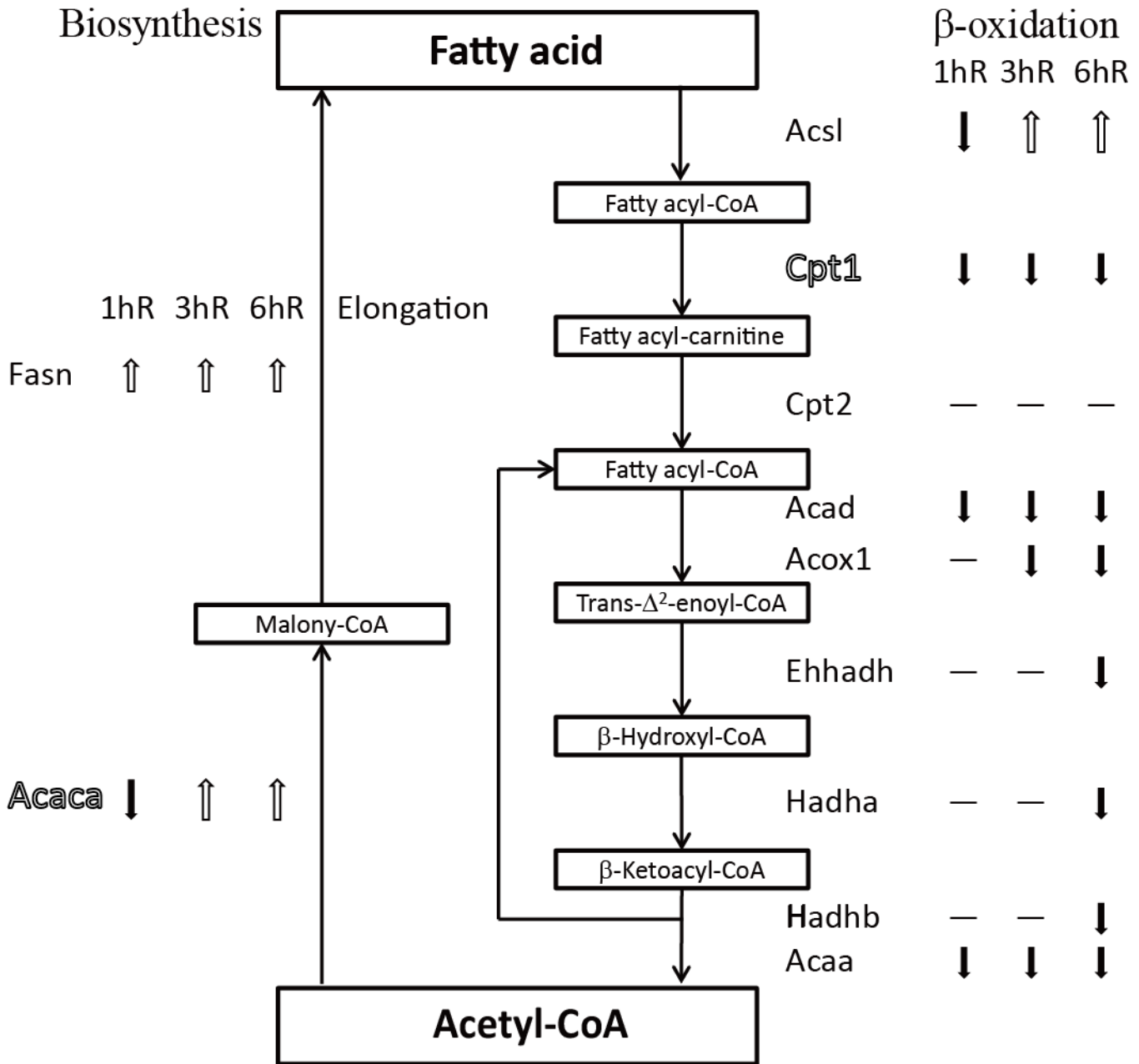


図1-5. 脂肪酸代謝経路の遺伝子発現変動

代謝経路に関わる遺伝子の発現変動を矢印で表現した。各代謝における律速酵素は遺伝子名を白抜き文字で表した。

脂肪酸合成経路(左側)は律速酵素Acacaが一時的に発現低下したが、3hRから発現上昇した。脂肪酸 β 酸化経路(右側)は1hRから多くの遺伝子が発現低下していた。

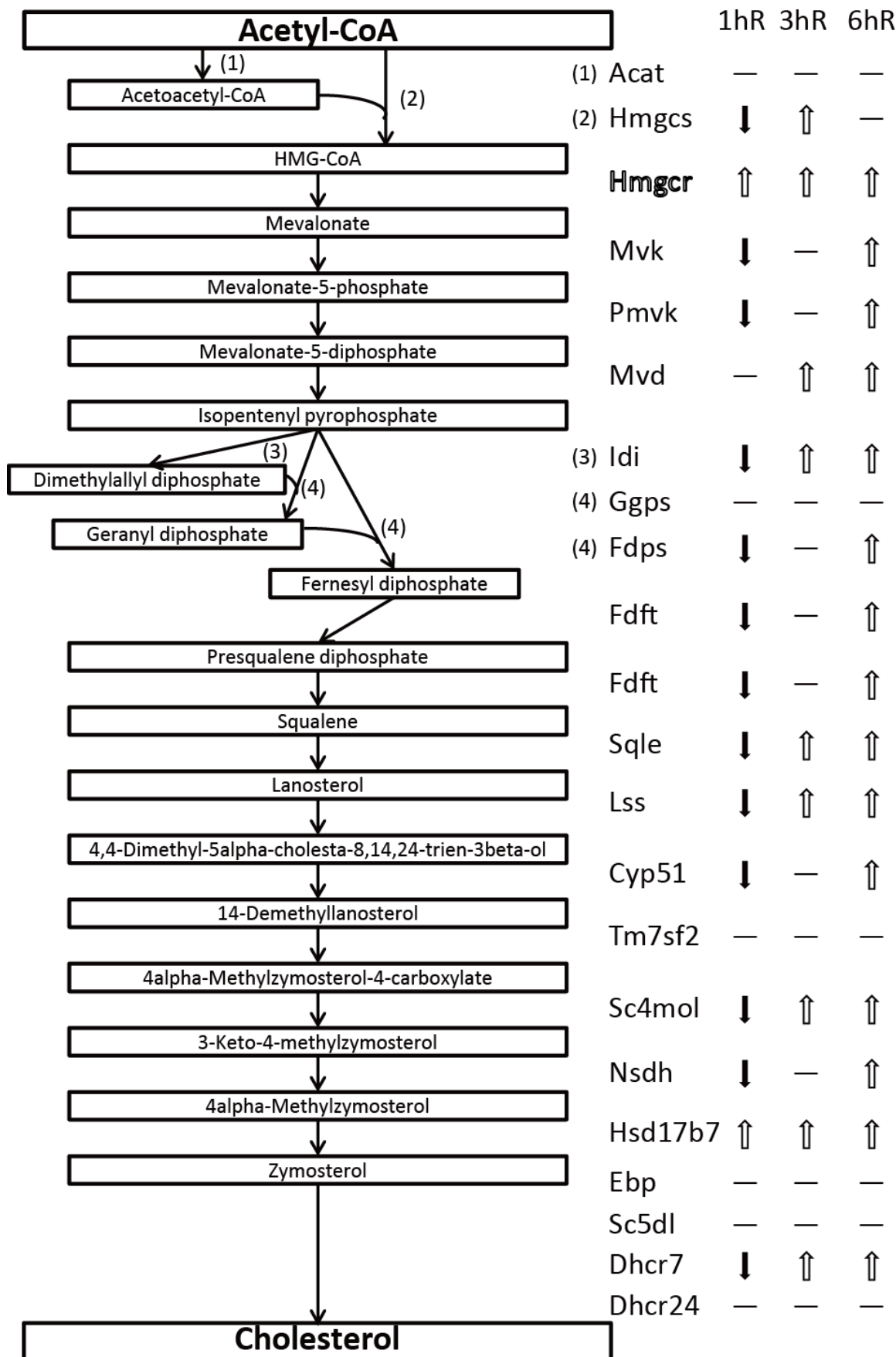


図1-6. コレステロール合成経路の遺伝子発現変動

代謝経路に関わる遺伝子の発現変動を矢印で表現した。各代謝における律速酵素は遺伝子名を白抜き文字で表した。

多くの遺伝子が1hRで一時的に発現低下したが、3hRから発現上昇した。

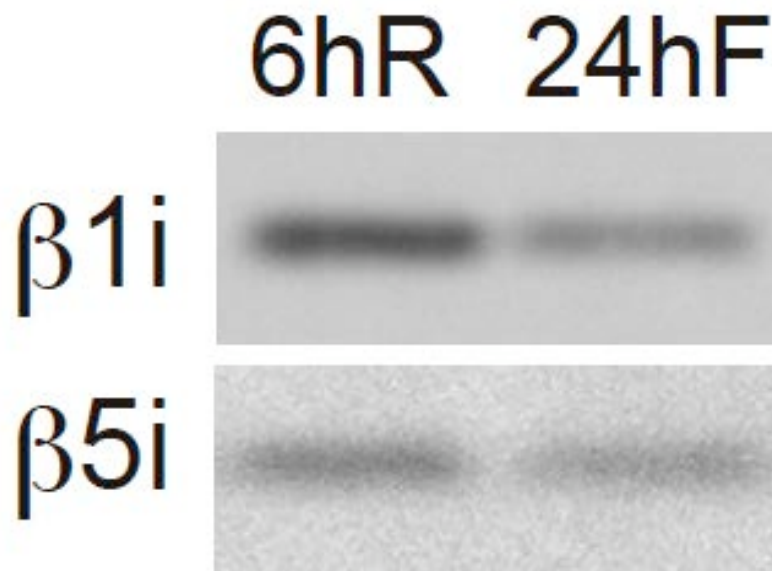
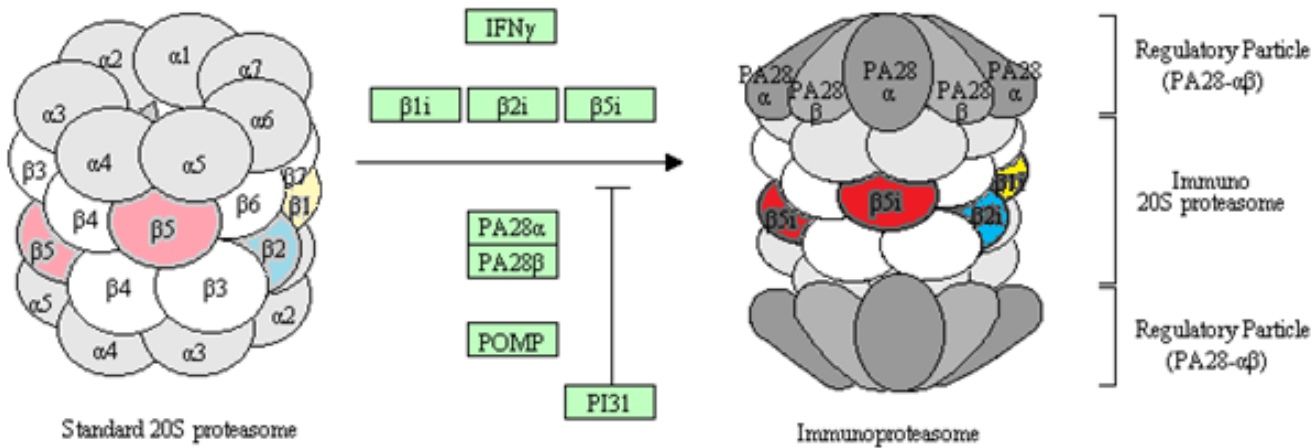


図1-7. 免疫プロテアソーム構成タンパク質の解析

(A) プロテアソームの構成

構成的プロテアソーム(左)の $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ が $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ に置換されると免疫プロテアソーム(右)になる。KEGG Pathway: map03050を一部改変

(B) 免疫プロテアソーム構成タンパク質のイムノブロッティング

左のレーンは6hR群、右のレーンは24hF群を示す。(上段)抗 $\beta 1i$ 抗体、(下段)抗 $\beta 5i$ 抗体を使用した。

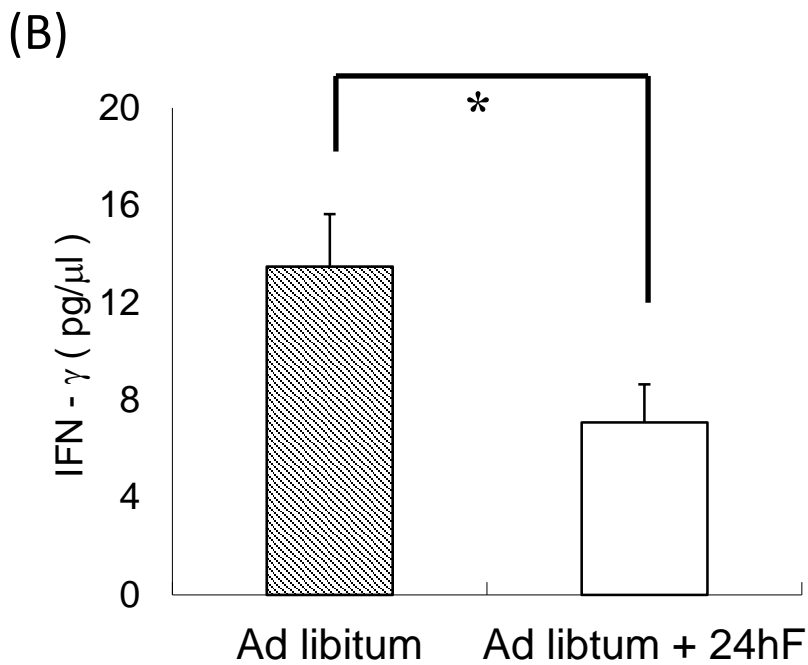
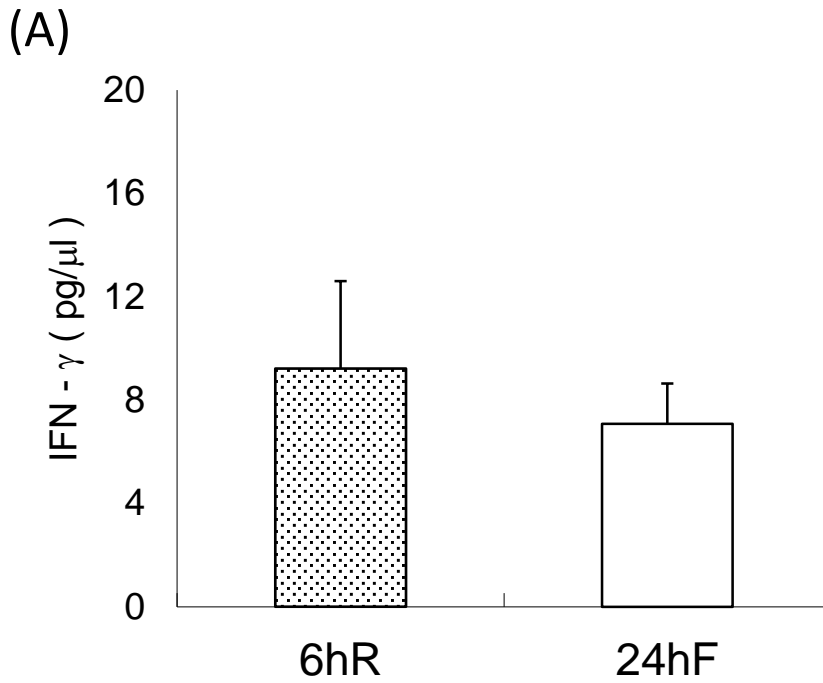


図1-8. 血清中IFN- γ 濃度の変化

(A)6hR群と24hR群の比較、(B)Ad libitum群とAd libitum+24hF群の比較
 制限給餌により飼育した群間にはIFN- γ の変化は見られなかったが、(B)Ad
 libitum群とAd libitum + 24hF群の比較では有意な変化が見られた(n = 5)。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

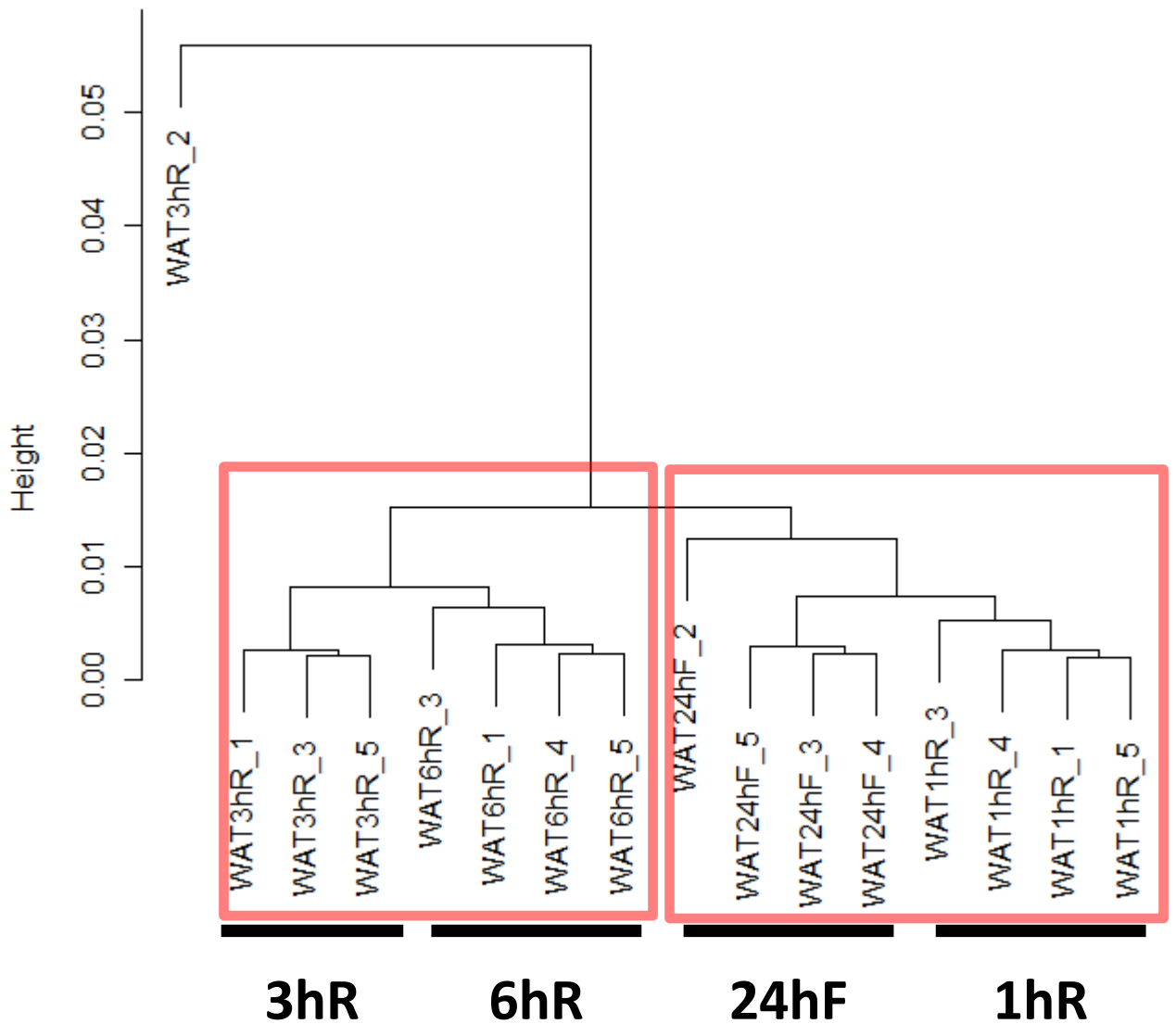


図1-9. qFARMSで正規化したWATマイクロアレイデータのサンプル間クラスタリング

WAT3hR_2のサンプル以外は給餌時間の違いでクラスターを形成しており、さらに肝臓同様に24hFと1hR、3hRと6hRで大きなクラスターを形成していた(赤枠)。

第 2 章

摂食と味覚刺激の関係性の解析

緒言

第1章では絶食後再給餌によって生じる様々な生理機能の変化について、DNA マイクロアレイを用いた肝臓や脂肪組織の遺伝子発現変動解析から経時的且つ網羅的に明らかにした。これは、摂食による栄養素吸収によって生じた変化であり、摂食によって生じる変化を栄養学的な観点から捉えたものである。

摂食によって生じる応答は栄養素の吸収に生じる変化だけでなく、何をどれくらい食べるかという摂食行動の調節も重要である。このような、末梢器官における代謝調節や摂食行動の調節は中枢である脳によって行われており、体内のエネルギーバランスを調節する。

また、摂食の際には、視覚、嗅覚、触覚、味覚など様々な感覚を受容し、その判断を元に摂食行動を決定していると考えられている。その中でもとくに味覚は摂食時のみに生じる感覚であり、摂取する食物の質・量に影響を与えている[119]ため、エネルギー恒常性との関連性が深い。しかし、でんぷんなどのように全ての炭水化物が甘味を呈さないことや、特定の味覚を知覚できないマウス(Ggust^{-/-} [120],T1R3^{-/-} [121],Trpm5^{-/-} [122]など)でも餌を認識し生存することが知られている。また、味覚刺激を知覚できなくても報酬系などの摂取後(post-ingestive)効果が生じることで摂食行動に影響を及ぼしうることも知られている[123,124]。先行研究でも、甘味、旨味、苦味の3つの味覚を失わせたTrpm5^{-/-}マウスでもエネルギー獲得のために糖분을摂取しようとする他、栄養素の質的な違いも感知することが報告されている[125]。その中で味覚刺激が摂食行動に対してどのような役割を果たしているかについては不明な点が多い。また、味覚刺激は体内への栄養素流入のシグナルにもなりうる可能性が考えられている。とくに自然界において甘味刺激を感じる場面は食物中の糖の存在を感知するシステムであると考えられており、味覚刺激が体内への栄養素流入の刺激になっているのであれば、エネルギー代謝調節に関与している可能性も考えられる。

そこで本章は、エネルギー恒常性維持機構の一端である摂食行動の調節やエネルギー代謝調節が味覚刺激の影響を受けるか否かを明らかにすることを目的として、第1節では味覚刺激が摂食行動に与える影響、第2節では甘味刺激が肝臓遺伝子発現に与える影響について解析した。

第 1 節 味覚刺激が摂食行動に与える影響

1. 目的

摂食行動により生じる感覚の中でも味覚は摂食時のみに生じる感覚であり、何をどれくらい摂取するかという食物摂取の質・量に影響を与える。このため、エネルギー恒常性との関連性が深いと考えられる。ヒトでは味覚刺激に対する食物選択の影響については既に報告ある[126]が、ヒト対象とした研究では遺伝的背景や生育環境、年齢等にも影響を受けることが考えられた。そのため、遺伝的・環境的背景を一定条件に揃え、味に対して学習をしていないマウスを利用して解析することにした。

本研究では味覚刺激の有無が摂食行動に影響するか否かを明らかにすることを目的として、各味覚刺激に対する摂食量の変化および、味物質添加餌と味物質非添加餌の 2 種類の餌を同時に提示した時に生じる味物質添加餌に対する嗜好性の変化という 2 つの観点から評価を行った。

2. 材料と方法

2.1. 被験動物

8 週齢 C57BL/6J 系 (WT) 雄性マウスを日本クレア株式会社(Tokyo, Japan)から購入した。また、Skn1 遺伝子欠損(KO) 雄性マウスは当研究室で作製及び自家繁殖したものをを用いた[76]。系統の維持は KO マウス同士を掛け合わせて行った。

2.2. 動物飼育

第 1 章と同様の環境で飼育した。

2.3. 飼料の作製

飼料はオリエンタル酵母(Tokyo, Japan)より購入した。組成は AIN-93G 飼料組成 [127]に基づき、AIN-93G に含まれるスクロース(10%)、AIN-93G ミネラルミックス及び AIN-93G ビタミン

ミックスに含まれるスクロースを全て除去した。この飼料をベースとして除去したスクロース分を全てβ-コーンスターチに置換した飼料を味物質非添加餌(無味餌)として作製した。また以下の味物質を添加し、β-コーンスターチで調製した飼料を味物質添加餌として作製した。除去したスクロースを再度 10%添加した飼料を AIN-93G として利用した。以下、飼料を餌として表記した。

先行研究において嗜好性の変化が見られる味物質及び濃度を参考に、以下の通りの味物質添加餌を作製した[128]。

スクロース (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)	10 (%)	= AIN-93G
サッカリンナトリウム (Tokyo Chemical industry Co. LTD.)	0.3 (%)	
スクラロース (Sigma-Aldrich Co.)	0.1, 1 (%)	
安息香酸デナトニウム (Sigma-Aldrich Co.)	0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 1 (%)	
塩酸キニーネ (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)	0.03, 0.1, 0.3, 1 (%)	
クエン酸 (Kanto Chemical Co., Inc.)	0.1, 0.3, 1, 3 (%)	
塩化ナトリウム (Kanto Chemical Co., Inc.)	0.6 (%)	
グルタミン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich Co.) 1.7 (%) + イノシンーリン酸 (Nacalai Tesque, Inc.) 0.2 (%)		

2.4. 摂食行動試験

2.4.1. 摂食量試験(1 餌提示実験)

プラスチックケージで単独飼育を行い、AIN-93G で 7 日間の予備飼育を行った後、実験に用いた。WT マウス(n = 5~6)または KO マウス(n = 5~6)に対して、粉末飼料給餌器を用いて 48 時間ずつ 5 基本味(甘味、苦味、酸味、塩味、旨味)味物質添加餌と無味餌の中から 1 つを提示し、摂食量を記録した。飼育期間を通して、滅菌水を自由飲水させた。各餌提示前 24 時間はマウスの栄養状態を揃えるために、インターバルとして固形餌(ラボ MR ブリーダー)を 24 時間自由摂取させた。

各試験は低濃度から高濃度へと順に行い、各餌の提示される順番の学習等の影響を除外するために、群ごとの平均体重が近くなるようにマウスを 2 群に分けて提示する順番を変えた。一方は

先に味物質添加餌を提示後、無味餌を提示し、もう一方は無味餌を提示後、味物質添加餌を提示した。実験の日程、測定に利用したガラス製給餌器の様子を図 2-1 に示した。

2.4.2 嗜好性試験(2 餌提示実験)

液体による 2 瓶選択法による嗜好性試験のプロトコールを参考にして実験系を設計した[128]。

アルミ製ケージで単独飼育を行い、AIN-93G で 7 日間の予備飼育を行った後、実験に用いた。WT マウス(n = 5)及び KO マウス(n = 5)に対して、ガラス製壁掛け型給餌器(MUROMACHI KIKAI Co. LTD., Tokyo, Japan) をケージの両端に提示し、一方には無味餌、もう一方には味物質添加餌を入れて 48 時間自由摂取させた。各マウスに対して位置・マーキングによる偏りを防ぐために 24 時間経過した時点で給餌器を取り替えると共に位置を入れ替えた。48 時間後に無味餌と味物質添加餌の摂食量をそれぞれ測定し、味物質添加餌の嗜好性(Preference ratio)を全摂食量に対する味物質添加餌の摂食量の割合として算出した。飼育期間を通して、滅菌水を自由飲水させた。

添加した味物質としてサッカリンナトリウム(甘味物質添加餌)と安息香酸デナトニウム(苦味物質添加餌)を利用し、様々な濃度で検討を行い、各濃度について 48 時間で 1 セットとして行った。また、学習による摂食行動の偏りを防ぐために、各実験の間には両給餌器に AIN-93G を入れて提示し、嗜好性が約 50%になり特定の給餌器に対して嗜好性を示さなくなるまで間隔をおいた。各試験は低濃度から高濃度へと順に行った。

実験の日程、ガラス製壁掛け型給餌器、測定の様子を図 2-2 に示した。

3. 結果

3.1. 摂食量測定実験(1 餌提示実験)

3.1.1. 甘味物質添加餌

マウスに対して甘味物質添加餌を単独で提示した時の 48 時間摂食量を測定し、無味餌を単独で提示した時との摂食量の比較を行った。高い嗜好性が報告されている濃度の人工甘味料(0.3%サツ

カリン、0.1%スクラロース)や高濃度の人工甘味料(1%スクラロース)を添加した。しかし、各甘味物質添加餌は、無味餌提示時と比較してWTマウスの48時間あたりの摂食量に変化はなかった(図2-3 A~C)。さらに、糖質(10%スクラロース)を添加した甘味物質添加餌でも無味餌に対して有意な摂食量の変化は見られなかった(図2-3 D)。以上より、甘味刺激は摂食量には影響しないことが示唆された。そのためKOマウスを用いた解析は行わなかった。

3.1.2. 苦味物質添加餌

苦味物質として安息香酸デナトニウムを用いて検討を行った結果、WTマウスでは0.3%以上の濃度で摂食量の低下が見られた(図2-4 A)。この摂食量低下が味覚による影響を受けているか検討するために、KOマウスを用いて試験を行ったところ、WTマウス同様に0.3%以上の濃度で摂食量低下が見られ、苦味を受容できないKOマウスでも摂食量の低下が示された(図2-4 B)。WTマウスとKOマウスの忌避の程度を比較するために、無味餌の摂食量に対する苦味物質添加餌の摂食量の割合(摂食量低下率)を算出した。摂食量低下率が0に近いほど摂食量が大きく低下し忌避の程度が大きいことを示す。摂食量低下率が1に近いほど摂食量の変化は小さく無味餌に近い摂食量であり忌避の程度が小さいと示される。この比較を行った結果、0.3%デナトニウム添加餌においてWTマウスに比べてKOマウスの摂食量低下率が高値を示し(図2-4 C)、KOマウスでは忌避の程度が緩和されたことが示唆された。

デナトニウムによる摂食量低下の原因が苦味刺激であることを示すために、異なる苦味物質を用いた。デナトニウムと化学構造が大きく異なるだけでなく、苦味を受容するための受容体が異なること[129]が知られている塩酸キニーネを用い同様の試験を行った。その結果、WTマウスでは0.1%以上の濃度でキニーネ添加餌に対する摂食量低下が生じた(図2-5 A)一方、KOマウスでは0.3%以上の濃度で摂食量の低下が生じた(図2-5 B)。この結果から、KOマウスはキニーネ添加餌に対して摂食抑制が生じる閾値が高いことが示唆された。さらに、デナトニウム添加餌と同様に、無味餌の摂食量に対するキニーネ添加餌の摂食量低下率を算出したところ、KOマウスはWTマウスに比べ0.1%から割合が有意に高く忌避が緩和されていた(図2-5 C)。この結果は、塩酸キニーネでもデナトニウム同様にKOマウスで忌避の程度が緩和されていることが示され、苦味刺激

の有無によって忌避の程度が変化することが示唆された。

3.1.3. 酸味物質添加餌

酸味物質としてクエン酸を用いた検討を行った。忌避味であるのにもかかわらず、3%までは摂食量の低下が見られなかった。10%クエン酸添加餌を提示すると、WT マウスに加えて KO マウスでも摂食量の低下が生じた(図 2-6 A~B)。その忌避の程度を評価するために、無味餌の摂食量に対するクエン酸添加餌の摂食量低下率を算出したところ、KO マウスは WT マウスに比べ高値を示した(図 2-6 C)。この結果は、酸味によって摂食量は低下するが、KO マウスは苦味同様に忌避の程度が緩和されたと考えられる。

3.1.4. その他の味物質の検討(旨味及び塩味)

旨味物質添加餌にはグルタミン酸ナトリウム(Monosodium Glutamate; MSG)とイノシン酸一リン酸(Inosine5'-monophosphate; IMP)の混合物を用いた。WT マウスに対して旨味物質添加餌を提示したが、無味餌との有意な摂食量の変化は見られなかった(図 2-7 A)。また、塩味物質添加餌には NaCl を利用した。通常、塩味は低濃度では嗜好するが、高濃度では忌避する。本研究では低濃度(0.6%)で添加し、WT マウスに対して提示したところ無味餌との有意な摂食量の変化が見られなかった(図 2-7 B)。

以上の結果から、甘味や旨味、低濃度の塩味という嗜好味ではどの検討でも摂食量の変化が生じなかった一方、苦味と酸味という忌避味に対しては摂食量の低下が生じたことが示された。

3.2. 嗜好性試験(2 餌提示実験)

3.2.1. 甘味物質添加餌に対する嗜好性試験

サッカリン添加餌を無味餌と同時に提示すると、WT マウスでは、0.01%では無味餌に対して有意な忌避が見られたが、0.03%~0.3%の範囲では無味餌に対して有意な嗜好性が見られた(図 2-8 A)。1%以上の高濃度になると、有意差は見られなかったもののばらつきが大きくなるとともに、嗜好率が大幅に低下した。この結果は、サッカリン溶液を用いた 2 瓶選択試験で得られた結果と

類似していた。1%の提示実験において、5匹のうち2匹は高い嗜好性を示した一方で、残りの3匹は忌避性を示していたことから非常にばらつきが大きく、3%の提示実験では全マウスの Preference ratio が低下していた(Data not shown)。続いて、KO マウスに対して同様の試験を行った結果、どの濃度でもばらつきが大きいものの、嗜好率は全ての濃度で約 50%を示していた(図 2-8 B)。

以上の結果を用いて、各濃度において WT マウスと KO マウスの嗜好率を比較した結果、0.03% 及び 0.1%では KO マウスの嗜好率に比べ WT マウスの嗜好率が有意に高かった(図 2-8 C)。この結果は、嗜好性が生じた原因が甘味刺激であったことを示唆している。

3.2.2. 苦味物質添加餌に対する嗜好性試験

デナトニウム添加餌を無味餌と同時に提示すると、WT マウスは 0.03%では嗜好性に変化は見られなかったが、0.1%の濃度から有意な嗜好性の低下(忌避)が見られ、0.1%以上の濃度ではさらに強い忌避を示した(図 2-9 A)。一方で、KO マウスに対して行った同様の試験でも 0.03%では嗜好性に変化が見られなかったが、0.1%以上で有意な忌避が生じていた(図 2-9 B)。

以上の結果を用いて、各濃度における WT マウスと KO マウスの各嗜好性を比較した結果、0.1% 及び 1%において WT マウスは KO マウスに比べより強い忌避を示した(図 2-9 C)。この結果は忌避が生じた原因が苦味刺激であることを示唆している。

4. 考察

従来の味覚研究における行動解析では、味物質溶液と水を同時に 48 時間提示した時の飲水量を測定する 2 瓶選択試験や、短時間で溶液をなめた回数を測定する Brief access test などが存在する。これらの 2 つの手法の共通点として、味物質を水溶液として提示することが挙げられる。しかし、自然界において動物が味覚を利用する機会は飲水時ではなく、摂食時に食物から得る味覚刺激が圧倒的に多い。本実験で利用した粉末餌は、マウスの栄養必要量を基礎にして米国国立栄養研究所で策定された標準精製飼料 AIN-93G をベースとして設計を行った。AIN-93G に含まれ

る各物質が味覚に与える影響をコントロールすることは難しいため、一般的な甘味物質となるスクラロースを全量コーンスターチに置換し味物質を可能な限り排除したものの無味餌として作製し、この無味餌に各味物質を添加することで味物質添加餌を作製した。

4.1. 摂食量測定実験(1 餌提示実験)

人工甘味料を始めとする各味物質の濃度は、2 瓶選択試験や Brief access test において強い嗜好性が示されているモル濃度を重量パーセントに換算 (サッカリン 10 mM = 0.3%、スクラロース 2 mM = 0.1%) して混餌を行った。また、摂食と飲水では甘味刺激を受ける閾値が異なる可能性を検討するために人工甘味料を高濃度で添加した場合についても実験を行った。サッカリンは高濃度において苦味を呈する[130]ため、スクラロースのみを高濃度の実験に用いた。各甘味物質添加餌の実験の結果、どの甘味物質添加餌でも摂食量の変化は見られなかった。その他、旨味や低濃度の塩味に関しても、マウスが嗜好する濃度の味物質を添加した餌(MSG 100 mM = 1.7%、NaCl 100 mM = 0.6%) では摂食量の変化は見られなかった。以上の結果から、マウスが嗜好する味による味刺激では摂食量には影響しないことが示唆された。これは、マウスが持つカロリー補償性による可能性が考えられる。カロリー補償性とはマウスが 1 日あたりの摂食カロリーを揃えることで体内のエネルギーバランスを保とうとする働きであり、摂食によって消化管における食物の蓄積や栄養素の吸収などが進むと摂食に対するネガティブフィードバックがかかる[131,132]。また近年では消化管におけるグルコーストランスポーター(Glucose transporter 3: GLUT3)が起点となり摂食が抑制されるという報告もなされている[133]。2 瓶選択試験など溶液を用いた行動試験では溶媒である水にカロリーがないため、味物質以外にカロリーを考慮する必要はないが、餌をベースとした本実験においては嗜好味であってもカロリー補償性が優先されている可能性が考えられる。しかし、このような知見は、味物質とカロリーが同時に存在する実験条件だからこそ得られた新たな知見であると考えられる。一方、グレリン投与により甘味物質(サッカリン)添加餌に対する摂食量が無味餌に比べ増加するという報告もされている[134]。この実験に利用した餌はカロリーがない寒天を使用していることから、カロリー補償性が働かなかった条件であると考えられる。この報告を加味すると、カロリー補償性が働かない環境下では甘味物質

により摂食量が増加する可能性が考えられ、今後はカロリー補償性を排除したマウスにおいて摂食量がどのように変化するかを明らかにすることで、より味覚と摂食の関係を明らかにできると考えられる。カロリー補償性を排除したマウスとしては後天的な過食モデルが考えられ、ストレプトゾトシン[135]や金硫化グルコース[136]処理などを利用することが有効なのではないかと考える。

続いて、苦味物質添加餌提示実験に関して考察を行う。苦味物質としてデナトニウム及びキニーネの2種類を用いると、高濃度で添加時に有意な摂食量低下が生じた。2種類の異なる苦味物質で同様に摂食量の低下が生じたことから、苦味刺激が摂食量に影響したことが強く示唆された。さらに、摂食量への影響が口腔内の味覚刺激に起因することを明らかにするために、苦味を受容しないKOマウスを用いた実験を行ったところ、WTマウス同様に高濃度の苦味物質添加餌に対して摂食量の低下が生じた。この結果は摂食量低下の主たる原因が、口腔における苦味刺激であるという仮説と矛盾している。しかし、キニーネではWTマウスは0.1%から摂食量が低下したことに対して、KOマウスでは0.3%から摂食量が低下した。さらに、両苦味物質の実験において無味餌に対する苦味物質添加餌の摂食量低下率を算出すると、KOマウスに比べWTマウスの方が有意な低値を示したことから強い忌避を示した。以上の結果は、KOマウスはWTマウスに比べて、2種類の苦味物質に対する忌避が緩和されたことを示唆している。KOマウスは口腔における苦味受容体の発現が消失していること[76]から、口腔の味覚刺激の消失が忌避の緩和に大きく寄与した可能性が考えられる。

次に酸味物質添加餌の結果について議論を行う。低濃度の酸味物質添加餌は摂食量に変化がなかった一方、10%クエン酸を添加した高濃度の酸味物質添加餌はWTマウス及びKOマウスにおいて摂食量が低下した。MatsumotoらによってKOマウスはWTマウスに比べて酸味応答に関連するType III味蕾細胞の数は増えている一方で、行動試験では酸味に対する応答に差がないことが報告されている[76]ため、WTマウスとKOマウスで共に酸味物質添加餌を忌避したことは予想通りである。しかし、苦味物質添加餌同様に、WTマウスの酸味餌に対する摂食量低下率はKOマウスの摂食量低下率に比べ大きいという結果が得られた。この結果は、行動試験で行った低濃度(30 mM クエン酸)の酸味溶液受容には変化がなかった報告と矛盾する。この知見に関して

は、KO マウスと WT マウスの口腔内における酸味受容機構は変化していないため、低濃度では差が見られなかったと考えられる。しかし、KO マウスは消化管内における pH 受容機構などが変化したことにより高濃度の酸味物質添加で差が生じた可能性が考えられる。

以上の摂食量測定実験(1 餌提示実験)から、嗜好味(甘味・旨味・低濃度の塩味)を呈する味物質の添加では摂食量に影響を与えない一方、忌避味(苦味・酸味)を呈する味物質を高濃度で添加すると摂食量が低下することを明らかにした。また、KO マウスでは忌避が緩和されることから、摂食量低下が生じる原因の一つとして味覚刺激が挙げられることが示唆された。

4.2. 嗜好性試験(2 餌提示実験)

サッカリン添加餌に対する嗜好性は、WT マウスでは 0.03~0.3%の範囲では有意に上昇していた。しかし、低濃度(0.01%)では忌避性を示した他、高濃度(1%, 3%)では有意差は付かなかったものの嗜好率の低下が見られた。2 瓶選択試験などの行動試験においてサッカリン溶液は、低濃度では甘味を呈する一方で、高濃度では苦味を呈するようになる[137]。このことから、0.03%~0.3%では甘味を知覚し嗜好していたが、高濃度になると苦味も知覚したことにより忌避を示したと考えられる。サッカリン重量パーセントをモル濃度に換算すると 0.03%~0.3%は 1.24 mM~12.44 mM となり、先行研究の 2 瓶選択試験で有意な嗜好性を示す範囲と一致する。また、1%はモル濃度 41.46 mM に換算され、2 瓶選択試験でも忌避が生じる濃度である。本実験ではマウスのサッカリンの苦味に対する閾値の違いによってばらつきが大きくなり有意差は付かなかったが、忌避した知見と一致する。しかし、0.01%サッカリン添加餌において忌避が生じていたことは、溶液を用いた先行研究において報告されておらず、原因は不明である。低濃度特異的に異味等が生じるとは考えにくく、サッカリンナトリウムという化学物質による生理効果等が影響した可能性も考えられる。

KO マウスを用いた 2 餌提示実験を行った結果、全ての濃度において Preference ratio が 50%前後となり、WT マウスで見られていた嗜好性が全て消失していた。サッカリンによる甘味や苦味を受容できないため、ランダムな摂食行動を行ったと考えられる。WT マウスと KO マウスの嗜好性を直接比較すると、0.03%及び 0.1%において有意に嗜好率が変化していることが明らかに

なった。以上の結果は、サッカリンによる甘味刺激によって食物選択の変化が生じていることが強く示唆された。

続いて、デナトニウム添加餌に対する検討では、WT マウスでは 0.03%では嗜好性に変化がなかったが、0.1%以上では明らかな忌避性を示していた。デナトニウム重量パーセントをモル濃度に換算すると 0.03%は 0.67 mM にあたり、2 瓶選択試験では忌避が生じることが報告されている。しかし、本実験における摂食実験では 0.1%以上(約 2.24 mM)から忌避が生じていた。一方で、KO マウスを用いた実験では甘味同様に忌避性が消失することを予想して実験を行ったが、WT マウス同様に 0.1%以上で明確な忌避性を示した。この結果は、1 餌提示実験同様に KO マウスも苦味を何らかの形で感知していることが予想された。しかし、WT マウスと KO マウスを直接比較すると、WT マウスの方が有意に強い忌避性を示し、苦味を受容することによって忌避性が強くなったことが考えられる。

以上の嗜好性試験(2 餌提示実験)から、甘味刺激に対しては味覚刺激依存的に摂食行動が変化し食物選択に影響することを示した。一方、苦味刺激に対しては口腔における知覚の有無に関わらず摂食行動が変化するものの、味覚受容機構の消失により忌避性の程度が緩和されることを示した。以上の結果から、味覚刺激は摂食行動に対して大きな影響を与えうることを明らかにした。

4.3. 溶液による行動試験との知見の違い

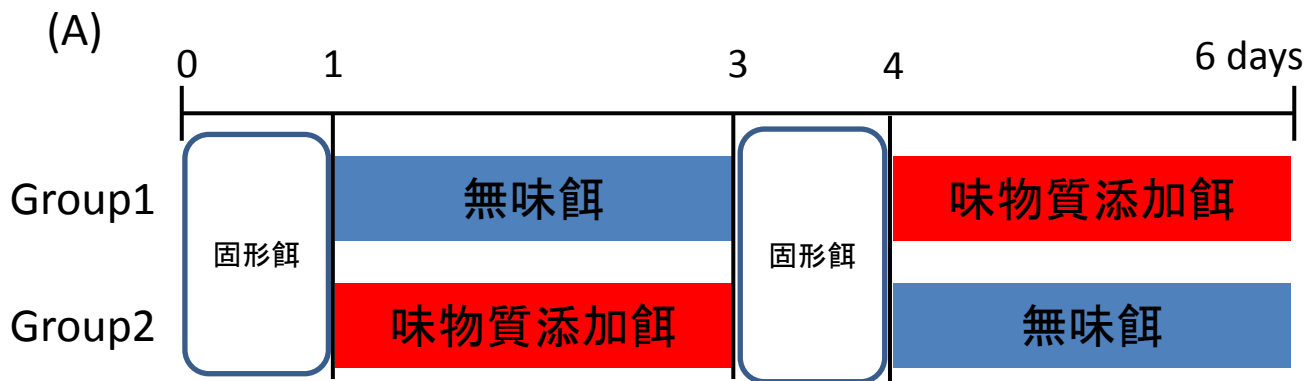
溶液による 2 瓶選択試験の知見と、本実験の粉末餌による 2 餌提示実験で得られた知見の間において違いが生じた原因について考察を行う。溶液と粉末餌の提示方法の違いは、カロリーの有無による違い以外にも、味覚刺激を受容するまでのプロセスも異なる可能性が考えられる。溶液を用いた実験は直接味溶液による刺激であるが、粉末餌に味物質を混合した本実験では、口腔内の唾液に溶けることで初めて味物質による刺激が生じる。均等な濃度になるよう混餌を行っているが、状況によっては均質な味刺激になっていない可能性が考えられる。今後、味覚受容のプロセスまで考慮したより精度の高い実験を行うには、味物質を液体として提示することが可能な液体餌を利用することが有効ではないかと考える。

4.4. 口腔以外の苦味受容機構について

口腔内の苦味受容細胞が消失したことにより苦味刺激を受容できない KO マウスでも、苦味物質添加餌に対して忌避を示したことは矛盾した結果とも考えられる。今回の結果から、口腔内以外に苦味を感知する機構が存在する可能性が考えられる。生体では様々な組織において味覚受容体が発現することが数多く報告されており[138]、特に消化管は直接食品と接する組織であるため苦味受容機構が存在する可能性が高いと考える。先行研究においても苦味物質を胃内投与すると、投与直後にグレリン放出が一時的に促進し摂食量が上昇した後に、長時間になると摂食量が落ちるといふ報告が存在する[61]。これらの作用は味覚関連分子の *Gagust* 欠損マウスを用いることで消失することから、消化管における味覚受容体の作用であると考えられている。さらに培養細胞を用いた実験も複数報告されており、マウス腸内分泌細胞(enteroendocrine cell)由来の STC-1 cell に苦味受容体 T2Rs アゴニスト(苦味物質)による刺激を与えると、コレシストキニン(CCK)の放出が亢進し[139]、その作用は Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2)により増強される[140]。また、結腸由来の Caco-2 細胞でも苦味刺激により CCK やガストリンの分泌が亢進することで ATP-binding cassette B1(ABCB1)の発現を誘導し、苦味物質の排泄を促進する[141]。摂食の調節を行う脳においても、苦味受容体のリガンド(苦味物質)を胃内投与すると後脳孤束核での CCK 受容体やペプチド YY(PYY)受容体が求心性迷走神経を介して活性化される[142]。CCK や PYY はどちらも摂食抑制に関連するインクレチンであることから、苦味物質による刺激が、摂食抑制インクレチンの分泌量を亢進するだけでなく、感受性も上昇することにより効果的に摂食量を低下させていると考えられる。以上の先行研究より消化管で発現する苦味受容体は摂食抑制に関わる機構ではないかと考えられる。本研究においては、WT マウスでは口腔の苦味受容機構及び消化管の苦味受容機構の両方で受容した結果、強い摂食抑制が生じていた一方、KO マウスでは口腔の苦味受容機構は消失した一方で、消化管の苦味受容機構のみで受容したため WT マウスに比べ弱い摂食抑制が生じていたと考えられる。この仮説を支持するには KO マウスにおいて消化管の苦味受容機構が存在しているかどうかの問題となる。STC-1 cell には味覚受容体だけでなく、*Gagust* や他の G タンパク質、*Plcb2* 等の味覚関連分子も発現しており、味蕾における味覚受容機構と似た受容機構を持っていると考えられる。しかし、腸管において苦味受容

体を発現する enteroendocrine cell への分化には、味細胞の分化に関わる Skn1 の制御とは異なり、Atonal homolog 1 (Atoh1) や Neurogenin 3 (Neurog3) などが関与することが報告されている [143] ことから、KO マウスの enteroendocrine cell への分化は正常であると考えられる。enteroendocrine cell が存在していれば消化管における苦味受容機構が存在し機能している可能性が高い。今後、KO マウスの消化管における味覚関連分子の発現について詳しく調べる必要があると考える。甘味物質として使用したサッカリンも高濃度で添加すると苦味が生じるが [144]、2 餌提示実験において KO マウスでも 3% サッカリン添加餌において忌避は見られなかった。これは、サッカリンの苦味の強さがデナトニウムや塩酸キニーネと比較して弱いことが考えられる。

本節では、味覚刺激が摂食行動に対して与える影響について、摂食量及び嗜好性による検討を行った。その結果、嗜好味による味覚刺激では食物選択には大きく影響するが、摂食量には影響しないことを明らかにし、動物は味よりもエネルギーを確保すること(カロリー補償性)を優先することが示唆された。一方、忌避味に対しては高濃度で提示すると食物選択に影響を与えるだけでなく、摂食量も低下することを明らかにし、カロリー補償性以上に摂食行動の停止を優先することが考えられた。以上の知見から、動物は糖やアミノ酸などの摂食によって利益となる栄養素を嗜好味として知覚するために味覚感覚を利用している一方、体内において不利益となる食物内の腐敗(酸味)や毒物(苦味)を忌避味として検出するためにも利用していると考えられる。さらに、忌避すべき物質に対しては口腔と消化管という 2 段階の受容機構を備えることで、より精度の高い食物選択を行っている可能性が考えられる。



(B)



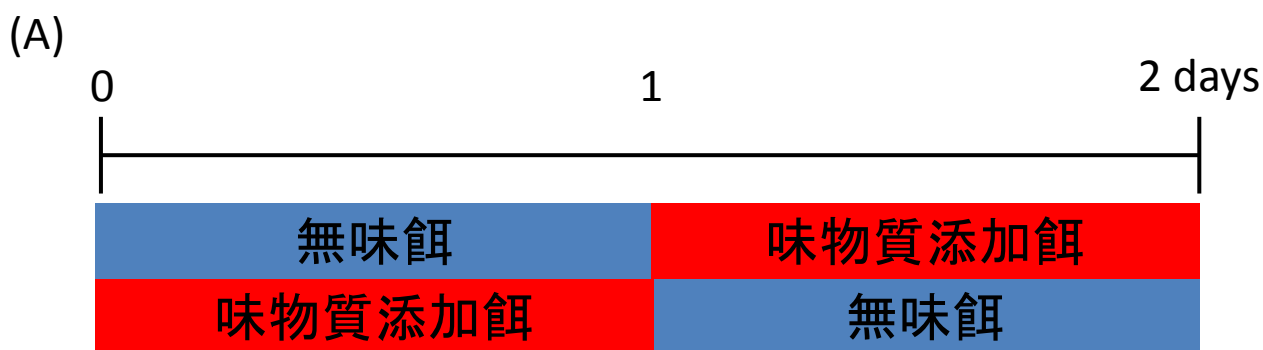
図2-1. 摂食量試験(1餌提示実験)の方法

(A)飼育スケジュール

無味餌と味物質添加餌を48時間ずつ提示を行い、摂食量を測定した。各餌提示前24時間は固形餌の提示を行い、栄養状態を揃えた。提示の順番による影響を排除するため、2群(n = 2~3)に分けて実験を行った。

(B)実験に用いたガラス製給餌器

ケージの底に置くガラス製給餌器を用いて実験を行い、飼育中に混入した床敷や糞などの異物は取り除いた後測定を行った。



(B)



(C)



図2-2. 嗜好性試験(2餌提示実験)の方法

(A)飼育スケジュール

無味餌と味物質添加餌を同時に48時間提示したときの各摂食量を測定し嗜好率を算出した($n = 5$)。匂いや場所の影響を除外するため、24時間後に給餌器を取り替え、場所を交換した。異なる味物質添加餌ごとのインターバルにはAIN-93Gを提示し、嗜好性が消失するまでの期間を設けて飼育を行った。

(B)実験に用いたガラス製給餌器

壁掛け式のガラス製給餌器を利用した。

(C)実験の様子

ケージの両端に給餌器を設置し、位置が変わらないよう固定した。

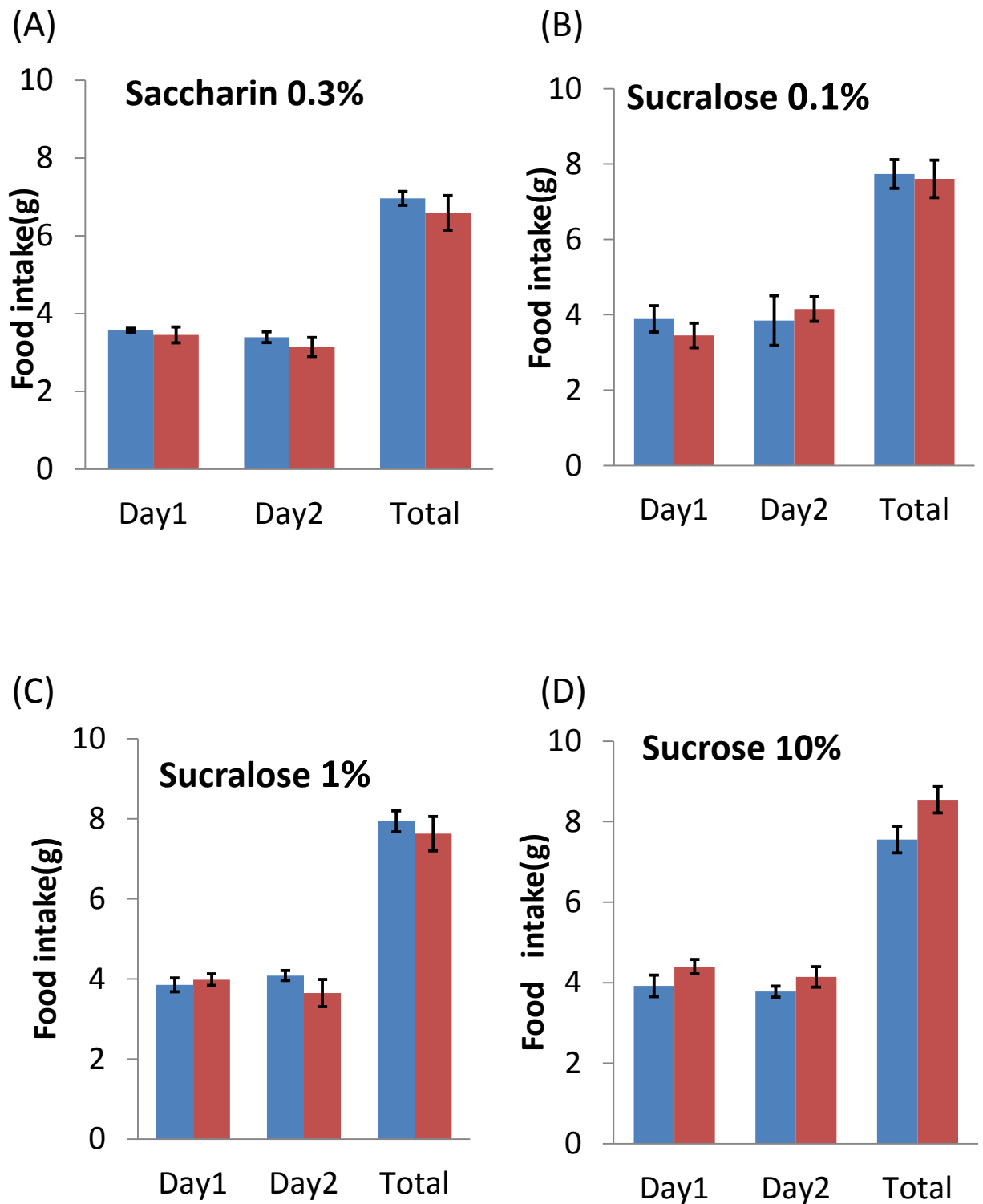


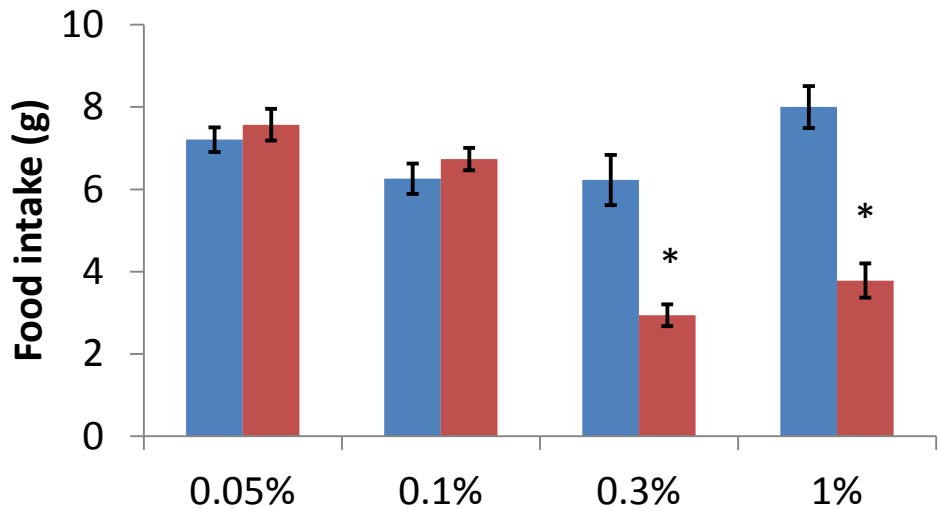
図2-3. 甘味物質添加餌による摂食量の変化

(A)0.3%サッカリン、(B)0.1%スクラロース、(C)1%スクラロース、(D)10%スクラロース

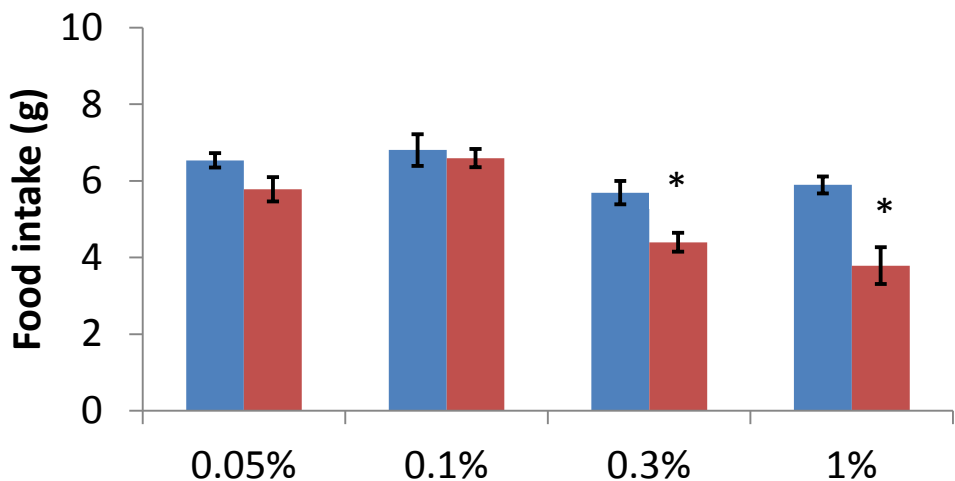
人工甘味料・高濃度人工甘味料・糖質など、様々な甘味物質を添加してWTマウスに提示を行ったが、摂食量に変化は見られなかった。WTマウスで変化が見られなかったことから、KOマウスを用いた実験は行わなかった。青は無味餌、赤は味物質添加餌を示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

(A) WTマウス



(B) KOマウス



(C)

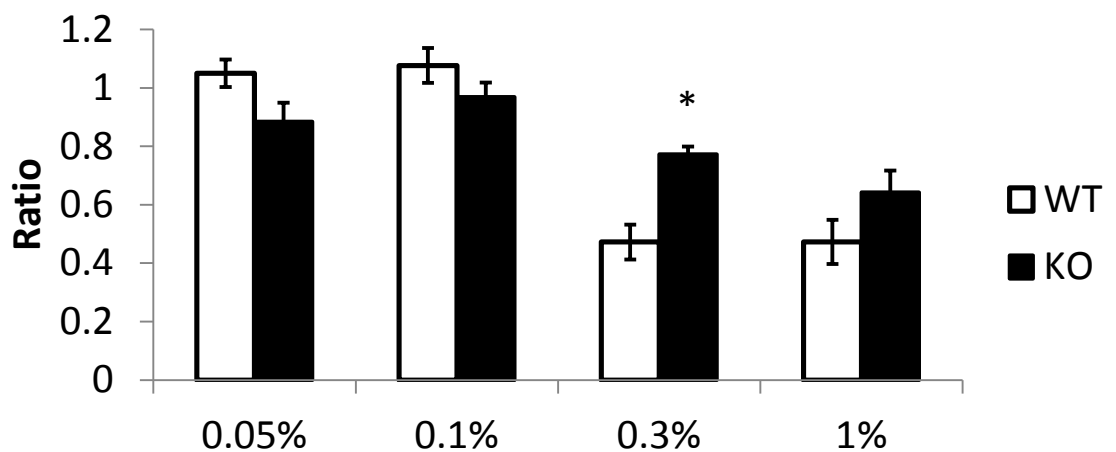


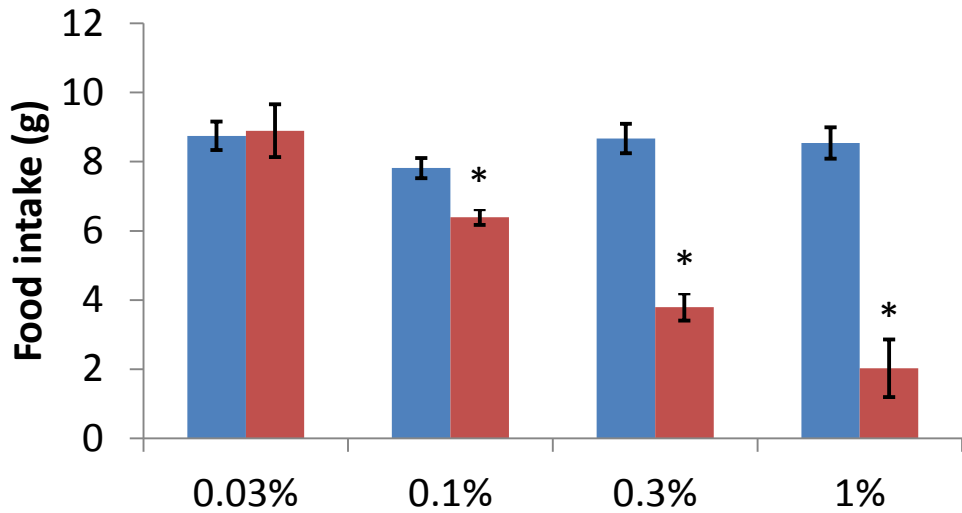
図2-4. 苦味物質(デナトニウム)添加餌による摂食量の変化

(A)WTマウス、(B)KOマウス、(C)遺伝子型による摂食量低下率

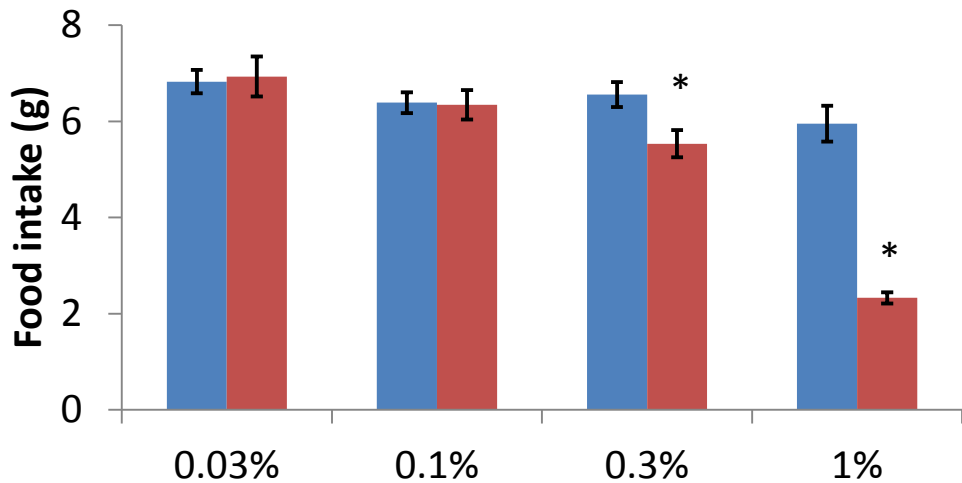
デナトニウム添加餌を提示したところ、WTマウスとKOマウスで0.3%以上のデナトニウム添加餌で摂食量が低下した。WTの方が摂食量低下率が大きくより強い忌避を示した。青は無味餌、赤は味物質添加餌、白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

(A) WTマウス



(B) KOマウス



(C)

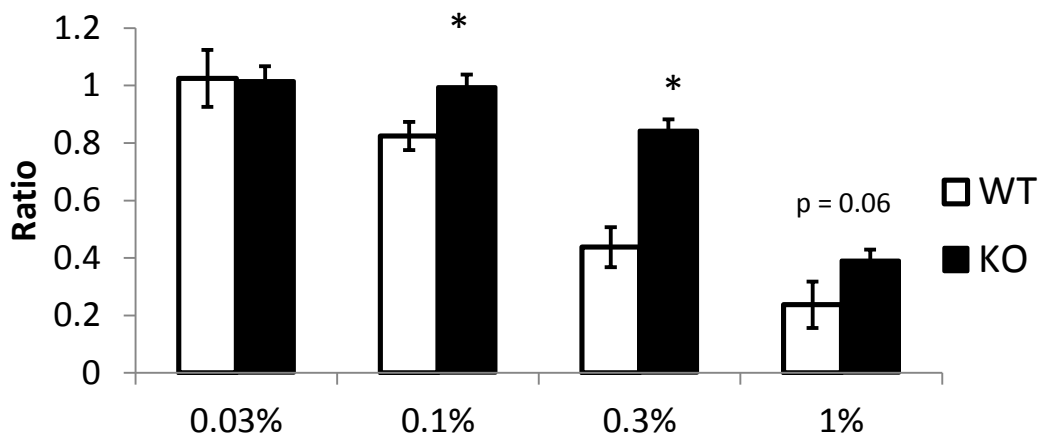


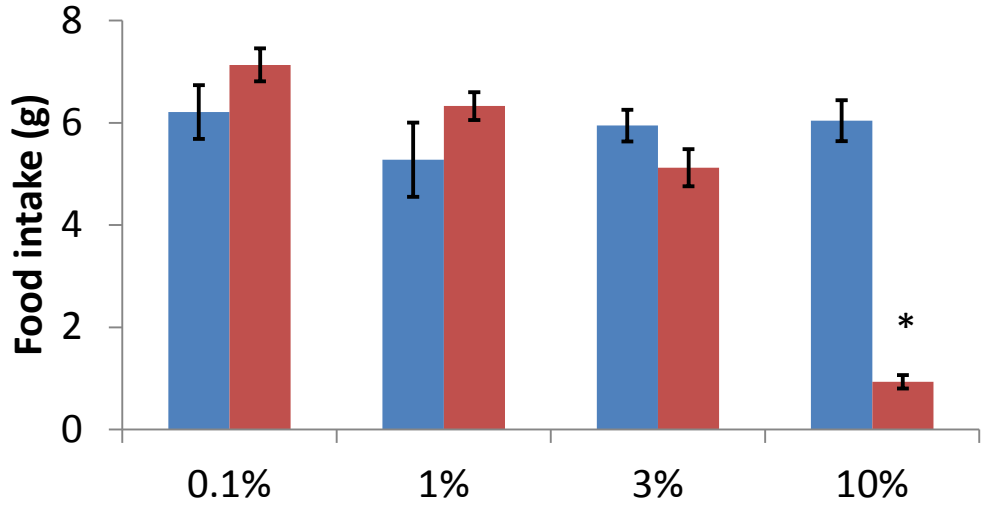
図2-5. 苦味物質(キニーネ)添加餌による摂食量の変化

(A)WTマウス、(B)KOマウス、(C)遺伝子型による摂食量低下率

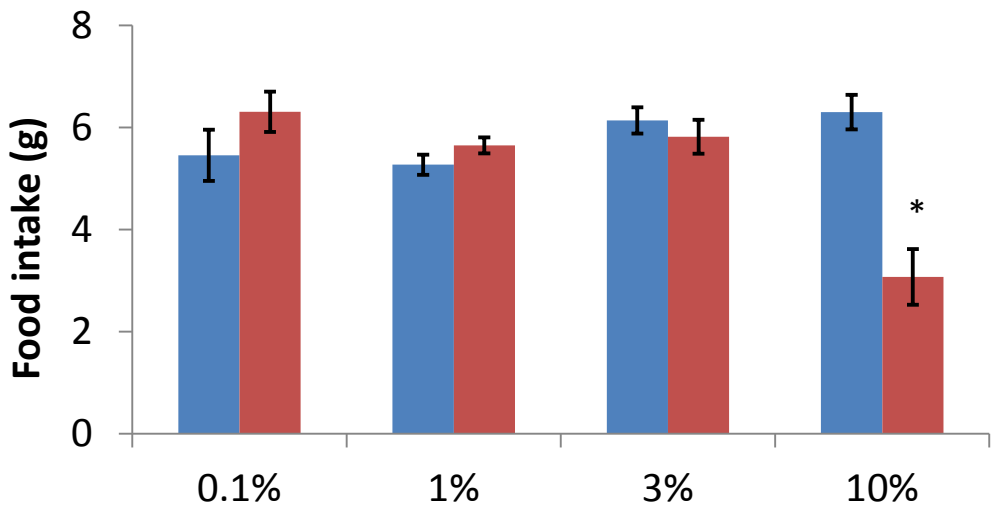
キニーネ添加餌を提示したところ、WTマウスは0.1%から摂食量が低下した一方、KOマウスは0.3%から摂食量の低下が生じた。WTの方が摂食量低下率が大きく、より強い忌避を示した。青は無味餌、赤は味物質添加餌、白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

(A) WTマウス



(B) KOマウス



(C)

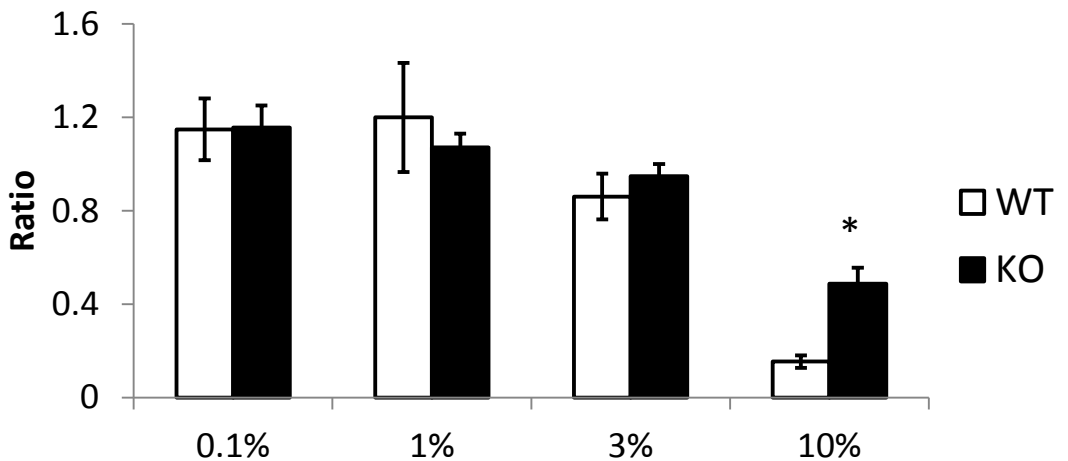


図2-6. 酸味物質(クエン酸)添加餌による摂食量の変化

(A)WTマウス、(B)KOマウス、(C)遺伝子型による摂食量低下率

クエン酸添加餌を提示したところ、WTマウスとKOマウスで10%クエン酸添加餌で摂食量が低下した。WTの方が摂食量低下率が大きく、より強い忌避を示した。青は無味餌、赤は味物質添加餌、白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

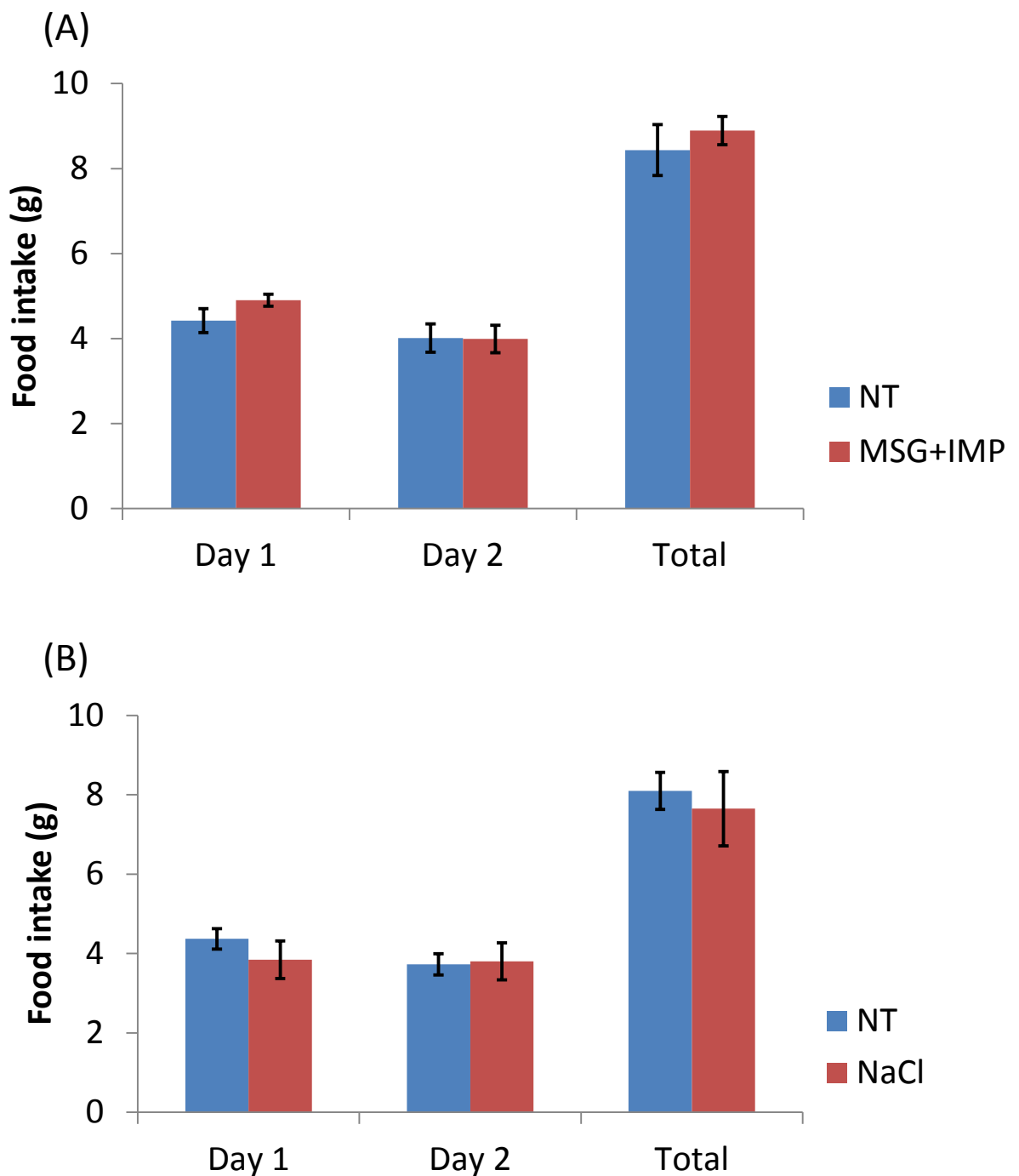


図2-7. その他の味物質添加餌による摂食量の変化

(A)旨味物質(1.7% MSG+0.2% IMP)添加餌、(B)塩味物質(0.6% NaCl)添加餌

旨味及び塩味を添加した餌を提示しても摂食量に変化は見られなかった。これらの濃度は溶液の2餌選択試験で最も嗜好性が高い濃度を採用した。

青は無味餌、赤は各味物質添加餌を示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

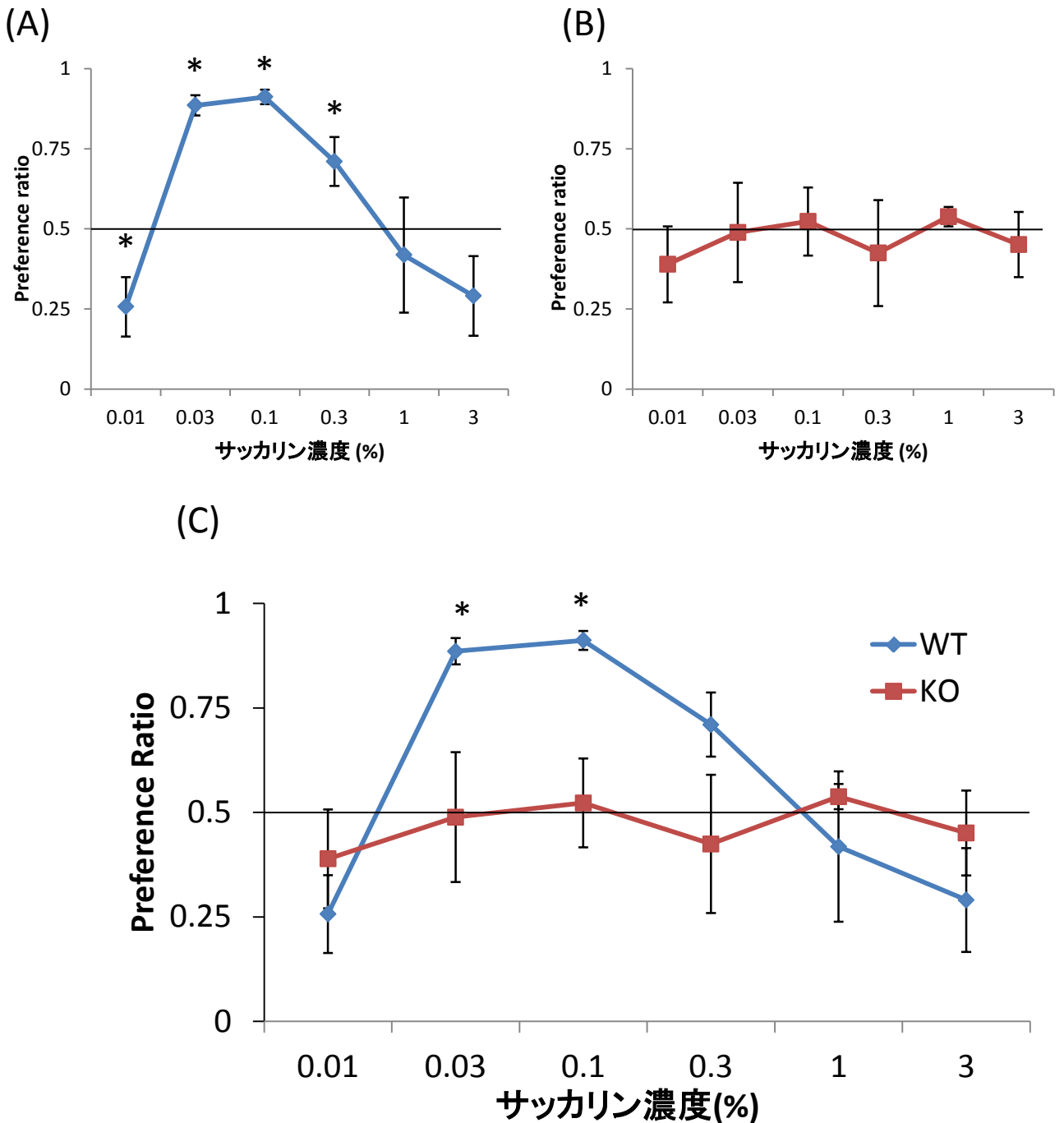


図2-8. 甘味物質添加餌による食物選択の変化

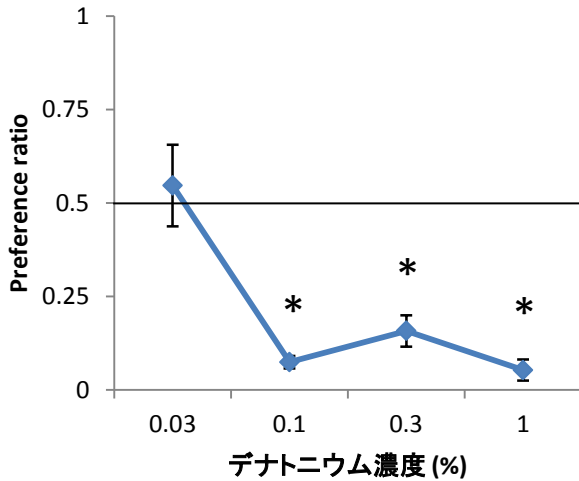
(A)WTマウス、(B)KOマウス、(C)WTマウスとKOマウスの比較

無味餌に対する甘味物質添加餌の嗜好率(Preference ratio)を算出した結果、WTマウスでは0.01%では有意な忌避し、0.03~0.3%の範囲で有意な嗜好性を示した。一方、KOマウスはこれらの嗜好性の変化が消失した。WTマウスとKOマウスのPreference ratioを比較すると、WTマウスは0.03~0.1%の範囲で有意に高値を示したことから、味覚刺激によって嗜好したことが示唆された。

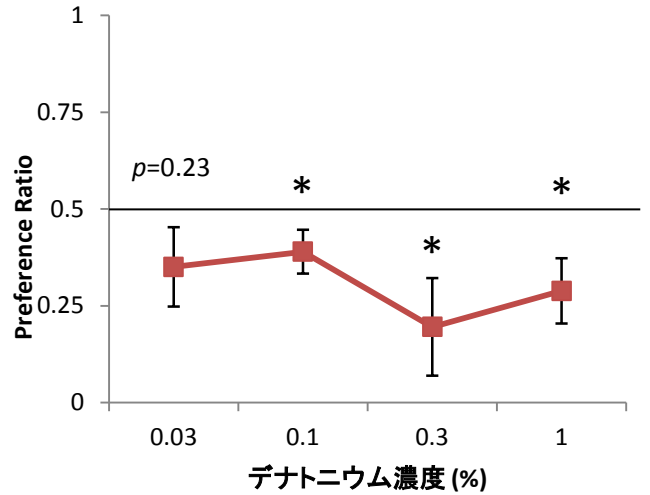
青はWTマウス、赤はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、*は $p < 0.05$ を示す。

(A)



(B)



(C)

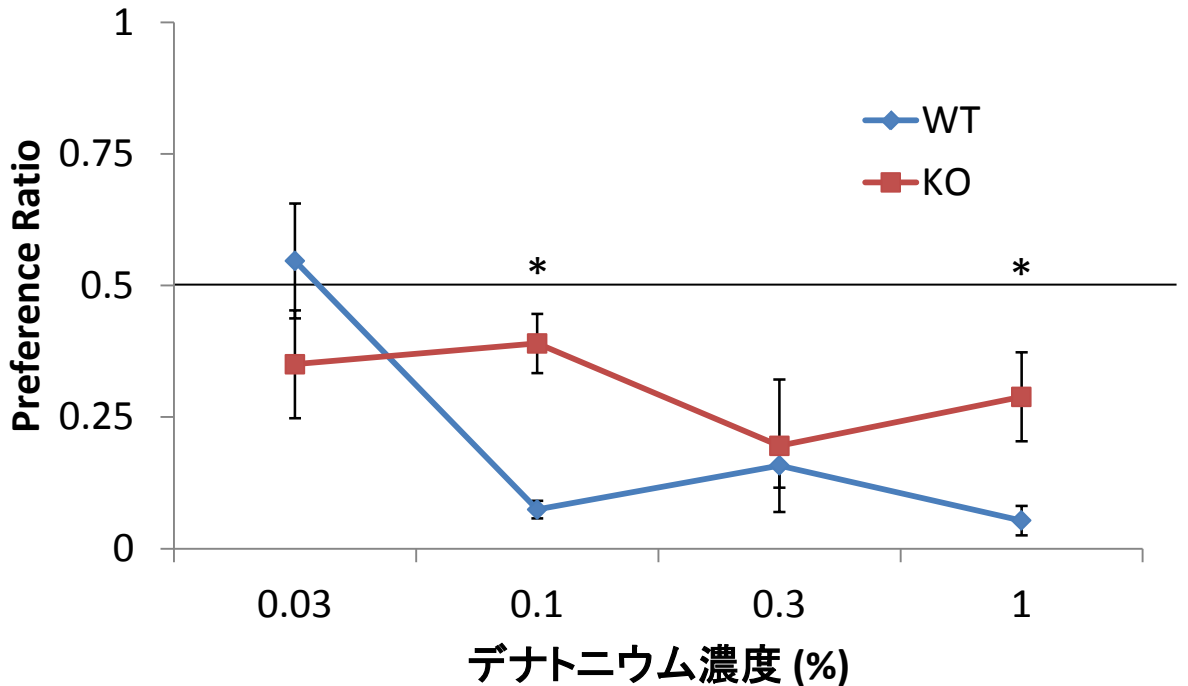


図2-9. 苦味物質添加餌による食物選択の変化

(A)WTマウス、(B)KOマウス、(C)WTマウスとKOマウスの比較

無味餌に対する苦味物質添加餌の嗜好率(Preference ratio)を算出した結果、0.03%ではWTマウスとKOマウスで有意な忌避が見られなかった一方で、0.1%以上の濃度では両マウスが有意な忌避を示した。WTマウスとKOマウスのPreference ratioを比較すると、WTマウスの方が0.1%及び1%苦味物質添加餌に対して有意に低値を示し、WTマウスの方が強い忌避を示す一方、KOマウスは忌避が緩和されていることが示唆された。

青はWTマウス、赤はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、*は $p < 0.05$ を示す。

第2節 甘味刺激とエネルギー代謝の関連性の解析

1. 目的

動物が自然界において受容する甘味刺激は食物中の糖質由来であり、甘味刺激がエネルギー源のシグナルと考えられている。そのため動物は甘味を嗜好すると言われており[145]、第2章第1節での、甘味刺激が食物選択に影響を与える、という結果もこれを支持している。また、甘味受容体は口腔のみならず、腸管でも発現する[50]。腸管に発現する受容体により、甘味物質が受容されるとホルモン放出の誘導[54]や糖取り込みの活性化[51]など様々な変化が生じると報告されている。以上のように、甘味とエネルギー代謝との関係は深いと考えられている。

一方で、人工甘味料は甘味を付与するものの体内でエネルギー源として利用されないことから、スクロースに代表される糖類の代替として様々な食品に広く添加されている。しかし近年、人工甘味料を摂取させて飼育を行うと糖類(主にスクロース)を摂取させた場合に比べ著しい体重増加を示すという報告[46,146,147,148,149]がなされるなど、人工甘味料が生体のエネルギー恒常性に影響を与えうる可能性について議論が数多くなされているが、その結論は出ていない。また、これまでに人工甘味料の摂取が生体各組織に与える影響についても詳細な解析はなされていない。

本研究は口腔における甘味刺激に着目し、甘味刺激がエネルギー代謝に影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。味覚研究で最も利用される人工甘味料(サッカリン)による甘味刺激を与えた時に生じる末梢組織の遺伝子発現プロファイルの変化について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に捉えた。さらに得られた変化が味覚刺激由来であることを示すと共に、その調節経路を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と手法

2.1. 被験動物

7 週齢 C57BL/6J 系(WT)マウスを日本クレア株式会社から購入した。Skn1 遺伝子欠損 (KO) マウスは第2章第1節と同じ系統を用いた。それぞれ雄性マウスを用いた。

2.2. 動物飼育

第 1 章と同じ環境下の動物室で飼育を行った。プラスチックケージで単独飼育を行い、飼料としてラボ MR ブリーダー固形飼料を与えた。1 週間以上馴化させた後に 2.3.に示した各実験に用いた。

2.2.1. 解剖

解剖ではソムノペンチル(Kyoritsu Seiyaku Corp., Tokyo, Japan)をマウスに腹腔内投与(10 μ l/g BW)し、マウスを完全に眠らせた。開腹後心臓を露出させた後に 26 G \times 1/2 注射針及び 1 ml シリンジを用いて心臓採血して安楽死させた後、開腹して肝臓を摘出した。摘出した臓器は氷冷した生理食塩水で洗浄後に、液体窒素で凍結させ -80°C で保管した。肝臓は第二葉より 5 mm 角程度のブロックを切り取り、1 ml の Ambion® RNAlater に浸漬し、第 1 章と同様に処理を行った。採血後 1 時間室温静置し 830 \times g で 10 分遠心後、上清を回収することで血清を調製した。

2.2.2. 肝枝切除手術(HVx)

7 週齢前後の WT マウスに対して 6 倍希釈したソムノペンチルをマウスに腹腔内投与(60 μ l/kg BW)し、マウスを完全に眠らせた。その後開腹し実体顕微鏡下で肝臓下に存在する迷走神経の肝枝を確認し、血管を傷つけないように肝枝を切除した。切断後、生理食塩水を腹腔内に充填し、AUTOCLIP(Becton Dickinson and Company, New Jersey, US)により速やかに開腹部を留め、使い捨てカイロまたは動物用ヒーターマット(Natsume Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan)の上で覚醒を待ち、手術後 1 週間を回復期間とした後、実験に利用した。

2.3. 解剖当日の実験スケジュール

馴化後、群ごとの体重が近くなるように平均及び分散を考慮してマウスを 2 群(n = 5~6)に分けた。さらに、以下に示す各実験スケジュールに従って処理を行い、その後 16:00 より解剖を行った。2.3.4 のみ KO マウスを使用し、他の実験は全て WT マウスを用いた。

2.3.1. サッカリン溶液または水の飲水実験(飲水実験)

解剖前日 16:00 からケージから餌及び水を抜く(絶食・絶水)処理を行った後に、解剖当日 10:00 から水(D-W 群)または 10 mM サッカリンナトリウム(Kanto Chemical Co., Inc.)水溶液(D-Sac 群)を 2 ml 飲水させた(図 2-10 A)。

2.3.2. サッカリン溶液または水の胃内投与実験(胃内投与実験)

解剖前日 16:00 から絶食・絶水処理を行った後に、解剖当日 10:00 と 12:00 に胃ゾンデにて水(GI-W 群)または 10 mM サッカリンナトリウム水溶液(GI-Sac 群)を 500 μ l (約 25 μ l/g BW)ずつ 2 回強制投与し、合計 1 ml を投与した(図 2-10 B)。

2.3.3. サッカリン溶液の投与部位の違いによる遺伝子発現変動(WT 実験)

解剖前日 16:00 から絶食・絶水処理を行った後に、解剖当日 10:00 より 10 mM サッカリンを 1 ml 飲水させた群(WT-D-Sac 群)と、解剖当日 10:00 と 12:00 に胃ゾンデを用いて 10 mM サッカリンナトリウム水溶液を 500 μ l (約 25 μ l/g BW)強制投与し、合計 1 ml を投与した群(WT-GI-Sac 群)を作製した(図 2-11 A)。なお、胃内投与時にマウスに与える保定やゾンデ挿入に対するストレスの影響を除外するために、D-Sac 群マウスに対しても同時間に保定及びゾンデ挿入を行った。

2.3.4. KO マウスを用いたサッカリン溶液の投与部位による遺伝子発現変動(KO 実験)

条件検討の結果(Data not shown)、18 時間絶水では飲水が 1 ml に満たなかったため絶水時間を延長した。解剖 2 日前 16:00 から絶水処理のみを行い、解剖前日 16:00 にさらに絶食処理を行った。2.3.3.と同様に、10 mM サッカリン水溶液を 1 ml 飲水させた群(KO-D-Sac 群)と、胃内投与した群(KO-GI-Sac 群)を作製した(図 2-11 B)。

2.3.5. HVx マウスを用いたサッカリン溶液の投与部位による遺伝子発現変動(HVx 実験)

2.2.2.で HVx を施した WT マウスに対して、2.3.3.と同様の処理を行い、10 mM サッカリン水溶液を 1 ml 飲水させた群(HVx-D-Sac 群)と胃内投与した群(HVx-GI-Sac 群)を作製した(図 2-11 A)。

2.4. 血中生化学データの測定

2.4.1. インスリン・レプチン濃度測定

血清中インスリンはインスリン測定キット(Morinaga Institute of Biologinal Science Inc.)を用いて第 1 章と同様に行った。血清中レプチンは、レプチン測定キット(Morinaga Institute of Biologinal Science Inc.)を用いて測定した。それぞれの吸光度測定は Flexstation 3 を用いて行なった。

2.4.2. 血液生化学データの測定

その他の血清成分については長浜ライフサイエンスラボラトリーに委託して測定した。測定項目はアスパラギン酸アミノ基転移酵素(Aspartate aminotransferase; AST)、アラニンアミノ基転移酵素(Alanine aminotransferase; ALT)、総コレステロール(T-CHO)、遊離型コレステロール(F-CHO)、エステル型コレステロール(E-CHO)、血清遊離脂肪酸(NEFA)、LDL コレステロール(LDL-C)、HDL コレステロール(HDL-C)、総脂質(TL)、血清中グルコース(Glucose; GLU)である。

2.5. DNA マイクロアレイ及び DNA マイクロアレイデータ解析

解剖により摘出したマウス肝臓サンプルを用いて、第 1 章と同様に行った。マイクロアレイチップは Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix Inc.)を利用した。

3. 結果

3.1. サッカリン溶液の飲水による遺伝子発現変動(飲水実験)

3.1.1. 動物実験

サッカリン溶液または水を飲水させた時に生じる遺伝子発現変動を明らかにすることを目的として、10 mM サッカリン溶液または滅菌水 2 ml をマウスに 6 時間飲水させた。この 6 時間の間に、D-Sac 群は 1.74 ± 0.01 ml を飲水したが、D-W 群は 0.88 ± 0.08 ml しか飲水しなかった。そ

の後、解剖を行い血液の採取及び肝臓の摘出を行い、DNA マイクロアレイ解析に供した。

3.1.2. 血液生化学データ解析

サッカリン摂取による血液成分への影響を検討するために、肝機能マーカーや脂質、糖質関連項目について血液生化学データ解析を行った。その結果、各項目において D-W 群と D-Sac 群で血液成分の変化は見られなかった(表 2-1)。人工甘味料の摂取によりインスリンやレプチンなどのホルモンにも影響しないことが報告[150]されているが、本研究においても大きな変化は見られなかった(表 2-1)。

3.1.3. DNA マイクロアレイ解析

qFARMS 法を用いて正規化した肝臓 DNA マイクロアレイデータを用いてサンプル間の階層的クラスタリング解析を行ったところ、SacR-4 以外の D-Sac 群においてクラスターを形成していた(図 2-12 A)。この結果より、サッカリンの飲水により遺伝子発現プロファイルが大きく変動することが示された。

さらに、正規化法として採用した qFARMS 法との相性がよい Rank products 法[92] を用いた二群間比較を行った。FDR < 0.05 を満たす発現変動プローブセットを抽出し、D-W 群に対して D-Sac 群で発現上昇した 1020 プローブセットと、発現低下した 1304 プローブセットを抽出した。得られた発現変動プローブセットに対してウェブツール DAVID を用いた機能解析を行い、FDR 補正した EASE Score < 0.05 を満たす有意に濃縮された GO term を抽出し、最下層を中心に示した(表 2-2)。その結果、発現上昇プローブセット群からは、糖代謝の変化を示す“monosaccharide biosynthetic process”や脂質代謝を示す“fatty acid metabolic process”といった GO term が抽出された。発現低下プローブセット群からも脂質代謝を示す“cellular lipid metabolic process”, “cholesterol biosynthetic process”や、アミノ酸代謝を示す“monocarboxylic acid metabolic process”, “cellular amino acid derivative metabolic process”の GO term が抽出された。これらの GO term から糖代謝やアミノ酸代謝、脂質代謝など栄養素代謝関連遺伝子が大きく変動していることが示唆された。特に脂質代謝に関しては、脂肪酸分解が亢進する一方、コレステロール合

成が抑制されていることが示唆された。その他に、補酵素代謝に関連する“coenzyme metabolic process”や刺激応答に関係する“response to chemical stimulus”が抽出された。

脂肪酸分解を示す GO term “fatty acid metabolic process”が抽出されたことを始め、様々な脂質代謝関連 GO term 抽出されたことから、脂肪酸合成及び分解、コレステロール合成経路に着目し、発現変動遺伝子を各脂質代謝経路にマッピングした(図 2-13 赤/青矢印, 表 2-3)。脂肪酸合成経路は、律速酵素アセチル CoA カルボキシラーゼ α (Acetyl-CoA carboxylase alpha; Acaca)の発現変動は見られなかったが、脂肪酸合成酵素(Fatty acid synthase; Fasn)や、脂肪酸生合成を制御する転写因子 Sterol regulatory element binding transcription factor 1(Srebf1)も発現低下傾向($p = 0.052$)であったことから、脂肪酸合成が抑制されていることが示唆された。脂肪酸伸長酵素(Elovl)に関しても発現上昇遺伝子及び発現低下遺伝子として抽出された。コレステロール合成経路に関しても、コレステロール生合成の律速酵素ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ(Hmgcr)の発現変動は見られなかったが、他のコレステロール合成関連遺伝子の発現低下に加えて胆汁酸合成律速酵素 Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1(Cyp7a1)が発現低下していたことから、コレステロール合成及び異化経路も抑制されたことが示唆された。脂肪酸 β 酸化は律速酵素カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ Cpt1a の発現変動は見られなかったが、その他の多くの脂肪酸 β 酸化関連遺伝子が発現上昇していた。また、脂肪酸 β 酸化を亢進させる転写因子 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara)は発現上昇しており、脂肪酸 β 酸化が亢進していた可能性が強く示唆された。以上の結果より、GO term 解析で得られていたように脂質代謝が大きく変動していることが明らかになっただけでなく、脂質合成経路の抑制と脂質分解の亢進という知見は絶食時の遺伝子発現パターンに類似していた。絶食状態の 2 群を比較しても、絶食時に見られる遺伝子発現パターンが見られたことは、より過酷な絶食状態になっていることを示すと共に、サッカリンの摂取がエネルギー代謝に影響している可能性が示された。

3.2. サッカリン溶液の胃内投与による遺伝子発現変動(胃内投与実験)

3.2.1. 動物実験

飲水実験(3.1.)で得られた遺伝子発現変動が、サッカリンナトリウム摂取による生理作用である可能性について検討した。サッカリン溶液(GI-Sac 群)または滅菌水(GI-W 群)を 500 μ l ずつ 2 回の胃内投与を行った後、解剖を行い血液の採取及び肝臓の摘出を行い、DNA マイクロアレイ解析に供した。

3.2.2. 血液生化学データ解析

飲水実験同様にサッカリン摂取による血中成分への影響を検討するために、血液生化学データ解析を行った。その結果、各項目において GI-W 群と GI-Sac 群の間には血中成分の変化がないことを確認した(表 2-1)。

3.2.3. DNA マイクロアレイ解析

qFARMS 法により正規化した肝臓 DNA マイクロアレイデータを用いてサンプル間の階層的クラスタリング解析を行ったところ、飲水実験で見られたようなクラスターは形成されず(図 2-12 B)、胃内投与では遺伝子発現プロファイルが大きく変動しなかったことが示唆された。

Rank products 法による二群間比較を行い、FDR < 0.05 を満たす GI-W 群に対して GI-Sac 群で発現変動したプローブセットを抽出した。発現上昇した 330 プローブセットと、発現低下した 696 プローブセットが抽出された。変動プローブセットについて DAVID を用いた機能解析を行い、FDR 補正した EASE Score < 0.05 を満たす有意に濃縮された GO term を抽出した(表 2-2)。その結果、栄養素代謝に関連する GO term として、発現上昇プローブセット群からは、アミノ酸代謝の変化を示す“cellular amino acid metabolic process”が抽出された一方で、発現低下したプローブセット群からは脂質代謝を示す“lipid metabolic process”が抽出された。これらの GO term による解析から脂質代謝は胃内投与によっても変動する可能性が示唆された。その他、炎症に関する GO term “acute inflammatory response”が抽出された。

飲水実験で得られたような脂質代謝の変化が胃内投与実験でも変化するか検討するために、発現変動遺伝子を脂質代謝経路にマッピングした(図 2-13 白抜き矢印, 表 2-3)。その結果、脂肪酸合成に関しては、飲水実験同様に Acaca の発現変動は見られなかったが、飲水時に発現低下して

いた *Fasn* は発現変動せず *Srebf1* は発現上昇していた。*Elovl5* 及び *Elovl6* は飲水時と同様の発現変動が見られた。コレステロール合成経路に関しては発現変動した遺伝子は減ったものの、胃内投与時に発現変動していた遺伝子の低下と同じ遺伝子発現変動が見られ、飲水実験と同様に抑制されていることが示唆された。脂肪酸 β 酸化については、*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1*(*Acs11*)は発現上昇していた一方で、*Cpt1a* や *Acox1* は発現低下しており、飲水実験で見られた脂肪酸 β 酸化の亢進は示されなかった。以上の結果より飲水実験と胃内投与実験では、同じサッカリン溶液摂取でも脂肪酸 β 酸化を始めとして遺伝子発現パターンが異なることが示された。

3.3. サッカリン溶液の投与部位による遺伝子発現変動(WT 実験)

3.3.1. 動物実験

飲水実験(3.1.)で見られた脂肪酸 β 酸化の亢進は、胃内投与実験(3.2.)では示されず、この違いは投与部位の違いによる可能性が考えられた。しかし、これらの実験では与えたサッカリン溶液量が異なること(飲水実験 約 2 ml、胃内投与実験 1 ml)、飲水実験と胃内投与実験では胃ゾンデによるストレスの有無など条件が異なるため直接比較ができなかった。そこで、サッカリン溶液摂取の影響が投与部位の違いによる影響であるかを明らかにするために、10 mM サッカリン溶液を等量(1 ml)飲水させた(WT-D-Sac)群、または、胃内投与した(WT-GI-Sac)群の 2 群を作製した。その後解剖を行い、肝臓を摘出し DNA マイクロアレイ解析に供した。

3.3.2. DNA マイクロアレイ解析

qFARMS 法により正規化したデータを用いてサンプル間の階層的クラスタリング解析を行ったところ、3.1.3 同様に WT-D-Sac 群においてクラスターを形成していた(図 2-14)。この結果は、サッカリン溶液を等量摂取させた時でも、飲水時特異的に遺伝子発現プロファイルが大きく変動することが示唆された。

Rank products 法を用いた二群間比較を行い、FDR < 0.05 を満たす WT-GI-Sac 群に対する WT-D-Sac 群の発現変動プローブセットを抽出した。その結果、発現上昇した 1282 プローブセッ

トと、発現低下した 678 プローブセットが抽出された。DAVID を用いた機能解析を行い、FDR 補正した EASE Score < 0.05 を満たす有意に濃縮された GO term を抽出した(表 2-4)。その結果、栄養素代謝関連 GO term として、発現上昇プローブセット群からは、“lipid biosynthetic process”、“glycerol ether metabolic process”、“cholesterol metabolic process”、“fatty acid metabolic process”、“acylglycerol metabolic process”が抽出され 3.1 における飲水実験群同様に、脂質代謝の変動が示された。その他、エネルギー代謝に間接的に関連する“coenzyme metabolic process”が抽出された。発現低下プローブセット群からは GO term が抽出されなかった。

飲水実験や胃内投与実験では脂質代謝関連 GO term が抽出されたことに加え、脂質代謝経路に関する遺伝子発現変動が得られた。本実験でも GO term “fatty acid metabolic process”が抽出され脂肪酸分解が大きく変動した可能性が示されたことから、脂質代謝経路に発現変動遺伝子をマッピングした(図 2-15 赤/青矢印, 表 2-5)。その結果、飲水実験や胃内投与実験とは異なり Elov13 の発現上昇は見られたが、脂肪酸合成関連遺伝子は発現変動していなかった。コレステロール合成関連遺伝子は、飲水実験及び胃内投与実験で多くの遺伝子が共通して発現低下していたが、本実験ではほとんどの遺伝子発現が見られなかった。脂肪酸β酸化に関しては飲水実験同様に多くの遺伝子で発現上昇が見られた他、Ppara に加えて Adiponectin receptor 2(Adipor2)や AMP-activated protein kinase alpha 2 catalytic subunit (Prkaa2)など脂肪酸β酸化を亢進する因子の発現上昇が得られ、脂肪酸β酸化の亢進が示唆された。脂肪酸β酸化の亢進や各律速酵素の発現変動が見られなかったことは飲水実験の知見と一致しており、サッカリン溶液の飲水時特異的に遺伝子発現が大きく変動したと考えられる。

さらに、“glycerol ether metabolic process”や“acylglycerol metabolic process”の GO term は TG 合成に関連する GO term であるため、他の脂質代謝経路の変動について検討を行ったところ、不飽和脂肪酸合成遺伝子や TG 合成関連遺伝子の多くが発現上昇していた(図 2-16 A~B 赤/青矢印, 表 2-5)。不飽和脂肪酸合成に関しては、Fatty acid desaturase 2/6(Fads2/6)や Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1)などの脂肪酸不飽和化酵素や Elov13 など脂肪酸伸長関連遺伝子の多くが発現上昇していた他、脂質不飽和化に必要な CoA の転移化に関与する Acyl-CoA thioesterase(Acot)も発現上昇しており、不飽和脂肪酸合成経路が亢進し、脂肪酸組成が変化している可能性が示唆

された。また、TG 合成経路関連遺伝子は TG 合成の基盤となるグリセロールに対してアシル-CoA を結合し、モノアシルグリセロール(Monoacylglycerol; MAG)に変換する Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (Gpat)や MAG から再度アシル-CoA を結合しジアシルグリセロール(Diacylglycerol; DAG)に変換する 1-acylglycerol3-phosphate-O-acyltransferase (Agpat)ファミリーや Phosphatidate phosphatase(Ppap2)が WT-D-Sac 群で発現上昇していた。この結果より脂肪酸からグリセロールエステルへの変換が亢進していることが示唆された。しかし、DAG から TG に変換する Diglyceride acyltransferase (Dgat)の発現変動は見られなかった。

直接的な脂質代謝経路ではないが、“coenzyme metabolic process”はエネルギー産生において必須な補酵素の代謝に関わるため、エネルギー産生に深く関わる。発現変動遺伝子を詳細に解析したところ、Pantothenate kinase 1/3 (Pank1/3)、Coenzyme A synthase (Coasy)など、CoA 合成経路を司る遺伝子の発現上昇が見られ、CoA 合成が亢進している可能性が得られた(図 2-16 C 赤/青矢印, 表 2-6)。

以上の WT 実験の DNA マイクロアレイ解析より、脂肪酸β酸化の発現上昇を始めとした脂質代謝遺伝子発現変動が得られた。この結果は、飲水実験や胃内投与実験で得られた知見と同様の知見であり、サッカリン溶液が口腔を通過することが重要な要因となっている可能性が示唆された。

3.4. KO マウスを用いたサッカリン溶液の投与部位による遺伝子発現変動(KO 実験)

3.4.1. 動物実験

WT 実験(3.3.)より等量のサッカリン溶液でも投与部位の違いにより肝臓遺伝子発現プロファイルが大きく変化した事を示した。サッカリン溶液は口腔で甘味を呈するため、味覚刺激によって遺伝子発現変動が生じた可能性が示唆された。そこで甘味を受容しない KO マウスを利用し、遺伝子発現変動がサッカリン溶液による甘味刺激によって誘導されるかについて検討を行った。

絶水時間を 42 時間とした他は WT 実験と同様の処理を行い、サッカリン溶液飲水させた(KO-D-Sac)群と胃内投与した(KO-GI-Sac)群を作製した。解剖により肝臓を摘出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。

3.4.2. DNA マイクロアレイ解析

qFARMS 法を用いて正規化した肝臓 DNA マイクロアレイデータを用いてサンプル間の階層的クラスタリング解析を行ったところ、処理群ごとのクラスターは形成されず、KO マウスを用いた実験では遺伝子発現プロファイルの変化は見られなかった(図 2-17)。

Rank products 法を用いた二群間比較を行い、KO-GI-Sac 群に対して KO-D-Sac 群で発現変動するプローブセット(FDR < 0.05)を抽出した。その結果、発現上昇した 399 プローブセット及び、発現低下した 494 プローブセットが抽出された。DAVID を用いた機能解析を行い、FDR 補正した EASE Score < 0.05 を満たす有意に濃縮された GO term を抽出した(表 2-4)。その結果、栄養素代謝関連 GO term として、発現低下したプローブセット群からは“alcohol metabolic process”が抽出されたが、発現上昇プローブセット群からは抽出されず、KO 実験では直接脂質代謝を示す GO term は抽出されなかった。栄養素代謝関連 GO term 以外として、ファゴサイトーシス関連の“positive regulation of phagocytosis”や、炎症応答関連の“chemotaxis”、“acute inflammatory response”、“T cell activation”、“response to bacterium”、“positive regulation of immune response”、“immunoglobulin mediated immune response”、“antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I”、“antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II”が抽出され、免疫関係遺伝子の発現変動が示唆された。

WT 実験でサッカリン溶液の投与方法の違い(飲水または胃内投与)によって多くの発現変動遺伝子が見られた脂質代謝に着目して解析を行った(図 2-15 白抜き矢印, 表 2-5)。その結果、脂肪酸合成関連遺伝子の発現は律速酵素 Acaca 及び Fasn 両者が発現低下しており、脂肪酸合成の抑制が示唆された。また、コレステロール合成関連遺伝子については WT 実験同様に発現変動遺伝子が抽出されず、胆汁酸合成遺伝子である Cyp7a1 及び Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1(Cyp8b1)は発現低下を示した。脂肪酸β酸化関連遺伝子は転写因子 Ppara 及び Acox1 と Acot の発現上昇が見られた一方、他の遺伝子発現変動は見られなかったことから、脂肪酸β酸化の活性化は生じていないことが示された。また、不飽和脂肪酸合成経路に関しては Fad2、Scd1、Acot の発現上昇など WT 実験でも見られた結果が抽出された(図 2-16 A, 表 2-5)。しかし、

WT 実験で大きく発現変動していた TG 合成(図 2-16 B, 表 2-5)や CoA 合成経路(図 2-16 C, 表 2-6)に関する遺伝子発現変動は観察されなかった。

以上のように、不飽和脂肪酸合成の亢進は WT 実験と同様な発現変動傾向が見られた一方で、WT 実験で見られた脂肪酸β酸化や TG 合成の亢進は KO 実験では見られなくなっていたことから、味覚刺激による影響を受けている可能性が強く示唆された。

3.5. HVx マウスを用いたサッカリン溶液の投与部位による遺伝子発現変動(HVx 実験)

3.5.1. 動物実験

KO 実験では WT 実験で見られたサッカリン溶液投与部位の違いによる遺伝子発現プロファイルの変化が見られなかったことから、味覚刺激により遺伝子発現変動が誘導されている可能性が示唆された。味覚刺激は脳へと伝達されるため、肝臓の遺伝子発現調節は脳によって制御されている可能性が考えられた。脳による肝臓の代謝調節には、ホルモンなどの液性因子と迷走神経を介した経路の 2 つが存在する。後者の可能性を検討するために、脳と肝臓を繋ぐ迷走神経の肝枝切除手術を施した(HVx)マウスを利用して解析を行うことで、脳が迷走神経を介して肝臓の遺伝子発現調節を行い得るか検討した。

HVx マウスに対し WT 実験同様の処理を行い、飲水 (HVx-D-Sac) 群と胃内投与(HVx-GI-Sac) 群を作製した。解剖により肝臓を摘出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。

3.5.2. DNA マイクロアレイ解析

qFARMS 法で正規化した肝臓 DNA マイクロアレイデータを用いてサンプル間の階層的クラスタリング解析を行ったところ処理群ごとのクラスターは形成されず、肝枝切断を行うことで遺伝子発現プロファイルの変動が見られなくなった(図 2-18)。

さらに Rank products 法を用いた二群間比較を行い、HVx-GI-Sac 群に対して HVx-D-Sac 群で発現変動するプローブセット(FDR < 0.05)を抽出した。その結果、発現上昇した 123 プローブセットと、発現低下した 261 プローブセットが抽出された。DAVID を用いた機能解析を行い、FDR 補正した EASE Score < 0.05 を満たす有意に濃縮された GO term を抽出した(表 2-4)。その

結果、栄養素代謝関連 GO term として、脂質代謝を示す“steroid metabolic process”が発現上昇プローブセット群より抽出された。その他、炎症に関連する“acute-phase response”が抽出された。発現低下プローブセット群からは GO term が抽出されなかった。

WT 実験で見られた脂質代謝関連遺伝子の発現変動に着目して解析を行ったところ、KO 実験と同様に発現変動遺伝子はほとんど見られなかった(図 2-15 紫矢印, 表 2-5)。脂肪酸合成経路では Elov13 のみ WT 実験と同様に発現上昇が見られたが、他に発現変動遺伝子は抽出されなかった。コレステロール代謝に関連する GO term は抽出されたものの、コレステロール合成経路に直接関連する遺伝子発現変動はほとんど見られず、ステロイドホルモン代謝に関わる遺伝子が多く抽出された。胆汁酸合成経路に関連する遺伝子は Cyp7a1 のみ発現上昇を示した。脂肪酸β酸化関連遺伝子は Ppara と Acot が発現低下遺伝子として抽出された以外は、他の遺伝子発現変動は見られなかったことから、脂肪酸β酸化経路の活性化は示唆されなかった。

不飽和脂肪酸合成経路に関しては Scd1 や Elov13 が発現上昇(図 2-16 A, 表 2-5)しており WT 実験と同様な発現変動が見られたが、TG 合成経路関連遺伝子 Gpam や Apgat は発現低下しており(図 2-16 B, 表 2-5)TG 合成経路は抑制されていることが示唆された。CoA 経路関連遺伝子の発現変動は観察されなかった(図 2-16 C, 表 2-6)。以上の結果から、不飽和脂肪酸合成は WT 実験と同様な発現変動が見られたが、脂肪酸β酸化や TG 合成、CoA 合成など WT 実験で亢進が示された経路が、HVx 実験で見られなかったことから、迷走神経を介して肝臓遺伝子発現変動が一部誘導された可能性が示唆された。

4. 考察

4.1. 投与方法に関する考察

人工甘味料は口腔の甘味受容体によって受容されることで甘味刺激として知覚されるが、口腔以外にも様々な部位に甘味受容体が発現している。そのため、口腔以外の甘味受容体が関与した可能性について検討を行う必要がある。口腔以外に甘味受容体(T1R2 は T1R3)が発現している組織は、消化管(胃[49]、小腸[151,152])、肝臓[153]、膵臓[154]、膀胱[155]、視床下部[49]などが報告されている。その中でも、小腸においてグルコーストランスポーター2(GLUT2)[151]やナトリ

ウム依存性グルコーストランスポーター(Sglt1)の発現誘導[152]や、小腸内分泌細胞(enteroendocrine cell)においてグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(GIP)の分泌亢進が報告されていること[52,54]から、消化管がサッカリンから直接刺激を受容し機能している可能性が考えられた。そのため、飲水実験(3.1.)で得られた遺伝子発現プロファイルの変動が、消化管による影響ではないことを示すために胃内投与実験(3.2.)を行った結果、遺伝子発現プロファイルに大きな変動は観察されなかった。これらの結果は、飲水時には①口腔及び食道に加え、②胃以降の消化管を通過する一方で、胃内投与時には②胃以降の消化管のみを通過することから、得られた遺伝子発現プロファイルの変動は消化管の通過による影響ではないことが示唆された。

サッカリン溶液の投与部位の違いが遺伝子発現プロファイルに影響したことを直接評価するために、飲水実験で得られた結果と胃内投与実験で得られた結果の直接比較を試みた。階層的クラスタリングによる解析を行ったところ、飲水実験と胃内投与実験群で別のクラスターを形成していた(Data not shown)。これは、飲水実験では2 mlを飲水させた一方で、胃内投与では2 ml与えることは不可能であった[156]ことからサッカリン投与量を1 mlに減らしたためサッカリンの摂取量が異なることが原因であると考えられる。サッカリンは体内において代謝されないが、吸収され[157]、アデニル酸シクラーゼやグルコース6リン酸フォスファターゼ活性がサッカリンによって上昇するなどの生理作用[158,159]を持つことから、サッカリン吸収量の違いが生理作用に影響を与えた可能性も考えられる。さらに、胃内投与実験では胃ゾンデによる投与時にマウスに対して保定やゾンデ挿入を行った負荷も問題として挙げられた。

上記の問題点からサッカリンの投与量を揃え、D-Sac 群に対してもゾンデ挿入を行いマウスに与えるストレスを揃えることで、サッカリン溶液の投与部位の違いを評価する実験系を構築した(WT 実験)。その結果、飲水実験で得られた遺伝子発現プロファイル変動に加え、脂肪酸 β 酸化の亢進が WT 実験でも示唆された。水とサッカリン溶液の比較だけでなく、サッカリン溶液の投与部位の違いによる比較ではサッカリン溶液が口腔を通過することが共通しており、口腔の通過が重要な要因であることが示唆された。さらに、異なる2つの実験系を用いて共通の知見を得られたことより、信頼性が高い知見であると考えられた。

甘味を受容できない KO マウスを用いた実験では、18 時間絶水後サッカリン溶液 1 ml を飲水しなかったため、絶水時間を 42 時間に延長した。他の動物実験系で採用した 18 時間と比較して過酷な条件ではあるが、絶水時間を揃えた 2 群間で比較を行ったため、絶水に対する影響を考慮する必要はないと考え、飲水と胃内投与という投与部位の違いを比較した。

迷走神経切断マウスについて比較を行う場合は、通常、切断群と偽手術(Sham)群との比較を行い、迷走神経の有無による違いを比較することが一般的である。本研究においても、Sham 群と HVx 群を作製し、両群にサッカリン溶液を飲水させた時の遺伝子発現プロファイルと比較する方が直接的であり最適であると考えられた。しかし、先行研究において Sham 群と HVx 群では絶食時のエネルギー利用が異なるという報告[70]がなされていることから、本実験で目的としたサッカリン溶液の投与部位の違いによる影響に加え、迷走神経の有無による絶食時のエネルギー利用変化という別の要因が生じる可能性が懸念された。このため HVx 手術を行ったマウス同士の比較を行うことで肝枝切断による影響を排除した。

4.2. 人工甘味料による脂質代謝への影響

前項で議論したように、サッカリン溶液によって遺伝子発現プロファイルに変化が生じる場合の共通する特徴は、サッカリン溶液を飲水させた時である。飲水させた場合には GO term “fatty acid metabolic process” が抽出されたことから脂質分解が示された。さらに、甘味を知覚できない KO マウスを用いた検討ではこの作用が消失していたことから味覚刺激による影響が強く疑われた。そこで、味覚刺激がなぜ脂質代謝に影響したかについて議論する。

動物の甘味刺激受容機構は食物中のカロリー源となる糖を検出する機構であると考えられている[145]。そのため甘味刺激受容後には、栄養素として糖が体内に供給されることが予想される。しかし、人工甘味料にはカロリーが存在しないため、体内にカロリーが吸収されない。予想と異なるため、絶食状態においても生体がより深刻な飢餓状態と錯覚して脂肪酸 β 酸化を亢進させてエネルギー産生を図るという経路が考えられる。実際に、人工甘味料の摂取が食欲や衝動的な摂食を増加させる可能性が報告されている[160]ように、カロリーがない人工甘味料がスクロースなどのカロリーが存在する糖とは異なる応答を示す可能性が高い。味覚刺激が生体内の代謝に影響す

るという知見は、生体が食物中の栄養素を吸収する前から感知することで予測し、それに合わせて栄養素代謝などを変化させる機構が存在しているのではないかと考えられる。

また、CoA 合成経路関連遺伝子の発現上昇も脂質代謝と同様な発現変動パターンを示していた。これは、脂肪酸β酸化や TG 合成に共通する特徴として CoA を消費する経路であるという点である。脂肪酸β酸化は脂肪酸に CoA を結合させたアシル CoA を分解することで大量のアセチル CoA を産生するため、CoA を大量に利用する。また、TG 合成経路の基質となる脂肪酸はアシル CoA となることでグリセロール骨格に取り込まれる他、不飽和脂肪酸合成経路においても、CoA を結合させた脂肪酸に対して不飽和化酵素が働く。以上のように、本研究で変化が認められた脂質代謝経路は CoA を大量に消費することから、不足分を補うために副次的に CoA 産生を亢進しているのではないかと考えた。

また非常に興味深いことに、ほとんどの DNA マイクロアレイ解析の結果から、脂肪酸合成律速酵素 *Acaca*、脂肪酸β酸化律速酵素 *Cpt1a*、コレステロール合成律速酵素 *Hmgcr* など、律速酵素の発現変動は見られなかった。これは各律速酵素が他の遺伝子に比べ複雑な制御を受けるため、他の遺伝子に比べ発現変動しにくかったのではないかと考えている。

4.3. 予測される甘味刺激による脳を介した脂質代謝調節機構

口腔での甘味刺激が肝臓の脂質代謝調節を引き起こした機構について考察を行う。口腔で認識される甘味刺激は、味蕾中の甘味受容体を発現する味細胞によって受容される。その情報は鼓索神経や舌咽神経中の味神経を介して、延髄孤束核(nucleus tractus solitarii; NTS)へと伝達される。さらに、結合腕傍核と視床後内側腹側核を通じて大脳皮質味覚野へと伝達されることで認識される[161]。この情報の伝達経路からはエネルギー代謝が関連する部分は少ないと考えられる。

しかし、味覚刺激による脳の応答は大脳皮質味覚野の活性化以外にもいくつか報告されている。まず、摂食後約 2~4 分で脳を介してインスリンが放出される機構 *Cephalic phase insulin release(CPIR)*は味覚と関連することが報告されている[162]。この機構によるインスリンの分泌は血糖値の上昇が始まる前に生じ、食物の種類によらず変動することが知られている[163]。グルコースなどの糖だけでなく、サッカリンによる人工甘味料の甘味刺激でも活性化され、CPIR が

生じることが報告されている[164]。味覚伝達経路の一つである鼓索神経の切断によって CPIR によるインスリン分泌が消失したことから、味覚刺激が直接関与していることが考えられている[165]。しかし、他の報告では人工甘味料による甘味刺激では CPIR が誘導されないことも報告されている[166]。

視床下部前部におけるヒスタミン産生機構も味覚刺激に関連することが数例報告されている[167]。特に塩酸、高濃度食塩、塩酸キニーネ等の忌避味に対してはヒスタミン分泌量が上昇する一方で、サッカリンやスクロース等の嗜好味に対してはヒスタミン分泌量が低下するなど、味質によって効果が大きく異なる可能性が示唆されている[168]。マウスは甘味を学習し嗜好するが、初めて甘味を提示する際に同時に LiCl を腹腔内投与すると、マウスの体調不良が生じ甘味刺激と関連付けて学習することで本来好むべき甘味刺激を忌避するようになる。このような学習を条件付け味覚嫌悪という[169]。非常に興味深いことに、条件付け味覚嫌悪を学習させたマウスに対してサッカリン刺激を与えると、視床下部前部におけるヒスタミン分泌量の低下は消失することから、口腔における嗜好性と非常に関連性が深いと考えられる[168]。この機構はサッカリン投与後測定終了時間(180分)まで効果が持続していたことから、本実験のように少量のサッカリン溶液を飲水させた一過的な刺激であったとしても、6時間後の解剖まで効果が持続していた可能性が高いと考えられた。この機構も鼓索神経の切断によって投与後の効果が消失することから味覚刺激が直接関与していると考えられている[170]。以上のように、甘味刺激を受けたマウスは CPIR やヒスタミン産生など様々な形で応答することから、脳が活性化している可能性が高い。

脳から肝臓に対して行う調節として、ホルモン等の液性因子が血液を介して調節を行う可能性と、脳と肝臓を繋ぐ迷走神経による神経伝達を介して調節を行う可能性の2つが考えられた。液性因子は脳内で産生されるものだけでもオキシトシンや成長ホルモンなど多岐にわたり、ターゲットの設定及び分泌のピークを検討することが難しい。一方で迷走神経とは、脳と末梢組織を繋ぐ末梢神経の一つであり延髄から各臓器へと投射しており、肝臓には横隔膜下の神経束から分岐して投射している(肝枝)。脳から肝臓への調節経路に迷走神経が関与する可能性について検討するために肝枝を切除する HVx 実験を行った。その結果、HVx 実験では脂肪酸 β 酸化の変動が見られなかったことから、脳は迷走神経を介して肝臓の遺伝子発現変動を誘導したと考えられる。脳か

ら末梢組織に繋がる迷走神経も味神経同様に NTS を介している[171]ことから、味覚刺激の伝導経路と脳領域共有していることで味覚刺激と迷走神経による末梢組織の制御が関連している可能性は高い。

4.4. 先行研究との比較

本研究では甘味刺激を与えたマウスは肝臓において脂肪酸 β 酸化関連遺伝子が発現上昇するという結果を見出し、異なる実験系を用いて再現性も得ることができた。しかし、脂肪酸 β 酸化は脂質分解経路であることから人工甘味料摂取による顕著な体重増加が生じる表現型とは矛盾が生じる。そこで、本研究と人工甘味料のエネルギー代謝に対する影響を報告している先行研究に関して様々な観点から議論を行う。

まず、本研究を始めるきっかけとなった人工甘味料が体重に与える影響に関して考察を行う。Swithers らは、SD 系ラットに対して、サッカリンまたはグルコースを混合したヨーグルトを毎日一定量ずつ固形餌と共に提示しながら飼育を行ったところ、サッカリンによる甘味刺激群における体重増加が顕著だったことを見出した[46]。筆者らはこの原因を甘味刺激とカロリーによる関連性の破綻だと結論づけている。つまり、自然界で感知する甘味は糖であることがほとんどであることからカロリーが体内に入ることが予想される(Predictive)が、人工甘味料では甘味刺激からカロリーの吸収には結びつかない(Non-predictive)ため、摂取カロリーに変化がなくても体重増加が見られること、甘味刺激に対する体温変化が鈍化することで、脂肪重量や体重が増加する。その続報では、人工甘味料を化学的構造が大きく異なるアセスルファムカリウム(アセスルファム K)に変更したり、ヨーグルトの提示時間を 1 日 23 時間から 1 時間にするなどの変更を施しても人工甘味料添加群において顕著な体重増加は見られることから、普遍的な作用だとしている[172]。さらに、サッカリン水溶液として与えても顕著な体重増加が得られたことが報告されている[147]。このように著者らは人工甘味料の摂取はカロリーと甘味刺激のバランスが崩れることから顕著な体重増加が生じるとの知見を様々な観点から報告している[173]。さらには耐糖能の悪化など、様々な表現型の変化を伴うことについても数多く報告している[174]。また、Polyak らは CBA/CA マウスに対して、サッカリン、アセスルファム K、アスパルテーム、シクラメートの様な様々

な人工甘味料溶液を与えたところ、水を与えたコントロールに比べ、サッカリンのみで体重増加量が大きかったことを報告している[146]。一方で、体重が増加しないという報告も存在する。Hella らは人工甘味料、フルクトース、グルコース溶液をマウスに対して与えたところ、フルクトース溶液のみで水を与えたコントロールに比べて体重増加が著しかったことを報告している[175]。これらの先行研究は、体重増加には人工甘味料による甘味刺激が原因となっているとしているが、各論文によって結果が異なり統一的な見解は得られていない。しかし、問題点も挙げられる。Swithers らによる複数本の論文[46,147,172,173]では水ではなくグルコースによる甘味刺激群を対照群としている。グルコース群では溶液またはヨーグルトから摂取するエネルギーが人工甘味料群に比べて多くなることから、カロリー補償性が働き固形餌の摂食量が低下している[46]。このことは、総カロリー摂取量には変化がなかったとしても、糖質としての摂取形態、糖質以外の脂質やタンパク質の摂取バランス、ビタミンやミネラルの摂取量などが比例して異なることから、摂取した栄養素の組成が大きく異なることが問題として挙げられる。また、Polyak らによる報告[146]でも飲水量もサッカリンのみで多かったことから、別の因子が関連している可能性は否定できない。また、0.0005%サッカリン含有餌を6週間与え続けると、摂食量は少なかった一方で体重増加量は大きく、それに伴い血糖値やASTの上昇が見られた他、膵臓ランゲルハンス島の細胞数が増加した結果も報告されている[176]。0.0005%のサッカリン含有餌は、本論文第2章第1項で実施した嗜好性試験(2餌選択試験)において嗜好性が見られた0.03%から比べはるかに低いことから、甘味刺激は受容できていないと考える。その飼育状況下でも体重増加量が見られたことはサッカリンによる味覚刺激ではなく、サッカリンの長期摂取がもたらす何らかの生理的効果である可能性も考えられる。

また、サッカリンと並び人工甘味料研究に利用されているのはアスパルテームであり、げっ歯類に対してアスパルテームを与えて飼育した時でも体重増加への影響が報告されている[148,149]。しかし、げっ歯類はアスパルテームに対して弱い嗜好性しか示さないことが報告されている[137,177]ことに加え、マウスに対してアスパルテームによる甘味刺激を与えても鼓索神経に対する応答は無い[178,179]ことから、甘味受容体非依存的に嗜好していると考えられている。

これらの実験が本当に甘味刺激由来で変化が生じているか、甘味刺激を受容しないマウス

(T1R3 KO マウスや Skn1 KO マウス)を利用するか、鼓索神経など味神経の切除などを用いることで明らかになると考えられる。また、Swithers らは体重増加の原因が甘味刺激を糖の存在として関連付けるというパブプロフ学習によるものであると結論づけていること[173]からも、本研究のように単回投与では結果が異なる可能性がある。甘味刺激を複数回投与した時に、今回見られた発現変動がどのように変化するか検討する必要があると考える。

一方、本研究のように人工甘味料の摂取によってエネルギー消費が亢進する先行研究も存在する。Kawada らは2週間0.05%サッカリン含有餌を与えながら飼育を行った Wistar ラットを4℃の環境に4~5時間暴露した後に解剖を行ったところ、肩甲骨間褐色脂肪組織(Interscapular Brown adipose tissue; IBAT)において Uncoupling protein 1 (Ucp1)が発現上昇していたことを見出した[180]。この結果は、単回投与ではないが、本論文第2章第1項で使用した2餌選択試験においても、嗜好性が見られた0.03%~0.1%の範囲内に存在していることからサッカリンによる甘味刺激によると考えられる。

4.5. まとめ

本節では、サッカリン溶液の飲水によって肝臓の遺伝子発現プロファイルが大きく変動し、特に脂肪酸β酸化を始めとする脂質代謝が大きく変動することを明らかにした。さらに、飲水時に観察された遺伝子発現変動は、KO マウスや肝枝切断マウスを用いた実験では見られなかったことから、味覚刺激による脳への入力と肝枝による脳からの出力による肝臓遺伝子発現調節経路が存在する可能性が示唆された。本研究は、味覚刺激が直接エネルギー代謝に与える影響を報告したことに加え、カロリーを持たない人工甘味料でもエネルギー代謝への影響が存在することを明らかにした新たな知見である。今後は、味覚刺激に依存して変化することを遺伝子発現変動以外の観点から捉える必要があると考える。例えば、脂肪酸β酸化に対しては呼吸交換比やエネルギー消費量などの観点から、TG合成に関しては肝臓中等のTG量の測定などを想定している。

本研究の遺伝子発現解析手法はDNAマイクロアレイのみを利用した。DNAマイクロアレイは非常に多くの遺伝子に関して同時に遺伝子発現変動解析が可能であるが、統計的な手法に依存するため、対象がぼやけてしまうことがある。しかし、本研究のように、律速酵素が発現変動しな

い対象にはリアルタイム PCR による解析では捉えにくいと考えられるため、DNA マイクロアレイ解析は有効であったと考える。

また、本研究では甘味物質としてサッカリンのみを利用したが、今後他の人工甘味料を利用することで、甘味刺激による影響であることを一般化できると考える。また、スクロースとサッカリンでは同じ甘味だが、ドーパミンの分泌量はスクロースのほうが高かったという報告もある [181]。この報告はマウスが、同じ甘味刺激でもその味質を区別して代謝調節を行っている可能性を示すものである。カロリーがない人工甘味料とカロリーがある天然の糖で応答が異なるかを明らかにすることも重要である。最終的には、各基本味に対するエネルギー代謝への影響を明らかにすることで、摂食により食物から受容する味覚刺激の役割を解明できるのではないかと考えている。

表2-1 血液生化学データ

	D-W群	D-Sac群	GI-W群	GI-Sac群
AST (IU/L)	243.33 ± 32.97	249.20 ± 33.77	223.40 ± 27.69	202.0 ± 14.66
ALT (IU/L)	72.50 ± 8.40	68.80 ± 8.89	48.80 ± 2.87	49.6 ± 4.31
T-CHO (mg/dL)	71.67 ± 2.72	73.00 ± 2.30	97.60 ± 3.59	97.8 ± 1.69
F-CHO (mg/dL)	19.67 ± 1.78	18.80 ± 0.37	29.00 ± 0.84	28.8 ± 0.73
E-CHO (mg/dL)	52.00 ± 1.70	54.20 ± 1.93	68.60 ± 3.17	69.0 ± 1.14
NEFA (μEq/L)	722.50 ± 76.98	860.80 ± 44.60	516.40 ± 29.57	515.0 ± 18.96
LDL-C (mg/dL)	2.00 ± 0.28	1.80 ± 0.20	2.80 ± 0.86	2.6 ± 0.40
HDL-C (mg/dL)	43.50 ± 1.46	45.80 ± 1.66	51.40 ± 3.54	52.0 ± 0.95
TL (mg/dL)	177.83 ± 8.25	179.60 ± 5.77	258.40 ± 9.26	252.0 ± 5.30
GLU (mg/dL)	77.67 ± 13.42	64.20 ± 12.19	124.40 ± 8.80	132.2 ± 14.44
Insulin (ng/ml)	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.04		
Leptin (ng/ml)	0.64 ± 0.21	0.39 ± 0.05		

数値は平均±標準誤差で示し、* はp<0.05を示す。
統計解析は、D-W vs D-Sac、GI-W vs GI-Sacで行った。

表2-2 サッカリン摂取により肝臓で発現変動する遺伝子の機能

GO ID	GO term	飲水実験	胃内投与実験
GO:0008152	metabolic process	1.67E-02	
GO:0019637	organophosphate metabolic process	2.57E-03	
GO:0006066	alcohol metabolic process	1.34E-02	
GO:0046165	alcohol biosynthetic process	6.42E-03	
GO:0034637	cellular carbohydrate biosynthetic process	1.74E-02	
GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	1.19E-02	
GO:0006629	lipid metabolic process	4.47E-03	
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	6.02E-03	
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	4.76E-04	
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1.55E-03	
GO:0006631	fatty acid metabolic process	4.54E-02	
GO:0044106	cellular amine metabolic process		3.43E-02
GO:0043436	oxoacid metabolic process		2.36E-03
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process		2.36E-03
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process		2.56E-03
GO:0008152	metabolic process	3.05E-02	
GO:0055114	oxidation reduction	3.13E-07	
GO:0006629	lipid metabolic process	2.50E-05	4.10E-02
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	3.28E-02	
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	2.96E-02	
	cellular amino acid metabolic process	N/S	
GO:0006575	cellular amino acid derivative metabolic process	4.83E-02	
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	3.15E-02	
GO:0006694	steroid biosynthetic process	7.58E-06	
GO:0016125	sterol metabolic process	1.42E-05	
GO:0016126	sterol biosynthetic process	1.17E-05	
GO:0008203	cholesterol metabolic process	1.62E-03	
GO:0006695	cholesterol biosynthetic process	2.33E-04	
GO:0051186	cofactor metabolic process	4.54E-02	
GO:0006732	coenzyme metabolic process	7.33E-03	
GO:0050896	response to stimulus	3.30E-02	
GO:0042221	response to chemical stimulus	3.76E-03	
GO:0048523	negative regulation of cellular process	2.98E-02	
GO:0006953	acute-phase response		2.52E-02
GO:0002526	acute inflammatory response		4.61E-02

各実験でEASE Score<0.05を満たしたプローブセットを表示し、満たさなかった項目は「N/S」で表示した。
 発現上昇遺伝子群から抽出されたGO termは赤、発現低下遺伝子群から抽出されたGO termは青で表示した。
 最下層のGO termは太字で示した。

表2-3 サッカリン摂取により肝臓で発現変動した脂質代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	飲水実験	胃内投与実験	Probe ID
脂肪酸合成				
FASN	fatty acid synthase	down		1423828_at
Elov12	elongation of very long chain fatty acids-like 2	up		1416444_at
Elov13	elongation of very long chain fatty acids-like 3	up	up	1420722_at
Elov15	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids	down	down	1459242_at
ELOVL6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	up	up	1445062_at 1417403_at
Srebf1	sterol regulatory element binding transcription factor 1		up	1426690_a_at
脂肪酸β酸化				
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	up	down	1417023_a_at 1451263_a_at
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	up	down	1416022_at 1416021_a_at
ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		down	1422996_at, 1439478_at
Acot3	acyl-CoA thioesterase 3	up	up / down	1443147_at
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	down	down	1444518_at
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	up		1423883_at, 1460316_at
Acs14	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	up up	up	1433531_at, 1418911_s_at
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver		down	1460409_at
EHHADH	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	up		1448382_at
hadhb	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, beta subunit	up		1437172_x_at
ACAA2	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	up		1455061_a_at
adipor2	adiponectin receptor 2		down	1437864_at
PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	up		1439675_at
prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit		down	1429464_at
コレステロール合成				
HMGCS1	similar to Hmgcs1 protein; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	down down	down	1433445_x_at, 1433443_a_at, 1433446_at 1433444_at
IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	down down	down	1423804_a_at 1451122_at
sq1E,	squalene epoxidase	down	down	1415993_at
FDFT1	predicted gene 6781; farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	down		1438322_x_at, 1448130_at
FDPS	similar to farnesyl diphosphate synthetase; farnesyl diphosphate synthetase	down		1423418_at
Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	down		1434520_at
cyp51	cytochrome P450, family 51	down		1422533_at, 1450646_at
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	down down	down	1418129_at 1451895_a_at
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	down		1423078_a_at
hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	up	down	1417871_at 1448865_at
Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	down	down	1438743_at, 1422100_at

各実験でFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」、両方で抽出されたプローブセットは「up/down」として表示した。

表2-4 サッカリン溶液投与部位の違いで発現変動する遺伝子の機能

GO ID	GO term	WT実験	KO実験	HVx実験
GO:0006629	lipid metabolic process	1.09E-08		1.11E-02
GO:0008610	lipid biosynthetic process	3.78E-04		
GO:0008202	steroid metabolic process	3.96E-04		1.01E-02
GO:0016125	sterol metabolic process	4.81E-02		
GO:0008203	cholesterol metabolic process	2.20E-02		
GO:0018904	organic ether metabolic process	1.34E-02		
GO:0006662	glycerol ether metabolic process	2.76E-02		
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	1.80E-06		
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	5.50E-06		
GO:0006631	fatty acid metabolic process	2.63E-05		
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	2.30E-05		
GO:0046486	glycerolipid metabolic process	2.27E-02		
GO:0006638	neutral lipid metabolic process	2.38E-02		
GO:0006639	acylglycerol metabolic process	2.17E-02		
GO:0044248	cellular catabolic process	4.76E-02		
GO:0008152	metabolic process	2.57E-05		
GO:0055114	oxidation reduction	3.07E-05		
GO:0051186	cofactor metabolic process	7.82E-03		
GO:0006732	coenzyme metabolic process	9.91E-03		
GO:0050764	regulation of phagocytosis		2.80E-02	
GO:0050766	positive regulation of phagocytosis		2.18E-02	
GO:0009605	response to external stimulus		3.47E-06	
GO:0042330	taxis		3.36E-02	
GO:0006935	chemotaxis		3.36E-02	
GO:0006954	inflammatory response		6.01E-07	3.35E-04
GO:0002526	acute inflammatory response		2.24E-02	1.01E-06
GO:0006953	acute-phase response			3.35E-04
GO:0045321	leukocyte activation		2.51E-02	
	lymphocyte activation		N/S	
GO:0042110	T cell activation		1.58E-02	
GO:0051704	multi-organism process		6.69E-05	
GO:0009607	response to biotic stimulus		5.42E-04	
GO:0051707	response to other organism		4.20E-05	
GO:0009617	response to bacterium		2.17E-02	
GO:0050896	response to stimulus		5.27E-07	
GO:0048583	regulation of response to stimulus		1.47E-03	
GO:0048584	positive regulation of response to stimulus		2.07E-02	
GO:0050776	regulation of immune response		2.13E-02	
GO:0002376	immune system process		2.04E-11	
GO:0002684	positive regulation of immune system process		4.00E-03	
GO:0050778	positive regulation of immune response		6.15E-03	
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity		4.23E-04	
GO:0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains		8.43E-04	
GO:0019724	B cell mediated immunity		7.44E-04	
GO:0016064	immunoglobulin mediated immune response		5.91E-04	
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen		8.76E-08	
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I		9.11E-03	
GO:0019884	antigen processing and presentation of exogenous antigen		6.52E-05	
GO:0002478	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen		1.76E-05	
GO:0002504	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II		7.38E-05	
GO:0002495	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II		5.32E-04	
GO:0019886	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II		5.32E-04	
GO:0006066	alcohol metabolic process		2.49E-03	

各実験でEASE Score<0.05を満たしたプローブセットを表示し、満たさなかった項目は「N/S」で表示した。
 発現上昇遺伝子群から抽出されたGO termは赤、発現低下遺伝子群から抽出されたGO termは青で表示した。
 最下層のGO termは太字で示した。

表2-5 サッカリン溶液投与部位の違いで発現変動した脂質代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	WT実験	KO実験	HV _x 実験	Probe ID
脂肪酸合成					
ACLY	ATP citrate lyase	down	down		1434185_at 1454647_at
ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha		down		1450392_at
FASN	fatty acid synthase		down		1436355_at
Elov13	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3	up		up	1417298_at
Elov15	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	up			1420722_at
脂肪酸β酸化					
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	down		up	1437040_at 1416021_a_at
ACOT12	acyl-CoA thioesterase 12	down			1451666_at
ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		up	down	1439459_x_at
Acot3	acyl-CoA thioesterase 3	up	up		1425150_at, 1419395_at
Acot4	acyl-CoA thioesterase 4	up	up		1439478_at
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	up			1422925_s_at, 1422077_at, 1444518_at, 1422526_at
Acs14	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	up			1450643_s_at, 1423883_at
ACSM1	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1	down			1460316_at
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	up	up		1443147_at
ACAD11	nephronophthisis 3 (adolescent); acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11			down	1421839_at
ACADSB	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	up			1416946_a_at
hadhb	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, beta subunit	up			1458701_at
Acaa1a	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A	down			1457403_at
adipor2	adiponectin receptor 2	up			1433531_at
PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	up		down	1437113_s_at 1437112_at
		up	up	down	1451361_a_at
prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	up	down	up	1422619_at 1446850_at 1449051_at
PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	up		down	1457721_at, 1439675_at
コレステロール合成					
LSS	lanosterol synthase	up			1442878_at
Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)		up		1419075_s_at
hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	up			1450010_at, 1449385_at, 1448865_at
Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	down	down	up	1424352_at, 1438743_at
不飽和脂肪酸合成					
FADS2	fatty acid desaturase 2	up	up		1416022_at
FADS6	fatty acid desaturase domain family, member 6	up			1443838_x_at
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	up	up	up	1437378_x_at 1415964_at
baat	bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	down			1457554_at
TG合成					
GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	up		down	1437172_x_at
Agpat6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid acyltransferase, zeta)	up			1451828_a_at, 1418668_at
AGPAT9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	up		down	1437864_at
PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A	up			1422147_a_at
Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B	up			1430700_a_at
Mttp	microsomal triglyceride transfer protein		down		1435326_at
Crat	carnitine acetyltransferase	up			1459992_x_at
DGKH	diacylglycerol kinase, eta			down	1444320_at

各実験でFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

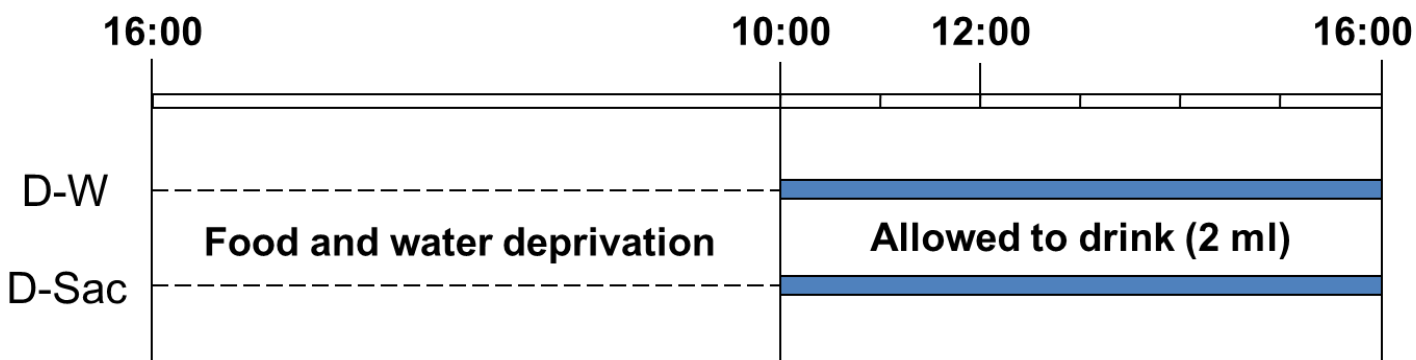
表2-6 サッカリン溶液投与部位の違いで発現変動した補酵素代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	WT実験	KO実験	HVx実験	Probe ID
ACOT12	acyl-CoA thioesterase 12	up			1419395_at
ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		up	down	1439478_at
Acot3	acyl-CoA thioesterase 3	up	up		1443147_at, 1422925_s_at
Acot4	acyl-CoA thioesterase 4	up	up		1422077_at
ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2		down		1422478_a_at
ALAS1	aminolevulinic acid synthase 1	up			1424126_at, 1442331_at, 1455282_x_at
Cbr1	predicted gene 5678; carbonyl reductase 1	down			1460196_at
COASY	Coenzyme A synthase	up			1443829_x_at
COQ5	coenzyme Q5 homolog, methyltransferase (yeast)	up			1417264_at
coq7	demethyl-Q 7	down			1416665_at
CPOX	coproporphyrinogen oxidase	up			1422493_at
Cyp1a2	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	up	down		1450715_at
DLST	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	up			1437775_at
FECH	ferrochelatase	up			1418698_a_at
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit			down	1424296_at
GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	up			1418627_at
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble; similar to Superoxide dismutase	up	up		1440222_at 1459976_s_at, 1451124_at
GPHN	gephyrin	up			1426462_at, 1426463_at
GPX4, hnrp11	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like; glutathione peroxidase 4	up			1427144_at
gsr	similar to Glutathione reductase, mitochondrial precursor (GR) (GRase)		down		1421816_at
GSTT3	glutathione S-transferase, theta 3			up	1423891_at
hmox1	heme oxygenase (decycling) 1	down			1448239_at
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase			up	1455320_at
naprt1	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	down			1454748_at
NUDT7	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7	up up	up		1430896_s_at 1431302_a_at
OXSM	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial	up			1455395_at
PANK1	pantothenate kinase 1	up	down down		1431028_a_at 1441765_at, 1418715_at 1429814_at, 1429813_at
PANK3	pantothenate kinase 3	up			1433613_at
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	up	up	down	1417273_at
PGD	phosphogluconate dehydrogenase		down	down down	1437380_x_at 1438627_x_at

各実験でFDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇したプローブセットは「up」、発現低下したプローブセットは「down」として表示した。

(A)



(B)

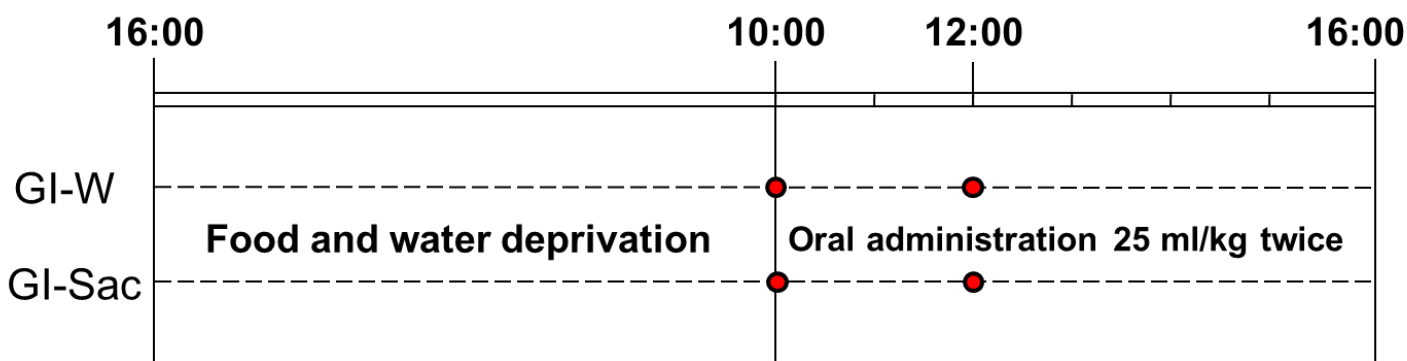


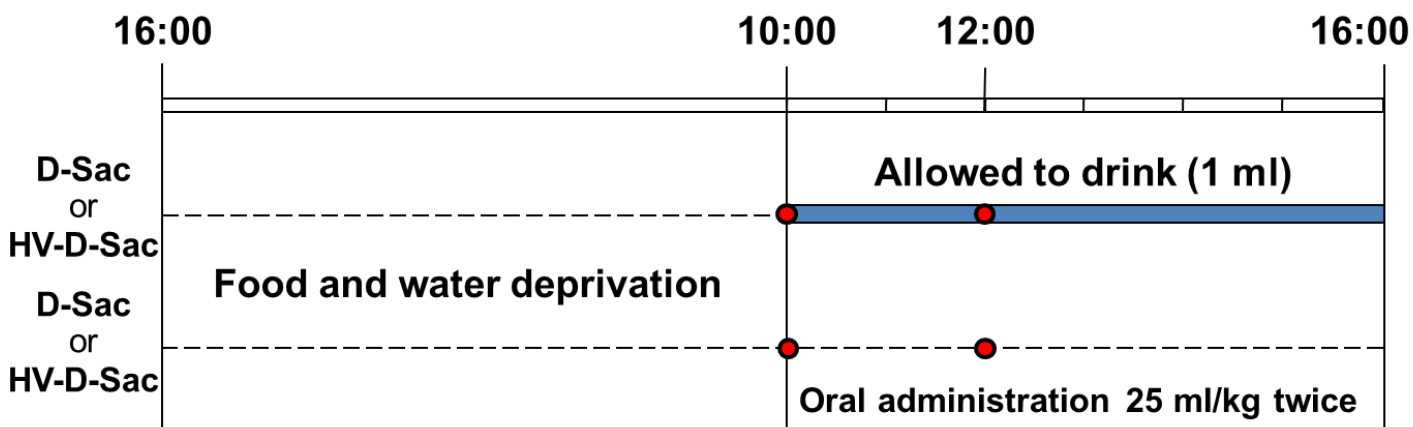
図2-10. サッカリン溶液摂取による影響を解析するための動物実験スケジュール

(A)飲水実験、(B)胃内投与実験

解剖24時間前から餌と水を抜くことで絶食・絶水処理を行い、解剖6時間前から10 mM サッカリン溶液または滅菌水を2 ml飲ませた飲水実験と、10 mM サッカリン溶液または滅菌水を2回の胃ゾンデにより合計1 ml投与した胃内投与実験を行った。その後解剖を行い、血液を採集し、肝臓を摘出した。

赤丸はゾンデ挿入のタイミングを示した。

(A)



(B)

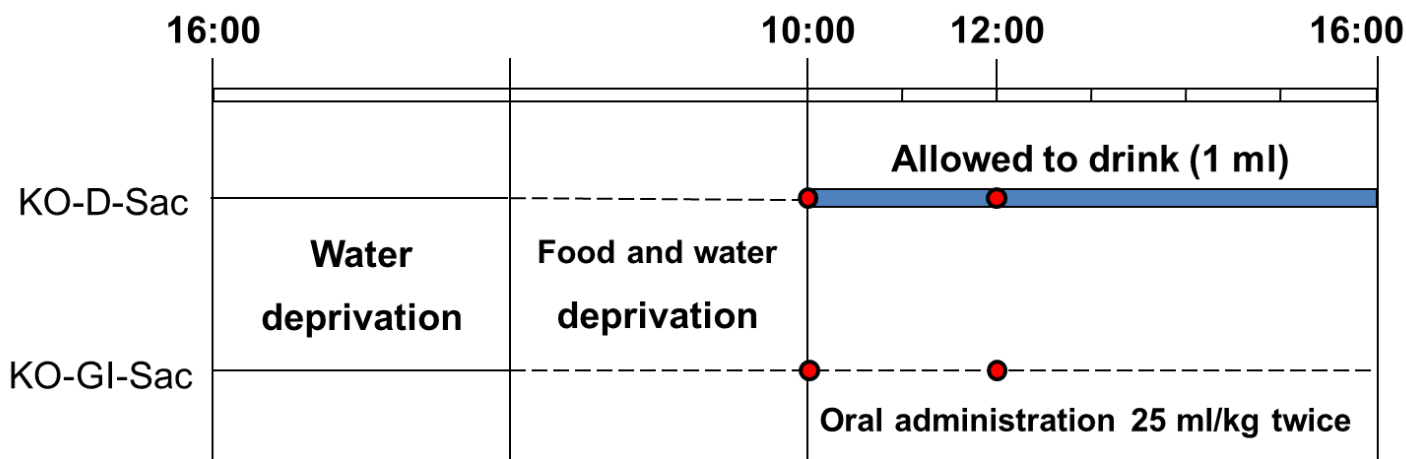


図2-11. サッカリン溶液投与部位の違いによる影響を解析するための動物実験スケジュール

(A)WT実験及びHV_x実験、(B)KO実験

解剖24時間前から餌と水を抜くことで絶食・絶水処理を行い、解剖6時間前からサッカリン溶液を1 ml飲ませた飲水群と、2回の胃ゾンデにより1 ml投与した胃内投与群を作製した。

赤丸はゾンデ挿入のタイミングを示し、飲水群でもゾンデ挿入を行うことで動物にかけるストレスを揃えた。KO実験ではKOマウスが18時間絶水後1 ml全量を飲水しなかったことから絶水時間を42時間に延長してから処理を行った。

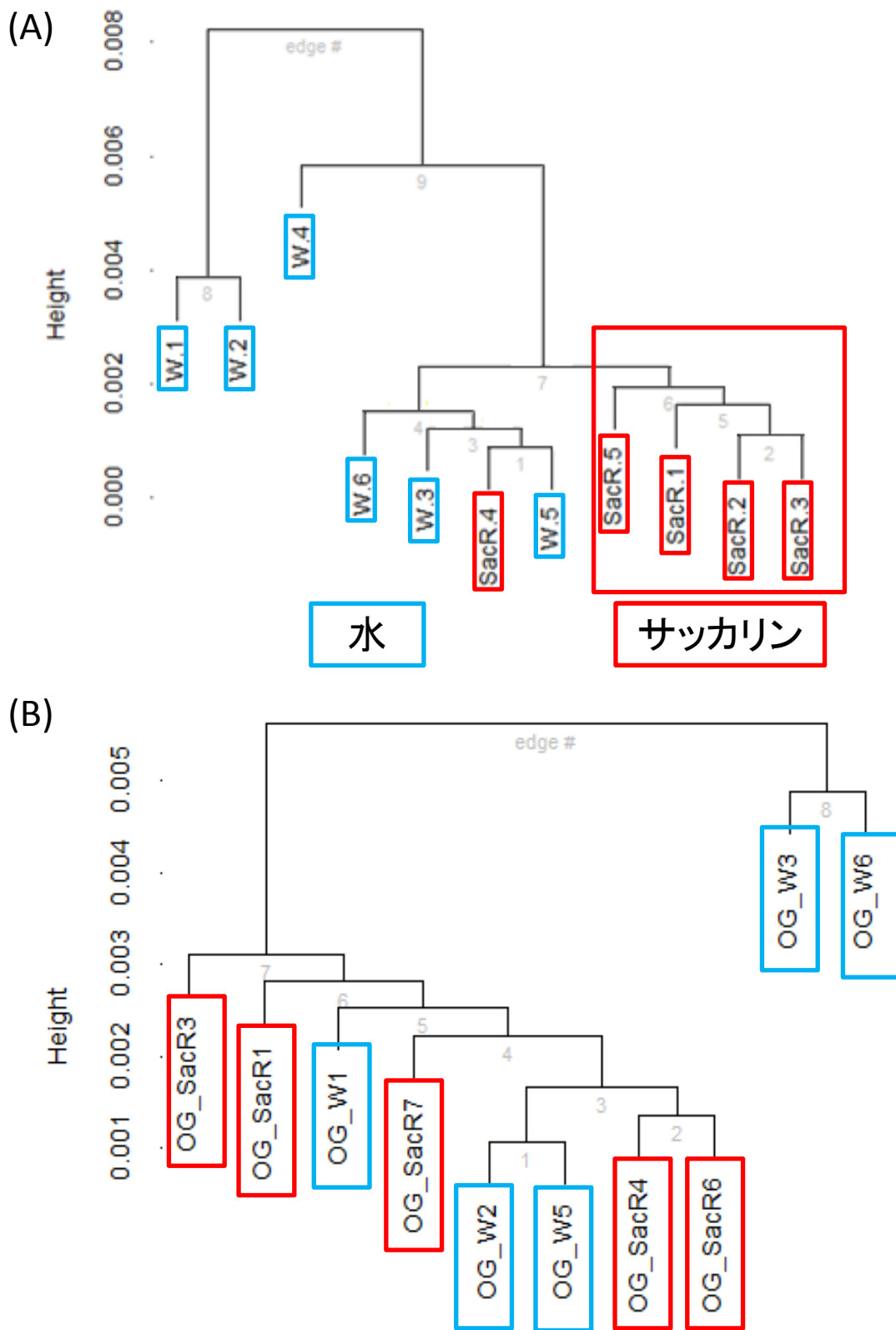


図2-12. サッカリンまたは水投与時の
遺伝子発現プロファイルの変化

(A)飲水実験、(B)胃内投与実験

飲水実験では水またはサッカリン溶液の飲水により、サッカリン飲水群でクラスターを形成し遺伝子発現プロファイルが大きく変化することが示唆された。一方で、ゾンデによる胃内強制投与を行うとクラスターを形成せず、明確な遺伝子発現プロファイルの変化は示唆されなかった。正規化法はそれぞれqFARMS法を用いた。

赤枠はサッカリン投与群、水色枠は水投与群を示す。

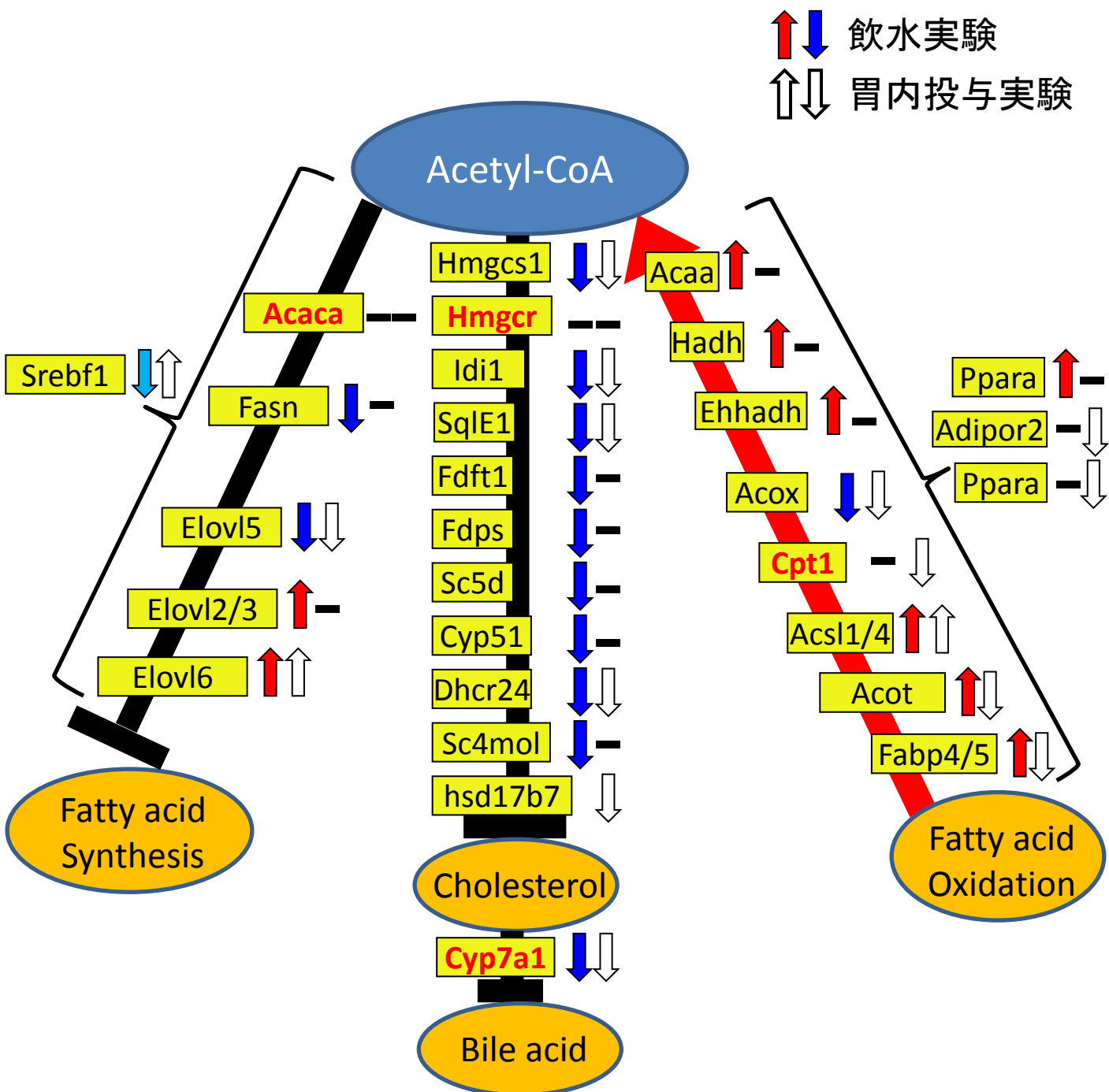


図2-13. サッカリンまたは水投与時に生じる脂質代謝経路

飲水実験では、脂肪酸合成・コレステロール合成経路関連遺伝子の発現低下が見られ、脂肪酸伸長酵素関連遺伝子や、脂肪酸β酸化関連遺伝子の多くは発現上昇していた。

胃内投与実験では脂肪酸伸長酵素の発現変動やコレステロール合成経路関連遺伝子の発現低下は見られたが、他の脂質代謝経路の発現変動の多くは消失していた。

各黄色枠は各経路の遺伝子を示し、赤矢印または青矢印は飲水実験(3.1.)から抽出された遺伝子発現変動を示した。白抜き矢印は胃内投与実験(3.2.)から抽出された遺伝子発現変動を示した。

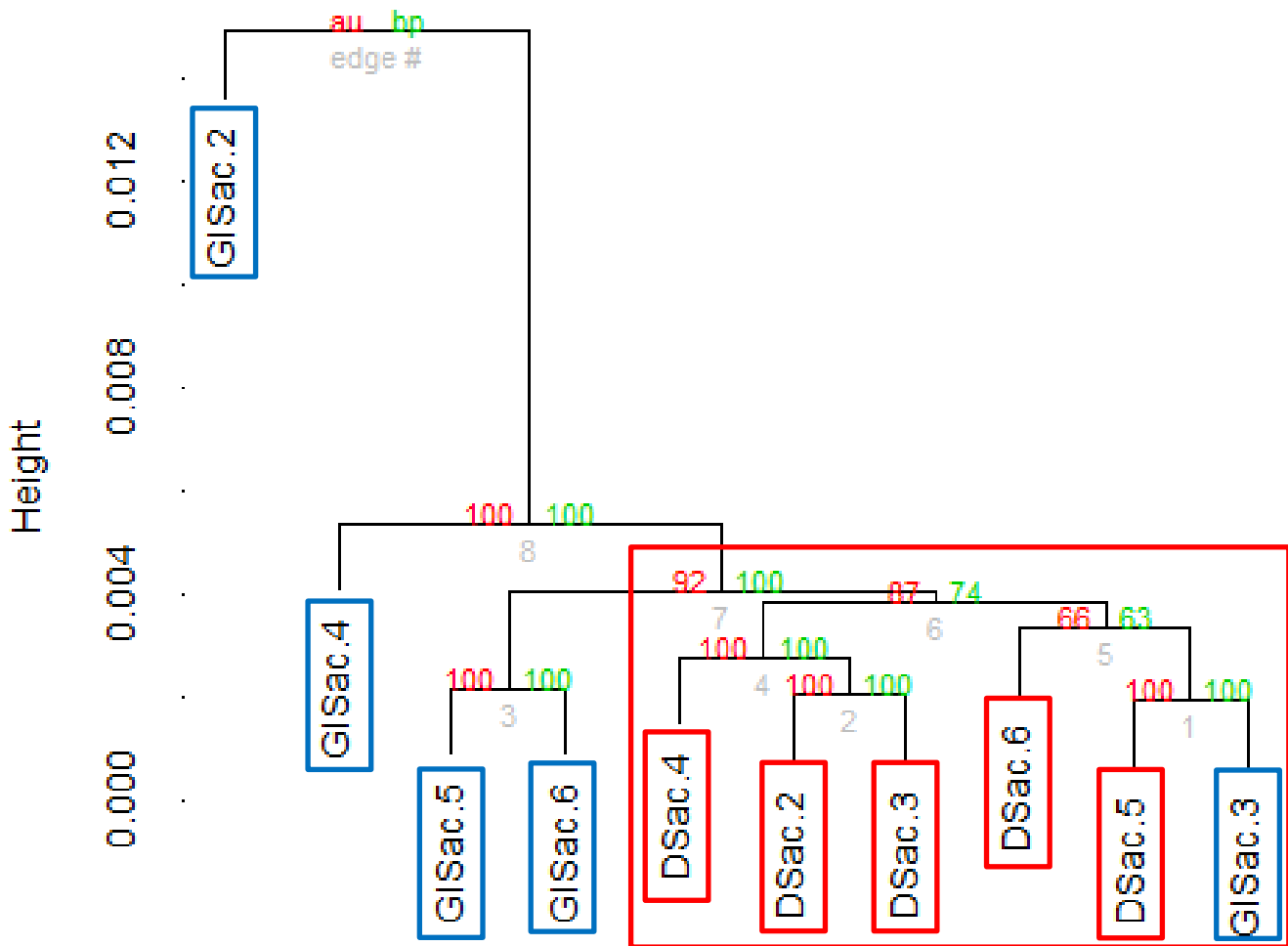


図2-14. WT実験の肝臓遺伝子発現プロファイルの変化

WTマウスに対して10 mMサッカリン溶液1 mlを飲水または胃内投与を行った時の肝臓遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、飲水群でクラスターを形成していたことから、飲水の影響によって遺伝子発現プロファイルが大きく変化したことが示唆された。

正規化法としてqFARMS法を用い、赤枠はサッカリン溶液飲水(WT-D-Sac)群、青色枠はサッカリン溶液胃内投与(WT-GI-Sac)群を示す。

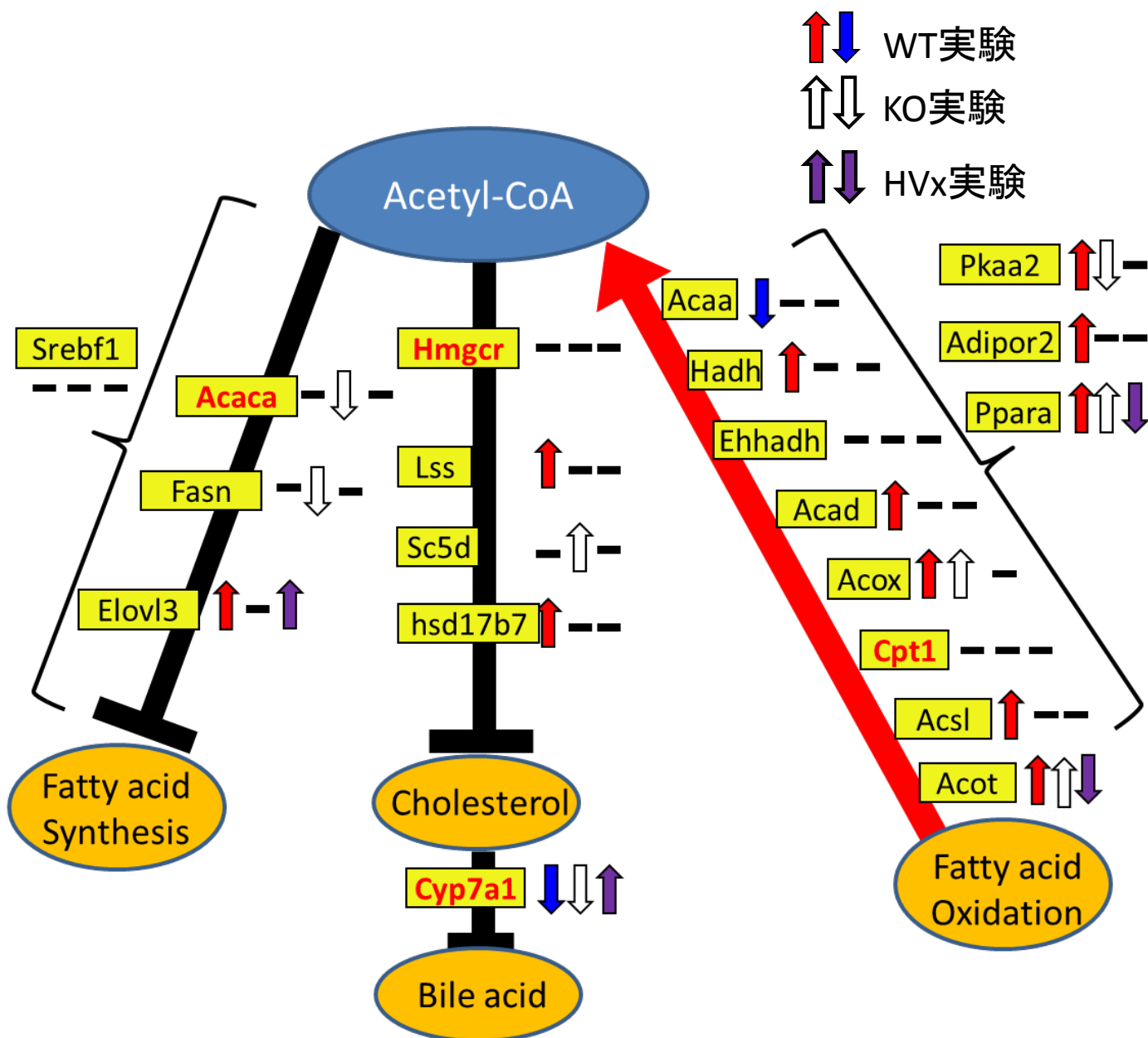


図2-15. サッカリン投与部位の違いによる脂肪酸代謝の変化

WT実験、KO実験、HV_x実験において10 mMサッカリン溶液を飲水または強制投与を行った時に生じる脂質代謝関連の発現変動遺伝子を代謝経路にマッピングした。その結果、WT実験で見られた脂肪酸β酸化の亢進は他の実験では見られなくなっていたことから、サッカリンの甘味刺激によって発現変動したことが示唆された。

各黄色枠は各経路の遺伝子を示し、赤矢印または青矢印はWT実験(3.3.)から抽出された遺伝子発現変動を示した。白抜き矢印はKO実験(3.4.)、紫色矢印はHV_x実験(3.5.)から抽出された遺伝子発現変動を示した。

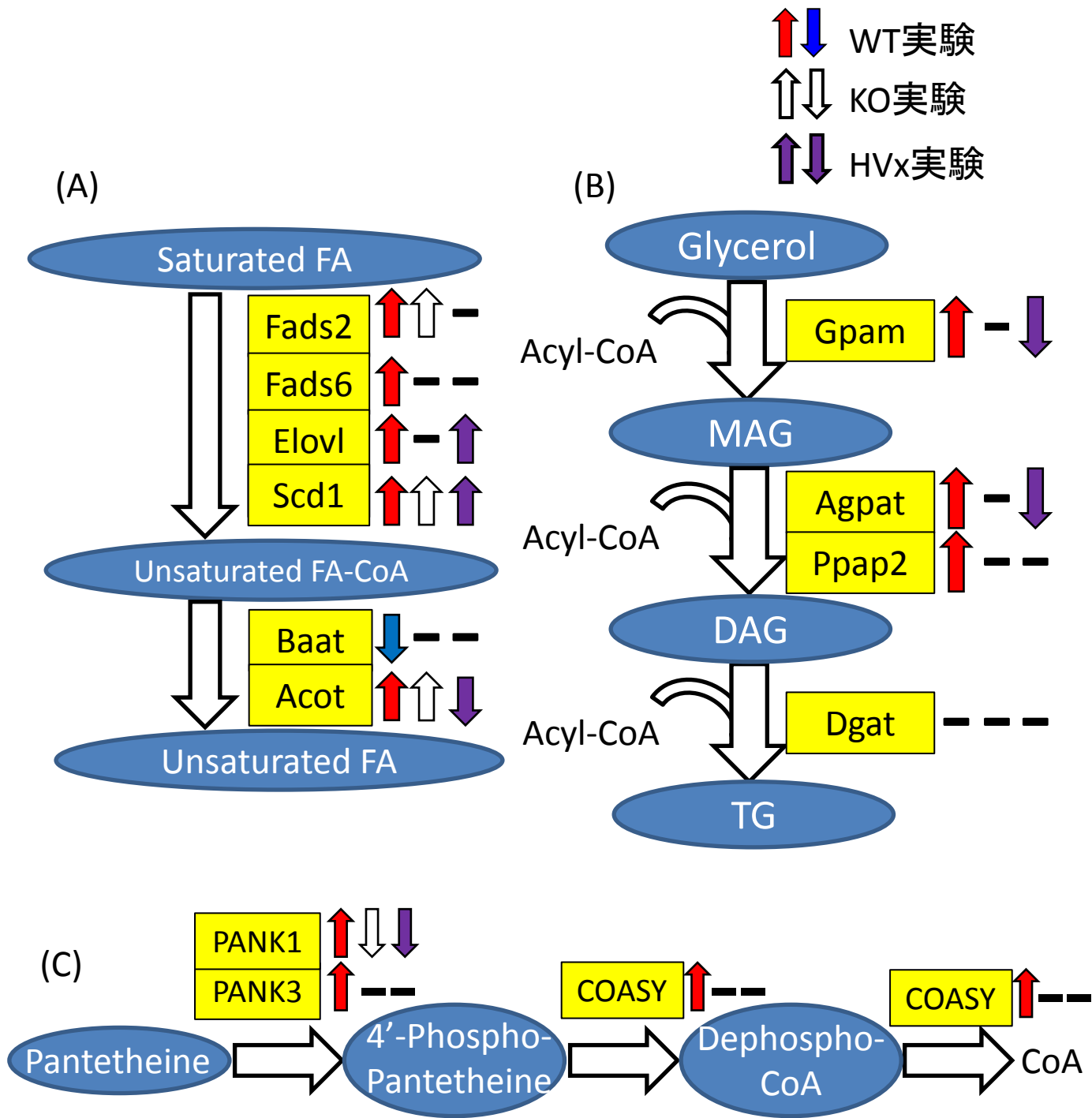


図2-16. サッカリン投与部位の違いによる

脂質代謝関連遺伝子の発現変動

(A)不飽和脂肪酸合成経路、(B)TG合成経路、(C)CoA合成経路

不飽和脂肪酸合成経路は、WT実験及びKO実験、HVx実験で発現上昇する遺伝子が多く、不飽和脂肪酸合成の亢進が示唆された。TG合成経路及びCoA合成経路はWT実験で遺伝子の発現変動が見られ、遺伝子型や処理の違いによって結果が異なった。

各黄色枠は各経路の遺伝子を示し、赤矢印または青矢印はWT実験(3.3.)から抽出された遺伝子発現変動を示した。白抜き矢印はKO実験(3.4.)、紫色矢印はHVx実験(3.5.)から抽出された遺伝子発現変動を示した。

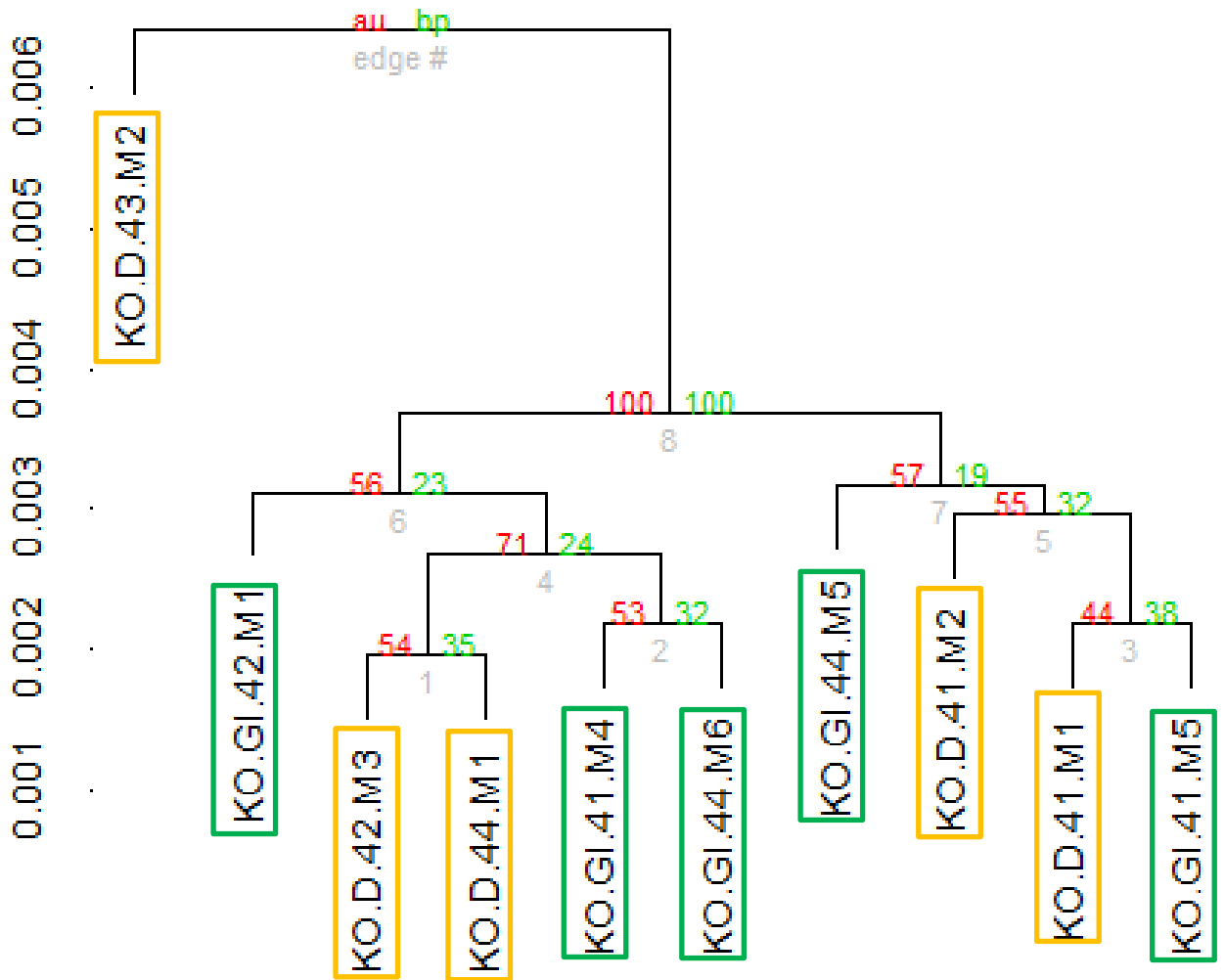


図2-17. KO実験の肝臓遺伝子発現プロファイルの変化

KOマウスに対して10 mMサッカリン溶液1 mlを飲水または胃内投与を行った時の肝臓遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、飲水群及び胃内投与群でクラスターを形成していなかったことから、飲水の影響による遺伝子発現プロファイルが見られなかったことが示唆された。

正規化法としてqFARMS法を用い、黄色枠はサッカリン溶液飲水(KO-D-Sac)群、緑色枠はサッカリン溶液胃内投与(KO-GI-Sac)群を示す。

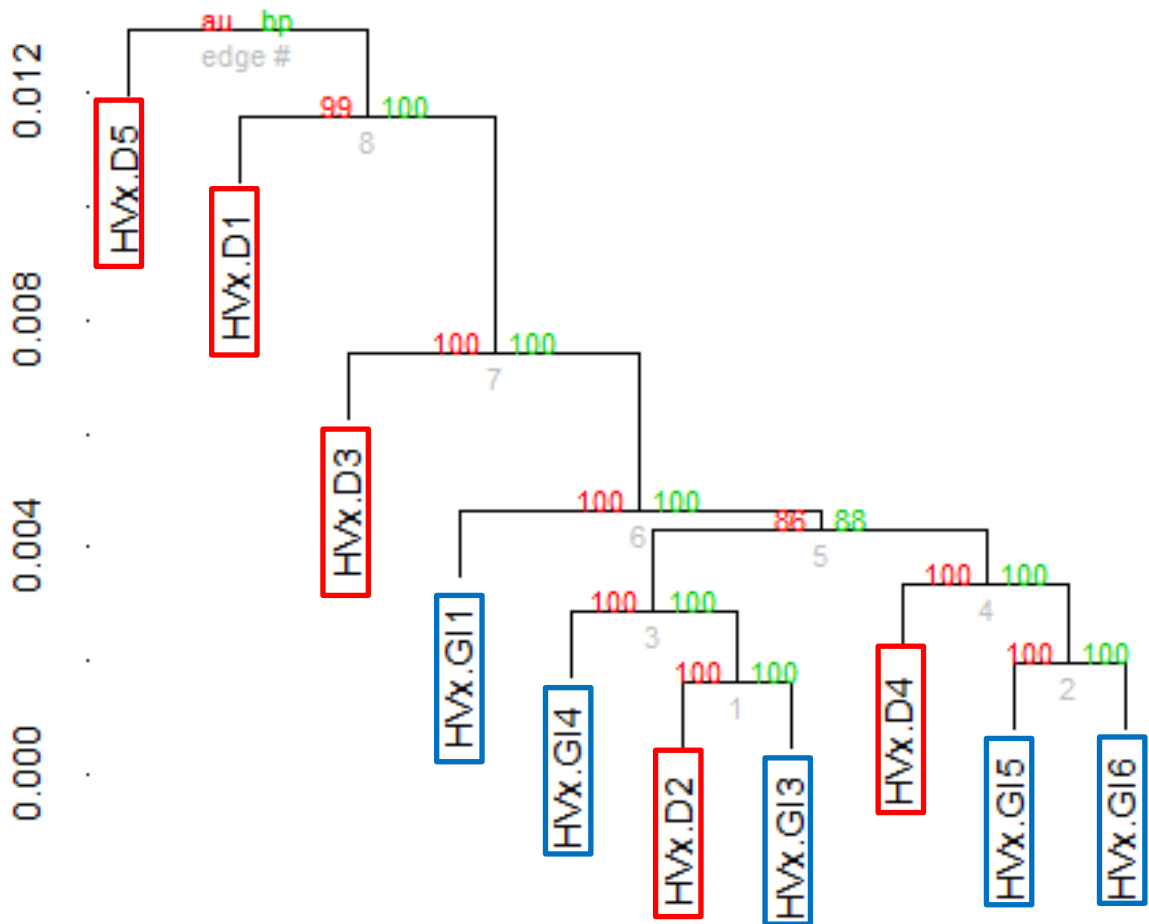


図2-18. HV_x実験の肝臓遺伝子発現プロファイルの変化

肝枝切断(HV_x)マウスに対して10 mMサッカリン溶液1 mlを飲水または胃内投与を行った時の肝臓遺伝子発現プロファイルと比較した。その結果、飲水群及び胃内投与群でクラスターを形成していなかったことから、飲水の影響による遺伝子発現プロファイルが見られなかったことが示唆された。

正規化法としてqFARMS法を用い、赤枠はサッカリン溶液飲水(HV_x-D-Sac)群、青枠はサッカリン溶液胃内投与(HV_x-GI-Sac)群を示す。

第3章

消化管を起点とする

新たな臓器間ネットワークの解明

緒言

第2章では、これまでエネルギー恒常性維持との関連が報告されてこなかった味覚刺激が、摂食量や食物選択に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。その際、味盲モデルマウスとして用いた KO マウスは通常飼育下において摂食パターンの変化や絶食時甘味刺激による代謝の変化が消失していた。

味覚など認知される感覚に限らず、摂食によって食物から受ける刺激は、食物成分が消化管など末梢組織に作用して生理機能を変化させることが報告されている。消化管では、摂食により大量の糖が消化管を通過することが引き金となって GLUT2 が管腔側に膜移行し吸収を促進する機構や[47]、カプサイシンが吸収されて内臓感覚神経を介して脳に伝達されることでカテコールアミンの分泌が亢進するという機能[182]に加え、近年消化管でも受容されることで脳に伝達されて機能する機構が報告されている[183]。また、第2章第1節では、味物質は口腔だけでなく消化管においても受容され、インクレチンの放出等に関わる可能性を議論したように、消化管における刺激受容も様々な生理機能を有することが推定される。

また、栄養状態の変化を感知した末梢組織は求心性神経を介して脳に対して情報伝達を行い、他の末梢組織の代謝を調節するという機構が複数報告され注目されている[70]。臓器間ネットワークの起点は肝臓が多く報告されているが、消化管も迷走神経による支配を受けており、消化管から脳を介して他の臓器へと伝達されるネットワークが存在する可能性が示唆された。このようなネットワークを解析するにあたっては、経路の一つである口腔内味覚刺激を除外できる *Skn1* KO マウスを利用することが非常に有効であると考えた。

そこで本章は、*Skn1* KO マウスの表現型の詳細を解析するとともに、その得られた表現型が生じる原因について様々な角度から解析を行い、新たなエネルギー恒常性維持機構が存在する可能性について検討を行った。

1. 目的

序論で述べたように転写因子 *Skn1* は皮膚における角化細胞への分化に関わることが報告されていた[72]。Matsumoto らは新たに *Skn1* が味蕾に発現し、この転写因子の欠損によって味覚関連分子が消失することを見出し、*Skn1* が味蕾における味細胞の分化に関わることを報告した[76]。しかし、*Skn1* KO マウスを繁殖・飼育している中で、同週齢の WT マウスに比べて体長が小さいことに気がついた。このような表現型は *Gagust* 遺伝子欠損マウス等の他の味盲モデルマウスでは報告されていない。この *Skn1* KO マウスには味覚の消失とは別の機構によってエネルギー恒常性に異常が生じている可能性が示唆された。

そこで、遺伝的な背景を揃えた同腹仔マウスによる解析を行い、成長の違いを確認すると共に、その原因を検討し、エネルギー恒常性機構の新たな知見を解明することを目的とした。

2. 材料と手法

2.1. 被験動物

C57BL/6J 系(WT)マウスは日本クレア株式会社から購入した。*Skn1* KO マウスは当研究室で作製・自家繁殖した後、C57BL/6J 系マウスとの 10 回以上の交配によりバッククロスをかけたものを用いた[76]。ホモ(-/-)同士の交配及びヘテロ(+/-)同士の交配の 2 系統で維持を行った。ヘテロ同士の交配によりノックアウト個体はメンデルの法則に従った比率で得られた。

以下の実験は、迷走神経切断実験のみホモ同士の交配で維持した系統を用い、その他の解析は全てヘテロ同士の交配で得られた同腹仔で解析を行った。

2.2. 動物飼育

2.2.1. 動物飼育環境

第 1 章と同様の環境下でマウスを飼育した。ラボ MR ブリーダー固形飼料を通常食(Control diet; CD)飼料として与え、飼料及び水は *Ad lib* 条件下で飼育を行った。マウスの飼養と実験手順は National Institutes of Health の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals と東京大学動物実験実施規則に従った。

2.2.2 高脂肪食(HFD)負荷実験

離乳した 3 週齢の仔マウスに対してラボ MR ブリーダー固形飼料を 1 週間与えた後、4 週齢から高脂肪食 High Fat Diet 32(CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan)(High Fat Diet; HFD)を与えた。脂肪の酸化を防ぐため 2 日に 1 回全ての HFD を交換した。

2.2.3. 体重測定

各個体の体重は離乳時(3 週齢)から 16 週齢まで 1 週間に 1 回測定を行った。出生した曜日による違いが生じることを避けるため、生まれた曜日 ± 1 日の誤差範囲で測定を行った。

出生直後の体重測定時には、後肢の指を切断することにより個体を識別するタグとすると共に、遺伝子型判定のサンプルとした。離乳時には耳に穴を開けるパターンを用いて個体を識別するタグとした他、尻尾の先端から 3~5 mm 切断し遺伝子型判定のサンプルとした。遺伝子型の判定は 2 回行い、実験結果が一致することで確認した。出生直後及び離乳時には性別による体重差が見られなかった(Data not shown)ことから、雌雄を区別せず解析を行い、離乳までに死亡したマウスは解析対象から除外した。

2.2.4. 動物の解剖

解剖は DNA マイクロアレイ用(12~16 週齢)及び生化学データ解析用(約 20 週齢)の 2 回行った。前者は前日 16:00 より絶食状態にした上で、後者は *Ad lib* 状態で当日 10:00 から解剖を行った。第 2 章第 2 節同様に、麻酔、心臓採血、血清の処理を行った。さらに、肝臓、精巣上体 WAT、筋肉(腓腹筋・ヒラメ筋)、BAT を摘出し、各臓器は氷冷した生理食塩水で洗浄後に、液体窒素で凍結させ、 -80°C で保管した。肝臓は第二葉より 5mm 角程度のブロックを切り取り、1 ml の Ambion® RNeasy Lysis Buffer に浸漬し、第 1 章と同様に処理を行った。

2.2.5. PCR 法による遺伝子型判定

切断した尾または後肢の指は 1× Lysis Buffer (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 200 mM

NaCl, 2% SDS) 500 μ l 及び Proteinase K(Kanto Chemical Co. Inc.) 5 μ l を加え、58°C で 3 時間以上インキュベートすることで溶解した。得られた溶解液に対してフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)混合液(Wako Pure Chemical Industries) 500 μ l を加え、室温条件下で 15 分穏やかに振盪した。15,000 \times g で 10 分遠心後、上清を回収した。得られた上清 2 μ l に対し、DEPC 処理水 18 μ l を加え、このうち 1 μ l を以下の PCR 反応の鋳型として用いた。

PCR 反応には Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)、Skn1 用または標的遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子)用のプライマー対(図 3-1 A)と、上記の鋳型を用いて PCR(図 3-1 B) を行った。その後、PCR 産物をアガロース電気泳動に供して、Skn1 遺伝子増幅予測長約 800 bp、標的遺伝子増幅予測長約 470 bp の増幅断片の有無に基づいて遺伝子型を判定した。

2.3. マウス摂食量の測定

CD(4 週齢、8 週齢)または HFD(4 週齢、8 週齢、15 週齢)で飼育しているマウスに対して、粉末化した各餌をガラス製給餌器に入れて提示した。7~8 日の摂食量を測定した後に 1 日あたりの摂食量を算出した。その間、CD は 3~4 日ごとに、HFD は 2~3 日おきに測定を行った。

2.4. マウス糞中脂質分析

HFD で飼育した 15 週齢マウスの 4 日間の糞を採取し、凍結乾燥機 EYELA FDU-2100 (TOKYO RIKAKIKAI CO, LTD, Tokyo, Japan)を用いて 48~72 時間乾燥させ、-80°C で保存した。分析は天然素材探索研究所株式会社(Kanagawa, Japan)に委託し、糞中 TG 濃度及び糞中胆汁酸(Bile acid; BA)濃度を測定した。

2.5. 体組成の測定

東京大学農学生命科学研究科食と生命研究室において、実験動物用の X 線 Computed Tomography(CT)装置 Latheta LCT-200 (Aloka-Hitachi LCT-200, Tokyo, Japan)を用いて測定した。頭部から尾部まで全体を 2 mm 間隔で撮影した後、腹部(肋骨の下から 2 本目から骨盤の尾側先端)の領域に関して Latheta 付属ソフトにより筋肉量及び脂肪量の測定を行った。測定時にはイ

ソフルラン吸入装置(MUROMACHI KIKAI Co. LTD.)を用いてイソフルラン(Mylan Inc., Pennsylvania, US)麻酔下で測定を行った。

2.6. 血液生化学データの測定

血清は長浜ライフサイエンスラボラトリーに委託して分析した。測定項目は総タンパク質(Total Protein; TP)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素(ALT)、アルカリホスファターゼ(Alkaline phosphatase; ALP)、乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase; LDH)、総コレステロール(T-CHO)、遊離型コレステロール(F-CHO)、エステル型コレステロール(E-CHO)、トリアシルグリセロール(TG)、血清遊離脂肪酸(NEFA)、LDL コレステロール(LDL-C)、HDL コレステロール(HDL-C)、総脂質(TL)、グルコース(GLU)、総ケトン体(T-KB)である。

ホルモンも同様に長浜ライフサイエンスラボラトリーに委託して分析し、甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン(Triiodothyronine; T3)およびチロキシン(Thyroxin; T4)を、電気化学発光測定法(Electro-chemiluminescence immunoassay; ECLIA)法により測定した。

2.7. 間接カロリメトリーによるエネルギー代謝解析

間接カロリメトリーによるエネルギー代謝解析は芝浦工業大学システム 理工学部 生命科学科 食品栄養学研究室との共同研究で測定を行った。マウスを呼気ガス分析チャンバー(150 mm x 150 mm x 150 mm)内で飼育し、小動物用代謝計測システムMK-5000RQ (MUROMACHI KIKAI Co. LTD.)により 22 時間呼気ガス測定を行ない、酸素消費量 (VO₂)、二酸化炭素排出量 (VCO₂)を測定した。この結果から糖質消費量、脂質消費量、エネルギー消費量(Energy metabolism)及び呼吸交換比(Respiratory exchange ratio; RER)を算出した。各数値は次式により算出した。

$$\text{エネルギー消費量} = 3.9 \times \text{VO}_2 + 1.1 \times \text{VCO}_2 \quad [184]$$

$$\text{RER} = \text{VCO}_2 / \text{VO}_2$$

2.8. 血圧及び心拍数測定

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 食品栄養学研究室との共同研究で測定を行った。

7~14 週齢のマウスを固定ケージの中に入れて保定し、尾を出して MK-2000ST (MUROMACHI KIKAI Co. LTD.)を用いたテイルカフ法[185]による測定を行った。

2.9. 直腸温の測定

直腸温は、Microprobe Thermometer BAT-12 (Physitemp instruments Inc., NJ, US)、マウス直腸用プローブ RET-3 (Physitemp instruments Inc.)を用いて測定を行った。ストレス負荷が少ないようにマウスを飼育ケージのアルミ製蓋にのせた状態で、プローブを直腸から挿入し温度が安定した段階の数字を読み取った。

2.10. ミトコンドリアコピー数解析

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 食品栄養学研究室との共同研究で測定を行った。解剖によって得た腓腹筋から QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN K.K)を用いて DNA を抽出し、260 nm における吸光度測定を行い、total DNA の抽出量を確認した。TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, California, US)のプロトコールに従い、Cytochrome b (Cytb)に対応するプライマー・プローブセット(Mm04225271_g1)を加え、Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems)による増幅及び測定を行った。さらにゲノム DNA 由来の β -Actin (Mm00607939_s1)も同様に測定を行い、ゲノム DNA 量による補正を行った。

2.11. DNA マイクロアレイ解析及び DNA マイクロアレイデータ解析

解剖により摘出したマウス肝臓及び腓腹筋サンプルを用いて、第 1 章と同様に行った。マイクロアレイチップは Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を利用した。

2.12. 迷走神経切断(Vx)実験

2.12.1. 迷走神経切断手術

20 週齢前後の WT マウス及び KO マウスに対して 6 倍希釈したソムノペンチルをマウスに腹腔内投与(60 μ l / g BW)し、マウスを完全に眠らせた。その後開腹し、実体顕微鏡下で腹膜下迷走神

経を切断した(Vx)群と迷走神経を切断しない偽手術(Sham)群の2群を作製した。切断後、生理食塩水を腹腔内に充填し、AUTOCLIPにより開腹部を留め、使い捨てカイロまたは動物用ヒーターマット上で覚醒させた後、その後1週間を*Ad lib*条件で飼育して回復期間とした。

2.12.2. 経口グルコース負荷試験(Oral Glucose Tolerance Test: OGTT)

前日16:00より絶食処理し、翌10:00よりマウスの腹腔に3 mg / g BWのグルコース溶液を注入した。グルコース投与後、0, 15, 30, 60, 120, 180分に尾静脈から採血を行い、Glucose Pilot (Iwai Chemical, Tokyo, Japan)を使用した血糖値を測定した。さらに、ヘパリン入りチューブで血液を採取し4°C、1,500 ×gで10分遠心分離後、上清を回収し、血漿を調製した。

2.12.3. 血清中インスリン測定

血清中インスリンは超高感度インスリン測定キット(Morinaga Institute of Biological Science Inc.)を用いて測定を行った。

2.12.4. コレシストキニン負荷試験

Vx手術が正しく行われているか確認するため、コレシストキニン負荷試験による摂食量の解析を行った。OGTT解析から7日以上経過後、粉碎した固形ラボMRブリーダーを3日間以上与えることで粉餌トレーニングを行った。その後、試験前日18:00から絶食処理を行ったマウスに対して14:00からコレシストキニンオクタペプチド硫酸塩(Bachem, Bubendorf, Switzerland) 8 ng / g BWを腹腔内投与し、粉碎ラボMRブリーダーを与え、30, 60, 120分における摂食量の測定を行った。

2.13. 尿中カテコールアミンの測定

2.13.1. 採尿

11~12週齢のマウスを代謝ケージ(AS ONE Corp., Osaka, Japan)に入れて1日以上馴化させた後、24時間尿を回収した。先行研究[186]を参考に、カテコールアミン分解防止のため回収用

サンプルチューブに 6 M HCl 60 μ l を添加した。得られた尿は粗尿量を定量した後、6 M NaOH 60 μ l によって中和後、室温条件下 10,000 \times g で 5 分遠心し、尿量を測定しながら上清を回収した。

2.13.2. 標品とコントロール尿を用いた添加検量線用サンプルの作製

DL-エピネフリン (Tokyo Chemical industry Co. LTD.)、L-酒石酸ノルエピネフリン一水和物 (Tokyo Chemical industry Co. LTD.)、ドーパミン塩酸塩 (LKT Laboratories Inc., Minnesota, US) 、 3, 4-ジヒドロキシベンジルアミン臭化水素酸塩 (3, 4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide; DHBA)(Sigma-Aldrich Corporation)を標品として用いた。

各カテコールアミン標品を 0.1%トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetate; TFA)(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)に溶解し、1 mM Stock solution を作製した。各 1 mM Stock solution を混和して 25 μ M Mixture を調製した。任意のマウス尿 100 μ l に対し、25 μ M Mixture を 0, 9, 18, 36 μ l 加えた後に 0.1% TFA で 180 μ l にフィルアップして添加検量線用サンプルを作製した。

2.13.3. 尿中カテコールアミンの精製

添加検量線用サンプルまたは測定用尿サンプル 180 μ l に対して 10 μ M DHBA 20 μ l を内部標準として加えた後に、MonoSpin PBA カラム(GL Science, Tokyo, Japan)を用いて MonoSpin PBA カラム付属のプロトコールに従って精製を行った。精製した尿サンプルは HPLC で分析するまで -80°C で保存した。

2.13.4. HPLC による測定

HPLC は東京大学 薬学研究科 生体分析研究室において以下の条件で行った[187]。

移動相 : Acetate-citrate buffer (20 mM Acetate (Nacalai tesque), 20 mM Citrate (Kanto Chemical Co. Inc.), 4.6 mM Sodium octane-1-sulfonate (Tokyo Chemical industry Co. LTD.)) / Acetonitrile (KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd., Osaka, Japan) = 100 : 16

カラム:Inertsil ODS-4 (粒子径:5 μ m, 長さ:250 mm, 内径:3.0 mm)(GL Science)

流量:500 μ l/min

カラム温度:35°C

検出:ECD 800 mV vs. Ag / AgCl (電気検出器 ED703 (GL Science))

インジェクション量 : 20 μ l

得られたクロマトグラムから付属ソフトウェアを用いて各ピークの高さを算出し解析した。クロマトグラムの分析例を図 3-2 A~B に示した。

2.13.5. 尿中クレアチニン量測定

ラボアッセイ™クレアチニン(Wako Pure Chemical Industries)を用いて測定した。吸光度測定は Flexstation 3 を用いて行なった。

2.13.6. 解析

添加検量線用サンプルで検出された各カテコールアミンのピークの高さを内部標準(DHBA)のピークの高さで補正した値を用いて、添加検量線を作製した。測定サンプルも同様に DHBA のピークの高さで補正した値を用いて検量線から濃度を算出した。体重や尿量を補正するため、得られた各カテコールアミン濃度を尿中クレアチニン濃度で補正した。

3. 結果

3.1. Skn1 KO マウスの生物学的表現型の解析

3.1.1. 体重変化と体重増加量

Skn1^{+/+}(ヘテロ)マウス同士の交配で生まれた同腹仔マウスについて 3 週齢から 16 週齢まで体重の測定を行った。その結果、オス・メスともにSkn1^{-/-}(KO)マウスは、Skn1^{+/+}(WT)マウス及びヘテロマウスに比べて低体重を示した(図 3-3 A~B)。16 週齢のオスでは、WTマウス及びヘテロマウスはそれぞれ 29.84 ± 0.36 g、 29.26 ± 0.24 gであったのに対して、KOマウスは 27.37 ± 0.45 gであった。メスではKOマウスとヘテロマウスの差が小さく、WTマウスでは 22.71 ± 0.36 g、ヘテロマウスは 21.94 ± 0.21 g、KOマウスは 21.40 ± 0.36 gであった。ヘテロマウスとWTマウスはどちらもKOマウスよりも体重増加が見られたが、WTマウスの方がより顕著な体重の増加が見ら

れたことから、以降の解析ではWTマウスとKOマウスの2群を比較することにした。

遺伝子型の違いによる体重差は3週齢から生じていたが、3週齢以降の成長でも差がみられるかを明らかにするため、3週齢(離乳時)を起点として、各週齢の体重から3週齢の体重を減じて体重増加量を算出した。その結果、オスではKOマウスの体重増加量(19.88 ± 0.34 g)がWTマウスの体重増加量(20.90 ± 0.29 g)に比べ低値を示した(図 3-4 A)が、メスの体重増加量は遺伝子型の違いによる変化は見られなかった(図 3-4 B)。KOマウスで生じる低体重は両性で見られたが、メスは体重増加量に差が見られなかったことから、3週齢までに生じる体重差が16週齢までの体重差に影響したことが示唆された。一方、オスは体重増加量にも差が見られたことから、3週齢までと3週齢以降で生じる体重増加が遺伝子型によって異なるためメスよりも体重差が顕著であることが示された。遺伝子型の違いによる成長の違いを明らかにすることを目的としたため、以降の実験で3週齢以降のマウスを解析するときにはオスのみを用いた。

3.1.2. 出生直後と離乳時の体重の変化

体重差が生じる時期が出生前後のどちらであるかを検討するために1日齢(出生直後)のマウスの体重を測定した結果、遺伝子型による体重差は見られなかった(図 3-5 A)。しかし、同じ個体を3週齢まで飼育し体重測定を行った結果、図 3-3 と同様にKOマウスはWTマウスと比べ有意に低体重を示した。この実験において出生直後では性別の判定が難しく、3週齢の体重ではオス・メスに差がない(Data not shown)ことから性別を分けずに行った。以上の結果より体重差が生じた時期は出生後であることが示されるとともに、胎児期の成長は正常であるが出生後の成長に変化が生じていることが示唆された。

出生直後に体重を測定したマウスが、離乳までに死亡するケースが多かった。このため、出産直後の親マウスにストレスをかけてしまい親マウスが全仔マウスを食殺した場合を除外した各遺伝子型の仔マウスの生存率を求めた。その結果、WTマウスの生存率は約90%であったが、KOマウスの生存率は約70%に低下していた(図 3-5 B)。KOマウスは、出生から離乳時までの体重増加が少ないため親からの食殺対象になりやすいと考えられる。

3.1.3. 摂食量の解析

体重増加量の違いが摂食行動に起因しているか明らかにするために、4, 8 週齢において摂食量の測定を行った。その結果、各週齢において摂食量の差は見られなかった(図 3-6 A~B)。KO マウスが低体重を示す原因は摂食量の低下ではなく、吸収や代謝など摂食以外の要因であることが考えられた。

3.1.4. 体組成の解析

低体重を示す原因として、全身における成長抑制が生じている可能性、または脂肪組織や筋肉が少ないなど体組成が変化している可能性が考えられた。この可能性を検討するため、4~5 ヶ月齢のマウス(体重を図 3-7 A に示した)に対して X 線 CT による体組成の解析を行ったところ、KO マウスは WT マウスに比べて筋肉量及び脂肪量が低下していた(図 3-7 B)。体重で補正した脂肪量は KO マウスで有意に低値を示したが、筋肉量は変化していなかった(図 3-7 C)。筋肉量と脂肪量のバランスを示す体脂肪率は、KO マウス($19.24 \pm 1.63\%$)では、WT マウス($13.29 \pm 2.12\%$)に比べて有意な低値を示した(図 3-7 D)。以上の結果より、KO マウスは WT マウスに比べて脂肪組織が少ないマウスであることが示された。

摂食量には変化がないが脂肪組織が少ないマウスは、栄養素の吸収に問題がある可能性、または脂肪代謝(脂肪蓄積の抑制や脂肪消費の亢進)が変化している可能性の 2 つの仮説が考えられた。

3.2. KO マウスの生化学的表現型の解析

3.2.1. 間接カロリメトリーによるエネルギー代謝解析

低体重を生じる原因が、エネルギー利用などの栄養素代謝に変化が生じているかについて検討を行った。4 ヶ月齢前後の同体重のマウスを代謝チャンバーに入れ、一定時間内(22 時間)における酸素消費量(VO_2)と二酸化炭素排泄量(VCO_2)を測定した。絶食条件下で解析を行った結果、KO マウスの VO_2 は明期及び 22 時間合計において WT マウスに比べ高値を示した(図 3-8 A)。KO マウスの VCO_2 は明期のみで WT マウスに比べ高値を示し、22 時間合計では上昇傾向を示した(図 3-8 B)。これらの数値を用いて、エネルギー消費量・RER を算出した結果、RER は KO マウス($0.81 \pm$

0.01)では、WTマウス(0.84 ± 0.01)に比べて有意に低下した(図 3-8 C~D)。また、KOマウスのエネルギー消費量(263 ± 9 kcal/kg)はWTマウス(232 ± 9 kcal/kg)に比べて有意に上昇していた(図 3-8 E~F)。運動量には遺伝子型の違いによる変化(図 3-8 G~H)は見られなかった。エネルギー消費量の増加はエネルギー産生が亢進していることを示し、RERの低下は利用された栄養素における脂質の割合が高いことを示す。以上の結果より、KOマウスでは運動非依存的に、脂質の利用が亢進することで体脂肪の蓄積が抑制されている可能性が示された。また、エネルギー消費量や呼吸交換比など、遺伝子型による変化が観察された各項目は 22 時間全体でも差が見られたが、暗期に比べ明期の方がより明確な差が見られた。

3.2.2. 血液生化学データ解析

体重測定を終えた 4~6 ヶ月齢マウスを *Ad lib* 条件下で採取した血液から血清を調製し、血液生化学データの解析を行った。その結果、T-KB, F-CHO が KO マウスにおいて有意な高値を示した他、ALP, T-CHO, HDL は上昇傾向、GLU は低下傾向を示した(図 3-9 A~E)。

また、3~4 ヶ月齢マウスを 18 時間絶食後に解剖を行い、同様の項目について血液生化学データの解析を行った。その結果、ALP, T-KB が KO マウスにおいて有意な高値を示した他、NEFA の上昇傾向や TP の低下傾向が示された(図 3-10 A~D)。

異なる飼育条件のマウスを解析したにも関わらず、両者で共通して変動する項目(ALP, T-KB)が見られた。ALP の上昇より肝臓や胆道などにおいて何らかの変化があったことが示唆された。T-KB の上昇より脂肪酸 β 酸化やケトン体合成などの亢進、特にマウスのケトン体合成は肝臓でのみ行われることが知られているため、肝臓の脂質代謝の亢進が示唆された。さらに摂食と絶食のそれぞれの解析においてコレステロール(T-CHO, F-CHO)や、WAT からの脂肪分解を示す NEFA にも変化が見られていたことから、脂質代謝の変化がより強く示唆された。また GLU や TP が低下したことから関連物質の代謝にも影響していることが示唆された。

3.2.3. 血圧及び心拍数

エネルギー消費の亢進が生じる原因として、交感神経の興奮が有力であると考えた。この理由

として交感神経の興奮が生じると副腎からカテコールアミンが分泌され脂肪細胞における脂肪分解の亢進が生じることが知られている[188,189]。交感神経の興奮の程度は血圧や心拍数の上昇にも反映されるため血圧測定による検討を行った結果、KOマウスの平均血圧(Mean blood pressure; MBP)、最低血圧(Diastolic blood pressure; DBP)はWTマウスに比べて有意に低下し、最高血圧(Systolic blood pressure; SBP)も低下傾向であった(図 3-11 A)。また心拍数(Heart rate; HR)に変化は認められなかった(図 3-11 B)。これらの結果は、血圧が上昇するという当初の予想に反してKOマウスが低血圧であることを示しており、エネルギー消費の亢進は交感神経の興奮等による変化ではないこと及び、血圧が低下する別の機構が働いている可能性が示唆された。

3.2.4. 直腸温の測定

T-KB の上昇とエネルギー消費量の上昇より、何らかの機構で大量にエネルギーを消費されていることが予想された。そこでエネルギー利用方法の一つである熱産生について検討するために 4 ヶ月齢前後のマウス直腸温の測定を行った。その結果、遺伝子型による有意な変化は見られなかった(図 3-12 A)。熱産生は BAT や骨格筋における脱共役タンパク質(UCP)による働きが大きいですが、直腸温の変化が見られなかったことから KO マウスと WT マウスでは熱産生に変化が生じていないことが示唆された。

3.2.5. 肝臓 DNA マイクロアレイ解析

・サンプル間階層的クラスタリング及び発現変動遺伝子の抽出

qFARMS 法により正規化を行った肝臓 DNA マイクロアレイデータを用いてサンプル間階層的クラスタリング解析を行った。その結果、1 サンプル(WT-30-2)を除き WT マウスがクラスターを形成し WT マウスクラスターの外側に KO マウスのサンプル群がプロットされた(図 3-13)。この結果より、遺伝子型の違いにより肝臓遺伝子発現プロファイルが大きく変化していることが示唆された。続いて、qFARMS と相性の良い二群間比較である Rank products 法を用いて、FDR < 0.05 を満たす発現変動プローブセットを抽出し、WT マウス群に対して KO マウス群で発現上昇した 1020 プローブセットと、発現低下した 1304 プローブセットを抽出した。

・発現変動遺伝子の機能解析

ウェブツール DAVID を用いて発現変動遺伝子に関する機能解析を行い、Benjamini の多重比較補正した EASE Score < 0.05 を満たす、有意に濃縮された GO term を抽出した。その結果、エネルギー代謝に関する GO term が多く抽出され、発現上昇した遺伝子群からは解糖やコレステロール合成に関する GO term が抽出された(表 3-1)。発現低下した遺伝子群からは糖代謝や脂質代謝、アミノ酸代謝に関連する GO term が抽出された(表 3-2)。エネルギー代謝関連の GO term が多く抽出されたこと、血液生化学データより脂質代謝関連項目に大きな変化が生じていたことから、エネルギー代謝経路に着目して糖代謝関連遺伝子(表 3-3)と脂質代謝関連遺伝子(表 3-4)の発現変動遺伝子解析を行った。糖代謝として、解糖関連遺伝子は発現上昇・低下どちらの発現変動遺伝子も含まれていた(図 3-14 A)。一方で糖新生に関連する不可逆遺伝子は全て発現低下していた(図 3-14 B)。この結果より、解糖は大きな変化が起きていない一方で、糖新生は抑制されている可能性が示唆された。脂質代謝に関しては T-KB の上昇や脂質利用が亢進していた結果から、脂肪酸 β 酸化やケトン体合成経路の亢進が予想されたが、脂肪酸 β 酸化(図 3-14 C)やケトン体合成経路(図 3-14 D)関連遺伝子群の多くが発現低下しており、脂質分解代謝の抑制が示唆された。この結果は、上述のエネルギー消費量や T-KB の上昇などから示された脂質分解の亢進とは相反する結果であった。

3.2.6. 筋肉におけるミトコンドリアコピー数と DNA マイクロアレイ解析

マウスで肝臓や BAT と並びエネルギーを大量に消費する組織として筋肉が挙げられる。解剖時に腓腹筋を摘出したところ、WT マウスに比べ KO マウスの腓腹筋の方が赤く見え(Data not shown)、赤筋化している可能性が考えられた。赤筋化はミトコンドリアコピー数の増加によって生じるため、腓腹筋におけるミトコンドリアのコピー数について検討を行った。ミトコンドリア遺伝子(Cytochrome b; Cytb)数と、細胞数(ゲノム DNA 由来遺伝子(β -actin; Actb)数)との割合を算出した。その結果、KO マウスは WT マウスに比べて、ゲノム DNA 由来の遺伝子数に対するミトコンドリア遺伝子数の比率が有意に高く(図 3-12 B)、細胞あたりのミトコンドリアコピー数が有意に約 2.1 倍増加していることが示された。しかし、ミトコンドリアコピー数が増えてエネ

ルギー産生を行っても、産生したエネルギーをどのように利用しているかは不明である。そこで筋肉の遺伝子発現変動について肝臓同様に DNA マイクロアレイ解析を行い、ミトコンドリア内で発現する遺伝子に着目して解析を行った。その結果、腓腹筋における熱産生を司る **Uncoupling protein 3 (Ucp3)** の発現上昇が見られた(表 3-5)。以上より、筋肉ではミトコンドリア数が増加することによって Ucp3 による熱産生が亢進し、血中のケトン体を筋肉が熱産生に利用するという経路が示唆された。

3.3. HFD 負荷による KO マウスの変化

3.3.1. 体重変化及び体重増加量摂食量

4 週齢から HFD を与えた飼育を行い、各週齢の体重を測定した。その結果、CD(MR ラボブリーダー)飼育時と同様に KO マウスは WT マウスに比べて低体重を示した。しかし CD 飼育時に比べて遺伝子型による体重差が顕著であり、16 週齢時点では WT マウスは 39.52 ± 0.85 g まで増えた一方で KO マウスは 30.35 ± 0.89 g までしか増加しなかった(図 3-15 A)。CD 投与時と比較すると、16 週齢の時点において WT マウスでは約 1.3 倍、KO マウスでは 1.1 倍増加していた。体重増加量に関しても、CD に比べて遺伝子型による顕著な差が見られ、WT マウスでは 30.31 ± 0.76 g であった一方、KO マウスでは 22.92 ± 0.84 g であった(図 3-15 B)。この結果は、KO マウスの HFD に対する感受性は WT マウスに比べて低く、KO マウスは食餌誘導性の肥満が著しく抑制されたことを示している。

3.3.2. 摂食量の解析

CD 同様に 4, 8 週齢に加え、15 週齢時においても摂食量の測定を行った結果、各週齢において遺伝子型による摂食量の差は見られなかった(図 3-16 A~C)。この結果は、CD 同様に KO マウスと WT マウスとの間に体重差が生じる原因が、体内での物質代謝や消化管での栄養素吸収の変化が原因となっている可能性が示唆された。

3.3.3. 糞中脂質の解析

これまで摂食量は変化せず、生体内の代謝の変化を示す結果が数多く得られてきたが、摂食量に対する栄養素吸収量が低下すれば体重増加が抑制される可能性が考えられた。そこで、消化管における脂質吸収について検討を行うため、15週齢時に採取した乾燥糞中の脂質量の測定を行った。その結果、1gあたりの糞中TG量は遺伝子型の違いによる変化がみられなかった(図3-17A)が、1gあたりの糞中BA量は、WTマウスがKOマウスに比べて有意な高値を示した(図3-17B)。この結果は食餌由来のTG吸収量には変化がなかったことを示し、エネルギーの出納は遺伝子型の違いによる変化がなかったことが示唆された。またWTマウスの1gあたりの糞中BA量がKOマウスに比べて有意な高値を示したことは、肥満により分泌される胆汁酸量が増加した可能性または小腸でのBA吸収量の減少によりコレステロール排出が亢進している可能性が示唆された。

3.3.4. 体組成及び直腸温の解析

HFDでは、CD同様に脂肪蓄積量が低下しているかを検討するため、4~5ヶ月齢のマウスに対してCTによる体組成の解析を行った。測定に用いたマウスの体重は図3-18Aに示した。その結果、KOマウスはWTマウスに比べて筋肉量及び脂肪量の低下が見られた(図3-18B)。体重あたりの脂肪量はKOマウスで有意に低値を示したが、体重あたりの筋肉量は変化していなかった(図3-18C)。筋肉量と脂肪量のバランスを示す体脂肪率は、KOマウス($27.89 \pm 13.02\%$)がWTマウス($34.50 \pm 7.96\%$)に比べて低値を示した(図3-18D)。以上の結果は、HFDで飼育したKOマウスはWTマウスと比べてCDと同様に、脂肪組織が少ないマウスであることが示された。

また測定時に直腸温の測定を行ったところ、遺伝子型による有意な変化は見られなかった(図3-18E)。こちらもCDで飼育した時と同様に、KOマウスは熱産生においては変化しないことが示唆された。

3.3.5. HFD投与時のエネルギー利用の解析

CD飼育時に見られたエネルギー消費の亢進がHFD投与でも生じているか明らかにするために、間接カロリメトリーによるエネルギー利用解析を行った。栄養状態によって結果が大きく変化することが予想されたため、絶食及び*Ad lib*条件下における測定を行った。測定に利用した17~19

週齢の KO マウスは同週齢の WT マウス(WT(week))と約 1.3 倍の体重差がついていたことから、体重の違いによる影響を排除するために、同体重(約 30 g)を示す 8~9 週齢の WT マウス(WT(BW))も同時に測定を行った。

*Ad lib*条件下で測定した結果、 VO_2 と VCO_2 は全測定期間(22 時間、明期、暗期)を通じてKOマウスとWT(BW)マウスで、WT(week)マウスに比べて高値を示していた(図 3-19 A~B)。これらから算出されたRERは各マウス間で変化は見られなかった(図 3-19 C)が、エネルギー消費量はKOマウスとWT(BW)マウスの方がWT(week)マウスに比べて高値を示していた(図 3-19 D)。運動量は各マウス間で変化は見られなかった(図 3-19 E)。この結果から運動量には変化がないが、KOマウスとWT(week)マウスはWT(BW)マウスに比べてエネルギー代謝が亢進していることが示唆された。

絶食条件下での測定の結果、全測定期間を通じて VO_2 と VCO_2 はKOマウスの方が、WT(week)マウスやWT(BW)マウスに比べて高値を示していた(図 3-20 A~B)。RERはWT(week)マウスとWT(BW)マウスで変化が見られたが、KOマウスとの比較では変化は見られなかった(図 3-20 C)。エネルギー消費量は、*Ad lib*条件下での測定は異なり、KOマウスが、WT(week)マウスやWT(BW)マウスに比べて高値を示していた(図 3-20 D)。運動量は各マウス間で変化は見られなかった(図 3-20 E)。絶食条件下の測定結果からも、KOマウスは恒常的にエネルギー代謝が亢進していることが示された。

以上の結果より、測定条件の異なる各エネルギー利用解析において運動量の変化は伴わずにKOマウスのエネルギー消費量が高値を示したことから、KO マウスは恒常的にエネルギー消費が亢進していることが示された。

3.3.6. 血液生化学データの解析

HFD で飼育した 4~5 ヶ月齢マウスを *Ad lib* 条件下で解剖し、血液生化学データの解析を行った。その結果、KO マウスは WT マウスに比べて、肝機能項目(ALT, LDH)、脂質項目(TL, 各種コレステロール(T-CHO, F-CHO, E-CHO), LDL-C)の項目で有意に低値を示した(図 3-21 A~E)。一方で、GLU のみ有意に高値を示した(図 3-21 F)。CD 飼育時では KO マウスで高値を示してい

た肝機能項目や脂質項目が、HFD 投与により逆の結果が得られた。GLU に関しても CD 飼育時とは逆に WT マウスよりも KO マウスで上昇しており非常に興味深い結果を得た。

3.4. 脳を介した摂食刺激応答ネットワークの解析

3.4.1. 迷走神経切除による耐糖能の変化

横隔膜下迷走神経切除(Vx)後に OGTT を行い、血糖値の経時変化を解析した。本解析のみ遺伝子型により遺伝的背景が異なるため WT マウスと KO マウスで分けて評価を行った。WT マウスは、グルコースの投与により生じる血糖値の上昇が Sham 群に比べ Vx 群において有意に抑制された(図 3-22 A)。特に、グルコース投与後 30, 45, 60 分の時点では有意に Vx 群で血糖値が有意に低く、90 分の時点でも低値を示す傾向であった。KO マウスはグルコース投与直前(0 分)の時点で Vx 群は Sham 群に比べて血糖値が有意に高値を示したが、OGTT 後は WT マウスで見られた血糖値上昇抑制は見られなかった(図 3-22 B)。この結果より、WT マウスでは脳と末梢組織との連絡を遮断すると OGTT 後の血糖値の変化に対する影響が現れたが、KO マウスでは脳と末梢組織の連絡を遮断しても影響が見られず、KO マウスは迷走神経を介した連絡経路が機能していない可能性が示唆された。

続いて、OGTT 時に採集した血漿よりインスリン分泌量の測定を行った。その結果、WT マウス及び KO マウスで、Sham 群と Vx 群の間でインスリン分泌量に差は見られなかった(図 3-23 A~B)。インスリン分泌量はすなわち迷走神経による情報伝達に影響されないことが示唆された。

3.4.2. コレシストキニン(CCK)投与による迷走神経切除の確認

Vx 手術によって迷走神経が切断できているか確認するために、OGTT を実施したマウスに対して CCK 投与後の摂食量解析を行った。本実験を行うにあたり、KO マウスは CCK 感受能が存在するかが不明であったが、Vx 前後の摂食行動は WT マウスと KO マウスとで変化が無いため、摂食調節因子の一つである CCK も受容することが考えられた。CCK 投与の結果、WT マウス及び KO マウスで、Vx 群に比べ Sham 群の摂食量が低下していた(図 3-24 A~B)。この結果は、各マウスの CCK 感受性が Vx 群と Sham 群で異なっていることを示し、迷走神経が切断されていた

ことを確認した。

3.4.3. 甲状腺ホルモン分泌量の変化

Vx マウスの解析より迷走神経の情報伝達に変化していたことから、消化管と脳の関係が変化していることが示唆された。脳は積極的な代謝調節を行うことから、エネルギー消費が亢進する原因が脳にある可能性について検討を行った。脳が分泌制御する因子としてホルモンによる調節及びカテコールアミンの 2 種を想定した。まず、脂質分解亢進を担う甲状腺ホルモン(T3 及び T4) について HFD で飼育した 11~12 週齢のマウスを対象として測定したところ、遺伝子型による変化は見られなかった(図 3-25 A~B)。この結果は KO マウスの脂質分解亢進が、甲状腺ホルモン非依存的に生じていることが予想された。

3.4.4. 尿中カテコールアミンの変化

脂質代謝の亢進が生じる原因の一つとして考えた甲状腺ホルモン分泌量には差が見られなかったことから、カテコールアミンについて検討を行った。カテコールアミンは神経伝達物質であると同時に、交感神経の興奮によって副腎で産生されるホルモンであり、エピネフリンやノルエピネフリンは絶食時に体内でのエネルギー産生を亢進させるために放出され、脂質代謝亢進作用を持つ。これら脂質代謝亢進因子であるカテコールアミン分泌量が上昇している可能性を検討するために、非ストレス由来の尿中カテコールアミンの測定を行った。尿量や体重などの補正には尿中クレアチニン濃度を用いた。甲状腺ホルモン測定した条件と同様に HFD で飼育した 11~12 週齢マウスの 24 時間蓄尿を行い、尿中カテコールアミンを測定した。その結果、KO マウスは WT マウスに比べエピネフリン及びドーパミンが有意に高値を示し、ノルエピネフリンも高値を示す傾向が得られた(図 3-26)。カテコールアミンが尿中に多量に排泄されたことは、体内における分泌量も増加していることが予想される。KO マウスはカテコールアミンの分泌の増加によって脂質分解が亢進しているという制御経路が示唆された。

4. 考察

4.1. KO マウスが示す低体重に関する考察

KO マウスが WT マウスに比べて低体重を示すことについて考察を行う。低体重が生じた期間は、(1)胎児期、(2)離乳期前、(3)離乳後が候補として挙げられる。

まず(1)胎児期で生じる低体重の原因として、母体内での成長不良が考えられる。真核生物翻訳開始因子 3(eukaryotic translation initiation factor 3; eIF3)の m サブユニット遺伝子欠損マウスは母体内での成長が著しく抑制され致死となる他、ヘテロマウスも成長不全を示し出生後も含め持続的に低体重を示す例が報告されている[190]ように、母体内において成長が生じると出生後の体重増加にも非常に大きな影響を与える。しかし、本実験において出生直後のマウスにおける体重測定の結果は差が見られなかった。3 週齢時の体重では遺伝子型によって有意な体重差が見られたため、体重差が生じる時期は(2)離乳期前の成長過程であると強く示唆された。また、出生直後に体重測定を行ったマウスは、離乳時においては体重差が確認できたことより、解析に用いた個体群が偏っているとは考えにくい。

(1)胎児期で変化が見られず(2)の離乳期前の成長で体重差が生じる原因として栄養素の供給ルートが大きく異なることが考えられる。胎児期(出生前)は血液を通して母体から栄養素が供給されるが、出生後は摂食により食物を取り入れ消化管で栄養素を吸収する。このため、摂食開始後に発生する何らかの要因が成長に影響を与えると考えられる。具体的な候補としては、消化管の機能が KO マウスで変化している可能性及び摂食量など摂食行動の変化(母乳摂取量の違い)が生じている可能性が考えられた。先行研究においても消化管機能が変化している場合には母体内や母乳飼育時には変化がないが、栄養素の摂取を変えた時に初めて現れる表現型も報告されている。例えば、腸管に発現するナトリウム-グルコース共輸送体(SGLT1)遺伝子欠損マウスでは母乳飼育時には正常に発育するが、離乳後はグルコース及びガラクトースを吸収できないことからグルコース・ガラクトース除去食を投与しないと生存できない[191]。母乳摂取量を測定することは技術的に困難であり測定できなかったが、離乳後の摂食量には差がないことから摂食行動は正常であると考えられ、母乳摂取量には遺伝子型による差がないと考えている。

(3)離乳後の成長についても、オスの体重増加量は WT マウスに比べ KO マウスで有意に低値を示すという結果から、離乳後の成長も体重差に影響を及ぼしていることが示された。CT を用いた

解析により体脂肪率の低下が示されたことから、KO マウスが低体重を示す原因は「摂取エネルギー量の違い」または「エネルギー利用の変化」の2つの仮説が考えられた。

前者に対して、摂食量が少なければ成長に利用できるエネルギーが限られるため低体重が生じる。これまでにも、摂食量と体重変化に非常に強い相関があることを示す報告[192]や、人工的に摂取カロリー制限して飼育すると、自由摂食で飼育した時に比べて体重が低下することが報告されている[193]。実際に摂食量の比較による検討を行ったが、各週齢において摂食量に有意な変化は見られなかった。さらに、HFD 飼育時の糞中 TG 濃度にも影響がなかったことから脂質吸収に関しては遺伝子型による差が生じていないことが示唆された。以上の結果は、摂取したエネルギー量(摂食量)と排泄されたエネルギー量には遺伝子型による違いがないことから、体内に吸収されたエネルギー量も遺伝子型による変化がなかったことを示している。

次に、エネルギー利用が変化した可能性については間接カロリーメトリーを用いたエネルギー代謝解析により検討し、KO マウスにおけるエネルギー消費の亢進が示された。この結果は、CD 及び HFD の両方で見られたことから、餌の脂肪含量に依存しないことを含めて示し信頼性が高い知見であると考えられる。以上の結果から、低体重の原因が摂食し体内に吸収されたエネルギー量の差ではなく、マウスのエネルギー消費が亢進した結果、蓄積される脂肪が減少し体脂肪率が低下し低体重を示したという仮説が妥当である。

続いて性差による結果の違いについて考察する。オスの体重変化は3週齢までに生じた変化に加え、3週齢以降の体重変化でも差があったことから継続的に成長に違いが生じたのに対して、メスの体重差は出生時から3週齢までの体重変化のみが3週齢以降の体重変化に反映されていることが示された。このような性差は、先行研究においても数多く報告されている[194]。これらの多くはメス特有の性周期によるものであると考えられる。この理由として、性周期のばらつきが個体のばらつきに繋がる他、周期的に代謝が変化するため影響が相殺していくと考えられている。本研究においても性成熟以前である3週齢までの結果は雄と一致しているものの、4週齢以降はその差が見られなくなっていることからオスで得られた結果がメスで得られなかった理由は性周期によるものと考えられる。先行研究の多くでも性周期がないオスを利用することが多いため、本研究でも以降の解析にオスを利用することとした。

HFD で飼育を行ったマウスは遺伝子型によって顕著な体重差を示した。CD での飼育時には遺伝子型による体重差は 2~3 g 程度であったが、HFD での飼育時には WT マウスは約 40 g まで体重が増加した一方、KO マウスは約 30 g までしか増加しなかった。この体重(約 30 g)は CD 投与時の WT マウスと同程度であり、肥満の発症が抑制されたと考えられる。このような食餌の質によって体重差が変化した結果は、HFD により脂質を大量に取り込んだことによって体重差がより顕著になったことを示し、脂質代謝が大きく変化した結果であることが示唆された。

生じた体重差が質的な変化に起因しているかを調べるために CT を用いた体組成の解析を行った。CT による体組成分析は解剖による組織重量の比較と比べて、非侵襲的に行うことができる点、解剖技術に依存せず同条件で各組織を測定できる点、WAT のように皮下・腎周囲・鼠径部・精巣周囲など様々な部位に分かれている組織を同時に評価できる点など数多くの利点が挙げられる。測定の結果、KO マウスにおいて体重あたりの筋肉には変化が認められず、脂肪組織が減少しており体脂肪率の低下という質的な変化を示した。以上の結果から KO マウスの脂肪組織の減少が示され、脂肪の蓄積経路に問題が生じているか、脂肪利用の過剰亢進が考えられた。しかし既に、エネルギー利用解析においてエネルギー消費量の亢進が示唆されていることから、脂肪利用の過剰亢進によるものと考えた。また、HFD 飼育時の体組成も CD 飼育時と同様の知見が得られたことから脂質代謝の変化が生じている可能性が示唆された。

最後に、遺伝子型によるエネルギーの出納に関して議論を行う。吸収したエネルギーが少なければ低体重を示す理由になる。この可能性について検討を行うため、CD 飼育時及び HFD 飼育時の両方で複数の週齢 (4, 8, 15 週齢) での摂食量の測定を行ったところ、遺伝子型の違いによる摂食量の変化は認められず、摂取エネルギーには変化がなかった。一方、栄養素吸収に変化があっても体内で利用可能なエネルギー量は減少するため、栄養成分の消化管内における動態も重要である。使用した HFD32 の脂質成分(粉末牛脂、紅花油由来)の大部分は TG の形態として含まれているため、リパーゼの分泌不全や吸収に問題が生じると分解や吸収を受けない TG が増加し、糞として排泄される。栄養成分の吸収については糞中 TG 解析の結果、遺伝子型による有意な変化は見られなかったから、食餌由来の TG の吸収に関しては遺伝子型による変化がなかったことが示唆された。摂取エネルギーと吸収エネルギー量で遺伝子型による差がないことから、各遺伝子

型のマウスで吸収されたエネルギーはほぼ等量であることが示唆された。BA は消化管に分泌されてミセルを形成し食餌由来の脂質を効率的に吸収する働きが主である他、消化管内の BA は回腸で吸収され肝臓に戻り腸肝循環と呼ばれる循環系を形成している。BA はコレステロールが酸化された代謝産物であるため、糞中に排泄される BA は回腸での吸収を逃れたものでありコレステロール排出の指標になる[195]。本実験において WT マウスの糞中 BA 濃度が KO マウスに比べて有意に高値を示していたことは、コレステロール排出が亢進していたことを示す。コレステロール排出亢進の原因は、コレステロール合成やステロイド代謝産物が増加したことによる腸管内への分泌増加及び、回腸における BA 吸収低下による可能性が考えられる。これらの仮説に対しては、血液生化学データから各種コレステロール量が KO マウスに比べて WT マウスで有意に高値を示していたことから、消化管への BA の分泌亢進または再吸収の低下によって、糞中 BA 排泄量が増加した可能性が高い。以上の知見から、KO マウスで胆汁酸やステロイド代謝産物が低下したと考えるのではなく、WT マウスが HFD 摂取により肥満を発症したことによる副次的な影響であって、KO マウスは肥満を発症していないことから有意な変化が生じたと考えられる。

以上より KO マウスは WT マウスと比較して、摂取エネルギーが不足しているため低体重が生じたのではなく、生体内における脂質利用パターンの変化によって低体重が生じていることが示唆された。

4.2. KO マウスにおけるエネルギー利用の変化に関する考察

KOマウスで生じた低体重が脂質蓄積量の低下によることが示唆されたため、脂質代謝の変化に関して検討を行った。まずCDで飼育した同体重のマウスを用いて間接カロリーメトリーによる解析を行った結果、 VO_2 及び VCO_2 上昇しエネルギー利用が活性化していることが示唆された。生体内でのエネルギー産生に利用された栄養素のバランスを示すRERはKOマウスで低下し、脂質が利用される割合が高いことが示唆された。エネルギー消費量に関してもKOマウスで高値を示したことから、エネルギー産生が活性化したことが示された。一方、運動量に変化が見られなかったことから、運動によるエネルギー消費量の増加ではないことが示唆された。

HFD 投与時のエネルギー利用解析では、CD 飼育マウスの解析時と異なり、4 ヶ月齢のマウス

では KO マウスは WT マウスに比べ体重が約 10g(WT マウスの約 77%)異なり、体の大きさの違いが顕著であった。一定温度のもとでは動物の熱発生と酸素消費量は体表面積に比例するというループナーの体表面積の法則を加味すると、体重が顕著に異なるマウスを比較することが適切ではない可能性が懸念された。そこで解析に利用した KO マウスと同週齢の WT マウス(WT(week))に加え、KO マウスとほぼ同体重を示す約 9 週齢 WT マウス(WT(BW))を同時に解析した。また、栄養状態によっても結果が異なる可能性が考えられたため、*Ad lib* 条件下及び絶食条件下の両方での解析を行った。その結果、*Ad lib* 条件下においては、RER に変化が見られなかった一方で、エネルギー消費量は KO マウスや WT(BW)マウスでは WT(week)マウスに比べて高値を示した。体表面積が大きいとエネルギー消費量が大きくなるため、本研究においても WT(week)マウスで消費エネルギー量が高値を示す可能性を考えていたが、予想に反して KO マウスの方が大きかった。この結果は、KO マウスが体表面積の違いを超えて消費エネルギーが増大したものと考えられる。さらに、WT マウス同士でもエネルギー消費量に差が生じているが、8~9 週齢は性成熟期直後の成長が著しい期間であるためエネルギー消費が亢進したことが予想される。絶食条件下におけるエネルギー消費量の解析の結果、RER は WT 同士では週齢によって変化していることが示された一方で、KO マウスに対して各 WT マウスは変化が見られなかった。CD 飼育時において KO マウスで RER の低下が認められたが、HFD 飼育時には見られなかった原因としては HFD 投与によって基礎の RER が低下していることが考えられた。これは CD 飼育時には主に糖質を利用する RER が比較的 1 に近い値を示す一方で、HFD では摂取エネルギーにおいて脂質が占める割合が多いため、エネルギー産生にも脂質が多く利用されて全体的に RER が低下するためと考えられる。HFD 摂取により基礎の RER が低下することによって、RER の差が見られなくなった可能性が高いと考えられる。また、KO マウスのエネルギー消費量は各 WT マウスに比べ顕著に増加していた。これは KO マウスで恒常的にエネルギー消費が亢進していることを示しただけでなく、WT(BW)マウスでは *Ad lib* 条件では KO マウスと変わらなかった一方、絶食条件では KO マウスに比べて低下していた結果は興味深い。若齢マウスの方が栄養状態の影響を受けやすい可能性が考えられた。以上の結果は、全て運動量に差がないことから、体内の代謝の変動によって生じたことが支持されている。CD 及び HFD で行った全ての実験で、KO マウスのエネルギー消費

量が増加していたことは普遍的な変化であることが示唆された。

また、間接カロリメトリーを用いた CD および HFD の解析の中で、顕著な変化が見られたのは明期であった。この原因はマウスの運動量には遺伝子型による変化が見られないものの、明期は暗期に比べてマウスの運動量が少ないことによって、純粋な基礎代謝を見ることができたためであると考えている。

血液生化学データでは、CD 飼育時と HFD 飼育時では大きく異なる結果が得られた。まず、CD 飼育時においては肝機能項目(ALP)や脂質項目(T-KB, NEFA, 各種コレステロール)は KO マウスが高値を示した一方で、TP や GLU など脂質以外の栄養素に関する項目は低値を示す傾向が得られた。この結果は、KO マウスのエネルギー消費量の亢進に加え、脂質利用率が上昇していたことから、WAT での脂質分解の亢進による NEFA の上昇、NEFA を利用した肝臓での T-KB の産生と続くことで、血中での T-KB が上昇する一方で、TP や GLU などの消費が低下している可能性が考えられる。ALP は肝機能マーカーとして利用されているが、HFD 飼育時など脂質代謝の変化でも上昇すると報告されていること[196]から、KO マウスにおける脂質分解の亢進により肝細胞にストレスがかかり、ALP に影響した可能性が考えられる。HFD 飼育時では肝機能項目(ALT, LDH)および脂質項目(TL, LDL-C, 各種コレステロール)において WT マウスが KO マウスに比べ高値を示し、有意な差が見られた項目は異なるものの食餌の質的变化によって逆の結果を得た。この食餌の質によって反対の結果を得たことに関しては、HFD 負荷によって、WT マウスで肥満を発症した影響が大きいと考えられる。先行研究でも肥満により、肝機能項目の上昇や脂質関連項目の上昇が数多く報告されている[196]。HFD 負荷により WT マウスが肥満を発症し、脂質項目が上昇したことで肝臓に負荷がかかり肝機能項目の値が上昇した可能性が考えられる。しかし、脂質代謝が恒常的に亢進している KO マウスは HFD 負荷でも肥満を発症しないため、肝機能項目に変化がなかったと考えられた。また、T-KB にも変化は見られなかったことに関しては、肥満によりケトン体産生の亢進が生じることが報告されていることから[197]、HFD 負荷をかけたために KO マウスとの差が見られなくなったと考えられる。糖代謝に関しても KO マウスが WT マウスに比べ血清中グルコース(GLU)の項目で高値を示していたことは興味深い。この結果は、エピネフリンを初めとするカテコールアミンは血糖値上昇作用があることから、尿中カテ

コールアミンの排泄亢進との関連性が高いと考えられるが、下記の 4.4. で詳しく言及する。

この脂質代謝の変化が起きている原因としてケトン体に着目した。ケトン体は絶食に陥るなどエネルギーが不足すると WAT の TG が分解され、血中に NEFA として放出され肝臓における脂肪酸β酸化を伴い産生され[198]、他の組織でのエネルギー源となる。本研究において CD 飼育時の摂食、絶食の両条件で有意に血清中ケトン体が上昇しているという結果を得た。そこで、肝臓のケトン体合成関連遺伝子について DNA マイクロアレイ解析を行ったが、驚くべきことに血清中のケトン体が上昇する一方で、NEFA を取り込み、アセチル CoA を産生する経路である脂肪酸β酸化経路関連遺伝子や、アセチル CoA からケトン体を産生するケトン体合成経路関連遺伝子の発現が KO マウスで軒並み低下していた。1 遺伝子(Acat2)のみ発現上昇する遺伝子も存在したが、これらの経路は抑制されていることが示唆された。恒常的に高ケトン体を示す血清分析値と肝臓の遺伝子発現が矛盾している結果であった。しかしこの差異については、18 時間絶食処理が影響したと考えた。通常 WT マウスではエネルギー源が体内に存在する場合にはケトン体合成が低下し、絶食時には大量に供給されることから、このための遺伝子発現も大きく変動する。一方、KO マウスではケトン体が高値を示し恒常的にケトン体産生が亢進されていることから絶食に陥ってもあまり遺伝子発現変動は生じず、脂肪酸β酸化やケトン体合成経路関連遺伝子の発現変動の幅は WT マウスに比べて小さくなったと考えられる。このケトン体に関してさらに詳細に調べるには非絶食条件下における肝臓遺伝子発現について解析することが有効であると考えられる。

次に、ケトン体の利用について考察を行う。産生されたケトン体は肝臓外の組織(脳、骨格筋、心筋、BAT)においてグルコースの代替エネルギー源として利用される[199]。腓腹筋におけるミトコンドリアコピー数の変化を測定したところ、ミトコンドリアコピー数が上昇しケトン体利用が亢進していることが示唆された。産生されたエネルギーの利用方法については、運動による ATP の産生や熱産生などが疑われたが、CD 及び HFD 飼育時において運動量の変化は生じていないことに加え、直腸温での変化も見られなかった。腓腹筋における DNA マイクロアレイ解析を行った結果、Ucp3 が発現上昇し脱共役による熱産生の亢進が示唆されたが、直腸温で変化が見られなかったこととは矛盾した。一般にマウスは通常飼育条件下(18~23°C)で生じる熱産生は脱共役に加え、骨格筋での震えや肝臓における代謝など複数の機構によって熱産生が行われているため差が

埋もれてしまったと考える。脱共役による熱産生の変化を捉えるには、震えによる熱産生がなくなる 28~30°C 前後で解析を行う方法または、4°C など低温暴露などを行うことで骨格筋における熱産生を評価する方法が考えられる。実際に、BAT における UCP1 欠損マウスの表現型では、22°C での飼育では UCP1 KO マウスの方が震えによる熱産生により大量にエネルギーを消費するため WT マウスに比べ低体重を示すが[200]、28°C 飼育では脱共役による熱産生の違いが反映され肥満を発症することが報告されている[201]。今後、Ucp3 による熱産生の検討については、温度を変えた飼育を行う必要があると考えている。

4.3. 食餌の質の変化によって生じる影響

様々な遺伝子欠損マウスの表現型解析は CD 飼育時では変化が見られず、HFD 負荷によって顕在化する例が多い。しかし、本研究における KO マウスの表現型では CD 飼育時でも顕著な体重差が見られたことから、遺伝子欠損により代謝に大きな変化が生じていることが示唆された。しかし、これらの変化が CD 特異的に観察される現象であるかは不明であり、食餌の質を変えた時には表現型が消失あるいは悪化する可能性などが考えられた。例えば、KO マウスの脂質代謝が変化しているのであれば、HFD 負荷をかけると脂質代謝関連の分析結果が大きく変化する可能性が考えられた。一方、糖代謝が変化するのであれば、HFD では糖質が少ないため、脂質関連の表現型が消失する可能性が考えられた。そこで、食餌の質的变化が与える影響を検討するために HFD による飼育を行ったところ、WT マウスでは顕著な体重増加を示した。一方で、KO マウスの体重増加は緩やかであり、CD 飼育時の WT マウスと同程度までしか体重が増えず、KO マウスは食餌誘導性肥満を発症していないと考えられた。また、体組成解析やエネルギー利用解析では CD 飼育時と同じ表現型が得られた一方で、血液生化学データでは脂質項目や肝機能項目が食餌の質的变化により、大小が入れ替わるなどの変化が得られた。糞中脂質及び、尿中カテコールアミンは高感度で検出するため、表現型でより大きな差が生じやすい HFD 飼育時のマウスを解析することで、様々な知見を得ることができた。

本実験において議論してきた食餌の質的变化は、糖質と脂質に関してのみであるが、タンパク質も深く関連する。本研究で用いた 2 種類の餌は主に脂質と糖質のバランスが異なり、粗タン

パク質は CD で 20%、HFD で 25%である。この 5%の違いによって CD 飼育時に比べて HFD 飼育時に顕著な体重差が現れたとは考えにくいことから、大きく影響した要因はタンパク質ではないと考える。今後タンパク質の影響を検討するには、尿中窒素排泄量の測定等を行うことが重要であると考えられる。

4.4. 消化管を起点とする新たな臓器間ネットワーク

KO マウスの表現型を引き起こすメカニズムについて、転写因子 *Skn1* の発現分布から議論を行う。序論でも述べたように、先行研究で *Skn1* の発現分布は胸腺間質、皮膚、胃、小腸、精巣で発現する一方、脳、心臓、肺、筋肉、肝臓、脾臓、腎臓では発現していないことが報告されている[74,75]。本研究で用いた KO マウスは当研究室で作出されたものであるため、味覚サイエンス研究室の石丸らによって RT-PCR による発現分布の確認を行ったところ、脳、肝臓、骨格筋、BAT、WAT、膵臓では発現せず、胃、回腸、空腸など食物と直接接触する組織において発現することが確認された(図 3-27)。消化管における *Skn1* の発現分布を *in situ* hybridization 法や免疫染色法により検討を行ったところ、胃及び小腸において刷子細胞(Tuft cell)において発現することが報告されている[202]。具体的には、KO マウスの小腸においては刷子細胞のマーカーである Doublecortin-like kinase 1(DCLK1)の発現が消失する一方で、内分泌細胞(enteroendocrine cell)のマーカーである Chromogranin A (CHGA)や L 細胞のマーカーである GLP-1 の発現は消失しなかった。また味覚関連分子 *Plcb2* や *Gust* の発現は消失しなかったが、*Trpm5* の発現は KO マウスで消失しており刷子細胞では何らかのシグナルを受容している可能性が示されている。以上より、*Skn1* は消化管内において刷子細胞への分化を制御している可能性を示すとともに KO マウスでは消化管の機能が変化している可能性が考えられる。一方で、エネルギー代謝に深く関連する器官である肝臓や骨格筋においては *Skn1* が発現しないため、上述のようなエネルギー代謝亢進を示すのは二次的な影響であると示唆された。

KO マウスの糖代謝に関しては、石丸らによって検討が行われた。16 週齢の同腹仔の WT マウス及び KO マウスに対して OGTT を行った場合、グルコース投与後の血糖値には変化がなかったことから耐糖能には大きな変化が見られなかった(図 3-28 A)。しかし、血漿中インスリン濃度は

グルコース投与 15 分後において WT マウスに比べて KO マウスの方が顕著な低値を示した(図 3-28 B)。また、腹腔内グルコース負荷試験(Intraperitoneal glucose tolerance test; IPGTT)での血糖値(図 3-28 C)や血漿中インスリン濃度(図 3-28 D)、インスリン負荷試験(Insulin tolerance test; ITT)での血糖値(図 3-28 E)に関して変化が見られなかったことから、耐糖能に変化はなく糖代謝は正常であるが、グルコースが消化管を通過するときのインスリン分泌のみに変化があったことが示された。インスリン分泌低下が膵臓のインスリン分泌能低下に由来するか、分泌シグナリングの変化に由来するかについて検討を行った。まず、インスリン分泌能は *Skn1* の影響を受けているか検討したところ、IPGTT でのインスリン分泌が変化していなかったことに加え、*Skn1* 遺伝子が膵臓で発現していなかったことを確認した。味蕾においては *Skn1* と共発現しており、膵臓ではインスリン分泌への影響が報告されている[203]*Trpm5* 遺伝子が、KO マウス膵臓においても発現していたこと(Data not shown)からも、KO マウスのインスリン分泌能には変化がないことが強く示唆された。続いて、インスリン分泌シグナリングの変化としてインクレチンについて検討を行ったところ、OGTT によって血糖値やインスリンの分泌亢進に関わる GIP でも変化が見られなかったこと[202]から、液性因子など物質を介した情報伝達ではないと考えられた。続いて、分泌シグナリングの変化について検討を行った。インスリンはグルコースに誘導されるインスリン分泌(Glucose-stimulated insulin secretion; GSIS)[204]とは別に、迷走神経を経由する脳からの信号を介したインスリン放出シグナリングが存在する[205,206]。この経路について検討を行うため、横隔膜下迷走神経切除(Vx)した時に生じる OGTT への影響を評価した。その結果、WT マウスでは Sham 群に対して Vx 群の血糖値の上昇抑制が見られた。この結果は先行研究において Vx 群は Sham 群に比べ血糖値上昇抑制が生じるという報告[207]と一致している。しかし、インスリン分泌量は先行研究において Vx マウスで低下するという報告[207]も存在する他、迷走神経を介したインスリン分泌シグナル[205,206] が消失することから、Vx マウスでは分泌量が低下すると予想された。しかし、本研究では Vx によるインスリン分泌の低下は見られなかった。腹部を切開したストレスがインスリン放出量に影響した可能性も考えられるが、他の実験でも Sham 群をコントロールとしていることから、この可能性は考えにくい。一方、KO マウスに対して同様な処理を行った解析では WT マウスで見られたような Vx 群の血糖値上昇抑制が消失し、

血漿中インスリン濃度は WT マウス同様に変化が見られなかった。以上の結果より、迷走神経の切断の結果、WT マウスと KO マウスでは迷走神経切断による影響が異なることが示された。インスリン分泌に関しては再試験が必要である。

CCK を投与することにより Vx 手術の評価を行った。CCK は小腸で作られる消化管ホルモンの一つ[208]であり、食物の組成や状態に合わせて分泌されて胃内滞留時間の延長[209]などにより、摂食量を低下させる機能を持つ[210,211]。CCK は迷走神経を介して脳にその情報が伝達されて機能するという作用機序を持つことから CCK 投与による摂食抑制の効果が見られれば迷走神経を介した伝達経路が確認できる一方、CCK 投与により摂食抑制効果が消失していれば迷走神経が切除されたと考えられる。CCK 負荷による摂食量解析から WT マウスと KO マウスで同様に Sham 群に対して Vx 群での摂食量の上昇が確認できたことから、両遺伝子型で Vx 手術によって CCK 感受性が消失し迷走神経が切除されたことを確認した。両遺伝子型で迷走神経が切除されているにもかかわらず、OGTT による血糖値上昇のパターンが変化したことは非常に興味深い。迷走神経を経由して情報伝達する組織は多く、消化管だけでなく、肝臓や膵臓なども含まれるため、これらの組織に影響があった可能性も考えられる。特に肝臓はエネルギー代謝に大きく影響し、肝枝切断マウスでは OGTT による血糖値やインスリンに変化が生じることが報告されている[212,213]ことから、脳と肝臓の迷走神経が血糖値に影響した可能性も考えられた。しかし、肝臓において Skn1 が発現していないこと、KO マウスにおいて Vx マウスで血糖値の上昇抑制が消失していたことから、Skn1 が発現している消化管で影響すると考えるのが妥当と考える。今後、消化管由来のシグナルの存在を検証していく必要がある。具体的には、消化管における Skn1 陽性細胞種を特定し、食餌由来のシグナルを受容していることを明らかにすることが考えられる。先行研究においてグルタミン酸投与による消化管迷走神経の神経応答を捉えた報告[214]もあることから、遺伝子型の違いによって迷走神経の興奮を捉える手法も迷走神経の関与を示す一つの手段であり検討したい。

消化管から脳への情報伝達経路が変化していることは明らかになったが、脂質代謝が亢進するには脳から末梢に対して情報発信が必要であり、ホルモンによる制御である可能性が考えられた。脂質代謝を亢進するホルモンとしては、成長ホルモン(Growth hormone; GH)や甲状腺ホルモン等

が挙げられる。成長ホルモンは脳下垂体前葉の GH 細胞が分泌するため直接脳の制御を受けることが知られているが、分泌過剰の場合には骨の伸長や筋肉量の上昇が知られている。KO マウスは WT マウスに比べ体長が小さく、体重あたりの筋肉量に変化がないことが体組成解析から明らかになっているため、成長ホルモンによる影響ではないと予想された。一方、甲状腺ホルモンは甲状腺から分泌されるが、その分泌促進ホルモンである甲状腺刺激ホルモンは脳下垂体前葉の甲状腺刺激ホルモン分泌細胞から放出されるため、間接的ながら脳を介する制御が行われる。甲状腺ホルモン(T3, T4)分泌量について検討を行ったところ遺伝子型による有意な変化は見られず甲状腺ホルモンを介する経路ではないことが示唆された。以上の検討から、脂質代謝の亢進の原因は脳由来のホルモンではないことが示唆された。

次に、脳が脂質代謝を調節する機構としてカテコールアミン分泌を検討した。カテコールアミンはカテコール基とアミノ基を持つ化学物質であり、エピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミンの 3 種が知られている。これらは生体において主要な神経伝達物質となっている他、副腎由来のホルモンとしても機能する。エピネフリン[215]は WAT におけるホルモン感受性リパーゼの活性化を引き起こし NEFA の放出を促進させることで、肝臓におけるケトン体合成を亢進させて血中ケトン体濃度を上昇させることが知られている[216]。ノルエピネフリンはエピネフリン同様に脂肪分解を促進するが、ケトン体合成への関与は直接ではないことが報告されている[217]。また、これらの働きはエピネフリンが肝臓の $\alpha 1$ アドレナリン受容体を介して直接制御している[218]。他、カテコールアミンとグルカゴンは協調しておりグルカゴンが肝細胞のミトコンドリア内への NEFA の取り込みやケトン体産生を促進することが報告されている。ドーパミンは脳の中樞神経系における主要な神経伝達物質として知られているが、副腎髄質でも分泌され、末梢のドーパミンは血液脳関門を通過しないために脳内には到達せず、末梢のドーパミン作動性神経に影響を与える。末梢におけるドーパミンの機能は、腎臓などの臓器の血管に作用して血管を拡張させることが報告されており、心臓では心拍数と血圧を変化させずに心収縮力を増加させることで心拍出量を増大させる[219]。本研究では尿中エピネフリン及びドーパミンの有意な上昇に加え、尿中ノルエピネフリンの上昇傾向が見られたことから体内においても分泌亢進が示唆された。血液生化学データの解析でも、CD 飼育時に KO マウスで T-KB が恒常的に上昇した結果や、HFD 投与時

に GLU が上昇したように、カテコールアミン分泌促進が支持される結果が複数の実験から得られている。このことから KO マウスの脂質代謝亢進が生じる原因がカテコールアミン量によるものであると考えるのが妥当である。

KO マウスの脂質代謝が亢進する原因はカテコールアミンの過剰分泌によることが強く示唆された。カテコールアミンの作用は脂質代謝亢進とともに、血圧上昇が知られている。しかし、WT マウスが KO マウスに比べ低血圧を示した結果は、カテコールアミン分泌とは矛盾しているため以下の考察を行う。

カテコールアミンの分泌は心臓などのアドレナリンレセプターの α_1 に作用し血圧が上昇する[220]ことから、高血圧との関連性が指摘されている[221]。恒常的なカテコールアミンの分泌過剰は継続的な血圧上昇を引き起こす可能性が高い。血圧上昇に伴って血管内皮細胞が血流による摩擦で受けるシェアストレスが増加する。血管内皮[222,223,224]や赤血球[225]はシェアストレスに呼応して Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) シグナリングを介して Nitric Oxide synthase(eNOS)をリン酸化により活性化することで、一酸化窒素(Nitric Oxide; NO)を産生する[226]。NOは平滑筋を弛緩させるため血管が拡張し血圧が低下する[227]。実際に、運動負荷による血圧上昇でシェアストレスがかかりNOの産生が上昇することで、運動後の血圧低下が報告されている[228]。本実験ではKOマウスが常に高いカテコールアミン濃度を維持するため常にシェアストレスがかかる環境である。これに応答してeNOSの発現状況が常に高くなった結果、血圧の低下が引き起こされている可能性が考えられる。この仮説が正しければKOマウスにおいてカテコールアミン分泌が亢進することで脂質代謝亢進と同時に血圧低下が生じていたことが繋がる。今後eNOSのリン酸化等を確認することにより、NO産生が亢進していることを確認していきたい。

KO マウスの表現型解析から、消化管において Skn1 の発現が消失するが、摂食量や TG 吸収には変化がなかった。さらに消化管から脳にかけての迷走神経を介したシグナルが消失していることが示唆された。以上の実験結果をまとめると、消化管から脳にシグナルが伝達されないため、エピネフリン等のカテコールアミンの分泌を脳から抑制できずに、恒常的に亢進しているのではないかと考える。亢進したカテコールアミンは血圧の低下を引き起こすと同時に、脂質の分解が

常に亢進状態となるためケトン体が高値を示し、脂肪組織では蓄積が十分に行われなため、脂肪組織の肥大化が起こらず、低体重を示しているという流れが考えられる。インスリンの分泌に関しても、脳に摂食シグナルが伝達されないため脳が制御するインスリン分泌を正常に制御できない可能性が考えられる(図 3-29)。

KO マウスの知見を基に、**WT** マウスが持つエネルギー代謝調節機構を推定する。摂食した食物が腸管に到達すると、刺激を消化管で受容し迷走神経を介して脳に摂食した情報が伝達される。脳では、糖代謝を調節するためにインスリン分泌を促進し、カテコールアミンの分泌を抑制することで脂質代謝を調節するという機構が示唆された。

表3-1 KOマウスの肝臓で発現上昇した遺伝子の機能解析

GO ID	GO term	P-value
GO:0006732	coenzyme metabolic process	3.09E-04
	acyl-CoA metabolic process	N/S
GO:0006084	acetyl-CoA metabolic process	1.66E-02
GO:0043436	oxoacid metabolic process	4.80E-03
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	4.80E-03
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1.06E-03
GO:0008202	steroid metabolic process	2.62E-04
GO:0006066	alcohol metabolic process	3.76E-04
GO:0016125	sterol metabolic process	1.89E-03
GO:0008203	cholesterol metabolic process	2.46E-03
GO:0050896	response to stimulus	7.52E-03
GO:0009605	response to external stimulus	3.54E-02
GO:0009607	response to biotic stimulus	2.74E-02
GO:0006952	defense response	2.74E-04
GO:0009611	response to wounding	1.07E-02
GO:0045087	innate immune response	1.51E-02
GO:0006954	inflammatory response	4.69E-03
GO:0002526	acute inflammatory response	4.41E-03
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	1.70E-02
GO:0019884	antigen processing and presentation of exogenous antigen	3.04E-02
GO:0002478	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen	4.98E-02
GO:0002449	lymphocyte mediated immunity	1.57E-02
GO:0002460	adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	5.14E-03
GO:0019724	B cell mediated immunity	4.21E-02
GO:0016064	immunoglobulin mediated immune response	3.33E-02
	regulation of developmental process	N/S
GO:0051094	positive regulation of developmental process	4.56E-02
GO:0045595	regulation of cell differentiation	4.58E-02

BenjaminiのFDRで補正したEASE Scoreを示した。
EASE ScoreのN/SはEASE Score< 0.05を満たさなかった項目を示した。
最下層のGO termは太字で示した。

表3-2 KOマウスの肝臓で発現低下した遺伝子の機能解析

GO ID	GO term	P-value
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	1.17E-04
GO:0055114	oxidation reduction	9.71E-05
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	2.00E-03
GO:0043436	oxoacid metabolic process	5.80E-07
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	5.80E-07
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	1.22E-04
GO:0006090	pyruvate metabolic process	4.85E-02
GO:0006082	organic acid metabolic process	4.83E-07
GO:0016054	organic acid catabolic process	1.51E-02
GO:0046395	carboxylic acid catabolic process	1.51E-02
GO:0006006	glucose metabolic process	3.27E-02
GO:0006066	alcohol metabolic process	1.63E-03
GO:0006629	lipid metabolic process	3.69E-05
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	1.65E-03
GO:0044237	cellular metabolic process	1.08E-03
GO:0051186	cofactor metabolic process	3.78E-02
GO:0051188	cofactor biosynthetic process	4.84E-02
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	4.50E-07
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	3.76E-02
GO:0009066	aspartate family amino acid metabolic process	8.68E-04
GO:0009067	aspartate family amino acid biosynthetic process	4.34E-03
GO:0001504	neurotransmitter uptake	4.71E-02
GO:0044271	nitrogen compound biosynthetic process	1.13E-04
GO:0009308	amine metabolic process	1.07E-03
GO:0044106	cellular amine metabolic process	2.98E-04
GO:0009309	amine biosynthetic process	4.58E-02
GO:0003012	muscle system process	5.75E-03
GO:0006936	muscle contraction	7.83E-03
GO:0010927	cellular component assembly involved in morphogenesis	3.09E-02

BenjaminiのFDRで補正したEASE Scoreを示した。
最下層のGO termは太字で示した。

表3-3 KOマウスの肝臓で発現変動した糖質代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	UP	Down	Probe ID
グルコース代謝				
GBE1	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	3.69E-04		1420654_a_at
gck	glucokinase	2.31E-03		1425303_at, 1419146_a_at
Pgm3	phosphoglucomutase 3		2.13E-03	1428228_at
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate; predicted gene 8767		4.33E-02	1416921_x_at
aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate		3.42E-02	1451461_a_at
TPI1	triosephosphate isomerase 1; similar to triosephosphate isomerase 1		3.33E-02	1415918_a_at
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		1.49E-02	1418625_s_at
PGK1	phosphoglycerate kinase 1; predicted gene	1.03E-02		1438640_x_at
eno1	enolase 1, alpha non-neuron		3.54E-02	1419023_x_at, 1419022_a_at, 1427404_x_at
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	1.59E-03		1417273_at
LdhA	lactate dehydrogenase A		7.32E-03	1419737_a_at
ldhb	lactate dehydrogenase B		3.21E-02	1416183_a_at, 1434499_a_at
Gpd2	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	2.64E-02		1459689_at, 1428323_at
dlaT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	4.76E-05	4.91E-04	1452005_at 1426265_x_at, 1426264_at
Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	1.16E-04		1436834_x_at
PGD	phosphogluconate dehydrogenase	3.71E-02		1437380_x_at
SLC37A4	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4		5.06E-03	1417042_at
グリコーゲン代謝				
GYS2	glycogen synthase 2		3.83E-02	1424815_at
ppp1r1a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A		4.32E-02	1422605_at
Ppp1r2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2		3.47E-02	1448684_at
PYGL	liver glycogen phosphorylase	1.48E-02		1417741_at
糖新生				
Fbp1	fructose bisphosphatase 1		3.34E-02	1458829_at
G6PC	glucose-6-phosphatase, catalytic		4.34E-02	1417880_at
Pcx	pyruvate carboxylase		2.23E-02	1416383_a_at
PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic		1.85E-02	1439617_s_at

FDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇した遺伝子は赤、発現低下した遺伝子は青、両方で抽出された遺伝子を紫で表示した。

表3-4 KOマウスの肝臓で発現変動した脂質代謝関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	UP	Down	Probe ID
脂肪酸β酸化				
fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart; similar to mammary-derived growth inhibitor		3.91E-03	1416023_at
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	4.35E-05		1416021_a_at, 1416022_at
ACOT12	acyl-CoA thioesterase 12		2.37E-02	1449457_at
ACOT2	acyl-CoA thioesterase 2		3.15E-02	1422996_at
Acot3	acyl-CoA thioesterase 3	7.14E-05		1443147_at, 1422925_s_at
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1		4.61E-02	1450643_s_at
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	1.69E-02		1452771_s_at, 1428386_at
Acsl4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4		2.06E-02	1418911_s_at
ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5		1.50E-02	1428082_at
ACSM5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	4.46E-02		1437662_at
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	1.61E-04		1434866_x_at, 1438156_x_at
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl		3.07E-02	1460409_at
ech1	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal		8.12E-03	1444518_at
Echs1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial		2.43E-02	1448491_at
ACAD11NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent); acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11		1.87E-02	1452341_at
ACADM	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain		1.07E-02	1433545_s_at
hadh	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	1.68E-03		1436756_x_at
hadhb	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	6.10E-03		1437172_x_at
HADHA	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit		6.40E-03	1452173_at
Acaa1a	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A	3.42E-02		1456011_x_at
ケトン体産生				
ACAT1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1		1.50E-02	1424183_at
Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	1.67E-02		1435630_s_at
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2		4.12E-02	1431833_a_at
hmgcl	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase		3.21E-02	1424639_a_at
BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1		3.15E-02	1426959_at

FDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。

発現上昇した遺伝子は赤、発現低下した遺伝子は青、両方で抽出された遺伝子を紫で表示した。

表3-5 KOマウス腓腹筋で発現上昇したミトコンドリア関連遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	Probe ID
ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	1419748_at
ociad2	OCIA domain containing 2	1435917_at
Pptc7	PTC7 protein phosphatase homolog (S. cerevisiae)	1455958_s_at
4930402E16Rik	RIKEN cDNA 4930402E16 gene	1459869_x_at
8430408G22Rik	RIKEN cDNA 8430408G22 gene	1433837_at
TBC1D15	TBC1 domain family, member 15	1416062_at
XAF1	XIAP associated factor 1	1443698_at
COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	1420384_at
dsp	desmoplakin	1435494_s_at, 1435493_at
dlaT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	1426264_at, 1426265_x_at
FDX1	ferredoxin 1	1449108_at
GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	1419499_at
Hk2	hexokinase 2	1422612_at
COQ10B	hypothetical protein LOC675736; coenzyme Q10 homolog B (S. cerevisiae)	1460510_a_at
IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	1429533_at
IDE	insulin degrading enzyme	1423121_at, 1435140_at
KRT5	keratin 5	1424096_at
KIF1B	kinesin family member 1B	1423995_at, 1451642_at, 1451200_at, 1425270_at
ELOVL6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	1417403_at
CSDE1	cold shock domain containing E1, RNA binding	1423997_at
Prkca	protein kinase C, alpha	1437393_at, 1446598_at, 1450945_at
Ppm1k	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	1441988_at
ppp3ca	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	1426401_at, 1438478_a_at
REEP1	receptor accessory protein 1	1433509_s_at
ND5, ND6	similar to Unknown (protein for IMAGE:4910858); predicted gene 4076	1426088_at
Opa1	similar to optic atrophy 1 (autosomal dominant); optic atrophy 1 homolog (human)	1434890_at
slc25a12	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12	1436440_at
slc25a25	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	1424735_at, 1447856_x_at
TMTC1	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1	1435261_at
tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1416016_at
Ucp3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	1420658_at

FDR <0.05を満たしたプローブセットを表示した。
発現上昇した遺伝子は赤で表示した。

(A)

Skn1 野生型アレル用プライマー	
センス	5'-CATGCTGAGATTTGTCCCAAGCTG-3'
アンチセンス	5'-ATCTGCGCACAGCCTTGTATCTTC-3'

Skn1 変異型アレル用プライマー	
センス	5'-ACAAGATGGATTGCACGCAGGTTC-3'
アンチセンス	5'-GTCCAGATCATCCTGATCGACAAG-3'

(B)

温度	時間	30 cycles
94 °C	1 min	
94 °C	20 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	2 min	
4 °C	Hold	

(C)

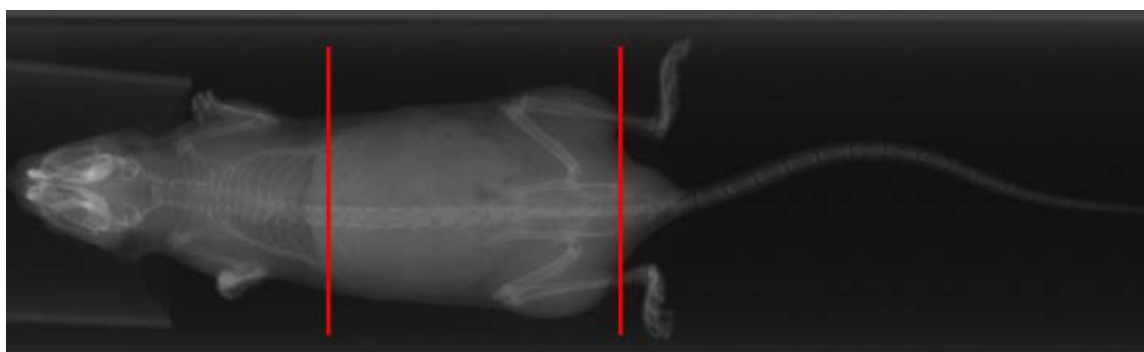


図3-1. KOマウスの表現型解析の実験手法

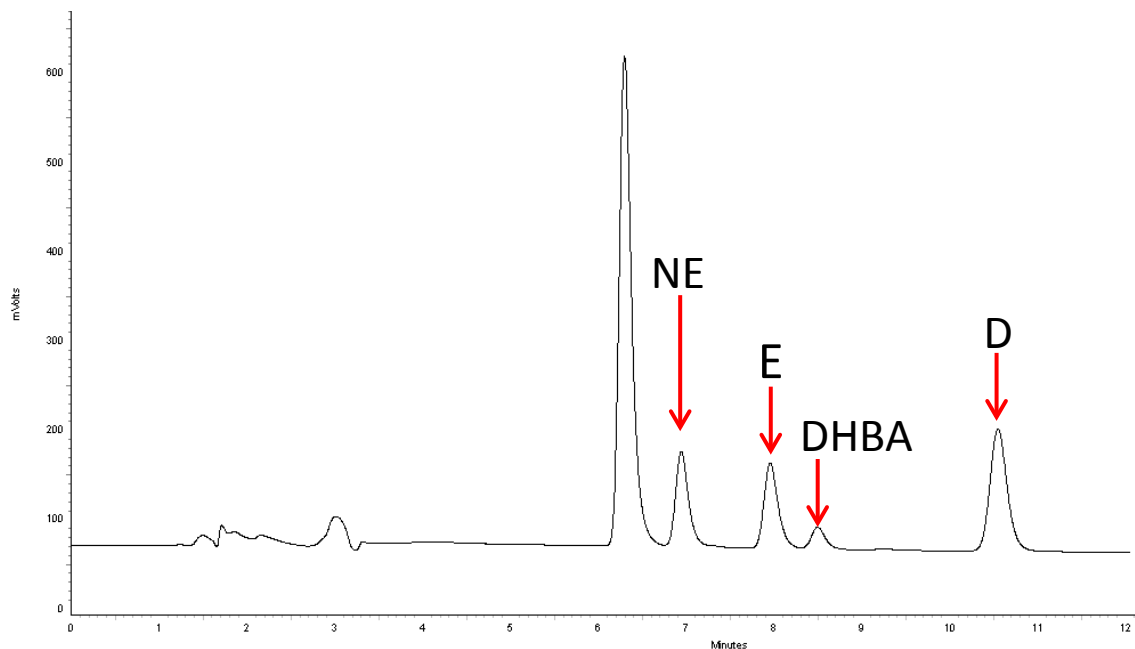
(A) 遺伝子型決定に利用したプライマー対

(B) 遺伝子型決定に利用したPCR反応条件

(C) 体組成測定時の解析領域

赤線間の領域(肋骨下から2本目～骨盤の尾側先端)で体組成の測定を行った。イソフルランによる麻酔下で、測定間隔2 mmで測定を行った。

(A)



(B)

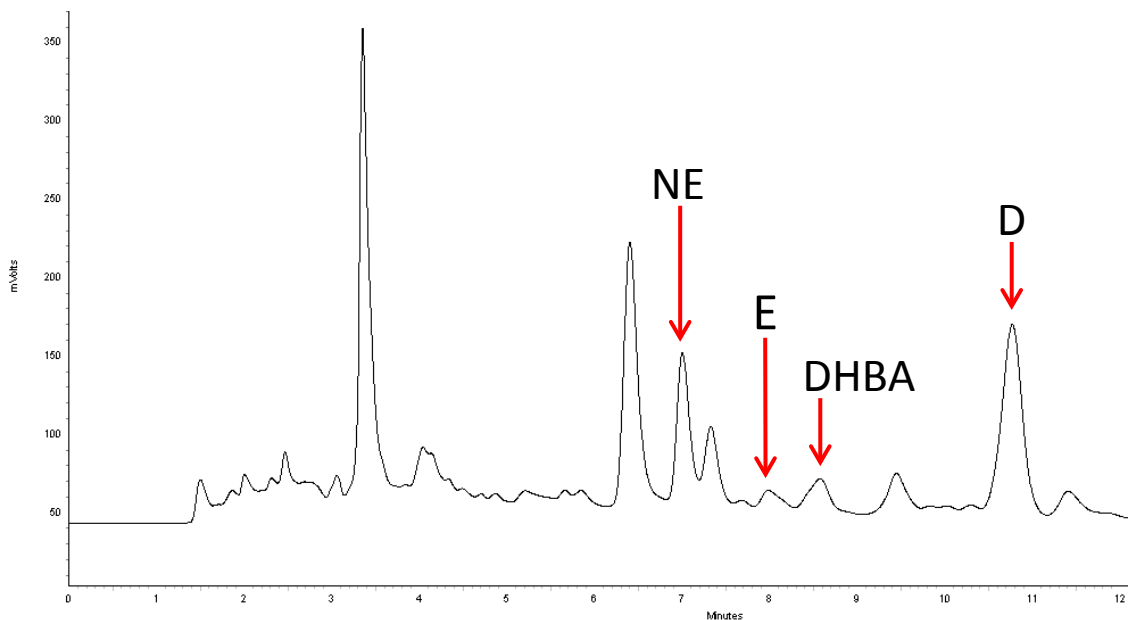


図3-2. カテコールアミン測定時のクロマトグラム

(A)標品のクロマトグラム、(B)尿サンプルのクロマトグラム

HPLCによる測定を行った時に得られるクロマトグラムを示した。各矢印は測定用のカテコールアミン(ノルエピネフリン(Norepinephrine; NE)、エピネフリン(Epinephrine; E)、ドーパミン(Dopamine; D))及び内部標準DHBAを示した。横軸に保持時間、縦軸にピークを示した。尿サンプルでもピークが得られることを確認した。

解析時にはDHBAで標準化した各カテコールアミンのピークの高さを用いた。

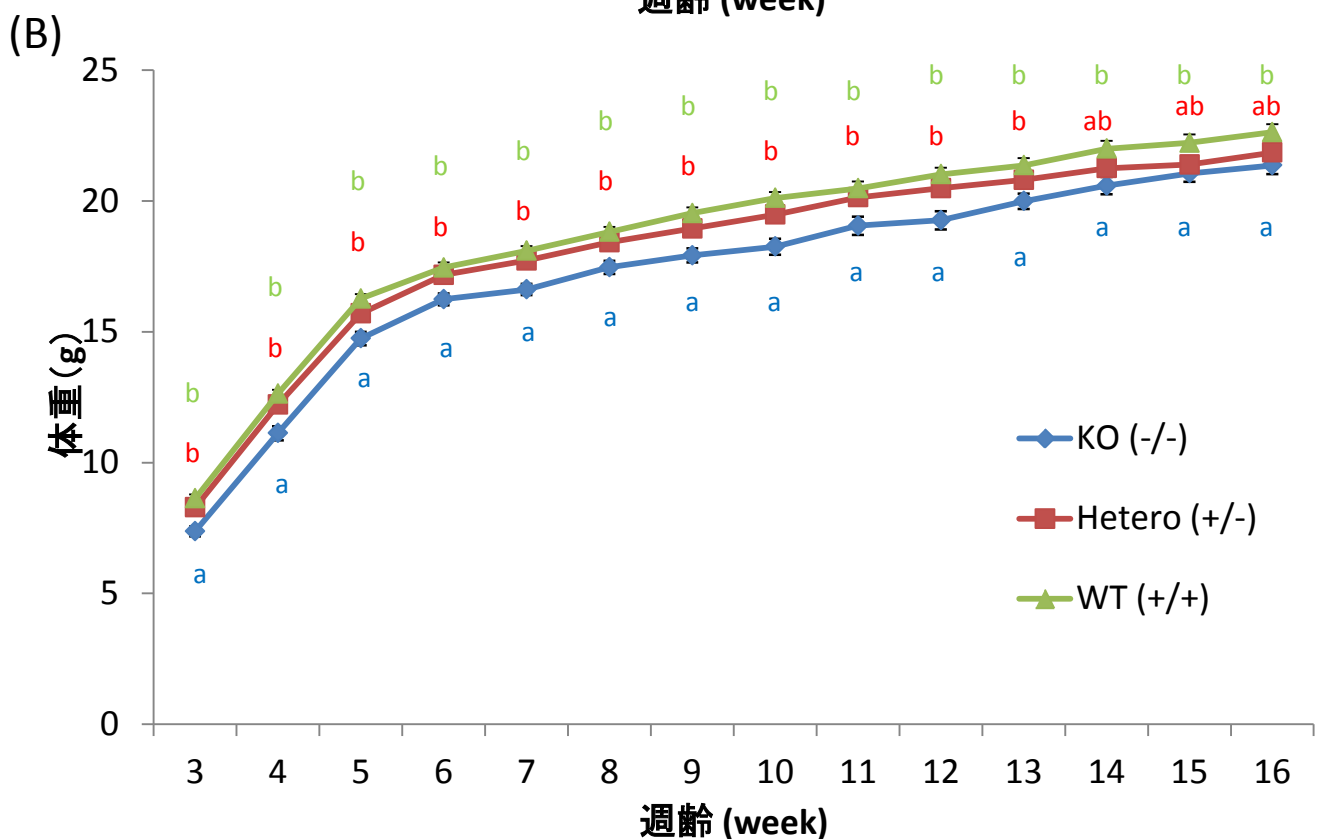
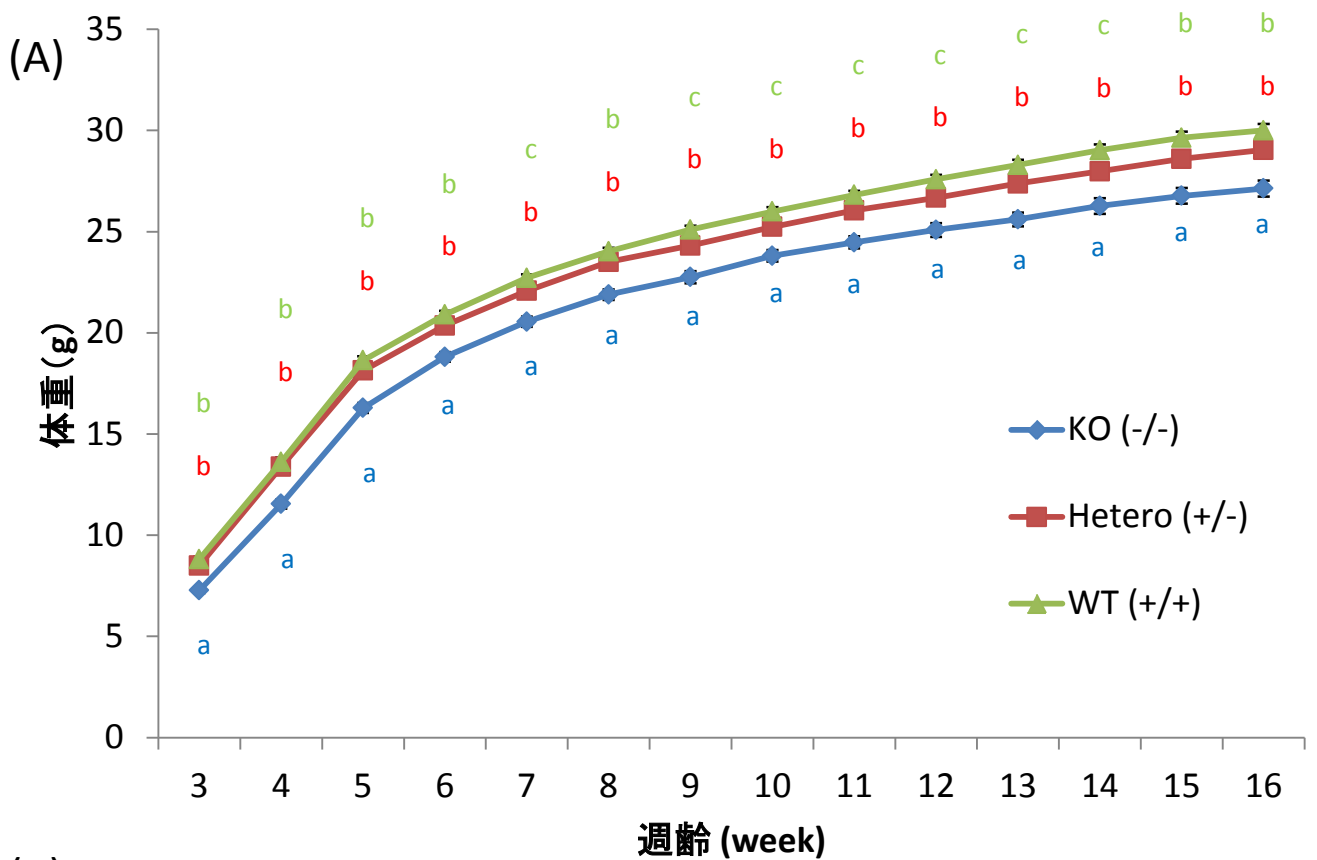


図3-3. 遺伝子型による体重の変化

(A)オスマウスの体重、(B)メスマウスの体重

オス、メス共にKOマウスは、WTマウスやヘテロマウスに比べて低体重を示した。

数値は平均±標準誤差で示す (オス: n > 75, メス: n > 57)。

KOマウスは青、ヘテロマウスは赤、WTマウスは緑で示し、異なるアルファベット間には有意差があることを示す (Bonferoniの多重検定 $p < 0.05$)。

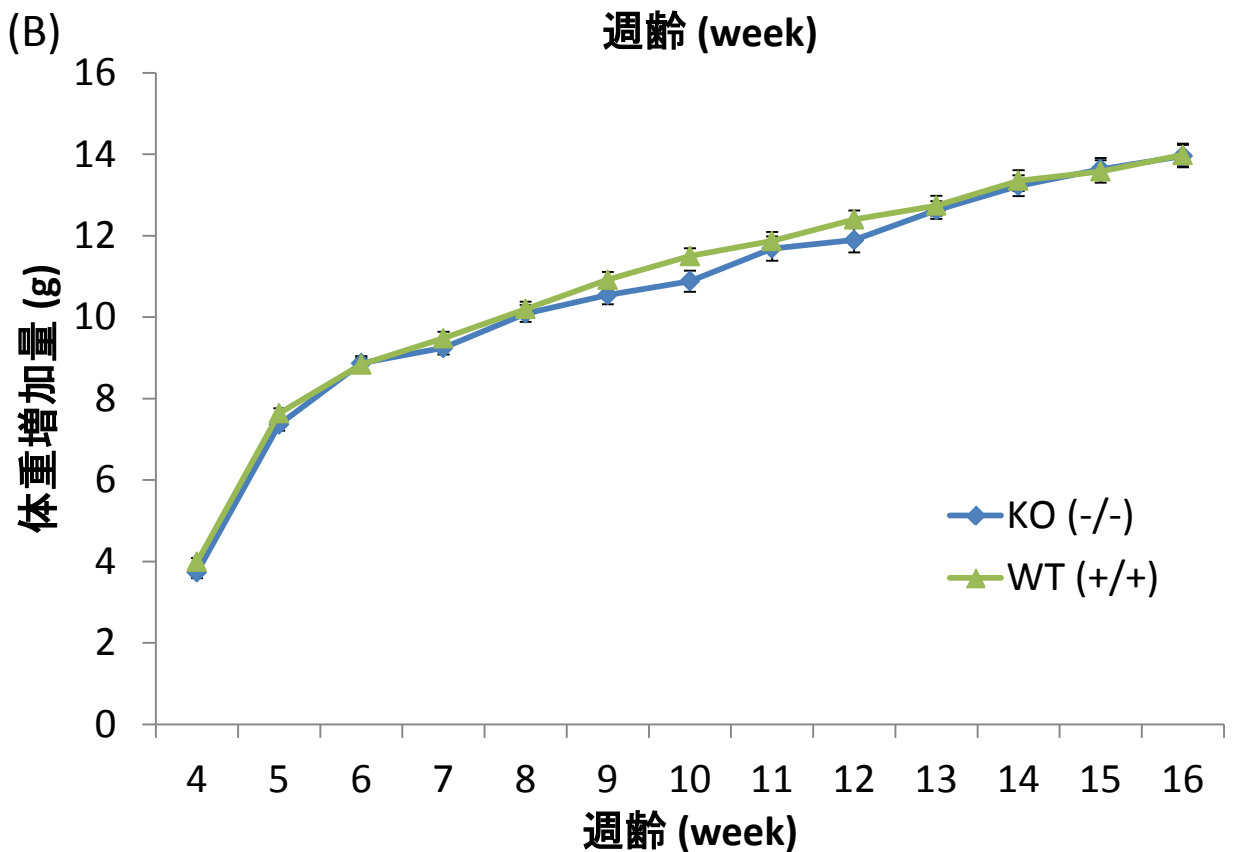
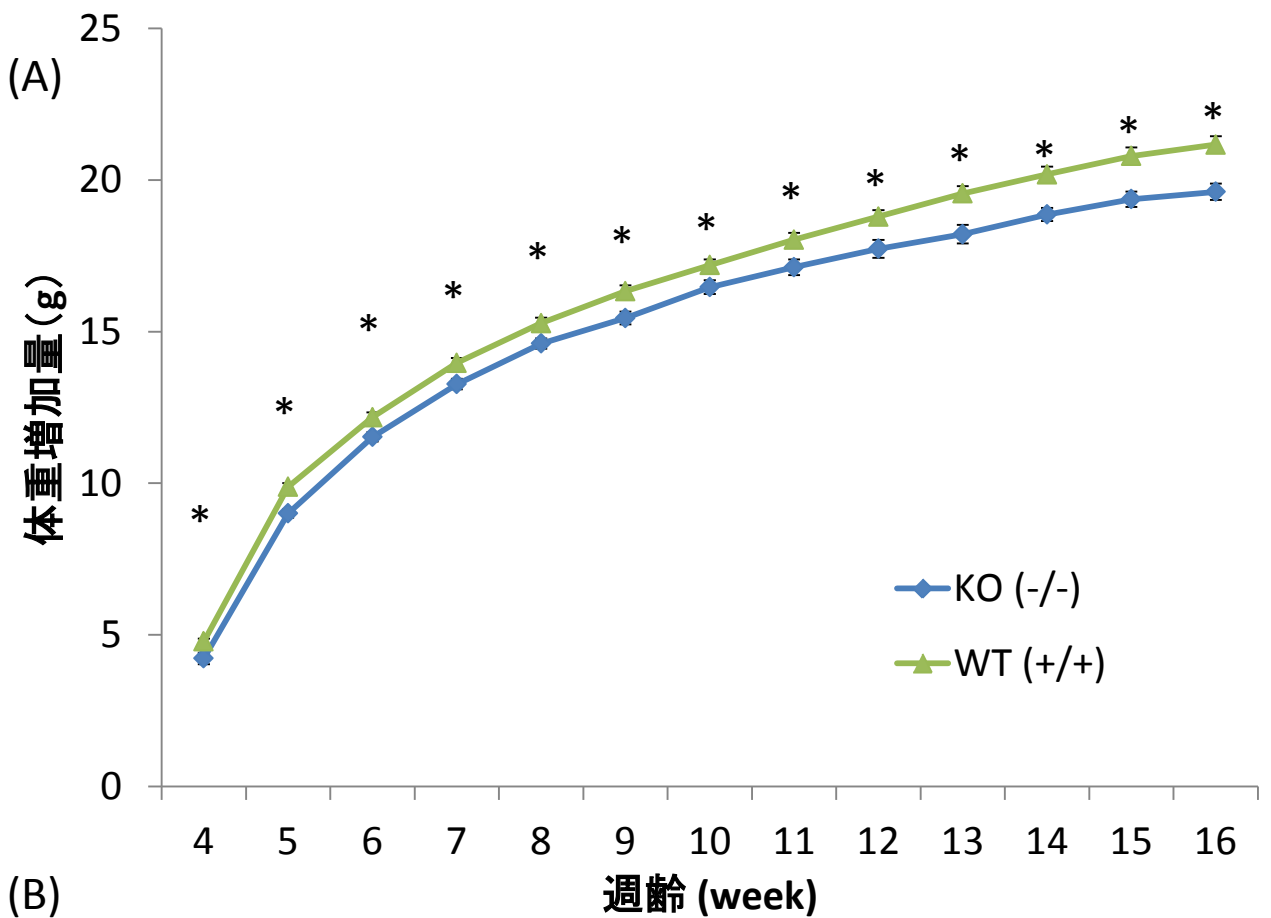


図3-4. 体重増加量の解析

(A)オスの体重増加量、(B)メスの体重増加量

オスの体重増加量はKOマウスがWTマウスに比べ低値を示したが、メスでは体重増加量に差はなかった。

数値は平均±標準誤差で示す(オス: n > 75, メス: n > 57)。* はp < 0.05を示す。

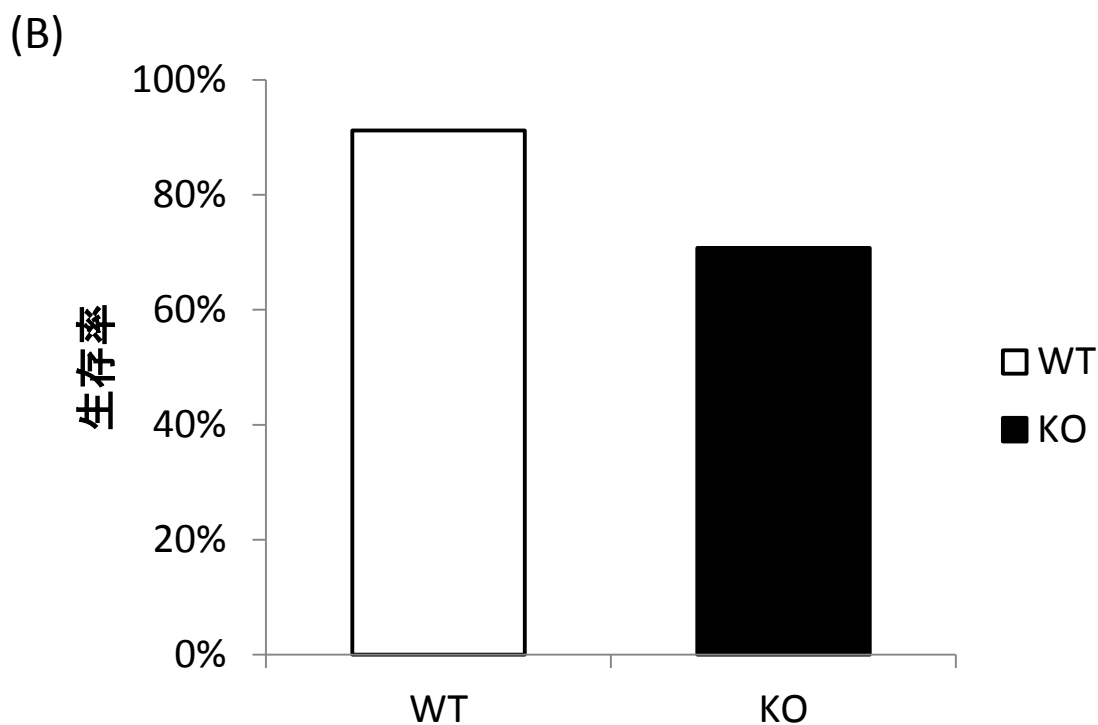
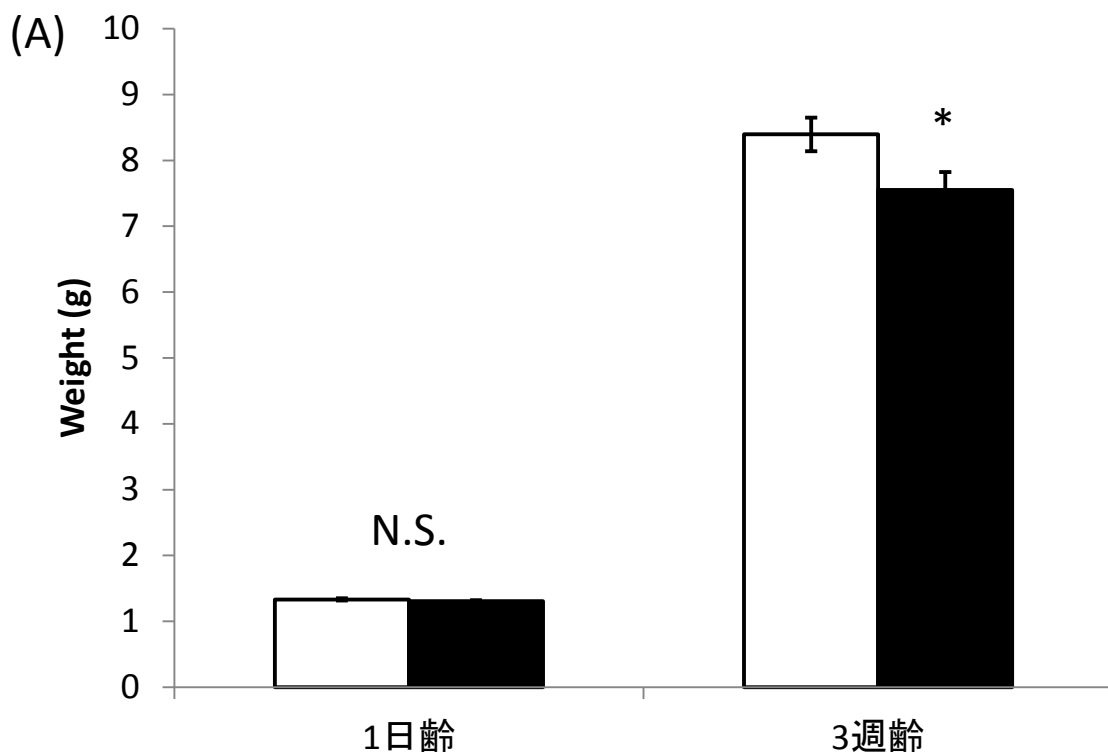


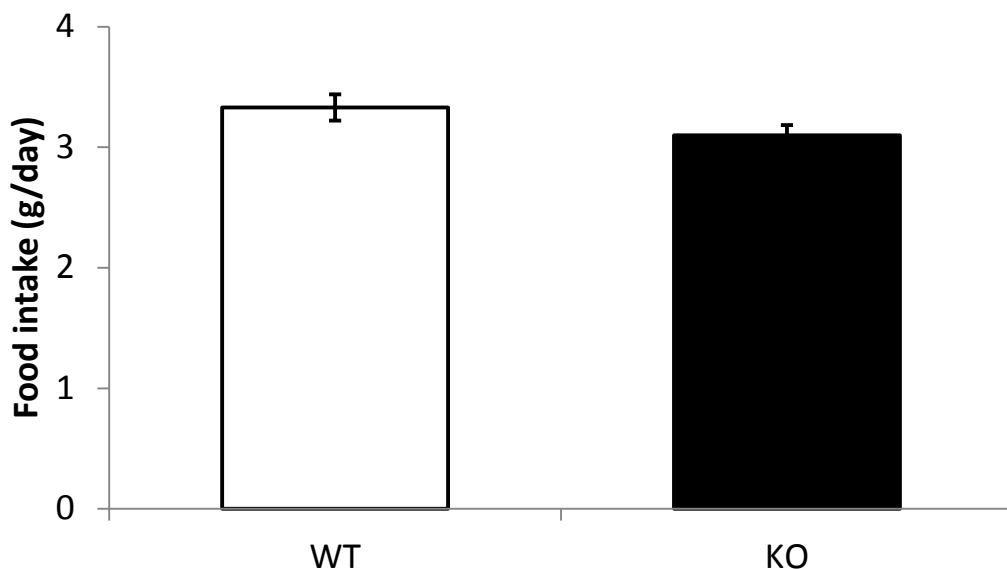
図3-5. 出生直後の体重測定

(A)1日齢(出生直後)と3週齢(離乳期)の体重、(B)3週齢までの生存率

出生直後の1日齢では遺伝子型による体重差がなかったが、3週齢ではWTマウスに比べKOマウスで低値を示した(n = 60~62)。生存率はKOマウスの方が低かった。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を、N.S.は有意差がなかったことを示す。

(A) 4週齢



(B) 8週齢

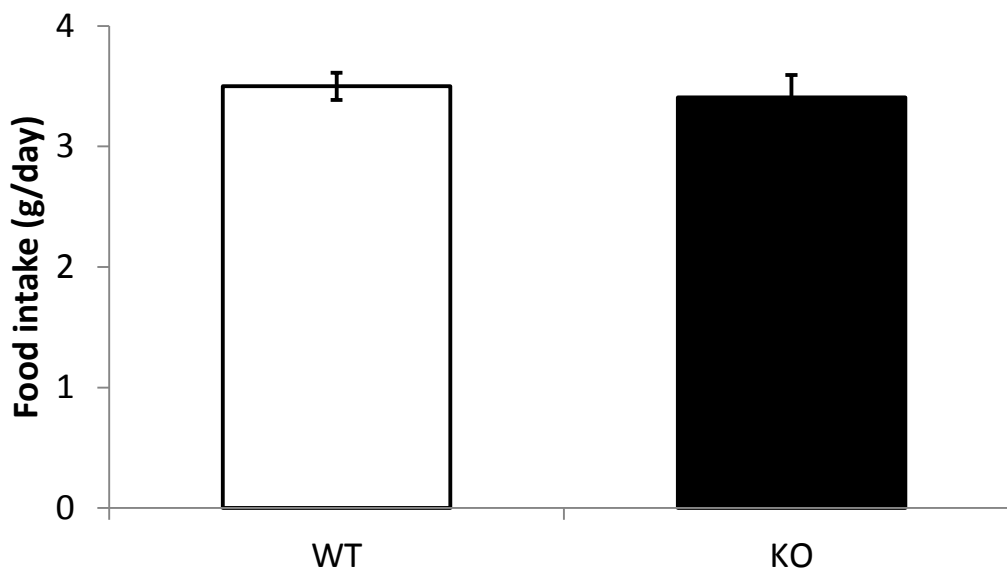


図3-6. 通常食投与時の摂食量解析

(A)4週齢時、(B)8週齢時の1日あたりの平均摂食量

各週齢1週間で摂食量の測定を行い、1日あたりの摂食量を比較した。その結果、摂食量の変化が見られなかった(各週齢WT, KO: n = 5~8)。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、* は $p < 0.05$ を示す。

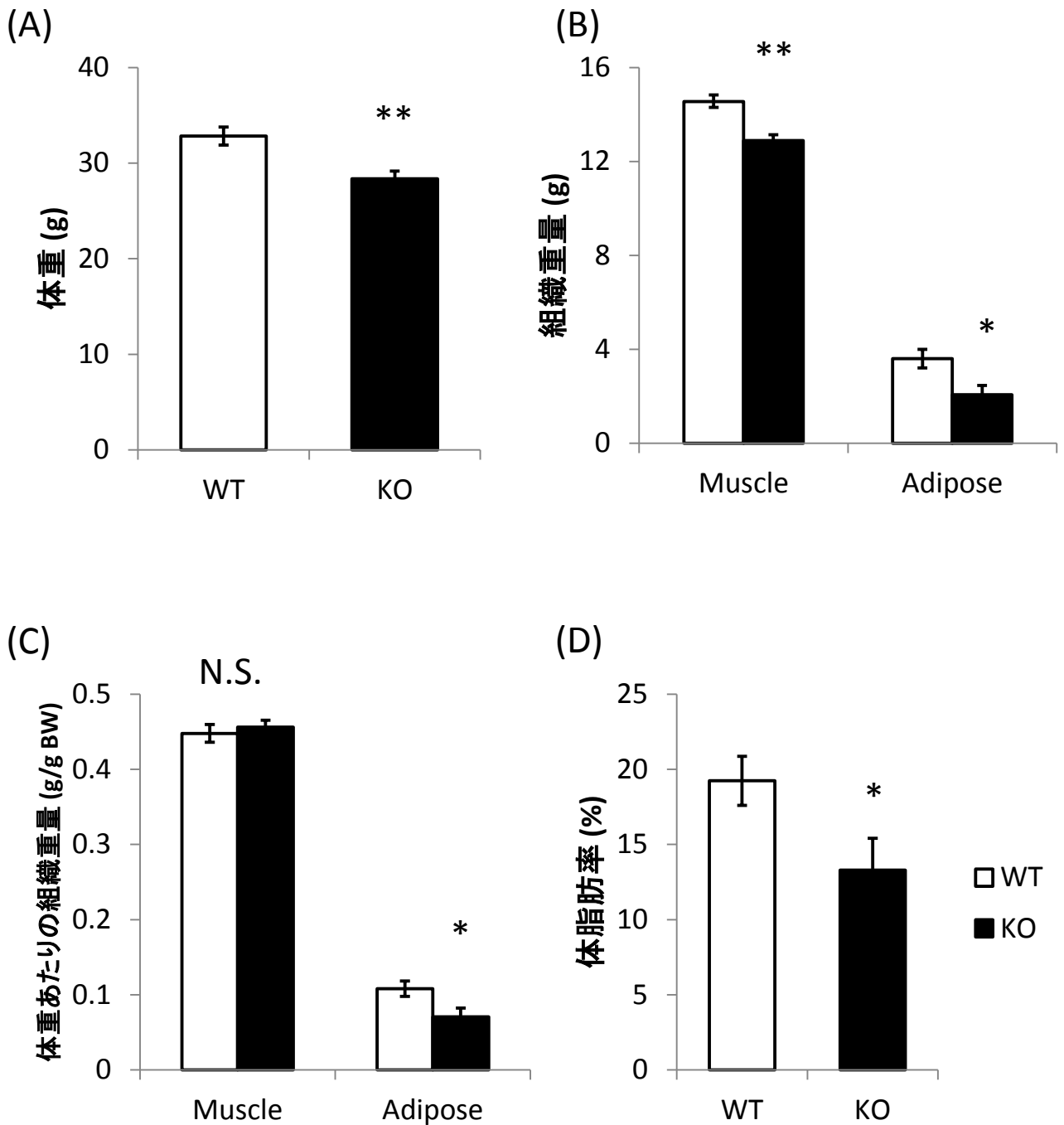


図3-7. 体組成の解析

(A)測定したマウスの体重、(B)組織重量、(C)体重あたりの組織重量、(D)体脂肪率

臓器重量は筋肉、脂肪組織でKOマウスはWTに比べ低値を示した。体重あたりの脂肪重量ではWTマウスに比べKOマウスの方が低値を示したが、筋肉に変化はなく、体脂肪率が低下していた。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 19, KO: n = 10)、* はp < 0.05、** はp < 0.01、N.S.は有意差がなかったことを示す。

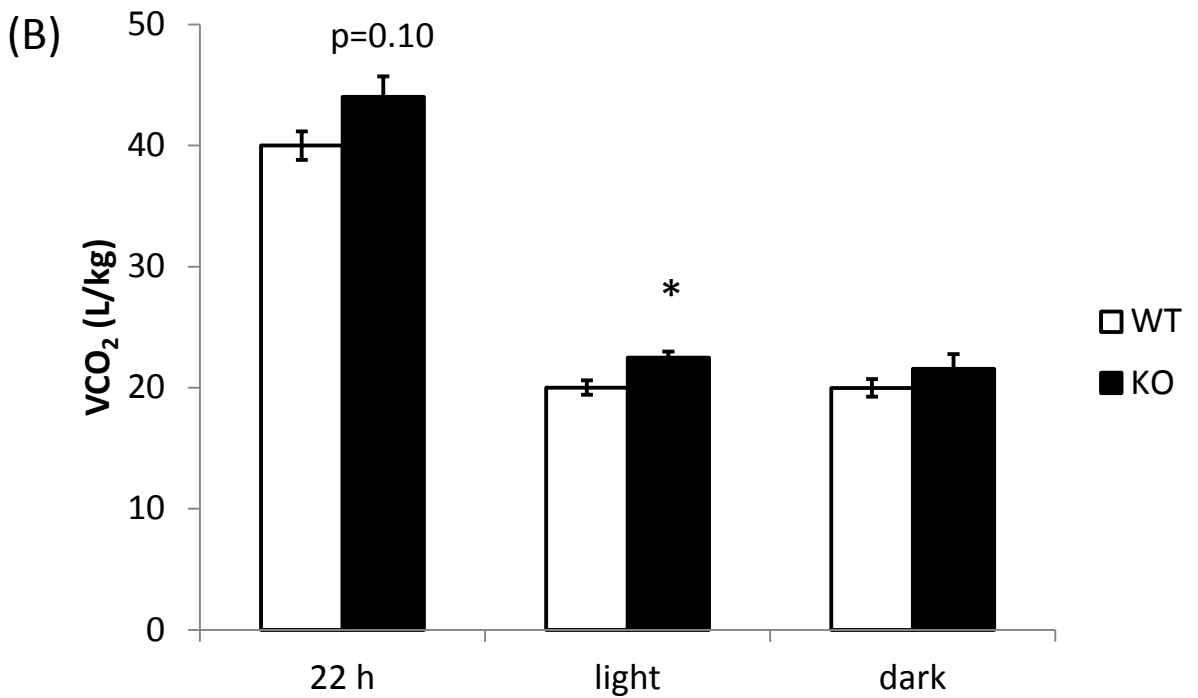
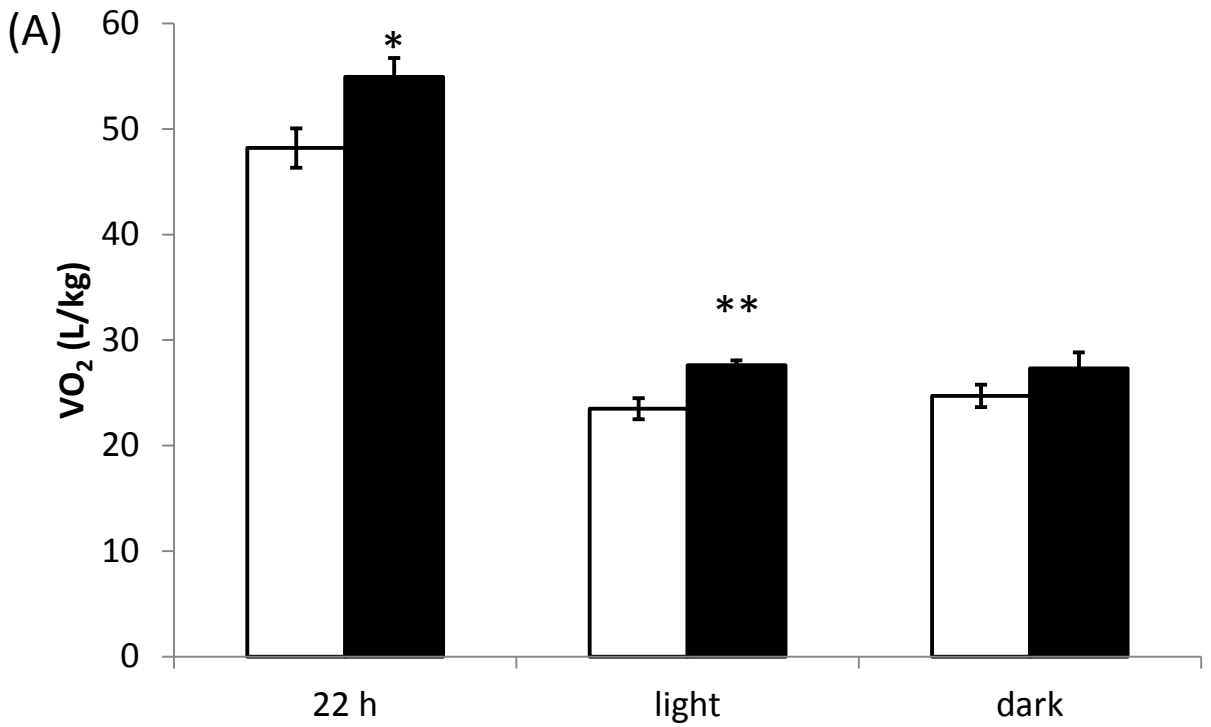


図3-8. エネルギー代謝解析 (その1)

(A)酸素消費量(VO_2)、(B)二酸化炭素排出量(VCO_2)

KOマウスはWTマウスに比べ、明期及び22時間合計で VO_2 が有意に高値を示した。 VCO_2 は明期のみで高値を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(n = 4)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

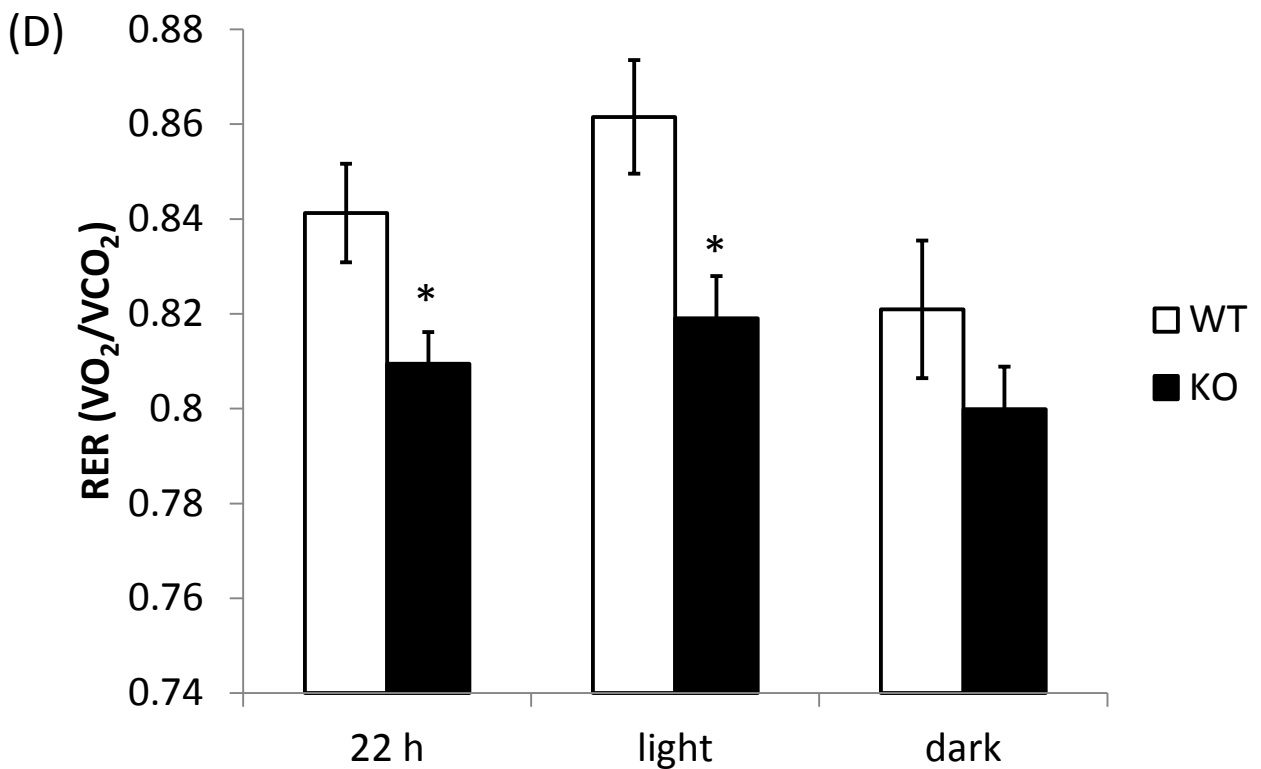
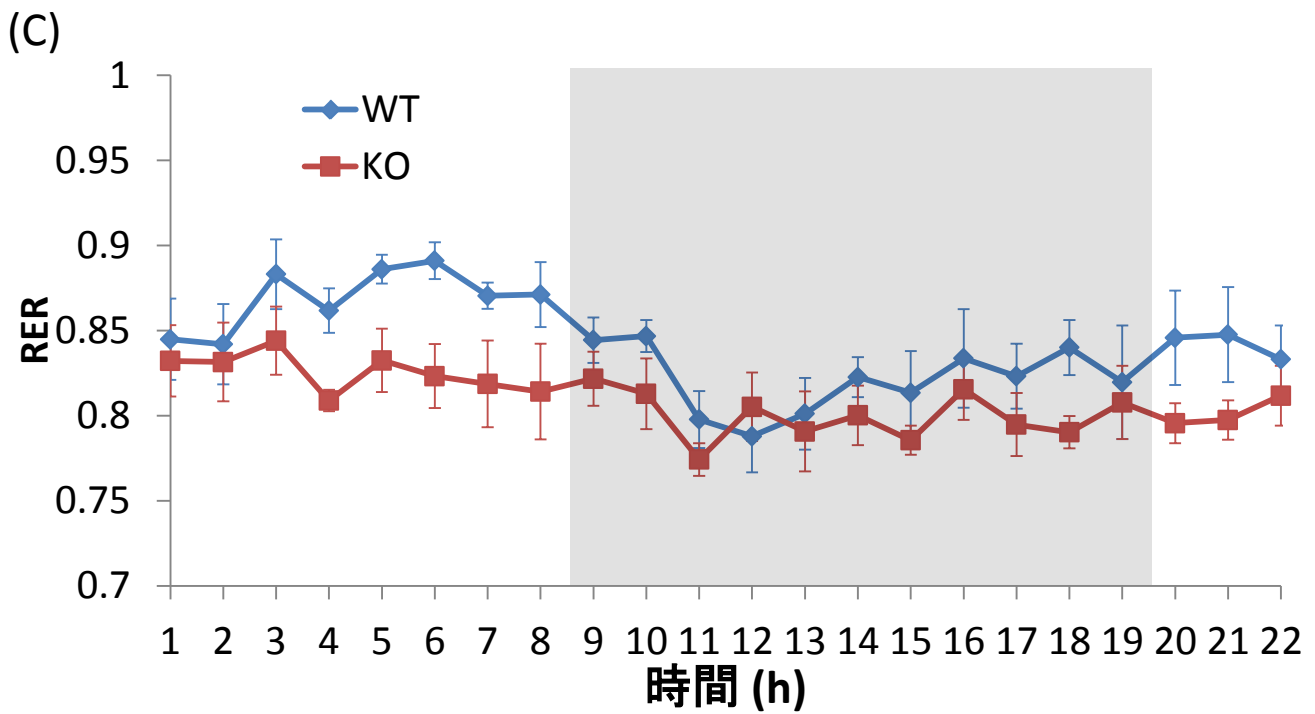


図3-8. エネルギー代謝解析 (その2)

(C)各時点での呼吸交換比(RER)、(D)RER

測定期間のほとんどの時点でWTマウスに比べKOマウスでRERは低値を示した。合計では、暗期で差が見られなかった一方、22時間及び明期においてWTマウスに比べ、KOマウスで有意な低値を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(n = 4)、*はp < 0.05、**はp < 0.01を示す。

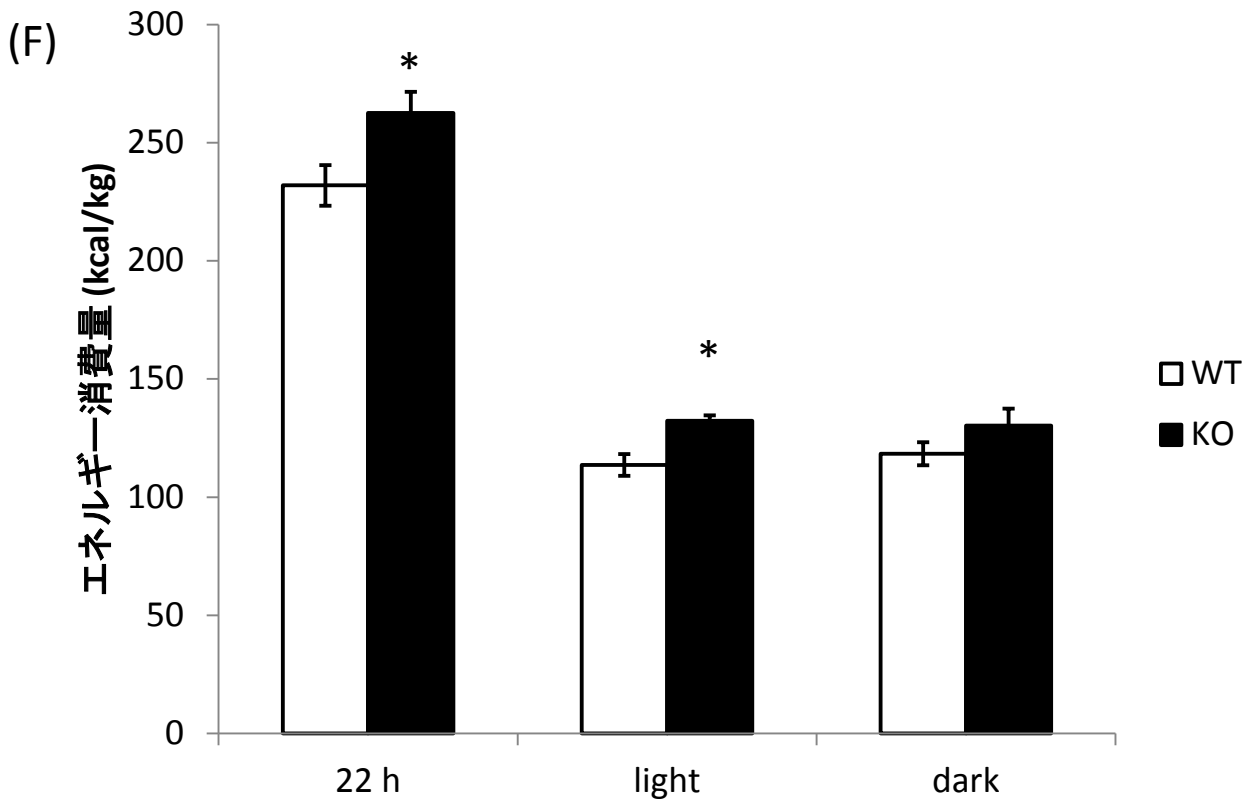
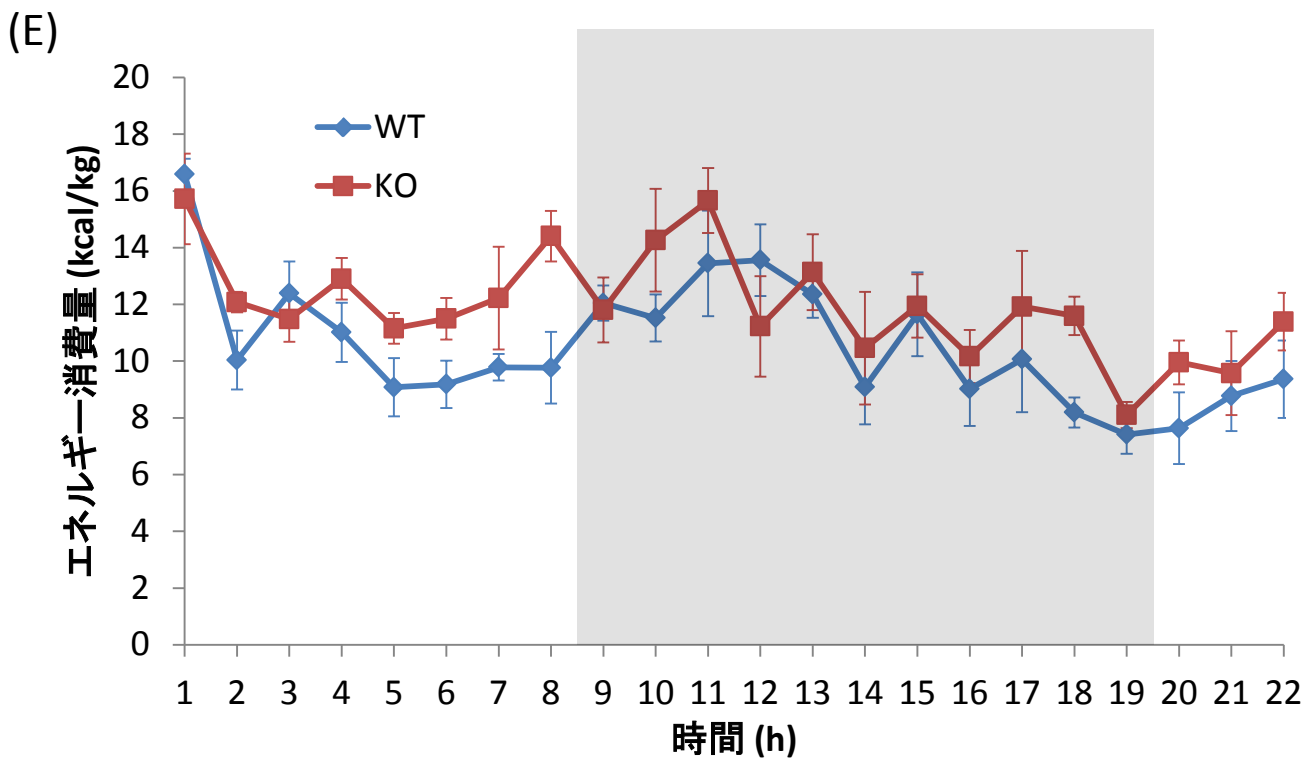


図3-8. エネルギー代謝解析 (その3)

(E)各時点でのエネルギー消費量、(F)エネルギー消費量

エネルギー消費量はばらつきは大きいですが、多くの時点でWTマウスに比べKOマウスで高値を示した。暗期で差が見られなかった一方、22時間及び明期においてWTマウスに比べ、KOマウスでエネルギー消費量が有意な高値を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(n = 4)、* はp < 0.05、** はp < 0.01を示す。

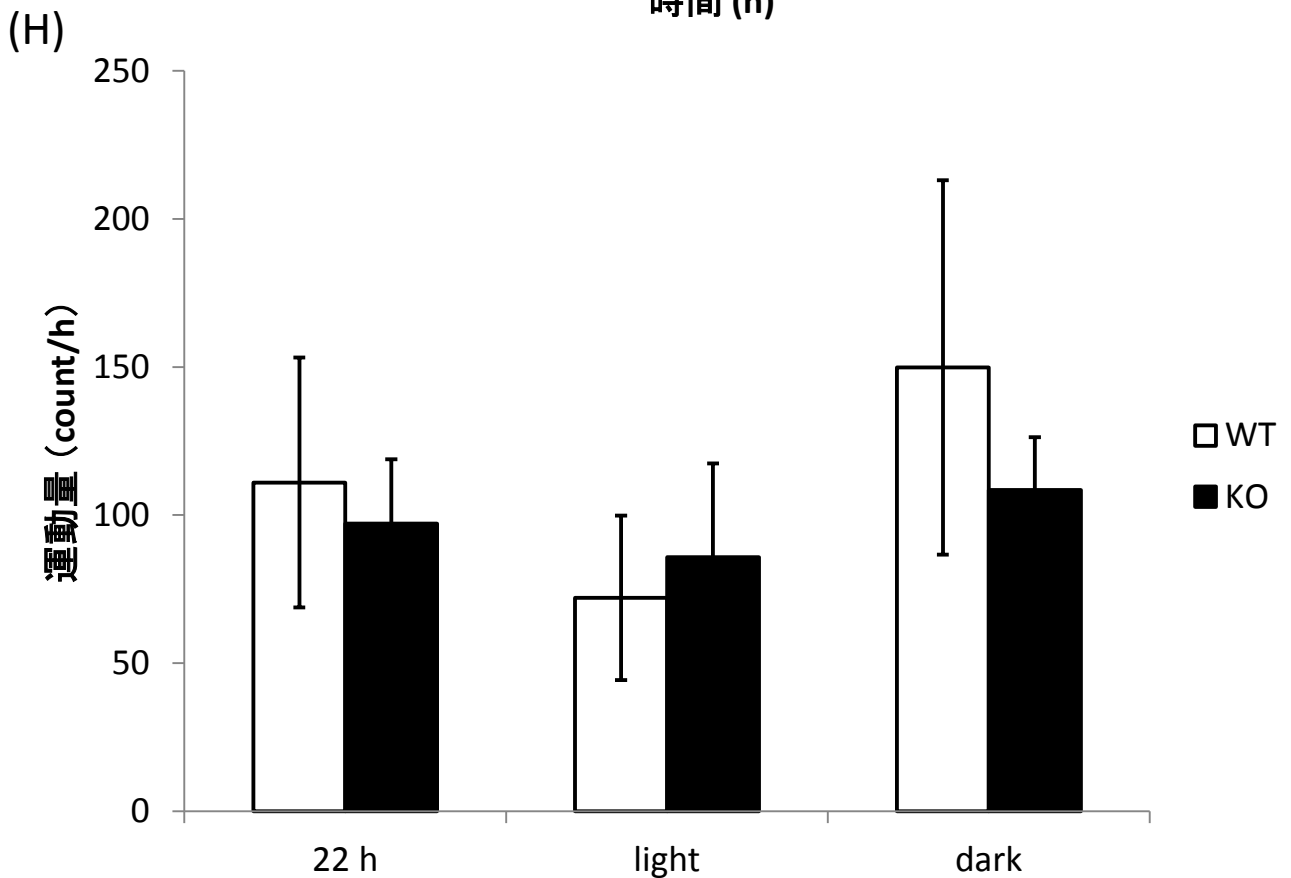
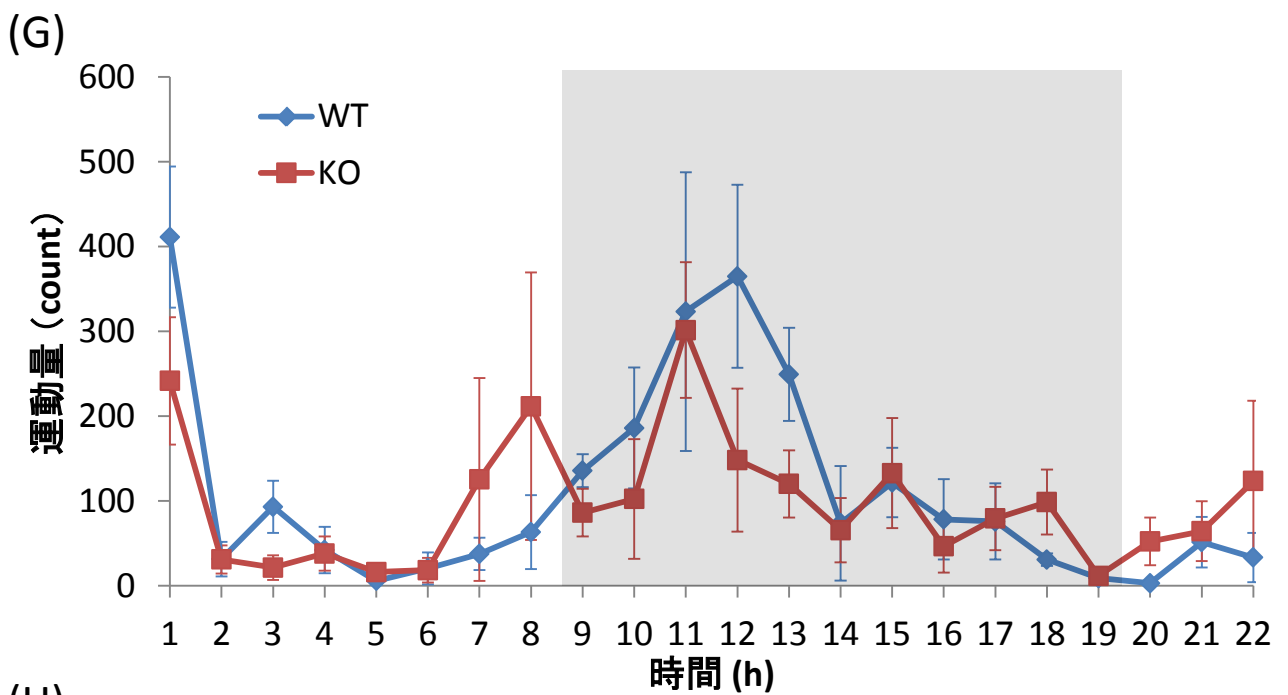


図3-8. エネルギー代謝解析 (その4)

(G)各時点での平均運動量、(H)平均運動量

測定開始直後及び暗期時に運動量が上昇していたが、各時点で差は見られなかった。平均運動量でも、遺伝子型による変化は見られなかった。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(n = 4)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

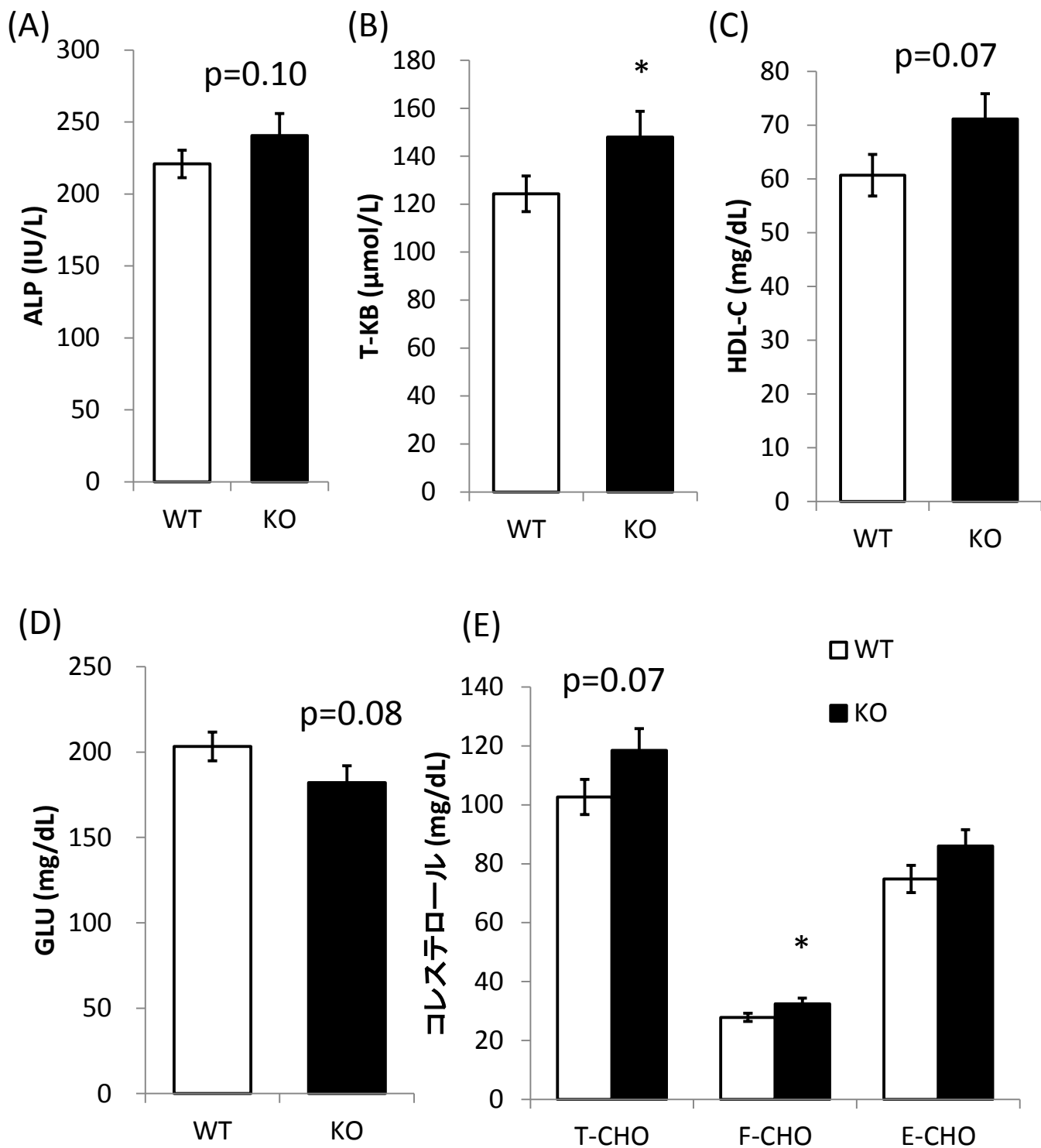


図3-9. *Ad lib*条件下の血液生化学データ

(A)ALP、(B)T-KB、(C)HDL、(D)GLU、(E)各種コレステロール

約20週齢のマウスから*Ad lib*条件下で血液を採集し血液成分の分析を行った。T-KB及びF-CHOでKOマウスは有意に高値を示し、ALP, T-CHO, HDLは上昇傾向、GLUは低下傾向を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 28, KO: n = 18)、* はp < 0.05、** はp < 0.01を示す。

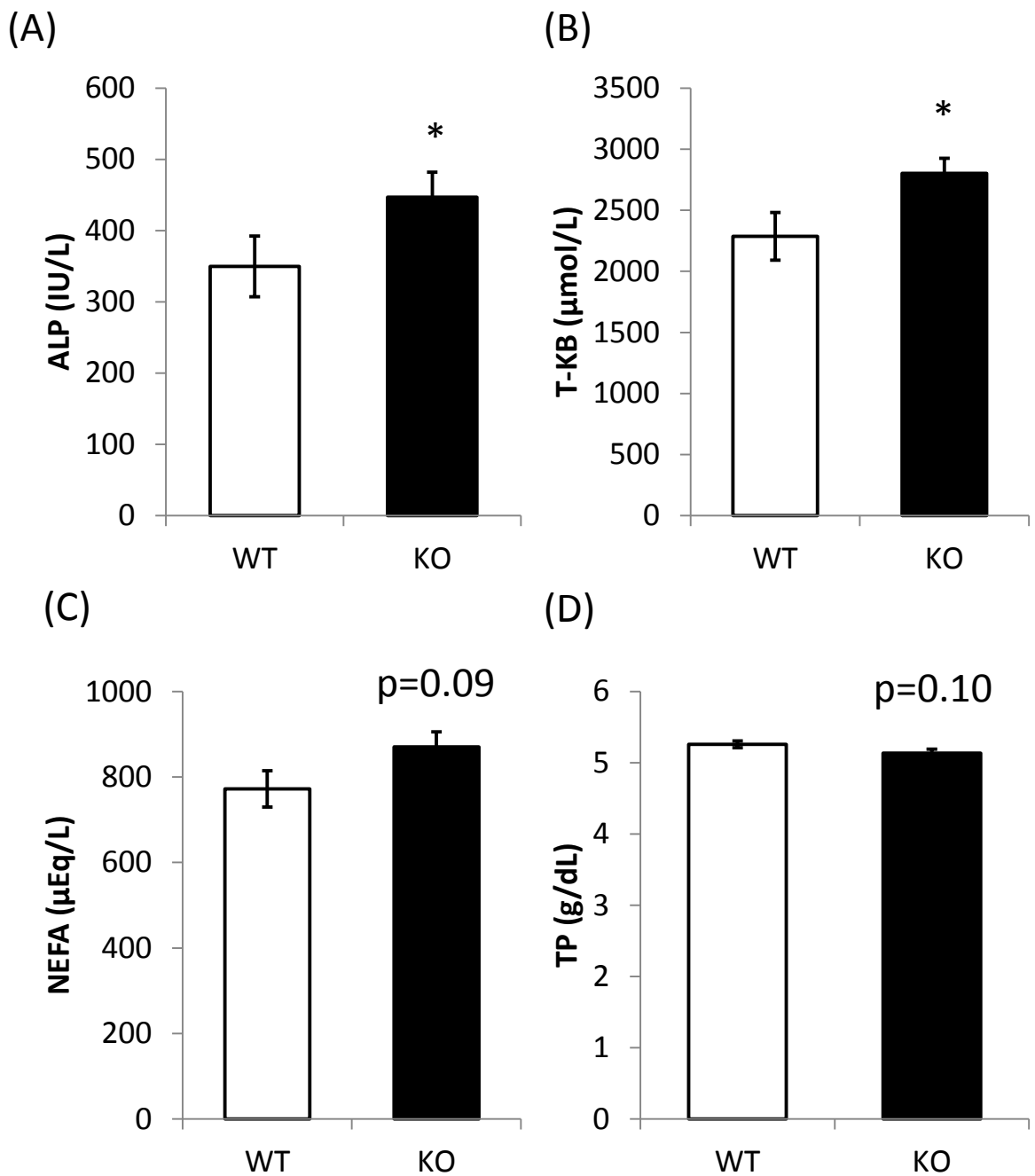


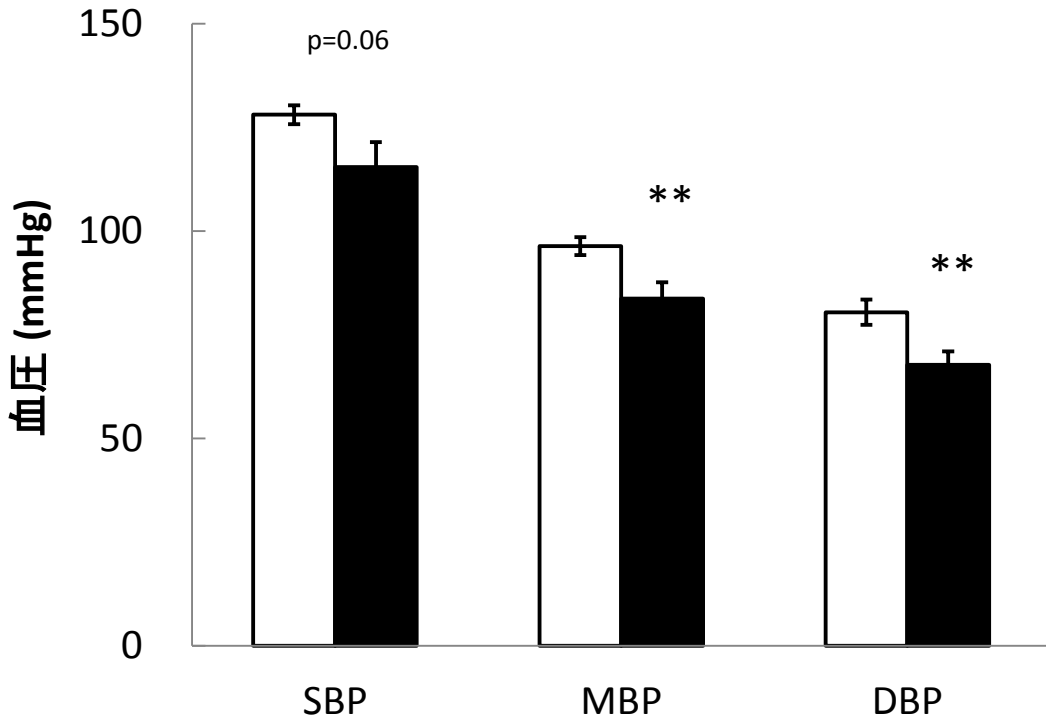
図3-10. 絶食条件下の血液生化学データ

(A)ALP、(B)T-KB、(C)NEFA、(D)TP

12~16週齢のマウスから18時間絶食後血液を採集し血液成分の分析を行った。ALP及びT-KBでKOマウスは有意に高値を示し、NEFAは上昇傾向、TPは低下傾向を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 13, KO: n = 13)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

(A)



(B)

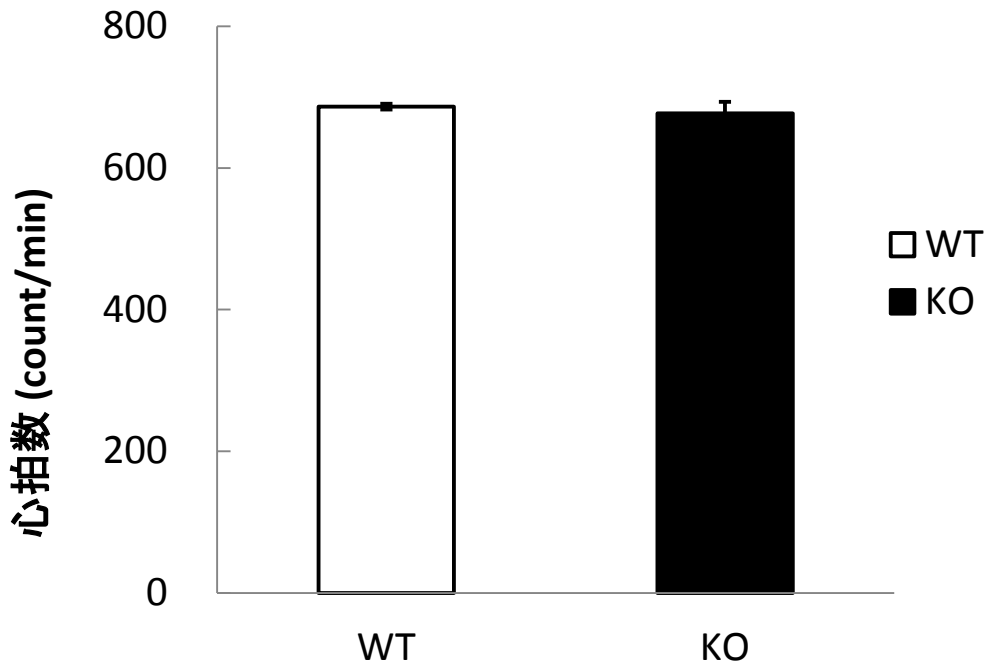


図3-11. 血圧及び心拍数の測定

(A)各血圧(SBP(最高血圧)、MBP(平均血圧)、DBP(最低血圧))、(B)心拍数

7~14週齢のマウスの血圧をテイルカフ法によって測定した。KOマウスは各血圧が低下していたが、心拍数に変化は見られなかった。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 6, KO: n = 7)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

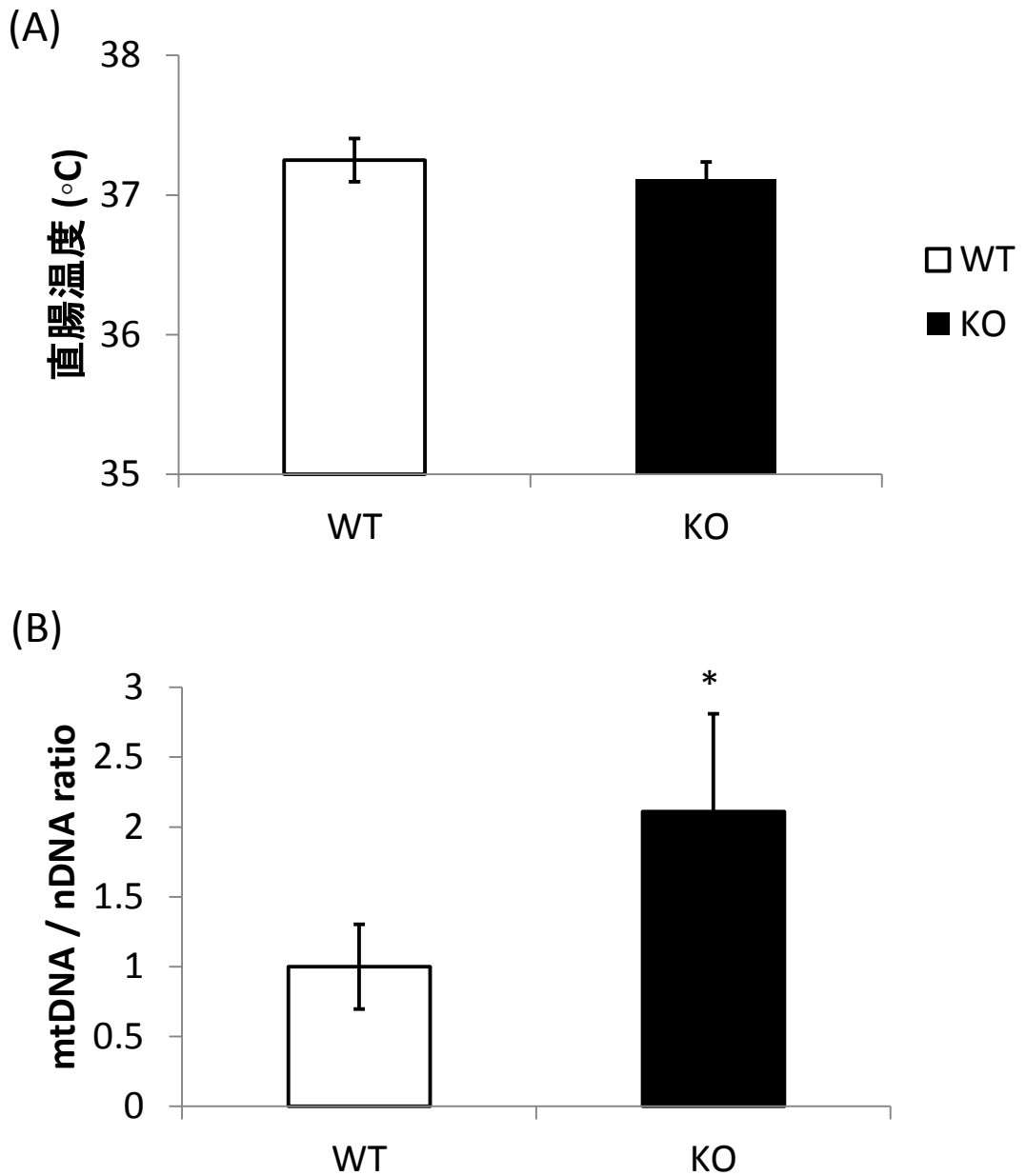


図3-12. 熱産生亢進の可能性に対する検討

(A)直腸温度の測定

約4ヶ月齢のマウスの直腸温度を測定した結果、遺伝子型により直腸温度は変化していなかった。直腸温度はBATなどにおける熱産生の影響を受けるため、全身性の熱産生の亢進は示唆されなかった (WT: n = 12, KO: n = 10)。

(B)腓腹筋におけるミトコンドリアコピー数

ミトコンドリア由来DNAをゲノム由来DNAで補正してミトコンドリアコピー数を算出した。KOマウスはWTマウスに比べ、ミトコンドリア由来のDNA量の割合がWTマウスに比べ増加していた。この結果は、筋細胞あたりの平均ミトコンドリア数が上昇していたことを示唆している (WT: n = 4, KO: n = 4)。

それぞれ白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。数値は平均±標準誤差で示し、*はp < 0.05、**はp < 0.01を示す。

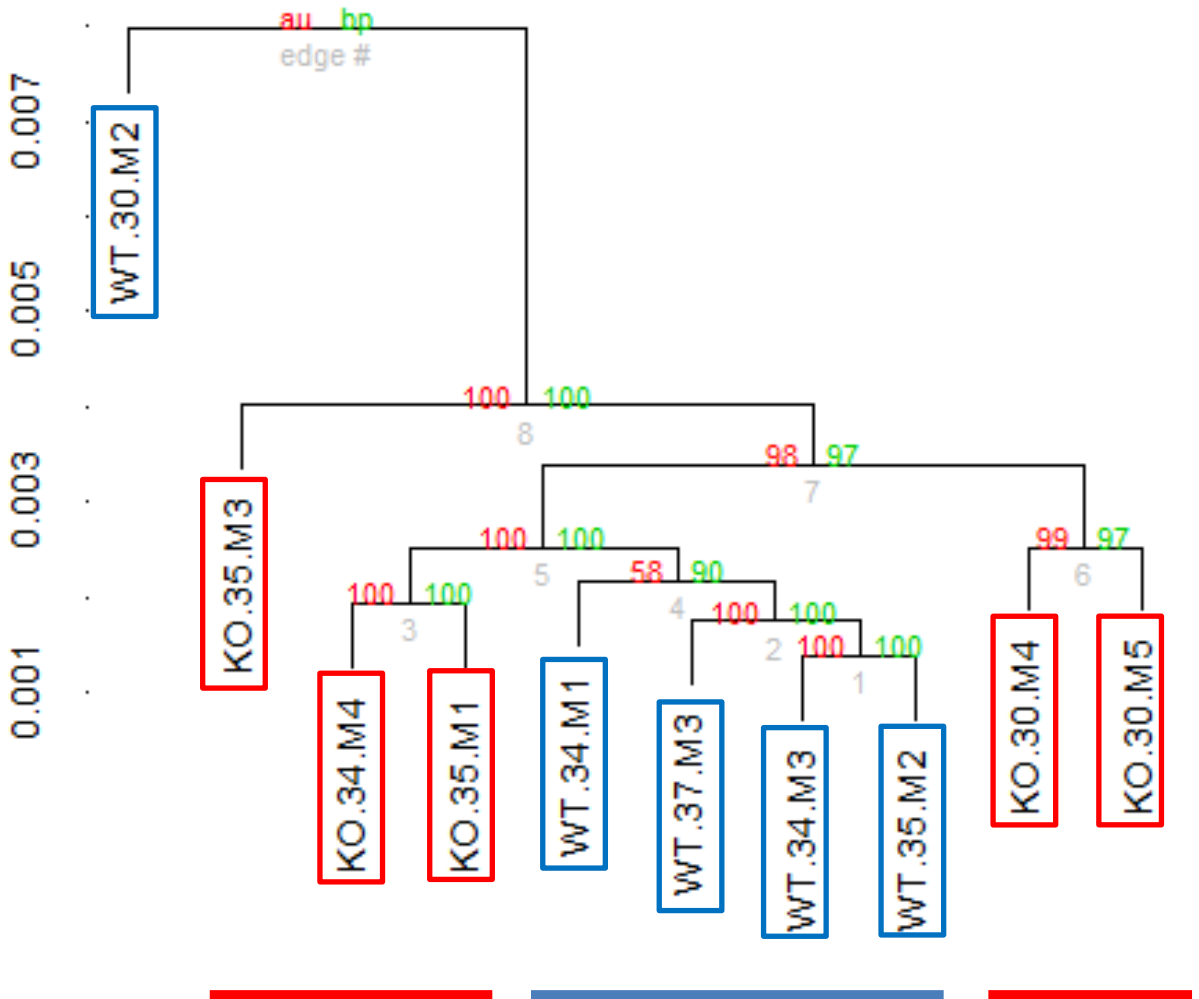


図3-13. qFARMSで正規化した肝臓マイクロアレイデータのサンプル間クラスタリング

WTマウスを青、KOマウスを赤で示した。中央の数字が一致しているものは同腹であることを示している。1サンプル(WT.30.M2)を除いて、WTマウスがクラスターを形成し、クラスター外にKOマウスのサンプルがプロットされた。

この結果より、遺伝子型により遺伝子発現プロファイルが変化していることが示唆された。また、同腹仔ごとのクラスターは形成せず遺伝的背景による影響は見られなかった。

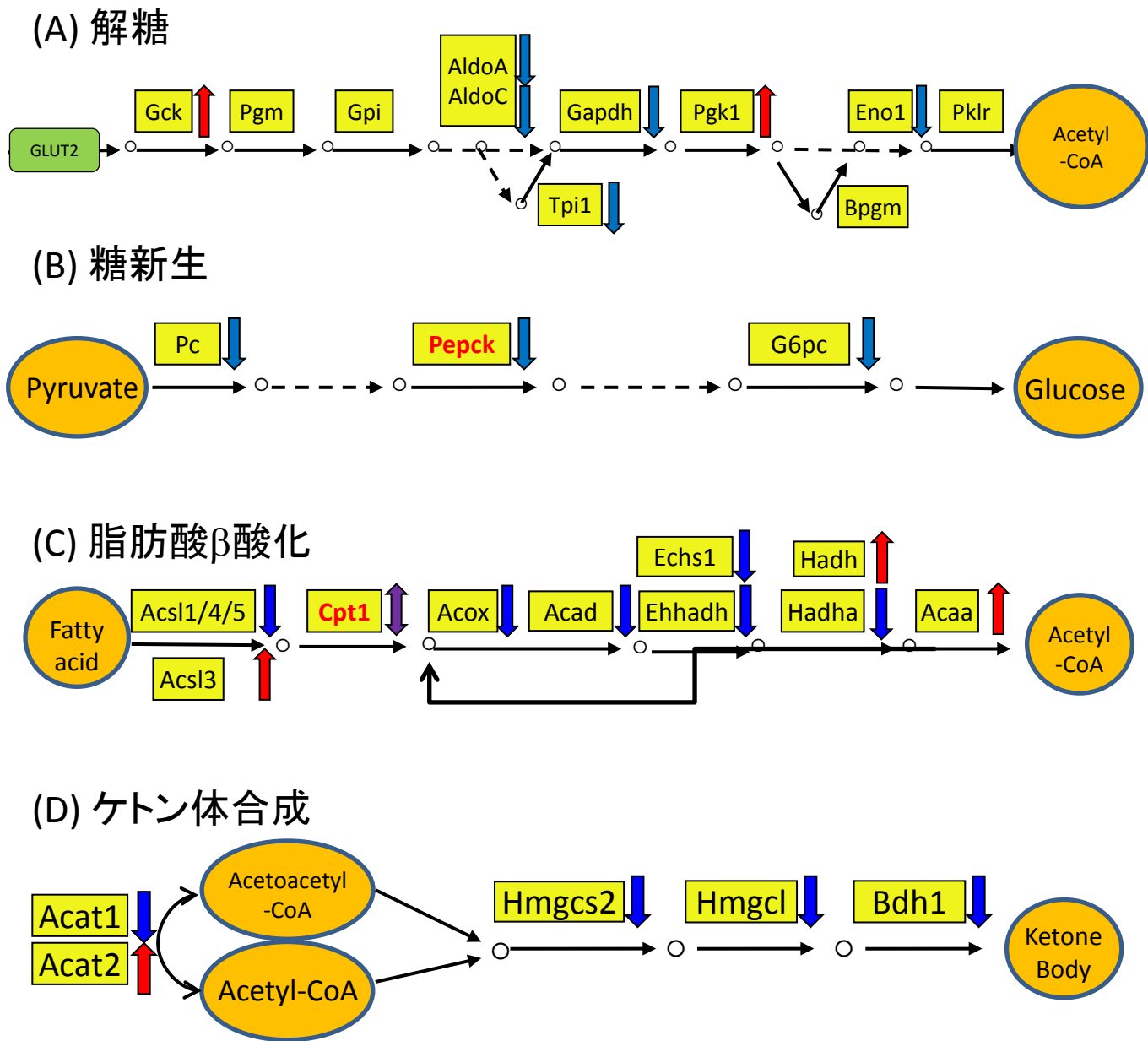


図3-14. 栄養素代謝経路に関連する遺伝子発現変動

(A)解糖、(B)糖新生、(C)脂肪酸β酸化、(D)ケトン体合成経路

赤は発現上昇、青は発現低下、紫は発現上昇・低下の両方で抽出された遺伝子を示す。

解糖関連遺伝子群は発現上昇と発現低下の両方の遺伝子が含まれていたが、糖新生関連遺伝子は全て発現低下していたことから糖新生の低下が示唆された。

脂肪酸β酸化及びケトン体産生に関してはほとんどの遺伝子が発現低下しており、脂肪酸分解からケトン体合成が抑制されることが示唆された。

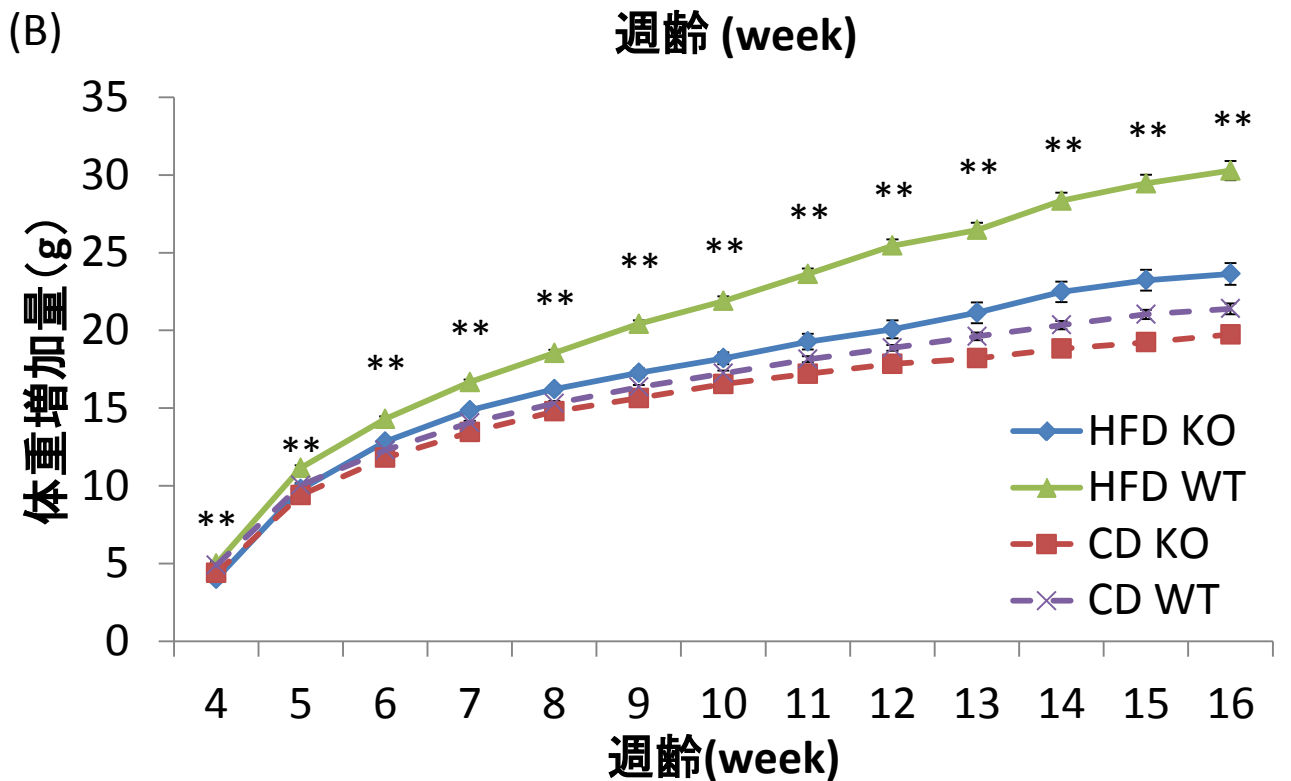
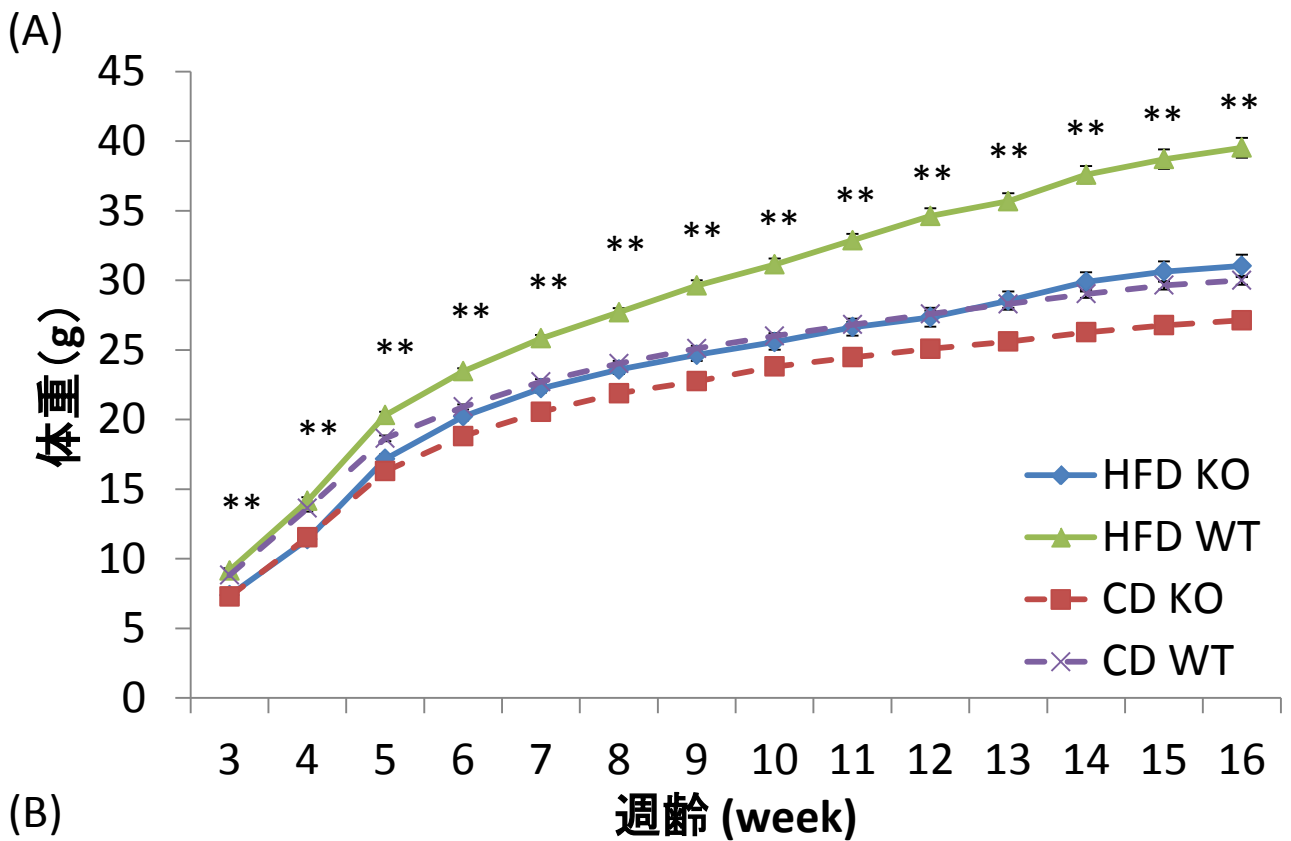


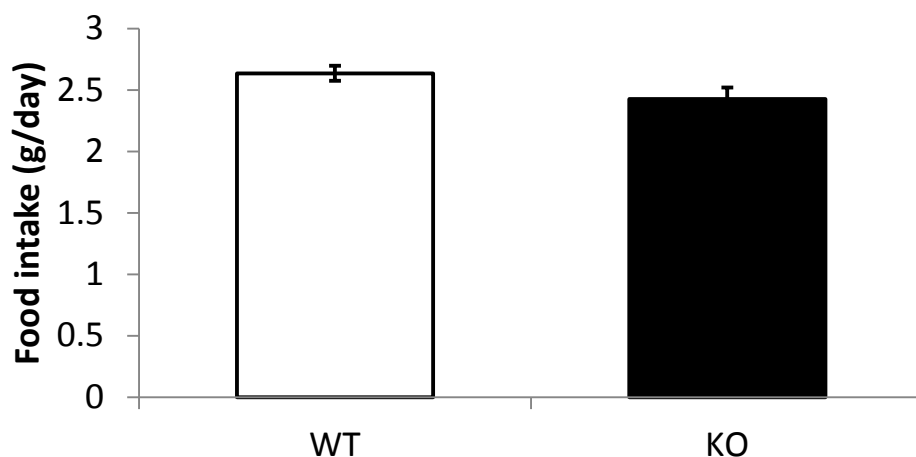
図3-15. 高脂肪食(HFD)飼育時の体重の変化

(A)HFD飼育時の体重変化、(B)体重増加量

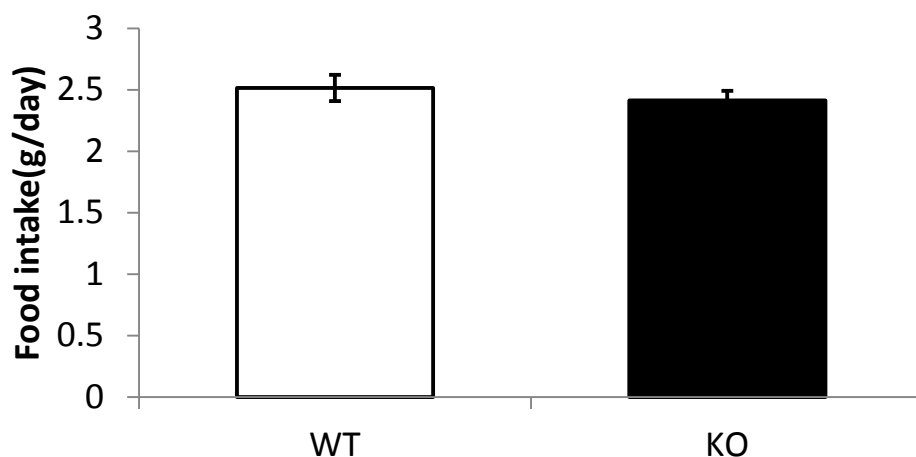
高脂肪食(HFD)飼育時のWTマウスを緑、KOマウスを青で示した。破線は通常食(CD)投与したWTマウスとKOマウスを示した。通常食同様にKOマウスはWTマウスに比べ低体重を示しただけでなく、体重の差及び体重増加量の差はCDに比べ、HFDの方が顕著であった。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n > 54)、* はp < 0.05、** はp < 0.01を示す。

(A) 4週齢



(B) 8週齢



(C) 15週齢

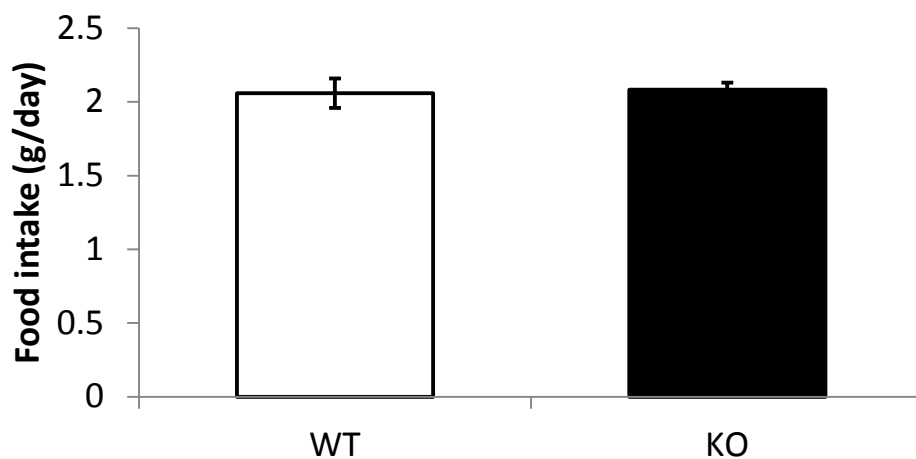


図3-16. HFD飼育時の摂食量解析

(A)4週齢時、(B)8週齢時、(C)15週齢時の1日あたりの平均摂食量

各週齢1週間で摂食量の測定を行い、1日あたりの摂食量を比較した。その結果、摂食量の変化が見られなかった。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(各週齢WT, KO: n = 8~10)、* は $p < 0.05$ を示す。

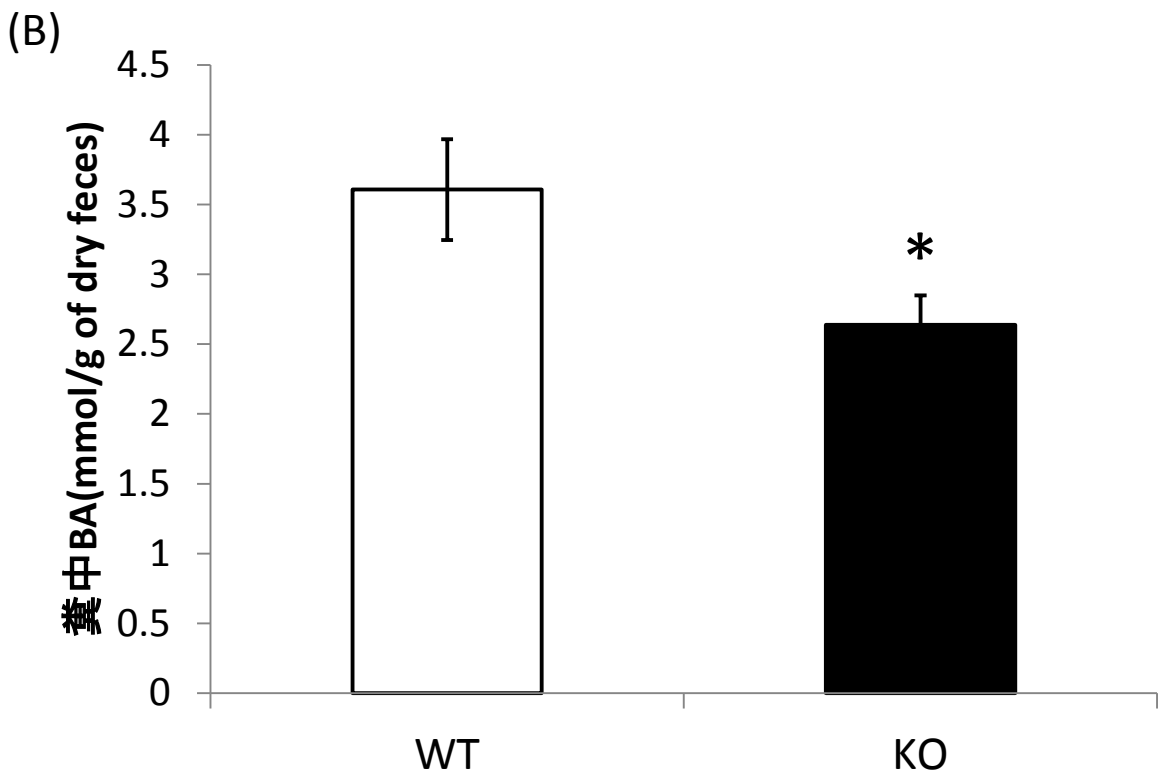
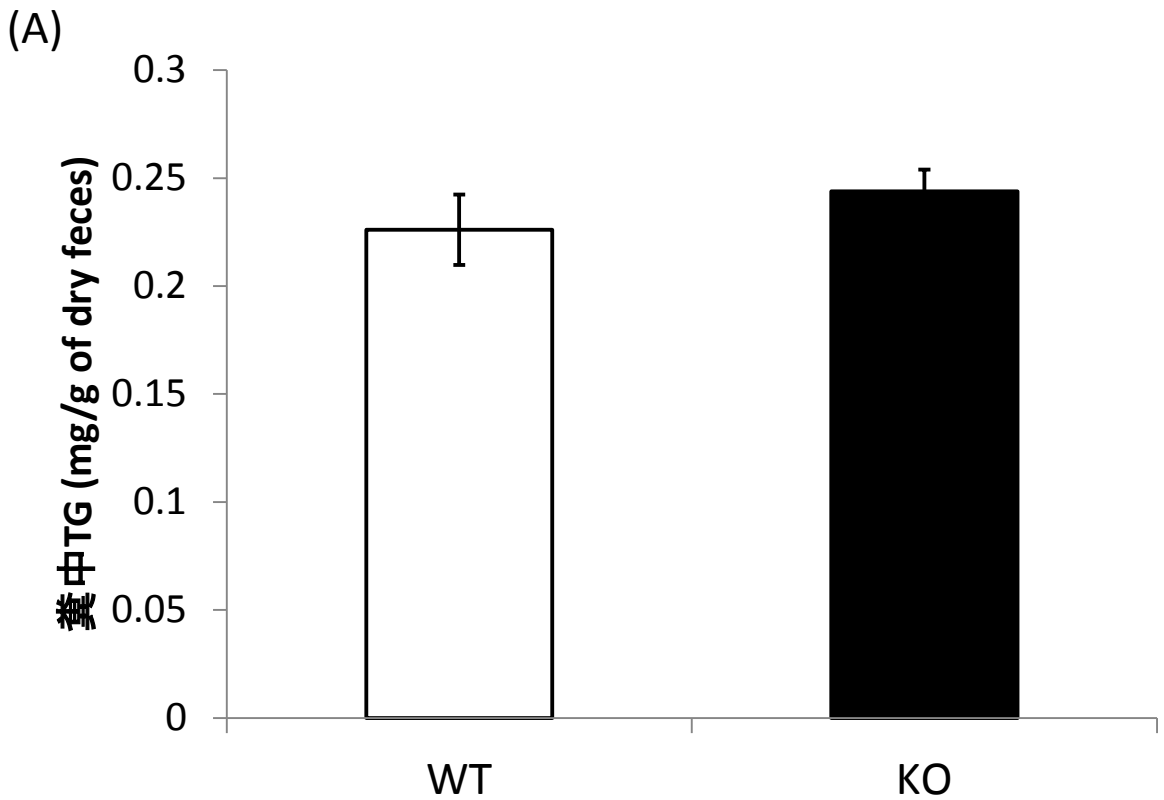


図3-17. 糞中脂質濃度の解析

(A)糞中トリアシルグリセロール(TG)濃度、(B)糞中胆汁酸(BA)濃度

HFDで飼育した15週齢マウスの畜糞を行い、糞中TG濃度及び糞中BA濃度を測定した。その結果、糞中TG濃度は変化が見られなかったが、糞中BA濃度はKOマウスはWTマウスに比べ高値を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 8, KO: n = 10)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

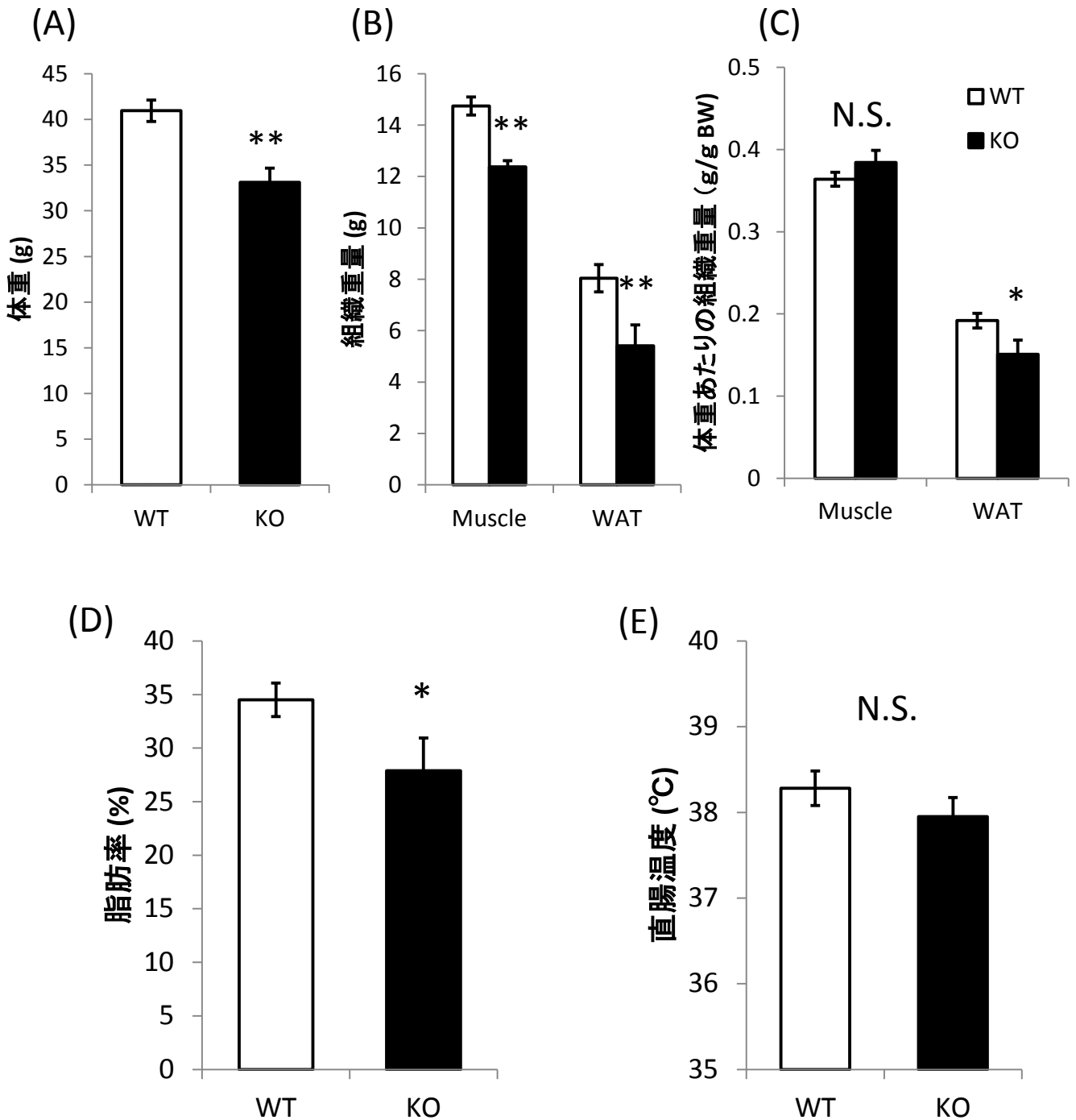


図3-18. HFD飼育時の体組成解析

(A)測定したマウスの体重、(B)組織重量、(C)体重あたりの組織重量、(D)脂肪率、(E)直腸温度

体重あたりの脂肪重量はWTマウスに比べKOマウスの方が低値を示し、体脂肪率が低下し、体重あたりの筋肉量には変化はなかった。これらの知見は通常食と一致した。また、直腸温にも変化は見られなかった。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 26, KO: n = 18)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ 、N.S.は有意差がなかったことを示す。

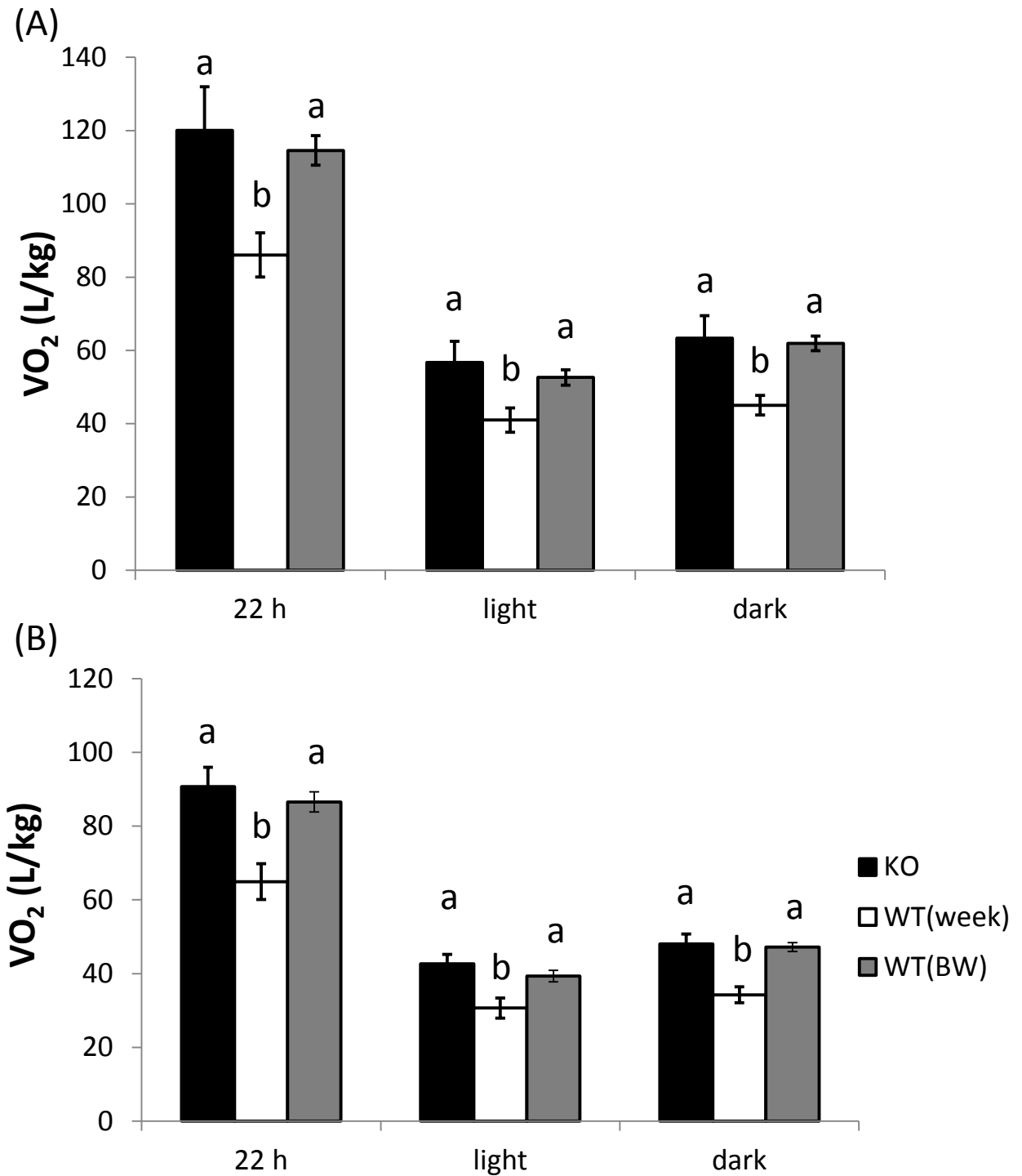


図3-19. HFD飼育時のエネルギー代謝(*Ad lib*) (その1)

(A)酸素消費量(VO_2)、(B)二酸化炭素排出量(VCO_2)

HFDで飼育した17~19週齢KOマウスと同週齢のWTマウスをWT(week)、同体重のマウス(約9週齢)をWT(BW)として示した。

VO_2 及び VCO_2 の値は、KOマウスとWT(week)はWT(BW)に比べ、各時点で高値を示した。黒はKOマウス、白は同週齢のWTマウス、灰色は同体重のWTマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 4)、異なるアルファベット間には有意差があることを示す (Tukey-Kramerの多重検定 $p < 0.05$)。

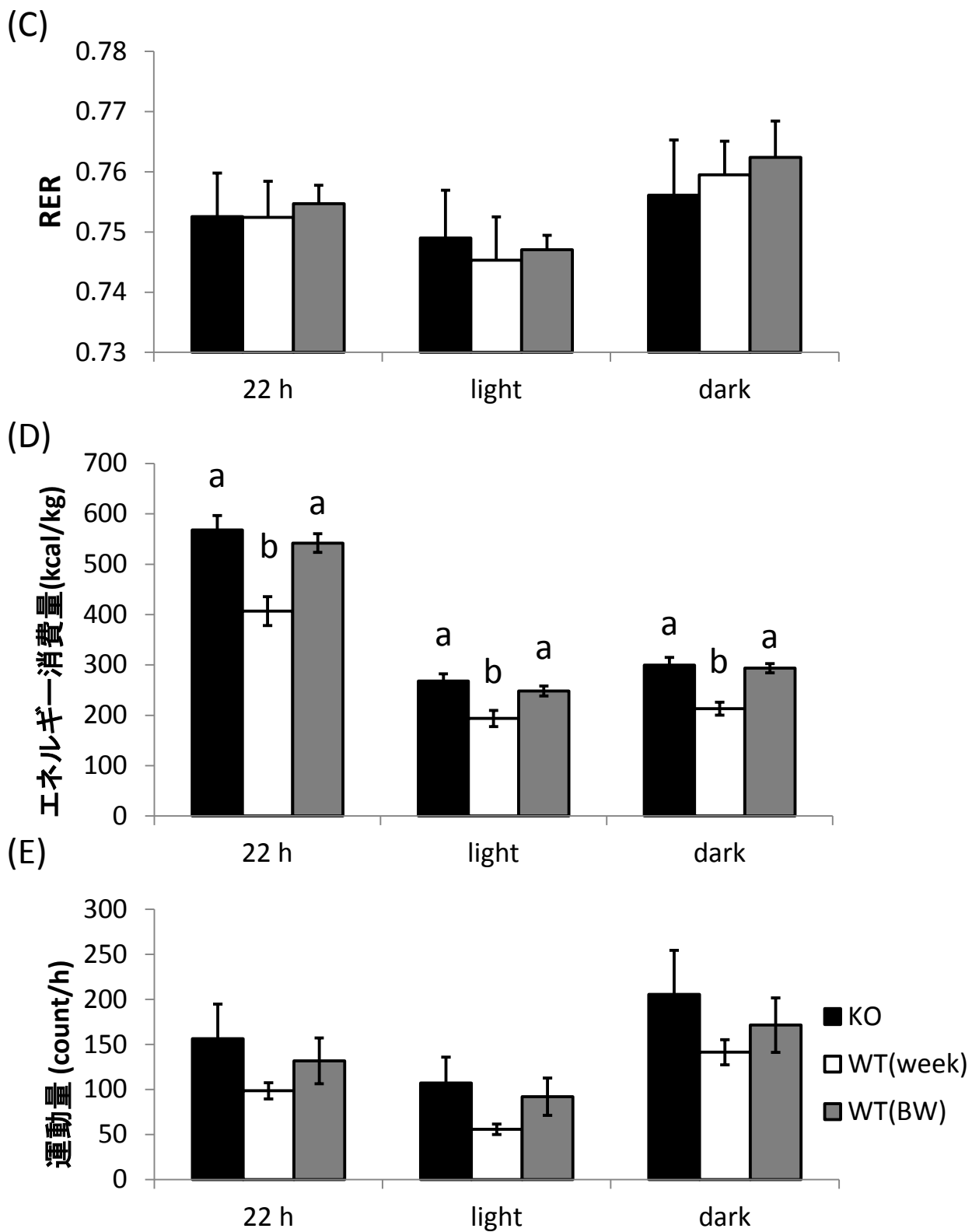


図3-19. HFD飼育時のエネルギー代謝(*Ad lib*) (その2)

(C)呼吸交換比(RER)、(D)エネルギー消費量、(E)平均運動量

RERは大きな変化がなかったが、KOマウス及びWT(week)はWT(BW)に比べエネルギー消費量が増加していた。運動量に変化は見られなかった。黒はKOマウス、白は同週齢のWTマウス、灰色は同体重のWTマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 4)、異なるアルファベット間には有意差があることを示す (Tukey-Kramerの多重検定 $p < 0.05$)。

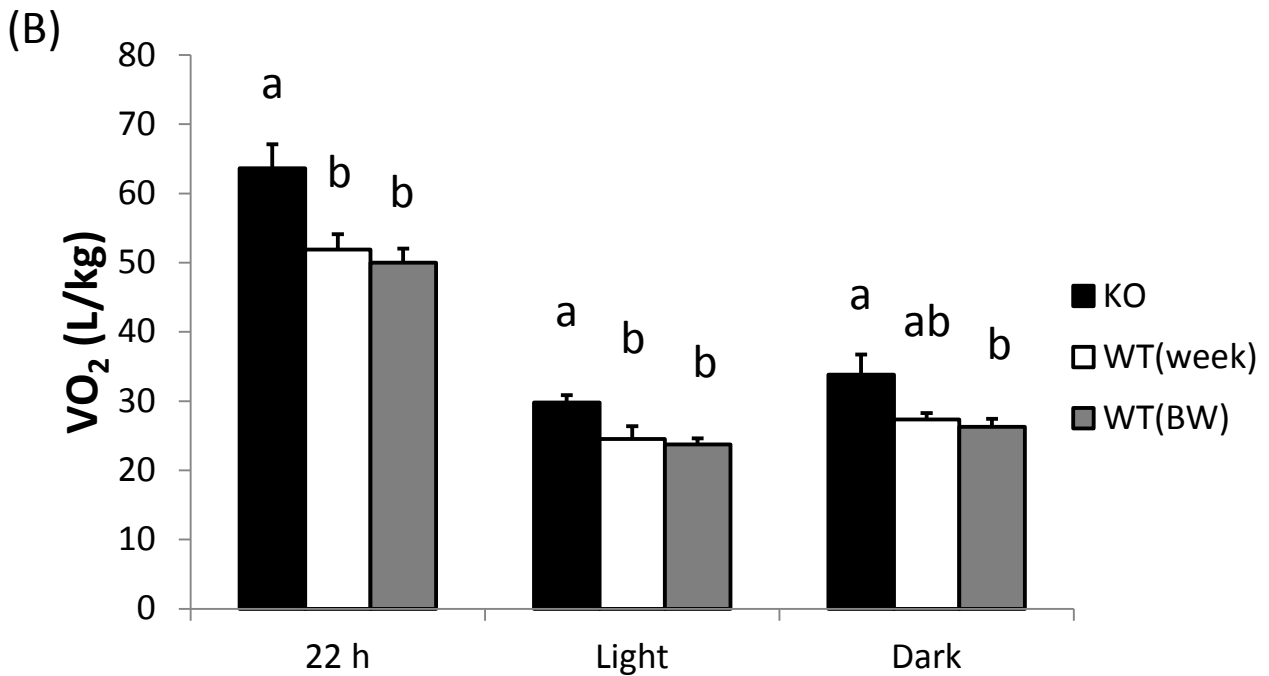
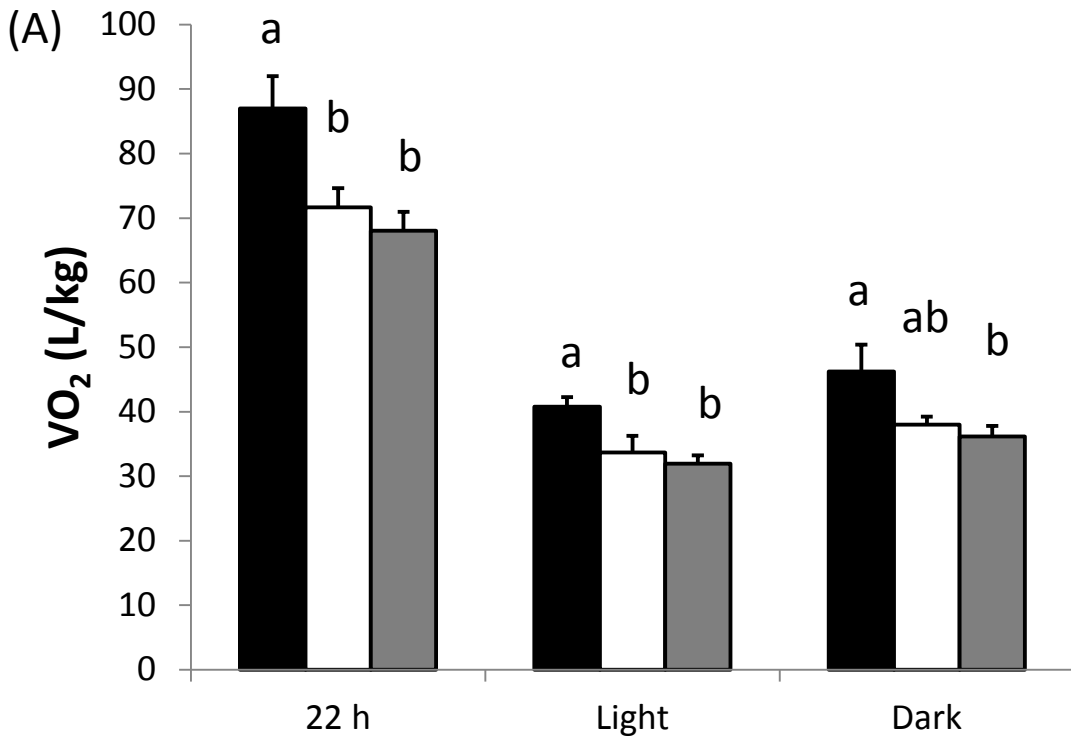


図3-20. HFD飼育時のエネルギー代謝(絶食)(その1)

(A)酸素消費量(VO_2)、(B)二酸化炭素排出量(VCO_2)

HFDで飼育した17~19週齢KOマウスと同週齢のWTマウスをWT(week)、同体重のマウス(8~9週齢)をWT(BW)として示した。KOマウスは各WTに比べ、 VO_2 及び VCO_2 で高値を示した。特に、明期及び22時間合計での差が顕著であった。黒はKOマウス、白は同週齢のWTマウス、灰色は同体重のWTマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 4)、異なるアルファベット間には有意差があることを示す (Tukey-Kramerの多重検定 p < 0.05)。

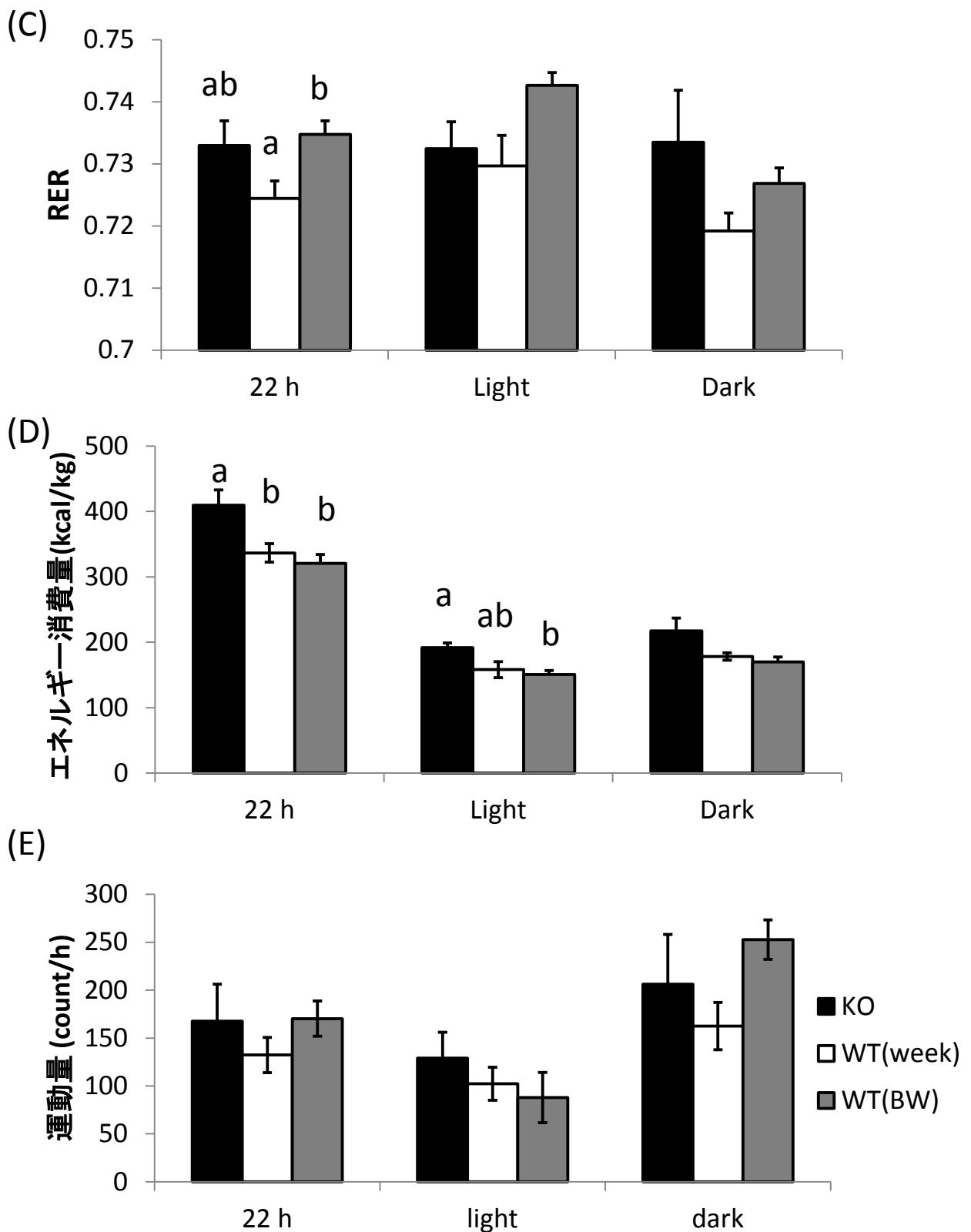


図3-20. HFD飼育時のエネルギー代謝(絶食) (その2)

(C)呼吸交換比(RER)、(D)エネルギー消費量、(E)平均運動量

KOマウスに対して同週齢のWTマウスをWT(week)、同体重のマウス(8~9週齢)をWT(BW)として示した。RERに大きな変化がなかった一方で、エネルギー消費量はKOマウスは各WTマウスに比べて顕著に増加していた。運動量には変化はなかった。黒はKOマウス、白は同週齢のWTマウス、灰色は同体重のWTマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 4)、異なるアルファベット間には有意差があることを示す (Tukey-Kramerの多重検定 $p < 0.05$)。

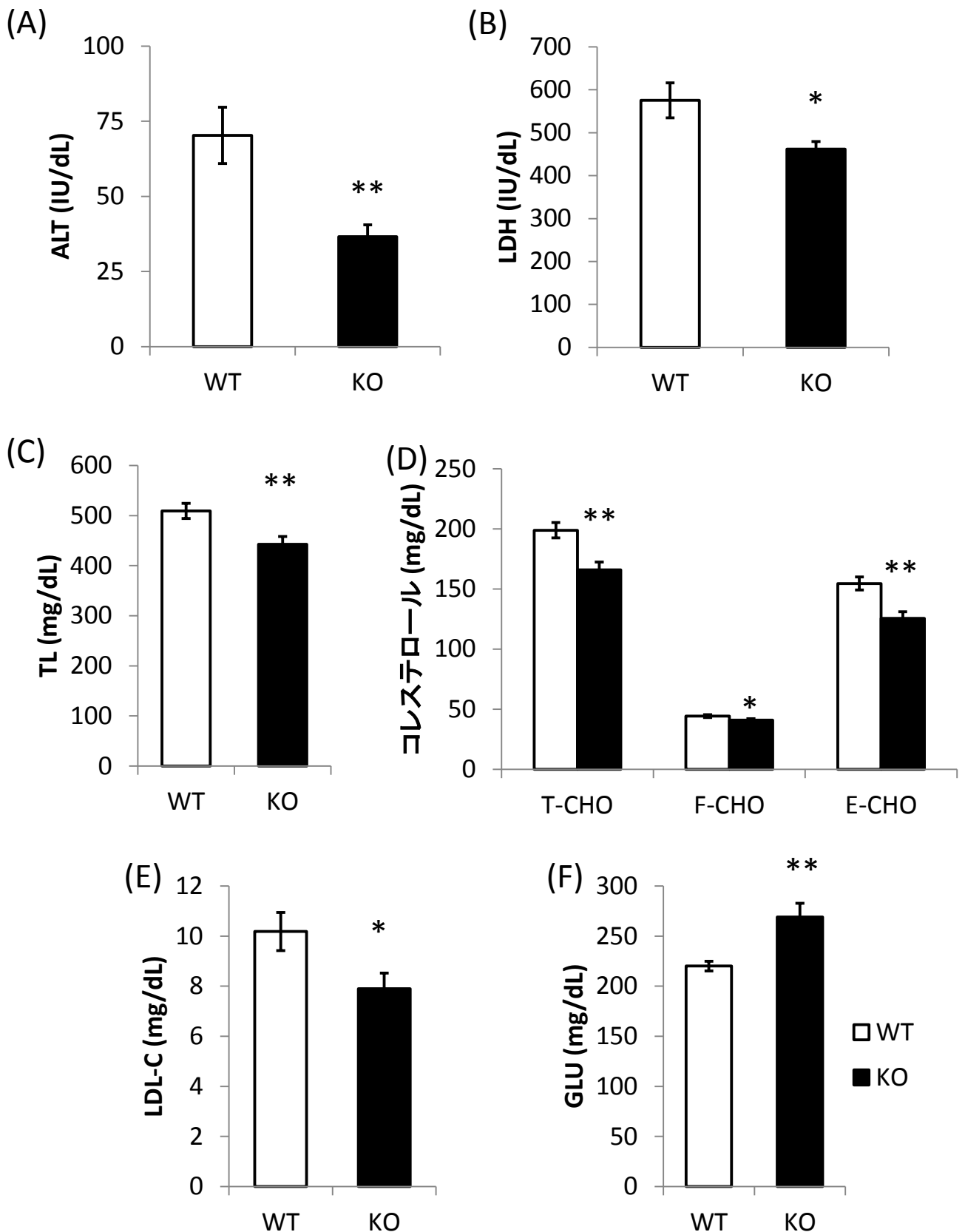


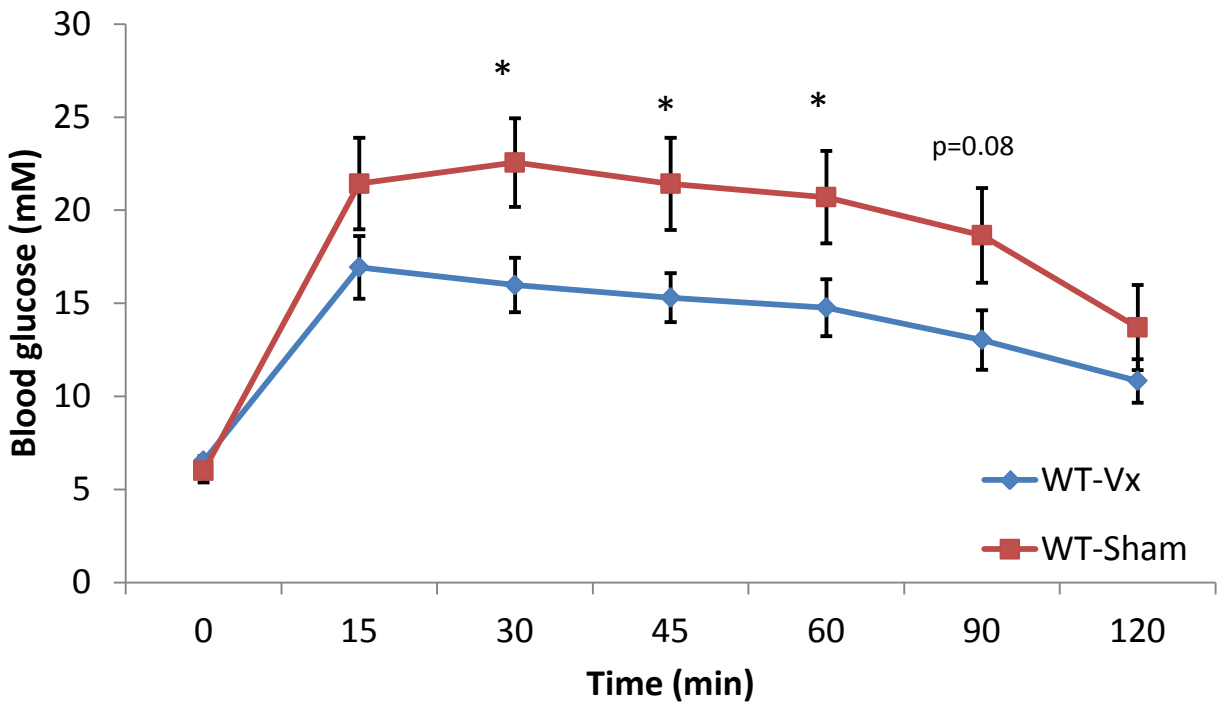
図3-21. HFD飼育時の血液生化学データ (*Ad lib*)

(A)ALP、(B)LDH、(C)TL、(D)各種コレステロール、(E)LDL-C、(F)GLU

HFDで飼育した約20週齢のマウスから*Ad lib*条件下で血液を採集し血液成分の分析を行った。肝機能項目(ALP, LDH)及び脂質関連項目(TL, 各種コレステロール, LDL-C)でKOマウスはWTマウスに比べて有意に低値を示した一方、GLUは有意に高値を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 24, KO: n = 20)、*はp < 0.05、**はp < 0.01を示す。

(A)



(B)

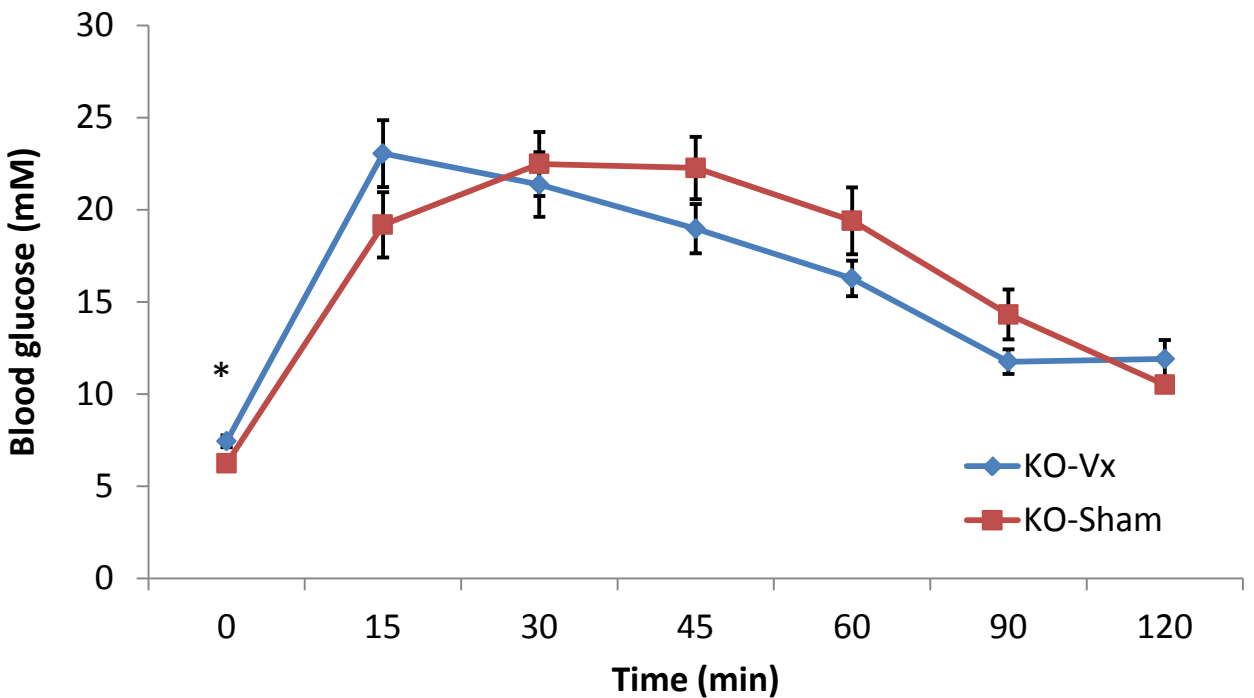


図3-22. Vxマウスに対してOGTTを行った時の血糖値変化

(A)WTマウス、(B)KOマウス

迷走神経切断(Vx)群を青、偽手術(Sham)群を赤で示した。WTマウスでは、Vx群の血糖値がSham群の血糖値に比べ低値を示した(30, 45, 60 min)。一方、KOマウスでは、OGTT前の血糖値はVx群の方がSham群に比べ高値を示したが、OGTT後はVx手術の有無による血糖値の変化に差は見られなかった。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 6~10)、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。

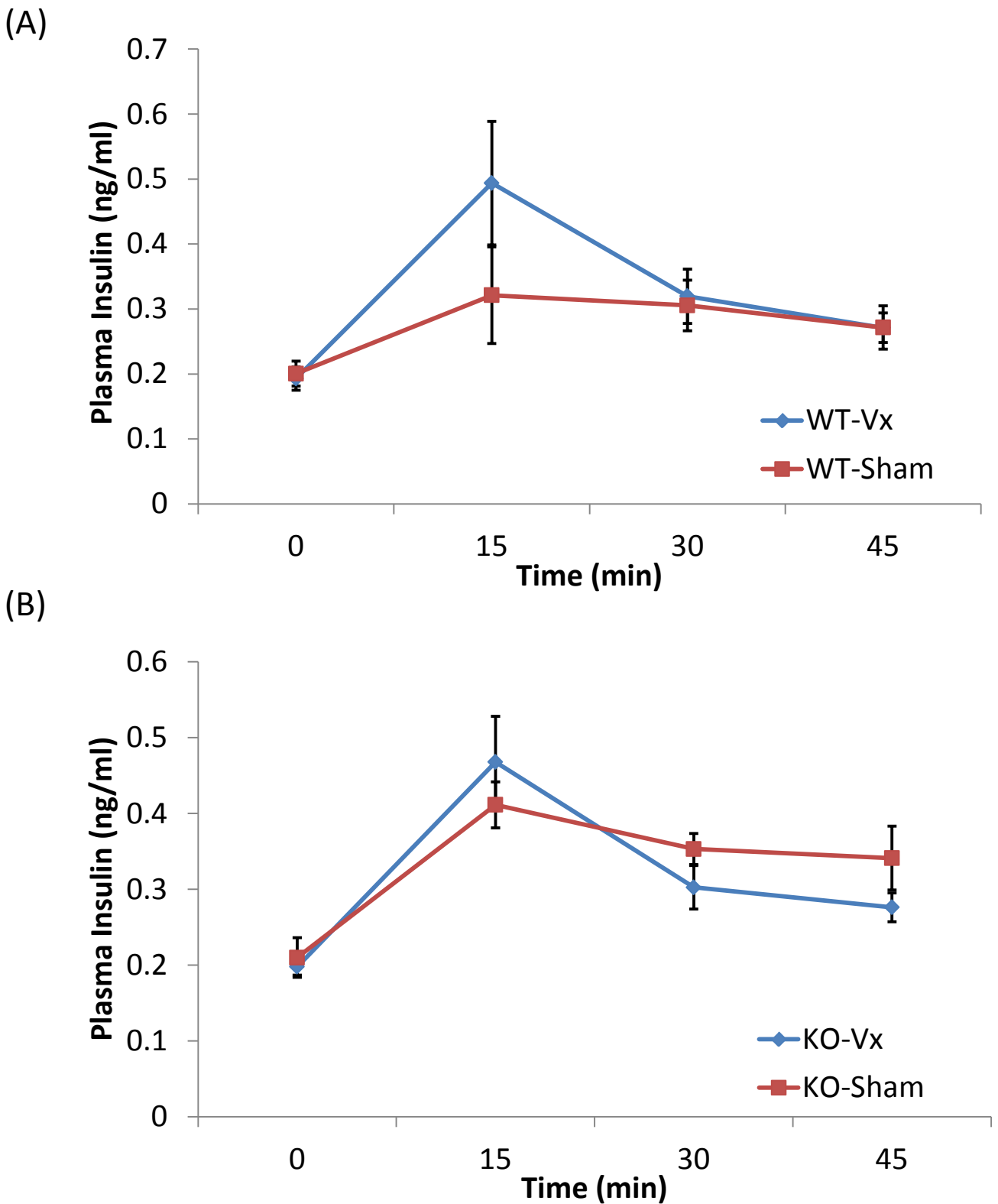


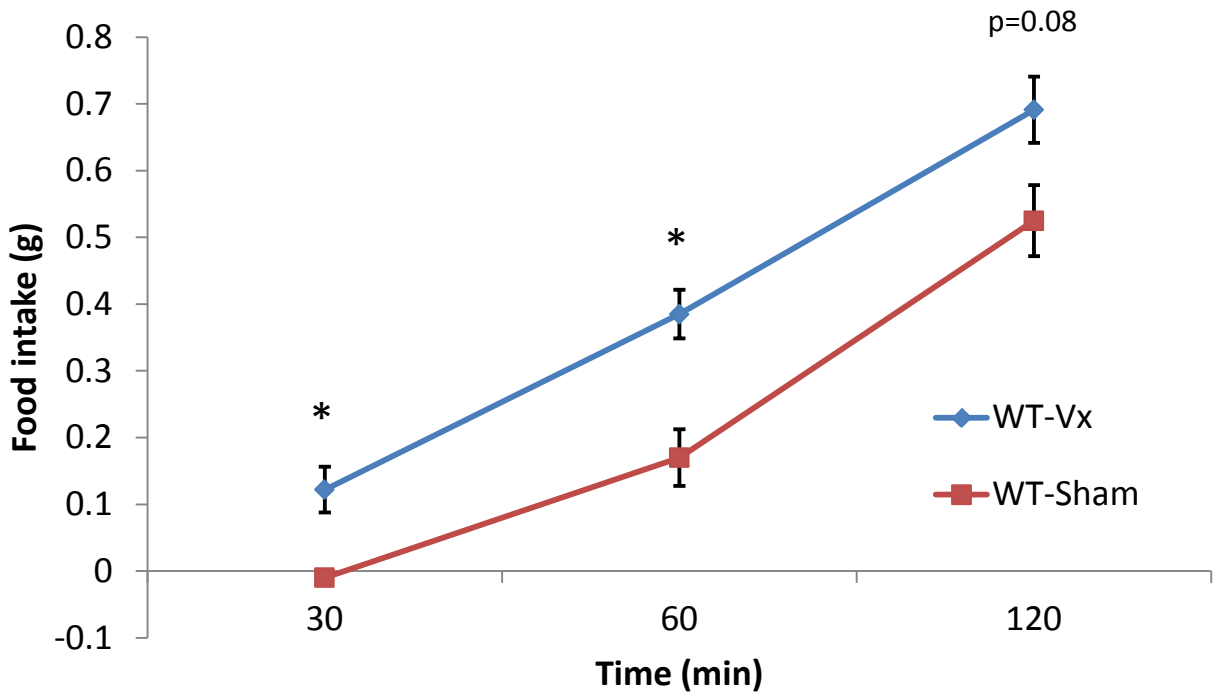
図3-23. Vxマウスに対するOGTT実施時のインスリン変化

(A)WTマウス、(B)KOマウス

迷走神経切断(Vx)群を青、偽手術(Sham)群を赤で示した。WTマウス及びKOマウスで、手術の有無によるOGTT後のインスリン分泌量に差は見られなかった。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 6~10)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

(A) WTマウス



(B) KOマウス

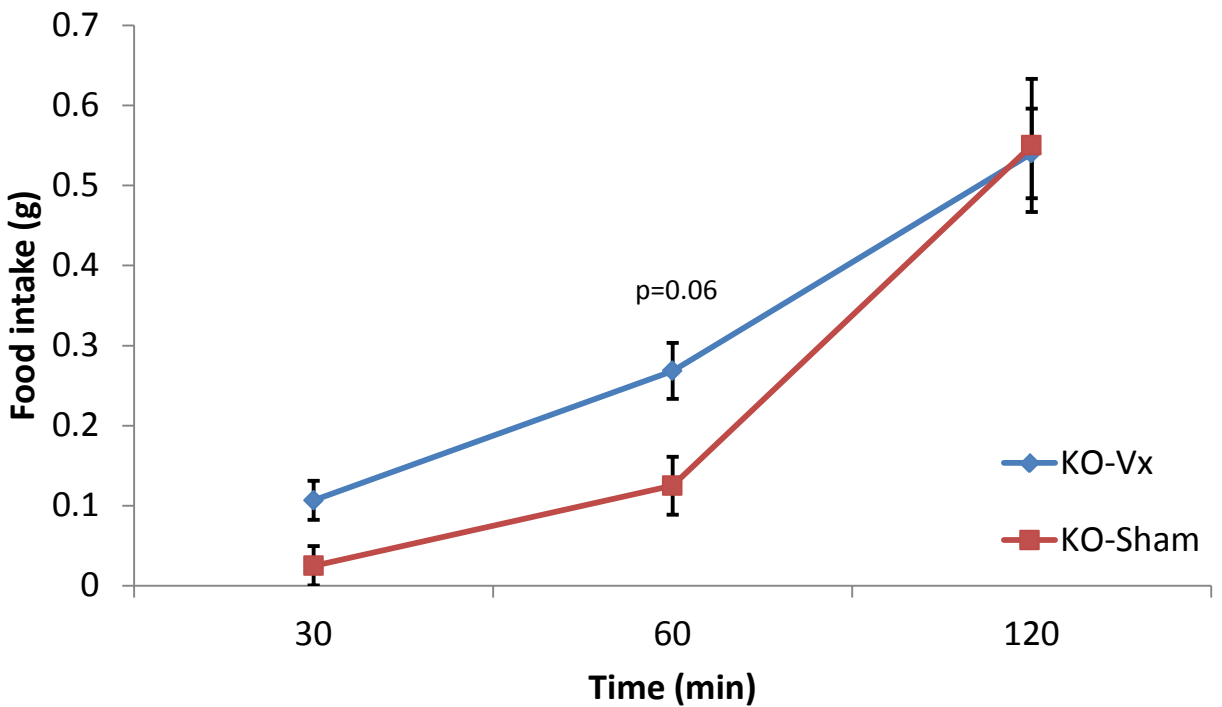


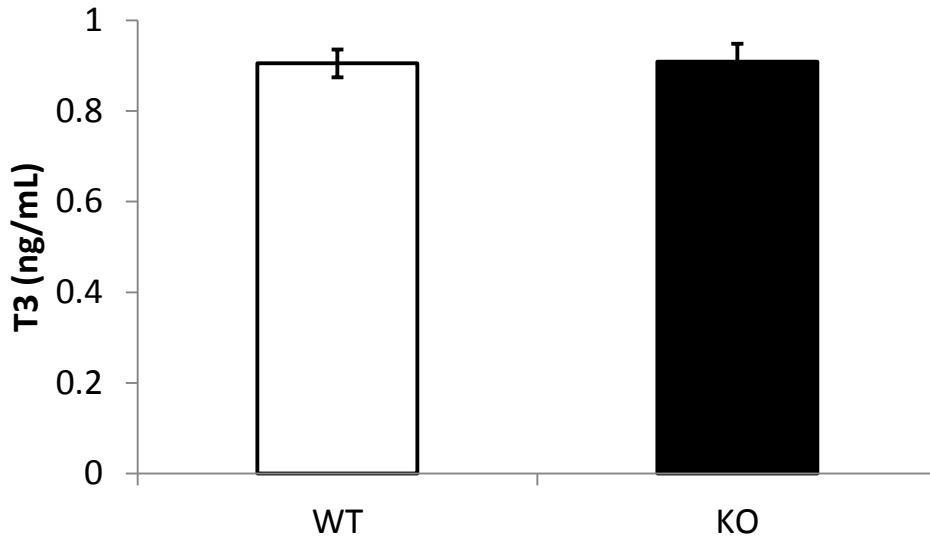
図3-24. Vxマウスに対するCCK負荷試験

(A)WTマウス、(B)KOマウス

迷走神経切断(Vx)群を青、偽手術(Sham)群を赤で示した。WTマウス及びKOマウスで、Sham群に比べVx群の方が摂食量が多く、CCKの作用の違いが存在することが示唆された。

数値は平均±標準誤差で示し(WT, KO: n = 6~10)、* は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ を示す。

(A)



(B)

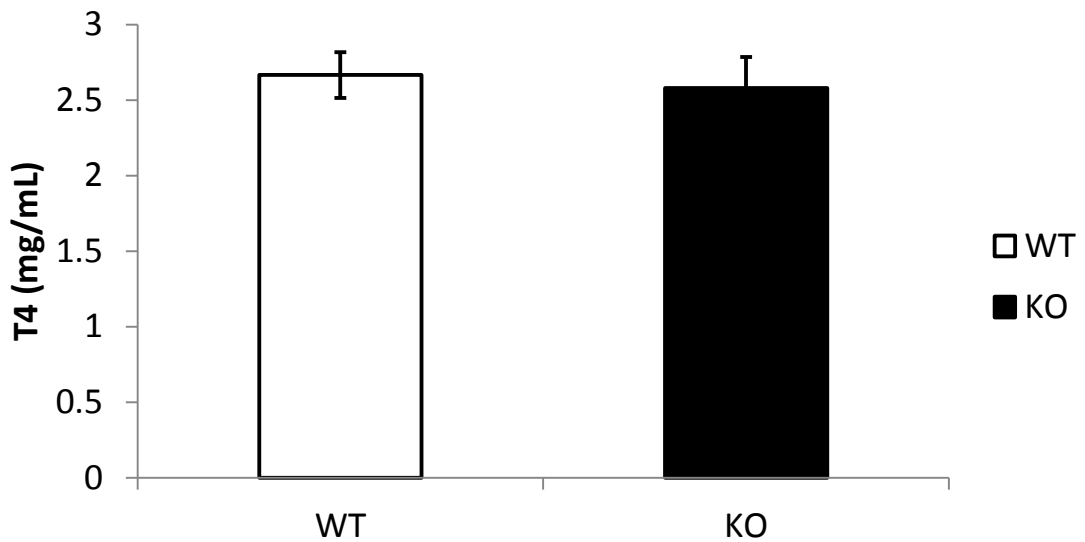


図3-25. エネルギー消費に関わるホルモン(*Ad lib*)

(A)T3ホルモン、(B)T4ホルモン

HFDで飼育した約11~12週齢のマウスから*Ad lib*条件下で血液を採集し血中ホルモンの分析を行った。エネルギー消費との関連が深いことが知られている甲状腺ホルモン(T3, T4)を測定した結果、遺伝子型による有意な変化は見られなかった。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 8, KO: n = 7)、* はp < 0.05、** はp < 0.01を示す。

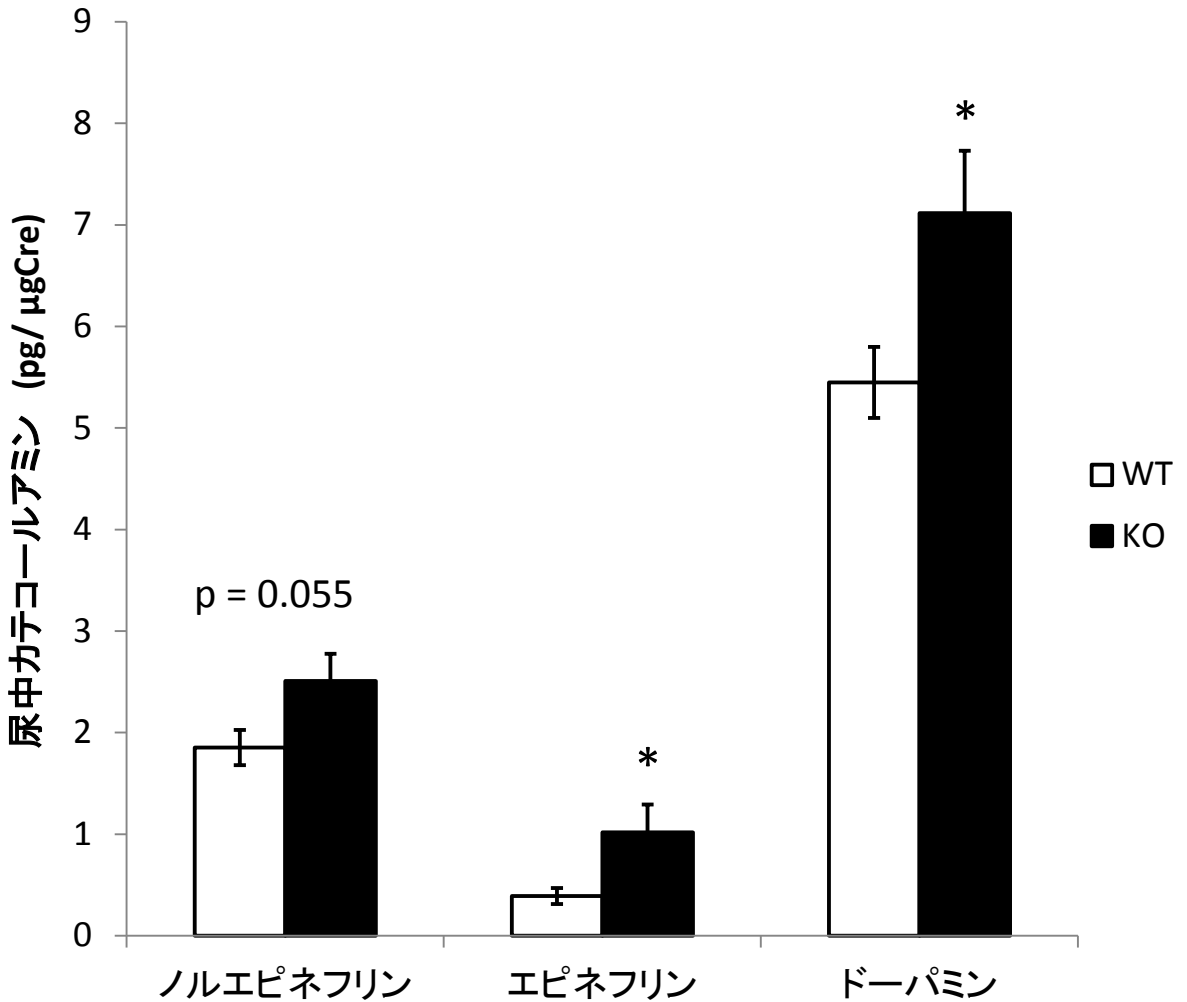


図3-26. 尿中カテコールアミンの測定

HFDで飼育した約11~12週齢のマウスを代謝ケージに入れ、*Ad lib*条件下で24時間蓄尿を行い、尿中カテコールアミン量を測定した。測定した値は、クレアチニン量で補正した。

その結果、KOマウスでエピネフリン及びドーパミンは有意に高値を示し、ノルエピネフリンも高値傾向を示した。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し(WT: n = 13, KO: n = 14)、*はp < 0.05、**はp < 0.01を示す。

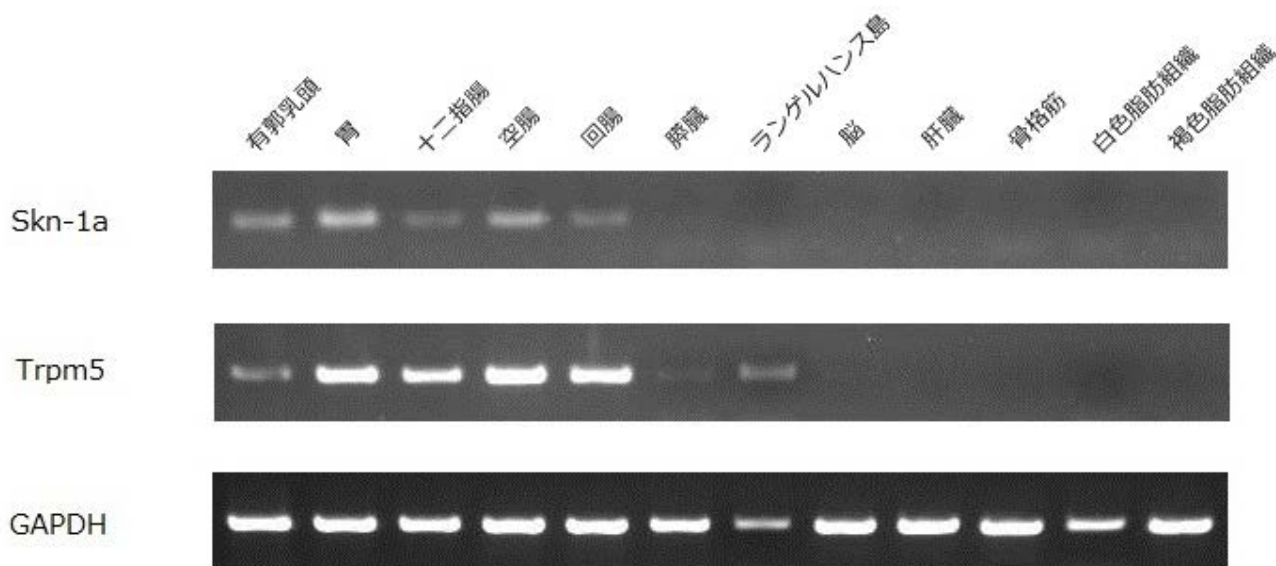


図3-27. Skn1遺伝子とTrpm5の発現部位

各組織におけるSkn1及びTrpm5の発現分布をRT-PCR法で確認した。その結果、Skn1は、味蕾(有郭乳頭)、胃、膵臓、十二指腸、回腸、空腸において発現し、膵臓(ランゲルハンス島含む)、脳、肝臓、骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織は発現していなかった。Trpm5は、味蕾(有郭乳頭)、胃、十二指腸、空腸、回腸、膵臓(ランゲルハンス島含む)膵臓での発現が認められたが、脳、肝臓、骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織においては発現が見られなかった。

本実験は味覚サイエンス研究室石丸らによって行われたものである。

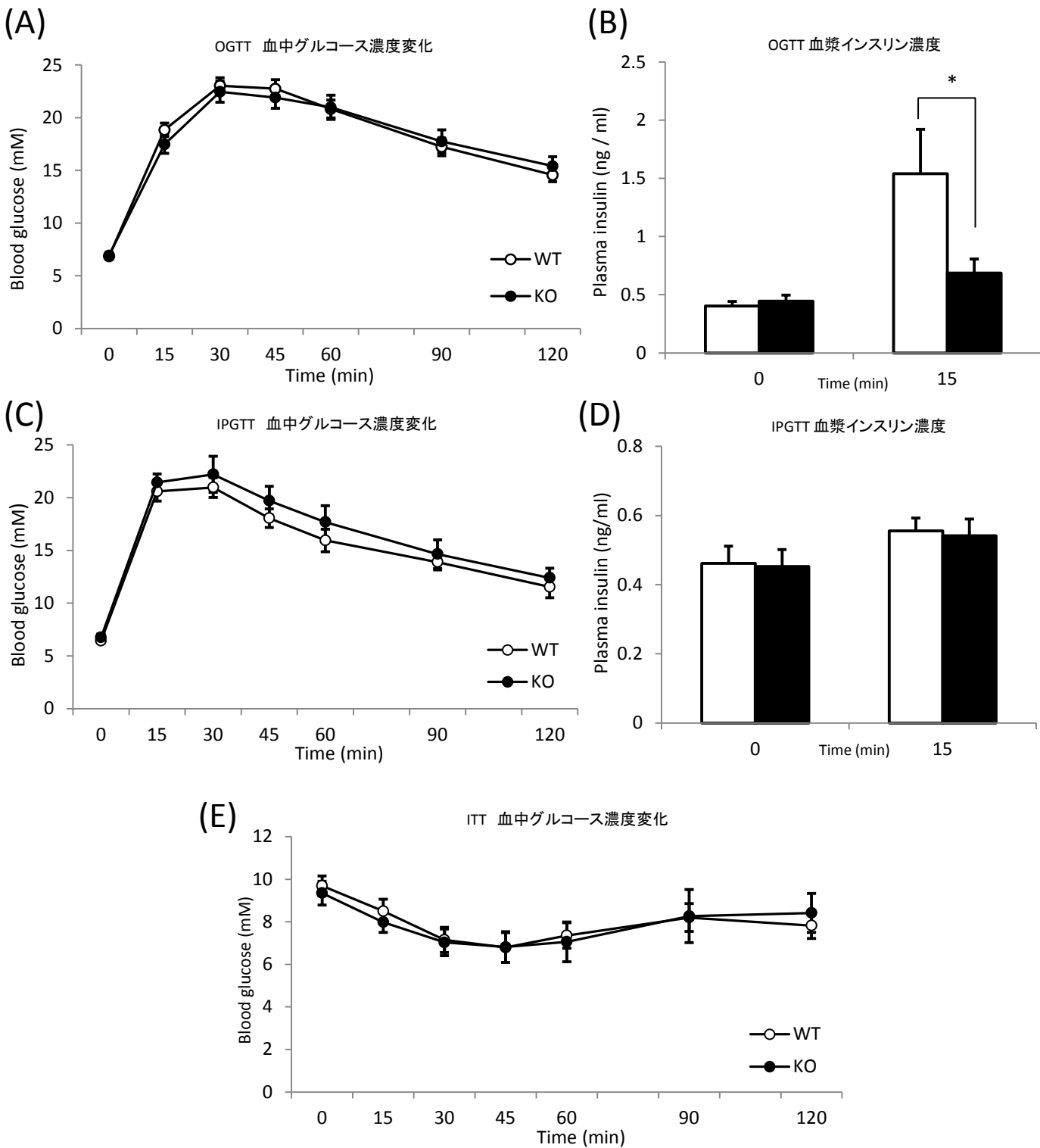


図3-28. KOマウスの糖代謝に関する検討

OGTTによる(A)血糖値と(B)インスリン(WT: n = 33, KO: n = 21)、IPGTTによる(C)血糖値と(D)インスリン(WT: n = 13, KO: n = 10)、(E)ITTによる血糖値(WT, KO: n = 12)

CDで飼育した16週齢マウスに対してOGTTを行った結果、血糖値には差が見られなかったが、血漿中インスリン濃度はKOマウスで低値を示した。一方で、IPGTTは血糖値およびインスリン濃度で遺伝子型による変化がなく、ITTでも血糖値の変化は見られなかった。この結果は、消化管を通過した時に生じるインスリン分泌の違いを示しており、消化管を通過しているか否かによって、インスリン分泌が大きく変化していることが示唆された。白はWTマウス、黒はKOマウスを示す。

数値は平均±標準誤差で示し、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を示す。

本実験は味覚サイエンス研究室石丸らによって行われたものである。

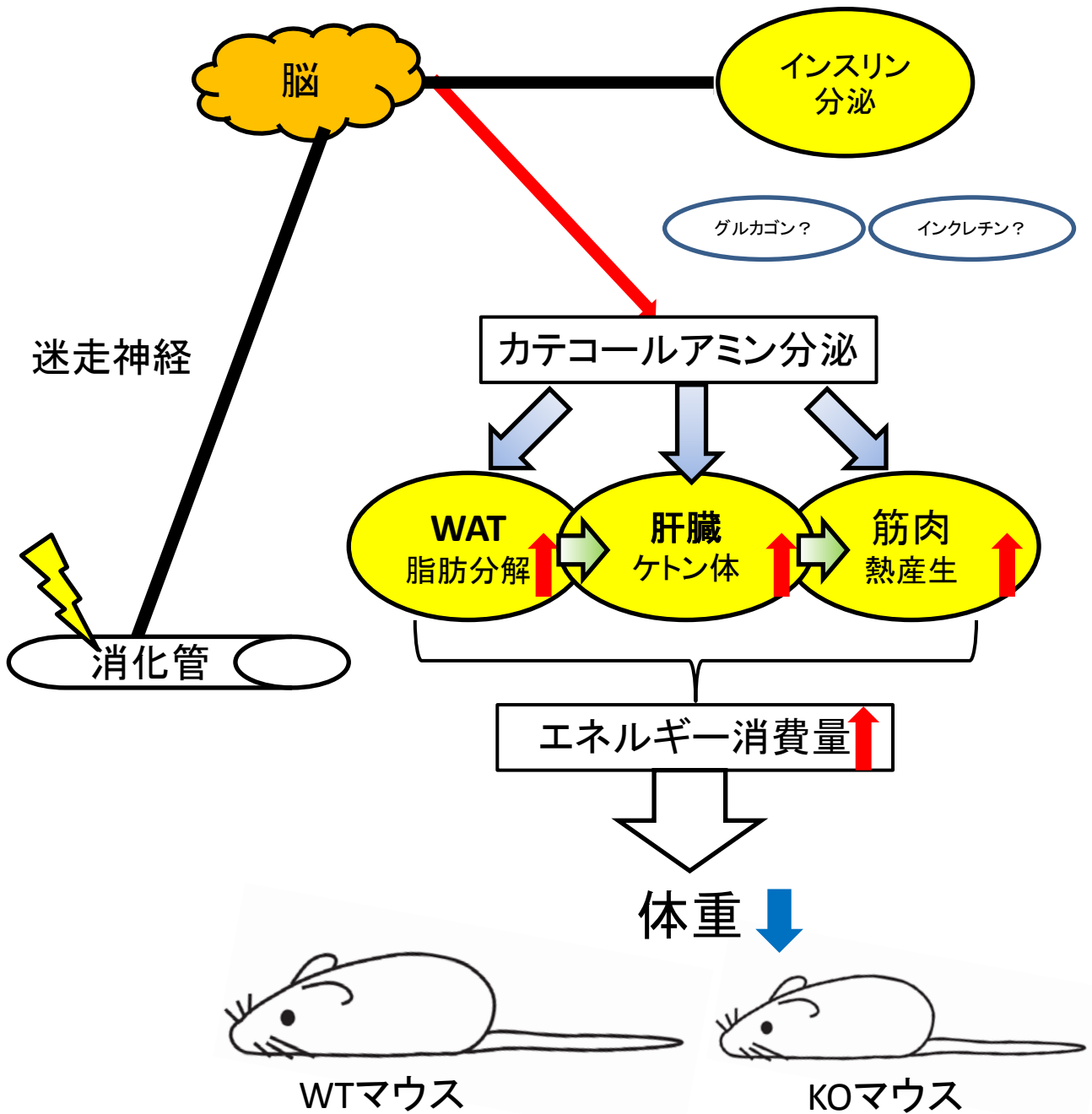


図3-29. KOマウスで生じた代謝変化のモデル図

KOマウスは摂食による刺激を受容できず、摂食による脳に対する情報伝達が行われないため、摂食に伴うインスリン分泌が十分に行われないことから血中インスリンが低下する一方、カテコールアミン分泌が恒常的に上昇する。この過剰なカテコールアミンの分泌が、WATにおける脂肪分解、肝臓におけるケトン体産生、筋肉における熱産生をそれぞれ促進することでエネルギー消費量が上昇する。エネルギー消費量が上昇したマウスは摂取したエネルギーを蓄積することができないため、体脂肪の低下を伴って低体重を生じる。

WTマウスにおいては摂食による刺激が消化管内で受容されると、迷走神経を介して脳に伝達される。脳に伝達された情報を元に、インスリン放出の促進をする一方で、カテコールアミンの分泌を抑制することでエネルギー代謝の切り替えを行っていると考えられる。

総合討論

摂食は動物の生命維持の根源の一つであり、その主目的は生体に不足した物質の取得である。これまでの摂食に関する研究では、食物の消化吸収や、体内に栄養素が流入することで生じる栄養学的な観点からの研究が中心であり、第 1 章でも摂食による影響について栄養学的な観点から DNA マイクロアレイを用いて経時的かつ網羅的に捉えた。しかし、食物は味や香りなどの感覚を生体に与える他、体内に取り込むことで消化管に対して物理的および化学的な刺激を与える。しかもその刺激は、Gut-Brain axis を介して様々な生理作用を引き起こす。このように摂食とエネルギー恒常性維持機構は栄養学的な観点に加え、様々な要素が複雑に絡み合っていると考えられる。論文では、末梢器官(口腔や消化管)が受容した摂食の刺激が脳に伝達され、脳はその情報を基に末梢組織(肝臓や筋肉)の代謝を調節するという脳を介したエネルギー代謝調節ネットワークが存在することを明らかにした。本総合討論では脳を中心とするエネルギー恒常性維持機構について議論を行う。

まず第 2 章で解析対象とした味覚は、口腔で受容されると味神経を介して脳へと伝達されること[161]から、脳の関与は明らかである。また摂食において味覚刺激は栄養素吸収を行う前にその食物を評価できる一つのパラメータになっていると考えられる。本研究で得られた嗜好味に対しては摂食量には変化を与えない一方で、食物選択には影響するという知見より、摂食時に脳がその食物を栄養素非依存的に評価していると考えられる。特に、食物選択に関してはどちらも従来指標での栄養価が同じであるが、甘味物質を添加した餌を好んで食べるのは、脳が栄養素吸収とは独立的に甘味物質添加餌を食べることを評価し、その後の行動決定に寄与しているためであろう。また、嗜好味に対してはカロリー補償性が優先されるため、食物選択で嗜好性を示しても摂食量には変化が見られなかった。この結果に関しては、提示時間による影響が大きいと考える。本研究での試験は 48 時間の総摂食量で評価をしたが、絶食後再給餌による単位時間あたりに摂食量の評価することで食欲の変化を捉えることが可能である。例えば、マウスを絶食させた後に、無味餌または味物質添加餌を 1 時間与えた時の摂食量を測定する。再給餌後 1 時間では 1 日分の摂食量を十分に摂取できないこと(第 1 章から示唆)から、不十分なエネルギー摂取に対してカロリー補償性は働かないはずである。そのため、摂食量が上昇していればその味質に対して食欲が上昇したのであろう。このような評価方法は溶液による Brief access test でも同様な原理で実施

されていることから可能であると考え。しかし、**Brief access test**と同様に、制限給餌を学習させるなど、本研究で行った実験に比べ学習期間や提示時間などの条件が複雑になり条件検討が必要である。一方、忌避味に対しては、食物選択で忌避性を示しただけでなく高濃度で提示すると摂食量が低下した。これは、忌避味は摂食可否の判断基準に利用しているからであろう。自然界において忌避味である苦味は食物を摂取すると危険な物質(毒など)が含まれている時に、酸味は食物が腐敗している時に受容することが多いことから、体内に取り入れないようにするために味覚により知覚し脳がスクリーニングを行っている可能性が高い。また、**KO** マウスも苦味を知覚し忌避行動を示したことは興味深い。口腔の受容体が消失したにもかかわらず、忌避を示したことは、他の苦味受容機構が存在する可能性だけでなく、毒物等を体内に可能な限り取り込まないように口腔と消化管の複数段階で制御していることが示唆された。げっ歯類では、アスパルテームに対して鼓索神経の応答はなく[179]、甘味として受容していなくても弱い嗜好性を示した[137]ように、味覚以外の要因が関連する可能性も考えられる。先行研究では苦味物質の受容により消化管からの分泌が報告[139,142]されている **CCK** 等のインクレチンも脳をターゲットにしていることから、味覚刺激だけでなく、消化管刺激も脳がその情報を統合しているのでであろう。実際に、消化管における味覚受容体が摂食調節に寄与していることも報告されている[229]。しかし、より深刻なエネルギー枯渇状態に陥った時にはエネルギー摂取と忌避行動のどちらを優先させるかについて、どのように調節しているかは非常に興味深い。

第2章第2節で甘味刺激が脂質代謝に影響することを明らかにしたことは、摂食時に食物から受ける味覚刺激が代謝に直接影響したという新たな知見である。これまで序論で述べた通り、様々な感覚刺激が摂食に関わることが示されてきたが、代謝への影響を明らかにした知見は初めてである。しかし、本実験で得られた結果に対し、どのような刺激が脳に対して直接影響し、脳が示す応答についてより詳細に検討する必要がある。例えば、前者に関しては、甘味刺激という感覚そのものが影響するのか、嗜好性や報酬系など脳の情報処理による影響であるかは非常に重要な点である。この検討については、マウスが新たな味溶液摂取時に **LiCl** の腹腔内投与による味覚嫌悪学習(**Conditioned taste aversion; CTA**) [169]が有用であろう。甘味は通常嗜好するが、**CTA**により忌避する場合に脂質代謝の発現変動が生じるかは非常に興味深い。後者の可能性については、

本文中でも述べたように CPIR [166]や、視床下部におけるヒスタミン分泌パターンの変化[168]に加え、油脂の摂取によって視床下部 β エンドルフィン神経が活性化されることが報告[230]されており、摂食に対する脳が示す応答についても今後詳細な解析が必要である。さらに、本研究では甘味刺激のみを対象として行ったが、他の 4 つの基本味についてもそれぞれ異なる影響が存在するかを明らかにしたい。特に、旨味に関しては、甘味同様に食物中のエネルギー(アミノ酸)を感知する機構であると想定されていることからエネルギー代謝との関連が深い味覚刺激であろう。味覚刺激は摂食のみで受容される感覚であるため、エネルギー恒常性との関連性が最も深いと考え本論文で研究対象としたが、他の感覚も摂食との関連性は存在することから今後の研究が期待される。美味しく食べるこそ「食」の本質の一つである。本研究のように食物由来の感覚が摂食行動やエネルギー代謝に影響することを明らかにすることができれば、食物を栄養学的な質だけでなく見た目や味など感覚的な質が重視されるようになり、美味しい食物を食べることの意義を明らかにできよう。

第 3 章では、有意な低体重を示す **Skn1 KO** マウスをエネルギー恒常性の破綻したモデルマウスとして解析した。低体重を示す原因を解析したところ、迷走神経切断による血糖値上昇パターンへの影響が遺伝子型によって異なること、副腎由来のカテコールアミン分泌亢進などが関連することが示唆された。以上の知見から、前者より消化管と脳のネットワークの変化、後者より脳による交感神経の興奮の亢進が推定され、**KO** マウスにおいて生じた脂質代謝の亢進を伴う体脂肪の低下や低体重など変化には脳が深く関わっていることが強く示された。さらに、転写因子 **Skn1** の発現は上皮系の組織に集中し、脳やエネルギー代謝の中心となる肝臓、筋肉、脂肪組織では発現していないことから、単一の組織の変化だけでは説明がつかず、脳を介した全身性の代謝調節に変化が生じていることが考えられた。**KO** マウスでは迷走神経切断の影響が見られなかったことは神経伝達経路の消失が示唆され、食物が消化管を通過しても脳に情報が伝達されない可能性が考えられる。そのため、脳から副腎に対してカテコールアミン分泌抑制シグナルが出されず、常に分泌過剰となり脂質代謝が促進し体重差が生じたと推定された。**KO** マウスで欠損し **WT** マウスには備わっているエネルギー恒常性機能を浮き彫りにしてみたい。**WT** マウスでは絶食状態においてカテコールアミンを分泌しエネルギー産生を亢進させている。摂食により食物が消化

管を通過する際、食物由来の刺激が受容され、迷走神経を介して脳へと情報が伝達されることで、カテコールアミン分泌が抑制されて、エネルギー恒常性を維持する機構が存在する。この経路は、栄養状態に呼応して調節する機構の一つであり、消化管が起点となるネットワークであろう。

このような脳を介した新たなエネルギー代謝調節経路のモデルは、今後エネルギー恒常性維持機構に関する研究以外にも様々な研究に影響をあたえる可能性がある。例えば、従来の機能性成分の特徴は以下の通りである。

烏龍茶ポリフェノールはリパーゼ阻害作用持ち、食餌由来の TG 吸収を低下させることで血漿 TG 濃度が低下し、糞中 TG 量が増加する[231]。また、ジアシルグリセロール(DAG)は消化管における TG 再合成が阻害されるため[232]、TG に比べて TG 再合成、リンパ放出速度が遅くなる[233]。プロバイオティクスやプレバイオティクスは腸内細菌叢の改善を行う事で免疫賦活作用[234]や菌種バランスの調節[235]を行う。これらは消化管内で作用する機能性成分である。ポリフェノールは肝臓において核内受容体(Constitutive androstane receptor; CAR)を活性化し[236,237]、中でもレスベラトロールやエラグ酸は CAR 活性化を経てアルコール性脂肪肝を抑制したとの報告もある[238]。ゴマリグナンのセサミン・エピセサミンは肝臓ミトコンドリアやペルオキシゾームの脂肪酸酸化活性を上昇させる[239]他、脂肪酸合成を制御する転写因子 SREBP1 の活性化を抑制する[240]。食餌性不飽和脂肪酸 Eicosapentaenoic acid(EPA)や Docosahexaenoic acid (DHA)は脂肪組織の PPAR α に作用し UCP1 を発現上昇させ熱産生が亢進する[241]。その他、 β -クリプトキサンチン[242]や水素水[243]などが挙げられる。これらは消化管内で吸収を受けた後、肝臓などの組織に直接作用することで機能を発揮する。

以上で紹介した 2 つの特徴のように、従来の機能性成分は末梢器官で作用しており、脳を介して機能する例は報告されていない。脳を介する例としては、辛味成分であるカプサイシンは消化管の管腔でも受容され機能することが報告されている[183]が、脳を経由するかはまだ明らかではない。さらにカプサイシンの主な作用機序として脳を介することは知られているが、吸収されたカプサイシンが内臓感覚神経を介して脳に作用することで副腎からのエピネフリン分泌量を増加させるように[244,245]、生理作用の発揮には体内への吸収が必要である。しかし、本研究で得られた代謝調節機構の特徴は食物吸収非依存的に代謝調節を行っている点である。味覚等の感覚や

消化管の刺激のように、食物摂食により末梢組織に対して与える刺激を介して脳に作用する機能性を示す食品成分が存在すれば、新たな機能性食品研究への道が拓けるのであろう。さらに、口腔や消化管を起点とするネットワークは本研究で得られた経路以外にも存在すれば今後、脳を介した代謝調節モデルが食品機能性研究において新たな潮流になる可能性が期待される。

しかし、消化管を起点とするネットワークについては現在のモデルとは異なる可能性も検討する必要もある。RT-PCR の解析結果より WT マウスでは消化管において **Skn1** が発現し、KO マウスはその発現が消失していた。**Skn1** は転写因子であるため、栄養素を受容する受容体やトランスポーターが消失した可能性がある。この変化が、消化管の機能が変化させ他の臓器に影響した可能性もあろう。また驚くべきことに、近年転写因子 **Foxo1** 欠損マウスは本来腸管では発現しない活性型のインスリンを産生するようになるという報告がある[246]ように、消化管における細胞種の組成だけでなく機能的な変化を捉えることが重要である。この検証には転写因子 **Skn1** が発現する下流遺伝子を特定することが重要である。

さらに本研究に共通する特徴として、末梢組織が起点となり脳を介することで、他の臓器に影響を与えることが挙げられる。従来、摂食によりグルコースなどの栄養素が体内に吸収されることで生じる血糖値の上昇を末梢組織が受容する代謝変化と共に、脳からインスリンなど内分泌系を調節することで末梢組織の代謝を制御するように、末梢組織は受動的な役割が多いとされてきた。しかし、近年肝臓においてグリコーゲン蓄積量[70]などの栄養状態に加え、**Gck**[69]や **Ppar γ** [68]など特定の遺伝子の発現量が変化すると、脳を介して **WAT** や **BAT** など他の臓器の代謝を調節するという経路が注目されており、末梢組織がエネルギー状態を感知し、積極的な代謝の変化を誘導していることが報告されている。本研究において得られた新たな脳を介したエネルギー代謝調節機構は第 2 章の研究で見出した味覚刺激では口腔、第 3 章の研究で見出した消化管刺激では消化管など起点はこれまでに知られている組織ではないが、それぞれ摂食に深く関連する機能を持つ組織であり栄養状態の変化を最も早く感知できることから、エネルギー状態の変化のセンサーとなる可能性は高い。食物由来の刺激を様々な形で受容した末梢組織が起点となり、脳にその情報が伝達されることで脳が積極的に他の臓器の代謝調節を行うというように、脳がエネルギー代謝調節の中心となっていることが示唆された。

今後、脳の末梢組織における代謝調節への関与を直接的に調べるには、脳の活性化領域を調べることが重要である。脳の活性化領域の特定は、脳からどの末梢組織に対して制御を行うかを示すことにも繋がる。また味神経を介した脳への情報伝達はよく知られているが、消化管から求心性迷走神経を介した脳への情報伝達には迷走神経の切断以外にも直接迷走神経の神経応答を測ることを検討したい。WT マウスでは応答するが、KO マウスでは消失するという直接的な神経応答を捉えることができれば代謝調節ネットワークの存在を示すことができよう。

以上のような脳によるエネルギー恒常性維持機構の結果が、末梢組織における代謝変化へと繋がる。実際に、第 1 章で肝臓と WAT における遺伝子発現変動を時系列的かつ網羅的に捉えた。この中で特に 1hR 群で律速酵素 Hmgcr 以外のコレステロール合成関連遺伝子が一過的に発現低下していたことは網羅的解析により初めて得られた知見である。また、同じ個体の異なる組織を解析することで、転写因子や免疫関連遺伝子の発現変動など共通して変動する生理機能の存在が示唆された。摂食応答において、全身の組織で同調して起こる機構が存在する可能性が考えられたのは非常に興味深い。さらに、本研究によりエネルギー代謝関連遺伝子の発現変動のみならず、摂食に反応して様々な生理機能を経時的に変動させていることが判明した。エネルギー代謝関連以外として免疫機能やプロテアソーム系タンパク質分解が摂食応答に関わると示唆された。実際、筆者らは、摂食応答に伴う免疫プロテアソームの発現変化を新たに明らかにして報告した[113]。また、プロテアソーム系タンパク質分解は、ユビキチン化された特定のタンパク質を分解するため、その対象が栄養素代謝に関わる律速酵素を始めとする因子であれば、個体の栄養状態に呼応して代謝を変化させる可能性がある(図 4-1)。今後、本研究の成果を基にプロテアソーム系タンパク質分解の対象となるタンパク質を同定し、プロテアソーム系タンパク質分解の栄養素代謝への影響を明らかにするなど、摂食応答で起こる生理機能の変化を様々な角度から検証しようと考えられる。また、第 1 章で得られた知見は、末梢組織への栄養素の流入によって生じる機構と、脳による制御によって生じる機構の 2 つの種類があり得る。前者は細胞レベルでも再現できるが、後者は単一の組織で捉えることは難しい。特に 1hR で血糖値やインスリンの上昇は既に見られていることから、より短時間の摂食による影響を捉えることが、摂食により生じるシグナル伝達制御を解明するためには重要である。

本論文では、第1章で摂食に対する影響を包括的に捉えた結果を基にして、摂食によって生じる影響について要素ごとに分割して解析を行った。これまで非常に多くの研究がなされている栄養学的な観点以外に、感覚や消化管と食物成分との相互作用という観点から、脳が積極的にエネルギー代謝調節を行っていることを明らかにした(図4-2)。これらの作用も第1章で捉えた摂食に対する影響を構成する要素の一部である。特に、再給餌時間に依存して変化する遺伝子発現プロファイル全体が同時に変化するのはなく、機能毎に変化するタイミングが異なることは、栄養素吸収による変化だけでなく他の制御機構が存在している可能性を示唆している。この結果からも摂食におけるエネルギー恒常性維持機構の影響は栄養素吸収による変化以外にも、感覚や刺激などの複雑な相互作用の結果生じたものを捉えている。今後、より詳細なエネルギー恒常性維持機構の解明のために、摂食によって生じる影響がどの要素によって制御されているかを明らかにしていくことが重要である。また、食物の質を栄養学的な観点としてだけでなく、味覚や刺激など脳にどのような影響を与えるかという観点からも評価・解析する必要がある。

本論文では、摂食によって生じるエネルギー恒常性維持機構の一端を解明することを目的として研究を行った。その結果、網羅的かつ経時的な末梢組織の代謝変動を栄養学的な視点から明らかにした。さらに、食物が生体に与える影響を栄養面だけでなく、食物(栄養素)吸収とは非依存的な刺激を起点とする感覚をパラメータとして統合的に解析した新たな知見を提示した。以上の研究は、食物を栄養学的な観点だけでなく統合的に評価する必要があることを示すものであり、少なからず学術的・産業的・社会的に貢献するものと期待している。

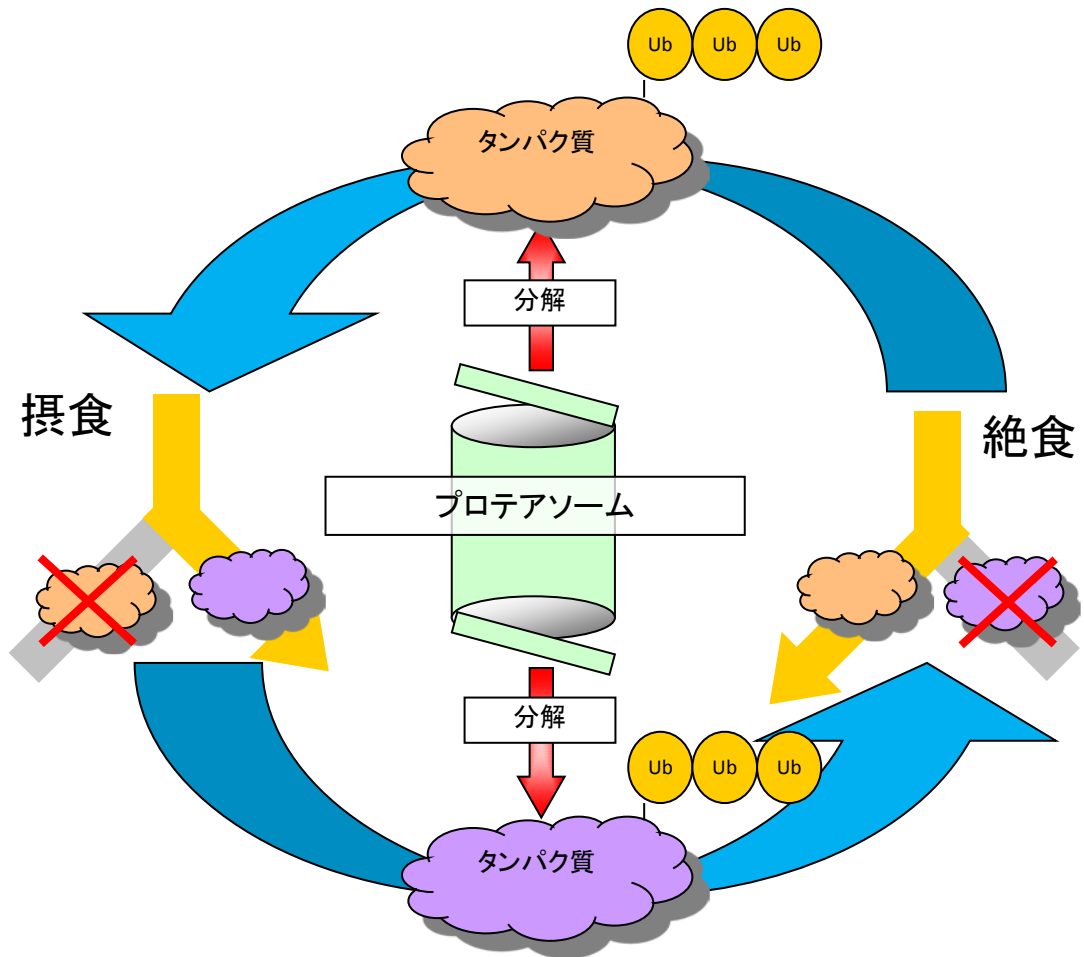


図4-1. プロテアソームによる代謝の制御

プロテアソームが代謝の律速酵素など特定のタンパク質を分解することで、効率的に代謝を抑制する。絶食時にWATで脂肪酸合成の律速酵素Acacaが標的タンパク質となることが報告されたように、プロテアソームがスイッチ様の機能を担っている可能性が考えられる。

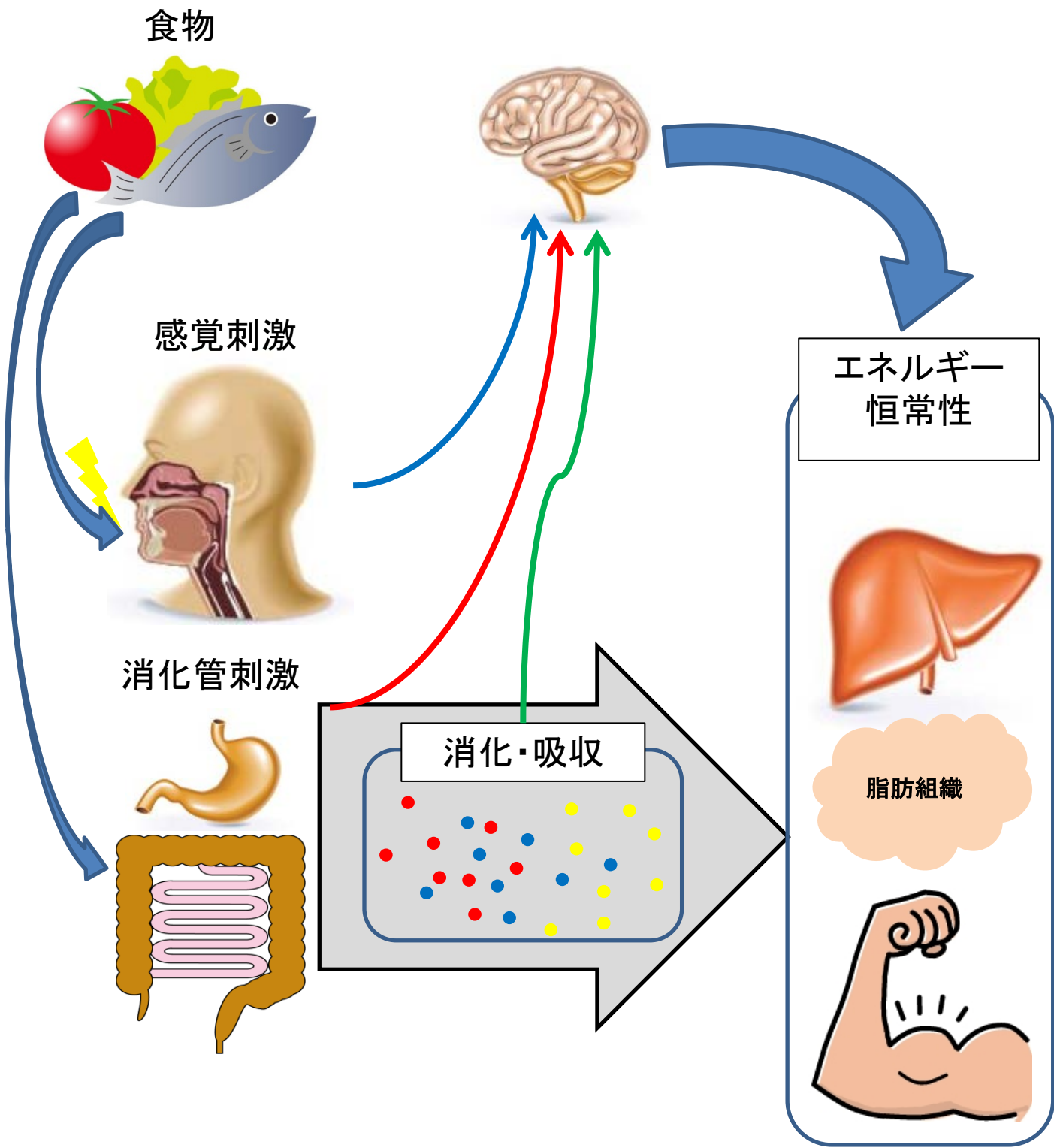


図4-2. 脳を介したエネルギー恒常性維持機構

食物摂取は、食物の消化吸収に加えて、味覚を始めとする感覚刺激や、消化管に対して様々な刺激を与える。これらの情報は脳へと伝達され、脳は情報を基に末梢組織の代謝を調節することで、エネルギー恒常性維持機構の一部を構成していると考えられる。

参考文献

1. Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H (1998) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5987-5992.
2. Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, et al. (2005) Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J Lipid Res* 46: 697-705.
3. Winder WW (2001) Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 91: 1017-1028.
4. Fujii N, Jessen N, Goodyear LJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E867-877.
5. Palou M, Priego T, Sanchez J, Villegas E, Rodriguez AM, et al. (2008) Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch* 456: 825-836.
6. Desert C, Duclos MJ, Blavy P, Lecerf F, Moreews F, et al. (2008) Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genomics* 9: 611.
7. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, et al. (2008) A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 456: 269-273.
8. Iritani N, Fukuda H, Tada K (1996) Nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression in rat epididymal adipose tissue. *J Biochem* 120: 242-248.
9. Wu T, Ni Y, Kato H, Fu Z (2010) Feeding-induced rapid resetting of the hepatic circadian clock is associated with acute induction of *Per2* and *Dec1* transcription in rats. *Chronobiol Int* 27: 1-18.
10. van den Berghe G (1991) The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 14: 407-420.
11. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
12. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. (2012) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 556-559.
13. Booth DA (1972) Satiety and behavioral caloric compensation following intragastric glucose loads in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 78: 412-432.
14. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, et al. (2009) A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 138: 976-989.
15. Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12150-12155.
16. Miller CC, Martin RJ, Whitney ML, Edwards GL (2002) Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. *Nutr Neurosci* 5: 359-362.
17. Wolfgang MJ, Cha SH, Sidhaye A, Chohnan S, Cline G, et al. (2007) Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19285-19290.

18. Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD (2008) Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16871-16875.
19. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H (2008) Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70: 537-556.
20. Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
21. Konner AC, Bruning JC (2012) Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* 16: 144-152.
22. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ (1981) Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science* 213: 1036-1037.
23. Verhulst PJ, De Smet B, Saels I, Thijs T, Ver Donck L, et al. (2008) Role of ghrelin in the relationship between hyperphagia and accelerated gastric emptying in diabetic mice. *Gastroenterology* 135: 1267-1276.
24. Neary MT, Batterham RL (2009) Gut hormones: implications for the treatment of obesity. *Pharmacol Ther* 124: 44-56.
25. Gonzalez JA, Jensen LT, Fugger L, Burdakov D (2008) Metabolism-independent sugar sensing in central orexin neurons. *Diabetes* 57: 2569-2576.
26. McCrimmon R (2008) The mechanisms that underlie glucose sensing during hypoglycaemia in diabetes. *Diabet Med* 25: 513-522.
27. Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton SS, de Araujo IE (2009) Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci* 3: 12.
28. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, et al. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51: 271-275.
29. Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9: 756-761.
30. Magnan C, Collins S, Berthault MF, Kassis N, Vincent M, et al. (1999) Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J Clin Invest* 103: 413-419.
31. Migrenne S, Le Foll C, Levin BE, Magnan C (2011) Brain lipid sensing and nervous control of energy balance. *Diabetes Metab* 37: 83-88.
32. Su Y, Lam TK, He W, Poci A, Bryan J, et al. (2012) Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production. *Diabetes* 61: 85-93.
33. Taguchi A, Wartschow LM, White MF (2007) Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317: 369-372.
34. Sadagurski M, Leshan RL, Patterson C, Rozzo A, Kuznetsova A, et al. (2012) IRS2 signaling in LepR-b neurons suppresses FoxO1 to control energy balance independently of leptin action. *Cell Metab* 15: 703-712.
35. Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, Lim GE, Chu KY, et al. (2012) Hyperinsulinemia drives

- diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab* 16: 723-737.
36. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, et al. (2000) Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 105: 1243-1252.
 37. Toda C, Shiuchi T, Lee S, Yamato-Esaki M, Fujino Y, et al. (2009) Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes* 58: 2757-2765.
 38. Killgore WD, Young AD, Femia LA, Bogorodzki P, Rogowska J, et al. (2003) Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. *Neuroimage* 19: 1381-1394.
 39. Toepel U, Knebel JF, Hudry J, le Coutre J, Murray MM (2009) The brain tracks the energetic value in food images. *Neuroimage* 44: 967-974.
 40. Ohla K, Toepel U, le Coutre J, Hudry J (2012) Visual-gustatory interaction: orbitofrontal and insular cortices mediate the effect of high-calorie visual food cues on taste pleasantness. *PLoS One* 7: e32434.
 41. Howard WE, Marsh RE, Cole RE (1968) Food detection by deer mice using olfactory rather than visual cues. *Anim Behav* 16: 13-17.
 42. Nakamura A, Fujiwara S, Matsumoto I, Abe K (2009) Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. *J Agric Food Chem* 57: 5480-5485.
 43. Nakamura A, Fujiwara S, Ishijima T, Okada S, Nakai Y, et al. (2010) Neuron differentiation-related genes are up-regulated in the hypothalamus of odorant-inhaling rats subjected to acute restraint stress. *J Agric Food Chem* 58: 7922-7929.
 44. Desmarchelier C, Ludwig T, Scheundel R, Rink N, Bader BL, et al. (2013) Diet-induced obesity in ad libitum-fed mice: food texture overrides the effect of macronutrient composition. *Br J Nutr* 109: 1518-1527.
 45. Yamamoto K, Ishimaru Y (2013) Oral and extra-oral taste perception. *Semin Cell Dev Biol* 24: 240-246.
 46. Swithers SE, Davidson TL (2008) A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav Neurosci* 122: 161-173.
 47. Kellett GL, Brot-Laroche E (2005) Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 54: 3056-3062.
 48. Sbarbati A, Osculati F (2005) The taste cell-related diffuse chemosensory system. *Prog Neurobiol* 75: 295-307.
 49. Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H (2010) T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell and Tissue Research* 339: 493-504.
 50. Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP (2005) Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 33: 302-305.
 51. Stearns AT, Balakrishnan A, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A (2010) Rapid upregulation of sodium-glucose transporter SGLT1 in response to intestinal sweet taste stimulation. *Ann Surg* 251: 865-871.
 52. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, et al. (2007) T1R3 and gustducin in gut

- sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15075-15080.
53. Brown RJ, Walter M, Rother KI (2009) Ingestion of diet soda before a glucose load augments glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes Care* 32: 2184-2186.
54. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, et al. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15069-15074.
55. Widmayer P, Kuper M, Kramer M, Konigsrainer A, Breer H (2012) Altered expression of gustatory-signaling elements in gastric tissue of morbidly obese patients. *Int J Obes (Lond)* 36: 1353-1359.
56. Young RL, Chia B, Isaacs NJ, Ma J, Khoo J, et al. (2013) Disordered control of intestinal sweet taste receptor expression and glucose absorption in type 2 diabetes. *Diabetes* 62: 3532-3541.
57. Chaudhry RM, Garg A, Abdelfatah MM, Duenes JA, Sarr MG (2013) Lack of functionally active sweet taste receptors in the jejunum in vivo in the rat. *J Surg Res* 183: 606-611.
58. Clark AA, Liggett SB, Munger SD (2012) Extraoral bitter taste receptors as mediators of off-target drug effects. *FASEB J* 26: 4827-4831.
59. Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J, et al. (2002) Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2392-2397.
60. Dotson CD, Zhang L, Xu H, Shin YK, Vignes S, et al. (2008) Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One* 3: e3974.
61. Janssen S, Laermans J, Verhulst PJ, Thijs T, Tack J, et al. (2011) Bitter taste receptors and gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2094-2099.
62. Cettour-Rose P, Bezencon C, Darimont C, le Coutre J, Damak S (2013) Quinine controls body weight gain without affecting food intake in male C57BL6 mice. *BMC Physiol* 13: 5.
63. Daly K, Al-Rammahi M, Moran A, Marcello M, Ninomiya Y, et al. (2013) Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G271-282.
64. Nakamura E, Hasumura M, Uneyama H, Torii K (2011) Luminal amino acid-sensing cells in gastric mucosa. *Digestion* 83 Suppl 1: 13-18.
65. Uneyama H, Nijima A, San Gabriel A, Torii K (2006) Luminal amino acid sensing in the rat gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G1163-1170.
66. Li Y, Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF (2013) Gustducin couples fatty acid receptors to GLP-1 release in colon. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E651-660.
67. Kaiyala KJ, Woods SC, Schwartz MW (1995) New model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr* 62: 1123S-1134S.
68. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, et al. (2006) Neuronal pathway from the liver

- modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312: 1656-1659.
69. Tsukita S, Yamada T, Uno K, Takahashi K, Kaneko K, et al. (2012) Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals. *Cell Metab* 16: 825-832.
 70. Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Nishi M, Shikama A, et al. (2013) Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nat Commun* 4: 2316.
 71. Andersen B, Schonemann MD, Flynn SE, Pearse RV, 2nd, Singh H, et al. (1993) Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis. *Science* 260: 78-82.
 72. Andersen B, Weinberg WC, Rennekampff O, McEvelly RJ, Bermingham JR, Jr., et al. (1997) Functions of the POU domain genes Skn-1a/i and Tst-1/Oct-6/SCIP in epidermal differentiation. *Genes Dev* 11: 1873-1884.
 73. Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, et al. (2013) The POU domain transcription factors Oct-6 and Oct-11 negatively regulate loricrin gene expression in keratinocytes: association with AP-1 and Sp1/Sp3. *Arch Dermatol Res* 305: 371-378.
 74. Goldsborough AS, Healy LE, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. (1993) Cloning, chromosomal localization and expression pattern of the POU domain gene Oct-11. *Nucleic Acids Res* 21: 127-134.
 75. Yukawa K, Yasui T, Yamamoto A, Shiku H, Kishimoto T, et al. (1993) Epoc-1: a POU-domain gene expressed in murine epidermal basal cells and thymic stromal cells. *Gene* 133: 163-169.
 76. Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K (2011) Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature Neuroscience* 14: 685-687.
 77. Murray RG, Murray A (1960) The fine structure of the taste buds of rhesus and cynomolgus monkeys. *Anat Rec* 138: 211-233.
 78. Chaudhari N, Roper SD (2010) The cell biology of taste. *J Cell Biol* 190: 285-296.
 79. Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, et al. (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8981-8986.
 80. Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, et al. (2010) Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3210-3215.
 81. Ohmoto M, Matsumoto I, Yasuoka A, Yoshihara Y, Abe K (2008) Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol Cell Neurosci* 38: 505-517.
 82. Ohmoto M, Yamaguchi T, Yamashita J, Bachmanov AA, Hirota J, et al. (2013) Pou2f3/Skn-1a is necessary for the generation or differentiation of solitary chemosensory cells in the anterior nasal cavity. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 2154-2156.
 83. Nakai Y, Hashida H, Kadota K, Minami M, Shimizu K, et al. (2008) Up-regulation of genes related to the ubiquitin-proteasome system in the brown adipose tissue of 24-h-fasted rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 139-148.
 84. R Development Core Team (2006) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

85. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80.
86. Hubbell E, Liu WM, Mei R (2002) Robust estimators for expression analysis. *Bioinformatics* 18: 1585-1592.
87. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
88. Hochreiter S, Clevert DA, Obermayer K (2006) A new summarization method for Affymetrix probe level data. *Bioinformatics* 22: 943-949.
89. Talloen W, Clevert DA, Hochreiter S, Amaratunga D, Bijnens L, et al. (2007) I/NI-calls for the exclusion of non-informative genes: a highly effective filtering tool for microarray data. *Bioinformatics* 23: 2897-2902.
90. Chen Z, McGee M, Liu Q, Scheuermann RH (2007) A distribution free summarization method for Affymetrix GeneChip arrays. *Bioinformatics* 23: 321-327.
91. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P (2004) Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 573: 83-92.
92. Kadota K, Nakai Y, Shimizu K (2009) Ranking differentially expressed genes from Affymetrix gene expression data: methods with reproducibility, sensitivity, and specificity. *Algorithms Mol Biol* 4: 7.
93. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57: 289-300.
94. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
95. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37: 1-13.
96. Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, et al. (2009) QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* 25: 3045-3046.
97. Huntley RP, Binns D, Dimmer E, Barrell D, O'Donovan C, et al. (2009) QuickGO: a user tutorial for the web-based Gene Ontology browser. *Database (Oxford)* 2009: bap010.
98. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
99. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39: 147-164.
100. Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, et al. (1991) A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353: 357-360.
101. Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, et al. (1991) Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353: 662-664.
102. Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ (2003) Meal pattern analysis of diet-induced

- obesity in susceptible and resistant rats. *Obes Res* 11: 845-851.
103. Oliveira Ldos S, da Silva LP, da Silva AI, Magalhaes CP, de Souza SL, et al. (2011) Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. *Behav Processes* 86: 119-124.
104. Storch KF, Weitz CJ (2009) Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6808-6813.
105. Siegel EG, Trimble ER, Renold AE, Berthoud HR (1980) Importance of preabsorptive insulin release on oral glucose tolerance: studies in pancreatic islet transplanted rats. *Gut* 21: 1002-1009.
106. Paisley EA, Park EI, Swartz DA, Mangian HJ, Visek WJ, et al. (1996) Temporal-regulation of serum lipids and stearoyl CoA desaturase and lipoprotein lipase mRNA in BALB/cHnn mice. *J Nutr* 126: 2730-2737.
107. Mueckler M, Kruse M, Strube M, Riggs AC, Chiu KC, et al. (1994) A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *J Biol Chem* 269: 17765-17767.
108. Iynedjian PB, Jotterand D, Nospikel T, Asfari M, Pilot PR (1989) Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem* 264: 21824-21829.
109. Vasta V, Bruni P, Vannini F, Farnararo M (1989) Fructose 2,6-bisphosphate and insulin stimulation of glycolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Biochem* 21: 1359-1363.
110. Binkley F, Richardson SM (1982) Effects of fasting and insulin on hepatic phosphofructokinase (PFK). *Biochem Biophys Res Commun* 106: 175-178.
111. Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, Screatton R, Goebel N, et al. (2006) TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science* 312: 1763-1766.
112. Kee AJ, Combaret L, Tilignac T, Souweine B, Aurousseau E, et al. (2003) Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *J Physiol* 546: 765-776.
113. Ushiyama S, Nakamura T, Ishijima T, Misaka T, Abe K, et al. (2010) The hepatic genes for immunoproteasome are upregulated by refeeding after fasting in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1320-1323.
114. Rodriguez AM, Sanchez J, Tobaruela A, Priego T, Pico C, et al. (2010) Time-course effects of increased fatty acid supply on the expression of genes involved in lipid/glucose metabolism in muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 25: 337-346.
115. Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, et al. (2006) FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26: 3455-3467.
116. Palou M, Sanchez J, Priego T, Rodriguez AM, Pico C, et al. (2010) Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. *J Nutr Biochem* 21: 23-33.
117. Park HS, Lee K (2005) Greater beneficial effects of visceral fat reduction compared with subcutaneous fat reduction on parameters of the metabolic syndrome: a study of weight reduction programmes in

- subjects with visceral and subcutaneous obesity. *Diabet Med* 22: 266-272.
118. Wong RH, Chang I, Hudak CS, Hyun S, Kwan HY, et al. (2009) A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. *Cell* 136: 1056-1072.
 119. Drewnowski A (1997) Taste preferences and food intake. *Annu Rev Nutr* 17: 237-253.
 120. He W, Danilova V, Zou S, Hellekant G, Max M, et al. (2002) Partial rescue of taste responses of alpha-gustducin null mice by transgenic expression of alpha-transducin. *Chem Senses* 27: 719-727.
 121. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, et al. (2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301: 850-853.
 122. Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, et al. (2005) Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438: 1022-1025.
 123. de Araujo IE, Oliveira-Maia AJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, et al. (2008) Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron* 57: 930-941.
 124. Myers KP, Taddeo MS, Richards EK (2013) Sensory-specific appetite: Postingestive detection of glucose rapidly promotes continued consumption of a recently encountered flavor. *Physiol Behav* 121: 125-133.
 125. Ren X, Ferreira JG, Zhou L, Shammah-Lagnado SJ, Yeckel CW, et al. (2010) Nutrient selection in the absence of taste receptor signaling. *J Neurosci* 30: 8012-8023.
 126. Negri R, Di Feola M, Di Domenico S, Scala MG, Artesi G, et al. (2012) Taste perception and food choices. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54: 624-629.
 127. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
 128. Tordoff MG (2007) Taste solution preferences of C57BL/6J and 129X1/SvJ mice: influence of age, sex, and diet. *Chem Senses* 32: 655-671.
 129. Brassler SM, Mozhui K, Smith DV (2005) Differential covariation in taste responsiveness to bitter stimuli in rats. *Chem Senses* 30: 793-799.
 130. Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Hofmann T, Frank O, et al. (2004) Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci* 24: 10260-10265.
 131. Smith GP (1996) The direct and indirect controls of meal size. *Neurosci Biobehav Rev* 20: 41-46.
 132. Smith GP (2000) The controls of eating: a shift from nutritional homeostasis to behavioral neuroscience. *Nutrition* 16: 814-820.
 133. Delaere F, Duchamp A, Mounien L, Seyer P, Duraffourd C, et al. (2012) The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol Metab* 2: 47-53.
 134. Disse E, Bussier AL, Veyrat-Durebex C, Deblon N, Pfluger PT, et al. (2010) Peripheral ghrelin enhances sweet taste food consumption and preference, regardless of its caloric content. *Physiol Behav* 101: 277-281.
 135. Leedom LJ, Meehan WP (1989) The psychoneuroendocrinology of diabetes mellitus in rodents. *Psychoneuroendocrinology* 14: 275-294.

136. Debons AF, Krinsky I, Maayan ML, Fani K, Jemenez FA (1977) Gold thioglucose obesity syndrome. *Fed Proc* 36: 143-147.
137. Bachmanov AA, Tordoff MG, Beauchamp GK (2001) Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chem Senses* 26: 905-913.
138. Rozengurt E (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G171-177.
139. Chen MC, Wu SV, Reeve JR, Jr., Rozengurt E (2006) Bitter stimuli induce Ca²⁺ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C726-739.
140. Jeon TI, Zhu B, Larson JL, Osborne TF (2008) SREBP-2 regulates gut peptide secretion through intestinal bitter taste receptor signaling in mice. *J Clin Invest* 118: 3693-3700.
141. Jeon TI, Seo YK, Osborne TF (2011) Gut bitter taste receptor signalling induces ABCB1 through a mechanism involving CCK. *Biochem J* 438: 33-37.
142. Hao S, Sternini C, Raybould HE (2008) Role of CCK1 and Y2 receptors in activation of hindbrain neurons induced by intragastric administration of bitter taste receptor ligands. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R33-38.
143. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, et al. (2011) Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 192: 767-780.
144. Horne J, Lawless HT, Speirs W, Sposato D (2002) Bitter taste of saccharin and acesulfame-K. *Chem Senses* 27: 31-38.
145. de Araujo IE (2011) Sweet taste signaling and the formation of memories of energy sources. *Front Syst Neurosci* 5: 99.
146. Polyak E, Gombos K, Hajnal B, Bonyar-Muller K, Szabo S, et al. (2010) Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta Physiol Hung* 97: 401-407.
147. Swithers SE, Martin AA, Clark KM, Laboy AF, Davidson TL (2010) Body weight gain in rats consuming sweetened liquids. Effects of caffeine and diet composition. *Appetite* 55: 528-533.
148. Feijo Fde M, Ballard CR, Foletto KC, Batista BA, Neves AM, et al. (2013) Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite* 60: 203-207.
149. Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, et al. (2014) Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism* 63: 69-78.
150. Steinert RE, Frey F, Topfer A, Drewe J, Beglinger C (2011) Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br J Nutr* 105: 1320-1328.
151. Mace OJ, Lister N, Morgan E, Shepherd E, Affleck J, et al. (2009) An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol* 587: 195-210.

152. Dyer J, Daly K, Salmon KS, Arora DK, Kokrashvili Z, et al. (2007) Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption. *Biochem Soc Trans* 35: 1191-1194.
153. Taniguchi K (2004) Expression of the sweet receptor protein, T1R3, in the human liver and pancreas. *J Vet Med Sci* 66: 1311-1314.
154. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, et al. (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One* 4: e5106.
155. Elliott RA, Kapoor S, Tincello DG (2011) Expression and distribution of the sweet taste receptor isoforms T1R2 and T1R3 in human and rat bladders. *J Urol* 186: 2455-2462.
156. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, et al. (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21: 15-23.
157. Colburn WA, Bekersky I, Blumenthal HP (1981) Dietary saccharin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 30: 558-563.
158. Lygre DG (1974) The inhibition by saccharin and cyclamate of phosphotransferase and phosphohydrolase activities of glucose-6-phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 341: 291-297.
159. Striem BJ, Naim M, Zehavi U, Ronen T (1990) Saccharin induces changes in adenylate cyclase activity in liver and muscle membranes in rats. *Life Sci* 46: 803-810.
160. Elfhag K, Tynelius P, Rasmussen F (2007) Sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks in association to restrained, external and emotional eating. *Physiol Behav* 91: 191-195.
161. Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJ (2009) Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139: 234-244.
162. Berthoud HR, Bereiter DA, Trimble ER, Siegel EG, Jeanrenaud B (1981) Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* 20 Suppl: 393-401.
163. Bellisle F, Louis-Sylvestre J, Demozay F, Blazy D, Le Magnen J (1983) Reflex insulin response associated to food intake in human subjects. *Physiol Behav* 31: 515-521.
164. Just T, Pau HW, Engel U, Hummel T (2008) Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation? *Appetite* 51: 622-627.
165. Tonosaki K (2006) Relationships between insulin release and taste. *Chemical Senses* 31: A119-A120.
166. Abdallah L, Chabert M, Louis-Sylvestre J (1997) Cephalic phase responses to sweet taste. *Am J Clin Nutr* 65: 737-743.
167. Treesukosol Y, Ishizuka T, Yamamoto T, Yamatodani A (2003) The effect of taste stimuli on histamine release in the anterior hypothalamus of rats. *Brain Res* 964: 51-55.
168. Treesukosol Y, Ishizuka T, Yamamoto C, Senda K, Tsutsumi S, et al. (2005) Hypothalamic histamine release by taste stimuli in freely moving rats: possible implication of palatability. *Behav Brain Res* 164: 67-72.
169. Coil JD, Hankins WG, Jenden DJ, Garcia J (1978) The attenuation of a specific cue-to-consequence association by antiemetic agents. *Psychopharmacology (Berl)* 56: 21-25.

170. Ishizuka T, Yamatodani A (2012) Integrative role of the histaminergic system in feeding and taste perception. *Front Syst Neurosci* 6: 44.
171. Berthoud HR, Neuhuber WL (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85: 1-17.
172. Swithers SE, Baker CR, Davidson TL (2009) General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behav Neurosci* 123: 772-780.
173. Swithers SE, Martin AA, Davidson TL (2010) High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol Behav* 100: 55-62.
174. Swithers SE, Laboy AF, Clark K, Cooper S, Davidson TL (2012) Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. *Behav Brain Res* 233: 1-14.
175. Jurgens H, Haass W, Castaneda TR, Schurmann A, Koebnick C, et al. (2005) Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res* 13: 1146-1156.
176. Andrejic BM, Mijatovic VM, Samojlik IN, Horvat OJ, Calasan JD, et al. (2013) The influence of chronic intake of saccharin on rat hepatic and pancreatic function and morphology: gender differences. *Bosn J Basic Med Sci* 13: 94-99.
177. Sclafani A, Abrams M (1986) Rats show only a weak preference for the artificial sweetener aspartame. *Physiol Behav* 37: 253-256.
178. Danilova V, Hellekant G, Tinti JM, Nofre C (1998) Gustatory responses of the hamster *Mesocricetus auratus* to various compounds considered sweet by humans. *J Neurophysiol* 80: 2102-2112.
179. Inoue M, McCaughey SA, Bachmanov AA, Beauchamp GK (2001) Whole nerve chorda tympani responses to sweeteners in C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chem Senses* 26: 915-923.
180. Kawada T, Sakabe S, Aoki N, Watanabe T, Higeta K, et al. (1991) Intake of Sweeteners and Pungent Ingredients Increases the Thermogenin Content in Brown Adipose-Tissue of Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 651-654.
181. McCutcheon JE, Beeler JA, Roitman MF (2012) Sucrose-predictive cues evoke greater phasic dopamine release than saccharin-predictive cues. *Synapse* 66: 346-351.
182. Iwai K, Yazawa A, Watanabe T (2003) Roles as metabolic regulators of the non nutrients, capsaicin and capsiate, supplemented to diets. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* 79: 207-212.
183. Leung FW (2008) Capsaicin-sensitive intestinal mucosal afferent mechanism and body fat distribution. *Life Sci* 83: 1-5.
184. Weir JB (1949) New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 109: 1-9.
185. Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, et al. (2006) Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 29: 1756-1758.
186. Moreira-Rodrigues M, Quelhas-Santos J, Roncon-Albuquerque R, Serrao P, Leite-Moreira A, et al. (2012)

- Blunted renal dopaminergic system in a mouse model of diet-induced obesity. *Exp Biol Med* (Maywood) 237: 949-955.
187. Tsunoda M, Aoyama C, Ota S, Tamura T, Funatsu T (2011) Extraction of catecholamines from urine using a monolithic silica disk-packed spin column and high-performance liquid chromatography-electrochemical detection. *Analytical Methods* 3: 582-585.
188. Dodt C, Lonnroth P, Wellhoner JP, Fehm HL, Elam M (2003) Sympathetic control of white adipose tissue in lean and obese humans. *Acta Physiol Scand* 177: 351-357.
189. Chen X, Fahy AL, Green AS, Anderson MJ, Rhoads RP, et al. (2010) beta2-Adrenergic receptor desensitization in perirenal adipose tissue in fetuses and lambs with placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction. *J Physiol* 588: 3539-3549.
190. Zeng L, Wan Y, Li D, Wu J, Shao M, et al. (2013) The m subunit of murine translation initiation factor eIF3 maintains the integrity of the eIF3 complex and is required for embryonic development, homeostasis, and organ size control. *J Biol Chem* 288: 30087-30093.
191. Gorboulev V, Schurmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, et al. (2012) Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* 61: 187-196.
192. Dworak M, Kim T, McCarley RW, Basheer R (2011) Sleep, brain energy levels, and food intake: Relationship between hypothalamic ATP concentrations, food intake, and body weight during sleep-wake and sleep deprivation in rats. *Somnologie (Berl)* 15: 111-117.
193. Kirchner H, Hofmann SM, Fischer-Rosinsky A, Hembree J, Abplanalp W, et al. (2012) Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. *Diabetes* 61: 2734-2742.
194. Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, et al. (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9579-9584.
195. Lepage G, Roy CC (1988) Fecal Bile-Acids as a Means of Assessing the Integrity of the Enterohepatic Circulation of Bile-Acids and Their Microbial-Degradation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 7: 6-9.
196. Das N, Sikder K, Ghosh S, Fromenty B, Dey S (2012) *Moringa oleifera* Lam. leaf extract prevents early liver injury and restores antioxidant status in mice fed with high-fat diet. *Indian J Exp Biol* 50: 404-412.
197. Yun YP, Casazza JP, Sohn DH, Veech RL, Song BJ (1992) Pretranslational activation of cytochrome P450IIE during ketosis induced by a high fat diet. *Mol Pharmacol* 41: 474-479.
198. McGarry JD, Foster DW (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49: 395-420.
199. Wright J, Agius L (1983) Fatty acid synthesis and ketone body utilization by brown adipose tissue of the rat. Response to cold or nutritional state? *Biochim Biophys Acta* 753: 244-248.
200. Liu X, Rossmeisl M, McClaine J, Riachi M, Harper ME, et al. (2003) Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J Clin Invest* 111: 399-407.

201. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2009) UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9: 203-209.
202. 吉岡美紗子 (2014) 修士論文「消化管刷子細胞の分化と機能の解明」.
203. Colsoul B, Schraenen A, Lemaire K, Quintens R, Van Lommel L, et al. (2010) Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5208-5213.
204. Straub SG, Sharp GW (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 451-463.
205. Miller RE (1970) Effects of vagotomy or splanchnicotomy on blood insulin and sugar concentrations in the conscious monkey. *Endocrinology* 86: 642-651.
206. Uvnas-Wallensten K, Nilsson G (1978) A quantitative study of the insulin release induced by vagal stimulation in anesthetized cats. *Acta Physiol Scand* 102: 137-142.
207. Galewski D, Schwille PO, Rumenapf G, Scheele J, Kissler H, et al. (1995) Proximal gastric vagotomy: effects of two surgical modifications on oral and intravenous glucose tolerance in the conscious rat. *Physiol Behav* 57: 813-819.
208. Buffa R, Solcia E, Go VL (1976) Immunohistochemical identification of the cholecystikinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 70: 528-532.
209. Schwartz GJ, Berkow G, McHugh PR, Moran TH (1993) Gastric branch vagotomy blocks nutrient and cholecystikinin-induced suppression of gastric emptying. *Am J Physiol* 264: R630-637.
210. Sayegh AI (2013) The role of cholecystikinin receptors in the short-term control of food intake. *Prog Mol Biol Transl Sci* 114: 277-316.
211. Gibbs J, Young RC, Smith GP (1973) Cholecystikinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84: 488-495.
212. Okazaki H, Tanaka K, Nagase H, Inoue S (1993) Modulation of insulin secretion by hepatic vagotomy in cirrhotic rats. *Physiol Behav* 53: 521-525.
213. Hayes MR, Kanoski SE, De Jonghe BC, Leichner TM, Alhadeff AL, et al. (2011) The common hepatic branch of the vagus is not required to mediate the glycemic and food intake suppressive effects of glucagon-like-peptide-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R1479-1485.
214. Nijijima A (2000) Reflex effects of oral, gastrointestinal and hepatoportal glutamate sensors on vagal nerve activity. *J Nutr* 130: 971S-973S.
215. Steiner KE, Stevenson RW, Adkins-Marshall BA, Cherrington AD (1991) The effects of epinephrine on ketogenesis in the dog after a prolonged fast. *Metabolism* 40: 1057-1062.
216. Bahnsen M, Burrin JM, Johnston DG, Pernet A, Walker M, et al. (1984) Mechanisms of catecholamine effects on ketogenesis. *Am J Physiol* 247: E173-180.
217. Connolly CC, Steiner KE, Stevenson RW, Neal DW, Williams PE, et al. (1991) Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am J Physiol* 261: E466-472.
218. Nomura T, Nomura Y, Tachibana M, Nomura H, Ukai K, et al. (1991) Alpha 1-adrenergic regulation of

- ketogenesis in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1092: 94-100.
219. Van Loon GR, Sole MJ (1980) Plasma dopamine: source, regulation, and significance. *Metabolism* 29: 1119-1123.
220. Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, et al. (2002) The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest* 109: 765-775.
221. Mathar I, Vennekens R, Meissner M, Kees F, Van der Mieren G, et al. (2010) Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice. *J Clin Invest* 120: 3267-3279.
222. Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, et al. (1995) Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 76: 536-543.
223. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, et al. (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991.
224. Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ (1991) Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17: 187-193.
225. Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, et al. (2011) Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide* 24: 184-191.
226. Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, et al. (2003) Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 63: 325-331.
227. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
228. Higashi Y, Yoshizumi M (2004) Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* 102: 87-96.
229. Sclafani A, Ackroff K (2012) Role of gut nutrient sensing in stimulating appetite and conditioning food preferences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R1119-1133.
230. Matsumura S, Eguchi A, Okafuji Y, Tatsu S, Mizushige T, et al. (2012) Dietary fat ingestion activates beta-endorphin neurons in the hypothalamus. *FEBS Lett* 586: 1231-1235.
231. Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, et al. (2005) Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agric Food Chem* 53: 4593-4598.
232. Kondo H, Hase T, Murase T, Tokimitsu I (2003) Digestion and assimilation features of dietary DAG in the rat small intestine. *Lipids* 38: 25-30.
233. Yanagita T, Ikeda I, Wang YM, Nakagiri H (2004) Comparison of the lymphatic transport of radiolabeled 1,3-dioleoylglycerol and trioleoylglycerol in rats. *Lipids* 39: 827-832.
234. Nakanishi Y, Hosono A, Hiramatsu Y, Kimura T, Nakamura R, et al. (2005) Characteristic Immune Response in Peyer's Patch Cells Induced by Oral Administration of Bifidobacterium Components. *Cytotechnology* 47: 69-77.
235. Nakanishi Y, Murashima K, Ohara H, Suzuki T, Hayashi H, et al. (2006) Increase in terminal restriction fragments of Bacteroidetes-derived 16S rRNA genes after administration of short-chain

- fructooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 72: 6271-6276.
236. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Tateishi N, et al. (2010) Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J Agric Food Chem* 58: 2168-2173.
237. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Rogi T, et al. (2011) Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor CAR. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 1635-1637.
238. Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Ushiyama S, Kitagawa Y, et al. (2014) Nuclear receptor-mediated alleviation of alcoholic Fatty liver by polyphenols contained in alcoholic beverages. *PLoS One* 9: e87142.
239. Ashakumary L, Rouyer I, Takahashi Y, Ide T, Fukuda N, et al. (1999) Sesamin, a sesame lignan, is a potent inducer of hepatic fatty acid oxidation in the rat. *Metabolism* 48: 1303-1313.
240. Ide T, Ashakumary L, Takahashi Y, Kushiro M, Fukuda N, et al. (2001) Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1. *Biochim Biophys Acta* 1534: 1-13.
241. Clarke SD (2000) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr* 83 Suppl 1: S59-66.
242. Izuchi R, Nakai Y, Takahashi H, Ushiyama S, Okada S, et al. (2011) Hepatic gene expression of the insulin signaling pathway is altered by administration of persimmon peel extract: a DNA microarray study using type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Agric Food Chem* 59: 3320-3329.
243. Nakai Y, Sato B, Ushiyama S, Okada S, Abe K, et al. (2011) Hepatic oxidoreduction-related genes are upregulated by administration of hydrogen-saturated drinking water. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 774-776.
244. Watanabe T, Sakurada N, Kobata K (2001) Capsaicin-, resiniferatoxin-, and olvanil-induced adrenaline secretions in rats via the vanilloid receptor. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2443-2447.
245. Marinelli S, Vaughan CW, Christie MJ, Connor M (2002) Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. *J Physiol* 543: 531-540.
246. Talchai C, Xuan S, Kitamura T, DePinho RA, Accili D (2012) Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat Genet* 44: 406-412, S401.

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 23 年度博士課程 進学
氏 名 牛尼 翔太
指導教員名 中井 雄治

論文題目

摂食とエネルギー恒常性に関する研究—脳を介する末梢器官調節の解析

序論

動物は体内の栄養状態の変化に呼応して摂食行動や末梢器官における代謝を調節することでエネルギー恒常性を維持する。栄養素摂取が十分な状態では、糖質をエネルギー源として利用し、余剰分を脂肪として蓄積する一方、摂食行動は抑制される。逆に、絶食により栄養素摂取が不十分な状態では体内で不足したエネルギーを補うため、蓄積していた脂肪を利用し、摂食行動が促進される。末梢器官におけるこうしたエネルギー恒常性は、脳の司令によるホルモンや神経伝達等の作動で厳密に調節されている。

エネルギー恒常性には、食物摂取が重要な要因となる。しかしその際、視覚・嗅覚・味覚・触覚などの感覚も密接に関わる。とくに味覚は摂食時のみに生じる感覚であり、摂取する食物の質・量に影響を与えるため、エネルギー恒常性との関連性が深い。また、摂食

に伴い食物由来の因子が消化管に作用し、その刺激が生理機能を引き起こす機構の存在も報告されている。消化管は摂取した食物(栄養素)を消化・吸収するだけでなく、エネルギー代謝の起点となることが推定されている。消化管を含めた末梢器官で受容された情報の多くは脳に伝達され、脳はそれを基にエネルギー代謝調節を行う。この場合、消化管と脳の連動関係は密接であると考えられるが、その詳細な機構については不明な点が多い。

本研究は、摂食時に生じるエネルギー恒常性維持機構の一端として、栄養学的な観点に加え、生体が食品因子から受ける刺激がエネルギー恒常性に与える影響、とくに脳を介する調節機構を解明することを目的とした。

第1章 絶食後再給餌が末梢臓器の遺伝子発現に与える影響の網羅的解析

摂食後に生じる遺伝子発現変動を経時的に捉えるために、絶食後飼料を1、3、6時間与えたラットの肝臓と白色脂肪組織について DNA マイクロアレイ解析を行った。両臓器とも給餌時間依存的に遺伝子発現プロファイルが変化し、肝臓ではエネルギー産生関連遺伝子が脂質合成関連遺伝子に比べ早期に発現変動するという経時的な代謝変化を明らかにした。また新たに、免疫プロテアソームの発現上昇など様々な遺伝子が栄養状態により変動することもわかった。これらの結果は、摂食により多様な生理作用、特にエネルギー恒常性変化が生じることを示した。そこで、摂食とエネルギー恒常性に関する生体现象を多面的に解析した。

第2章 摂食と味覚刺激の関係性の解析

第1節 味覚刺激が摂食行動に与える影響

食物由来の味覚刺激が摂食行動に与える影響を明らかにするために、野生型(WT)マウスに対して味物質添加餌を与え、摂食量の解析を行った。その結果、嗜好味では摂食量は変化しなかったが、高濃度の苦味では摂食量の低下が生じた。甘・苦・旨味の受容味細胞が消失し、これら3味を知覚できない、味覚関連転写因子 *Skn1* を欠損(KO)したマウスでも WT マウスと同様に忌避味に対する摂食量が低下したが、その忌避する割合は減少した。このことから味覚感知機能消失が忌避の緩和を引き起こした可能性が示唆され、摂食行動は味覚による影響を受けると考えられた。次に、食物選択における味覚刺激の関与を2種類の餌を同時に提示する嗜好性試験にて評価した。甘味に対しては WT マウスのみで味覚刺激依存的な嗜好性を示し、苦味に対しては両マウス共に忌避が見られたが、KO マウスの忌避の程度は WT マウスに比べ緩和され、味覚刺激が食物選択に影響することが示された。

以上より、動物は味よりもエネルギーを確保することを優先するため嗜好味は摂食量に影響しないが、食物選択には寄与することが示された。一方、忌避味は摂食可否の判断に寄与するためエネルギーの確保よりも優先されることが推定された。また、KO マウスも苦味に対して忌避したことから、口腔以外の受容機構が存在する可能性が示唆された。

第2節 甘味刺激とエネルギー代謝の関連性の解析

甘味受容はカロリー源である糖を感知する機構であり、甘味とエネルギー代謝の関連性は深い。しかし近年、ノンカロリー人工甘味料の摂取が体重増加を亢進するとの報告が複数あり、甘味刺激自体がエネルギー恒常性に影響する可能性が指摘されている。そこで、甘味刺激とエネルギー代謝の関連性を肝臓遺伝子発現解析から検討した。

WT マウスにサッカリン溶液を飲水または口腔を通過しないよう胃内投与した。6 時間後肝臓を摘出し、DNA マイクロアレイ解析を行なった。その結果、飲水群において脂肪酸 β 酸化関連遺伝子の発現上昇などの脂質代謝の変化が生じた。これらの遺伝子発現変動が甘味刺激により誘導されているかについて検討するために KO マウスを用いたところ、脂質代謝関連遺伝子の発現変動は観察されなかった。この結果より、口腔の甘味刺激が脳に伝達されることで遺伝子発現変動が誘導されるという新たな経路が存在する可能性が強く示された。さらに、脳から肝臓への制御機構を検討するため、肝枝切除手術を施した WT マウスでは、脂質代謝関連遺伝子の発現変動は認められなかった。このことは、甘味刺激が脳へと伝達された後、迷走神経を介して肝臓の遺伝子発現変動を誘導する経路が存在することを示唆している。

以上の結果は、甘味の感覚が肝臓の栄養素代謝に直接影響するだけでなく、体内でエネルギー源として利用されないとされてきた人工甘味料が栄養素代謝に影響を及ぼす可能性を示した新たな知見である。

第3章 消化管を起点とする新たな臓器間ネットワークの解明

食物由来の刺激が消化管に与える影響を解析するには、味覚の影響を除外できる KO マウスを利用することが有効である。通常飼育条件下においては、KO マウスの摂食量は WT マウスと同等であった。しかし、KO マウスは同腹仔の WT マウスに比べ、体脂肪率の低下を伴う顕著な低体重を示した。低体重が生じる原因について検討を行ったところ、運動量には遺伝子型の違いによる差はなかったが、呼吸交換比の低下、エネルギー消費量の上昇、血清中ケトン体の上昇等が観察され、KO マウスにおいて脂肪分解が亢進している可能性が示唆された。高脂肪食投与では脂質吸収量に差はなかったが、16 週齢時点で WT マウス(約 40g)に比べ、KO マウス(約 30g)は肥満の発症が大幅に抑制された。また心拍数、直腸温に変化はなかったが、血圧の低下、腓腹筋ミトコンドリアコピー数の増加などの表現型が観察された。以上の結果より、KO マウスにおいて恒常的に脂質分解が亢進し、産生されたケトン体が筋肉のミトコンドリアで消費される経路の存在が示唆された。

また、出生後の体重増加量に変化が見られたことから、KO マウスにおいて脂質分解の亢進が生じる原因は、摂食による栄養素摂取の開始であると考えた。また、経口グルコース負荷試験(OGTT)において、WT マウスに比べ KO マウスの血糖値に変化はないが、インスリン分泌量は有意に低値であったという結果が示されている。インスリン分泌は膵臓以外にも消化管や脳により調節される。KO マウスではこれらの組織による調節機構に変化が生

じていることが示唆された。この可能性を検証するために、横隔膜下迷走神経切断(Vx)マウスに対して OGTT を実施した。WT マウスでは、Vx マウスは偽手術(Sham)マウスに比べ、血糖値上昇が抑制された。しかし、KO マウスでは処理の違いによる血糖値上昇パターンに変化はなかった。この結果は、消化管と脳の迷走神経を介した連関性を示唆しており、KO マウスではその経路が作動していないことが推定された。

脳から脂質代謝を調節する因子としてホルモンとカテコールアミン分泌の関与を検討した。血清中甲状腺ホルモンには変化が見られなかったが、尿中カテコールアミンの排泄量が KO マウスで有意に増加していた。カテコールアミン分泌の促進により脂質分解が誘導されることが推定された。

WT マウスでは絶食状態においてカテコールアミンを分泌しエネルギー産生を亢進させている。Vx マウスの解析から、食物が消化管を通過する際に、食物由来の刺激が受容され、迷走神経を介して脳へと情報が伝達されることがわかった。この情報を基にカテコールアミン分泌を抑制し、エネルギー恒常性を維持する機構が存在する可能性を示唆している。一方、KO マウスは消化管から脳への神経伝達経路が消失していることから、食物が消化管を通過しても脳に情報が伝達されない。そのため、交感神経が常に興奮状態となり、過剰なカテコールアミン分泌により脂質代謝が促進し体重差が生じたことが考えられた。

まとめ

本研究では摂食が生体に与える影響をエネルギー恒常性維持機構に焦点を当てて解析した。口腔における味覚刺激が摂食行動に影響を与えることや、甘味刺激に連動したエネルギー代謝調節機構が存在することを検証し、味覚とエネルギー恒常性維持機構の関連性を明らかにした。さらに、WT マウスと比べ、摂取エネルギー量に変化はないが、有意な低体重を示す *Skn1* KO マウスをエネルギー恒常性の破綻したモデルとして解析した。KO マウスにおいて脂質代謝が有意に亢進し、さらに高脂肪食摂取により脂質代謝に関わる指標の顕著な変化が観察された。また、KO マウスでは脳と消化管の関係性が変化し、カテコールアミン分泌制御が正常に行われていないというネットワークの破綻が生じている可能性を明らかにした。

以上を総括すると、摂食によるエネルギー代謝の変化は、栄養素の吸収による影響だけでなく、摂食の刺激が受容されることで生じる末梢器官(口腔、肝臓、消化管、筋肉)と脳のネットワークからも調節されることが明らかになった。

本研究は、摂食による脳を介したエネルギー恒常性維持機構の一端を解明するとともに、食物が生体に与える影響を栄養面だけでなく感覚面などの視点から総合的に解析した知見を提示したもので、学術面のみならず社会面での貢献に繋がると考える。

発表論文

Ushiyama S, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2010)74:1320-1323.

追記

本論文で示した結果の一部は、様々な方に御協力いただきました。以下に、ご協力いただきました部分を明記致します。

第1章

図1-7 免疫プロテアソーム構成タンパク質のイムノブロットィングは、東京大学大学院農学生命科学研究科機能性食品ゲノミクス研究室の中井雄治特任准教授に行なっていただきました。

第2章

第2章第1節(図2-3～図2-9)の結果の一部は、東京バイオテクノロジー専門学校からのインターン生である藤平知華氏、仲川可南子氏、吹田紫香氏に測定していただきました。

第3章

腓腹筋におけるミトコンドリアコピー数(図3-12)、エネルギー代謝解析(図3-8,19,20)、血圧・心拍数(図3-11)は、芝浦工業大学システム理工学部生命科学科食品栄養学研究室の越阪部奈緒美教授及び渡辺尚貴氏に測定していただきました。

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 ILSI Japan 寄附講座「機能性食品ゲノミクス」研究室で行われたものであります。研究を行うにあたり、非常に多くの方々の御指導、御鞭撻、御協力を頂き遂行することが出来ました。この場をお借りして謝意を示したいと思います。

とくに、東京大学大学院農学生命科学研究科機能性食品ゲノミクス研究室の中井雄治特任准教授には、研究室に配属されてから現在に至るまで 5 年間指導教員として御指導、御鞭撻をいただきました。

同じく石島智子特任助教には、生活面で困ったことから実験サポートまで幅広くお世話になりました。文章の添削では忙しい中でも細かいところまで読み込んで頂き、本論文の作成においてもご助力いただきました。

東京大学農学生命科学研究科味覚サイエンス研究室の石丸喜朗特任助教、吉岡美紗子氏には、第 3 章の *Skn1* KO マウスの研究に関して共同研究者として実験やディスカッションなど多大なる御協力を頂きました。

東京大学農学生命科学研究科生物機能開発化学研究室内成川真隆特任助教には、迷走神経切除等様々な技術的なサポートに加えて、いつでもディスカッションさせていただきました。

東京大学農学生命科学研究科生物機能開発化学研究室内三坂巧准教授には、第 2 章第 1 項についてネスレとの共同研究に参加させていただいた上に、ディスカッションさせていただきました。

芝浦工業大学システム理工学部生命科学科食品栄養学研究室の越阪部奈緒美教授及び渡辺尚貴氏には、KO マウスのエネルギー代謝解析・血圧・心拍数の測定などご協力いただきました。

琉球大学医学部第二内科の益崎裕章教授及び小塚智沙代特別研究員には、迷走神経切除技術の御指導を頂いただけでなく、研究の方向性や得られた結果の解釈に関する貴重なアドバイスを頂きました。

東京大学総括プロジェクト機構総括寄付講座「食と生命」研究室の加藤久典特任教授には、体組成解析について機材を使用させていただくとともに、御指導いただきました。

東京大学薬学研究科生体分析化学研究室の角田誠講師には、尿中カテコールアミン測定の御指導をしていただきました。お忙しい中でも常に測定しやすいように機器の設定までしていただきました。

東京大学農学生命科学研究科味覚サイエンス研究室技術補佐員の高橋綾子さん、東京バイオテクノロジー専門学校からのインターン生である藤平知華さん、仲川可南子さん、吹田紫香さんには動物の世話から実験・解剖まで幅広く作業をしていただきました。皆様のサポートのお陰で様々な動物実験を遂行することができました。

本研究室で研究するきっかけから精力的な研究のディスカッションまで修士過程、博士課程の全てをトータルマネジメントしていただき、結果が出ない時でも常にやる気を奮い立たせてくれた阿部啓子特任教授には感謝の言葉が尽きません。特に厚く御礼申し上げます。

その他にも東京大学大学院農学生命科学研究科 ILSI Japan 寄附講座 機能性食品ゲノミクス

研究室、生物機能化学研究室、日清食品寄附講座 味覚サイエンス研究室、食の安全研究センター 食品生体機能研究室の先生方、学生の皆様にお世話になりました。皆様のおかげで非常に充実した 5 年間の研究室生活を送れました。先輩、同期、後輩の皆様に感謝したいと思います。特に、フードサイエンス棟 301-2 号室の皆さんには多大な迷惑をお掛けしてしまいましたが、非常に楽しい日々を送ることが出来ました。また、2012 年度ソフトボール春季大会で生物機能 A チームの方々と共に勝ち取った優勝は非常に思い出深い記憶になりました。最後の大会は出ることはできませんでしたが、研究室生活においてソフトボールは何よりの楽しみでした。

最後に、大学院進学に加え博士課程への進学に対しても理解を示し、研究生活をサポートしてくれた家族に感謝いたします。

2014 年 3 月 17 日