

初代培養肝細胞における脂肪酸合成系酵素 mRNA の誘導に対するアミノ酸の影響

EFFECTS OF AMINO ACIDS ON THE mRNA INDUCTIONS OF LIPOGENIC ENZYMES IN PRIMARY CULTURES OF RAT HEPATOCYTES

入谷信子・福田ひとみ（帝塚山学院短期大学）
田中武彦（大阪大学医学部）

Nobuko IRITANI¹, Hitomi FUKUDA and Takehiko TANAKA²

¹Tezukayama Gakuin College Sakai 590-01

²Osaka University Medical School, Osaka 530

ABSTRACT

Effects of amino acids on the mRNA concentrations of acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase were pursued in primary cultures of rat hepatocytes during the process of the enzyme induction. Acetyl-CoA carboxylase mRNA and enzyme were induced even in the absence of amino acids. Malic enzyme mRNA also was considerably induced in the absence of amino acids. However, both essential and non-essential amino acids required to increase fatty acid synthase mRNA and essential amino acids, to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA. In particular, the removal of lysine and tryptophan caused to decrease the mRNA and also enzyme induction. It was suggested that amino acids are differently involved in lipogenic enzyme induction before translation. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 12, 29-33, 1991.

哺乳動物での脂肪の合成は主として肝で行われ、その律速段階は一連の脂肪酸合成系酵素（acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase）が関与する。我々はラット肝よりこれら酵素のすべての cDNA をクローニングし、遺伝子発現に対する食餌栄養素やホルモンによる調節を研究している。一方、大豆、グルテン、ゼインなどの植物性たん白質をラットに投与すると肝トリグリセリド値がカゼインに比べて著明に低下することを見出し¹⁾、さらに一連の脂肪酸合成系酵素の mRNA 量と酵素に対する食餌たん白質とアミノ酸添加効果について研究し報告した²⁾。即ち、acetyl-CoA carboxylase の転写、mRNA 量、酵素誘導は糖質のみの摂取で十分で、たん白質の、摂取を必要とせず、し

たがって食餌たん白質の種類の影響を受けなかった。Malic enzyme の転写と mRNA の誘導は糖質のみの摂取で充分であったが酵素誘導にはたん白質が必要であった。そして malic enzyme の酵素誘導は大豆、グルテン、ゼインの摂取でカゼインに比べて低下した。Fatty acid synthase と glucose-6-phosphate dehydrogenase の mRNA と酵素の誘導は食餌たん白質により大きく影響を受け、植物性たん白質の摂取で低かったが、リジンとトリプトファン³⁾の添加で有意に回復した²⁾。今回はさらに初代培養肝細胞を用いてそれらのアミノ酸の脂肪酸合成系酵素 mRNA 誘導に対する影響を研究した。

実験方法

肝細胞

Collagenase 灌流法によりラット肝細胞を得、常法により24時間 plating した後、実験培地に交換した。即ち、ビタミンと塩類のみのアール培地にアミノ酸組成を変えて添加し、グルコース存在下で培養した。mRNA 量は24時間後、酵素活性は48時間後に harvest して測定した。

酵素活性の測定

肝細胞ホモジネート105,000 g 上清液を用いて malic enzyme (EC 1.1.1.40) は Ochoa³⁾ の方法で、glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) は Glock ら⁴⁾ の方法で、fatty acid synthase (EC 2.3.1.85) は Hsu ら⁵⁾ の方法で測定した。Acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2) は Nakanishi ら⁶⁾ の方法で10 mM citrate で最大活性を測定した。これらの酵素活性はすべて immunochemical titration により酵素量の指標になることを確認してある。

mRNA の定量

Chirgwin ら⁷⁾の方法で mRNA を調製し、formamide 処理で変性させ20 μ g を nylon filter に固定した。³²P でラベルした cDNA を用いて dot-blot hybridization 法により mRNA 量を定量した⁸⁾。

結果と考察

Acetyl-CoA carboxylase の mRNA 量と酵素活性は共にアミノ酸無添加でも完全培地と同じレベルにまで上昇し (Fig. 1), これは動物実験で糖質のみの摂取で十分に誘導されたこと¹⁰⁾を支持する結果であった。

Malic enzyme mRNA 量は必須アミノ酸のみ、または非必須アミノ酸のみの存在下で両者の存在下と同じレベルに達した (Fig. 2)。なお、酵素活性は mRNA 量とほぼ連動していた。動物実験で malic enzyme mRNA 量は糖質のみの摂取で十分に誘導され、酵素を十分に誘導するにはたん白質の摂取が必要であったが⁹⁾、初代培養肝細胞ではアミノ酸無添加で低く、必須、非必須は問わないがアミノ酸の添加により上昇し、

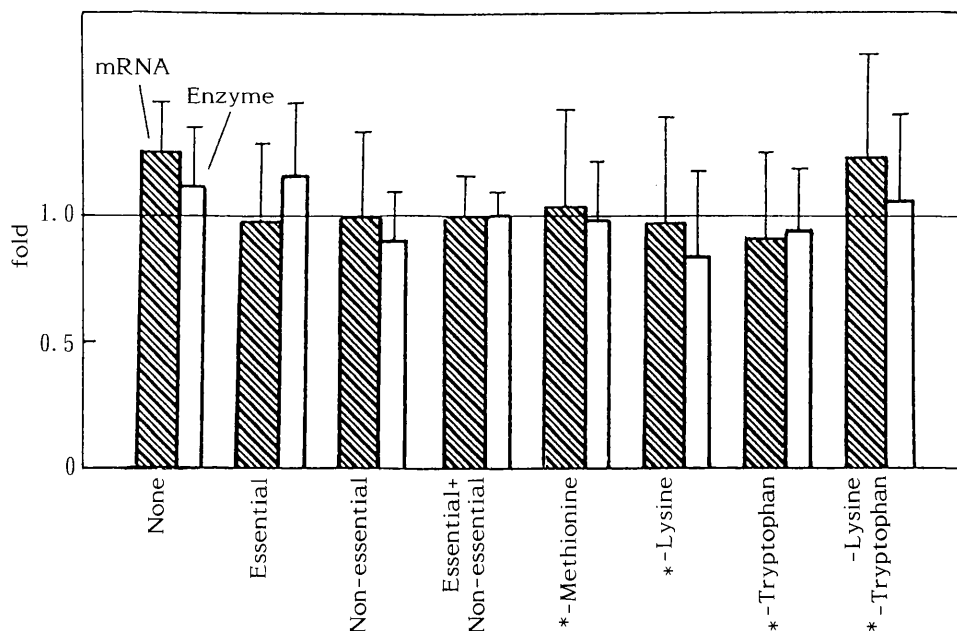


Fig. 1. Effects of amino acids on acetyl-CoA carboxylase mRNA and enzyme induction in hepatocytes.

* Removal of the indicated amino acid(s) from essential and non-essential amino acids.

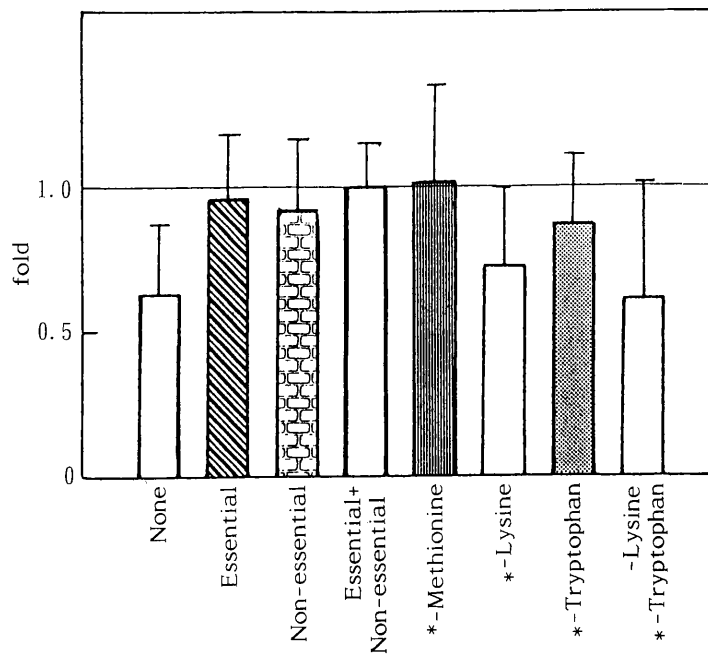


Fig. 2. Effects of amino acids on malic enzyme mRNA concentration in hepatocytes. * Removal of the indicated amino acid(s) from essential and non-essential amino acids.

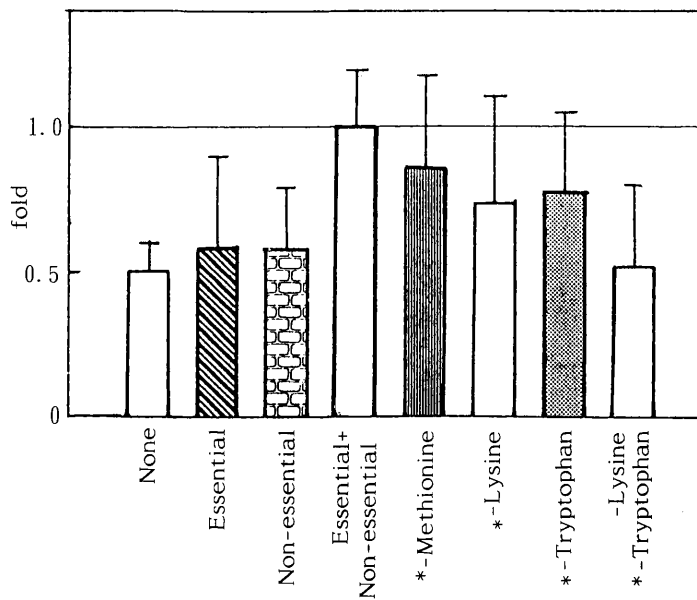


Fig. 3. Effects of amino acids on fatty acid synthase mRNA concentration in hepatocytes. * Removal of the indicated amino acid(s) from essential and non-essential amino acids.

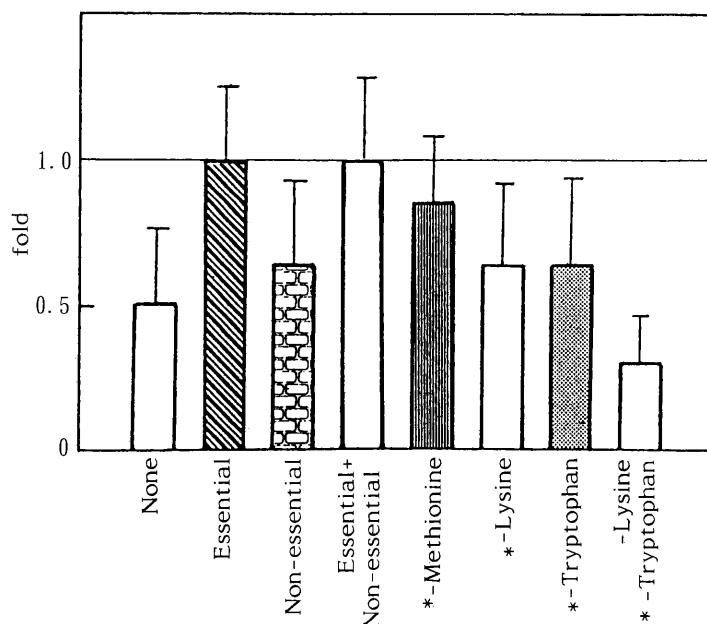


Fig. 4. Effects of amino acids on glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA concentration in hepatocytes.

* Removal of the indicated amino acid(s) from essential and non-essential amino acids.

動物実験の結果と必ずしも一致しなかった。

Fatty acid synthase mRNA 量の誘導は必須または非必須アミノ酸のみの存在下では低く、両者の存在が必要であった。そしてリジンとトリプトファンの非存在下で mRNA の誘導が低かった (Fig. 3)。

Glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA 量の誘導は非必須アミノ酸のみの添加では低く、必須アミノ酸が必要であった。しかし、非必須アミノ酸は必ずしも必要でなかった。一方、リジン、トリプトファンの両者が共存しないと glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA 誘導は特に低かった。また、fatty acid synthase と glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性は各 mRNA 量とほぼ連動していたのでリジン、トリプトファンは翻訳以前の段階で関与していることが示唆された。

今回の初代培養肝細胞において、glucose-6-phosphate dehydrogenase と fatty acid synthase の mRNA の誘導にはグルコース存在下でアミノ酸の添加が必要であった。先に、動物実験において glucose-6-phosphate dehydrogenase と fatty acid synthase の誘導には糖とたん白質の摂取が必要であり、primary には転写の段階に起因することを見出したが^{11,12)}、今

回の結果はそれを支持するものであった。両酵素とも mRNA の誘導はリジンとトリプトファンの添加により有意に上昇したが、動物実験においてゼイン摂取群で fatty acid synthase と glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA の誘導がカゼインに比べて低かったのは、ゼインの制限アミノ酸がリジン、トリプトファンであることが一因であるかも知れない。リジン、トリプトファンは脂肪酸合成系酵素の誘導に翻訳以前の段階で関与していることが示唆されたが、その機構は未解決である。また、各酵素でアミノ酸の関与が異なることが示唆された。

文 献

- 1) Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A. and Tanaka, T. (1986): Effects of dietary protein on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, **116**, 190-197.
- 2) 入谷信子, 西本真美, 福田ひとみ, 桂田昭彦, 松村羊子, 田中武彦 (1990): 一連の脂肪酸合成系酵素の mRNA 量に及ぼす食餌たん白質の影響. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 35-38.
- 3) Ochoa, S. (1955): Malic enzyme. *Methods*

- Enzymol.*, **1**, 739-753.
- 4) Glock, G. E., and McLean, P. (1953) : Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, **55**, 400-408.
 - 5) Hsu, R. Y., Butterworth, P. H. W. and Porte, J. W. (1969) : Pigeon liver fatty acid synthetase. *Methods Enzymol.*, **14**, 33-39.
 - 6) Nakanishi, S. and Numa, S. (1970) : Purification of rat liver acetyl-coenzyme A carboxylase and immunological studies on its synthesis and degradation. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 161-173.
 - 7) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979) : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.*, **18**, 5294-5299.
 - 8) Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Noguchi, T. and Tanaka, T. (1987) : Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 487-491.
 - 9) Lamers, W. H., Hanson, R. W. and Meisner, H. M. (1982) : cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5137-5141.
 - 10) Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Matsumura, Y., Nishimoto, N., Noguchi, T. and Tanaka, T. (1990) : Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 435-441.
 - 11) Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Matsumura, Y., Nishimoto, N., Noguchi, T. and Tanaka, T. (1990) : Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 427-433.
 - 12) Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Noguchi, T. and Tanaka, T. (1990) : Effects of nutrients and insulin on transcriptional and post-transcriptional regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1006**, 104-110.