

## 肥満による生体内代謝異常の新たなターゲット： 細胞内ケトン体利用経路

著者	山? 正博
雑誌名	星薬科大学紀要
号	53
ページ	7-14
発行年	2011
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1240/00000141/">http://id.nii.ac.jp/1240/00000141/</a>

## 肥満による生体内代謝異常の新たなターゲット～細胞内ケトン体利用経路

山 崎 正 博

星薬科大学 衛生化学教室

### **Ketone body utilization by cytosolic acetoacetyl-CoA synthetase is novel target of obesity-induced disorders of lipid metabolism**

Masahiro YAMASAKI

*Department of Health Chemistry, Hoshi University*

#### 1. はじめに

近年、先進国を中心に肥満が大きな社会問題になっている。米国では成人の約 1/3 が肥満、さらに 1/3 は肥満傾向にあるといわれている。我が国でも肥満者の割合は増加し続け、中年男性の 3 人に一人は肥満状態にある。我が国で肥満者の割合が増加している原因は、戦後の食生活の変化にあると考えられている。2005 年度の国民栄養基礎調査によると、日本人は 1950 年代と比べて総摂取カロリーが 13% 増加し、食事に占める脂質の割合に至っては 3 倍近く増加している。これは穀物中心だった日本人の食生活が、脂質を多く摂取する欧米型のスタイルに変化していることを裏付けている。この食生活の変化と同時に、モータリゼーションや家電製品の発達などにより日々の暮らしでの運動量が減少していることも相まって、我が国の肥満者の割合は現在進行形で急速に増加していると考えられる。

肥満自体は疾病ではない。しかし、肥満時には脂質異常症や糖尿病、高血圧など多くの代謝異常が併発すること、それに伴って動脈硬化や心筋梗塞、脳梗塞などの血管疾患を始めとする重篤で致命的な疾患を発症する確率が飛躍的に上昇することが知られている。これらの疾患は、病因と発症の因果関係がはっきりしている感染症とは異なり、長期間の不摂生やストレスなど生活習慣によって徐々に進行していくため、「生活習慣病」と呼ばれている。肥満自体は生活習慣病ではないが、生活習慣病の発症と増悪の確率を飛躍的に増大させる最大のリスクファクターであると考えられている。そこで、これら肥満とそれに伴う代謝異常を「メタボリックシンドローム」という名称で呼ぶことが 1998 年に WHO により提唱され、我が国でも 2005 年以降日本肥満学会などを中心にメタボリックシンドロームの診断基準の策定が進められてきた。メタボリックシンドロームは疾病の予防的観点から

重要視されている側面が強いが、現在の診断基準は前提として肥満状態であることを重視しているにもかかわらず、肥満自体の判定は体格差に大きく左右される腹囲であったり、測定に大掛かりな装置を要する腹部 CT スキャンによる内臓脂肪面積などを用いており、より簡便に測定できて客観的に比較可能な肥満の増進に関わる因子の発見が望まれ続けている。

また、肥満は脂肪組織の肥大化によるものだが、一方で脂肪萎縮症のように脂肪組織が極端に萎縮した場合にも重度の糖尿病や脂質異常症などが起きる。従って、脂肪組織とは適度の発達を維持することが重要であると考えられている。しかしながら、健康的な脂肪細胞とメタボリックシンドロームを誘発する病的な脂肪細胞を区別する明確なマーカー因子は見出されていない。そこで筆者らは脂肪の消費にともなって血中濃度が上昇するケトン体とその細胞内代謝経路に着目し、肥満とそれに伴う代謝異常におけるケトン体利用経路の寄与と肥満マーカーとしての可能性を検討した。

#### 2. 二つの細胞内ケトン体利用経路

食事摂取の過剰や運動量の不足などで余剰となったエネルギーは、肝臓で脂肪へと変換される。この脂肪が体内で消費される際には、代謝産物としてケトン体が生じることが知られている (Fig.1)。生体内にはアセト酢酸、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸、アセトンの三種のケトン体が存在することが知られているが、代謝的に生じるものはアセト酢酸であり、他のものはそれが酸化されて生じる。通常、糖質は解糖系を経てピルビン酸となりミトコンドリアに入るが、このピルビン酸はアセチル CoA とオキサロ酢酸として TCA サイクルに入り、ATP 産生へと利用される。一方、脂肪はミトコンドリアにおいて酸化を受け、アセチル CoA となって TCA サイクルに入る。従って、脂肪の代謝の際には糖質と異なり TCA サイク

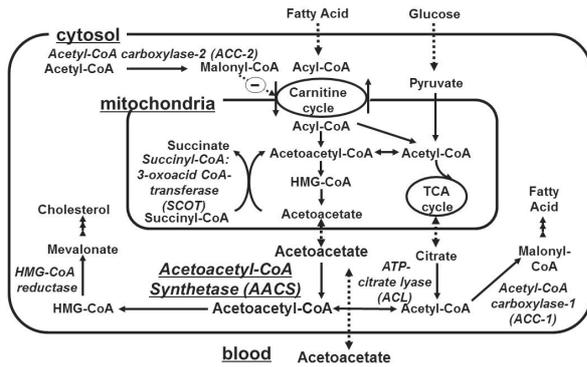


Fig. 1 Pathway of ketone body metabolism

ルの駆動に必要なオキサロ酢酸の不足が起きるため、過剰な脂質消費が起きた場合には TCA サイクルで処理しきれないアセチル CoA がミトコンドリア内に発生することになる。この余ったアセチル CoA はミトコンドリア内でケトン体であるアセト酢酸 (acetoacetate) に変換されて細胞質を経て血中に放出されるとされてきた<sup>1)</sup>。これら代謝的に産生するケトン体は、脂肪をエネルギー源として利用する割合の増加に応じて血中濃度が上昇するため、糖質の細胞内取り込みが阻害された糖尿病時や、そもそもエネルギー源が不足している絶食時には血中のケトン体量が高値となるケトosis、更に異常に上昇することで血液の pH が下がるケトアシドーシスなどを引き起こす。従って、ケトン体は脂質代謝に伴って生じる不要な物質として捉えられてきた。しかし、近年脳や筋肉など様々な組織でケトン体が積極的に利用されることが知られるようになりつつある<sup>2)</sup>。

このケトン体利用経路としては、主にミトコンドリアにおいて CoA 転移酵素である succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase (SCOT, [ EC 2.8.3.5 ]) によって活性化されて再び TCA サイクルに入り、エネルギー源として利用される経路のみが知られていた<sup>3)</sup>。しかし、1950年代に Chen ら<sup>4)</sup> がラット肝臓のスライスを用いてアセト酢酸がコレステロールへ取り込まれる事を発見し、ほぼ同じ時期に Blecher らは同様の実験で脂肪酸にも取り込まれる事を報告している<sup>5)</sup>。また、Stern らは鳩の肝臓ホモジネートを用いてアセト酢酸が ATP 及び CoA の存在下でクエン酸に変換することを発見した<sup>6)</sup>。これらのことから、ケトン体がエネルギーだけでなく脂質合成にも利用されている事実が明らかになった。更に、Endemann らによりミトコンドリアに SCOT の存在しない肝臓においてもケトン体が細胞内脂質へと変換されていることが示されたことから、細胞質側にケトン体からアセチル CoA を基質として供給する酵素が存在する可能性が示唆された<sup>7)</sup>。しかしながら、彼らはその酵素の同定には至らなかった。

一方、それらの研究とは独立して、福井らはポリヒド

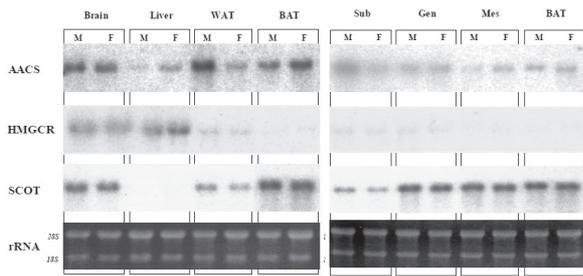
ロキシ酪酸 (PHB) の活性汚泥菌 *Zoogloea ramigera* における代謝の研究過程で、SCOT 以外のケトン体 CoA 付加活性を持つ酵素を初めて単離精製することに成功した。そしてその基質特異性より、アセト酢酸特異的な活性化酵素であることが明らかになった<sup>8)</sup>。この精製法を応用して哺乳動物で同様の活性を持つ酵素が存在するかどうかを探索したところ、ラット<sup>9)</sup> やヒト<sup>10)</sup> においてもこの酵素のホモログが存在することが明らかになった。この酵素はアセト酢酸を特異的な基質とする CoA ligase であることから acetoacetyl-CoA synthetase (AACS, [ EC 6.2.1.16 ]) と名付けられ、細胞質に特異的に存在する酵素であることも判明した<sup>9)</sup>。従って、本酵素は Stern らがその存在を予想した細胞質側のケトン体代謝酵素であることが明らかになった。CoA 付加された化合物は原則としてミトコンドリア膜を透過しない。従って、AACS により CoA 付加されて活性化したケトン体は、同じく細胞質に存在する脂肪酸やコレステロールといった生体内物質の合成経路において基質として利用されることが予想された。すなわち、生体内のケトン体は、従来知られていた SCOT を介するエネルギー源としての利用だけでなく、AACS を介して合成基質としても利用されていると考えられる。

実際、AACS は遺伝子・タンパク質・酵素活性いずれのレベルでも脂質合成の盛んな脳<sup>10, 11)</sup>・肝臓<sup>9, 12)</sup>・脂肪組織<sup>13, 14)</sup> に多く存在していることから、これらの組織ではケトン体が脂質の合成基質として使われている可能性が高いと考えられる。肥満時には余剰なエネルギーが脂質合成系へと向かう一方で、熱源として消費するために脂質分解系も活性化することから、ケトン体産生も増加している。従って、肥満時には本酵素を介したケトン体代謝量が増加している可能性がある。そこで肥満と AACS を介したケトン体利用経路の関係をまず末梢組織で検討した。

### 3. 脂肪組織のケトン体代謝に及ぼす肥満の影響

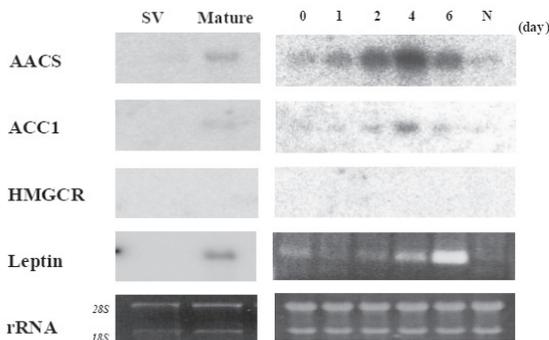
AACS は全身の脂肪組織に広く発現している。特に雄の皮下部白色脂肪組織には強く発現しており、部位特異性と性特異性を合わせ持つ酵素だと考えられる (Fig.2)<sup>14)</sup>。また、本酵素は成熟脂肪細胞に発現が特異的で、脂肪細胞の分化過程において脂肪細胞の分化マーカーである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) や、脂肪酸合成の律速酵素である acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1) と連動して発現が誘導されることから、成熟した脂肪細胞の脂肪酸合成系にケトン体が利用されていると考えられる (Fig.3)<sup>14)</sup>。

更に、高脂肪食 (60.0% fat, 24.5% protein, and 7.5% carbohydrate) を 3 週間与えて軽度の肥満状態にしたラットでは通常食 (5% fat, 24% protein, and



**Fig.2 Gene Expression of acetoacetyl-CoA synthetase mRNA in rat lipogenic tissues**

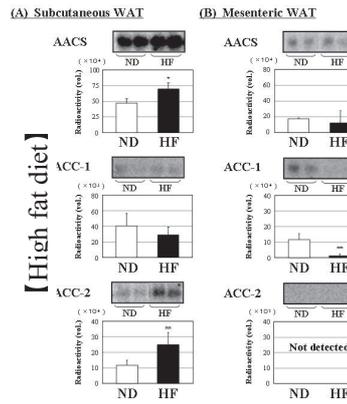
Total RNAs were isolated from brain, liver, white adipose tissue (WAT), and brown adipose tissue (BAT) of male and female rats (8 weeks old). Aliquots of RNAs (10µg) were subjected to Northern blotting analysis of AACS, SCOT, and HMGR cDNA probes. Sub, gen, mes, and BAT indicate a subcutaneous, paragenitalium, mesenterium, and brown adipose tissue, respectively. M and F indicate male and female, respectively. The lower panel shows EtBr staining of ribosomal RNAs (2µg/lanes).



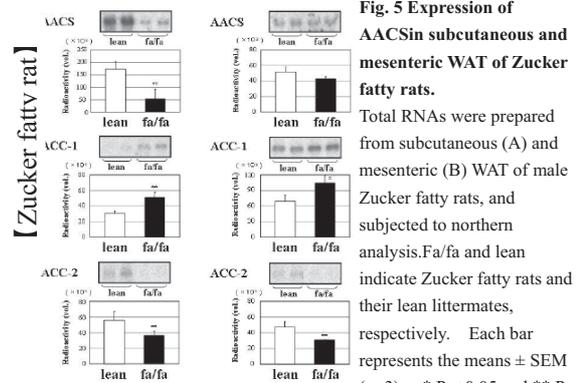
**Fig.3 AACS mRNA expression in pre-adipocytes and mature adipocytes**

Mature and preadipose cells were prepared by the collagenase-digestion method. Total RNA from cultured cells at the indicated time points of day 0, day 1, day 2, day 4, and day 6 were prepared. Total RNAs (8 µg/lanes) were isolated from these cells, and subjected to the Northern analysis of AACS, ACC-1, HMGR, and leptin cDNA probes. SV indicates stromal-vascular cells. N indicates the lane of non-induced cells on day 6. The lower panel shows EtBr staining of ribosomal RNAs (1 µg/lanes).

54% carbohydrate) を与えた群に比べ、AACS 遺伝子の発現が雄の皮下脂肪組織でのみ上昇していた (Fig.4)<sup>15)</sup>。一方、食欲抑制ホルモンとして知られるレプチンの受容体不全による遺伝的肥満ラット (Zucker fatty rat) では、逆に雄の皮下脂肪組織のみ発現が減少していた (Fig.5)<sup>15)</sup>。この時、高脂肪食による食事性肥満では血中ケトン体量が増加するが、Zucker fatty rat では逆に減少していた (table 1)<sup>15)</sup>。この違いは、脂肪過多による食餌性肥満と異なり Zucker fatty rat ではケトン体産生を担う筋肉や肝臓での脂肪消費が減少することが肥満の増悪に関わっているからである<sup>16)</sup>。すなわち、同じ肥満状態でも、摂取エネルギーが過剰なことに起因する食餌性肥満と、消費エネルギーが減少することに起因する遺伝性肥満では、ケトン体と AACS を介したその代謝経路は逆の影響を受けていることが明らかになった。このことから、AACS を介したケトン



**Fig. 4 Expression of AACS, in subcutaneous and mesenteric WAT of HFD-induced obese rats.** Male SD rats were given the normal diet or the HFD for 3-weeks. s, and subjected to northern analysis. ND and HF indicate normal diet fed rats and HFD fed rats respectively. Each bar represents the means ± SEM (n=3). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 compared with the lean littermates.



**Fig. 5 Expression of AACS in subcutaneous and mesenteric WAT of Zucker fatty rats.** Total RNAs were prepared from subcutaneous (A) and mesenteric (B) WAT of male Zucker fatty rats, and subjected to northern analysis. Fa/fa and lean indicate Zucker fatty rats and their lean littermates, respectively. Each bar represents the means ± SEM (n=3). \* P < 0.05 and \*\* P < 0.01 compared with the lean littermates.

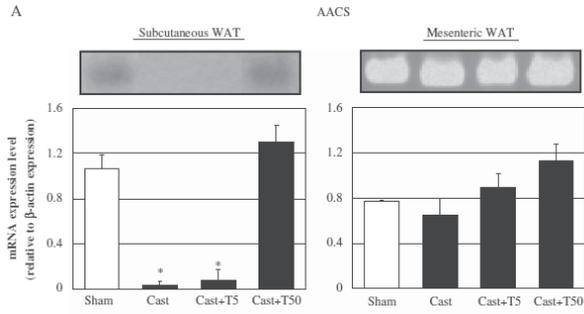
**Table 1 Body weight and blood parameters of two types of obese rats**

	Diet-induced obese rat		Zucker rat	
	Normal diet	High-fat diet	Lean (+/+)	Fatty (fa/fa)
Body weight (g)	597.6 ± 39	631.9 ± 27	211.8 ± 8.6	278.1 ± 13*
Plasma glucose (mg/dl)	132.5 ± 3.7	154.7 ± 13*	140.3 ± 19	152.5 ± 23
Plasma total ketone body (µmol/l)	217.8 ± 30	1308 ± 410***	365.1 ± 50	176.5 ± 67**

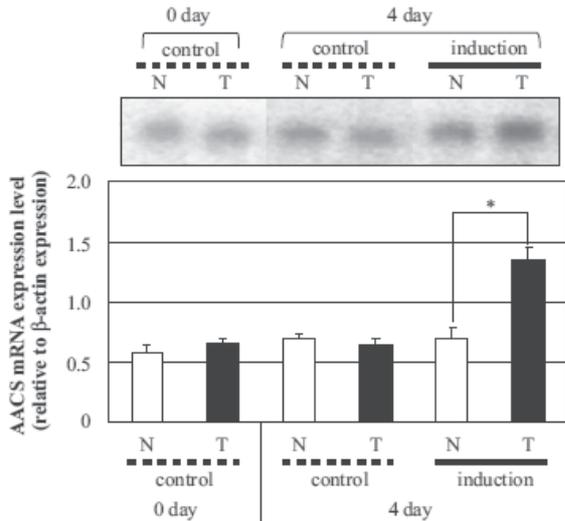
\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, and \*\*\* P < 0.001 compared with the normal diet or lean littermates.

体の利用経路は、肥満によって強く影響を受けるだけでなく、肥満を引き起こす原因そのものにも関与している可能性が考えられた。

更に、本酵素の脂肪組織における性特異性は、性成熟前の精巣除去によって消失し、男性ホルモンであるテストステロン (50mg/kg) の尾静注によって回復した (Fig.6)<sup>17)</sup>。また、マウス培養脂肪細胞である ST-13 細胞を用いて検討したところ、前駆脂肪細胞には影響がなく、分化誘導を行った細胞でのみテストステロンによる発現誘導が認められた (Fig.7)<sup>17)</sup>。更に、実際の成体ラットの脂肪組織から得た脂肪細胞を細胞の直径ごとに分画し AACS の発現を見たところ、雄から得た細胞径が 200µm を超える肥大化した脂肪細胞で特に強い発現が認められた (Fig.8)<sup>17)</sup>。これらの結果から、AACS は皮下脂肪組織の成熟脂肪細胞において男性ホルモンによ

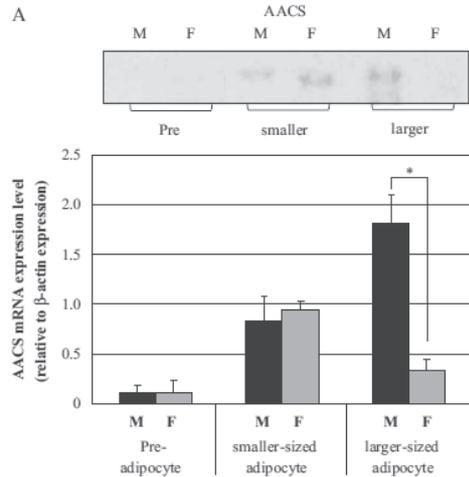


**Fig. 6 Effect of castration on expression of AACS in adipose tissues.** Total RNA was prepared from subcutaneous WAT of sham-operated (Sham), castrated (Cast), and 5mg/kg testosterone-injected (Cast+T5) or 50mg/kg testosterone-injected (Cast+T50) rats and subjected to Northern analysis using <sup>32</sup>P-labeled rat AACS cDNA probes. Total RNA (4 μg) prepared from mesenteric WAT was used for RT-PCR analysis of AACS. Data were normalized to the amount of β-actin mRNA in each sample. Each bar represents the means ± SEM (n = 3). \* Represents the significance of difference between sham group and other groups (P<0.05).



**Fig. 7 Effect of testosterone on AACS gene expression in ST-13 adipocytes.** MIX-induced (induction) and non-induced (control) ST-13 cells were treated with 100 nM testosterone (T) or vehicle (N). After 0 or 4 days, total RNA (10 μg) was isolated from the cells, and subjected to Northern analysis using a <sup>32</sup>P-labeled mouse AACS probe. Data were normalized to the amount of β-actin mRNA in each sample. Each bar represents the means ± SEM (n = 3). \* Represents the significance of difference between non-induced group and induced group (P<0.05).

て遺伝子発現が制御されている酵素であることが示唆された。従って、高脂肪食による肥満時には男性ホルモンが皮下脂肪組織でケトン体から脂肪が合成される経路を活性化している可能性が考えられた。また、高脂肪食による AACS の 発現誘導は負荷 3 週目から確認されたことから、この経路の活性化が肥満の早期から見られることが明らかになった。以上の結果から、本酵素並びに男性ホルモンが肥満の増悪に関与する可能性と、早期肥満マーカーとして用いることができる可能性が示唆され



**Fig. 8 Differential localization of AACS mRNA in subcutaneous WAT.**

Adipocytes isolated from male(M) and female (F) subcutaneous WATs were separated into three fractions: preadipocytes(left), smaller-sized adipocytes (middle), and larger-sized adipocytes (right). Total RNA (10 μg) was isolated from the cells, and subjected to Northern analysis using <sup>32</sup>P-labeled rat AACS probes. Data were normalized to the amount of β-actin mRNA in each sample. Each bar represents the means ± SEM (n= 6). \* Represents the significance of difference between male group and female group (P<0.05).

る。

#### 4. 脳のケトン体代謝に及ぼす肥満の影響

様々な組織でケトン体が積極的に利用されることが知られるようになりつつあるが、特に脳ではケトン体は重要な栄養素となりうる。脳血管には血液脳関門が存在するため血中の栄養素はグルコースの利用しか出来ないとされてきたが、水溶性低分子化合物であるケトン体も血液脳関門を通過するため脳内で利用出来るからである。また、脳は血液脳関門を通過しない脂質を血中から取り込めないが、脳組織には脂質が豊富に存在する。これらの脂質は他の栄養素を基質として脳内で *de novo* 合成されたものである。Fig.1 に示した代謝図から分かるように、グルコースをアセチル CoA として生体内物質の合成に利用するためには解糖系を含む多くの代謝を受ける必要がある。一方、ケトン体の場合は AACS による活性化を受けるだけでコレステロール合成へ利用でき、ケトチオラーゼを介するだけでアセチル CoA へと変換できるため脂肪酸合成系にも利用できる。このようにケトン体は、合成に利用できる基質へ変換されるまでに介在する経路と制御に関わる要因が少なくすみ、代謝エネルギー的にもグルコースに比べて有利な点があると考えられる<sup>18)</sup>。すなわち、脳内ではケトン体の基質利用に関与する AACS の挙動が重要である可能性が高い。実際、糖類を全く含まないケトン食が難治性小児てんかんに対する食事療法に 1900 年初頭より用いられているこ

と<sup>19)</sup> やアセト酢酸が脳で虚血時に引き起こされるポリグルタミン凝集による神経細胞障害の保護をする<sup>20)</sup> などの報告があることから、ケトン体の神経保護作用も注目されている。

そこで、本酵素の脳内における AACS 遺伝子の発現分布を検討したところ、大脳皮質や海馬、中脳や橋を中心に広く発現が認められた (Fig.9)<sup>21)</sup>。この局在の傾向は、従来からケトン体利用酵素として知られる SCOT とは異なっており、むしろコレステロール合成の律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) と類似していた。

また、ストレプトゾトシン投与による 1 型糖尿病モデルラットの脳内では、SCOT の遺伝子発現は維持されているが、AACS の発現は大きく減少していた (Fig.10)<sup>21)</sup>。一方で末梢組織である脂肪組織では大きな発現変動は両酵素とも認められなかった。従って、糖尿病時にはケトン体の合成基質としての利用が脳神経系で大きく障害されている可能性が考えられた。これらの結果から、ケトン体が脳内で部位ごとに異なる目的で利用されている可能性が考えられた。

更に、特に AACS と SCOT との間で遺伝子発現が大きく異なっていた視床及び視床下部を中心に局在性を検討したところ、SCOT と異なり AACS が第三脳室周辺部に強く発現していることが明らかとなった (Fig.11)<sup>22)</sup>。第三脳室内に満たされている脳脊髄液にはケトン体や遊離脂肪酸を含め様々な末梢からの液性因子が移行するとともに、脳内で合成された生理活性物質も放出されている<sup>23, 24)</sup>。従って、本酵素が第三脳室周辺部に強く発現することは、肥満時に末梢由来のケトン体や脂肪酸と中枢由来の伝達物質が脳脊髄液を介してやり取りされている可能性を検討する上で非常に興味深い。そこで次に肥満による影響を検討した。まず、高脂肪食による食餌性肥満による影響を検討したが、AACS の遺伝子発現に目立った変化は認められなかった。一方、遺伝性肥満モデルである Zucker fatty rat では大脳皮質や海馬では影響を受けていなかったが、視床下部の弓状核 (arcuate hypothalamic nucleus: Arc) 及び腹内側核 (ventromedial hypothalamic nucleus: VMH) では AACS の発現が有意に抑制されていた (Fig.12)<sup>22)</sup>。これは SCOT や他の脂質代謝酵素では認められない AACS 特異的な現象であった。またこれと同じ AACS の Arc と VMH での発現抑制は、Zucker fatty rat 同様にレプチン受容体に異常のある *db/db* mouse 及びリガンドであるレプチンに異常がある *ob/ob* mouse においても認められた<sup>25)</sup>。更に、マウス胎児由来脳初代培養細胞および視床下部由来神経細胞培養株である N41 細胞<sup>26)</sup> において、レプチンタンパク質が濃度及び時間依存的に AACS の遺伝子発現を誘導すること (Fig.13)、

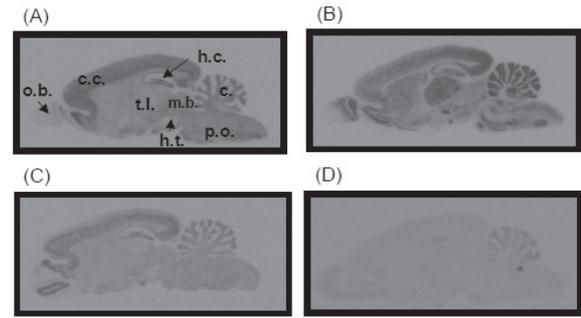


Fig.9 Localization of AACS, SCOT, HMGCR and ACC1 mRNAs in sagittal sections of the rat brain.

Sagittal sections were examined by in situ hybridization using a <sup>35</sup>S-labeled AACS antisense (A), <sup>35</sup>S-labeled SCOT (B), <sup>35</sup>S-labeled HMGCR (C) or <sup>35</sup>S-labeled ACC1 (D) as the probe. c.c, cerebral cortex; h.c, hippocampus; o.b, olfactory bulb; c, cerebellum; t.l, thalamus; h.t, hypothalamus; p.o, pons/medulla oblongata; m.b, midbrain. Scale bar = 5.0 mm

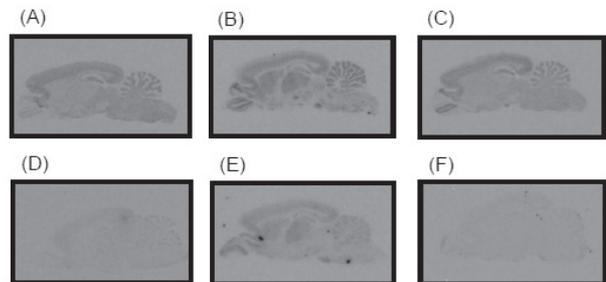


Fig.10 Expression of AACS mRNA in the brain of normal and streptozotocin-induced diabetic rat.

A, B and C are sagittal sections of the PBS-treated rat brain. D, E and F are sagittal sections of the brain of rat to which diabetes was induced by an intravenous injection of 90 mg streptozotocin/kg body weight. These sections were examined by in situ hybridization with a <sup>35</sup>S-labeled AACS antisense (A and D), <sup>35</sup>S-labeled SCOT antisense (B and E) or <sup>35</sup>S-labeled HMGCR antisense (C and F) probe. Scale bar = 5.0 mm

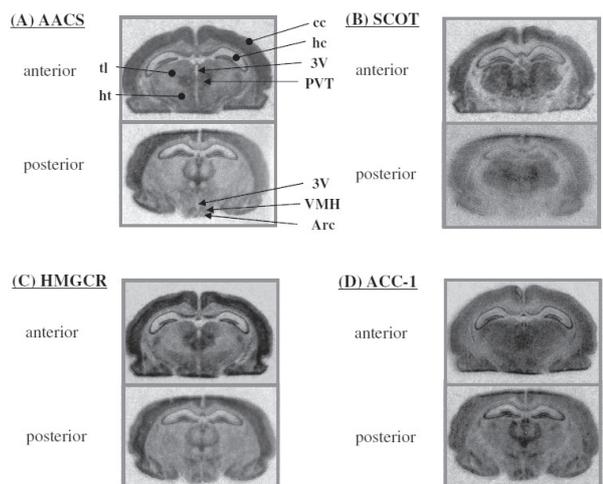
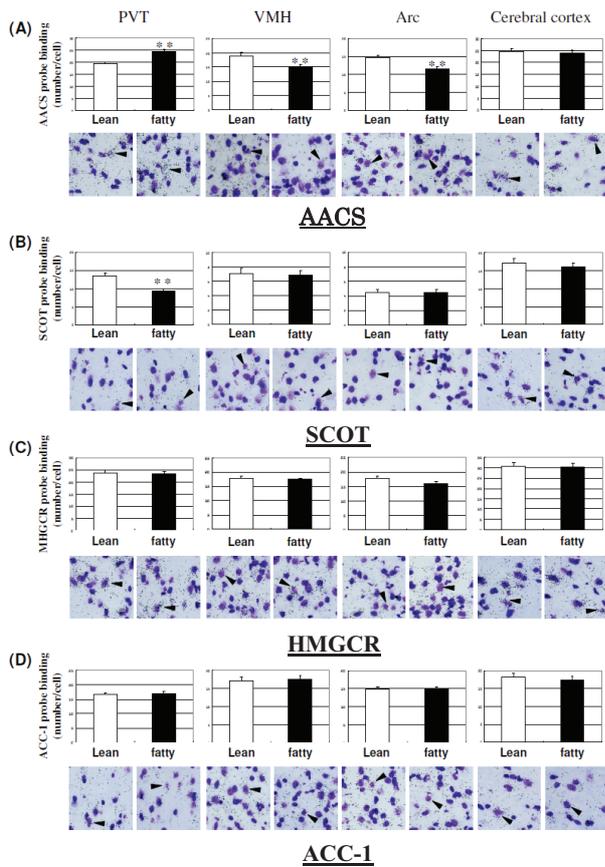


Fig. 11 Expression profiles of AACS and other enzyme mRNAs in coronal sections of Zucker lean rat brain.

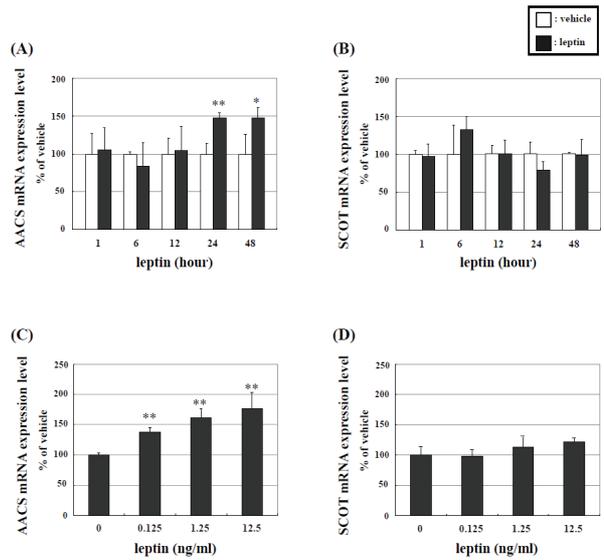
Coronal brain sections of male Zucker lean rats (8 weeks old) were examined by in situ hybridization

cc: cerebral cortex; hc: hippocampus; tl: thalamus; ht: hypothalamus; PVT: paraventricular thalamic nucleus, posterior part; 3V: third ventricle; VMH: ventromedial hypothalamic nucleus; Arc: arcuate hypothalamic nucleus.



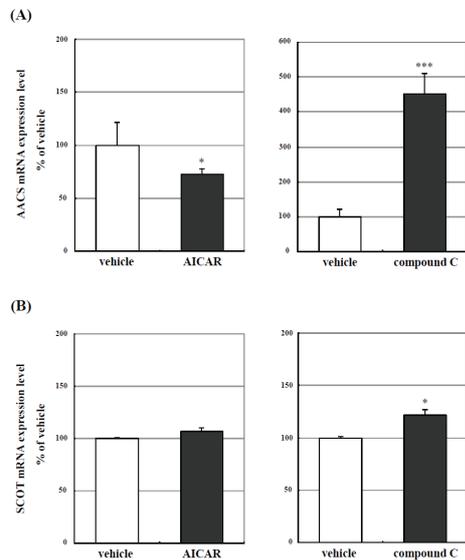
**Fig. 12** AACS and other enzymes mRNA levels in the cerebral cortex, thalamus and hypothalamus of genetically obese Zucker rats. Quantitative analysis of the radioreactivity of AACS (A), SCOT (B), HMGR (C) and ACC-1 (D) cRNA probes is shown in upper panels. The data are expressed as silver grain-numbers per cell. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. Lower panels show microscopic views of the PVT, the VMH, the Arc and the cerebral cortex of Zucker fatty (right) and lean (left) rats. Filled arrows indicate neural-like cells. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.  $^{**}p < 0.001$  compared with lean littermates.

レプチンシグナル伝達に関わる Signal Transducers and Activator of Transcription-3 (STAT-3) の影響は認められない一方で 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化剤 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) では AACS 遺伝子の発現が減少し、逆に AMPK 阻害薬である compound C によって発現が上昇することも明らかになった (Fig.14)<sup>27)</sup>。これらのことから、視床下部の神経細胞では AACS は AMPK シグナル伝達経路を介してレプチンによって遺伝子発現が維持されている可能性が考えられた。Arc と VMH は特にレプチン受容体が高発現しており、食欲を制御する高次機能中枢であると考えられている<sup>27)</sup>。神経伝達物質であるニューロステロイドの dehydroepiandrosterone (DHEA) は食欲調節に関与するという報告がある<sup>28)</sup> が、これはコレステロールから合成される。また、コレステロール合成阻害薬であるスタチン系薬剤は、血中コレステロール低下作用とは別



**Fig. 13** Effect of leptin treatment on AACS and SCOT mRNA expression levels in rat primary embryonic brain cells

A and B: Rat primary embryonic brain cells were cultured for 3 days and treated with 12.5 ng/ml leptin protein. After 1, 6, 12, 24 or 48 hr, total RNAs were isolated and subjected to RT-PCR analysis for AACS (A) and SCOT (B). Each bar represents the mean  $\pm$  SD (n = 6).  $^{*}p < 0.05$ ;  $^{**}p < 0.01$  compared with vehicle. C and D: Rat primary embryonic brain cells were treated with leptin protein (0.125, 1.25, 12.5 ng/ml). After 24 hours total RNAs were isolated and subjected to Northern blot analysis for AACS (C) and SCOT (D). Each bar represents the mean  $\pm$  SD (n = 6).  $^{**}p < 0.01$  compared with 0 ng/ml leptin.



**Fig. 14** Effect of AMPK activator and inhibitor on AACS and SCOT mRNA expression levels in hypothalamic cell line (N41 cell)

Mouse N41 cells were cultured for 3 days and treated 1 mM AICAR (left panels) or 10  $\mu$ M compound C (right panels). After 24 hours, total RNAs were isolated and subjected to Northern blot analysis for AACS (A) and SCOT (B). Each bar represents the mean  $\pm$  SD (n = 4).  $^{*}p < 0.05$ ;  $^{***}p < 0.001$  compared with vehicle.

に、Ras や Rho などの低分子量 G タンパク質のイソプレニル化に関与することで細胞内情報伝達を変動させるという報告がある<sup>29)</sup>。ケトン体は、これらコレステロー

ル合成経路において代謝的に有利な基質となりうることから、ケトン体の基質利用に関わる AACCS が食欲中枢に特異的に発現し、その発現維持に食欲調節ホルモンであるレプチンが関与するという筆者らが得た知見は、ケトン体が中枢で食欲調節へ関与するという新たな生理的意義を持つ可能性を提示するものである。従って、食欲調節、あるいはその調節機能異常の検出に AACCS とケトン体代謝が応用できる可能性があるのではないかと考えられた。

## 5. おわりに

肥満の持つ危険性は以前から疫学的に指摘されてきたが、近年特に脚光をあびるようになったひとつの契機にレプチンの発見を挙げることができる<sup>30)</sup>。脂肪組織から分泌され中枢神経に働くレプチンは、それまで脂肪を貯める単なる袋として捉えられがちだった脂肪組織を、巨大な内分泌組織として認識させる大きなきっかけとなった。その後、動脈硬化に関わる tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) などが肥大化した脂肪細胞から分泌されることや、インターロイキン-6 などのサイトカインの分泌を通してマクロファージを集積させ炎症状態になること

が糖尿病や生活習慣病の発症の引き金になることなどが次々に明らかになってきた<sup>31, 32)</sup>。筆者らの研究から、AACCS もレプチン同様脂肪組織と脳中枢の双方において肥満と密接な関係にあることが明らかになった。さらに、脂肪組織においてはレプチンにはない遺伝子発現量の性特異性が存在すること、雄において肥満の早期に影響をうけることなどを合わせて考えると、AACCS が男女の肥満の傾向の違いや生活習慣病発症率の違いなどに関わる因子である可能性も考えられる。筆者らは今後末梢と中枢において AACCS のもつ生理的意義の解明を目指すとともに、ケトン体が肥満診断や予防に応用できる可能性を追っていきたい。

## 謝 辞

本研究に対し、平成22年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜りましたことを、大谷卓男理事長ならびに中嶋暉躬学長に深く感謝申し上げます。また、本研究の機会を与えていただいた星薬科大学衛生化学教室の福井哲也教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行する上でご助力いただいた衛生化学教室の皆様へ感謝申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) J.D. McGarry, and D.W. Foster, Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production, *Annu. Rev. Biochem.*, **49**: 395-420 (1980)
- 2) E.A. Newsholme, and S.Start, "Regulation of Metabolism" John Wiley & Sons, London, 320-344 (1973)
- 3) G.A. Mitchell, S. Kassovska-Bratinova, Y. Boukaftane, M-F. Robert, S.P. Wang, L. Ashmarina, M. Lambert, P. Lapiere, and E. Potier, Medical aspects of ketone body metabolism, *Clin. Invest. Med.*, **18**: 193-216 (1995)
- 4) R.W. Chen, D.D. Chapman, and I.L. Chaikoff, Acetoacetate conversion to fatty acids in liver: the role of insulin and the nutritional state of the animal, *J. Biol. Chem.*, **205**: 383-393 (1953)
- 5) M. Blecher, and S. Gurin, The conversion of radioactive acetoacetate to cholesterol by surviving rat liver slices, *J. Biol. Chem.*, **209**: 953-962 (1954)
- 6) J.R. Stern, and S. Ochoa, Enzymatic synthesis of citric acid. I. Synthesis with soluble enzymes, *J. Biol. Chem.*, **191**: 161-172 (1951)
- 7) G. Endemann, P.G. Goetz, J. Edmond, and H. Brunengraber, Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate., *J. Biol. Chem.*, **257**: 3434-3440 (1982)
- 8) T.Fukui, M.Ito, and K.Tomita, Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from *Zoogloearamigera* I-16-M., *Eur. J. Biochem.*, **127**: 423-428 (1982)
- 9) M.Ito, T.Fukui, M.Kamokari, T.Saito, and K.Tomita, Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **794**: 183-193 (1984)
- 10) M. Ohgami, N. Takahashi, M. Yamasaki, and T. Fukui, Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain, *Biochem. Pharmacol.*, **65**: 989-994 (2003)
- 11) Y.Y. Yeh, J.R. Ginsburg, and T.B. Tso, Changes in lipogenic capacity and activities of ketolytic and lipogenic enzymes in brain regions of developing rats, *J. Neurochem.*, **40**: 99-105 (1983)
- 12) J.D. Bergstrom, and J. Edmond, A radiochemical assay for acetoacetyl-CoA synthetase, *Anal. Biochem.*, **149**: 358-364 (1985)
- 13) D.H. Williamson, and V. Ilic, Activities of enzymes of acetoacetate metabolism in rat brown adipose tissue during development, *Biochem. J.*, **231**: 773-775 (1985)
- 14) M. Yamasaki, S. Hasegawa, H. Suzuki, K. Hidai, Y. Saitoh, and T. Fukui: Acetoacetyl-CoA synthetase gene is abundant in rat adipose, and related with fatty acid synthesis in mature adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **335**: 215-219 (2005)

- 15) M.Yamasaki, S.Hasegawa, T.Kitani, K.Hidai, and T.Fukui, Differential effects of obesity on acetoacetyl-CoA synthetase gene in rat adipose tissues, *European J. Lipid Sci.and Tech.*, **109**: 617-622 (2007)
- 16) M.I. Malewiak, S. Griglio, and X. Le Liepvre, Relationship between lipogenesis, ketogenesis, and malonyl-CoA content in isolated hepatocytes from the obese Zucker rat adapted to a high-fat diet, *Metabolism*, **34**: 604-611 (1985)
- 17) M.Yamasaki, S.Hasegawa, H.Yamanaka, R.Narishima, and T.Fukui, Ketone Body Utilization is Regulated by Male-specific Factors in Rat Subcutaneous Adipocytes, *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*, **117**:170-174 (2009)
- 18) M.S. Patel, and O.E. Owen, Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. Evidence for conversion of acetoacetate into acetyl-coenzyme A in the cytosol, *Biochem. J.*, **156**: 603-607 (1976)
- 19) M. Gasior, M. A. Rogawski, and A. L. Hartman, Neuro- protective and disease-modifying effects of the ketogenic diet, *Behav. Pharmacol.*, **17**: 431-439 (2006)
- 20) L. Massieu, P. Del, Río, and T. Montiel, Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates, *Neuroscience*, **106**: 669-677 (2001)
- 21) M. Ohnuki, N. Takahashi, M. Yamasaki, and T. Fukui, Different localization in rat brain of the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, as compared to succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1729**: 147-153 (2005)
- 22) R. Narishima, M. Yamasaki, S. Hasegawa, and T. Fukui, Genetic obesity affects neural ketone body utilization in the rat brain, *Obesity*, **17**: 611-615 (2009)
- 23) D. Greitz, and J. Hannerz, A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography, *Am. J. Neuroradiol.*, **17** : 431-438 (1996)
- 24) K.J. Lamers, W.H. Doesburg, F.J. Gabreëls, A.C. Romsom, W.A.Lemmens, R.A. Wevers, and W.O. Renier, CSF concentration and CSF/blood ratio of fuel related components in children after prolonged fasting, *Clin. Chim. Acta.*, **167**: 135-145 (1987)
- 25) R.Narishima, M.Yamasaki, S.Hasegawa, S.Yoshida, S.Tanaka, and T.Fukui,Leptin controls ketone body utilization in hypothalamic neuron, *Neurosci Lett.*, **490**:185-190 (2011)
- 26) D.D. Belsham, F. Cai, H. Cui, S.R. Smukler, A.M. Salapatek, and L. Shkreta, Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders, *Endocrinology*, **145**: 393-400 (2004)
- 27) J.G. Mercera, N. Hoggardb, L.M. Williamsa, C.B. Lawrencea, L.T. Hannaha, and P. Trayhurn, Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization, *FEBS Let.*, **387**: 113-116 (1996)
- 28) F. Catalina, S. G. Speciale, V. Kumar, L. Milewich, and M. Bennett, Food restriction-like effects of dietary dehydroepiandrosterone. Hypothalamic neurotransmitters and metabolites in male C57BL/6 and (C57BL/6 × DBA/2) F1 mice, *Exp. Biol. Med.*, **226**: 208-215 (2001)
- 29) W.W. Wong, J. Dimitroulakos, M.D. Minden, and L.Z. Penn, HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis, *Leukemia*, **16**: 508-519, (2002)
- 30) Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, **372**: 425-432 (1994)
- 31) G.S. Hotamisligil, N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, **259**: 87-91 (1993)
- 32) I. Shimomura, T. Funahashi, M. Takahashi, K. Maeda, K. Kotani, T. Nakamura, S. Yamashita, M. Miura, Y. Fukuda, K. Takemura, K. Tokunaga, and Y. Matsuzawa, Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity, *Nat. Med.*, **2**: 800-803 (1996)

Ketone body utilization by cytosolic acetoacetyl-CoA synthetase is novel target of  
obesity-induced disorders of lipid metabolism

Masahiro YAMASAKI

*Department of Health Chemistry, Hoshi University*

Ketone body, such as acetoacetate, has been regarded as important energy source. Recent studies, however, have revealed that acetoacetate is utilized for the biosynthesis of important substances, such as cholesterol and fatty acids, by the novel cytosolic ketone body utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase (AACS). Previously, we showed that AACS mRNA was highly expressed in the male subcutaneous white adipose tissue (WAT), especially in large adipocytes. Moreover, AACS mRNA expression was up-regulated with enlargement of the subcutaneous WAT in high fat diet (HFD)-induced obesity, and such up-regulation was observed only in male rats. In castration rats, the HFD-induced upregulation of AACS gene was not observed in castrated group. In brain, AACS gene was specifically decreased in hypothalamus of genetic obese rodents. On the contrary, SCOT gene expression was not affected. Our results suggest that AACS and ketone body-utilization pathway is a novel important target of obesity-related metabolic disorders.