

<令和2年度助成>

加齢に伴うタンパク質摂取量の低下におけるグルカゴンの役割

松居 翔

(京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学 栄養化学分野)

背景

日本の高齢者は、70歳以上で急激にタンパク質の摂取量が低下することが報告されている（平成25年国民健康・栄養調査）。高齢者のタンパク質摂取量の減少は、骨格筋量を減少させ、特に、極度に低下する現象をサルコペニアと称し、高齢者のふらつき、転倒・骨折、虚弱状態との関連で、近年重要視されている。サルコペニアの対策は、骨格筋の形成・維持に必要なタンパク質を十分に摂取することである。そこで、タンパク質を積極的に摂取する機構を活性化することが（タンパク質嗜好性の向上）、加齢性のサルコペニアに対する有効な予防・治療につながることを予想される。

主に膵臓 α 細胞で合成・分泌されるグルカゴンは、血糖低下時に分泌が亢進し血糖値を上昇させるホルモンとして知られており、インスリンの拮抗ホルモンとして位置づけられていたが、近年、グルカゴンの主要かつ特異的な生理作用は、血糖値増加作用ではなくアミノ酸代謝の恒常性維持であることが提唱されている。このことから、グルカゴンはアミノ酸の恒常性を維持するために、タンパク質嗜好性の制御にも関わることが予想される。また、血中グルカゴン量は、老齢ラットで増加することが報告されており、一方で、高齢者はタンパク質の摂取量が低下することが知られている。これらのことから、高齢者の血中グルカゴン量の増加がタンパク質嗜好性の低下を誘導していることが考えられる。

そこで本研究では、「加齢により増加する血中グルカゴンは、タンパク質嗜好性を低下させる」という仮説を検証する。この研究から、高齢者で認めら

れるタンパク質嗜好性低下の分子基盤を明らかにし、加齢性のサルコペニアに対する食事（栄養）療法をサポートする新規創薬の開発を目指す。

方法

1. 飼育環境

実験室の室温および試験液の温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持し、6:00～18:00の昼夜サイクルにした。

2. C57BL/6 マウスの食餌選択試験

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

3. C57BL/6 マウスの二瓶選択試験

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

れる必須アミノ酸および非必須アミノ酸溶液の二瓶選択試験を行った。

4. 神経特異的 Gcgr ノックアウトマウスの解析

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

5. C57BL/6 マウスの食餌選択試験とアルギニン負荷試験

実験動物は雄の C57BL/6 マウスを 12 週齢から 60 週齢まで NC を与えて飼育を行った。また、12 週齢、60 週齢の時点で、NC vs. HPD の食餌選択試

験とアルギニン負荷試験を行った。

結果

1. グルカゴンはタンパク質嗜好性を抑制する (図 1)

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

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

C57BL/6 マウスに 1 mg/kg グルカゴンを暗期直前 (18:00) に投与すると、タンパク質嗜好性抑制効果は翌朝 (8:00) に認められ、1 mg/kg のグルカゴンを明期の 8:00 に投与すると、タンパク質嗜好

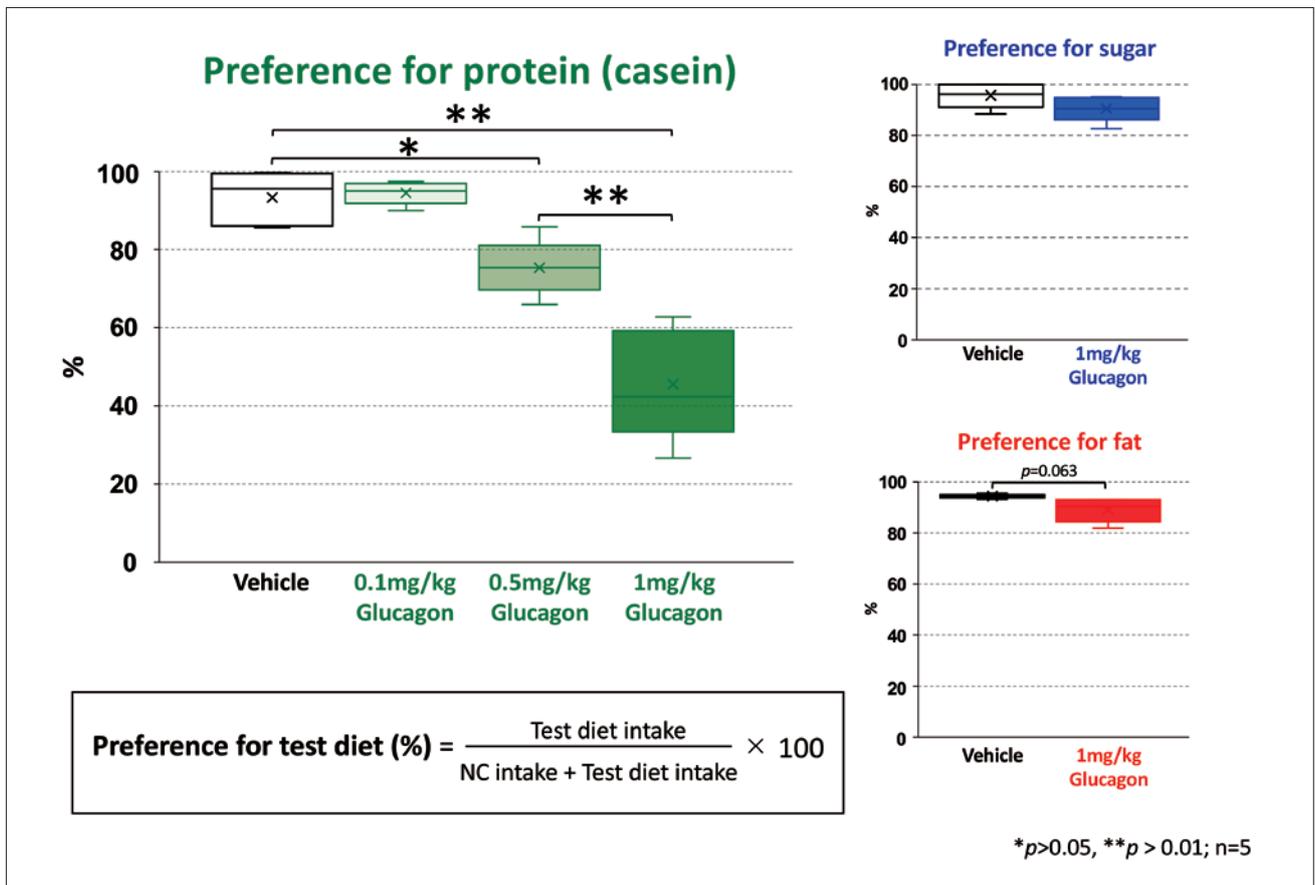


図 1 グルカゴンはタンパク質嗜好性を特異的に抑制する
 左：NC vs. HPD、中央：NC vs. HSD、右：NC vs. HFD；N = 5；HPD は Tukey's test、HSD と HFD は Welch's t-test's t-test、*p < 0.05, **p < 0.01.

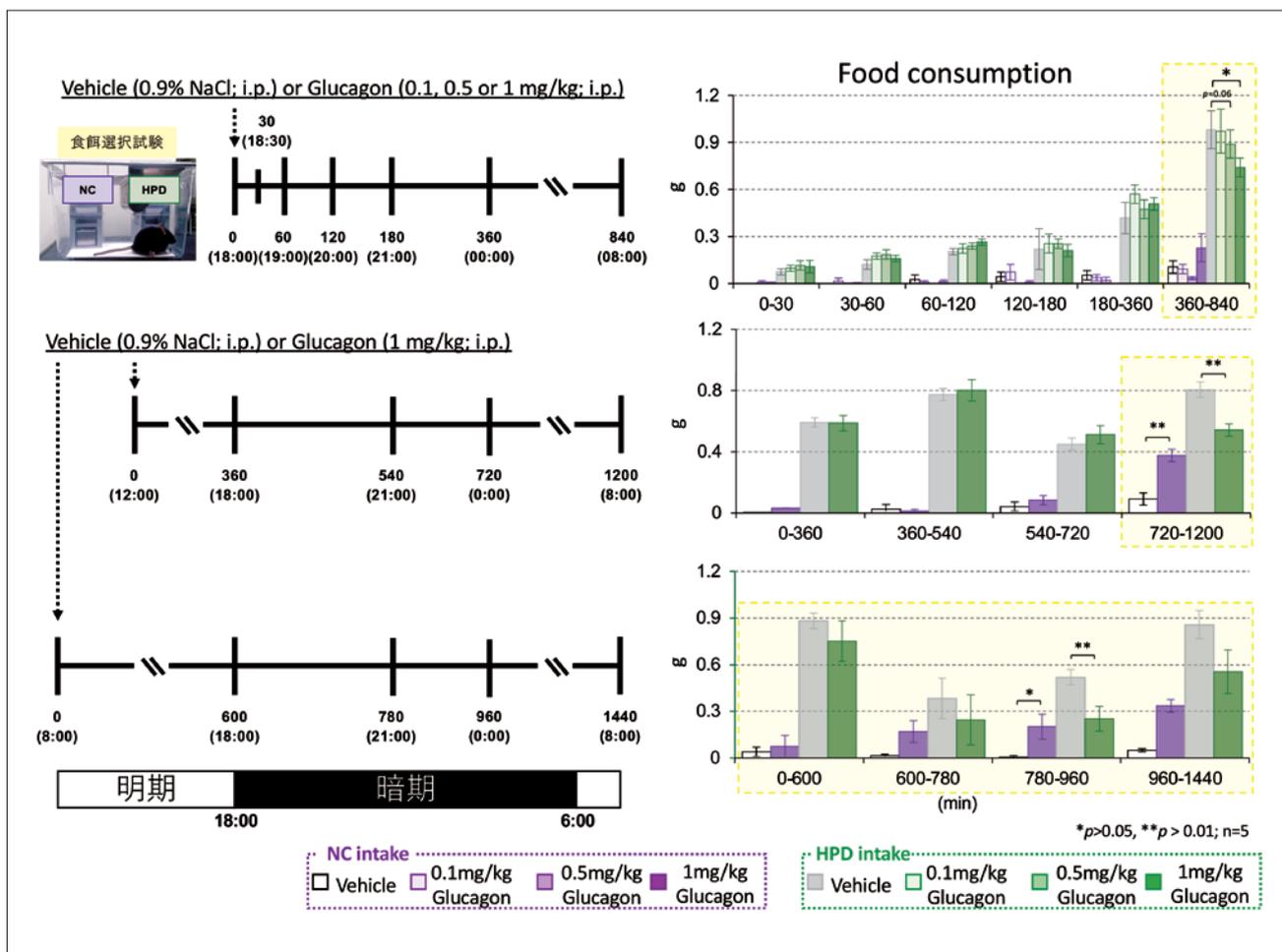


図2 グルカゴン投与後10時間でタンパク質摂取の抑制効果が認められる
 上段：暗期（18：00）にグルカゴンをip投与、下段：明期（8：00）にグルカゴンをip投与、N = 4, Tukey's test, *p < 0.05, **p < 0.01.

性抑制効果は暗期 18：00 に認められた。この結果から、グルカゴンによるタンパク質嗜好性抑制効果は、10時間の時間を要することが明らかになった。

3. グルカゴンは非必須アミノ酸嗜好性を抑制する（図3）

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

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

NG-KO マウスに 1 mg/kg のグルカゴンを投与すると、タンパク質に対する嗜好性が抑制されなかつ

た。そのため、グルカゴンは脳に直接作用することでタンパク質の嗜好性を制御していることが明らかになった。

5. 加齢によりタンパク質嗜好性は減少する（図5）

60 週齢の C57BL/6 マウスのタンパク質嗜好性は、12 週齢の C57BL/6 マウスの嗜好性よりも有意に低かった。そのため、加齢によりタンパク質嗜好性が低下することが明らかになった。

6. 加齢によりアミノ酸応答性グルカゴン分泌が亢進する（図6）

アルギニンの負荷を行った結果、加齢とともにアミノ酸応答性のグルカゴン分泌が増加することが明らかになった。

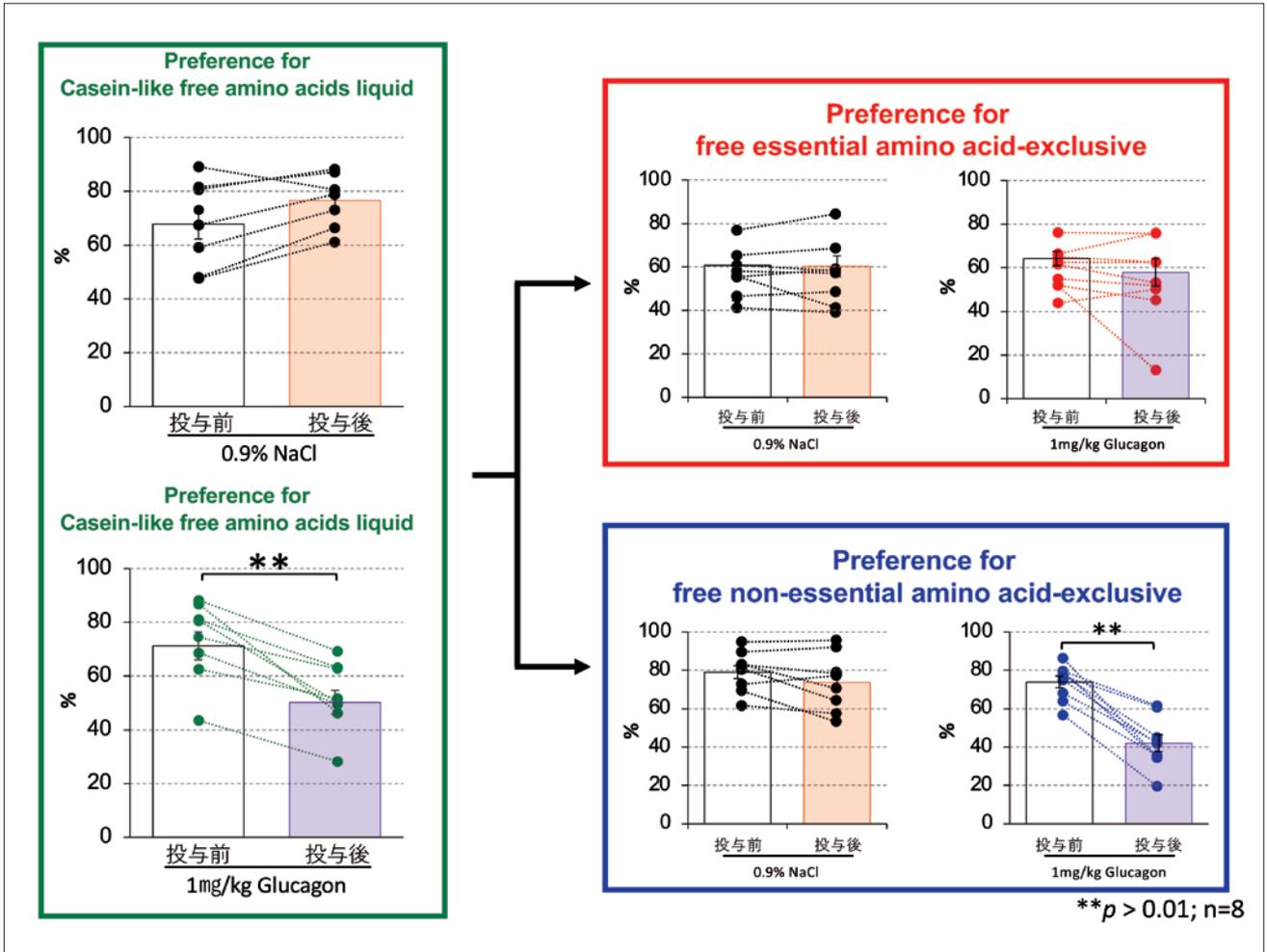


図3 グルカゴンは非必須アミノ酸特異的に嗜好性を抑制する
 左：水 vs. 必須アミノ酸、右：水 vs. 非必須アミノ酸、N = 8, Paired t-test, ** $p < 0.01$.

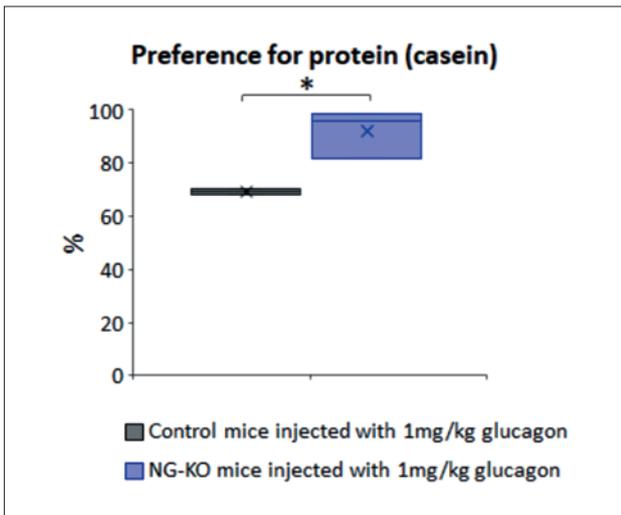


図4 NG-KO マウスでは、グルカゴン投与によるタンパク質嗜好性抑制効果が認められない
 NC vs. HPD の食事選択試験の結果、N = 3, Welch's t-test, * $p < 0.05$.

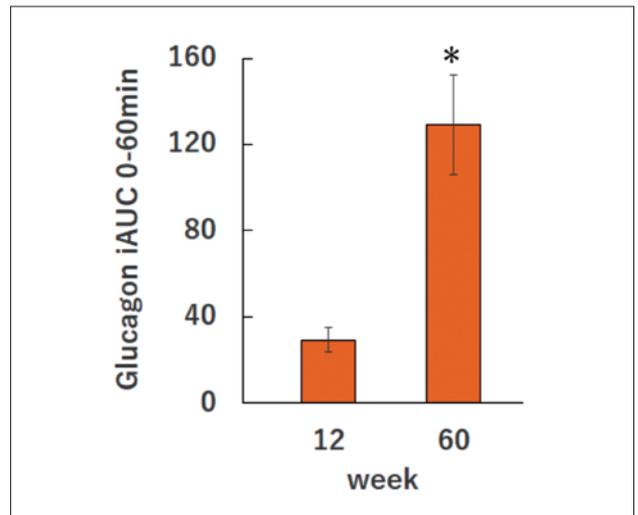


図5 C57BL/6 マウスでは、加齢とともにタンパク質に対する嗜好性が抑制された
 NC vs. HPD の食事選択試験の結果、N = 8, Welch's t-test, * $p < 0.05$.

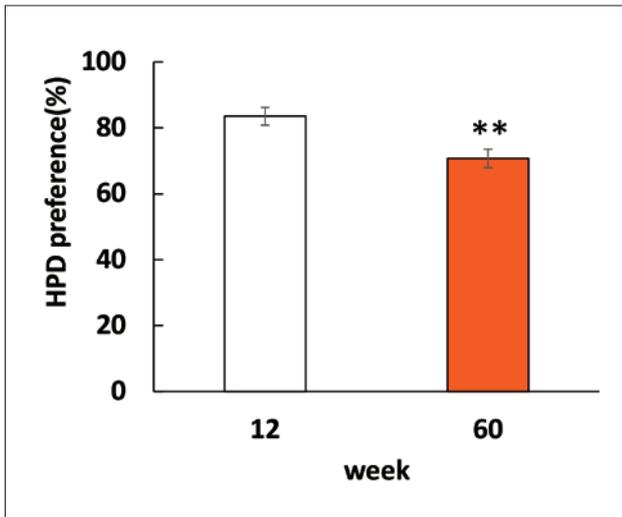


図6 C57BL/6 マウスでは、加齢とともにアルギニン誘導性のグルカゴンの分泌が増加したアルギニン負荷試験の結果、N = 8, Tukey's t-test, *p < 0.05.

考 察

加齢によりタンパク質に対する食欲は低下するが、その原因としてアミノ酸誘導性のグルカゴン分泌増加の関与を予想している。本研究では、グルカゴンが非必須アミノ酸に対する欲求を制御していることを明らかにしたが、その制御メカニズムは未解明である。今後、Gcgr を発現する各臓器特異的な Gcgr ノックアウトマウスの解析を行うことで、その制御メカニズムが解明されることを期待している。また、加齢によりタンパク質嗜好性は減少し、アミノ酸誘導性のグルカゴン分泌は増加することを明らかにした。そこで次に、各臓器特異的な Gcgr ノックアウトマウスの加齢モデルを作製し、食行動の解析を行うことを予定している。その結果から、加齢により低下するタンパク質嗜好性制御メカニズムの一端の解明につながることを期待している。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

Role of glucagon in suppressing protein intake associated with aging

Sho MATSUI

*Laboratory of Nutrition Chemistry, Division of Food Science and Biotechnology,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University*

Background: It has been reported that the protein intake of the elderly in Japan declines rapidly after the age of 70 years. In addition, it has been suggested that the major and specific physiological action of glucagon, which is primarily synthesized and secreted by pancreatic alpha cells, is the maintenance of homeostasis of amino acid metabolism. In this study, we tested the hypothesis that blood glucagon, which increases with age, decreases preference for protein.

Methods: C57BL/6 mice were administered an intraperitoneal injection of glucagon, and a diet choice test of normal diet vs. high protein diet was conducted. Next, C57BL/6 mice were administered an intraperitoneal injection of glucagon to verify changes in the diet choice test (NC vs. HPD) over time. In addition, C57BL/6 mice were administered an intraperitoneal injection of glucagon, and a two-bottle choice test (water vs. amino acid solution) was performed. Neuron-specific glucagon receptor (Gcgr) knockout (NG-KO) was used to perform the diet choice test (NC vs. HPD). In addition, the diet choice test (NC vs. HPD) and an arginine loading test were performed using 12-week- and 60-week-old C57BL/6 mice.

Results: Glucagon administration suppressed preference for protein. Furthermore, the suppression of protein preference by glucagon was observed after 10 hours of administration. The two-bottle choice test showed that glucagon administration suppressed preference for nonessential amino acid solutions. However, glucagon administration to NG-KO mice had no inhibitory effect on protein preference. 60-week-old C57BL/6 mice showed decreased protein preference and increased amino acid-induced glucagon compared to 12-week-old C57BL/6 mice.