

平成 30 年度 学位論文

外因性ピルビン酸による培養肝細胞の
糖質・脂質代謝の調節に関する研究

Regulation of carbohydrate and lipid metabolism by exogenous pyruvate
in cultured hepatocytes

十文字学園女子大学大学院

人間生活学研究科

食物栄養学専攻

倉若 美咲樹

指導教員 志村 二三夫 (教授)

目次

目次	1
略語表記一覧	6
論文要旨	7
和文	7
英文	10
第1章 序論	16
第2章 培養細胞代謝産物の定量法の検討	19
2-1 蛍光原色素を用いた乳酸・ピルビン酸の定量法の検討	19
2-1-1 研究の背景ならびに目的	19
2-1-2 実験材料ならびに方法	20
2-1-2-1 試薬等	20
2-1-2-2 細胞培養	20
2-1-2-3 細胞実験	21
2-1-2-4 標準液サンプルの調製	21
2-1-2-5 過酸化水素濃度の測定	21
2-1-2-6 乳酸濃度の測定	21
2-1-2-7 ピルビン酸濃度の測定	22
2-1-2-8 統計解析	22
2-1-3 結果と考察	22
2-1-3-1 蛍光原基質 ADHP とペルオキシダーゼ、過酸化水素による 蛍光色素レゾルフィンの検出とリアルタイム定量 PCR シ ステム Mx3000P の利用性に関する検討	22
2-1-3-2 乳酸・ピルビン酸濃度の定量可能レンジの検討	23
2-1-3-3 細胞培養液中の乳酸・ピルビン酸濃度の経時的変化	24
2-1-4 結語	25
図表	26
2-2 培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の検討	32
2-2-1 研究の背景ならびに目的	32
2-2-2 実験材料ならびに方法	33
2-2-2-1 試薬等	33
2-2-2-2 細胞培養	33
2-2-2-3 細胞実験	33
2-2-2-4 グリコーゲンの定量	33
2-2-2-4-1 保存液等の調製	33

2-2-2-4-2	グルコアミラーゼ処理によるグリコーゲンの分解	34
2-2-2-4-3	グルコース濃度の定量	34
2-2-2-4-4	グリコーゲン標準曲線および細胞内総グリコーゲン量の算出	35
2-2-2-5	タンパク質濃度測定	35
2-2-2-6	統計解析	35
2-2-3	結果と考察	35
2-2-3-1	定量可能レンジの検討	35
2-2-3-2	グルコアミラーゼ処理時間の検討	36
2-2-3-3	種々の濃度に調製したグリコーゲン標準液の検量線の検討	36
2-2-3-4	リアルタイム定量 PCR システム Mx3000P の利用性に関する検討	37
2-2-3-5	HepG2 細胞のグリコーゲン量の消長の検討	37
2-2-3-5-1	グルコース非含有培養液で培養した際の細胞内グリコーゲン量の変化	38
2-2-3-5-2	細胞内グリコーゲン枯渇状態からの回復とインスリンの作用	38
2-2-4	結語	39
	図表	40
2-3	細胞内 ATP 測定への化学発光イメージング解析の応用	48
2-3-1	研究の背景ならびに目的	48
2-3-2	実験材料ならびに方法	49
2-3-2-1	試薬等	49
2-3-2-2	細胞培養	49
2-3-2-3	HepG2 細胞の嫌気培養	49
2-3-2-4	ATP の測定	49
2-3-2-4-1	ATP 標準液の調製	49
2-3-2-4-2	ATP の測定	50
2-3-2-4-3	ATP 標準液の測定	50
2-3-2-4-4	細胞懸濁液中の ATP の測定	50
2-3-2-4-5	接着細胞中の ATP 濃度の測定	50
2-3-2-5	タンパク質濃度の測定	50
2-3-2-6	統計処理	50
2-3-3	結果と考察	51
2-3-3-1	ATP 濃度測定レンジの確認	51

2-3-3-2	ATP 検量線の直線性の確認	51
2-3-3-3	細胞懸濁液中の細胞数と ATP 量の関係	52
2-3-3-4	培養液中のグルコースおよび大気中の酸素が細胞内 ATP 量 におよぼす影響	52
2-3-4	結語	54
	図表	55
第 3 章	生理的濃度近傍の細胞外ピルビン酸はヒト肝細胞ガン由来細胞株 HepG2 におけるグルコース利用とともにミトコンドリア生合成を促進 する	64
3-1	研究背景ならびに目的	64
3-1-1	培養細胞におけるエネルギー栄養素の代謝とくにグルコースの 利用に対する細胞外ピルビン酸の影響	65
3-1-2	ミトコンドリア生合成 (mitochondrial biogenesis) およびミトコン ドリア活性に対するピルビン酸の影響	66
3-1-3	細胞内 NAD ⁺ /NADH 比と ATP 量、mtDNA 欠損細胞の生存に対す るピルビン酸の影響	67
3-1-4	先行研究まとめと本研究の目的	67
3-2	実験材料ならびに方法	67
3-2-1	試薬等	67
3-2-2	試験物質の調製	68
3-2-3	細胞培養	68
3-2-4	細胞実験	68
3-2-5	細胞数計測	69
3-2-6	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試験	69
3-2-7	細胞内グルコース取り込み量	69
3-2-8	細胞内ピルビン酸取り込み量	70
3-2-9	細胞の乳酸生成量	70
3-2-10	取り込まれた基質 (グルコース・ピルビン酸) の乳酸への変換 率	70
3-2-11	PAS 染色	70
3-2-11-1	滅菌済みカバーガラスの調製	70
3-2-11-2	細胞サンプルの調製	71
3-2-11-3	PAS 染色	71
3-2-11-4	対比染色	71
3-2-11-5	グリセリンゼリー封入剤の調製	71

3-2-11-6	封入・観察	71
3-2-12	Oil Red O 染色	72
3-2-13	細胞内のグリコーゲン量の定量	72
3-2-13-1	サンプル回収	72
3-2-13-2	グリコーゲンの定量	72
3-2-14	細胞内の中性脂肪量の定量	72
3-2-15	細胞内の ATP 量の定量	73
3-2-16	ミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数	73
3-2-16-1	DNA サンプル調製	73
3-2-16-2	プライマーの作成	74
3-2-16-3	Real-time PCR	74
3-2-17	ミトコンドリア蛍光染色と画像解析	74
3-2-18	遺伝子発現 (Real-time RT-PCR)	75
3-2-18-1	RNA サンプルの調製	75
3-2-18-2	プライマーの作成	76
3-2-18-3	Real-time RT PCR	76
3-2-19	タンパク質発現 (ウエスタンブロッティング)	76
3-2-19-1	細胞のサンプル回収	76
3-2-19-2	SDS 処理	76
3-2-19-3	SDS-PAGE	77
3-2-19-4	ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンの親水化	77
3-2-19-5	トランスブロット	77
3-2-19-6	抗原抗体反応	77
3-2-19-6-1	試薬調製	77
3-2-19-6-2	抗原抗体反応	78
3-2-19-7	化学発光	78
3-2-19-8	抗体除去および再免疫染色	78
3-2-20	統計解析	78
3-3	結果	79
3-3-1	細胞内へのグルコース取り込み量に対するピルビン酸の影響	79
3-3-2	生細胞数計測と MTT 試験による細胞活性の検討	80
3-3-3	グルコース取り込みに対する細胞外低濃度ピルビン酸の影響	80
3-3-4	グルコース取り込み量に対するピルビン酸以外の有機酸の影響	80
3-3-5	乳酸生成と乳酸変換率に対する細胞外ピルビン酸の影響	81
3-3-6	細胞内グリコーゲン・中性脂肪に対する細胞外ピルビン酸の影響	

響	81
3-3-7 ミトコンドリア関連指標に対する影響	82
3-3-8 解糖系物質からのアナプレロシス反応を担当する酵素の遺伝子 発現とタンパク質発現の解析	83
3-4 考察	84
3-4-1 ピルビン酸による細胞内グルコース取り込み促進作用	85
3-4-2 ピルビン酸と細胞数の関係	86
3-4-3 他の有機酸について	87
3-4-4 ピルビン酸取り込み量と乳酸生成量と乳酸変換率	88
3-4-5 細胞内グリコーゲン量と中性脂肪量	89
3-4-6 ミトコンドリア関連指標	89
3-4-7 中性脂肪量の増加とミトコンドリア生合成の増加	90
3-4-8 解糖系物質からのアナプレロシス反応	90
3-4-9 得られた結果から推定される仮説、今後の課題	92
3-5 結語	92
図表	94
第4章 総括	106
謝辞	111
参考文献	112

略語表記一覧

ADHP : 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine
BCA : ビシンコニン酸
BSA : 牛血清アルブミン
Cont : コントロール群 (試験物質非添加群)
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium
FBS : ウシ胎児血清
GAPDH : グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素
HBSS : Hank's balanced salt solutions
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Ins : インスリン
KHH : Krebs-Henseleit-HEPES
mtDNA : ミトコンドリア由来 DNA
MTT : 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ND1 : NADH 脱水素酵素複合体 1
nDNA : 核由来 DNA
PAS : periodic acid-schiff
PBS : リン酸緩衝生理食塩水
PC : ピルビン酸カルボキシラーゼ
PEP : ホスホエノールピルビン酸
PEPCK1 : ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (細胞質ゾル型)
PEPCK2 : ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (ミトコンドリア型)
PPIA : サイクロフィリン A
Pyr : ピルビン酸
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay
TBS : トリス緩衝生理食塩水
TCA : トリカルボン酸
TG : 中性脂肪

論文要旨

十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科食物栄養学専攻

倉若 美咲樹

外因性ピルビン酸による培養肝細胞の 糖質・脂質代謝の調節に関する研究

【背景・目的】

ピルビン酸 (Pyr) は解糖系の最終代謝産物、またエネルギー栄養素代謝の岐路に立つ重要な中間体で、血中 (約 0.1 mM) にも存在する。近年は痩身目的等のサプリメントやミトコンドリア病の症状改善薬への利用が研究されている。細胞培養では、Pyr は補助的エネルギー源・炭素骨格源として培養液に汎用される (1-2 mM)。しかし、細胞外 Pyr がエネルギー栄養素の代謝に与える影響には、生体丸ごととはもとより、神経・内分泌系等の調節系から独立した培養細胞レベルにおいても不明な点が多い。マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞やマウス由来 3T3-L1 前脂肪細胞での先行研究でグルコース (Glu) 取り込みへの影響が報告されているが、作用の方向は相反する。さらに Pyr 添加濃度は 50 mM、25 mM であり、血中や細胞培養での濃度と比べて極めて高い。また、エネルギー栄養素代謝の中枢である肝細胞への影響はほぼ不明である。そこで本論文では、肝臓代替モデルとして汎用されるヒト肝細胞ガン由来 HepG2 細胞株を用い、細胞外 Pyr の作用について、Glu の細胞内取り込みへの作用とその用量反応性等、Glu の細胞内取込み後の利用への作用、両者を連係する機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】

まず細胞培養レベルでの各種代謝産物の高感度測定法を検討した。培養液中の乳酸や Pyr、細胞内グリコーゲン量の定量には、基質特異的オキシダーゼにより生成した過酸化水素をペルオキシダーゼ-蛍光原基質 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine で検出する酵素蛍光法を検討した。細胞内 ATP はルシフェリン-ルシフェラーゼを用いる化学発光法と画像解析により定量した。続いてこ

これらの測定系を用いて HepG2 細胞に対する Pyr の影響を調べた。Pyr を 0-2 mM の濃度になるよう培養液に添加し、24 時間培養した。その後培養液と細胞を回収し、各測定を行った。培養液を用いて Glu 取り込み量や乳酸生成量を測定した。回収した細胞はグリコーゲン・中性脂肪 (TG)・ATP・ミトコンドリア由来 DNA (mtDNA) コピー数・遺伝子発現・タンパク質発現の測定、また PAS 染色・Oil Red O 染色・ミトコンドリア染色による組織学的検査に供した。

【結果】

Pyr 添加 (1, 2 mM) は HepG2 細胞による Glu の取り込みを有意に促進し、1 μ M インスリンの作用を凌ぐようであった。Glu 取り込み促進作用は Pyr 濃度依存的で、0.1 mM で有意な作用を示し、0.5-2 mM でほぼ最大となった。リンゴ酸は Pyr と類似の Glu 取り込み促進作用を示した。細胞内に取り込まれた Glu と Pyr の代謝運命に関しては、Pyr は乳酸生成を促進したが、この作用は 0.5 mM で飽和に達した。Glu と Pyr からの乳酸変換率は Pyr 添加により濃度依存的に低下した。細胞内呼吸が専ら解糖系による嫌氣的呼吸からミトコンドリア関与の好氣的呼吸へと部分的にシフトした可能性、Glu や Pyr 等の基質が乳酸以外に変換された可能性が示唆された。細胞内グリコーゲン量への Pyr の影響は、PAS 染色では検知できなかったが、酵素蛍光法では濃度依存的にグリコーゲン量は減少した。TG 量は反対に増加し、Oil Red O 染色では Pyr 添加群で脂肪滴の増加・増大が認められた。肝細胞での TG 合成に必須なミトコンドリアに関しては、Pyr 添加による細胞内 ATP 量および mtDNA コピー数の増加が認められた。また、ミトコンドリアの蛍光染色では、Pyr は濃度依存的に染色を増強し、その作用は 0.1 mM でも確認された。mtDNA コピー数への作用と合わせ、Pyr はミトコンドリア生合成を刺激したと推定された。さらにこれらの結果を受け、解糖系生成物からの TCA 回路中間体への補充反応で重要とされるピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) の遺伝子発現とタンパク質発現を解析した。また、糖新生経路の律速酵素として広く知られているが、近年補充反応にも関与している事が指摘されているホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の細胞質ゾル型 (PEPCK1) およびミトコンドリア型 (PEPCK2) についても同様に調べた。PC・PEPCK2 の遺伝子・タンパク質発現については整合性ある Pyr の有意な影響は見出せなかったが、PEPCK1 は増加傾向が認められた。

【考察】

本研究は、肝臓代替モデル HepG2 細胞において、Pyr が生理的濃度近くで 24 時間培養における Glu の取り込みを促進することを明らかにした。先行研究で

は、50 mM Pyr・72 時間の培養により、C2C12 筋管細胞内への Glu 取り込みは低下した。また、3T3-L1 前脂肪細胞では、25 mM Pyr・72 時間培養がインスリン・デキサメタゾン等の共存下で脂肪細胞への分化を促進し、Glu の取り込みが増加した。本研究の結果は、これら先行研究とは Pyr の用量、作用発現時間の点で大きく異なる新知見である。なお、これらの相異が細胞株由来組織の違いによるのかは検討を要する。本研究ではさらに、細胞外 Pyr により基質から乳酸・グリコーゲンへの代謝の流れが TG 合成へとシフトすることが明らかになった。この Glu の取り込み促進と TG 蓄積とを連係する機能として、ミトコンドリア生合成の刺激を示唆する結果を得た。一方、Glu・Pyr からの TG 生成には、TCA 回路から引き抜かれたクエン酸の補充すなわちアナプレロシスの促進が必須である。本研究では、解糖系中間体からのアナプレロシス反応に関わる PC や PEPCK について調べたが、PC や PEPCK2 の遺伝子・タンパク質発現に Pyr の有意な影響は認められなかった。一方、糖新生系の律速酵素として広く知られている PEPCK1 の発現を Pyr は促進した。ごく最近の報告では、PEPCK1 は糖新生とアナプレロシスに働く二面性を有することが明らかにされた。本研究の結果はこの最新知見と整合するようである。本研究では、Pyr は生理的濃度近くで諸作用を発揮した。よって、Pyr が生体内でも同様の作用を示す可能性も期待される。一方、得られた知見は HepG2 細胞に限定される可能性もある。HepG2 以外の肝細胞株の活用等も視野に入れて研究の発展を図りたい。ピルビン酸によるミトコンドリア生合成および PEPCK1 発現の促進機構の解明も重要課題である。

Abstract

Department of Food and Nutritional Sciences,
Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University graduate school

Misaki Kurawaka

Regulation of carbohydrate and lipid metabolism by exogenous pyruvate in cultured hepatocytes

【Introduction】

Pyruvate (Pyr), the terminal product of glycolysis, is a key intermediate located at a crossroads of metabolic pathways of energy nutrients and is also present in the blood (approximately 0.1 mM). In recent years, many research studies have attempted to apply Pyr as supplements improving overweight etc. and as pharmaceuticals ameliorating mitochondrial disease symptoms. Pyr (1-2 mM) is often added to the culture medium in cell culture as an additional source of carbon and energy. However, the effects of extracellular Pyr on the energy nutrient metabolism are poorly understood, not only in the whole organism but also on the cultured cell level isolated from the regulatory system such as the nerve and endocrine systems. In previous studies at supraphysiological concentrations (25-50 mM), Pyr inhibited glucose (Glu) uptake in mouse skeletal muscle-derived C2C12 myotube cells but conversely enhanced uptake in mouse fibroblast-

derived 3T3-L1 preadipocytes. The response direction of the glucose metabolic system to extracellular pyruvate thus appeared to vary depending on the tissue type from which the cell line is derived. Although hepatocytes are the metabolic pivot of energy nutrients, the effects of extracellular Pyr on glucose uptake and its subsequent metabolic fate have not been reported for cultured hepatocytes so far. Based on this background, this study aimed to unravel the pyruvate issue in the human hepatoma-derived cell line HepG2, widely used as an alternative model for the liver.

【Method】

At the start of this research, the author introduced and assessed high sensitivity enzymatic fluorometries for the quantification of trace amounts of lactate, pyruvate and glycogen, required as indicators in cell experiments. These methods quantified the target substances by detecting fluorophores converted from fluorogenic 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine in the presence of peroxidase and hydrogen peroxide, the latter of which was produced by substrate specific-oxidases. Intracellular ATP was quantified by a chemiluminescence method using luciferin-luciferase and image analysis. Subsequently, the effects of Pyr on HepG2 cells were examined using these measurement systems. The cells were cultured in a medium containing 0-2 mM Pyr for 24 hours. The culture medium

and the cells were collected and Glu uptake, Pyr uptake, lactate production, intracellular glycogen, intracellular triglyceride (TG), intracellular ATP, mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, gene and protein expression were measured. The cells were also microscopically examined after staining with PAS for glycogen, Oil Red O for TG, or a specific fluorescent dye for mitochondrial function.

【Results】

Extracellular Pyr (1, 2 mM) significantly increased Glu uptake by HepG2 cells and appeared to surpass 1 μ M insulin, a positive control. The increase in glucose uptake with Pyr was dose dependent and detectable at 0.1 mM and almost saturated at 0.5-2 mM. Malate, like Pyr, increased Glu uptake. Focusing on the metabolic fate of Glu and Pyr incorporated into the cells, Pyr increased lactate production, and this effect reached a plateau at 0.5 mM Pyr. The lactate conversion ratio from Glu and Pyr decreased in a dose-dependent manner with extracellular Pyr. This Pyr-induced change suggested that Glu and Pyr were converted to metabolites other than lactate and that intracellular respiration partially shifted from anaerobic respiration by glycolysis to aerobic respiration driven by mitochondria. The Pyr effect on intracellular glycogen content was undetectable by PAS staining, but the enzymatic fluorometry showed that Pyr decreased intracellular glycogen

in a dose-dependent manner. Conversely, Pyr increased intracellular TG, and Oil Red O staining showed that pyruvate increased lipid droplets. With respect to mitochondria, essential for TG synthesis in hepatocytes, Pyr increased intracellular ATP and the mtDNA copy number. Mitochondria-specific fluorescent-dye staining showed that Pyr enhanced staining signals in a dose-dependent manner. These results suggested that Pyr probably stimulated mitochondrial biogenesis. Based on these findings, the author analyzed mRNA and the protein expression of pyruvate carboxylase (PC) and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK1), which have roles in anaplerosis to replenish TCA cycle intermediates from glycolytic products. For comparison, mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK2) was also subjected to analysis. Although Pyr showed no significant effect on the mRNA/protein expression of PC/PEPCK2, 1 mM Pyr increased mRNA expression of PEPCK1 significantly and ca.1.5 fold compared to control. In addition, 1 mM Pyr almost significantly ($P=0.08$) increased the protein expression of PEPCK1 as analyzed by Western blotting.

【Discussion】

This study made clear that Pyr of near physiological concentrations increased Glu uptake for 24-h culture in HepG2 cell line, a widely used alternative model for the liver.

In a previous report using C2C12 myotube cells, the addition of 50 mM Pyr decreased Glu uptake after 72-h culture. In 3T3-L1 preadipocytes, 25 mM pyruvate promoted differentiation into adipocytes for 72 h culture with an induction mixture containing insulin and others. In the adipocyte thus differentiated, Pyr increased glucose uptake only with coexistence of insulin. The Pyr effects elucidated in this study significantly differ from those of the previous studies in terms of dose, time of onset of the effect, and independence from other factors such as insulin. It will be a future research topic whether these considerable differences reflect the specificities of the tissues that derived from the cell line. The further finding in this study was that extracellular Pyr shifted the metabolic fate of the substrates from lactate and glycogen synthesis to TG synthesis. The Pyr-stimulated TG accumulation triggered interest in investigating mitochondria, the supply site of the TG synthesis material citrate. As expected, Pyr appeared to stimulate mitochondrial biogenesis, as indicated by the ATP level, mtDNA copy number, and mitochondria-specific fluorescent staining. Besides the mitochondrial citrate supply, TG synthesis from glycolytic products highly depends on anaplerosis to replenish TCA cycle intermediates. In this study, Pyr did not affect gene expression of PC/PEPCK2. On the other hand, Pyr promoted the expression of PEPCK1, which is widely known as a key enzyme in gluconeogenesis. Very recently, however, PEPCK1 was revealed to have

duality and to play roles in both gluconeogenesis and anaplerosis. The present results appear consistent with this latest finding. Pyr-stimulated anaplerosis and mitochondrial biogenesis may cause the metabolic flow of glycolytic products to sink into TG synthesis. In this study, Pyr exerted various effects near physiological concentrations. Therefore, it is expected that Pyr may exhibit similar effects *in vivo*. On the other hand, the findings obtained may be limited to HepG2 cells. The author would like to further develop this research by taking into account the use of other types of hepatocellular lines. It is also a major challenge to elucidate the mechanism by which pyruvate promotes mitochondrial biogenesis and the expression of PEPCK1.

第 1 章 序論

ピルビン酸は示性式が CH_3COCOOH で表されるモノカルボン酸であり、生体内では主に解糖系の最終産物としてグルコースより生成される。細胞外のピルビン酸は細胞膜に存在するモノカルボン酸トランスポーター (MCT) を介して細胞内に取り込まれる¹⁾。細胞質内のピルビン酸は、ミトコンドリア内膜に存在するミトコンドリアピルビン酸キャリア²⁾によりミトコンドリアマトリックス内へ輸送され、トリカルボン酸 (TCA) 回路などに入り代謝を受ける。

生体の代謝において、ピルビン酸はエネルギー栄養素である炭水化物、脂質、タンパク質の代謝経路に関わる重要な中間体である。すなわち 1) 乳酸脱水素酵素 (LDH) により乳酸へ還元される、2) ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 複合体により脱炭酸されアセチル CoA となる、3) アラニンアミノ基転移酵素によりアミノ基を転移されアラニンとなる、4) ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) によりカルボキシル化されオキサロ酢酸となる^{3, 4)}。また、1) においてピルビン酸が LDH により乳酸に還元される際に同時に補酵素である NADH が NAD^+ に酸化される。この過程は、解糖系の上流酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) による反応において酸化剤として NAD^+ を必要とするため、嫌氣的条件下で解糖系のみで ATP を生成するために不可欠な反応である⁵⁾。

ヒト生体内では、ピルビン酸は細胞質、血液、尿、汗に分布している⁶⁾。特に臨床の現場において、血清ピルビン酸は血清乳酸とともに各種臓器の状態、細胞内におけるエネルギー代謝の評価指標として用いられている。安静空腹時の血清中のピルビン酸はおよそ 0.1 mM ^{7, 8)} であり、血清乳酸値とピルビン酸値の比率はおよそ 10 : 1 に保たれている⁷⁾。

近年ではピルビン酸をミトコンドリア病の症状改善薬として利用するための研究も進められている。ミトコンドリア病とはミトコンドリア由来 DNA (mtDNA) の異常により酸化的リン酸化による ATP の獲得が難しく、特にエネルギーを多く必要とする脳や筋肉において臨床症状が出現する病態の総称である⁹⁾。ミトコンドリア病患者はエネルギーの生産をほぼ解糖系に依存するため、血清乳酸値の上昇が多くみられる。この高乳酸血症に対してピルビン酸ナトリウムを内服させることにより症状を改善させるという研究がいくつか報告されている¹⁰⁻¹²⁾。さらにミトコンドリア病患者を対象としたピルビン酸ナトリウムの服用については臨床試験が進められており、現在は第 II 相試験が行われている (ミトコンドリア病患者を対象としたピルビン酸 Na とプラセボとのランダム化二重盲検比較試験 —臨床第 II 相試験—)¹³⁾。

インターネットサイトによると、ピルビン酸は過体重、運動能力などの健康

問題を改善するためのダイエタリーサプリメントとして販売されており、日本においてもインターネット通販を通じて容易に購入することができる。これに関連し、ピルビン酸を服用することにより体重や体脂肪が改善した報告^{14, 15)}がある一方、効果がないという報告^{16, 17)}も散見されおり、不明な点が多い。

また、ダイエタリーサプリメント等のデータベースとして定評のある NMCD (Natural Medicines Comprehensive Database) によれば、ピルビン酸はアルコール性肝疾患、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、心疾患、過体重、ガンに有効であると報告されているが、いずれもまだ根拠が不十分であると記されている¹⁸⁾。ヒトにおいてピルビン酸は有用な効果があると期待はされているが、まだ根拠が十分とは言えず、研究の余地は大きい。

ピルビン酸は食品中にもわずかながら存在する。特にネギや玉ねぎの刺激臭または辛味成分の前駆体であるアリインがアイリナーゼにより加水分解され、アリシンとともにピルビン酸が生成する。アリシンは揮発性で定量が難しいため、同時に生成するピルビン酸を測定することによりネギや玉ねぎの刺激成分や辛味の評価に利用されている^{19, 20)}。

細胞培養においてもピルビン酸はピルビン酸ナトリウムの形で培養液によく添加される。明確な根拠は不明であるが、培養細胞にとっての補助的なエネルギー・炭素骨格源を目的としているものが多い。その濃度はおよそ $1-2 \text{ mM}^{21-25)}$ であり、ヒト血液中の濃度 ($0.1 \text{ mM}^{7, 8)}$) と比較すると 10 倍ほど高い。特に、エチジウムブロマイド処理によりミトコンドリア由来 DNA (mtDNA) を枯渇させ、呼吸機能を失わせた p0 細胞などを培養する際はピルビン酸の添加が必須である²⁶⁾。ミトコンドリアの酸化的リン酸化を行うことが出来ない p0 細胞は解糖系で自身の生存に必要な ATP の大部分を生産しなければならない。解糖系による安定した ATP の産生には上述した通り十分な NAD^+ の再生産が必要であり、そのためにはピルビン酸を別途補充することが必要となる。

また、細胞を培養する中で生じた活性酸素種を消去する作用を示した報告もいくつかあり²⁷⁻³⁰⁾、これらの作用もピルビン酸が細胞培養液に添加される理由の一つであると考えられる。

細胞外のピルビン酸が各培養細胞のエネルギー栄養素、特にグルコースの代謝に与える影響についていくつか報告されている。Philip ら³¹⁾によると、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞にピルビン酸を 50 mM 添加して 72 時間培養すると、細胞内へのグルコースの取り込みの抑制、ホスホフルクトキナーゼの mRNA 発現の抑制が報告された。また、ピルビン酸は骨格筋由来細胞のミトコンドリアの生合成を高める報告もされている^{27, 32)}。一方、骨格筋細胞モデルとは異なり、マウス由来 3T3-L1 前脂肪細胞では脂肪細胞分化カクテル (0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、 $1 \mu\text{M}$ デキサメタゾンおよび $1 \mu\text{g/mL}$ インスリン) と共に

25 mM ピルビン酸を添加すると脂肪細胞への分化を促進させ、それに伴いインスリン刺激によるグルコースの取り込み増加、グルコース輸送体 4 (GLUT4) の遺伝子発現の亢進および細胞内中性脂肪 (TG) の増加が Hwang ら³³⁾ より報告されている。これらの先行研究によると、グルコース代謝に対するピルビン酸自体の効果は、細胞の種類によって異なる。さらに、血液中^{7, 8)} または細胞培養培地中のピルビン酸濃度²¹⁻²⁵⁾ よりも非常に高い濃度で得られた知見であることに注意を要する。

ピルビン酸は培養細胞のエネルギー栄養素の代謝などに影響を与えることは明らかではあるが、生理学的濃度近辺での作用やその詳細な作用機構等については現時点において不明な点が多い。また、細胞内へのグルコースの取り込みに対する影響は培養細胞の種類により結果が異なっている。さらに、生体のグルコース代謝の中心的な役割を担っている肝臓の細胞に対するピルビン酸の作用についての報告はまだ見当たらない。

以上の背景の下に、本研究では細胞外のピルビン酸が肝細胞におけるエネルギー栄養素の代謝、特にグルコースの利用に影響を与えるという仮説を立て、ヒト肝ガン細胞由来細胞株である HepG2 細胞を用いて調べることを目的とした。

また、細胞レベルの実験においては動物由来試料を用いた実験よりもスケールが小さく、測定したい代謝産物などが微量であることがほとんどであり、従来の化学反応に基づく比色法では検出限界以下になることが多い。これらを解決するために様々な高感度測定キットが販売されているが、高価であるとともに特殊な測定機器が必要となる場合も多く、多数のサンプルの定量には必ずしも適してはいない。そこで本研究では初めに細胞レベルの実験にも耐えうる代謝産物の高感度測定系を検討し、これらを利用して HepG2 細胞に対するピルビン酸の作用について検討した。本研究の構成は以下の通りである。

第 1 章 序論

第 2 章 培養細胞代謝産物の定量法の検討

第 1 部 蛍光原色素を用いた乳酸・ピルビン酸の定量法の検討

第 2 部 培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の検討

第 3 部 細胞内 ATP 測定への化学発光イメージング解析の応用

第 3 章 生理的濃度近傍の細胞外ピルビン酸はヒト肝細胞ガン由来細胞株 HepG2 におけるグルコース利用とともにミトコンドリア生合成を促進する

第 4 章 総括

第2章 培養細胞代謝産物の定量法の検討

第1章でも述べたように、細胞レベルの実験においては動物由来試料を用いた実験よりもスケールが小さく、測定したい代謝産物などが微量であることが多い。蛍光色素や化学発光を利用した高感度測定キットも市販されているが非常に高価であり、多数のサンプルの測定には必ずしも適していない。また、測定キットの付属説明書には参考文献等の記載がされていないものも見受けられ、試薬組成等も明記されていない場合が多い。そこで第2章ではこれらの問題を解決するため、培養細胞スケールの実験においても適応可能な代謝産物測定系を検討した。さらに、研究環境の状況により、マイクロプレートリーダー対応の蛍光・発光分光光度計が整備されていない場合であってもこれらの測定が可能となるように代替装置の検討も同時に行った。

2-1 蛍光原色素を用いた乳酸・ピルビン酸の定量法の検討

2-1-1 研究の背景ならびに目的

乳酸とピルビン酸はそれぞれ示性式が $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ 、 CH_3COCOOH で表されるモノカルボン酸である。乳酸には D 型・L 型の鏡像異性体が存在しており、自然界では L 型が多く存在している。

生体内において、乳酸とピルビン酸は糖代謝の生成物として広く知られている^{3, 4)}。そのため、乳酸とピルビン酸は血液中にも存在しており、生体内における代謝の状況を鋭敏に反映させている。健康なヒトにおいて、血液中の乳酸とピルビン酸はおもに運動時に上昇する。乳酸は安静時には 1 mM 程度であるが運動時に 6-10 mM に上昇し、ピルビン酸は安静時で 0.1 mM 程度、運動時で 0.4 mM 程度まで上昇する³⁴⁻³⁶⁾。また、ミトコンドリア病(安静時血清乳酸濃度: 2-6 mM)^{10, 11, 12)} や敗血症(安静時血清乳酸濃度: 4 mM、安静時血清ピルビン酸濃度: 0.38 mM)^{37, 38)} などの疾患においても高値を示し、臨床の現場において重要な指標として利用されている。また、ガン細胞ではミトコンドリアの機能が制限されており、ガン細胞の生存に必要なエネルギーのほとんどを解糖系による ATP 産生に依存している。そのため、ガン細胞からは大量の乳酸が生成される(ワールブルグ効果^{39, 40)})。さらに、乳酸はガン細胞における TCA 回路の炭素源として大きく寄与していることが報告されている⁴¹⁾。従って、乳酸とピルビン酸の定量は様々な研究分野で有益な情報を提供することが期待される。

乳酸やピルビン酸の定量には LDH の触媒により NAD^+ や NADH の増減を測

定する方法^{42, 43)}や、UV 検出を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)⁴⁴⁾を用いた方法などが報告されている。これらの方法では検出限界や測定手法にかかる時間などいくつか問題点が存在する。また、乳酸やピルビン酸の測定キットが開発・市販されているが高価であり、多数サンプルの定量には必ずしも適していない。一方、測定キットの付属説明書には参考文献等の記載がされていないものも見受けられ、試薬組成等も明記されていない場合が多い。

そこで本研究では、Fig. 1 と Fig. 2 に示す酵素反応過程を組み合わせ、安価かつ高感度・短時間で乳酸やピルビン酸を定量できる酵素蛍光法を検討することを目的とした。

始めに、乳酸やピルビン酸をそれぞれ乳酸オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼにより酸化し、過酸化水素を発生させる。この過酸化水素を電子受容体、蛍光原基質 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) を電子供与体とするペルオキシダーゼ反応により、ADHP を酸化して蛍光色素レゾルフィンに変換する^{45, 46)}。反応②の基質からレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので、適切な乳酸・ピルビン酸濃度範囲においてレゾルフィンの蛍光強度は基質濃度に比例する。本研究では、このような定量原理に沿って実験系を検討することを目的とし、さらに本法の検出限界、蛍光定量機器の代用、細胞実験への適用可能性等を検討した

2-1-2 実験材料ならびに方法

2-1-2-1 試薬等

ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 は理化学研究所バイオリソース研究センター (茨城) から購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ウシ胎児血清 (FBS)、Penicillin-Streptomycin、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) は Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) から購入した。10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) はフナコシ株式会社 (東京) から購入した。乳酸オキシダーゼ (Microorganism 由来)、ピルビン酸オキシダーゼ (Microorganism 由来) は東洋紡株式会社 (大阪) から購入した。ペルオキシダーゼ (西洋ワサビ由来) はオリエンタル酵母工業株式会社 (東京) から購入した。

2-1-2-2 細胞培養

HepG2 細胞は CO₂ インキュベーター内 (CO₂ 5%、湿度 95%、温度 37°C) で、DMEM (10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、フェノールレッド含有) 中で培養した。1 日もしくは 2 日おきに DMEM を交換し、対数増殖期に継代を行った。

2-1-2-3 細胞実験

操作はKawanoらとKamakuraら^{21,22)}の方法を参考に一部を改変して行った。実験前日に細胞が 1.25×10^5 cells/cm² になるように 24-well 培養プレートに播種した。翌日 DMEM を除き、Krebs-Henseleit-HEPES (KHH) バッファー (pH 7.4、1.2 mM MgSO₄、1.2 mM KH₂PO₄、4.7 mM KCl、118.2 mM NaCl、2.5 mM CaCl₂ · 2H₂O、25 mM NaHCO₃、10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)) で 2 回洗浄し、細胞表面に存在する DMEM 成分を除いた。もう一度 KHH バッファーを加え、CO₂ インキュベーター内で 2 時間予備培養を行った。2 時間後 KHH バッファーを除き、続いて 11 mM グルコースと 2 mM ピルビン酸を含む KHH バッファーに交換した。所定の時間までインキュベーション後、培養液を回収し、乳酸・ピルビン酸測定の測定に用いた。

2-1-2-4 標準液サンプルの調製

標準液の作成にはピルビン酸ナトリウムと乳酸ナトリウムを用いた。超純水で 1 M stock 溶液を作成し、使用するまで冷蔵庫で保存した。

2-1-2-5 過酸化水素濃度の測定

Fig. 1 と Fig. 2 の②に相当する蛍光原基質 ADHP の反応性を確認するため、過酸化水素標準液とペルオキシダーゼを用いて蛍光強度の測定を行った。サンプル 1 μL と反応液 (pH 7.4、PBS、6.0 U/mL ペルオキシダーゼ、10 μM ADHP) 49 μL を黒色 96-well 平底マイクロプレートに加え、マイクロプレートミキサーで混和させた。その後 37°C で 10 分インキュベーションし、マイクロプレート対応蛍光分光光度計 Varioskan™ LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を用いて励起波長 Ex=525 nm、蛍光波長 Em=585 nm における蛍光強度を測定した。また、リアルタイム定量 PCR システム Mx3000P (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) で蛍光強度を測定する場合は、サンプルと反応液を PCR 用チューブに取り、同様に反応させた後、ROX フィルターを用いて蛍光強度を測定した。

2-1-2-6 乳酸濃度の測定

サンプル中の乳酸濃度は蛍光乳酸オキシダーゼ法を用いて測定した。サンプル 1 μL と反応液 (pH 6.0、100 mM リン酸緩衝液、6.0 U/mL ペルオキシダーゼ、0.5 U/mL 乳酸オキシダーゼ、10 μM ADHP) 49 μL を用いた。以降は過酸化水素濃度の測定 (2-1-2-5) と同様の操作を行った。

2-1-2-7 ピルビン酸濃度の測定

ピルビン酸濃度は蛍光ピルビン酸オキシダーゼ法を用いて測定した。回収したサンプル 1 μL と反応液 (pH 6.0、100 mM リン酸緩衝液、0.24 mM thiamine pyrophosphate、0.01 mM FAD、1.20 mM EDTA、12 mM MgSO_4 、6.0 U/mL ペルオキシダーゼ、0.5 U/mL ピルビン酸オキシダーゼ、10 μM ADHP) 49 μL を用いた。以降は過酸化水素濃度の測定 (2-1-2-5) と同様の操作を行った。

2-1-2-8 統計解析

統計ソフトは IBM SPSS Statistics ver.20 for Japan (日本アイ・ビー・エム株式会社、東京) を用いた。2 変数間の関係の強さを分析するために Pearson の積率相関係数を算出した。さらに、独立変数 (過酸化水素濃度・乳酸濃度・ピルビン酸濃度) が従属変数 (蛍光強度) をどの程度説明できるのか調べるために単回帰分析を行い、決定係数を算出した。

2-1-3 結果と考察

2-1-3-1 蛍光原基質 ADHP とペルオキシダーゼ、過酸化水素による蛍光色素レゾルフィンの検出とリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P の利用性に関する検討

本法において、Fig. 1 と Fig. 2 の②で示したように各オキシダーゼにより生成した過酸化水素を電子受容体、蛍光原基質 ADHP を電子供与体とするペルオキシダーゼ反応により ADHP を酸化して蛍光色素レゾルフィンに変換する^{45, 46)}。まず初めにこの化学反応によりレゾルフィンの蛍光が検出できるか確認を行った。

0.8 μM 濃度に調製した過酸化水素溶液を用いて蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定した結果を Fig. 3A に示す。その結果、過酸化水素濃度依存的に蛍光強度が増大した。また、過酸化水素濃度と蛍光強度の間の相関係数を算出したところ 0.998 ($P < 0.001$, $n=5$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=0.713x+1.06$ で示され、決定係数 R^2 は 0.997 ($P < 0.001$) であった。

研究環境の状況により、マイクロプレートリーダー対応蛍光分光光度計が整備されていない場合であっても、これを代替できる装置の利用により、本酵素蛍光法は実施可能となる。我々は、PCR による DNA の増幅を蛍光色素由来の蛍光強度の増大により検知するリアルタイム定量 PCR システムに着目した。とくに Mx3000P (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) は、励起側・蛍光側からなるフィルターセットを複数備えており、そのうち蛍光色素の特性に対応する 1 つを選択することで、96-well マイクロプレートと同一ディメンションにセットした

PCR チューブ内試料の蛍光を測定できる可能性がある。本法で使用している蛍光原基質 ADHP は Fig. 1 と Fig. 2 で示したように蛍光色素であるレゾルフィン を生成する。レゾルフィンの励起・蛍光スペクトルは Fig. 3B の通りであり、Mx3000P 付属のフィルターセットのうち、ROX™/Texas Red® (ROX) フィルターはレゾルフィンの励起・蛍光極大波長をカバーしている。よって、このフィルターを用いて、本法による Mx3000P の利用可能性を検討した。

0-8 μM 濃度に調製した過酸化水素溶液を用いて Mx3000P の ROX フィルターで蛍光強度を測定した結果を Fig. 3C に示す。その結果、過酸化水素濃度依存的に蛍光強度が増大した。また、過酸化水素濃度と蛍光強度の間の相関係数を算出したところ 0.997 ($P<0.001$, $n=5$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=983x+4984$ で示され、決定係数 R^2 は 0.994 ($P<0.001$) であった。

以上の結果より蛍光原色素 ADHP はペルオキシダーゼとの作用により過酸化水素濃度依存的に蛍光色素のレゾルフィンを生成すること、リアルタイム定量 PCR システム Mx3000P は蛍光プレートリーダーの代行として利用可能であることが示唆された。

2-1-3-2 乳酸・ピルビン酸濃度の定量可能レンジの検討

実際に乳酸やピルビン酸を用いて定量可能レンジを検討した。まず初めに乳酸を 0-2000 μM の濃度に調製し、蛍光プレートリーダーおよびリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P の ROX フィルターで蛍光強度の測定を行った。蛍光プレートリーダーで測定した結果を Fig. 4A に示す。500 μM までは蛍光強度が乳酸濃度により増強したが、以降は急速に減弱した。そこでこの中の直線領域である 0-250 μM を抜粋して検量線を作成した(Fig. 4B)。その結果、乳酸濃度と蛍光強度間の相関係数は 0.999 ($P<0.001$, $n=9$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=0.310x+8.06$ で示され、決定係数 R^2 は 0.997 ($P<0.001$) であった。また、本法におけるサンプルの添加量は 1 μL であり、定量範囲を mol に換算すると 2-250 pmol となった。同様に蛍光強度を Mx3000P で測定した結果を Fig. 4C に示す。125 μM 付近までは蛍光強度が乳酸濃度により増強したが、250 μM 付近から次第に頭打ちとなり、以降は急速に減弱した。そこでこの中の直線領域である 0-62.5 μM を抜粋して検量線を作成した (Fig. 4D)。その結果、乳酸濃度と蛍光強度間の相関係数は 1.000 ($P<0.001$, $n=7$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=480x+16014$ で示され、決定係数 R^2 は 0.999 ($P<0.001$) であった。

続いて、ピルビン酸を 0-6000 μM の濃度に調製し、蛍光プレートリーダーおよび Mx3000P の ROX フィルターで蛍光強度の測定を行った。蛍光プレートリ

ーダーで測定した結果を Fig. 5A に示す。3000 μM までは蛍光強度がピルビン酸濃度により増強したが、以降は減弱した。そこでこの中の直線領域である 0-2000 μM を抜粋して検量線を作成した (Fig. 5B)。その結果、ピルビン酸濃度と蛍光強度間の相関係数は 0.999 ($P<0.001$, $n=12$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=0.048x+4.68$ で示され、決定係数 R^2 は 0.999 ($P<0.001$) であった。また、本法におけるサンプルの添加量は 1 μL であり、定量範囲を mol に換算すると 2-2000 pmol となった。同様に蛍光強度を Mx3000P で測定した結果を Fig. 5C に示す。500 μM 付近までは蛍光強度がピルビン酸濃度により増強したが、1000 μM 付近から次第に頭打ちとなり、以降は減弱した。そこでこの中の直線領域である 0-500 μM を抜粋して検量線を作成した (Fig. 5D)。その結果、ピルビン酸濃度と蛍光強度間の相関係数は 0.997 ($P<0.001$, $n=10$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=66.0x+17969$ で示され、決定係数 R^2 は 0.993 ($P<0.001$) であった。

本法で使用している蛍光原基質 ADHP は、過酸化水素を電子受容体とし、ペルオキシダーゼにより酵素的に酸化され、蛍光色素であるレゾルフィンに変換される。一方、過去の文献では、このペルオキシダーゼ反応液中の過酸化水素の濃度が数 μM を超えると、レゾルフィンが酵素的に低蛍光性物質に変換されること、また過酸化水素濃度が 100 μM 以上になると、ADHP からレゾルフィンへの変換が急激に抑制されることが報告されている。さらに、レゾルフィンの蛍光強度は、溶液の pH が 7 を下回ると著しく減弱することが示されている⁴⁶⁾。定量反応液中の乳酸やピルビン酸濃度が高い場合、Fig. 1 や Fig. 2 の①で示した反応でより多くの過酸化水素が生成する。また、Fig. 1 や Fig. 2 の②にも示した通り、ADHP がレゾルフィンになる過程で生成される酢酸も増加する⁴⁷⁾。これ等の要因が重なり、乳酸やピルビン酸濃度が高い場合に、蛍光強度の著しい低下を来した可能性が推定される。

以上の蛍光原基質 ADHP の特性を踏まえると、本酵素蛍光法では乳酸やピルビン酸を適切な濃度 (乳酸 : 250 μM まで。ピルビン酸 : 2000 μM まで) に適宜希釈し定量に用いることが定量系の設計および結果の解釈に重要であると考えられた。さらに、測定レンジは狭まるがリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P においても適切な濃度に設定すれば定量が可能であることが示唆された。

2-1-3-3 細胞培養液中の乳酸・ピルビン酸濃度の経時的変化

培養細胞は培養時間が経つにつれて培養液中に代謝産物である乳酸を放出する⁴⁸⁾。そこでグルコースを 11 mM、ピルビン酸を 2 mM 含む培養液で培養し、試験物質添加後 2、4、8、12、24 時間後に培養液を回収し、乳酸濃度とピルビン酸濃度の経時変化を測定した。その結果、培養液中の乳酸濃度は培養時間とも

に増加し、8時間付近（4 mM 付近）でプラトーに達したが（Fig. 6A）、ピルビン酸濃度は試験物質添加後 24 時間でほぼ検出できなくなるまで減少した（Fig. 6B）。細胞種は異なるが、ラット骨格筋由来 L6 細胞において 4 時間培養することでピルビン酸を 0.32 mM 消費すると報告されている⁴⁹⁾。これを 24 時間培養に換算すると 1.96 mM となるが、本研究のヒト肝臓由来 HepG2 細胞の結果とほぼ一致した。

2-1-4 結語

本研究では乳酸とピルビン酸を、蛍光原基質 ADHP を用いてオキシダーゼ法で検出する高感度定量法を検討した。本法の定量範囲は乳酸 2-250 μ M（2-250 pmol）、ピルビン酸 2-2000 μ M（2-2000 pmol）であり、両物質の細胞培養スケールの測定に活用できることが明らかとなった。また、測定範囲は狭まるが ROX フィルター装着リアルタイム定量 PCR システムを用いる蛍光測定への適用が可能であった。

また、HepG2 細胞を用いた実験で得られた培養液中の乳酸・ピルビン酸濃度の経時的変化（2-1-3-3）の結果は、本博士論文の主体を構成する第 3 章の論文における HepG2 細胞により取り込まれた基質の乳酸変換率（3-3-5）を調べるための足掛かりとなった。

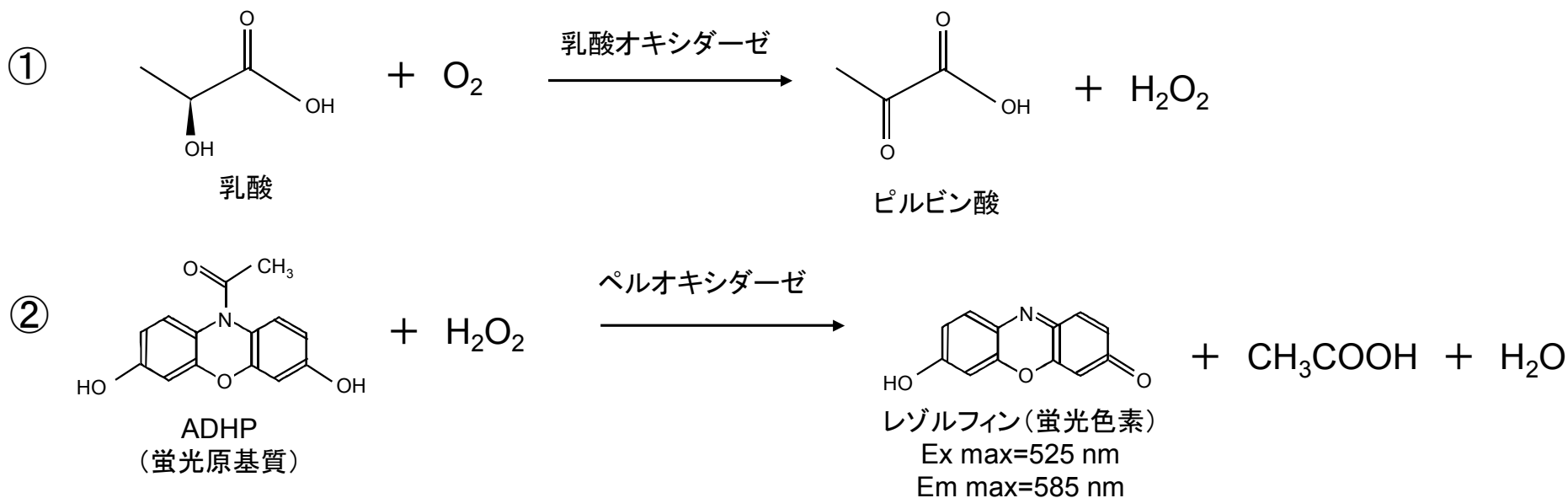


Fig. 1. 本研究における乳酸定量の反応過程.

本研究における乳酸定量の2段階反応機構を示した. ①: 乳酸を乳酸オキシダーゼにより酸化し, ピルビン酸と同時に過酸化水素を発生させる. ②: 蛍光原基質10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) を①で生成した過酸化水素とペルオキシダーゼの作用により蛍光色素レゾルフィンに変換する. 乳酸からレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので, 適切な乳酸濃度範囲ではレゾルフィンの蛍光強度はサンプル中の乳酸濃度に比例する.

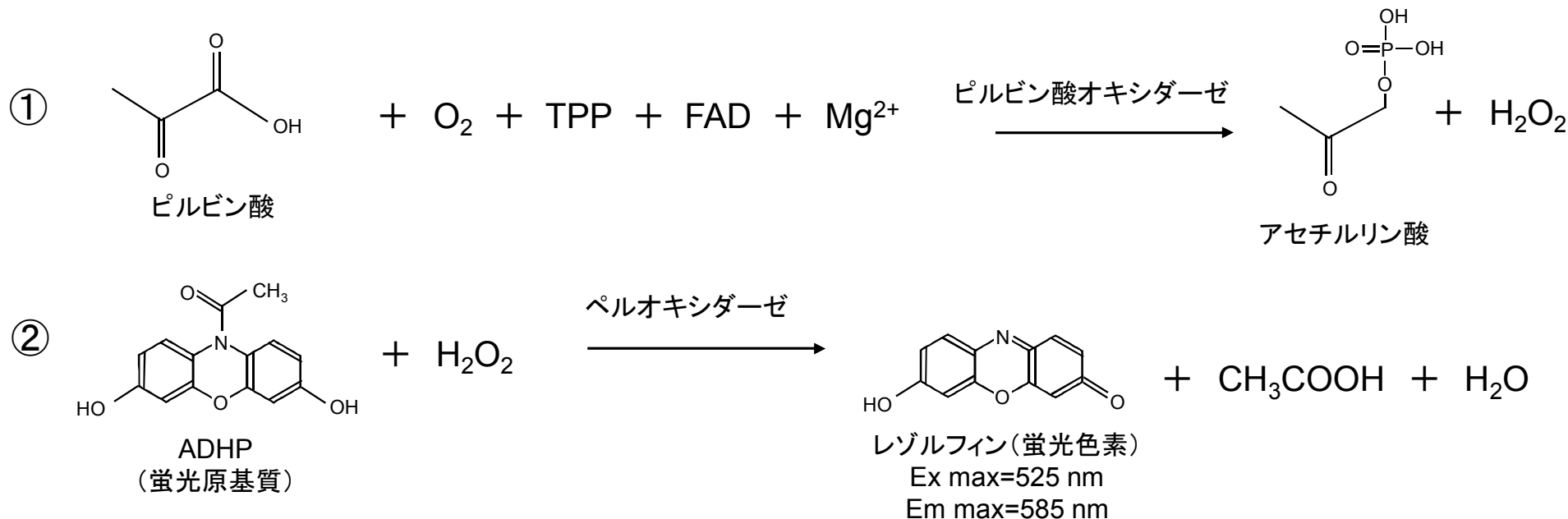


Fig. 2. 本研究におけるピルビン酸定量の反応過程.

本研究におけるピルビン酸定量の2段階反応機構を示した. ①: ピルビン酸をピルビン酸オキシダーゼにより酸化し, ピルビン酸と同時に過酸化水素を発生させる. ②: 蛍光原基質10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) を①で生成した過酸化水素とペルオキシダーゼの作用により蛍光色素レゾルフィンに変換する. ピルビン酸からレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので, 適切なピルビン酸濃度範囲ではレゾルフィンの蛍光強度はサンプル中のピルビン酸濃度に比例する. TPP: チアミノピロリン酸. FAD: フラニンアデニンジヌクレオチド.

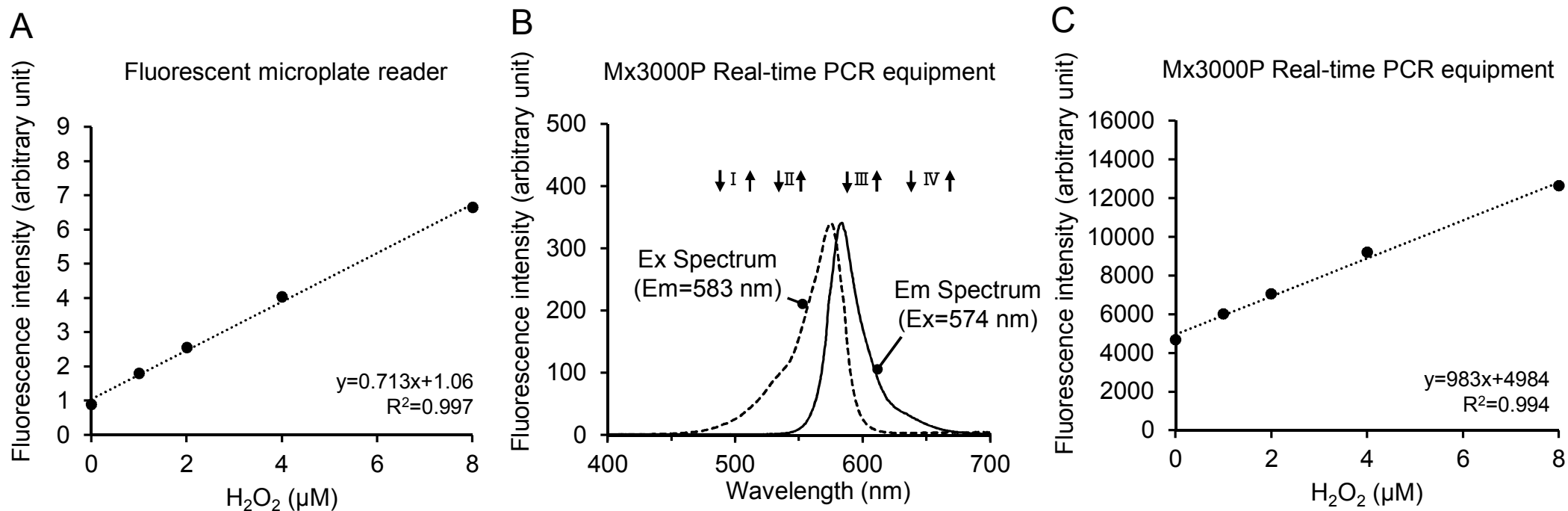


Fig. 3. 蛍光原基質10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) とペルオキシダーゼ，過酸化水素による蛍光色素レゾルフィンの検出とリアルタイム定量PCRシステムMx3000Pの利用性に関する検討。

蛍光基質ADHPとペルオキシダーゼ，過酸化水素による蛍光色素レゾルフィンが検出可能か蛍光プレートリーダーとリアルタイム定量PCRシステムMx3000PのROXフィルターを用いて蛍光強度を測定した。A：蛍光プレートリーダーで測定した0-8 μM 過酸化水素標準液の蛍光強度。B：レゾルフィンの励起・蛍光スペクトル。ローマ数字はMx3000P付属のフィルターセットを示す。下向きおよび上向きの矢印は，それぞれ励起および蛍光フィルターの平均波長を示す。I：FAM™/SYBR® Green I (Ex=492 nm, Em=516 nm)，II：HEX™/JOE™/VIC™ (Ex=535 nm, Em=555 nm)，III：ROX™/Texas Red® (Ex=585 nm, Em=610 nm)，IV：Cy5™ (Ex=635 nm, Em=665 nm)。C：Mx3000Pで測定した0-8 μM 過酸化水素標準液の蛍光強度。AとCはいずれもPearsonの積率相関係数を算出したのち，単回帰分析により決定係数を算出した (n=5)。

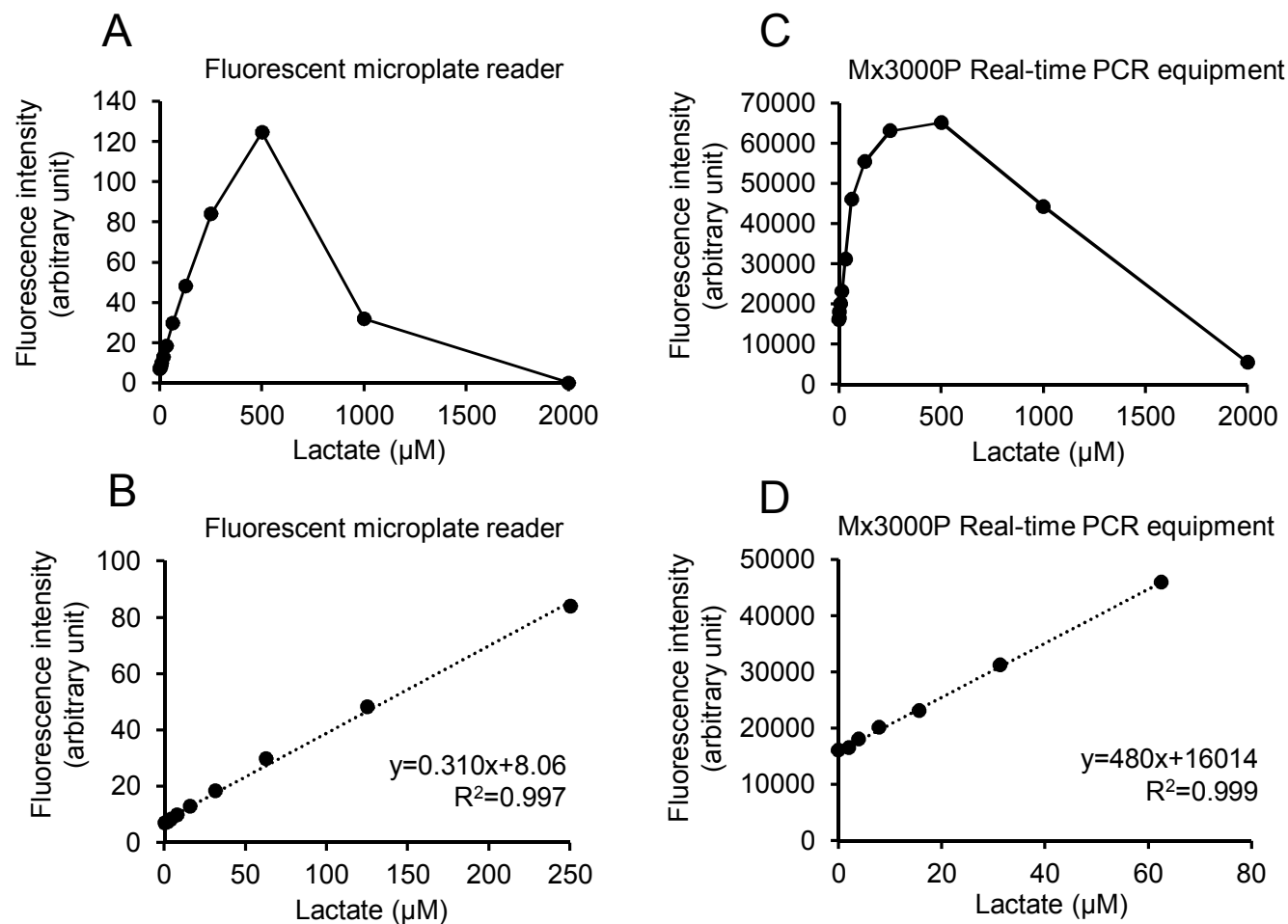


Fig. 4. 乳酸標準液の検量線の検討.

0-2000 μM 乳酸標準液を調製し、蛍光プレートリーダーまたはリアルタイム定量PCRシステムMx3000PのROXフィルターを用いて蛍光強度を測定した。A：蛍光プレートリーダーで測定した乳酸標準液の蛍光強度。B：蛍光プレートリーダーで測定した0-250 μM 乳酸標準液の蛍光強度と検量線 (n=9)。C：Mx3000Pで測定した乳酸標準液の蛍光強度。D：Mx3000Pで測定した0-62.5 μM 乳酸標準液の蛍光強度と検量線 (n=7)。BとDいずれもPearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

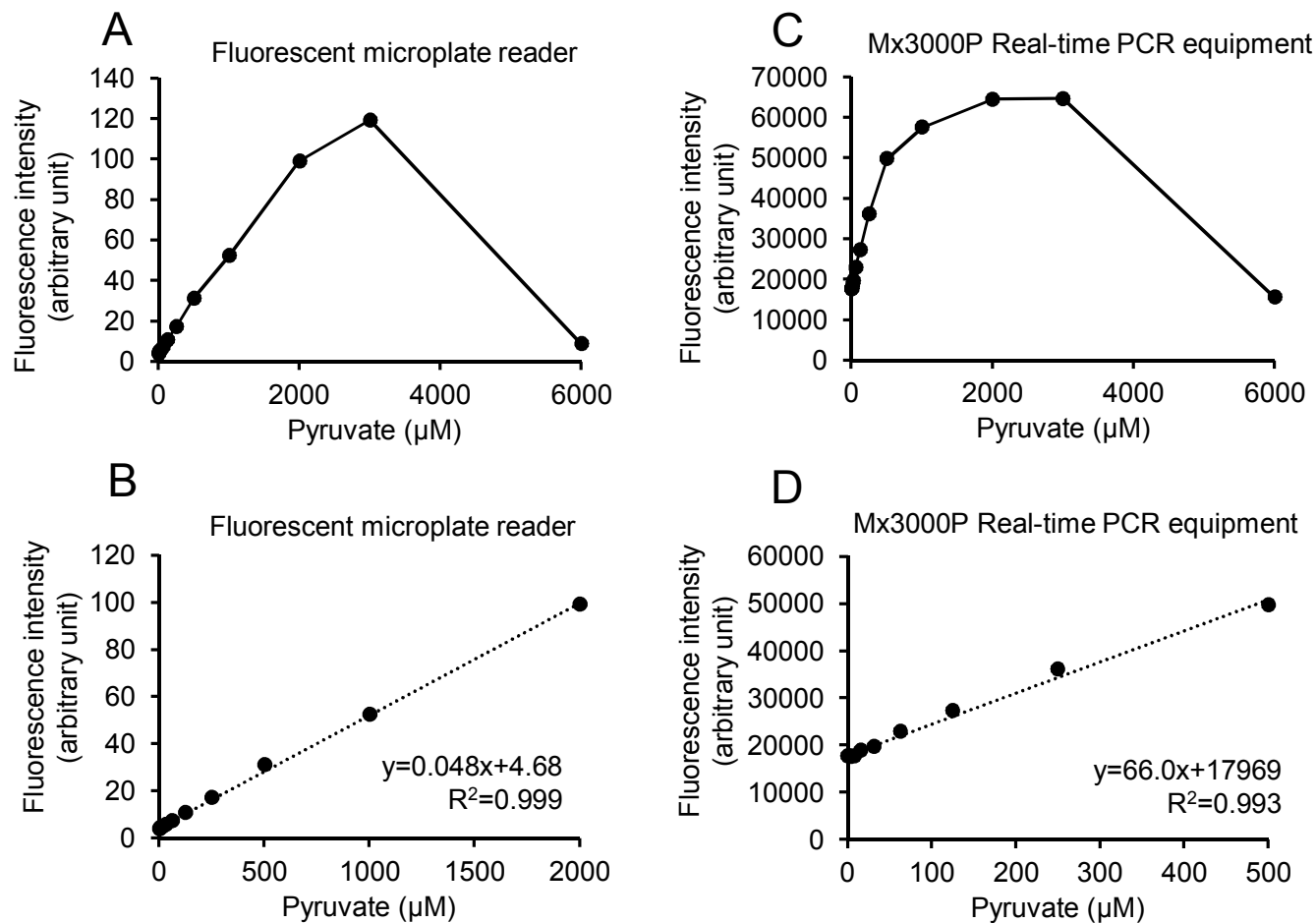


Fig. 5. ピルビン酸標準液の検量線の検討.

0-6000 μM ピルビン酸標準液を調製し、蛍光プレートリーダーまたはリアルタイム定量PCRシステムMx3000PのROXフィルターを用いて蛍光強度を測定した。A：蛍光プレートリーダーで測定したピルビン酸標準液の蛍光強度。B：蛍光プレートリーダーで測定した0-500 μM ピルビン酸標準液の蛍光強度と検量線 (n=12)。C：Mx3000Pで測定したピルビン酸標準液の蛍光強度。D：Mx3000Pで測定した0-62.5 μM ピルビン酸標準液の蛍光強度と検量線 (n=10)。BとDいずれもPearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

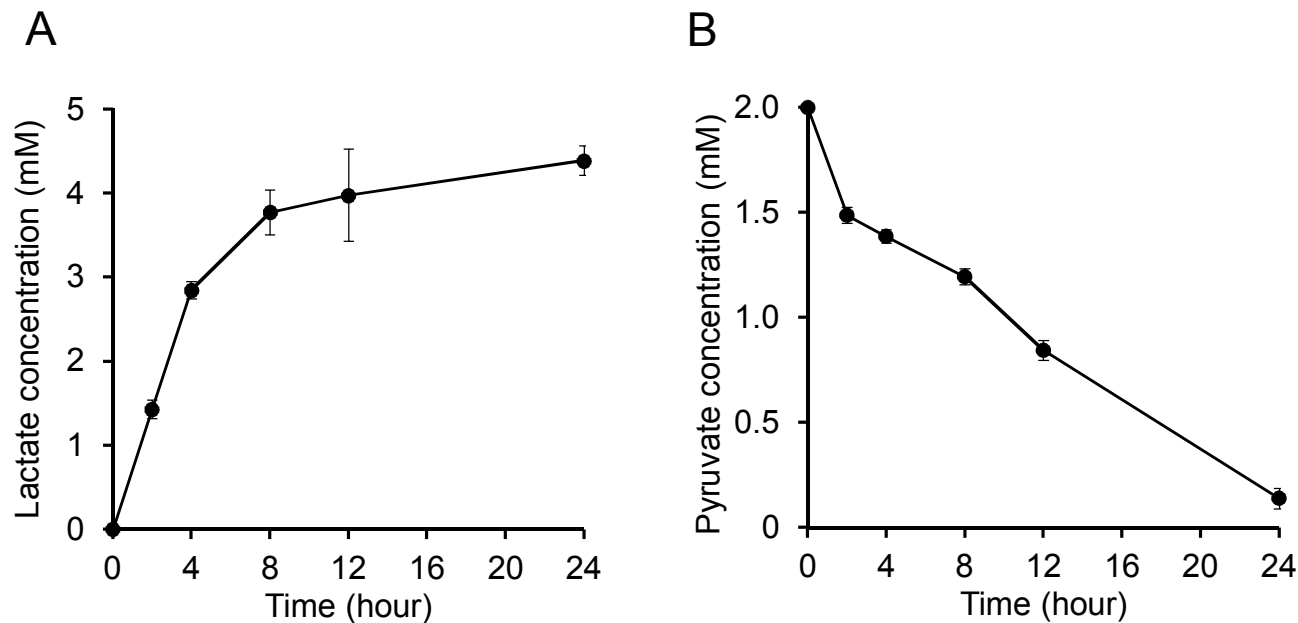


Fig. 6. 培養液中の乳酸濃度とピルビン酸濃度の経時変化.

実験前日にHepG2細胞をDMEM培地中に懸濁させ、24-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した. 翌日に培養液をグルコース非含有KHHバッファーに交換し、2時間前培養を行った. その後11 mMのグルコースと2 mMのピルビン酸を含むKHHバッファーに交換し、24時間培養した. 試験物質添加後2, 4, 8, 12, 24時間後に培養液を回収し、培養液中の乳酸濃度とピルビン酸濃度を測定した. 値は平均値±標準誤差 (n=4). A: 乳酸濃度の経時変化. B: ピルビン酸濃度の経時的変化.

2-2 培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の検討

2-2-1 研究の背景ならびに目的

グリコーゲンはD-グルコースを構成糖とする動物界の貯蔵多糖である⁵⁰⁾。グルコース残基は α -1、4グリコシド結合で直鎖状に連なっているが、一定間隔で α -1、6グリコシド結合が存在し、分枝構造を形成している⁵¹⁾。生体内では主に肝臓や骨格筋に存在しており、必要に応じて血糖値の維持やATP生産のために利用されている。

生体内におけるグリコーゲンの合成・分解は様々な酵素反応を経て行われる。特に、肝臓におけるグリコーゲン合成は食後などの一過性高血糖を防ぐ役割も担っており、個体レベルのグルコース代謝の恒常性維持に重要な役割を果たしている。そのため先天性疾患などでグリコーゲン合成酵素が欠損していると、肝臓の場合は食後高血糖、骨格筋の場合は運動不耐性などが生じ、場合によっては重篤な症状を引き起こすことがある⁵²⁾。

グリコーゲン合成・分解に関わるメカニズムやその調節、個体の糖代謝の状態、グリコーゲン代謝関連疾患の解明、また食品素材のグリコーゲン量の把握等には、グリコーゲンの定量が欠かせない。従来グリコーゲンの定量にはフェノール硫酸法⁵³⁾、アンスロン硫酸法⁵⁴⁾などが用いられてきた。しかしながら両者とも化学反応に基づく比色法で、特異性に難点があると同時に、感度が低い。これらの方法では、培養細胞を用いた培養細胞スケールの実験の場合、検出限界以下となることが多い。これらを解決するために、蛍光発光法を用いた高感度グリコーゲン定量キットが開発・市販されており、培養細胞中のグリコーゲンの定量に適用した報告が散見される^{55, 56)}。しかし、高感度グリコーゲン定量キットは高価であり、多数サンプルの定量には必ずしも適していない。また、測定キットの付属説明書には参考文献等の記載がされていないものも見受けられ、試薬組成等も明記されていない場合が多い。

そこで本研究では、Fig. 7に示す3つの酵素反応過程を組み合わせ、安価かつ高感度にグリコーゲンを定量できる酵素蛍光法を検討することを目的とした。3つの過程の第一の反応では、グルコアミラーゼによりグリコーゲンをグルコースに加水分解する⁵⁷⁾。次いで、生成したグルコースをグルコースオキシダーゼにより酸化するとともに、過酸化水素を発生させる⁵⁸⁾。最後は乳酸ピルビン酸測定と同様に、この過酸化水素を電子受容体、蛍光原基質ADHPを電子供与体とするペルオキシダーゼ反応により、ADHPを酸化して蛍光色素レゾルフィンに変換する^{45, 46)}。反応②、③のグルコースからレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので、適切なグルコース濃度範囲においてレゾルフィン

の蛍光強度はグルコース濃度に比例する。本研究では、このような定量原理に沿って実験系を検討することを目的とし、さらに本法の検出限界、蛍光定量機器の代用、細胞実験への適用可能性等を検討した。

2-2-2 実験材料ならびに方法

2-2-2-1 試薬等

ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 は理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城）から購入した。DMEM、FBS、Penicillin-Streptomycin、PBS (pH 7.4)、bicinchoninic acid (BCA) アッセイキットは Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) から購入した。ADHP はフナコシ株式会社（東京）から購入した。ペルオキシダーゼ（西洋ワサビ由来）はオリエンタル酵母工業株式会社（東京）から購入した。グルコアミラーゼ (*Rhizopus* sp.由来)、グルコースオキシダーゼ (*Aspergillus niger* 由来)、グルコース CII テストワコーは和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。

2-2-2-2 細胞培養

細胞内グリコーゲン量の定量の検討は、ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 細胞を用いて行った。HepG2 細胞は 2-1-2-2 で示した通りに継代維持を行った。

2-2-2-3 細胞実験

実験前日に細胞を 6-well プレートに 1.25×10^5 cells/cm² になるように播種した。実験時の培地には KHH バッファーを用いた^{21, 22)}。KHH バッファーの組成は 2-1-2-3 で示した通りである。グルコースを培地に添加する場合は濃度を 11 mM とした。グルコース添加後、所定の時間培養後、培地を取り除き、PBS で 1 回洗浄した。PBS を 500 μ L 加え、セルスクレーパーでウェル底面より細胞を回収し、1.5 mL 容マイクロチューブに移した。再度プレートに PBS を 500 μ L 加え、残りの細胞を回収した。続いてラボ用冷却遠心機 3-16KL（久保田商事株式会社、東京）で 825 \times g、5 分間遠心し、上清の PBS を除去した。得られた細胞ペレットに新しい PBS を 500 μ L 加え、ソニケーター Vibra-Cell™（Sonics & Materials, Inc., CT, USA）で 30 秒間超音波処理を行った。これをグリコーゲン測定用サンプルとした。

2-2-2-4 グリコーゲンの定量

2-2-2-4-1 保存液等の調製

グリコーゲン（カキ由来、分子栄養生物学研究用特製試薬、ナカライテスク株式会社、京都）を PBS で 10 mg/mL の濃度に調製し、冷蔵庫中で保存した。グ

ルコアミラーゼ酵素原液 (25 U/mL)、1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) はいずれも超純水で調製し、用時まで冷蔵保存した。蛍光原色素 ADHP は 10 mM となるようジメチルスルホキシド (DMSO) で調製し、用時まで -20°C で冷凍保存した。

2-2-2-4-2 グルコアミラーゼ処理によるグリコーゲンの分解

上記のように調製したグリコーゲン測定用サンプル 190 μL と 1 M 酢酸緩衝液 10 μL それぞれを 2 つの 1.5 mL 容マイクロチューブに取り、よく混和した。2 つのチューブの片方にはグルコアミラーゼ酵素液 (25 U/mL グルコアミラーゼ酵素原液 1 容と 1 M 酢酸緩衝液 19 容の混液) を、もう片方にはグルコアミラーゼを含まないブランク液 (超純水 1 容と 1 M 酢酸緩衝液 19 容の混液) を 50 μL 加えよく混和させた (最終濃度: 230 mM 酢酸緩衝液、0.25 U/mL グルコアミラーゼ)。あらかじめ 55°C に設定したヒートブロックでこれらの混液を 30 分加温し、グリコーゲンをグルコースに分解した。加温後、5 N NaOH 溶液を 5 μL 加え混液の pH を 6 付近に調整し、氷冷した。

2-2-2-4-3 グルコース濃度の定量

グルコアミラーゼ処理によるグリコーゲンの分解で生成したグルコースは、Fig. 7 に示す②と③の酵素反応を 1 つのチューブ内で連続させて生じるレゾルフインの蛍光を測定するグルコースオキシダーゼ法で定量した。過去の研究^{45, 46, 58)}を参考に調製した蛍光発光グルコース定量試薬混液 (pH 7.0、150 mM リン酸緩衝液 0.65 U/mL グルコースオキシダーゼ、9.0 U/mL ペルオキシダーゼ、10 μM ADHP) 140 μL とグルコアミラーゼ処理サンプル 10 μL を黒色 96-well 平底マイクロプレートに加え、マイクロプレートミキサーで混和させた。その後 37°C で 10 分インキュベーションし、マイクロプレート対応蛍光分光光度計 VarioskanTM LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を用いて励起波長 $\text{Ex}=525\text{ nm}$ 、蛍光波長 $\text{Em}=585\text{ nm}$ における蛍光強度を測定した。また、リアルタイム定量 PCR システム Mx3000P (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) で蛍光強度を測定する場合は、蛍光発光グルコース定量試薬混液とグルコアミラーゼ処理サンプルを PCR 用チューブに取り、同様に反応させた後、ROX フィルターを用いて蛍光強度を測定した。

100-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のグリコーゲン標準液を測定する場合は、グルコースオキシダーゼ法に基づく比色定量用キットであるグルコース CII テストワコーを用いた。透明の 96-well 平底マイクロプレートに発色試薬 140 μL とサンプル 10 μL を取り、 37°C で 10 分間反応させた後、マイクロプレート対応分光光度計 Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を用いて 505 nm における吸光度を測定した。

2-2-2-4-4 グリコーゲン標準曲線および細胞内総グリコーゲン量の算出

細胞内総グリコーゲン量の算出のための標準曲線は、グリコーゲン保存液を適宜希釈して調製した標準液について、上記のように処理して得られた蛍光強度または吸光度に基づいて作成した。細胞内総グリコーゲン量は、Varioskan™ LUX マルチモードマイクロプレートリーダーを用いて得られたデータを採用し、グルコアミラーゼ処理試料のデータからグルコアミラーゼ未処理試料のデータを差し引いて算出した。

2-2-2-5 タンパク質濃度測定

細胞サンプル中のタンパク質濃度は BCA アッセイキットを用いて測定した。付属の A 液と B 液を 50 : 1 の割合で混和させ、これを発色液とした、牛血清アルブミン (BSA) を標準とし、560 nm における吸光度を測定した。細胞内グリコーゲン量はタンパク質 1 µg あたりで表した。

2-2-2-6 統計解析

統計ソフトは IBM SPSS Statistics ver.20 for Japan (日本アイ・ビー・エム株式会社、東京) を用いた。2 変数間の関係の強さを分析するために Pearson の積率相関係数を算出した。さらに、独立変数 (グリコーゲン濃度) が従属変数 (蛍光強度または吸光度) をどの程度説明できるのか調べるために単回帰分析を行い、決定係数を算出した。平均値の差を検定するために、一元配置分散分析後に Tukey HSD による多重比較を行った ($P < 0.05$)。

2-2-3 結果と考察

2-2-3-1 定量可能レンジの検討

本研究は、Fig. 7 に示す 3 つの酵素反応過程を組み合わせ、安価かつ高感度にグリコーゲンを定量できる酵素蛍光法を検討した。酵素蛍光法は感度が高い反面、様々な要因の影響を受けるので、基質濃度と蛍光強度の間の線形性を把握する必要がある。そこで、0、1.2、2.4、4.8、12、24、50、120、240 µg/mL グリコーゲン溶液を用いて本法の定量可能レンジを検討した。測定はグルコアミラーゼ処理試料、未処理試料共に各グリコーゲン濃度 1 点ずつ行った。その結果、グリコーゲン濃度 24 µg/mL までは直線的に蛍光強度が増加していたが、50 µg/mL 以上の高濃度になるとむしろ蛍光強度が急激に低下し、240 µg/mL では蛍光を検出できなかった (Fig. 8)。グリコーゲンが高濃度になると蛍光強度が検出できなくなる結果については、第 2 章第 1 部の 2-1-3-1 でも示した通り、蛍光原基質 ADHP の特性によるものであると考えられる^{46, 47)}。

なお、グルコアミラーゼ未処理試料も同時に定量した結果、試料中のグリコ

ーゲン濃度依存的に蛍光強度が増強した。この原因として、グリコーゲン標品中のグルコースの混在、あるいはグリコーゲンの非酵素的分解等の可能性が考えられる。

以上の蛍光原基質 ADHP の特性とグルコアミラーゼを未処理試料の結果を踏まえると、グリコーゲンの濃度を適切な量 (20 $\mu\text{g/mL}$ まで) に適宜希釈し定量に用いることが定量系の設計および結果の解釈に重要であると考えられた。

2-2-3-2 グルコアミラーゼ処理時間の検討

実験プロトコルをさらに最適化するため、Fig. 7 中の①に当たるグルコアミラーゼによる処理時間を検討した。グリコーゲン溶液の濃度は 0、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ とし、各濃度 1 点ずつ測定した。グルコアミラーゼ処理時間が 15 分までは時間の経過とともに蛍光強度が増加したが、30 分以降ではほぼ一定となった (Fig. 9A)。また、グルコアミラーゼ処理時間 30 分について、グリコーゲン標準液の蛍光強度をグラフに示した (Fig. 9B)。その結果グリコーゲン濃度と蛍光強度間の相関係数は 0.998 で有意な正の相関が認められた ($P=0.002$, $n=4$)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=22.4x+16.3$ で示され、決定係数 R^2 は 0.996 ($P=0.002$) であり、良好な直線性が得られた。

以上の結果を踏まえて本法ではグルコアミラーゼ処理時間を蛍光強度がほぼ最大となる 30 分とした。また、本法において測定上限値が 20 $\mu\text{g/mL}$ であることが示唆された。サンプルの添加量が 190 μL であることを踏まえ g に換算すると 3.8 μg となった。

2-2-3-3 種々の濃度に調製したグリコーゲン標準液の検量線の検討

本酵素蛍光法の検出限界を調べるため、グリコーゲン濃度 2 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度域における蛍光強度の用量反応性を検討した。測定は各グリコーゲン濃度 1 点ずつ行った。その結果、0-2 $\mu\text{g/mL}$ の場合、グリコーゲン濃度と蛍光強度の間に良好な直線性が認められた (Fig. 10A)。両者の相関係数は 0.998 で有意な正の相関が認められた ($P<0.001$, $n=6$)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=11.8x+2.74$ で示され、決定係数 R^2 は 0.996 ($P<0.001$) であった。なお、グリコーゲン濃度が 0.1 $\mu\text{g/mL}$ を下回ると蛍光はほぼ検出されなかった。したがって、2-2-3-2 の結果も踏まえると、本法のグリコーゲン定量範囲は 0.1-20 $\mu\text{g/mL}$ (0.019-3.8 μg) であると考えられた。

一方、試料中のグリコーゲン濃度が 50 $\mu\text{g/mL}$ を超える場合は、Fig. 8 のように本酵素蛍光法による定量は不適切である。そこでグルコアミラーゼ反応までは本法の通りに行い、グルコアミラーゼ処理後のサンプル中グルコース濃度を定量する際は本法蛍光法ではなく従来の比色法を用いて定量した (Fig. 10B)。測

定は各グリコーゲン濃度 1 点ずつ行った。その結果、グリコーゲン濃度と吸光値間の相関係数は 0.999 で有意な正の相関が認められた ($P<0.001$, $n=6$)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=0.0004x+0.062$ で示され、決定係数 R^2 は 0.999 ($P<0.001$) であった。グルコアミラーゼを添加していない群も同時に定量したが、比色法では遊離グルコースが検出限界以下 ($100 \mu\text{g/mL}$ 以下) であった。

以上の結果より、定量したいサンプル中のグリコーゲン濃度に合わせて本酵素蛍光法と従来の比色法を採用することにより様々なサンプル中のグリコーゲン濃度の定量に応用が可能であることが示された。

2-2-3-4 リアルタイム定量 PCR システム Mx3000P の利用性に関する検討

続いて、本酵素蛍光法がリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P においても測定が可能か調べた。グリコーゲン濃度 $0-20 \mu\text{g/mL}$ の試料について、実際にリアルタイム定量 PCR システムで測定した。測定は各グリコーゲン濃度 1 点ずつ行った。 $2 \mu\text{g/mL}$ までは直線性が保たれていたが、 $5-10 \mu\text{g/mL}$ 付近で蛍光強度は上限に達した (Fig. 11A)。そこで直線領域である $0-2 \mu\text{g/mL}$ を抜粋し、新たにグラフを作成した (Fig. 11B)。グリコーゲン濃度と蛍光強度間の相関係数を調べたところ、0.998 で有意な正の相関が認められた ($P<0.001$, $n=6$)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=21785x+4276$ で示され、決定係数 R^2 は 0.996 ($P<0.001$) であり、良好な直線性が確認された。また、同様の条件で調製した試料について蛍光プレートリーダーで測定した結果を Fig. 11C に示す。グリコーゲン濃度と蛍光強度間の相関係数は 0.999 で有意な正の相関が認められた ($P<0.001$, $n=9$)。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=30.9x+6.39$ で示され、決定係数 R^2 は 0.999 ($P<0.001$) であった。

以上より、定量上限値は低下するが ROX フィルターを備えたリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P は、マイクロプレート対応蛍光分光光度計プレートリーダーを代行して、本酵素蛍光法に利用可能であることが示された。その定量可能範囲は $0.1-2 \mu\text{g/mL}$ ($0.019-0.38 \mu\text{g}$) であった。

2-2-3-5 HepG2 細胞のグリコーゲン量の消長の検討

続いて HepG2 細胞を用いて実験を行った。HepG2 細胞は長年ヒト肝臓代替モデルとして広く使用されている培養細胞株であり、グリコーゲンを合成・蓄積することができる⁵⁹⁾。そこで、本酵素蛍光法を用いて HepG2 細胞の細胞内グリコーゲン量の消長を検出可能か検討した。

2-2-3-5-1 グルコース非含有培養液で培養した際の細胞内グリコーゲン量の変化

肝臓内グリコーゲンは空腹時に分解されて、エネルギーまたは血糖値維持のために利用される⁵¹⁾。そこでまず、グルコース非含有 KHH バッファーで培養した際の細胞内のグリコーゲン蓄積量に与える影響を、本酵素蛍光法により検出が可能であるか検討した。実験方法については、詳細を Fig. 12A に示す。実験開始前の細胞内に含まれているグリコーゲン量、すなわち 0 h 時点における細胞内グリコーゲン量は 6.81 ng/ μ g protein (タンパク質標準化前のサンプル中グリコーゲン濃度 : 5.4 μ g/mL) であった。過去の報告⁶⁰⁻⁶²⁾によると、HepG2 細胞ではおよそ 4-10 ng/ μ g protein のグリコーゲンが含まれており、本研究の結果はこれらの既報値とよく一致した。一方、細胞内グリコーゲン量は、グルコースを含まない培地に交換してから 2 時間後で既に、初期値のおよそ 15% へと著しく減少しており、4 時間後ではグリコーゲンはほぼ検出できなくなるまで枯渇していた (Fig. 12B)。

2-2-3-5-2 細胞内グリコーゲン枯渇状態からの回復とインスリンの作用

続いて、HepG2 細胞をグルコース非含有 KHH バッファーで培養して細胞内グリコーゲンを枯渇させ、その後培養液にグルコースを添加した際の細胞内グリコーゲン量の回復を調べた。細胞内グリコーゲン枯渇状態からの回復の実験方法については、詳細を Fig. 13A に示す。グルコースを含まない培養液で 2 時間培養し、細胞内のグリコーゲンを枯渇させた 0 h 時点では 0.69 ng/ μ g protein (タンパク質標準化前のサンプル中グリコーゲン濃度 : 0.78 μ g/mL) であったが、グルコースを添加すると細胞内グリコーゲン量は急速に回復し、グルコース添加 4 時間後では Fig. 12B で示した実験前の細胞内グリコーゲン量とほぼ同水準まで回復した (Fig. 13B)。

生体内において、インスリンは肝臓におけるグリコーゲンの合成を促進するとされている⁶³⁾。そこでグリコーゲン枯渇状態からの回復過程におけるインスリンの影響を調べた。しかしながら、インスリン添加による細胞内グリコーゲン量に有意な影響は見られなかった (Fig. 14)。以上の結果より、細胞内グリコーゲンが枯渇している状態で培養液にグルコースが添加されるとすみやかにグリコーゲンを再合成することと、グリコーゲン回復過程におけるインスリンの影響は表れないことが示唆された。また、今までの先行研究において、HepG2 細胞はインスリン抵抗性のような特徴も持ち合わせており、培養液にインスリンを添加しても HepG2 細胞内のグリコーゲン量に変化しなかったという報告がいくつか挙げられている^{64, 65)}。グリコーゲン蓄積に対するインスリンの影響が見られなかった理由として、上述したような HepG2 細胞の特徴が関わっている可能

性も考えられた。

以上の結果より、本酵素蛍光法は培養細胞内のグリコーゲンを高感度で定量することが可能であり、さらに培養条件によるグリコーゲン量の消長を鋭敏に検出できることが明らかとなった。

2-2-4 結語

本研究では、グルコアミラーゼによるグリコーゲンの分解で生成するグルコースを、蛍光原基質 ADHP を用いてグルコースオキシダーゼ法で検出する、グリコーゲンの高感度定量法を検討した。本法の定量範囲は 0.1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.019-3.8 μg) であり、培養細胞スケールのグリコーゲンの定量に活用できることが明らかとなった。また、本法は ROX フィルター装着リアルタイム定量 PCR システムを用いる蛍光測定への適用が可能 (定量範囲 : 0.1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.019-0.38 μg)) であった。さらに、培養肝細胞 HepG2 を用いて培養液の栄養状態による細胞内グリコーゲン量の消長を本研究の手法により検出することを可能とした。

なお、第 2 章第 2 部は現在十文字学園女子大学 紀要に受理された『培養細胞内グリコーゲンの定量のための酵素蛍光法の構築』を一部加筆・修正を行い、博士論文の一部としてまとめたものである。

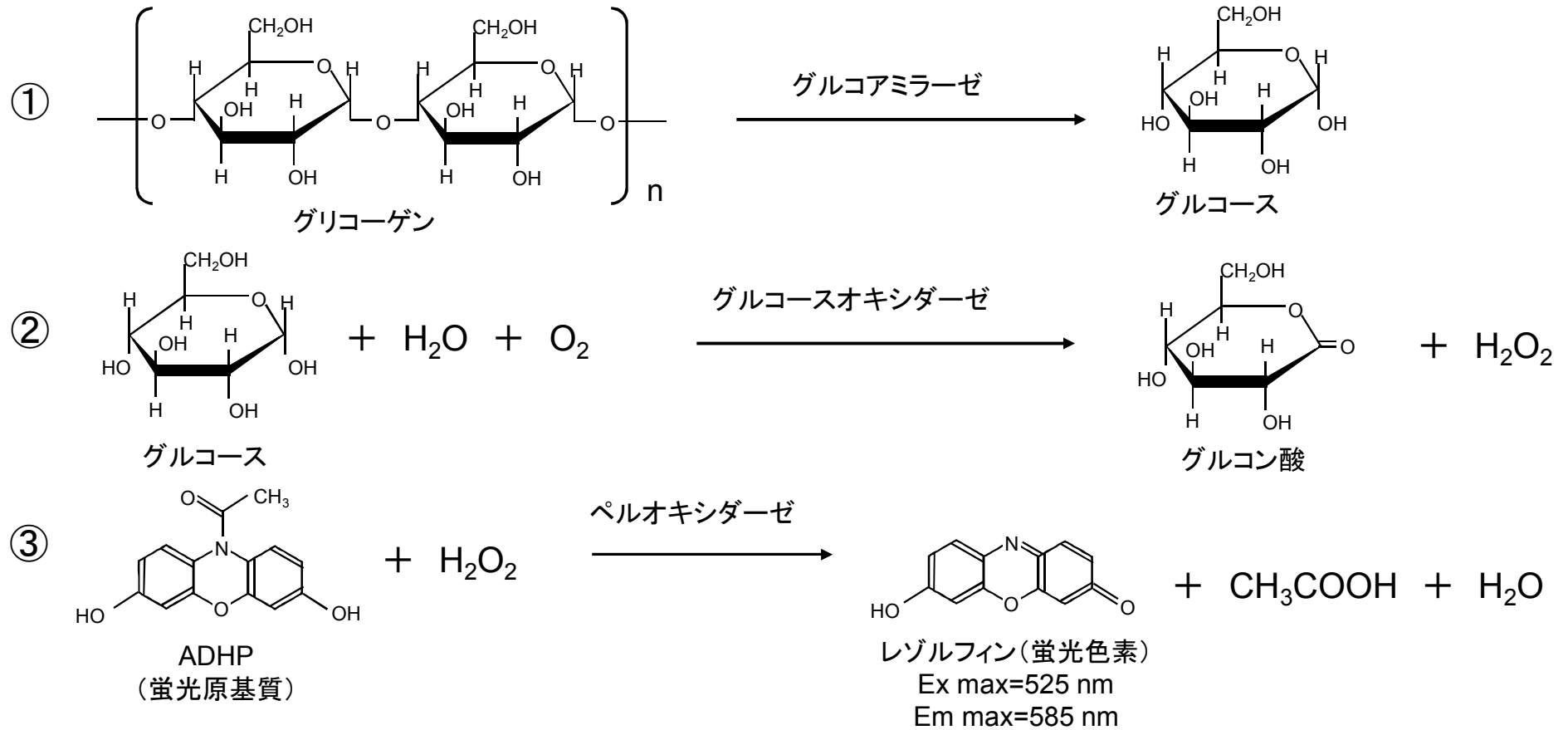


Fig. 7. 本研究におけるグリコーゲン定量の反応過程.

本研究におけるグリコーゲン定量の3段階反応機構を示した. ①: 最初にグルコアミラーゼを利用してサンプル中のグリコーゲンをグルコースに分解する. ②: グルコースをグルコースオキシダーゼにより酸化し, グルコン酸と同時に過酸化水素を生成させる. ③: 蛍光原基質10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) を②で生成した過酸化水素とペルオキシダーゼの作用により蛍光色素レゾルフィンに変換する. グルコースからレゾルフィン生成に至る反応は化学量論的に行われるので, 適切なグルコース濃度範囲ではレゾルフィンの蛍光強度はサンプル中のグルコース濃度, すなわちグリコーゲン濃度に比例する.

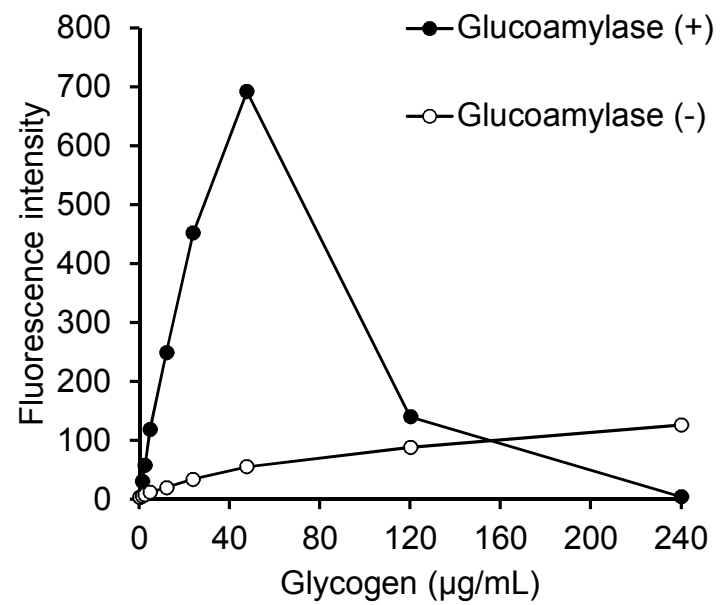


Fig. 8. グリコーゲン定量レンジの確認.

グリコーゲン標準液を0-240 μg/mLに調製し、本法の定量可能レンジの検討を行った。グルコアミラーゼ未処理サンプルも同様に実験を行った。

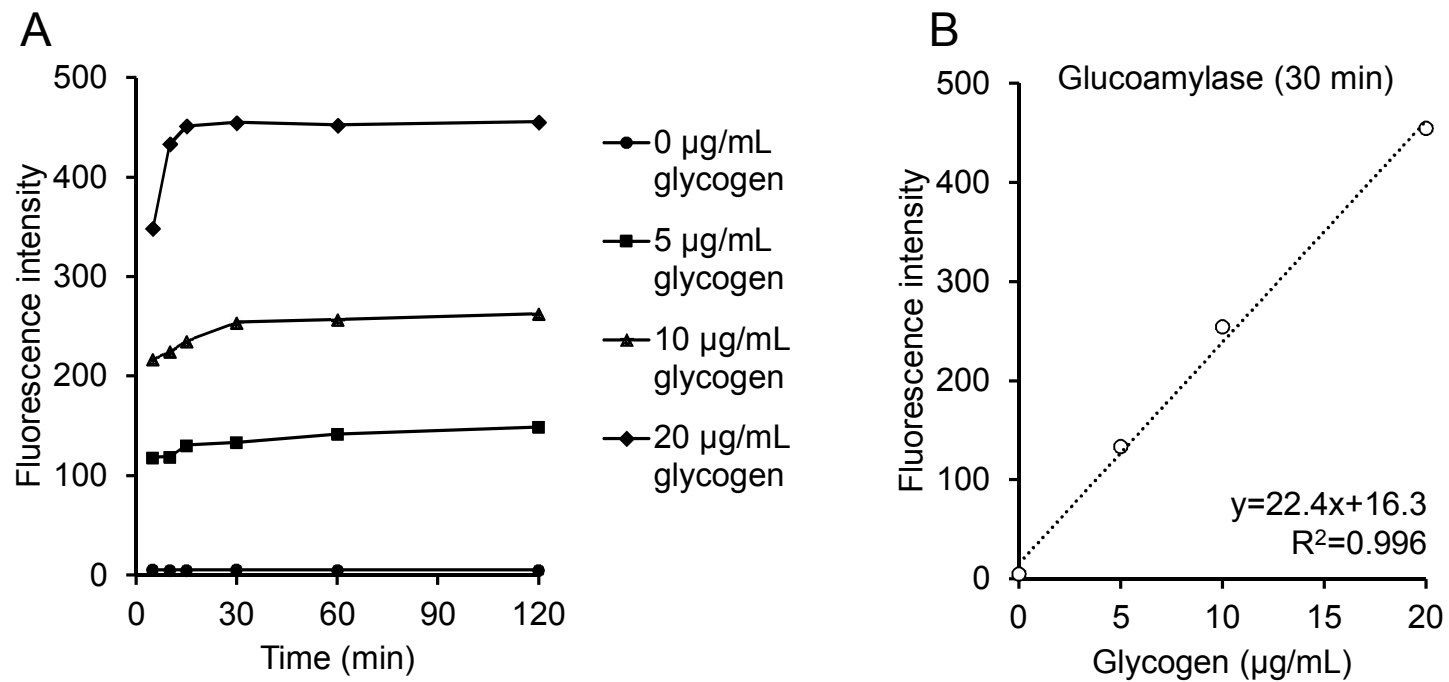


Fig. 9. グルコアミラーゼ処理時間による蛍光強度の変化.

グルコアミラーゼ処理時間を5-120分とし、処理後のサンプル中に含まれているグルコースを蛍光法で定量した. A: グルコアミラーゼ反応時間による蛍光強度の変化. B: グルコアミラーゼ反応30分時点におけるグリコーゲン濃度と蛍光強度の検量線. Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した (n=4).

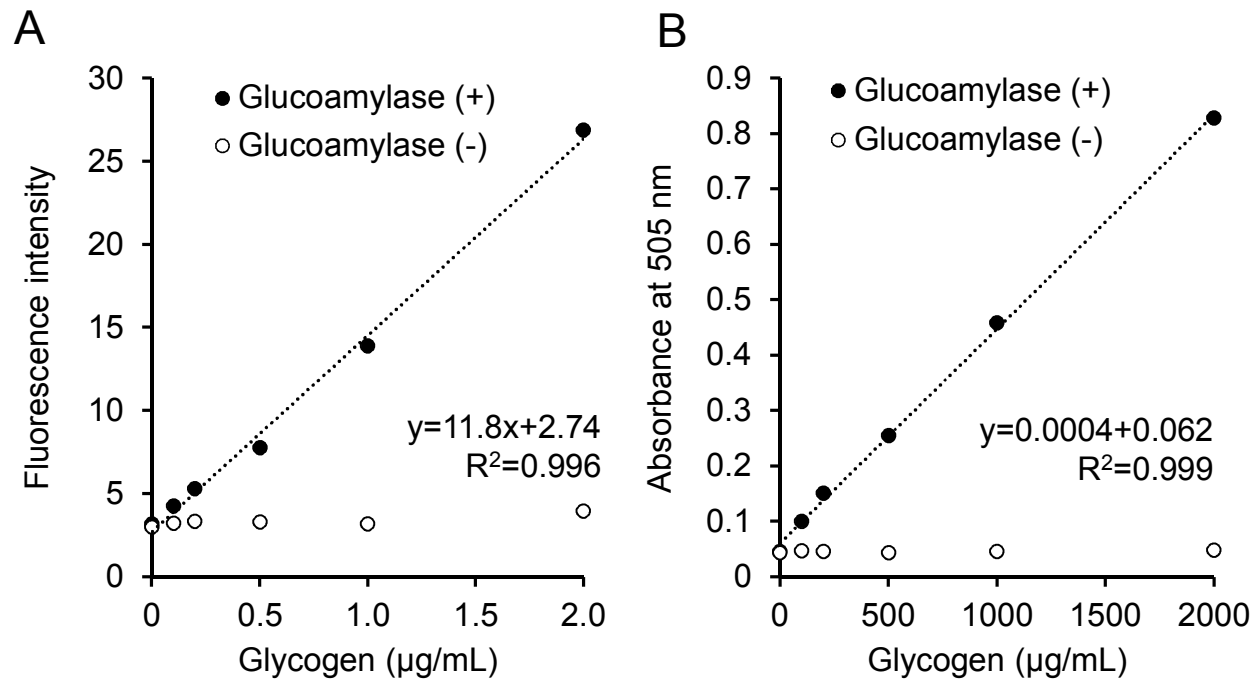


Fig. 10. 低濃度または高濃度グリコーゲン標準液の検量線の検討.

A: 本酵素蛍光法の検出限界値を調べるため低濃度 (0-2 $\mu\text{g/mL}$) のグリコーゲン標準液で定量した (n=6). B: 高濃度 (0-2000 $\mu\text{g/mL}$) のグリコーゲン標準液について, グルコアミラーゼ反応までは同様に行い, サンプル中に含まれているグルコースは比色法で定量した (n=6). AとBいずれもPearsonの積率相関係数を算出したのち, 単回帰分析により決定係数を算出した.

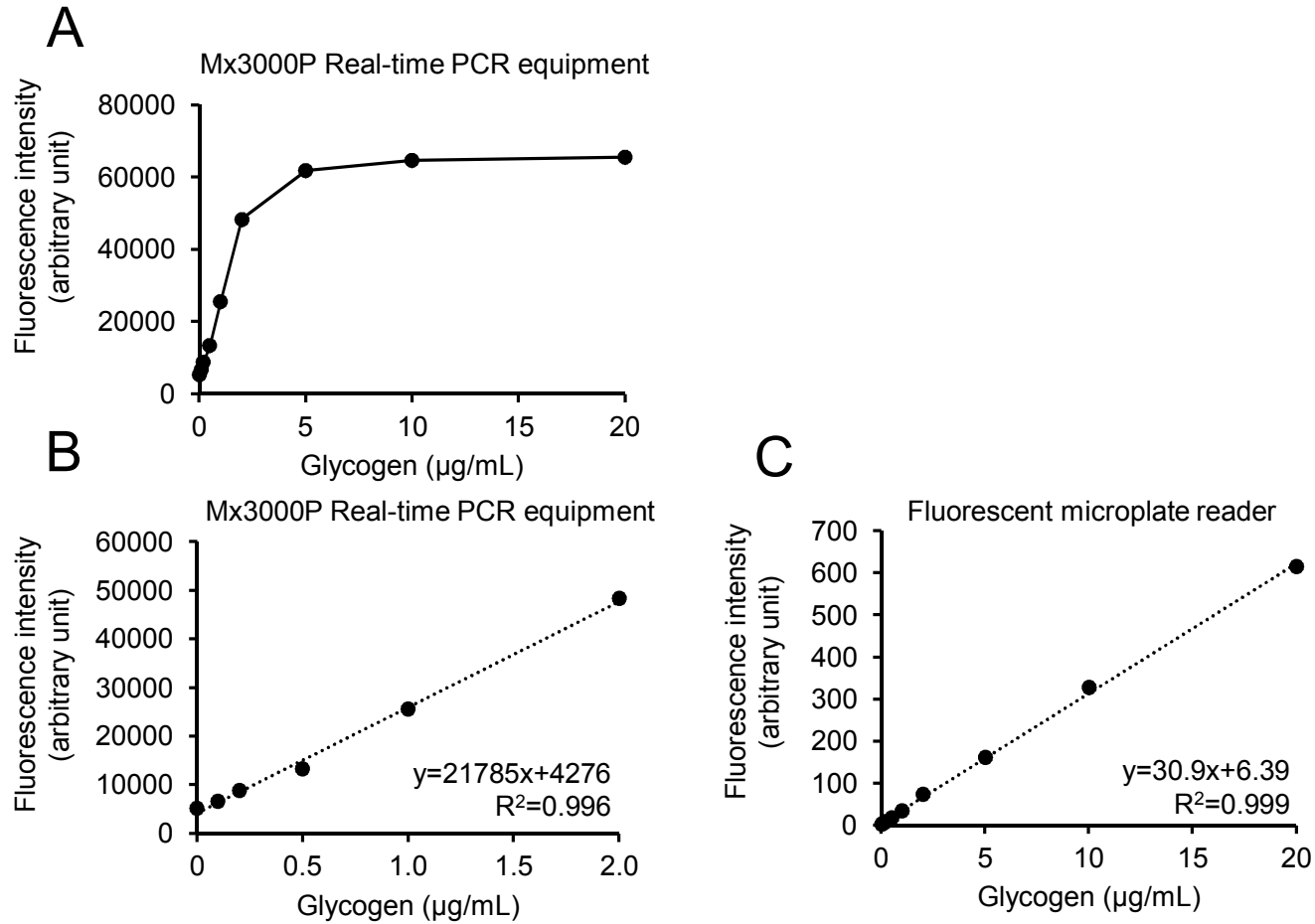


Fig. 11. リアルタイム定量PCRシステムMx3000Pの利用性に関する検討.

0-20 µg/mLグリコーゲン標準液を調製し、リアルタイム定量PCRシステムMx3000PのROXフィルターを用いて蛍光強度を測定した.

また、蛍光プレートリーダーでも同様に蛍光強度を測定した. A : Mx3000Pで測定した0-20 µg/mLグリコーゲン標準液の蛍光強度.

B : Mx3000Pで測定した0-2 µg/mLグリコーゲン標準液の蛍光強度と検量線 (n=6) . C : 蛍光プレートリーダーで測定した0-20 µg/mL

グリコーゲン標準液の蛍光強度と検量線 (n=9) . Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した.

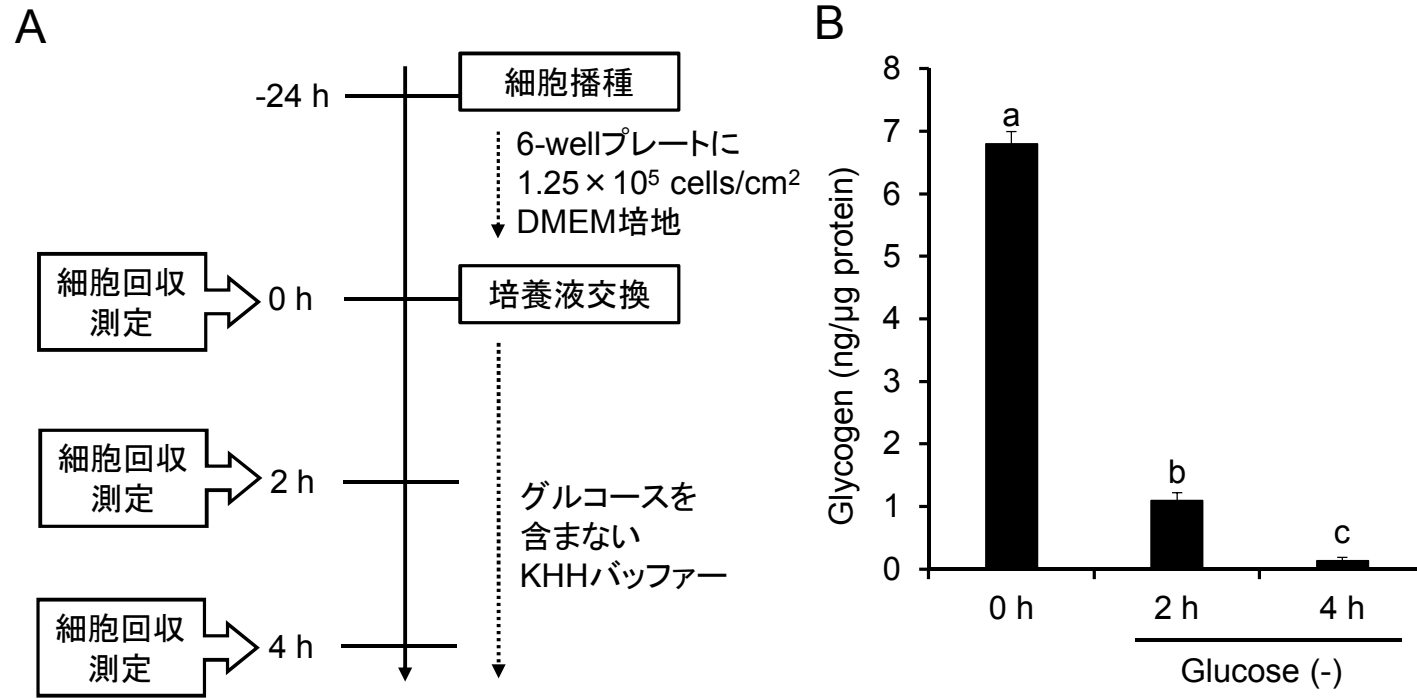


Fig. 12. グルコース非含有培養液で培養した際の細胞内グリコーゲン量の変化。
 実験前日にHepG2細胞をDMEM培地中に懸濁させ、6-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に培養液をグルコース非含有KHHバッファーに交換し、培養0, 2, 4時間後に細胞を回収してグリコーゲン量を定量した。細胞内グリコーゲン量はタンパク質量で標準化した。A：実験スケジュール。B：細胞内グリコーゲン量。値は平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析後、Tukey HSDによる多重比較を行った。異なるアルファベット間に有意差あり (P<0.05)。

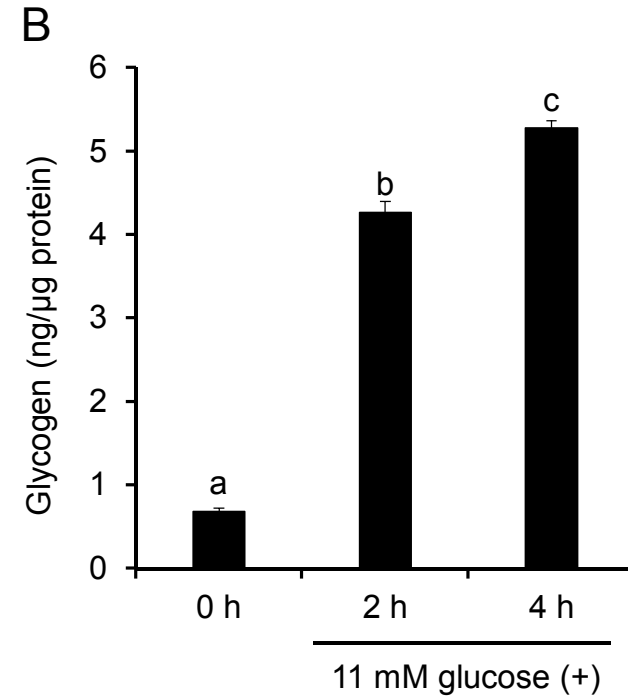
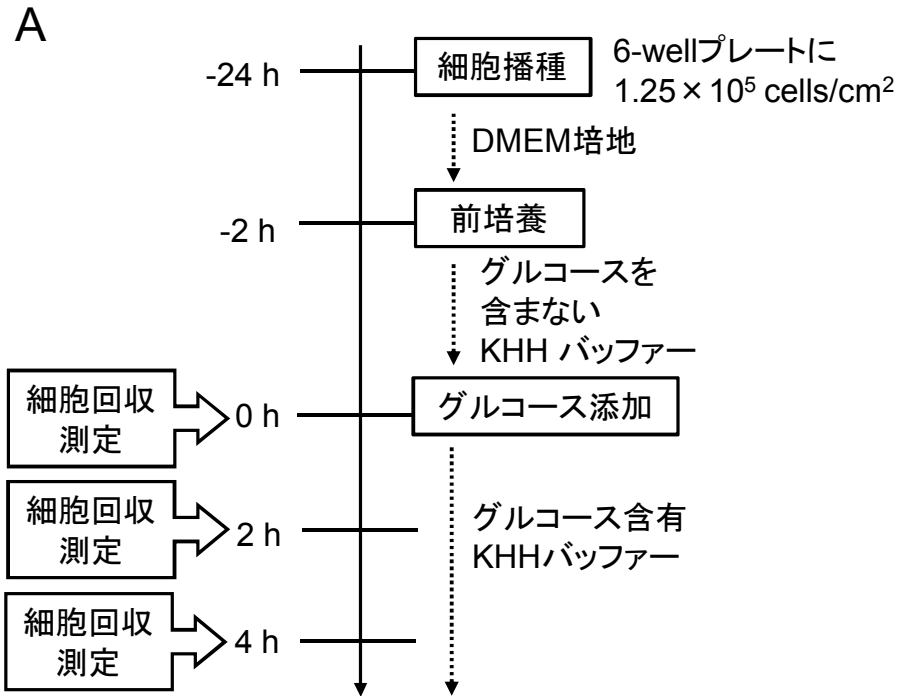


Fig. 13. グリコーゲン枯渇状態からの細胞内グリコーゲン量の回復.

実験前日にHepG2細胞をDMEM培地中に懸濁させ、6-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に培養液をグルコース非含有KHHバッファーに交換し、2時間培養することで細胞内グリコーゲン量を枯渇させた。その後11 mMのグルコースを含むKHHバッファーに交換し、培養0, 2, 4時間後に細胞を回収してグリコーゲン量を定量した。細胞内グリコーゲン量はタンパク質量で標準化した。A：実験スケジュール。B：細胞内グリコーゲン量。値は平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析後、Tukey HSDによる多重比較を行った。異なるアルファベット間に有意差あり ($P < 0.05$)。

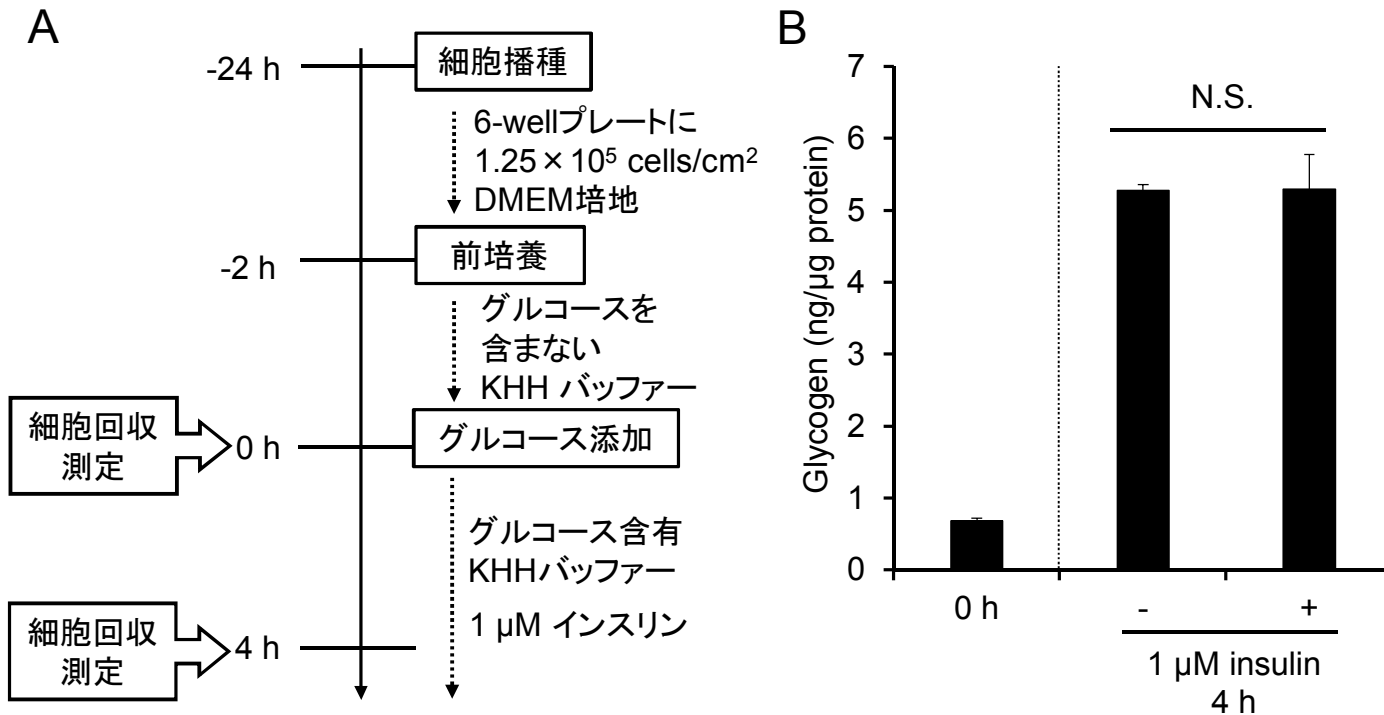


Fig. 14. グリコーゲン蓄積に対するインスリンの影響.

実験前日にHepG2細胞をDMEM培地中に懸濁させ、6-wellプレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した. 翌日に培養液をグルコース非含有KHHバッファーに交換し、2時間培養することで細胞内グリコーゲン量を枯渇させた. その後11 mMのグルコースを含むKHHバッファーに交換し、インスリンを試験物質として1 μM加えた. 培養4時間後に細胞を回収し、グリコーゲン量を定量した. 細胞内グリコーゲン量はタンパク質量で標準化した. A: 実験スケジュール. B: 細胞内グリコーゲン量. 値は平均値±標準誤差 (n=4). 対応のないt検定で平均値の差を検定した. N.S.: not significant.

2-3 細胞内 ATP 測定への化学発光イメージング解析の応用

2-3-1 研究の背景ならびに目的

ATP はアデノシンのリボースの 5'位のヒドロキシル基にリン酸が 3 分子連続して結合したヌクレオチドである。1 分子中に高エネルギーリン酸結合を 2 個含み、生体におけるエネルギーの獲得および利用に重要な役割を果たしている⁶⁶⁾。ATP を含む高エネルギーリン酸化合物はそのはたらきから「エネルギーの通貨 (energy currency)」とも呼ばれている。生体内において ATP は主にミトコンドリア内の酸化的リン酸化により生成される。そのため、ATP はミトコンドリアの機能を調べるための重要な指標の一つであり、様々な分野の研究で測定されている。

ATP の測定方法には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用した方法⁶⁷⁾ やグリセロールのリン酸化を利用した比色もしくは蛍光法^{68, 69)} などがあるが、その中でもルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた生物発光による測定法が広く用いられている⁷⁰⁻⁷²⁾。

ルシフェラーゼとはホタルなどが行う生物発光において、発光性物質であるルシフェリンの酸化反応を触媒する発光性酵素の総称である。ルシフェラーゼやルシフェリンは発光生物の種類ごとに特有の構造をしており、生物種の名前をとってホタルルシフェラーゼ、ホタルルシフェリンのように呼ばれることが多い。ホタルの場合、ルシフェリンは ATP、酸素、 Mg^{2+} イオン存在下でルシフェラーゼと反応し、2 段階の反応を経て励起状態のオキシルシフェリンを生成する。これが基底状態へ移動する際に差分のエネルギーが可視光として放出される⁷³⁾。この発光量は ATP 量に比例するため、発光量を測定することによりサンプル中の ATP 量を求めることができる。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応機構は Fig. 15 に示す。また、このルシフェリン-ルシフェラーゼ法は迅速かつ簡便であることから、食品製造工場などの機械・器具類に付着している細菌などの汚染物質を検出する方法として厚生労働省監修の「食品衛生検査指針微生物編 2004」にも掲載されており、簡易測定キットも販売されている⁷⁴⁾。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いて ATP 量を実際に定量する際は発光量を計測できる特殊なルミノメーターが必要となるが、マイクロプレートも測定できる機種となると非常に高額であり、用途も限られる。本研究では、本学が保有する汎用性の高い装置であり、ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現の検出等で広く用いられるケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトを併用することにより ATP の定量が可能であるか検討することを目的とした。さらに、実際に培養細胞内の ATP 含有量の定量が可能であるか併せて検討

した。その方法と実際を報告する。

2-3-2 実験材料ならびに方法

2-3-2-1 試薬等

ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 は理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城）から購入した。DMEM、FBS、Penicillin-Streptomycin、PBS（pH 7.4）、BCA アッセイキットは Thermo Fisher Scientific, Inc.（MA, USA）から購入した。アネロパック®・ケンキ 5%、アネロパック専用角型ジャー、嫌気指示薬は三菱ガス化学株式会社（東京）から購入した。『細胞の』ATP 測定試薬™は東洋ビーネット株式会社（東京）から購入した。

2-3-2-2 細胞培養

細胞内 ATP 量の定量の検討は、ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 細胞を用いて行った。HepG2 細胞は 2-1-2-2 で示した通りに継代維持を行った。

実際に細胞実験を行う際は、血清などの影響を取り除くため実験用 DMEM（FBS、Penicillin-Streptomycin、フェノールレッド非含有）を用いて行った。実験用 DMEM にグルコースを添加する際は、Kawano らと Kamakura らの報告^{21、22}を参考に 11 mM とした。

2-3-2-3 HepG2 細胞の嫌気培養

気相の酸素濃度が 0.1%以下の環境で細胞を培養するため、アネロパック®・ケンキ 5%を使用した。アネロパック®・ケンキ 5%は気相の酸素濃度を 0.1%以下にすると同時に二酸化炭素濃度を 5%に維持する試薬である。アネロパック専用角型ジャーに細胞を播種した 96-well プレートを一枚、アネロパック®・ケンキ 5%を一袋、気相の酸素濃度を確認するために嫌気指示薬を一錠、気相の湿度を維持するために蒸留水を染み込ませたろ紙をセットして密封し、37°Cで培養した。角型ジャー内の酸素濃度が 0.1%以下となったことを嫌気指示薬で確認し、その時点を経験開始時刻とした。

2-3-2-4 ATP の測定

2-3-2-4-1 ATP 標準液の調製

ATP 標準液は動物培養細胞用 ATP 標準試薬（東洋ビーネット株式会社、東京）を参考にして調製した。アデノシン 5'-三リン酸二ナトリウム水和物を最終濃度が 10 mM となるように 10 mM HEPES 緩衝液（pH 7.75）に加えた。0.6 mL 容チューブに 100 μ L ずつ分注し、使用するまで -80°C で保存した。ATP の安定性の観点から凍結融解は 5 回までとした。

2-3-2-4-2 ATP の測定

ATP 濃度はルシフェリン-ルシフェラーゼ法に基づく『細胞の』ATP 測定試薬™を用いて測定した。操作は付属の説明書に準じて行った。測定には黒色 96-well プレート (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を使用し、操作は試薬の説明書に準じて行った。

ATP 発光試薬をサンプルと同量加えて 1 分間マイクロプレートミキサーで混合させ、その後 23°C で 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、96-well プレートをケミルミネッセンス撮影装置である Cool saver AE-6955 (アト一株式会社、東京) にセットし、露光時間を調節しながら画像を撮影した。発光強度は Image J (National Institutes of Health, MD, USA) を用いる画像解析により数値化した⁷⁵⁾。発光強度をヒストグラム化し、数値化できる Gel モードを使用した。ATP 標準液を用いて検量線を作成し、ATP を定量した。各サンプルの測定は下記の通り行った。

2-3-2-4-3 ATP 標準液の測定

10 mM ATP 標準液を PBS で任意の濃度に希釈した。その後、黒色の 96-well フラットボトムプレートに希釈した ATP 標準液を 100 μL ずつ添加した。ATP 発光液添加以降の操作は 2-3-2-4-2 と同様に行った。

2-3-2-4-4 細胞懸濁液中の ATP の測定

PBS 中に HepG2 細胞を懸濁させ、 $0-10 \times 10^4$ cells/well になるよう黒色の 96-well フラットボトムプレートに 100 μL 添加した。ATP 発光液添加以降の操作は 2-3-2-4-2 と同様に行った。

2-3-2-4-5 接着細胞中の ATP 濃度の測定

実験前日に HepG2 細胞を 8.75×10^4 cells/well の濃度で播種し、黒色の 96-well フラットボトムプレート底面に接着させた。翌日培養液を取り除き、すみやかに PBS で 2 回洗浄して接着細胞表面の培養液成分を取り除いた。その後 PBS を 100 μL 添加した。ATP 発光液添加以降の操作は 2-3-2-4-2 と同様に行った。

2-3-2-5 タンパク質濃度の測定

細胞のタンパク質濃度は 2-2-2-5 と同様の操作を行い測定した。

2-3-2-6 統計処理

統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics ver.20 for Japan (日本アイ・ビー・エム株式会社、東京) を用いた。2 変数間の関係の強さを分析するために Pearson の

積率相関係数を算出した。さらに、独立変数（ATP 濃度または細胞数）が従属変数（発光強度の面積または ATP 濃度）をどの程度説明できるのか調べるために単回帰分析を行い、決定係数を算出した。平均値の差を検定するため、1 要因の場合、2 群間では対応のない *t* 検定を、3 群以上では一元配置分散分析後に Tukey HSD による多重比較を行った ($P < 0.05$)。2 要因の場合は二元配置分散分析後に Bonferroni による多重比較を行った ($P < 0.05$)。

2-3-3 結果と考察

2-3-3-1 ATP 濃度測定レンジの確認

発光を測定する際は黒色プレートに比べ白色プレートは測定感度が 10 倍ほど高くなるため各試薬説明書には白色プレートを使用することが推奨されている⁷⁶⁾。そこで初めに白色プレートを用いて実験を行ったところ、隣の well へ散乱光が映り込み、個別 well の発光面積を算出することができなかった。(Fig. 16A)。この理由に、ケミルミネッセンス撮影装置付属の CCD カメラが well 以外の箇所も撮影し、散乱光を検出している事が考えられた。一方黒色プレートを用いた場合は well に沿って発光を検知することができた (Fig. 16B)。以上より本法で ATP を測定する場合は黒色プレートを用いて実験を行った。

続いて ATP の測定レンジを確認するため、ATP 標準液の濃度を 10^{-2} M (10 mM) から 10^{-10} M (100 pM) まで 10 倍ずつ変化させて実験を行った。黒色の 96-well フラットボトムプレートに ATP 標準液と ATP 発光試薬を反応させ、ケミルミネッセンス撮影装置で撮影した実際の画像を Fig. 17 に示す。30 秒露光させたところ、 10^{-2} M (10 mM) から 10^{-5} M (10 μ M) まで発光を感知することができた (Fig. 17A)。さらに露光時間を 10 分としたところ、 10^{-7} M (100 nM) まで感知することができた (Fig. 17B)。データには示していないが、10 分以上露光させても 10^{-7} M (100 nM) より低濃度では発光を感知することができなかった。

『細胞の』ATP 測定試薬TM 付属の説明書によると、ルミノメーターを使用すれば 10^{-10} M (100 pM) まで測定が可能である。本法はそれよりも感度が低いが、サンプルに合わせて露光時間を調節することにより、様々な濃度の ATP の測定が可能となることが示唆された。

2-3-3-2 ATP 検量線の直線性の確認

標準試料の吸光度や発光値を利用することにより対象物質を相対的に定量する場合、標準試料の検量線の作成が必須である⁷⁷⁾。そこで、ATP 検量線の直線性を確認するため、ATP 標準液の濃度を 10 μ M から 100 μ M まで 10 μ M 刻みとし、露光時間を 10 秒に設定して実験を行った。解析に使用した画像を Fig. 18A に示す。これらの発光スポット画像を画像解析ソフト Image J を用いてヒストグ

ラム化した (Fig. 18B)。それぞれのピーク面積値をグラフに示すと、80 μM 以上で過剰露光状態となり、0-100 μM 全体ではシグモイド曲線となった (Fig. 18C)。そこで、この中の直線領域である 10-70 μM までの箇所を抜粋してグラフを作成した (Fig. 18D)。その結果、ATP 濃度とピーク面積値間の相関係数は 0.998 ($P<0.001$, $n=7$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=313x-2927$ で示され、決定係数 R^2 は 0.994 ($P<0.001$) であった。

一方、培養細胞内に含まれている ATP 量は、ラット由来初代グリア細胞ではおよそ 0.15 nmol/mg protein⁷¹⁾、ヒト肝ガン細胞由来 HepG2 細胞ではおよそ 10 nmol/mg protein⁶⁹⁾ や 5 nmol/mg protein⁷¹⁾、マウス由来 3T3-L1 前脂肪細胞ではおよそ 30 nmol/mg protein⁶⁸⁾、ラット骨格筋由来 L6 細胞ではおよそ 20 nmol/mg protein⁶⁷⁾ と報告されている。培養条件、細胞の種類や数が異なるが、これらの値を本研究の実験系に当てはめて換算するとおよそ 1-3 μM の ATP 濃度に相当する。そこでさらに、ATP 標準液の濃度を 0、0.5、1、1.5、2、5、10 μM とし、露光時間を 1 分に設定して実験を行った。解析に使用した画像を Fig. 19A に示す。これらの発光スポット画像を画像解析ソフト Image J を用いてヒストグラム化した (Fig. 19B)。それぞれのピーク面積値をグラフに示した (Fig. 19C)。その結果、ATP 濃度とピーク面積値間の相関係数は 0.999 ($P<0.001$, $n=7$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=2289x-643$ で示され、決定係数 R^2 は 0.998 ($P<0.001$) であった。

以上の結果より、本法はルミノメーターを使用した際の感度よりも低いですが、露光時間や測定範囲の調節により 96-well プレートスケールで培養細胞を用いた実験には適用可能な手法であることが示された。

2-3-3-3 細胞懸濁液中の細胞数と ATP 量の関係

続いて、実際の培養肝細胞 HepG2 を用いて実験を行った。ATP 含有量と細胞数との相関は高く、培養細胞の細胞数や細胞活性の測定に利用されている⁷⁸⁾。そこで、細胞数が 0-10 $\times 10^4$ cells/well になるように調製し、ATP 濃度を測定した。実際に撮影した画像は Fig. 20A に示す。細胞数に依存して発光が強くなるように見受けられた。次に Fig. 20A を画像解析し、得られた数値をグラフにした (Fig. 20B)。その結果、細胞数と ATP 濃度間の相関係数は 0.978 ($P<0.001$, $n=20$) で有意な正の相関が認められた。さらに単回帰分析を行ったところ、回帰式は $y=0.443x+0.412$ で示され、決定係数 R^2 は 0.956 ($P<0.001$) であった。

2-3-3-4 培養液中のグルコースおよび大気中の酸素が細胞内 ATP 量におよぼす影響

生体にとってグルコースは主要なエネルギー源である。肝臓において、グルコース 1 分子は解糖系で 2 分子、ピルビン酸に変換されたのち TCA 回路を経て完全に酸化されれば合計 38 分子の ATP を産生する。そこで本法により、培養液中のグルコースの有無が培養肝細胞内 ATP 含有量に与える影響を検出できるかどうかを検討するため、11 mM グルコース存在下・非存在下で HepG2 細胞を 24 時間培養し、細胞内の ATP 含有量を測定した。実際に撮影した画像は Fig. 21A に示す。グルコースが含まれている培地で培養した細胞の発光が強く見受けられた。次に Fig. 21A を画像解析し、得られた数値をグラフにした (Fig. 21B)。その結果、グルコースを含む培地で培養した細胞で有意に ATP 含有量が増加した。

一方、Chengqian ら⁷⁹⁾によると、酸素濃度が 2% の条件下でヒト骨肉腫由来 143B 細胞、ヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞、ヒト肝ガン細胞由来 Hep3B 細胞、ラット心臓横紋筋由来 H9c2 細胞を 24 時間培養すると、通常の大気中に含まれている酸素濃度 (21%) で培養した場合と比較して細胞内の ATP 含有量が有意に低下することを報告している。そこで本研究ではより結果が明確になるよう HepG2 細胞を酸素濃度 0.1% 以下の条件下で培養し、細胞内の ATP 含有量を測定した。

まず初めに低酸素・グルコース非含有環境下における培養時間を検討した。上述の通り、ATP 量と細胞数には正の相関がある⁷⁸⁾。そこで実験を行うにあたり、気相の酸素濃度が 0.1% 以下、さらに培養液中にグルコースが存在しない状態であっても細胞の生存率に影響を与えない培養時間を最初に検討した。通常 of 培養条件下 (培養液にグルコースを含み、気相の酸素濃度は 21%) で培養した細胞と、培養液にグルコースが含まれておらず、気相の酸素濃度を 0.1% 以下で培養した細胞のタンパク質量を比較した。その結果、1、2 時間の培養では通常 of 培養条件下で培養した細胞との間にタンパク質量の有意な影響は確認されなかった。しかしながら、4 時間培養ではタンパク質量の有意な減少が確認された (Fig. 22)。以上の結果を踏まえ、低酸素・グルコース非含有環境下における実験では細胞のタンパク質量に影響が及ばない 1 時間培養時点で細胞内 ATP 量を測定した。

実際に撮影した画像は Fig. 23A に示す。酸素濃度 0.1% 以下でグルコースを含まない培地で培養した細胞の発光が弱く見えた。次に Fig. 23A を画像解析し、得られた数値をグラフにした (Fig. 23B)。その結果、酸素濃度 0.1% 以下でグルコースを含まない培地で培養した細胞で ATP 含有量が有意に減少した。そのほか酸素濃度 0.1% 以下でグルコースを含む培地で培養した細胞とグルコースの有無にかかわらず好氣的条件下 (酸素濃度 21%) で培養した細胞間では細胞内 ATP 含有量の有意な影響は認められなかった。

解糖系は嫌氣的条件下でも行われるが、酸化的リン酸化による ATP の生成の

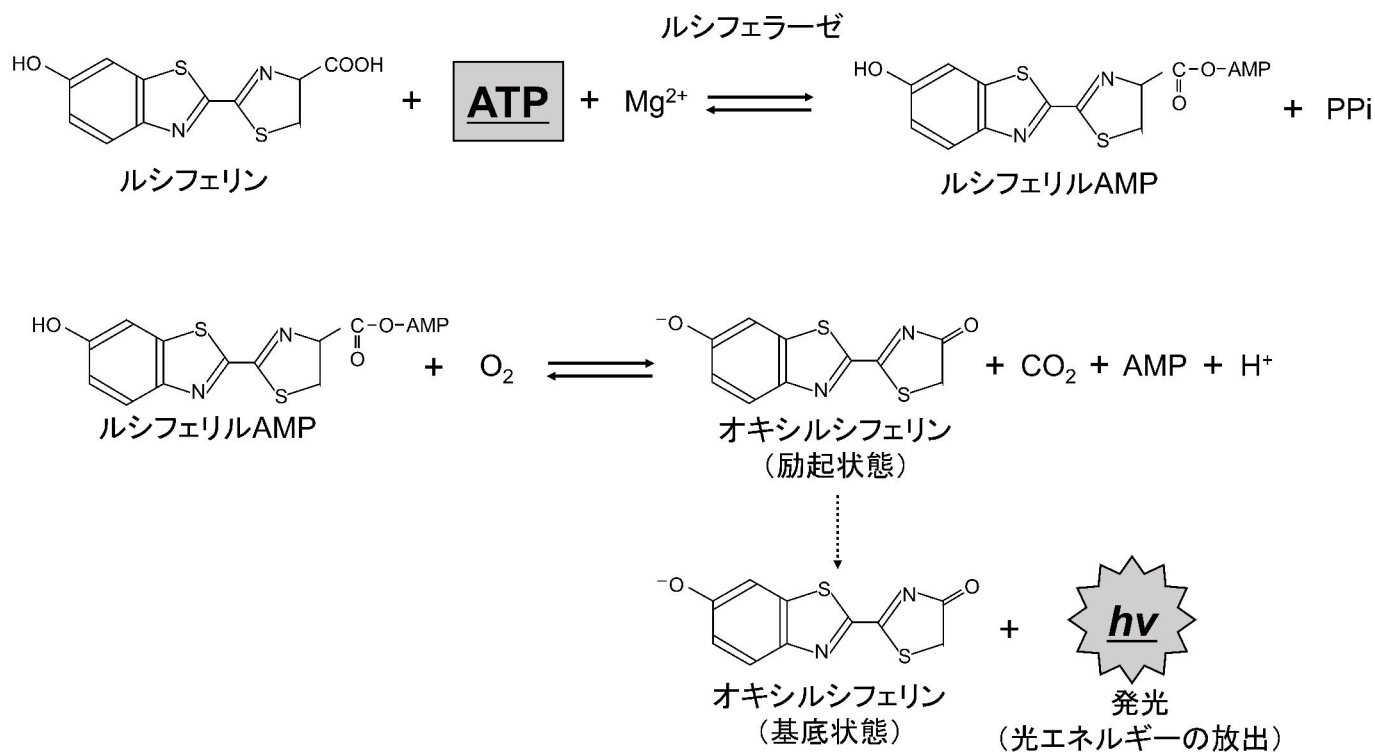
過程では酸素を必要とする。気相の酸素濃度が 0.1%以下でも培地中にグルコースが存在していれば解糖で ATP の生成を維持できたため ATP 濃度に差が認められなかったと考えられる。また、好氣的条件下で培養した細胞では、1 時間の培養ではグルコースの有無による細胞内の ATP 含有量に有意な影響は見られなかった。実験に使用した DMEM にはグリシンなどのアミノ酸が含まれている⁸⁰⁾。好氣的条件下でグルコースを含まない DMEM で培養された細胞は、DMEM 中のアミノ酸や細胞内に貯蔵されている中性脂肪などをエネルギー源として利用し、ミトコンドリア内の酸化リン酸化によって ATP の生成を維持できたためであると考えられる。

2-3-4 結語

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を用いて ATP を定量する際、ルミノメーター機能の代用となる手法として、ケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトの併用により測定が可能であるか検討した。ATP 標準液を用いた場合は露光時間や測定範囲の調節により測定が可能になることが明らかとなった。さらに、実際の培養肝細胞 HepG2 を用いて細胞数や培養液中のグルコースの有無、気相の酸素濃度による ATP 含有量の変化を本研究の手法により検出することを可能とした。

なお、第 2 章第 3 部は『細胞内 ATP 測定への化学発光イメージング解析の応用：十文字学園女子大学 紀要, 第 48 集 2 号, p.75-p.84, 2018 年 3 月 31 日発行.』を一部加筆・修正を行い、博士論文の一部としてまとめたものである。

本博士論文の主体を構成する第 3 章の論文では、最近本学に導入された Varioskan™ LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) により測定したケミルミネッセンスデータを採用し、細胞外液に加えたピルビン酸が生理的濃度に近い濃度で HepG2 細胞内の ATP 量を増加することを明らかにした。本法による検討は、同装置導入に先立って行われたものであるが、同様の結果が得られており、この知見が第 3 章の論文に述べたピルビン酸のミトコンドリア生合成 (mitochondrial biogenesis) 促進作用を見出すきっかけとなった。



文献73を参考に作図.

Fig. 15. ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応（ホタルの場合）による化学発光（ケミルミネッセンス）とATP測定への利用。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は2段階で進む。ルシフェリンはATP、酸素、 Mg^{2+} イオン存在下でルシフェラーゼと反応し、酵素分子中で生成したルシフェリルAMPが酸素分子と反応して励起状態のオキシルシフェリンを生成する。これが基底状態へ移動する際に差分のエネルギーが可視光として放出される。発光強度がATP濃度に依存するよう基質、酵素、補因子の濃度を十分量に設定することで、この反応系をATP濃度測定に応用できる。 h ：プランク定数。 ν ：光子の振動数。 $\nu=c/\lambda$ であり、 c は光速、 λ は波長を示す。ルシフェリン-ルシフェラーゼ系で生じる光の波長は生物種やルシフェラーゼの構造により異なるが、ホタルの場合、560 nm付近の波長の可視光が放出される。

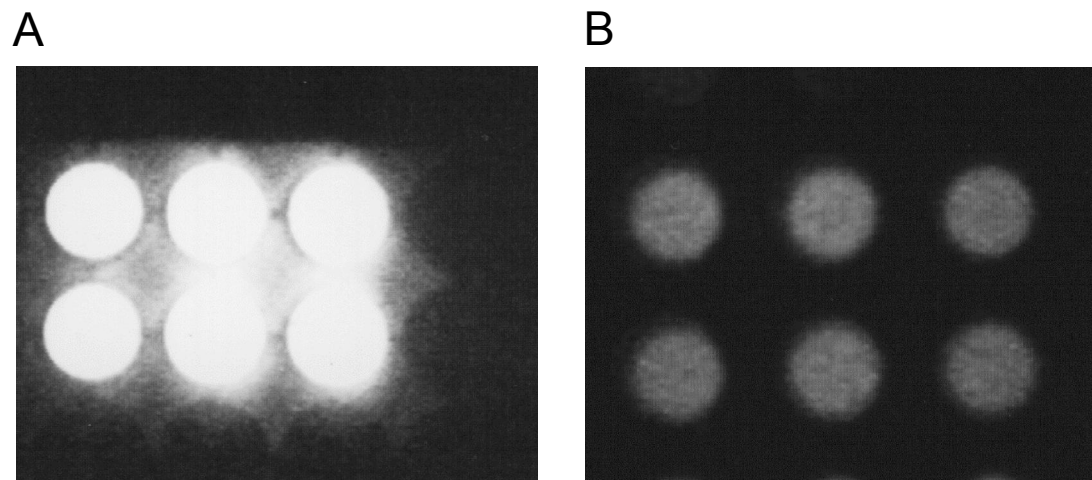


Fig. 16. 本法で使用するプレートの検討.

ATP溶液と発光試薬を100 μL ずつ混和させ、96-well白または黒プレートに添加し、ケミルミネッセンス撮影装置で発光を撮影した. A : 96-well白プレート. B : 96-well黒プレート

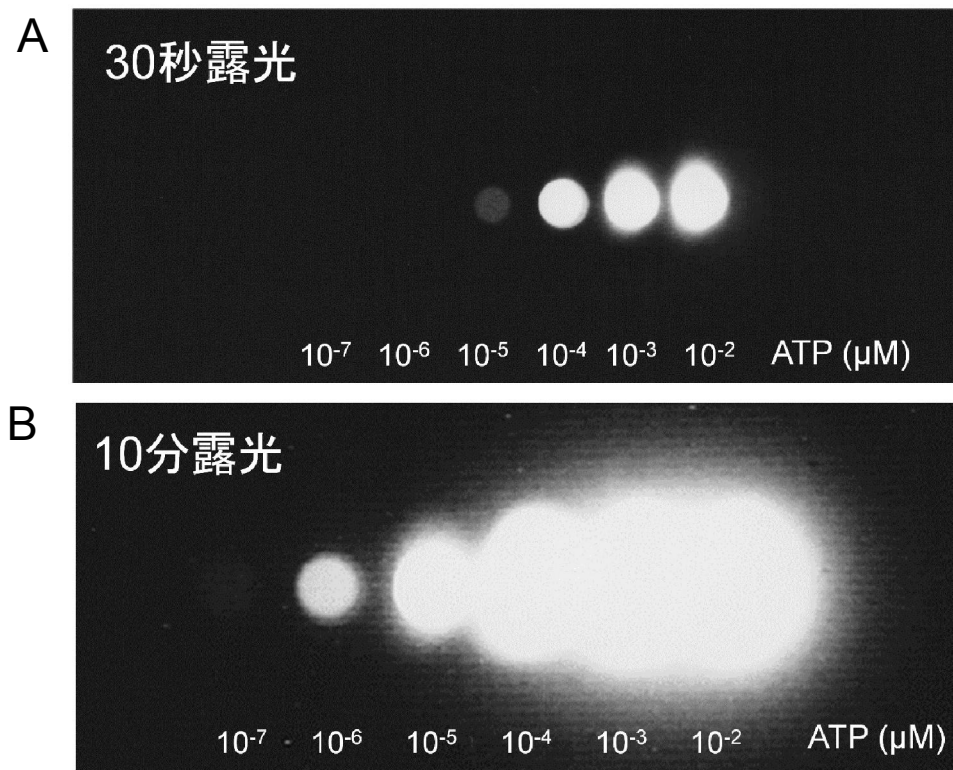
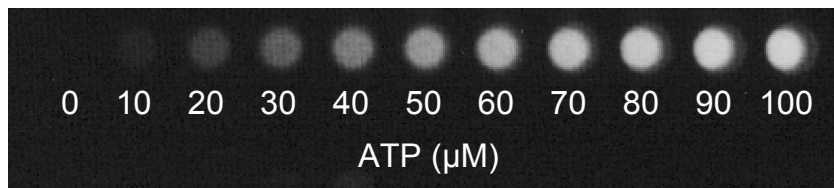


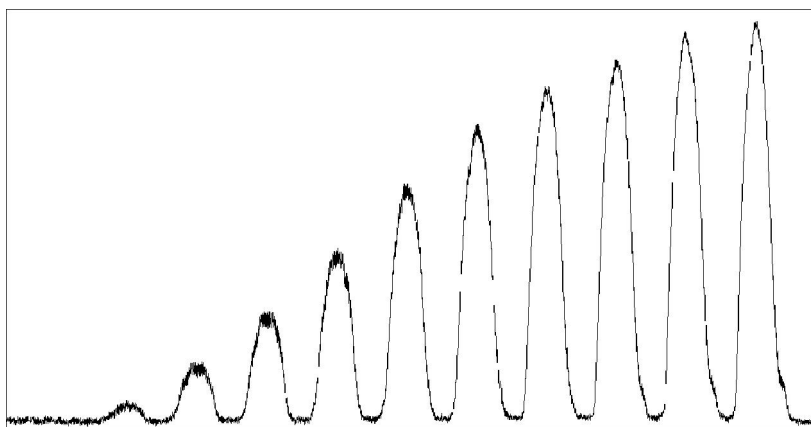
Fig. 17. ケミルミネッセンス撮影装置で撮影したルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により生じた発光. ATP標準液の濃度を 10^{-2} M (10 mM) から 10^{-10} M (100 pM) まで10倍ずつ変化させて黒色の96-wellフラットボトムプレートに100 μL ずつ添加した. ATP発光試薬をサンプルと同量の100 μL ずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で露光時間を調節しながら撮影した. A: 30秒露光させた画像. B: 10分露光させた画像.

[倉若 美咲樹, 館花 春佳, 志村 二三夫, 山崎 優子 (2018) 十文字学園女子大学紀要 48 (2) : 75-84.]

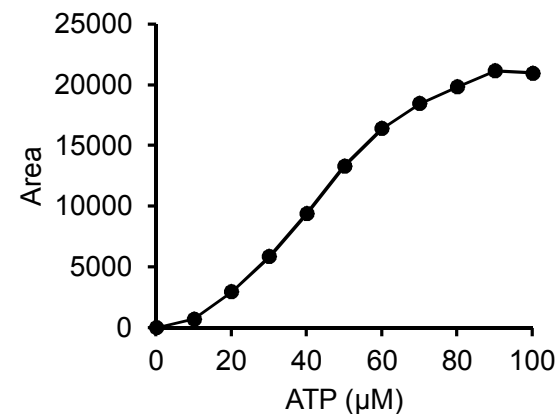
A



B



C



D

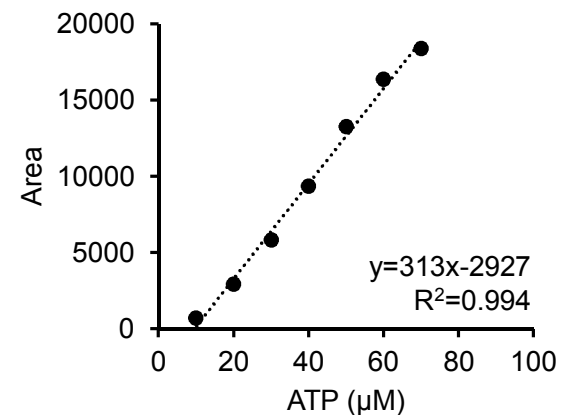
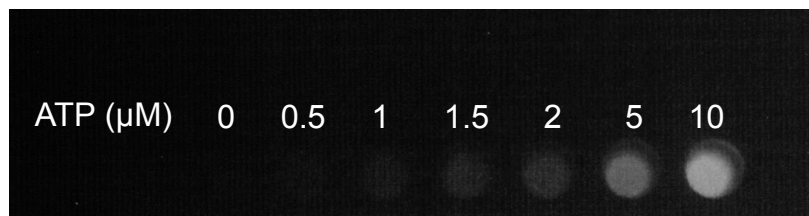


Fig. 18. 0-100 μLに調製したATP標準液の測定.

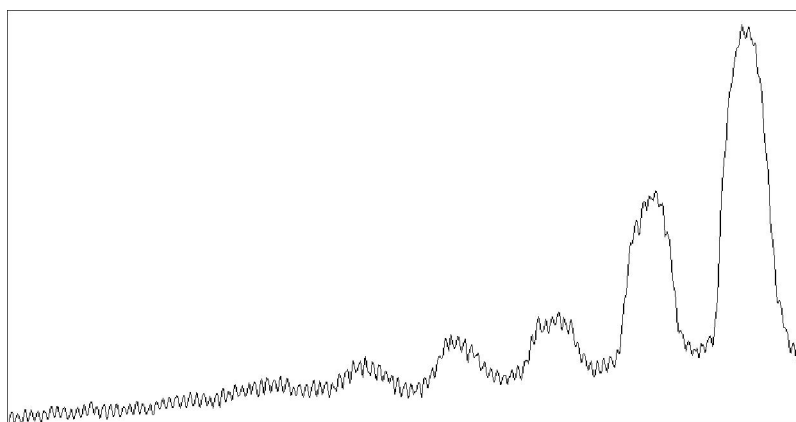
ATP標準液を0-100 μLで調製し、黒色の96-wellフラットボトムプレートに100 μLずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100 μLずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で撮影した。撮影した画像を用いて発光強度を測定した。A：撮影した実際の画像データ。B：発光強度をヒストグラムに変換した画像データ。C：0-100 μM ATP標準液の発光強度の変化。D：10-70 μM ATP標準液の発光強度と検量線。Piasonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した (n=7)。

[倉若 美咲樹, 舘花 春佳, 志村 二三夫, 山崎 優子 (2018) 十文字学園女子大学紀要 48 (2) : 75-84.]を一部改変.

A



B



C

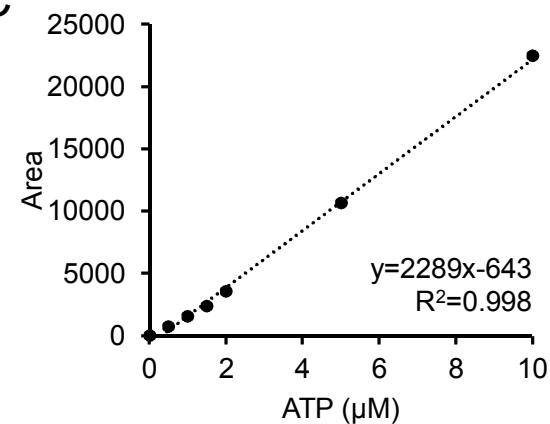


Fig. 19. 0-10 μMに調製したATP標準液の検量線.

0-10 μMに調製したATP標準液を黒色の96-wellフラットボトムプレートに100 μLずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100 μLずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で撮影した。撮影した画像を用いて発光強度を測定した。A：撮影した実際の画像データ。B：発光強度をヒストグラムに変換した画像データ。C：ATP濃度と発光強度の検量線。Piasonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した (n=7)。

[倉若 美咲樹, 舘花 春佳, 志村 二三夫, 山崎 優子 (2018) 十文字学園女子大学紀要 48 (2) : 75-84.]

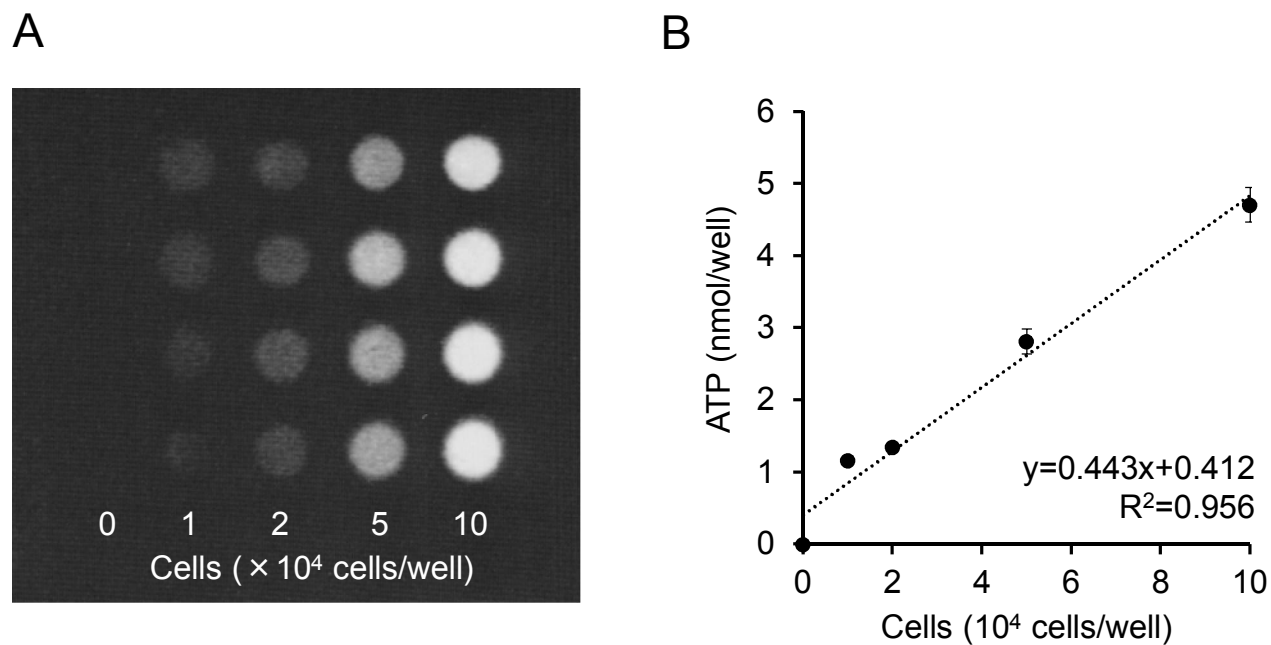


Fig. 20. 細胞数と細胞内ATP含有量の関係.

PBS中に培養肝細胞HepG2を懸濁させ、黒色の96-wellフラットボトムプレートに0-10×10⁴ cells/wellになるよう100 μLずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100 μLずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で撮影した。撮影した画像を用いて発光強度を測定した。A：撮影した実際の画像データ。B：細胞数によるATP含有量。値は平均値±標準誤差（n=4）。Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

[倉若 美咲樹，館花 春佳，志村 二三夫，山崎 優子（2018）十文字学園女子大学紀要 48（2）：75-84.]

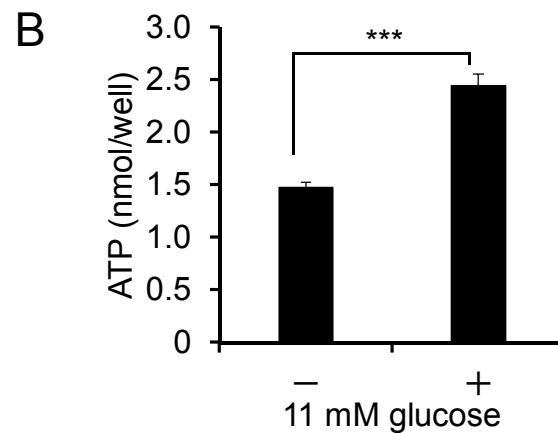
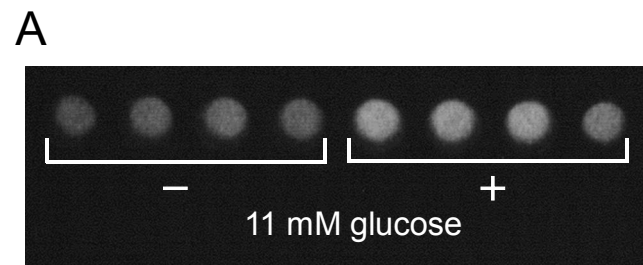


Fig. 21. 培養液中のグルコース存在下・非存在下における細胞内ATP含有量.
 実験前日に培養肝細胞HepG2を黒色の96-wellフラットボトムプレートに 8.75×10^4 cells/wellになるよう播種した. 翌日11 mMグルコースを含む実験用DMEMまたはグルコースを含まない実験用DMEMに変え, さらに24時間培養した. 24時間培養後に細胞内に存在するATP含有量を測定した. A: 撮影した実際の画像データ. B: 培地中のグルコースの有無による細胞内のATP含有量. 値は平均値 \pm 標準誤差 (n=4). 対応のないt検定で平均値の差を検定した. *** $P < 0.001$.

[倉若 美咲樹, 館花 春佳, 志村 二三夫, 山崎 優子 (2018) 十文字学園女子大学紀要 48 (2) : 75-84.]

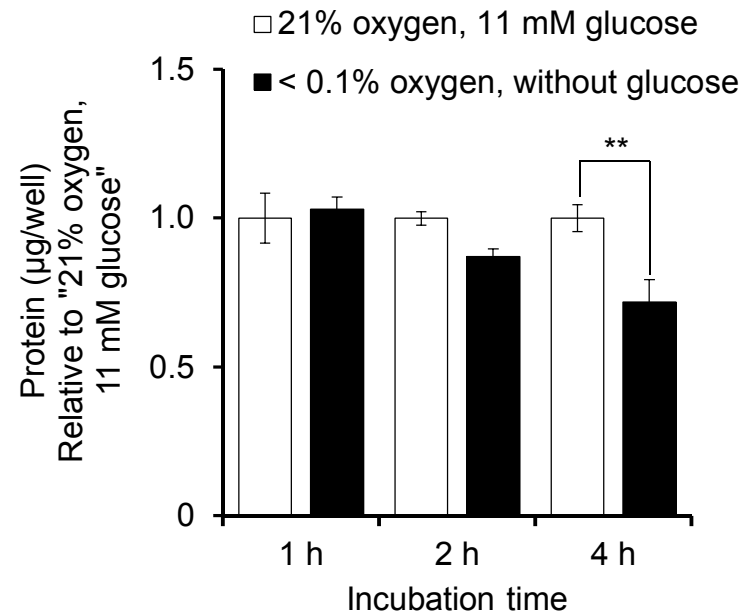


Fig. 22. 気相の酸素濃度と培養液中のグルコース存在下・非存在下における細胞の生存率
実験前日に培養肝細胞HepG2を黒色の96-wellフラットボトムプレートに 8.75×10^4 cells/wellになるよう播種した。翌日11 mMグルコースを含む実験用DMEMまたはグルコースを含まない実験用DMEMに変えた。その後気相の酸素濃度が21%または0.1%以下で1時間培養した。1, 2, 4時間培養後に細胞を回収し、タンパク質量を測定した。値は平均値±標準誤差(n=4)。二元配置分散分析ののち、Bonferroniによる多重比較を行った($P < 0.05$)。** $P < 0.01$ 。

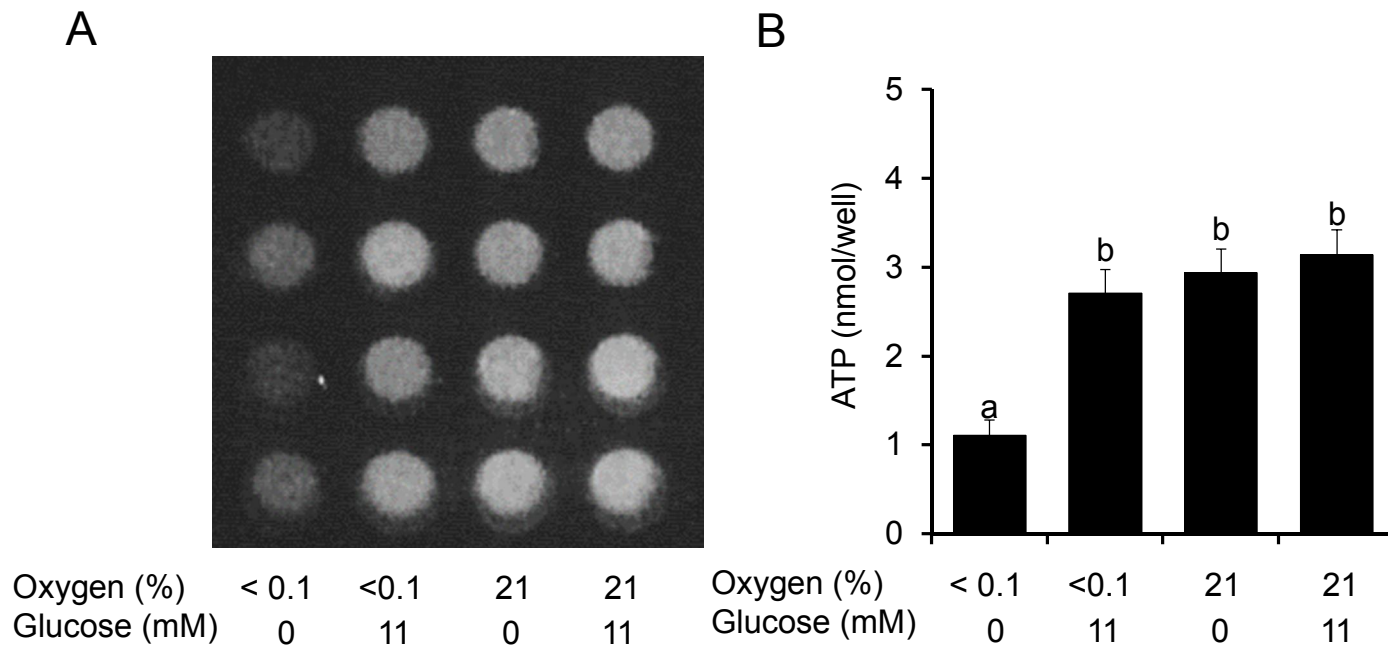


Fig. 23. 気相の酸素濃度と培養液中のグルコース存在下・非存在下における細胞内ATP含有量.

実験前日に培養肝細胞HepG2を黒色の96-wellフラットボトムプレートに 8.75×10^4 cells/wellになるよう播種した. 翌日11 mMグルコースを含む実験用DMEMまたはグルコースを含まない実験用DMEMに変えた. その後気相の酸素濃度が21%または0.1%以下で1時間培養した. 1時間培養後に細胞内のATP含有量を測定した. A: 撮影した実際の画像データ. B: 酸素と培地中のグルコースの有無による細胞内のATP含有量. 値は平均値±標準誤差 (n=4). 一元配置分散分析後, Tukey HSDによる多重比較を行った. 異なるアルファベット間に有意差あり ($P < 0.05$).

[倉若 美咲樹, 館花 春佳, 志村 二三夫, 山崎 優子 (2018) 十文字学園女子大学紀要 48 (2) : 75-84.]

第 3 章 生理的濃度近傍の細胞外ピルビン酸はヒト肝細胞ガン由来 細胞株 HepG2 におけるグルコース利用とともにミトコン ドリア合成を促進する

本博士論文の主体を構成するこの章では、第 1 章また本章の 3-1 節で示す研究背景に基づいて行った実験研究について述べる。3-2 節では実験材料ならびに方法、3-3 節では結果、3-4 節では考察を述べる。細胞外ピルビン酸がヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 におけるグルコース利用を促進することに関して新規性ある知見が得られた。これらの知見をとりまとめ、仮説として提案し、第 4 章で示す。

3-1 研究背景ならびに目的

第 1 章の序論でも述べたように、ピルビン酸は解糖系の最終産物であるとともに、エネルギー栄養素の代謝の岐路に立つ中間体である^{3, 4)}。ヒトの血液にも存在しており、その濃度はおよそ 0.1 mM である^{7, 8)}。ピルビン酸を痩身用健康食品等¹⁴⁻¹⁷⁾の素材やミトコンドリア病の症状改善薬¹⁰⁻¹²⁾として利用するための研究も進められている。また、有用性とその根拠は明確ではないが、細胞培養では培地に 1-2 mM の濃度でピルビン酸が添加されることが多い²¹⁻²⁵⁾。従って、細胞外ピルビン酸は細胞のエネルギー源として用いられるのみならず代謝調節においても重要な役割を担うと推定される。特に、ピルビン酸は解糖系の最終産物であり、エネルギー栄養素代謝の岐路の中間体であることから、グルコースの細胞内への取り込みから、その先に利用に至るまで様々な影響を及ぼすと推察される。しかし、細胞外ピルビン酸の役割やエネルギー栄養素の代謝調節への関与やその機構については、生体丸ごととはもとより、神経・内分泌系等の調節系から独立した培養細胞レベルにおいても不明な点が多い。

培養細胞レベルでの知見は、生体丸ごとへと直接的に外挿することはできないが、栄養素や情報伝達物質等の細胞外物質に対する細胞応答や細胞内機構を明らかにするうえで不可欠である。こうした基礎的知見の積み上げは、栄養学・生化学・細胞生物学分野において学問的に意義深いのみならず、生体における応用研究の基盤になると考える。

そこで、本実験研究では、下記小節 (3-1-1~3-1-3) で述べる先行研究における知見を研究背景として、研究目的 (3-1-4) を設定して取り組んだ。

3-1-1 培養細胞におけるエネルギー栄養素の代謝とくにグルコースの利用に対する細胞外ピルビン酸の影響

培養細胞におけるエネルギー栄養素の代謝、特にグルコースの利用に対するピルビン酸の影響を調べた先行研究は少ないが、マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞³¹⁾ およびマウス由来 3T3-L1 前脂肪細胞³³⁾ において、グルコース代謝の入口に相当する細胞内へのグルコース取込みに対する影響を調べた報告がある。

C2C12 筋管細胞における研究報告では、ピルビン酸を最終濃度が 50 mM となるように添加して 72 時間培養すると細胞内へのグルコースの取り込みが抑制された³¹⁾。同報告では、その他、パルミチン酸の取り込み減少、酸素消費量の減少、解糖系律速酵素であるホスホフルクトキナーゼの遺伝子発現の抑制も示されている。さらに、ピルビン酸添加により TCA 回路の流量が低下した。文献 31 は、C2C12 筋管細胞にピルビン酸を長期間暴露させると TCA 回路の流量が減少し、種々のエネルギー栄養素の代謝を減弱させたと結論付けた。しかしながら、文献 31 の本文中にも示されているように添加したピルビン酸の濃度が 50 mM と、血液中 (0.1 mM)^{7, 8)} や細胞培養培地中 (1-2 mM)²¹⁻²⁵⁾ の濃度と比較すると極めて高い。また、ピルビン酸の作用発現までに要する時間は 72 時間の長時間にわたる。

3T3-L1 前脂肪細胞における研究報告では、脂肪細胞分化カクテル (0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、1 μ M デキサメタゾンおよび 1 μ g/mL インスリン) と共に 25 mM ピルビン酸を添加して 72 時間培養すると、前脂肪細胞から脂肪細胞への分化が促進された³³⁾。さらに、脂肪細胞への分化に伴いインスリン刺激による細胞内グルコース取り込みの増加、グルコース輸送体 4 (GLUT4) の遺伝子発現の増加、細胞内中性脂肪 (TG) の増加が認められた。しかしながら、ピルビン酸単独添加ではいずれの影響も認められなかった。また、添加したピルビン酸濃度は 25 mM と高濃度であった。

ピルビン酸自身がグルコースの細胞内への取り込みからその先の代謝に与える影響を調べた研究はごく限られており、いずれの先行研究においてもピルビン酸の添加濃度はその血中・細胞外液濃度に比べて極めて高い。さらに、ピルビン酸は C2C12 筋管細胞に対してはグルコース取り込みを抑制すると報告³¹⁾ されているのに対して、3T3-L1 脂肪細胞ではインスリンとの共存とはいえ、グルコース取り込みを促進する方向で作用すると報告³³⁾ されており、グルコース取込みに対するピルビン酸の影響は培養細胞が由来した組織によって異なる可能性がある。エネルギー源として利用される可能性のあるピルビン酸は、C2C12 筋管細胞におけるようにグルコースの利用を抑制すると考えられるが、3T3-L1 脂肪細胞におけるように促進的に働く可能性もあり、興味深い。

一方、肝臓は個体レベルでの物質・エネルギー代謝の中樞臓器である。グル

コース代謝に関しては、グルコースの取り込み、グリコーゲン合成、糖新生などの形で際立った役割を果たしている⁶³⁾。食事から摂取したグルコースは小腸から吸収され門脈を通り、一旦肝臓に運ばれる。肝臓は到達したグルコースの50%から60%を細胞内に取り込み、食後急激に血糖値が上昇するのを防いでいる⁵¹⁾。従って、肝臓は他の臓器と比べ高濃度のグルコースに晒されやすく、肝臓におけるグルコースの取り込みが食後の血糖コントロールにおいて重要である。さらに中性脂肪やアミノ酸合成なども行っており、糖のみならずエネルギー栄養素の代謝の中心に立つ臓器である。しかし、肝臓の役割を実質的に担っている肝実質細胞（肝細胞）におけるグルコース利用については、その入り口であるグルコースの取り込みから、それ以降の代謝に対する細胞外ピルビン酸の影響を調べた報告は見当たらない。本研究は、主としてこのことに着眼して取組んだ。

3-1-2 ミトコンドリア生合成 (mitochondrial biogenesis) およびミトコンドリア活性に対するピルビン酸の影響

骨格筋細胞への分化前のC2C12筋芽細胞を用いた研究では、50 mM ピルビン酸存在下で72時間培養したところ、ミトコンドリア蛍光染色後の顕微鏡画像解析およびフローサイロメトリーにより、ミトコンドリアが増加することが示されている³²⁾。さらにミトコンドリア関連タンパク質であるシトクロム *c* や酸素消費量もピルビン酸添加により増加した。しかし、ミトコンドリア生合成と関連するとされるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体- γ 共活性化因子 1 α および β (PGC-1 α および PGC-1 β) の遺伝子発現、また PGC-1 α の活性化と関連するサーチュイン 1 (SIRT1) のタンパク質発現にはピルビン酸添加による有意な影響は認められなかった。さらに、PGC-1 α をノックダウンさせてもピルビン酸添加によるミトコンドリアの増加が確認された。以上より C2C12 筋芽細胞にピルビン酸を添加するとミトコンドリアが増加するが、この増加には PGC-1 α を介さない機構が関わっていると推察された。また、3-1-1 に示した Philp の報告では、ミトコンドリアに関するいくつかの指標も測定しており、ミトコンドリア関連タンパク質であるシトクロム *c* とシトクロム *c* オキシダーゼ I の遺伝子発現は増強したが、PGC-1 α および PGC-1 β の遺伝子発現やタンパク質発現は減弱した³¹⁾。さらに、ラット骨格筋由来 L6E9 筋芽細胞にピルビン酸を最終濃度が 50-100 mM となるように添加するとミトコンドリアの数が増加し、ミトコンドリアの膜電位が上昇した²⁷⁾。

これらの骨格筋由来細胞の研究では、ピルビン酸濃度が 50-100 mM と非常に高いが、ピルビン酸がミトコンドリアの数または活性に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。また、ピルビン酸によるミトコンドリアの増加は PGC-1 α を介さない別経路で行われている事が示唆された。

3-1-3 細胞内 NAD⁺/NADH 比と ATP 量、mtDNA 欠損細胞の生存に対するピルビン酸の影響

第 1 章でも述べたように、ピルビン酸が LDH によって乳酸へ還元される際、補酵素である NADH が共役的に NAD⁺ に再酸化される。NAD⁺ は解糖系の上流酵素である GAPDH による反応において必須な酸化剤・電子受容体であり、嫌気的条件下で解糖系のみで ATP を生成するためには、この LDH によるピルビン酸の乳酸への還元が不可欠な反応である⁵⁾。ピルビン酸は炭素骨格源の供給のみならず、このように乳酸へ還元されることにより細胞内に存在する NADH を NAD⁺ へ再酸化するという重要な役割も果たしている⁸¹⁾。実際に、ヒト精子においてミトコンドリアの活性を阻害している状態でも、ピルビン酸を添加することにより細胞内 NAD⁺ の増加とともに ATP 量が増加し、精子の運動機能が向上した⁸²⁾。また、ヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞、ヒト肝ガン細胞由来 Hep3B 細胞、ラット心臓横紋筋由来 H9c2 細胞においても、ピルビン酸を 1 mM に添加すると細胞内の ATP 量が増加した⁷⁹⁾。さらにこの報告では、mtDNA 欠損 143B206 細胞 (ρ0 細胞) にピルビン酸を添加すると細胞内 ATP と NAD⁺ 量が増加し、それに伴い細胞の生存率も上昇した。同様に、mtDNA 欠損細胞にピルビン酸を最終濃度が 10 mM となるように添加したところ、細胞内のエネルギー生成量は維持されたが、10 mM 乳酸添加群では低下したとする報告がある⁸³⁾。

3-1-2 も踏まえ、細胞外ピルビン酸のグルコース利用に対する影響を調べるには、ミトコンドリアへの作用の検討が鍵を握ると考えられた。

3-1-4 先行研究まとめと本研究の目的

上述の先行研究より、細胞外ピルビン酸は培養細胞におけるエネルギー栄養素とくにグルコースの利用やミトコンドリア機能に対して影響を与えていると考えられた。しかしながら、細胞種の違いやピルビン酸添加濃度により結果が異なる項目もあり、不明な点が多い。肝臓は個体レベルでの物質・エネルギー代謝の中核臓器であるにもかかわらず、その役割を実質的に担う肝細胞におけるグルコース利用については、その入り口であるグルコースの取り込みから、それ以降の代謝に対する細胞外ピルビン酸の影響を調べた報告が見当たらない。そこで本研究では、肝臓に着目し、ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 におけるグルコース利用に対するピルビン酸の作用を詳しく調べることを目的とした。

3-2 実験材料ならびに方法

3-2-1 試薬等

ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センター (茨城) から購入した。DMEM、FBS、Penicillin-Streptomycin、PBS (pH

7.4)、BCA アッセイキットは Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) から購入した。グルコース測定キット (グルコース C II テストワコー)、中性脂肪測定キット (トリグリセライド E テストワコー)、プロテアーゼインヒビターカクテルは和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)、One Step SYBR[®] PrimeScript[®] PLUS RT-PCR kit (Perfect Real-time) はタカラバイオ株式会社 (滋賀) から購入した。QuickGene DNA tissue kit S、QuickGene RNA cultured cell kit S は倉敷紡績株式会社 (大阪) から購入した。Periodic acid-Schiff (PAS) 染色キット、Oil Red O 染色原液は武藤化学株式会社 (東京) から購入した。『細胞の』ATP 測定試薬[™] は東洋ビーネット株式会社 (東京) から購入した。RNAprotect[®] Cell Reagent、RNase は QIAGEN, Inc. (Venlo, NLD) から購入した。ECL[™] Prime Western Blotting Detection Reagent は GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 (東京) から購入した。フルオロキパー退色防止剤はナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。MitoBright Red は株式会社同仁化学研究所 (東京) から購入した。

3-2-2 試験物質の調製

ピルビン酸ナトリウム、L-乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、 α -ケトグルタル酸ナトリウム、フマル酸二ナトリウム、DL-リンゴ酸二ナトリウム n 水和物、コハク酸二ナトリウム、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酪酸ナトリウムは超純水に溶解して 1 M の濃度に調製し、これを保存原液とした。冷蔵庫内で保存し、実験直前に各濃度に調製した。1 M 保存原液は調製日から 3 カ月以内に使い切った。オキサロ酢酸ジエチルナトリウムは水溶解度が 1.2 g/L (5.7 mM) であるため、11 mM のグルコースを含む KHH バッファーに溶解して 5 mM の濃度に調製した。オキサロ酢酸ジエチルナトリウム保存原液は調製日から 1 週間以内に使い切った。

3-2-3 細胞培養

ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 細胞を用いて実験を行った。HepG2 細胞は 2-1-2-2 で示した通りに継代維持を行った。

3-2-4 細胞実験

Kawano らと Kamakura ら^{21, 22)} の方法を参考に一部を改変して行った。実験前日に細胞が 1.25×10^5 cells/cm² になるように各種培養プレートに播種した。翌日 DMEM を除き KHH バッファーで 2 回洗浄し、細胞表面に存在する DMEM 成分を除いた。もう一度 KHH バッファーを加え、CO₂ インキュベーター内で 2 時間予備培養を行った。2 時間後 KHH バッファーを除き、続いて 11 mM グルコー

スと各試験物質が含まれている KHH バッファーに交換した。各試験物質含有 KHH バッファーの添加量は 96-well プレートの場合は 100 μ L、24-well プレートの場合は 300 μ L、12-well プレートの場合は 1,000 μ L、6-well プレートの場合は 2,000 μ L とし、各時間まで CO₂ インキュベーター内で培養した。なお、本研究のコントロール群は試験物質が添加されていない群とした。

培養終了後、KHH バッファーと HepG2 細胞を回収して下記の項目を測定した。

3-2-5 細胞数計測

培養プレートは 24-well プレートを使用した。試験物質処理後、KHH バッファーを取り除き、PBS で 2 回洗浄した。続いて 0.5% Trypsin-EDTA 250 μ L を加え、37°C で 3 分加温し、プレート底面に接着している細胞を剥がした。その後 10% FBS を含む DMEM 250 μ L (0.5% Trypsin-EDTA と同量) を加え、Trypsin の作用を阻害した。細胞数の測定には Trypan blue 色素排除法を用いて行った。細胞懸濁液と 0.2% Trypan blue を 1 : 1 で混和させ、TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて青色に染色された死細胞を除き、染色されていない生細胞数を測定した。

3-2-6 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試験

培養プレートは 96-well プレートを使用した。試験物質処理後、KHH バッファーを取り除き 1 mg/mL の MTT を含む KHH バッファー 100 μ L に交換した。その後 CO₂ インキュベーター内で 30 分インキュベートした。MTT 溶液を除き、DMSO を 100 μ L 加え、マイクロプレートミキサーで攪拌し、細胞内に生成されたホルマザン色素を抽出した。この DMSO 中に抽出された色素の吸光度をマイクロプレート対応分光光度計 Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) で 550 nm において測定した。

3-2-7 細胞内グルコース取り込み量

細胞による培養液中のグルコース取り込み量は、Kawano らと Kamakura ら^{21、22)}の方法を参考に一部を改変して行った。試験物質処理後、KHH バッファーを 0.6 mL 容マイクロチューブに回収し、ラボ用冷却遠心機 3-16KL (久保田商事株式会社、東京) で 15,493 \times g、5 分間遠心した。得られた上清をグルコース濃度の測定に利用した。培養液中に残存しているグルコース濃度の測定には、グルコースオキシダーゼ法に基づく比色定量用キットであるグルコース CII-テストワコーを用いた。96-well プレートに発色試薬 145 μ L、サンプル 5 μ L を添加した。マイクロプレートミキサーでよく混和させ、37°C で 10 分間加温した。その後マイ

クロープレート対応分光光度計 Multiskan GO で 505 nm における吸光度を測定した。グルコース溶液を用いて検量線を作成し、KHH バッファー中に残存しているグルコース濃度を測定した。培養前後でグルコース濃度を比較し、細胞のグルコース取り込み量を算出した。

3-2-8 細胞内ピルビン酸取り込み量

細胞によるピルビン酸取り込み量は培養液中に残存しているピルビン酸濃度を測定することで算出した。測定サンプルは 3-1-6 のグルコース取り込み量と同様に調製した。培養液中のピルビン酸濃度は 2-1-2-7 に述べたピルビン酸オキシダーゼを利用した酵素蛍光法と同様の操作を行い測定した。

3-2-9 細胞の乳酸生成量

細胞による乳酸生成量は培養液中に放出された乳酸の濃度を測定することで算出した。測定サンプルは 3-1-6 のグルコース取り込み量の測定の場合と同様に調製した。培養液中の乳酸濃度は 2-1-2-6 に述べた乳酸オキシダーゼを利用した酵素蛍光法と同様の操作を行い測定した。

3-2-10 取り込まれた基質（グルコース・ピルビン酸）の乳酸への変換率

KHH バッファーに含まれている基質であるグルコースとピルビン酸が HepG2 細胞により乳酸へと変換される割合について、文献 84 を参考に一部変更して算出した。細胞によるグルコース取り込み量とピルビン酸取り込み量、乳酸生成量を上述の通り測定した。グルコースまたはピルビン酸 1 分子が解糖系と乳酸脱水素酵素で完全に乳酸へ代謝される場合、乳酸がそれぞれ 2 分子、1 分子生成されること⁸⁵⁾を踏まえ、基質の乳酸変換率は下記計算式で算出した。

乳酸生成量 (mol) / グルコース取り込み量 (mol) × 2 + ピルビン酸取り込み量 (mol)

3-2-11 PAS 染色

3-2-11-1 滅菌済みカバーガラスの調製

操作は全てゴム手袋を着用して行った。カバーガラス (18 mm × 18 mm) を 12-well プレートに入れるため、上底 7 mm、下底 11 mm、高さ 18 mm になるようケガキ針で傷をつけて割った。ビーカーにカバーガラスと超純水、中性洗剤を加えてマルチモードシェーカー上で 1 晩洗浄した。翌日泡が出なくなるまで超純水ですすぎ、さらに超純水を加えてマルチモードシェーカー上で 1 時間洗浄した。この超純水洗浄は 2 回繰り返した。その後超純水を除き、少量の特級エタノールで 2 回すすぎ、もう一度特級エタノールを加えてマルチモードシェーカー上

で 2 時間洗浄した。中性洗剤で洗浄し、特級エタノールで共洗いしたガラスシャーレにカバーガラスを移し、乾熱滅菌（180°C、8 時間）を行った。

3-2-11-2 細胞サンプルの調製

実験前日、12-well プレートに滅菌済みカバーガラスを敷き、細胞を 1.25×10^5 cells/cm² の濃度で播種した。試験物質処理後、KHH バッファーを除き、PBS で 2 回洗浄した。10%中性緩衝ホルマリン溶液（pH 7.4）500 μL を加え、常温で 30 分固定後、ホルマリンを除き、超純水で 3 回洗浄した。

3-2-11-3 PAS 染色

PAS 染色は PAS 染色キットの説明書に準じて行った。1%過ヨウ素酸溶液 500 μL を加え、常温で 10 分酸化処理を行った。過ヨウ素酸溶液を除去し、超純水で 3 回洗浄した後、さらに超純水を加えて 5 分間溜水洗浄を行った。続いてシッフ試薬 500 μL を加え、37°C インキュベーター内で 30 分染色した。シッフ試薬を除去し、亜硫酸溶液 500 μL を加え、常温で 5 分置き、洗浄した。亜硫酸溶液洗浄は 2 回行った。その後超純水で 3 回洗浄した後超純水で 5 分間溜水洗浄を行った。

3-2-11-4 対比染色

核を染色する対比染色にはヘマトキシリンを用いた。ヘマトキシリン溶液 500 μL を加え、常温で 1 分染色した。ヘマトキシリン溶液を除き、超純水に色素が残らなくなるまで洗浄した。その後 60°C に温めておいた温水を加えて色だしを行った。

3-2-11-5 グリセリンゼリー封入剤の調製

封入剤には水系封入剤であるグリセリンゼリーを用いた。ビーカーに食品用粉ゼラチン 1.25 g と超純水 7.5 mL を加え、1 時間常温で膨潤させた。その後 40°C まで温めながらスターラーで混和した。ゼラチンが溶解したことを確認後、同じく 40°C ほどに加温したグリセリン 10 mL をゼラチン溶液に加えてよく混和した。グリセリンゼリーは 50 mL 容遠沈管に移し、使用するまで冷蔵庫で保存した。

3-2-11-6 封入・観察

染色した細胞が貼り付いたカバーガラスを取り出し、余分な水分を除いた。スライドガラス上に溶解させたグリセリンゼリーを 1 滴滴下し、カバーガラスを封入した。染色した細胞の観察には正立顕微鏡 ECLIPSE E600（株式会社ニコン、東京）と顕微鏡用スタンダードデジタルカメラ WRAYCAM NF500（株式会

社レイマー、大阪) を用いて撮影した。

3-2-12 Oil Red O 染色

滅菌済みカバーガラスの調製から細胞の固定までの操作は上述の PAS 染色の場合 (3-2-11-1 から 3-2-11-2) と同様に行った。Oil Red O 染色原液と超純水を 2:3 で混和し、常温で 15 分間静置した。混和液をろ紙でろ過し、この溶液を Oil Red O 染色液とした。Oil Red O 染色液は調製後 1-2 時間で結晶が析出するため、調製後はすみやかに実験を行った。

ホルマリン溶液を除去し、60%イソプロパノール 500 μ L を加えて常温で 5 分間静置した。この 60%イソプロパノール洗浄を 2 回繰り返した。洗浄後、調製した Oil Red O 染色液 500 μ L を加え、常温で 30 分染色した。染色液を除き、超純水に色素が残らなくなるまで繰り返し洗浄した。

核の対比染色と封入、顕微鏡観察は上述の PAS 染色の場合 (3-2-11-4 から 3-2-11-6) と同様に行った。

3-2-13 細胞内のグリコーゲンの定量

3-2-13-1 サンプル回収

培養プレートは 6-well プレートを使用した。試験物質処理後、KHH バッファーを除去し、PBS で 2 回洗浄した。続いて PBS 500 μ L を加え、セルスクレーパーで細胞を集め、1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。再度プレートに PBS 500 μ L を加え、残りの細胞を回収した。マイクロチューブをラボ用冷却遠心機 3-16KL で 825 \times g、5 分遠心した。上清を除去し、細胞ペレットに PBS 250 μ L を加え、ソニケーターVibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc., CT, USA) を用いて 30 秒間超音波処理を行った。これを測定用サンプルとした。

3-2-13-2 グリコーゲンの定量

細胞内グリコーゲンの定量は 2-2-2-4-2 から 2-2-2-4-4 に述べたグルコアミラーゼ処理により遊離したグルコースをグルコースオキシダーゼにより検出する酵素蛍光法と同様の操作を行い測定した。測定サンプル中のタンパク質量を 2-2-2-5 で述べた BCA アッセイキットを用いて測定した。細胞内グリコーゲン量はタンパク質 1 μ g あたりで標準化した。

3-2-14 細胞内中性脂肪量の定量

細胞内の中性脂肪の定量は、Zhan ら⁸⁶⁾ と Zhu ら⁸⁷⁾ の方法を参考に一部を改変して行った。細胞播種から測定サンプルの調製はグリコーゲンの定量の場合 (3-2-13-1) と同様に行った。測定用サンプル 80 μ L を新しい 1.5 mL 容マイクロ

チューブに移した。中性脂肪の測定には、リパーゼ処理により遊離したグリセロールを比色定量するトリグリセライド E-テストワコーを用いた。発色液をサンプルにそれぞれ 250 μL 添加し、よく混和させた。続いて 37°C に温めておいたヒートブロックにセットして 5 分間加温した。反応後、吸光度測定を干渉する懸濁物質を除去するためにラボ用冷却遠心機 3-16KL で 15,493 $\times g$ 、3 分遠心した。上清を 96-well プレートに 150 μL ずつ移し、マイクロプレート対応分光光度計 Multiskan GO で 600 nm における吸光度を測定した。グリセロールを標準として中性脂肪量を測定した。測定サンプル中のタンパク質量を 2-2-2-5 で述べた BCA アッセイキットを用いて測定した。細胞内中性脂肪量はタンパク質 1 μg あたりで標準化した。

3-2-15 細胞内 ATP 量の定量

実験前日に黒色 96-well プレートに細胞が 1.25×10^5 cells/cm² になるように播種した。試験物質処理後、KHH バッファーを除去し、PBS で 2 回洗浄した。続いて PBS 100 μL を加え、『細胞の』ATP 測定試薬™ を PBS と同量の 100 μL 加えた。マイクロプレートミキサーで 1 分間混和させ、遮光して 23°C で 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、Varioskan™ LUX マルチモードマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を用いて発光強度を測定した。測定サンプル中のタンパク質量を 2-2-2-5 で述べた BCA アッセイキットを用いて測定した。細胞内 ATP 量はタンパク質 1 μg あたりで標準化した。

3-2-16 ミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数

mtDNA コピー数は、Yu ら⁸⁸⁾ の報告を参考に、ミトコンドリア遺伝子として NADH 脱水素酵素複合体 1 (ND1) を、対照の核遺伝子としてサイクロフィリン A (PPIA) を採用し、Real-time PCR 法を用いて検討した。

3-2-16-1 DNA サンプル調製

実験前日に 24-well プレートに細胞が 1.25×10^5 cells/cm² になるように播種した。試験物質処理後、KHH バッファーを取り除き、PBS で 2 回洗浄した。その後 PBS を 180 μL 加え、セルスクレーパーを用いて細胞を 1.5 mL 容チューブに回収した。

ゲノム DNA の抽出は QuickGene DNA tissue kit S の操作法に従い、まず細胞ライセートを次に示すように作成した。回収した細胞に RNase 20 μL を加え、マイクロチューブを 5 回タッピングして混和させた。2 分間常温で放置し、サンプル中の RNA を分解した。続いて付属の Proteinase K 溶液 (EDT 溶液) 20 μL と

Lysis Buffer (LDT 溶液) 180 μ L を加え、15 秒ボルテックスしたものをヒートブロックで 70°C、10 分間インキュベーションした。最後にエタノール 240 μ L を加え、15 秒ボルテックスし、これを細胞ライセートとした。DNA の抽出には、自動核酸抽出システム QuickGene-800 (倉敷紡績株式会社、大阪) を用いた。DNA 濃度および純度 (A260/A280) は NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) を用いて測定した。

3-2-16-2 プライマーの作成

Real-time PCR で用いた NADH 脱水素酵素複合体 1 (ND1) のプライマー塩基配列は Yu ら⁸⁸⁾ が使用した塩基配列を参考にした。サイクロフィリン A (PPIA) は、米国立生物工学情報センターである NCBI (National Center for Biotechnology Information) の Nucleotide 検索

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) により対象遺伝子の塩基配列と Accession No. を得た。次に、対象遺伝子の Accession No. を、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 (東京) の Universal Probe Library Assay Design Center (<https://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) の検索ウィンドウに入力して得た同社推奨の塩基配列をプライマーの配列とし、Sigma-Aldrich Co. LLC. (MO, USA) のカスタムオリゴ DNA にて合成を依頼した。それらの塩基配列は Table 1 に示す。

3-2-16-3 Real-time PCR

Real-time PCR はリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) と SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) を用いて行った。反応液 (1 \times master mix reagent、0.5 μ M primer) 18 μ L に 10 ng/ μ L DNA 溶液 2 μ L を加えて反応させた。PCR の反応条件は 95°C (30 秒)、PCR 反応を [95°C (5 秒)、60°C (30 秒)] 40 サイクル行った。その後 55°C (30 秒)、95°C (30 秒) と設定し、温度変化に伴う二本鎖の解離状態を解析し、PCR 増幅産物の融解温度の均一性を確認した。ミトコンドリア由来 DNA のコピー数は、増幅が指数関数的に起こる領域で、増幅産物が一定量に達するサイクル数 (threshold cycle ; Ct 値) を用いて算出した。内部標準遺伝子として核由来遺伝子 (nDNA) である PPIA を用い、nDNA コピー数に対する mtDNA コピー数比を算出し、定量的に解析した。

3-2-17 ミトコンドリア蛍光染色と画像解析

実験前日に 12-well プレートに 3-2-11-1 と同様に調製した滅菌済みカバーガラスを敷き、細胞を 0.5×10^5 cells/cm² の濃度で播種した。試験物質処理後、KHH バッファーを除き、Hank's balanced salt solutions (HBSS) バッファー (pH 7.4、

137 mM NaCl、5.4 mM KCl、0.25 mM Na₂HPO₄、0.44 mM KH₂PO₄、1.3 mM CaCl₂・2H₂O、1.0 mM MgSO₄、4.2 mM NaHCO₃、5.5 mM グルコース) で 2 回洗浄した。その後 HBSS バッファーで 100 nM に調製したミトコンドリアに集積する色素である MitoBright Red working solution 1,000 μL を加え、37°C の CO₂ インキュベーター内でインキュベーションした。反応後に細胞を PBS で 2 回洗浄し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (pH 7.4) 500 μL を加え、常温で 30 分固定した。その後ホルマリン除き、超純水で 3 回洗浄した。プレートから染色細胞が貼り付いたカバーガラスを取り出し、余分な水分を除いた。スライドガラスに対比染色として核染色色素 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 含有の封入剤であるフルオロキパー退色防止剤を滴下して封入した。

観察には正立顕微鏡 ECLIPSE E600 に Y-FL 落射蛍光装置 (株式会社ニコン、東京) を取り付けた蛍光顕微鏡と顕微鏡用スタンダードデジタルカメラ WRAYCAMNF500 を用いて撮影した。得られた画像のミトコンドリアの染色面積と核の染色面積は、画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA)⁷⁵⁾ を用いて測定した。ミトコンドリアの染色面積は、核の染色面積あたりで標準化した。

3-2-18 遺伝子発現 (Real-time RT-PCR)

3-2-18-1 RNA サンプルの調製

実験前日に 24-well プレートに細胞が 1.25×10^5 cells/cm² になるように播種した。試験物質処理後、KHH バッファーを取り除き、RNAprotect[®] Cell Reagent 300 μL を加えた。ピペティングで細胞を RNAprotect[®] Cell Reagent に懸濁させながら 1.5 mL 容チューブに全量回収した。サンプルは Total RNA 抽出時まで説明書に従い -80°C で保存した。

Total RNA 抽出の際は、サンプルを常温に戻し、ラボ用冷却遠心機 3-16KL を用いて 17,968 ×g、5 分遠心した。細胞が沈殿していることを確認し、上清を除き、沈殿物を total RNA の抽出に用いた。以降の操作は QuickGene RNA cultured cell kit S の操作法にしたがい、細胞ライセートを次に示すように作成した。マイクロチューブ中の沈殿物をタッピングによりほぐし、2-メルカプトエタノールが添加された Lysis Buffer (LRC 溶液。2-メルカプトエタノール : LRC 溶液 = 1 : 100) 520 μL を加え、白い沈殿物が見えなくなるまで混和した。続いて、エタノール 100 μL を加え、1 分混和した。もう一度エタノール 180 μL を加え、1 分混和し、これをライセートとした。RNA の抽出には、自動核酸抽出システム QuickGene-800 を用いた。DNA の混入を防ぐため DNase による処理も行った。RNA 濃度および純度 (A260/A280) は NanoDrop 1000 Spectrophotometer を用いて測定した。

3-2-18-2 プライマーの作成

プライマーの作成は mtDNA コピー数の検討の場合 (3-2-16-2) と同様に行った。それらの塩基配列は、Table 1 に示す。

3-2-18-3 Real-time RT PCR

Real-time RT-PCR はリアルタイム定量 PCR システム Mx3000P と One Step SYBR[®] PrimeScript[®] PLUS RT-PCR kit (Perfect Real-time) を用いて行った。反応液 (1×master mix reagent、0.4 μM primer) 10 μL に 8 ng/μL total RNA 溶液を 4 μL 加えて反応させた。RT-PCR の反応条件は逆転写反応を 42°C (5 分)、95°C (10 秒) させた後、PCR 反応を [95°C (5 秒)、60°C (20 秒)] を 40 サイクル行った。その後 55°C (30 秒)、95°C (30 秒) と設定し、温度変化に伴う二本鎖の解離状態を解析し、PCR 増幅産物の融解温度の均一性を確認した。mRNA 発現量は Ct 値を用いて算出した。内部標準遺伝子として GAPDH を用い、GAPDH の mRNA 発現に対する標的遺伝子の mRNA 発現の比を算出し、定量的に解析した。

3-2-19 タンパク質発現 (ウエスタンブロッティング)

3-2-19-1 細胞のサンプル回収

実験前日に 1.25×10^5 cells/cm² になるよう 6-well プレートに播種した。試験物質処理後、培養液をアスピレートし、氷冷した PBS で 2 回洗浄した。Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) バッファー (pH 7.4、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% TritonX-100、0.5% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム、0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1 mM EDTA、10 mM NaF) にプロテアーゼインヒビターカクテルが 100 倍希釈されるように添加した細胞溶解液 150 μL を添加し、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。続いてソニケーターVibra-Cell[™] を用いて 10 秒間超音波処理を行った。その後ラボ用冷却遠心機 3-16KL で 17,968 ×g、4°C で 15 分遠心した。上清の 100 μL を別の 1.5 mL 容チューブに移し、これを次項の SDS 処理に用いた。残りの上清はタンパク質濃度測定に用いた。タンパク質濃度は 2-2-2-5 で述べた BCA アッセイキットを用いて測定した。

3-2-19-2 SDS 処理

回収したサンプル 100 μL に 3×SDS サンプルバッファー (60 mM Tris、468 mM グリシン、5% (w/v) SDS、0.02% (w/v) プロモフェノールブルー、120 mM ジチオトトレイトール、5% (w/v) グリセロール) 50 μL を加え、よく混和させた。あらかじめ水を張り、100°C にセットしておいたヒートブロックで 5 分インキュベートし、SDS 処理を行った。SDS 処理を行ったサンプル中のタンパク質が 2

mg/mL になるように 1×SDS サンプルバッファーで調製した。SDS-PAGE に用いるまでは−80℃で保存した。

3-2-19-3 SDS-PAGE

AE-6530 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽（アトー株式会社、東京）にアクリルアミド 15%含有ゲルである e-PAGEL（18 レーン、アトー株式会社、東京）と泳動バッファー（25 mM Tris、192 mM グリシン、1% (w/v) SDS）をセットし、ゲルのレーンにサンプルを 5 μ L 添加した。添加したサンプルがスタッキングゲル泳動中は 250 V、8 mA の条件で通電し、その後、分離用ゲル泳動中は 250 V、15 mA の条件に変更した。リーディングイオン（ブロモフェノールブルー）がゲルの下端から 5 cm まで移動したところで、泳動を終了させた。

3-2-19-4 ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンの親水化

PVDF メンブレンをメタノール中で 30 秒間振とうし、親水化させた。使用するまで乾燥を防ぐために超純水中で振とうさせた。

3-2-19-5 トランスブロット

使用する器具類全てを 70%アルコール消毒液で清拭し、以降の操作は手袋を着用して操作を行った。SDS-PAGE 終了後のゲルを取り出し、超純水中でゲルを 3 回洗浄した。親水化した PVDF メンブレンとゲルをタンク式転写装置 Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) にセットし、タンク内を転写バッファー（40 mM Tris、307 mM グリシン、25% (w/v)メタノール）で満たし、25 V、100 mA の条件で 1 晩通電した。

3-2-19-6 抗原抗体反応

3-2-19-6-1 試薬調製

TBS バッファー（pH 7.4、20 mM Tris-HCl、154 mM NaCl）、TBS-T 溶液（TBS バッファー、0.1% (w/w) Tween-20）、ブロッキングバッファー（3% (w/v) スキムミルク・TBS-T 溶液）、第一抗体液、第二抗体液はいずれも実験当日に調製した。第一抗体液には抗ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1 (PEPCK1) ウサギ由来ポリクロナール抗体 (Proteintech Group, Inc., IL, USA, カタログ No. 16754-1-AP)、抗ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 2 (PEPCK2) ウサギ由来モノクロナール抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA, カタログ No. #6924)、抗 PC ウサギ由来ポリクロナール抗体 (Proteintech Group, Inc., IL, USA, カタログ No. 16588-1-AP) を、抗 β -アクチンウサギ由来モノクロナール抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA, カタログ No. #4967) をいずれも 1 :

1,000 になるようにブロッキングバッファーで用時調製した。第 2 抗体液には西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を 1 : 100,000 になるようにブロッキングバッファーで用時調製した。

3-2-19-6-2 抗原抗体反応

転写装置からメンブレンを取り出し、ブロッキングバッファーで 1 時間振とうさせながらメンブレン表面のブロッキングを行った。次にブロッキングバッファーを除き、第一抗体液を加えてメンブレンを 2 時間振とうさせた。終了後に第一抗体液を除き、メンブレンと容器を超純水で洗浄し、TBS-T 溶液で 5 分間振とうした。もう一度新しい TBS-T 溶液に変え、この洗浄作業を 3 回行った。続いて第二抗体液を加えてメンブレンを 2 時間振とうさせた。第二抗体液を除き、メンブレンと容器を超純水で洗浄し、第一抗体反応の時と同様に TBS-T 溶液による 5 分間洗浄を 3 回行った。

3-2-19-7 化学発光

発光試薬は ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent を用いた。説明書に従い、A 液と B 液を実験直前に 1 : 1 の割合で調製した。PP クリアポケットの長辺を切りとり、内側にメンブレンを並べ、発光試薬を上から添加した。気泡が入らないようにラッピングし、ケミルミネッセンス撮影装置 Cool saver AE-6955 (アトー株式会社、東京) で染色バンドを検出した。

バンドの発光強度は画像解析ソフト ImageJ⁷⁵⁾ の Gel モードで解析し、数値化した。得られた面積は内部標準である β -アクチンで標準化し、試験物質非添加群に対する比率で求めた。

3-2-19-8 抗体除去および再免疫染色

同じメンブレンで数種類のタンパク質を検出するため、メンブレン上の抗原抗体反応物を除去し、繰り返し使用した。メンブレンに抗体除去バッファー (pH 7.4、62.5 mM Tris-HCl、2% (w/v) SDS、100 mM 2-メルカプトエタノール) を加え、50°C で 30 分振とうさせた。抗体除去バッファーを除き、超純水でメンブレンを洗浄した後に TBS-T 溶液による 5 分間洗浄を 3 回行った。その後メンブレンを TBS バッファー中に冷蔵保存した。次の操作は上記抗原抗体反応 (3-2-19-5) のブロッキング操作から行った。

3-2-20 統計解析

統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics ver.20 for Japan (日本アイ・ビー・エム株式会社、東京) を用いた。データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。平均値の

差を検定する為に一元配置分散分析後に Dunnett による多重比較を行った ($P<0.05$)。

3-3 結果

3-3-1 細胞内へのグルコース取り込みに対する細胞外ピルビン酸の影響

本研究では先行研究^{21, 22)}を参考に、培養液中のグルコース濃度の低下をもとにグルコース取り込み量を算出した。まず、試験物質添加 4 時間後、24 時間後に培養液を回収し、培養液中に残存しているグルコース濃度を測定し、初期濃度から差し引いてグルコース取り込み量を求めた (Fig. 24)。4 時間培養では、ピルビン酸 1 mM、2 mM 添加群のいずれにおいても、試験物質非添加群と比べてグルコース取り込み量に有意な影響は認められなかった (Fig. 24A)。24 時間培養の場合は、試験物質非添加群に比べて 1 mM ピルビン酸添加群では 1.23 倍、2 mM ピルビン酸添加群の場合は 1.26 倍と有意な増加が認められた (Fig. 24B)。

ポジティブコントロールのインスリン添加群では 4、24 時間培養において試験物質非添加群と比較してそれぞれ 1.11 倍、1.16 倍といずれも有意な増加が認められた。インスリンの添加濃度は 1 μ M であるが、これは培養細胞における実験でよく利用されている濃度である⁸⁹⁾。また、著者の修士論文の研究⁹⁰⁾において、インスリンを 1 nM-1 μ M 添加し、24 時間培養時のグルコースの取り込み量を調べたところ、インスリン濃度依存的にグルコース取り込み量が増加したが、100 nM-1 μ M でほぼプラトーに達していた (data not shown)。同様の結果は、先行研究においても示されている⁹¹⁾。したがって、以降の実験でポジティブコントロールとして使用するインスリンの濃度は全て 1 μ M とした。

ピルビン酸添加 4 時間後と 24 時間後における結果が異なっていることから、修士論文の研究⁹⁰⁾では、時系列的解析を行った。試験物質添加後 4 時間おきに培養液の一部を回収し、グルコースの取り込み量を測定した。4 時間ごとの累積取り込み量では、1、2 mM ピルビン酸のいずれの処理群においても試験物質添加 4 時間後よりグルコース取り込み量は増加し続け、試験物質添加 24 時間後においてもグルコースを取り込み続けた (data not shown)。また、0-4 時間培養では群間に有意な差は見られなかったが、0-8 時間培養からは試験物質非添加群と比較して、1、2 mM ピルビン酸添加群でグルコースの取り込み量が有意に増加した。以上の結果より、ピルビン酸によるグルコース取り込み促進作用は添加後数分で効果を表す即時的な作用ではなく、添加後 8 時間以降と、ある程度の時間を要する作用であることが考えられた。また、24 時間培地交換せず連続して培養した場合でもグルコースの取り込みへのピルビン酸の作用を検出することができたため、以降の実験は全て試験物質添加後 24 時間時点の測定とした。

3-3-2 生細胞数計測と MTT 試験による細胞活性の検討

ピルビン酸、インスリンの添加により培養 24 時間以内に HepG2 細胞によるグルコースの細胞内取り込み量が増加することが示されたが、その要因として試験物質添加による細胞数の増加が考えられた。そこで、試験物質添加後 24 時間時点における細胞数の測定と MTT 試験を行った。その結果、生細胞数はインスリン添加群では試験物質非添加群と比較して 1.34 倍と有意な増加が認められたが、ピルビン酸添加群については有意な影響は見られなかった (Fig. 25A)。一方、MTT 試験では、細胞内に蓄積したホルマザン色素が、試験物質非添加群と比較して、インスリン添加群では 1.09 倍と有意に増加していた。2 mM ピルビン酸添加群では 1.07 倍の有意な増加が認められ、1 mM ピルビン酸添加群では有意な影響は見られなかった (Fig. 25B)。なお、MTT 試験におけるホルマザンの生成は生細胞数と相関するが、実際にはミトコンドリアの機能を反映するものである⁹²⁾。

3-3-3 グルコース取り込みに対する細胞外低濃度ピルビン酸の影響

ここまでの実験では、1-2 mM のピルビン酸添加が、HepG2 細胞によるグルコース取り込みを促進することが再現性よく確認された。なお、ピルビン酸の濃度 1-2 mM は細胞培養でしばしば利用されている濃度²¹⁻²⁵⁾であり、実際のヒト血清中の濃度 0.1 mM^{7, 8)}に近いとはいえ、やや高めである。

そこでピルビン酸濃度が 1 mM より低濃度であっても、ピルビン酸のグルコース取り込み促進効果を検出できるか調べた。ピルビン酸を最終濃度が 0.1、0.5、1、2 mM となるように添加して 24 時間培養した。グルコースの取り込み量はピルビン酸濃度が 0.1 mM であっても、試験物質非添加群の 1.29 倍と有意に増加し、さらに濃度依存的に有意に増加して、0.5-2 mM ではほぼプラトーに達した (Fig. 26)。細胞実験²¹⁻²⁵⁾や過去の報告にある 25 mM³³⁾や 50 mM³¹⁾と比較するとより低濃度からグルコースの取り込み促進作用が確認された。

3-3-4 グルコース取り込みに対するピルビン酸以外の有機酸の影響

生理的濃度に近い細胞外ピルビン酸が示す HepG2 細胞に対するグルコース取り込み促進作用は、類縁有機酸に共通作用である可能性がある。そこで、いくつかの有機酸について、ピルビン酸の場合と同様の低濃度で検討した (Fig. 27A-J)。その結果、各有機酸の影響は様々であり、細胞外ピルビン酸のグルコースの取り込み促進作用は、対イオンのナトリウムイオンや浸透圧の上昇等の非特異的効果によるものではないことが判明した。一方、各有機酸には、2 mM までの範囲内での濃度依存性の観点から、有意な影響を示さなかったと判断されるもの (α -ケトグルタル酸・コハク酸・フマル酸)、低下作用を示したもの (乳酸・酢酸・

酪酸・ジエチルオキサロ酢酸)、二相性を示したために判断が保留されるもの(プロピオン酸・クエン酸)、そしてリンゴ酸のようにピルビン酸と同様に促進作用を示したものがあつた。したがって、細胞外ピルビン酸のグルコース取り込み促進作用は特異的な作用であり、細胞外リンゴ酸も同様の作用を示すと示唆された。

3-3-5 乳酸生成と乳酸変換率に対する細胞外ピルビン酸の影響

上記のように、生理的濃度に近いピルビン酸の HepG2 細胞外への添加はエネルギー源としてピルビン酸と競合する可能性のあるグルコースの細胞内への取り込みを促進することが明らかになった。一方、細胞外ピルビン酸のグルコース取り込み促進作用は、ピルビン酸自身が細胞内に取り込まれて発現すると推定される。また、グルコースやピルビン酸の細胞内への取り込みはグルコースの代謝産物量の増減を生じる可能性がある。これらの検証は、細胞外ピルビン酸によるグルコースの細胞内取り込みの機構を探る手掛かりを提供すると期待される。そこで、HepG2 細胞外に 0-2 mM の濃度に添加した際のグルコース取込み促進作用とともに、ピルビン酸の細胞内取り込みおよび細胞外乳酸生成量を調べた Fig. 28A。

その結果、グルコースの取り込みは、これまでと同様にピルビン酸によって濃度依存的に促進され、0.5-2 mM でプラトーに達した。一方、ピルビン酸の取り込みは、細胞外ピルビン酸濃度に比例してほぼ直線的に増加した。また、乳酸生成量は細胞外ピルビン酸濃度が高くなると増加したが、0.5-2 mM ではほぼプラトーに達した。

既に述べたように、グルコースまたはピルビン酸 1 分子が解糖系と乳酸脱水素酵素で嫌氣的かつ完全に乳酸に代謝される場合、グルコースからは乳酸が 2 分子、ピルビン酸からは乳酸が 1 分子生成される⁸⁵⁾。このことを踏まえ、取り込まれたグルコースとピルビン酸がどの程度乳酸に変換されているのか、その変換率を方法の項で示した計算式を用いて算出し、細胞外ピルビン酸濃度に対してプロットした結果を Fig. 28B に示す。試験物質非添加群ではこの乳酸変換率は 1.0 ほどであつた。一方、細胞外へのピルビン酸添加により、乳酸変換率は濃度依存的に 0.7 付近まで有意に低下した。インスリン添加群でも乳酸変換率の有意な低下が見られた。以上より、取り込まれたグルコースとピルビン酸が乳酸以外の別の物質に変換されている可能性とともに、嫌氣的代謝から好氣的代謝への転換が部分的に行われている可能性が示唆された。

3-3-6 細胞内グリコーゲン・中性脂肪に対する細胞外ピルビン酸の影響

上述 3-3-5 のように、ピルビン酸により取り込みが促進されたグルコースやピ

ルビン酸は、乳酸以外の物質に変換される可能性がある。HepG2 細胞は肝細胞由来株細胞であり、グリコーゲンや中性脂肪を合成し、それらを細胞内に蓄積することができる⁵⁹⁾。そこで、ピルビン酸添加が細胞内グリコーゲン量や中性脂肪量に与える影響について、それぞれ細胞染色による観察および酵素法による定量を行って調べた。

細胞内グリコーゲン量について PAS 染色により観察した。PAS 染色は細胞内の多糖類をピンク色に染色するが、検鏡による試験物質添加の影響を見出すことはできなかった (Fig. 29A)。一方、細胞外ピルビン酸 0.1 mM 添加後 24 時間の細胞内グリコーゲン量は、試験物質非添加群に比べて有意に減少し、さらにピルビン酸濃度依存的に減少した (Fig. 29B)。インスリン添加群では試験物質非添加群と比較して有意な影響は認められなかった。

Oil Red O 染色は細胞内の脂肪滴を赤色に染めるが、2 mM ピルビン酸添加群、インスリン添加群いずれの場合も添加 24 時間後の観察で試験物質非添加群と比較して赤色の脂肪滴が多く認められた (Fig. 30A)。続いて、細胞内の中性脂肪量を定量したところ、0.1 mM 以上のピルビン酸添加により濃度依存的かつ有意に増加したが、0.5-2 mM で概ねプラトーに達した (Fig. 30B)。この結果は、グリコーゲン量 (Fig. 29B) に対する影響とは逆方向の結果であった。インスリン添加群でも試験物質非添加群と比較して有意な増加が認められたが、その程度はピルビン酸の場合よりも小さかった。

3-3-7 ミトコンドリア関連指標に対する影響

既に述べたように、細胞外へのピルビン酸添加により、HepG2 細胞におけるグルコース代謝が嫌氣的代謝から好氣的代謝へと部分的に転換されている可能性があるとともに、細胞内中性脂肪量が増加した (Fig. 28, 30)。中性脂肪を構成する脂肪酸は細胞質ゾルで合成されるが、その素材となるアセチル CoA はミトコンドリアの TCA 回路から抜き取られたクエン酸に由来する^{93, 94)}。また、MTT 試験では、ピルビン酸添加によりホルマザンの生成が増加した (Fig. 25B)。これらの結果に着目して、ミトコンドリア機能へのピルビン酸添加の影響を、細胞内 ATP 量、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のコピー数、ミトコンドリア特異的蛍光染色を指標として検討した。

細胞内 ATP 量は、ピルビン酸の添加により濃度依存的に増加する傾向にあった。特に、ピルビン酸濃度 1 mM 以上では試験物質非添加群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 31A)。インスリン添加による有意な影響は認められなかった。

続いて、mtDNA として NADH 脱水素酵素複合体 1 (ND1)、nDNA としてサイクロフィリン (PPIA) を採用し、Real-time PCR を用いて nDNA コピー数に対

する mtDNA コピー数の比を測定したところ、2 mM ピルビン酸添加群では有意差はつかなかったものの、試験物質非添加群に比べて増加傾向にあり、0.1、0.5、1 mM ピルビン酸添加群では試験物質非添加群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 31B)。インスリン添加群では有意な影響が認められなかった。

次に、ミトコンドリアに特異的な蛍光色素である MitoBright Red を用いて細胞を染色し、さらに核染色色素 DAPI で対比染色し、観察した。その結果、ピルビン酸濃度依存的に赤色で示されたミトコンドリア染色部位が多く観察された (Fig. 32A)。そこで、これらの染色画像を画像解析し、染色面積を算出した。ミトコンドリアの染色面積は核の染色面積で標準化した。その結果、ピルビン酸添加によりミトコンドリアの染色面積の有意な増加が認められた (Fig. 32B)。

これら、細胞内 ATP 量、mtDNA コピー数、ミトコンドリア特異的蛍光染色の 3 つの指標への影響を総合すると、ピルビン酸の添加は HepG2 細胞のミトコンドリア生合成を促進すると考えられた。

3-3-8 解糖系物質からのアナプレロシス反応を担当する酵素の遺伝子発現とタンパク質発現の解析

ピルビン酸の細胞外添加は HepG2 細胞のグルコースの取り込みと中性脂肪量を増加させ、ミトコンドリアの生合成を促進した。グルコースを中性脂肪の合成に利用する場合、TCA 回路の途中で炭素骨格源であるクエン酸を引き抜く形で利用する。この状況下で TCA 回路を円滑に進めるためには TCA 回路中間体の補充、すなわちアナプレロシス反応 (補充反応) が必要となる⁹⁵⁾。

そこで、解糖系物質からのアナプレロシス反応に関与している酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)⁹⁶⁾ について遺伝子発現とタンパク質発現を解析した。また、糖新生経路 (カタプレロシス経路) の律速酵素として広く知られているが、近年アナプレロシス経路にも関与している事が指摘されているホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)⁹⁷⁻⁹⁹⁾ についても同様に調べた。なお、PEPCK には細胞質型 (PEPCK1) とミトコンドリア型 (PEPCK2) の 2 種類のアイソザイムが存在しているため、比較の為に両方検討した。HepG2 細胞へのピルビン酸の添加濃度は 0.1、1 mM、インスリンの添加濃度は 1 μ M とし、24 時間の培養を行った。

mRNA 発現への細胞外ピルビン酸・インスリン添加の影響は Fig. 33A に示すとおりである。PC の mRNA 発現にはピルビン酸添加による有意な影響は認められなかった。インスリンについては統計的に有意な mRNA 発現の低下が認められたが、軽度であった。PEPCK2 の mRNA 発現にもピルビン酸添加による有意な影響は認められなかった。インスリンについては統計的に有意な mRNA 発現の増加が認められたが、軽度であった。一方、PEPCK1 の mRNA 発現はピル

ピルビン酸添加により増加傾向にあり、1 mM ピルビン酸添加では試験物質非添加群の約 2 倍へと有意な上昇が認められた。インスリン添加では逆に発現が有意に低下を示した。

mRNA 発現については、PC や PEPCK2 に対しては細胞外ピルビン酸の影響は認められなかったが、PEPCK1 の発現を細胞外ピルビン酸が促進する結果が得られた。続いて、これら 3 つの酵素のタンパク質発現へのピルビン酸添加の影響をウェスタンブロッティングで検討した。撮影した画像 Fig. 33B では、PC や PEPCK2 のタンパク質発現に群間差があるようには見えなかったが、PEPCK1 についてはピルビン酸添加により 63 kDa 付近のバンドがわずかながら濃染しているように見受けられた。そこでさらに詳しく調べるため、バンドの強度を画像解析して数値化した (Fig. 33C)。その結果、PC や PEPCK2 では標的バンドの染色強度に群間差は認められなかったが、PEPCK1 では 1 mM ピルビン酸添加によりバンド強度が増加傾向にあり ($P=0.08$)、mRNA レベルでの PEPCK1 の発現に対するピルビン酸の影響と整合することが確認できた。

3-4 考察

ピルビン酸は解糖系の最終産物であり、エネルギー栄養素代謝の岐路に位置する中間体であり、血中にもおよそ 0.1 mM で存在する^{7, 8)}。よって、細胞外ピルビン酸は、培養細胞におけるグルコースの取り込みから、その先の利用に至るまで、様々な影響を及ぼす可能性がある。しかし、培養肝細胞におけるグルコース利用へのピルビン酸の影響を調べた研究は見当たらない。そこで本研究では、細胞外ピルビン酸がヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 細胞におけるエネルギー栄養素の代謝、特にグルコースの利用にどのような影響を与えるのか調べた。

まず初めに、細胞内へのグルコースの取り込みについて調べた。ピルビン酸の濃度は細胞培養でよく利用されている 1、2 mM²¹⁻²²⁾ とした。ピルビン酸添加後 4 時間では有意な影響が確認されなかったが、24 時間ではグルコースの取り込みを促進させた。ポジティブコントロールとしてインスリンを 1 μ M 添加した群では添加後 4 時間、24 時間ともにグルコースの取り込みが増加した。

ピルビン酸は HepG2 細胞によるグルコースの取り込みを促進したが、この要因の一つとして細胞数の増加が考えられたが、ピルビン酸添加による細胞数への有意な影響は確認されなかった。インスリン添加群では細胞数が有意に増加した。

次に、1 mM 以下の濃度のピルビン酸でもグルコース取り込み促進作用を確認できるか調べた。ヒト血清に含まれているピルビン酸はおよそ 0.1 mM^{7, 8)} であるが、0.1 mM から濃度依存的に細胞内へのグルコースの取り込みが有意に促進した。

グルコース取り込み促進作用の結果を受け、ピルビン酸により多く取り込まれたグルコースやピルビン酸自身はその後どのような代謝を受けるのか調べた。また、最終代謝産物を調べることによりピルビン酸がエネルギー栄養素の代謝のどの部分に作用しているのか検討することも目的とした。

初めに、可能性の一つとして乳酸の生成量を測定した。同時にグルコース取り込み量とピルビン酸取り込み量も測定した。乳酸生成量は 0.5 mM ピルビン酸添加群から増加傾向にあった。ピルビン酸取り込み量はピルビン酸添加量に従って直線的に増加した。

取り込まれた基質がどの程度乳酸に変換されているのか、基質の乳酸変換率を調べた。その結果、ピルビン酸濃度依存的に乳酸変換率が低下した。これらの結果より、細胞内に取り込まれた基質が乳酸以外の別の物質に変換されている可能性が示唆された。

そこで細胞内グリコーゲン量と中性脂肪量を測定した結果、グリコーゲン量はピルビン酸濃度依存的に減少したが、反対に中性脂肪量は濃度依存的に増加した。ピルビン酸は中性脂肪を合成する経路のどこかに影響を与えている可能性が考えられた。

取り込まれたグルコースが中性脂肪に変換されるにはミトコンドリアに存在する TCA 回路の一部を利用しなければならない^{93, 94)}。ピルビン酸はミトコンドリアの生合成や活性に影響を与えている可能性が考えられた。これらを調べるため、細胞内 ATP 量、mtDNA コピー数、ミトコンドリア蛍光染色の解析を行った。その結果、上述した 3 項目いずれもピルビン酸 0.1 mM の添加から増加傾向にあった。

さらに解糖系生成物からのアナプレロシス反応に関与している酵素である PC と PEPCK の遺伝子発現とタンパク質発現について調べたところ、PC およびミトコンドリア型の PEPCK2 の mRNA・タンパク質発現には、整合性ある有意な影響は認められなかった。一方、細胞ゾル質型の PEPCK1 については、ピルビン酸はその mRNA 発現を有意に、タンパク質発現をほぼ有意に促進した。

次に各項目についてさらに詳しく論考する。

3-4-1 ピルビン酸による細胞内グルコース取り込み促進作用

細胞培養において、ピルビン酸は細胞のエネルギー源・炭素骨格源となると仮定すると、ピルビン酸は同じエネルギー源・炭素骨格源であるグルコースの取り込みを減少させると予想していた。しかしながら本研究において、予想とは反対にピルビン酸は HepG2 によるグルコースの取り込みを増加させた。特に、生理学的な濃度である 0.1 mM からグルコース取り込み促進作用が確認された。また、1、2 mM ピルビン酸添加群ではポジティブコントロールである 1 μM インス

リン群よりも有意にグルコースを多く取り込んだ。

マウス骨格筋由来 C2C12 細胞において、ピルビン酸はグルコースの取り込みを抑制した³¹⁾。マウス由来 3T3-L1 前脂肪細胞ではインスリン刺激によるグルコースの取り込みは増加したが、ピルビン酸単独では効果が現れなかった³³⁾。本研究の結果はいずれの先行研究とも異なっていた。この違いについては細胞種の違いのほか、添加したピルビン酸濃度によるものであると考えられる（本研究：0.1-2 mM、文献 31：5-50 mM、文献 33：25 mM）。通常細胞培養液によく添加される濃度（1-2 mM）²¹⁻²²⁾ やヒト血清中の濃度（0.1 mM）^{7, 8)} と比較しても文献 31 と文献 33 は非常に高濃度である。また文献 31 と文献 33 は試験物質添加後 72 時間後で測定をしているが、本研究では最長で 24 時間である。本研究と先行研究との違いはこれらの実験条件も理由の一つであると考えられた。

3-4-2 ピルビン酸と細胞数の関係

本研究におけるグルコース取り込み量は^{21, 22)}の方法に従って、培養前後の培養液中のグルコース濃度を測定することにより算出している。この方法を用いて測定した結果グルコースの取り込みが増加した場合、二つの理由が考えられる。一つ目は試験物質によって細胞数が増加し、それに伴い全体としてのグルコース取り込み量が増加した。二つ目は試験物質が細胞一つ一つの代謝などに作用し、細胞数増加が伴わなくともグルコースの取り込みが増加した。これらを検証するため細胞数の測定と MTT 試験を行った。その結果、細胞数においてはインスリン群で有意な増加が認められたがピルビン酸群では有意な影響が認められなかった。MTT 試験ではインスリン群、2 mM ピルビン酸群で有意な増加が認められた。

インスリンは直接的な有糸分裂促進因子ではないが、細胞の増殖にかかわっており¹⁰⁰⁾、実際にインスリン添加により細胞数が増加したという報告がいくつも見受けられる¹⁰¹⁻¹⁰³⁾。本研究のインスリン添加によるグルコース取り込み促進作用は細胞数の増加が関与していると考えられた。

ピルビン酸添加群においては細胞数には有意な影響は確認されなかったため、ピルビン酸添加によるグルコース取り込み促進作用は細胞数ではなく何か別の要因が考えられた。しかしながら、細胞数の結果とは異なり MTT 試験では 2 mM 添加により吸光度の増大が確認された。

MTT 試験とは MTT などのテトラゾリウム塩が生細胞のミトコンドリアに存在するコハク酸脱水素酵素により紫色のホルマゼン色素を生成する反応を利用し、細胞の生存率や増殖率を調べる方法である⁹²⁾。MTT 試験の結果は生細胞数と強い正の相関があるが、実際にはミトコンドリアの活性（コハク酸脱水素酵素の活性）を測定している。また、後で詳しく述べるがピルビン酸はミトコンドリ

アの数や活性に関連するいくつかの指標を増大させていた。したがって、ピルビン酸添加群において細胞数と MTT 試験の結果が異なっていたのはピルビン酸添加によりミトコンドリアの数または活性が増大し、MTT 試験の結果に影響を与えたからであると考えられた。

3-4-3 他の有機酸について

ピルビン酸以外の他の有機酸でも同様のグルコース取り込み促進作用が確認できるか調べた。乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、クエン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、ジエチルオキサロ酢酸について調べたところ、ピルビン酸のように濃度依存的にグルコースの取り込みを増加させた有機酸はリンゴ酸のみであった。濃度依存的にグルコース取り込み量が減少した有機酸は乳酸、酢酸、酪酸、ジエチルオキサロ酢酸であった。ある特定濃度で取り込み量が増加した有機酸はプロピオン酸、クエン酸であった。 α -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸添加群では有意な影響は見られなかった。ピルビン酸を含む各有機酸は培養液中の pH が変動しないようにナトリウム塩の形で添加しているが、細胞のグルコース取り込みに与える影響は、ナトリウム塩ではなく有機酸自身であることが示唆された。続いて、本研究で検討した有機酸の中でも生体内においてピルビン酸と密接にかかわっている乳酸と、細胞のグルコース取り込み量を増加させたリンゴ酸について着目した。

乳酸やピルビン酸は第 1 章 序論、第 2 章第 1 部 蛍光原色素を用いた乳酸・ピルビン酸の定量法の検討 研究の背景ならびに目的 (2-1-1) でも述べたように、血液中にも存在する。乳酸とピルビン酸は乳酸脱水素酵素により相互変換され、健康なヒトの血液中においてその濃度はおよそ 10:1 に保たれている⁷⁾。本研究において乳酸を添加したとことピルビン酸とは反対に濃度依存的にグルコースの取り込みが減少した。ヒトを対象とした実験において、乳酸を投与して運動を行うとグルコースの酸化率 (利用率) が低下し、そのかわりに乳酸の酸化率が上昇したとの報告されている¹⁰⁴⁾。さらに近年の研究によると、乳酸は糖代謝により生成されてからそれ以降は利用されない代謝産物ではなく、各臓器でエネルギー源として再利用され、様々な代謝調節にも関わっているとされている¹⁰⁵⁾。これらの先行研究と照らし合わせると、乳酸は HepG2 細胞のエネルギー源として取り込まれたため、その分のグルコースの取り込みが減少した可能性が考えられた。また、本研究の検討ではピルビン酸と乳酸はそれぞれ単独で添加したが、より生体内の環境に近づけるため、ピルビン酸と乳酸を同時に添加した際の相互作用についても今後検討すべきであると考ええる。

リンゴ酸とピルビン酸は、リンゴ酸酵素により下記の通り相互変換される¹⁰⁶⁾。



また、リンゴ酸酵素には NADP 依存性細胞質ゾル型、NADP 依存性ミトコンドリア型、NAD 依存性ミトコンドリア型の 3 つのアイソザイムが存在する。特に NADP 依存性細胞質ゾル型リンゴ酸酵素は NADPH 供給源として脂肪の合成経路に関与しているとされている¹⁰⁶⁾。

ピルビン酸やリンゴ酸によるグルコース取り込み促進作用は、細胞内のリンゴ酸酵素により、ピルビン酸がリンゴ酸、もしくはリンゴ酸がピルビン酸に変換されてから発揮されている可能性が考えられた。リンゴ酸によるグルコースの取り込み促進作用について、ピルビン酸の作用とも比較しながらさらに精査していく必要があると考える。

3-4-4 ピルビン酸取り込み量と乳酸生成量と乳酸変換率

本研究ではピルビン酸を最大で 2 mM 添加しているが、第 2 章第 1 部の結果より 24 時間培養後では培養液中にはピルビン酸はほとんど残存しておらず (Fig. 6B)、さらに本章 (第 3 章) の結果においてもピルビン酸取り込み量は添加濃度に比例して増加した。このピルビン酸の特徴的な取り込まれ方は、24 時間という培養時間、細胞内のピルビン酸プール (10 μ M)¹⁰⁷⁾、ピルビン酸を細胞内へ取り込むモノカルボンサントランスポーターの大きな Km 値 (1 mM)¹⁾ によってもたらされていると考えられた。また、本研究で確認されたピルビン酸添加による諸作用はおそらく細胞外からの作用ではなく、細胞内に取り込まれてからの作用であると推察された。

乳酸生成量は、ピルビン酸添加群において乳酸生成量は増加する傾向にあったが、この作用はピルビン酸 0.5 mM で飽和に達した。

続いて、取り込まれた基質がどの程度乳酸に変換されているのか、基質の乳酸変換率を調べた結果、ピルビン酸濃度依存的に乳酸変換率が低下した。乳酸変換率は取り込まれた基質が乳酸へ代謝される嫌氣的呼吸優位な状態であると値が 1.0 に近づき、ミトコンドリアの酸化リン酸化による好氣的呼吸優位な状態であると値は 0 に近づくとされている⁸⁴⁾。以上より、ピルビン酸添加により細胞からの乳酸生成量は増加傾向にあるが、基質の乳酸変換率は低下することが明らかとなった。これは細胞内の呼吸がミトコンドリア関与の好氣的呼吸優位な状態にシフトした可能性と、取り込まれた基質が乳酸以外の別の物質に変換されている可能性が示唆された。

しかしながら、この方法は培養液中に残存しているグルコース、ピルビン酸、乳酸を測定し、間接的に求めた乳酸変換率である。細胞外に放出した乳酸を再び細胞内に取り込み代謝しているなどの可能性も考えられるので、より正確に細胞内に取り込まれた基質 (グルコースとピルビン酸) の乳酸変換率を調べるためには、放射性標識したグルコースやピルビン酸を用いてトレーサー実験を行う

必要があると考えられる。

3-4-5 細胞内グリコーゲン量と中性脂肪量

HepG2 細胞はヒトの肝ガン由来の細胞である¹⁰⁸⁾。細胞内でグリコーゲンや中性脂肪を合成・蓄積させておくことができ⁵⁹⁾、その機能は継代を重ねても維持していると報告されている¹⁰⁹⁾。上述したように取り込まれた基質が乳酸以外の物質に変換されている可能性が考えられたので、細胞内のグリコーゲン量と中性脂肪量を測定した結果、グリコーゲン量はピルビン酸濃度依存的に減少したが、中性脂肪量は反対に濃度依存的な増加が確認された。

取り込まれたグルコースがグリコーゲンに合成する経路は細胞質内で行われるが、中性脂肪の場合はミトコンドリアを利用しなければならない^{93, 94)}。ピルビン酸は中性脂肪の合成経路またはミトコンドリアに何らかの影響を与えた可能性が考えられた。

インスリン添加群においては、試験物質非添加群と比較してグリコーゲン量には影響が確認されなかったが、中性脂肪量は増加した。生体内において、インスリンは肝臓に対し、肝細胞内へのグルコースの取り込み、中性脂肪やグリコーゲンの合成促進、糖新生やグリコーゲン分解を抑制させる作用が知られている⁶³⁾。中性脂肪濃度には生体と同様な結果が得られたが、グリコーゲン濃度には従来生体内で起こる現象とは異なる結果が得られた。しかしながら第2章第2部でも述べたように、先行研究においてインスリンを添加しても HepG2 細胞内のグリコーゲン量が増加しなかったという報告もいくつか挙げられている^{64, 65)}。これらの結果の差異は生体と細胞株の特徴によるものであると考えられた。

なお、細胞外ピルビン酸による中性脂肪の蓄積は、顕微鏡下の観察では脂肪肝モデル^{110, 111)}における所見よりも軽度であり、また酵素蛍光法による定量では、0.5 mM ピルビン酸存在下でほぼ飽和に達していた。このことは、中性脂肪の蓄積促進が制御不能なピルビン酸の毒性によるのではなく、細胞の制御機構の下で行われていることを強く示唆する。

3-4-6 ミトコンドリア関連指標

上述のようにピルビン酸は HepG2 細胞のミトコンドリアの生合成等を刺激している可能性が推定された。これらを調べるため、細胞内 ATP 量、mtDNA コピー数、ミトコンドリア蛍光染色の解析を行った。その結果、細胞内 ATP 量は 1 mM から、mtDNA コピー数とミトコンドリア蛍光染色は 0.1 mM ピルビン酸添加群から有意な増大が確認された。細胞内 ATP 量のピルビン酸がミトコンドリアの数や活性を増大させることは C2C12 筋芽細胞を用いた先行研究³²⁾の報告と一致した。細胞内 ATP 量の増加も過去の報告^{79, 82)}と同様の結果が得られた。

以上の本研究の結果と先行研究より、ピルビン酸は培養肝細胞 HepG2 のミトコンドリアの生合成を促進させていることが考えられた。さらにミトコンドリアの生合成が増加したことにより細胞内へのグルコースの取り込みや中性脂肪の増加が引き起こされた可能性が示唆された。

これらの結果を受け、さらにミトコンドリアの生合成に関与するとされる PGC-1 α と PGC-1 β の遺伝子発現またはタンパク質発現の解析も行った。しかし、再現性ある明確な結果は得られなかった (data not shown)。

3-4-7 中性脂肪量の増加とミトコンドリア生合成の増加

取り込まれたグルコースが中性脂肪に変換されるにはミトコンドリアに存在する TCA 回路の一部を利用しなければならない^{93, 94)}。すなわち、TCA 回路の初反応でアセチル CoA とオキサロ酢酸から生成されたクエン酸がクエン酸キャリアにより細胞質へ輸送される。輸送されたクエン酸は、ATP クエン酸リアーゼにより ATP を利用してアセチル CoA に再変換され、脂肪合成経路の基質となる。また、TCA 回路を構成するイソクエン酸脱水素酵素は、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換する酵素であるが、ATP の生成が十分な条件下では活性が抑制され、ミトコンドリア内に過剰なクエン酸やイソクエン酸が蓄積する¹¹²⁾。余剰なクエン酸は細胞質に輸送され、上述の経路をたどり中性脂肪合成の基質になるとされている¹¹³⁾。さらに、中性脂肪の蓄積と mtDNA コピー数には正の相関があるとヒト実験¹¹⁴⁾ や細胞実験^{115, 116)} において報告されている。加えて、ATP はそのままの形では細胞内に蓄積することができないことも踏まえると⁶⁶⁾、ピルビン酸添加によりミトコンドリアの数または活性の増大が生じ、細胞内 ATP が増加し、それに伴い中性脂肪の合成を促進させている可能性が推定された。

3-4-8 解糖系物質からのアナプレロシス反応

TCA 回路の中間体は回路の反応を円滑に進めるために一定の濃度を保っており、運動や絶食の状態でも中間体の濃度に大きな変化はない⁹⁵⁾。しかしながら、グルコースを中性脂肪の合成に利用する場合、TCA 回路の途中で炭素骨格源であるクエン酸を引き抜く形で利用する。この状況下で TCA 回路を円滑に進めるためには TCA 回路中間体の補充、すなわちアナプレロシス反応 (補充反応) が必要となる⁹⁵⁾。

アナプレロシス反応による TCA 回路中間体は主に解糖系生成物やアミノ酸、奇数鎖脂肪酸の β 酸化から得られる。すなわち、1) PC によりピルビン酸を脱炭酸してオキサロ酢酸を生成する、2) アスパラギン酸アミノ基転移酵素によりアスパラギン酸のアミノ基を除いてオキサロ酢酸を生成する、3) グルタミン酸脱水素酵素によりグルタミン酸を脱水素して α -ケトグルタル酸を生成する、4) プ

ロピオニル-CoA カルボキシラーゼにより奇数鎖脂肪酸分解経路で生じたプロピオニル-CoA に二酸化炭素を付加させてスクシニル-CoA を生成する^{95, 117)}。中でも TCA 回路の初反応に必要なオキサロ酢酸の生成が生体において重要であるとされている。さらに近年、糖新生経路 (カタプレロシス経路) の律速酵素として広く知られている PEPCK も、ホスホエノールピルビン酸に二酸化炭素を付加してオキサロ酢酸を生成することによりアナプレロシス反応に関与していると報告されている^{97, 98)}。

ピルビン酸添加により中性脂肪の合成が増加したことから、TCA 回路中間体が不足し、アナプレロシス反応が促進した可能性が考えられた。グルコースの取り込みも増加していることから、PC と PEPCK の遺伝子とタンパク質の発現を解析した。PEPCK は細胞ゾル質型 (PEPCK1) とミトコンドリア型 (PEPCK2) の 2 種類のアイソザイムが存在するが、比較するため両者の解析を行った。その結果、PC や PEPCK2 ではピルビン酸による有意な影響は認められなかったが、PEPCK1 の遺伝子発現は 1 mM ピルビン酸添加により有意に増加した。タンパク質発現は 1 mM ピルビン酸添加群で増加傾向にあった ($P=0.08$)。そこで PEPCK、特に PEPCK1 について着目した。

上述のように、PEPCK は糖新生の律速酵素として広く知られているが、TCA 回路の中間体を補充するアナプレロシス経路にも関与しているとされている。近年の研究によると、細胞質ゾル型である PEPCK1 は糖新生の制御よりも TCA 回路の活性と密接に関連していると報告されている。すなわち、実際にマウスの PEPCK1 をノックダウンしてその酵素活性を 90% 阻害したところ、TCA 回路の流量は PEPCK1 活性と同等レベル (約 90%) 減少したにもかかわらず、糖新生は約 40% しか阻害がかからなかった¹¹⁸⁾。さらに、いくつかの培養ガン細胞の研究において PEPCK1 をノックダウンさせると細胞内へのグルコースの取り込みや、ピルビン酸、乳酸、クエン酸など多くの解糖系・TCA 回路の中間体や代謝産物、中性脂肪の *de novo* 合成も減少し、細胞増殖を抑制したという報告も見受けられた¹¹⁹⁾。

以上により、ピルビン酸が PEPCK1 の遺伝子発現やタンパク質発現を促進させた結果、糖の代謝経路に対しアナプレロシスな効果が発揮され、ミトコンドリア生合成の増加と相まってグルコースの取り込みや中性脂肪合成増加などのグルコースの利用が増加したのではないかと考えられた。

さらにごく最近、2018 年 9 月に報告された培養細胞の研究によると、PEPCK1 が糖新生経路 (カタプレロシス経路) とアナプレロシス経路のどちらの経路にシフトさせるかは PEPCK1 のアセチル化により制御されている¹²⁰⁾。すなわち、高グルコース条件下では PEPCK1 がアセチル化されてホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換するアナプレロシス回路が増強される。反対に低グルコ

ース（低エネルギー）条件下では PEPCK1 の脱アセチル化が引き起こされて糖新生経路を活性化させる。

この報告と本研究のピルビン酸による結果を合わせると、ピルビン酸は PEPCK1 の遺伝子発現のみならず、アセチル化を促進させている可能性が推定された。今後は PEPCK1 のアセチル化にも焦点を当て研究を進める必要があると考える。

また、PEPCK2 の発現上昇は細胞の増殖促進と関連することが報告されている¹²¹⁾。インスリン添加群で PEPCK2 の mRNA 発現が上昇したが、Fig. 25 でも示したように細胞数も増加した。インスリン添加による PEPCK2 遺伝子発現の誘導は細胞数の増加と関わっている可能性が示唆された。

3-4-9 得られた結果から推定される仮説、今後の課題

第3章の研究により得られた結果を代謝マップ上に示す (Fig. 34)。得られた結果より、細胞外ピルビン酸は、HepG2 細胞に対してミトコンドリア生合成を促進するとともに PEPCK1 発現を増加させ、グルコースの取り込み促進から中性脂肪の蓄積への代謝の流れを促しているという仮説が考えられた。しかしながら、この仮説を立証するためにはまだ明らかにされていない点がいくつか存在する。中性脂肪を合成するための基質である細胞内クエン酸量、ミトコンドリアから細胞質へクエン酸を輸送するための輸送体の発現、脂肪酸合成経路の酵素発現と活性などがピルビン酸添加によりどのような調節を受けているのか今後検討すべきであると考えられる。

3-5 結語

本博士論文の主体をなすこの第3章では、ヒト肝ガン細胞由来細胞株 HepG2 におけるグルコース利用に対するピルビン酸の作用を詳しく調べることを目的とした。その背景の概要は次のとおりである。ピルビン酸は解糖系の最終産物であり、エネルギー栄養素代謝の岐路の中間体であり、血中にもおよそ 0.1 mM で存在する。よって、細胞外ピルビン酸は、培養細胞におけるグルコースの取り込みから、その先に利用に至るまで、様々な影響を及ぼす可能性がある。しかし、培養肝細胞におけるグルコース利用へのピルビン酸の影響を調べた研究は見当たらない。培養骨格筋細胞・脂肪細胞で得られた知見は超生理的濃度の細胞外ピルビン酸によるものである。

これらを背景に実験研究に取り組み、主に下記3つの結果を得た。

- 1) 生理的濃度に近い細胞外ピルビン酸は単独で、グルコース取込みを促進した。その作用はインスリンを凌ぐように見受けられたが、細胞数の増加によるも

のではなかった。リンゴ酸はピルビン酸類似促進作用を示した。これらの特徴は、他臓器由来培養細胞での知見とは全く異なる新規なものであった。

- 2) 細胞外ピルビン酸は、基質の乳酸への転換率低下、細胞内呼吸を嫌氣的呼吸から部分的に好氣的呼吸へのスイッチをもたらした。また、細胞内グリコーゲン量を低下させる一方、中性脂肪量を増加させた。
- 3) 細胞外ピルビン酸は、ミトコンドリア生合成および PEPCK1 の mRNA・タンパク質発現を促進した。PEPCK1 はごく最近、従来の糖新生だけではなくアナプレロシスにも働くことが明らかにされている。

細胞外ピルビン酸によるミトコンドリア生合成および PEPCK1 の遺伝子発現を介したアナプレロシスが、グルコースの細胞取込みからの代謝の流れを中性脂肪の蓄積へと向かわせている可能性が推定された。

なお、第 3 章は現在投稿準備中である「**Extracellular pyruvate near at physiological concentrations stimulates glucose utilization by human liver cell line HepG2, possibly through promoting mitochondrial biogenesis.**」を一部加筆・修正を行い、和文にしたものを博士論文の一部としてまとめたものである。

Table 1. 本研究で使用したプライマー.

Genes	Gene symbol	Primer	Amplicon Length (bp)
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Forward: AGCCACATCGCTCAGACAC Reverse: GCCCAATACGACCAAATCC	66
NADH dehydrogenase subunit 1	ND1	Forward: TTCTAATCGCAATGGCATTCT Reverse: AAGGGTTGTAGTAGCCCGTAG	109
Pyruvate carboxylase	PC	Forward: GCAAGCTCTTCAGCATGGA Reverse: AGGGGCACTCATACAGGAAG	75
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	PEPCK1	Forward: AGATGGAGGAAGAGGGCATC Reverse: GGTCAGTGAGAGCCAACCA	69
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PEPCK2	Forward: CCACCTGGTGTACTGTGACC Reverse: AATCGAGAGTTGGGATGTGC	84
Cyclophilin A	PPIA	Forward: CCTAAAGCATACGGGTCCTG Reverse: TTTCACCTTTGCCAAACACCA	133

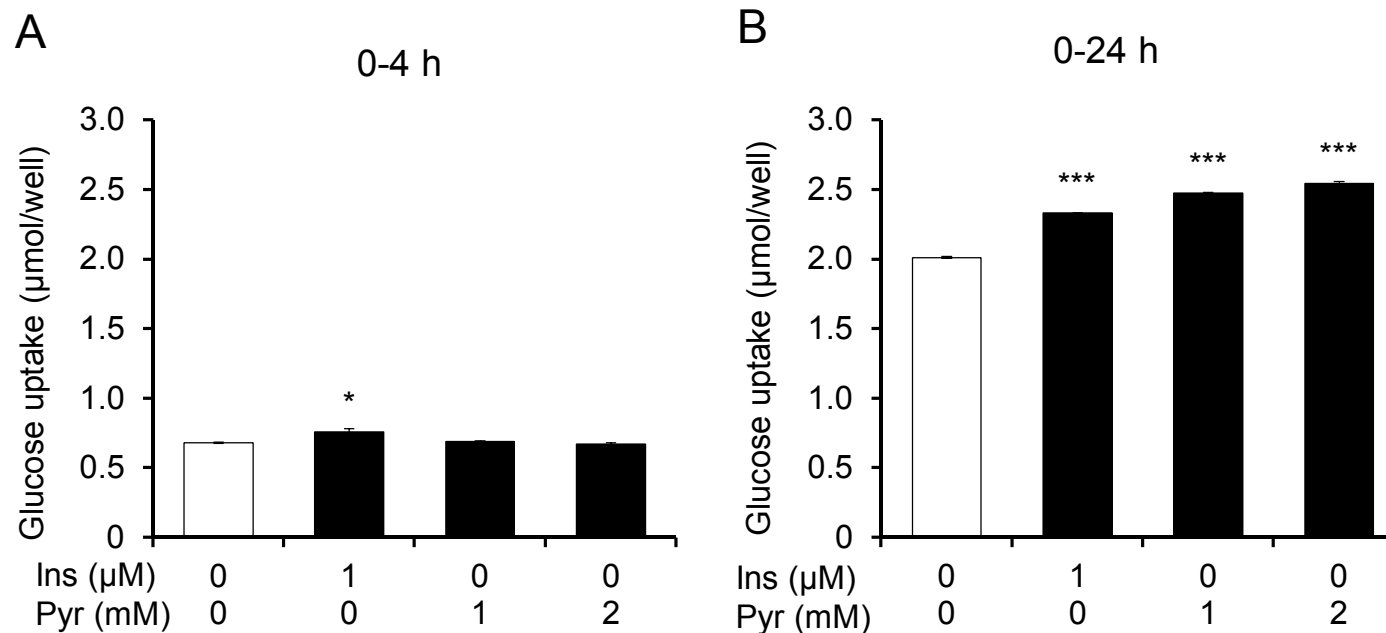


Fig. 24. ピルビン酸添加によるグルコース取り込み促進作用.

HepG2細胞を24-wellプレートに播種し、ピルビン酸 (Pyr) 1, 2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM 含む培養液で24時間培養した. 試験物質添加後4時間または24時間時点で培養液を回収し、グルコースの取り込み量を測定した. 平均値 \pm 標準誤差 (n=4). 一元配置分散分析のうち、試験物質非添加群に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$. A: 0-4時間のグルコース取り込み量. B: 0-24時間のグルコース取り込み量.

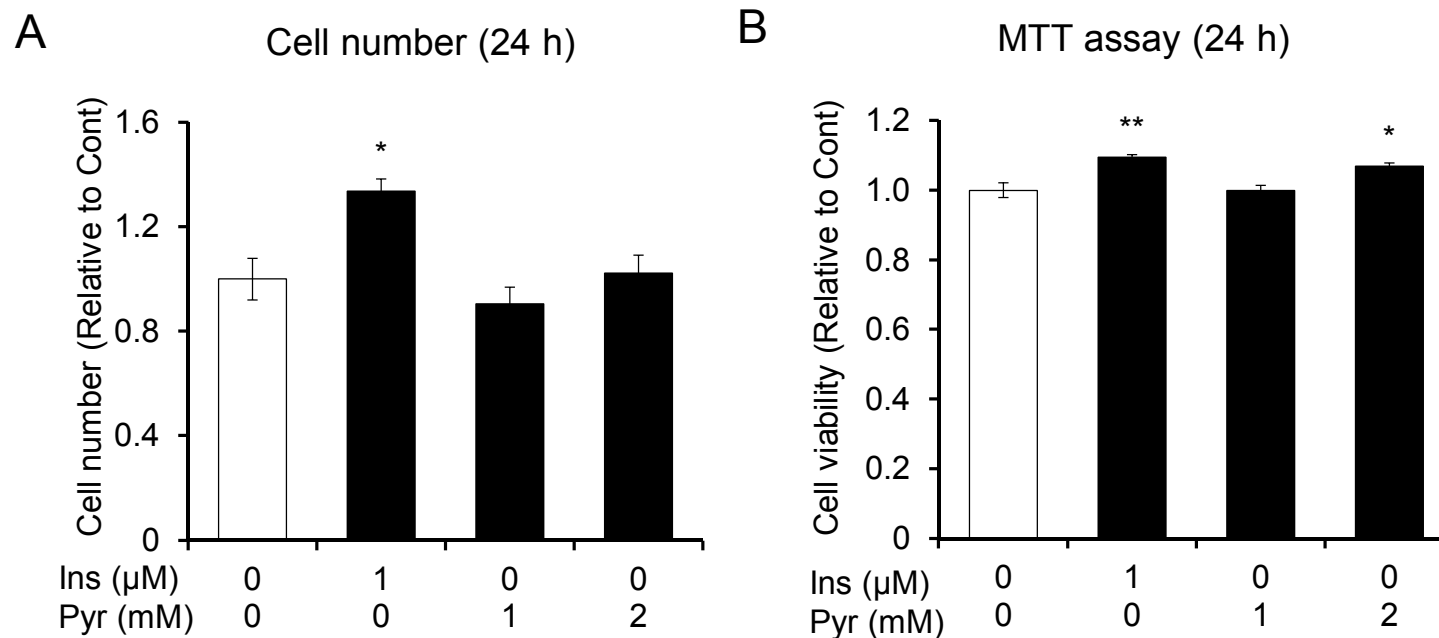


Fig. 25. ピルビン酸とインスリンによる細胞活性への影響.

HepG2細胞を24-wellプレートに播種し、ピルビン酸 (Pyr) 1, 2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM含む培養液で24時間培養した. 試験物質添加後24時間時点で細胞数計測と3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試験を行った. 平均値±標準誤差 (A : n=8, B : n=4). 一元配置分散分析ののち, 試験物質非添加群に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$. A : 細胞数. B : MTT試験.

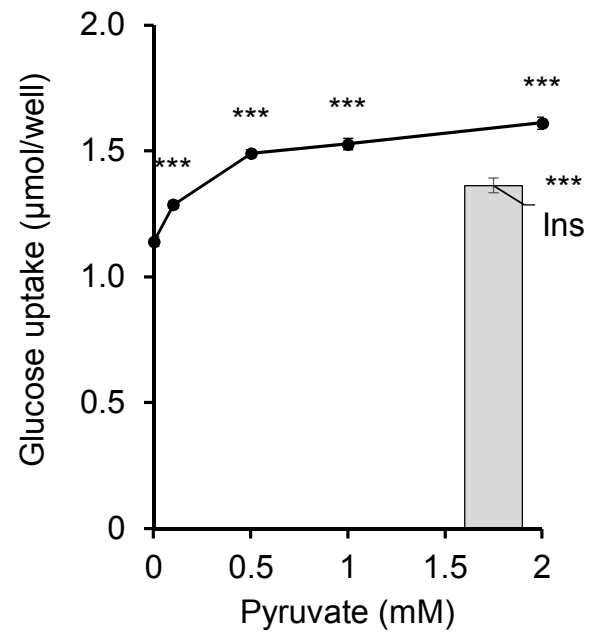


Fig. 26. 低濃度ピルビン酸によるグルコース取り込みへの影響.
HepG2細胞を24-wellプレートに播種し、ピルビン酸0.1-2 mMまたはインスリン1 μ M (Ins) 含む培養液で24時間培養した。その後培養液を回収し、グルコースの取り込み量を測定した。平均値 \pm 標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$)。*** $P<0.001$ 。

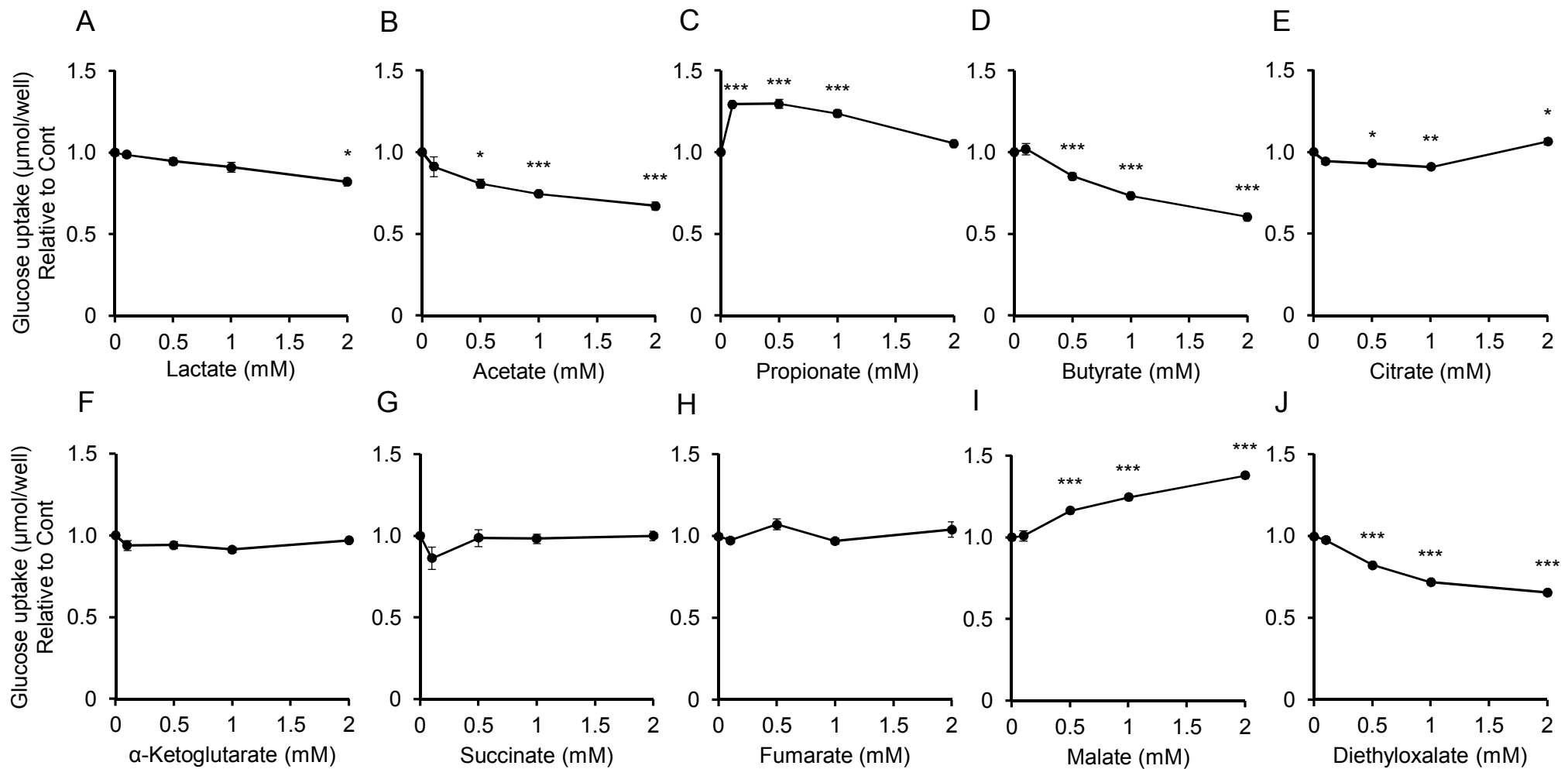


Fig. 27. グルコースの取り込みに対する有機酸の影響.

HepG2細胞を24-wellプレートに播種し、各有機酸を0.1-2 mM含む培養液で24時間培養した。その後培養液を回収し、グルコースの取り込み量を測定した。平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群 (Cont) に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。A: 乳酸。B: 酢酸。C: プロピオン酸。D: 酪酸。E: クエン酸。F: α -ケトグルタル酸。G: コハク酸。H: フマル酸。I: リンゴ酸。J: ジエチルオキサロ酢酸。

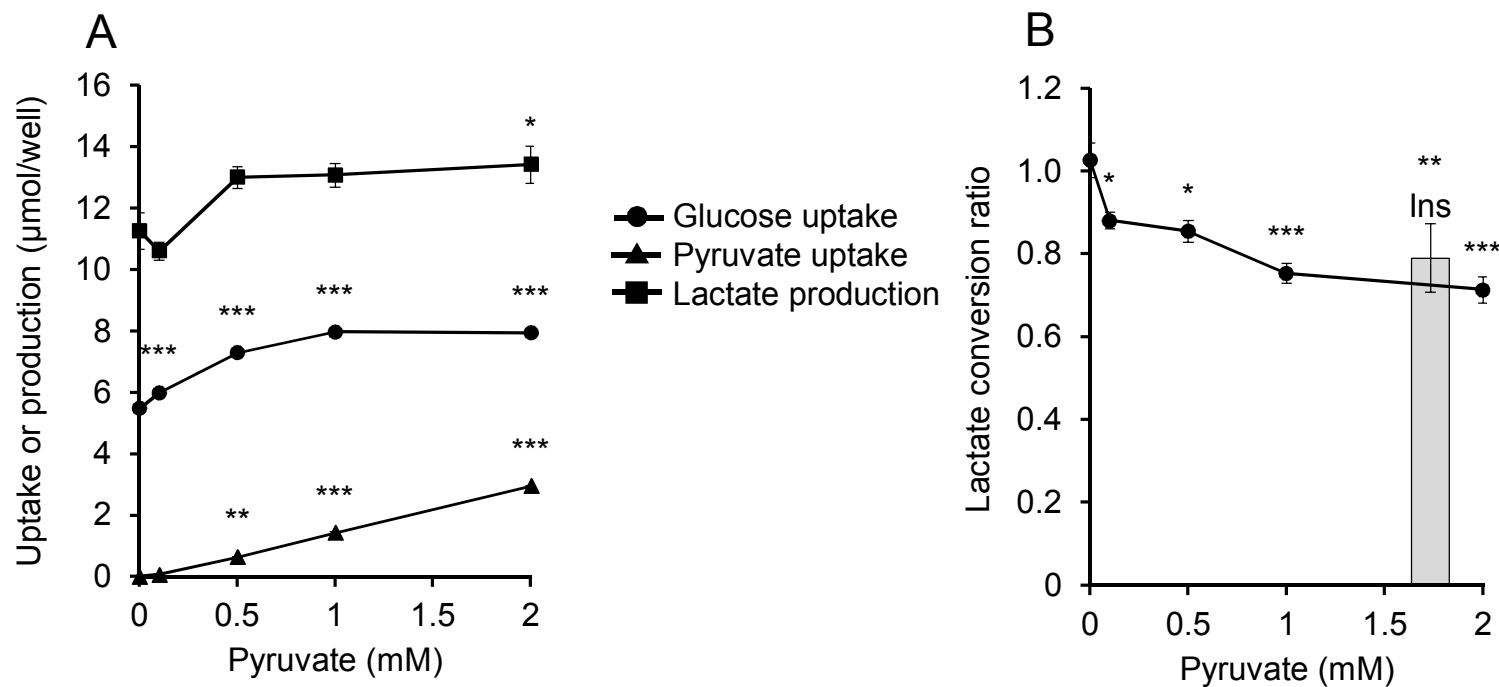


Fig. 28. 乳酸生成量と取り込まれた基質の乳酸変換率に対するピルビン酸の影響。

HepG2細胞を6-wellプレートに播種し、ピルビン酸を0.1-2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM含む培養液で24時間培養した。試験物質添加後4時間または24時間時点で培養液を回収し、グルコースの取り込み量、ピルビン酸取り込み量、乳酸生成量を測定した。取り込まれた基質の乳酸変換率は次の式を用いて算出した： $\text{乳酸生成量 (mol)} / \text{グルコース取り込み量 (mol)} \times 2 + \text{ピルビン酸取り込み量 (mol)}$ 。平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群に対するDunnettによる多重比較を行った ($P < 0.05$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。A：グルコース取り込み量、ピルビン酸取り込み量、乳酸生成量。B：乳酸変換率。

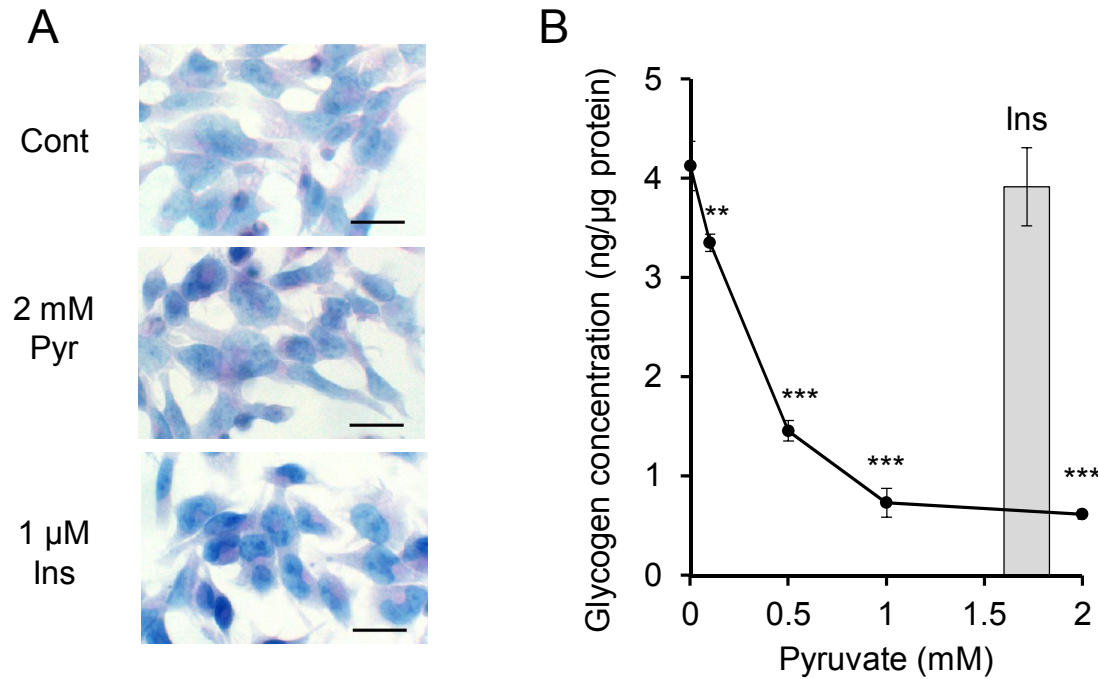


Fig. 29. 細胞内グリコーゲン量に対するピルビン酸の影響.

HepG2細胞を6-wellプレートに播種し、ピルビン酸 (Pyr) を0.1-2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM含む培養液で24時間培養した. 試験物質添加後24時間時点で細胞を回収し、PAS染色とグリコーゲンの測定を行った. 対比染色にはヘマトキシリンを用い、細胞内グリコーゲン量はタンパク質量で補正した. 画像中のバーは20 μmを示す. 平均値±標準誤差 (n=4). 一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群 (Cont) に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. A: PAS染色. B: 細胞内グリコーゲン量.

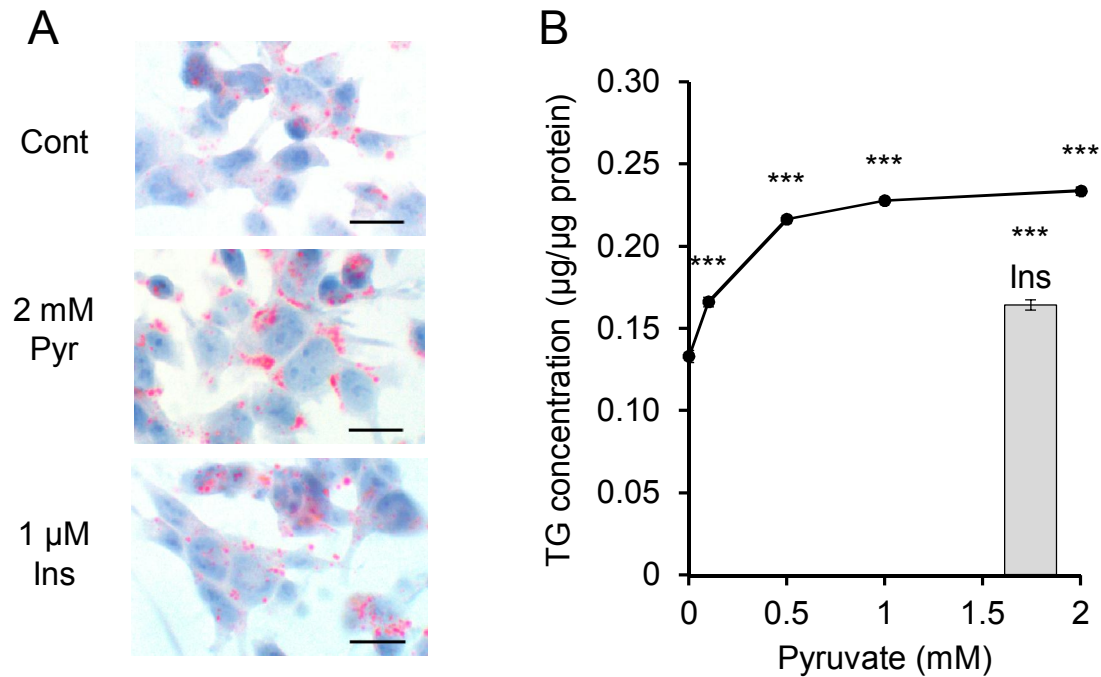


Fig. 30. 細胞内中性脂肪量に対するピルビン酸の影響.

HepG2細胞を6-wellプレートに播種し、ピルビン酸 (Pyr) を0.1-2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM含む培養液で24時間培養した。試験物質添加後24時間時点で細胞を回収し、Oil Red O染色と中性脂肪 (TG) の測定を行った。対比染色にはヘマトキシリンを用い、細胞内TG量はタンパク質量で補正した。画像中のバーは20 μmを示す。平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群 (Cont) に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$)。*** $P<0.001$ 。
A : Oil Red O染色。 B : 細胞内TG量。

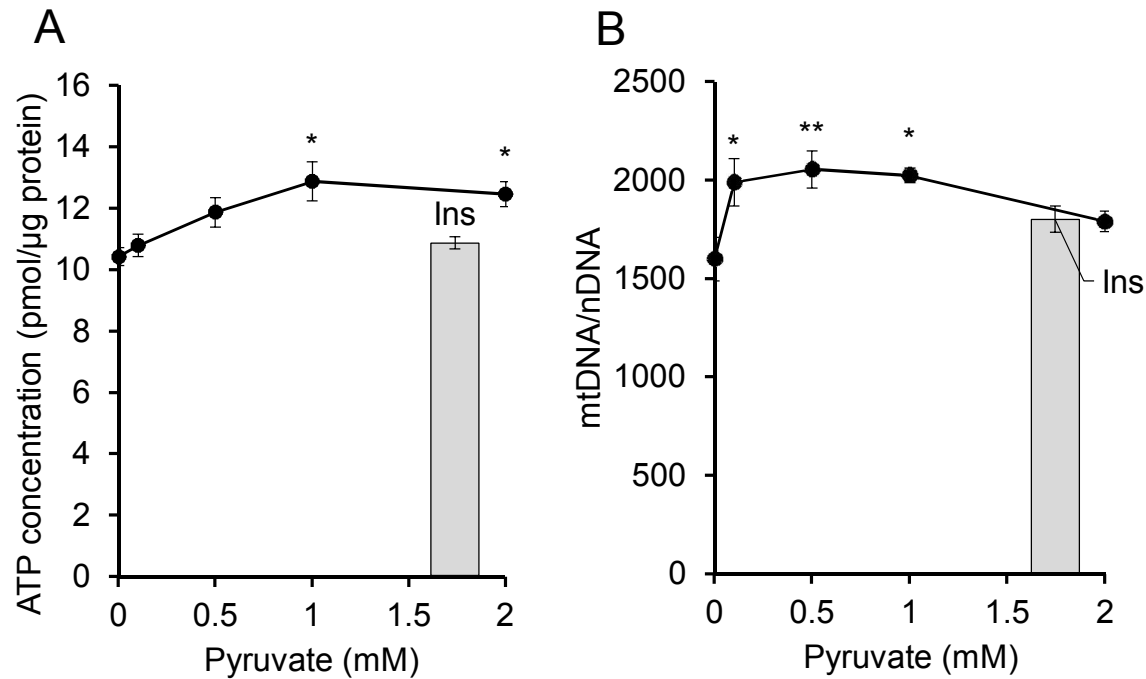


Fig. 31. 細胞内ATP量とミトコンドリア由来DNAコピー数に対するピルビン酸の影響。

HepG2細胞を96-wellまたは24-wellプレートに播種し、ピルビン酸を0.1-2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM含む培養液で24時間培養した。試験物質添加後24時間時点で細胞を回収し、ATPとミトコンドリア由来DNA (mtDNA) コピー数を測定した。ATPとmtDNAはそれぞれタンパク質量と核由来DNA (nDNA) コピー数で補正した。平均値±標準誤差 (n=4)。一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。A: 細胞内ATP量。B: mtDNAコピー数。

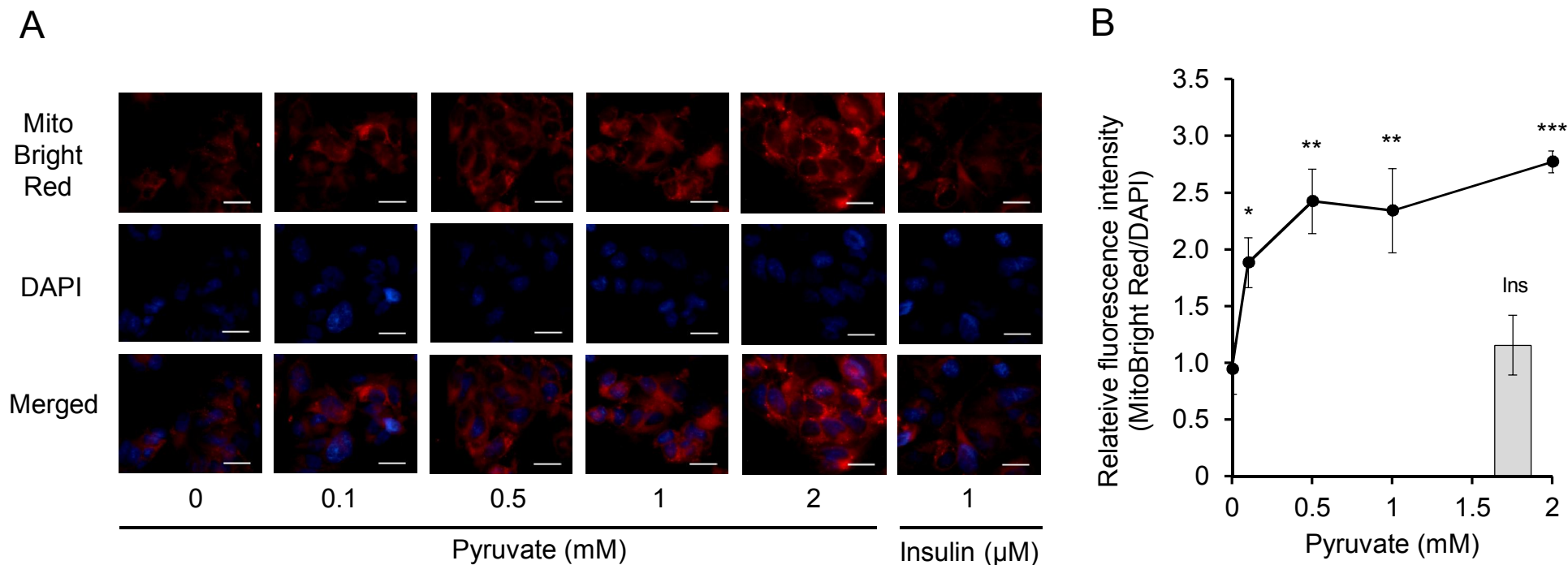


Fig. 32. ミトコンドリア特異的な染色に対するピルビン酸の影響。

HepG2細胞をカバーガラス上に播種し、ピルビン酸を0.1-2 mMまたはインスリン (Ins) 1 μM含む培養液で24時間培養した。培養後、MitoBright Red染色と4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。得られた画像は画像解析ソフトを用いて染色面積を算出した。画像中のバーは20 μmを示す。平均値±標準誤差 (n=6)。一元配置分散分析ののち、試験物質非添加群に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。A: ミトコンドリア染色。B: 核染色の蛍光強度に対するミトコンドリア染色強度。

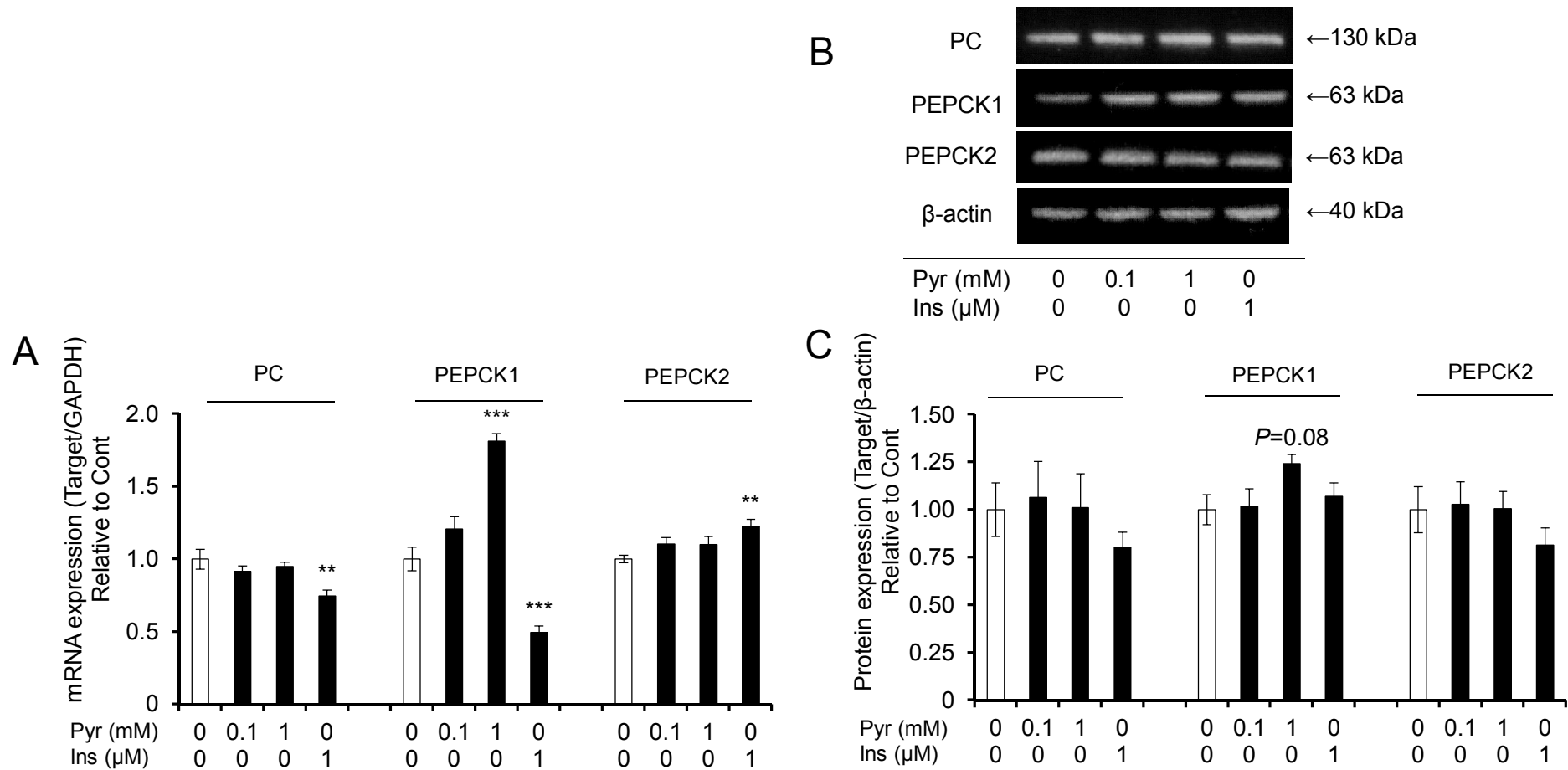


Fig. 33. アナプレロシス反応関連酵素のmRNA発現とタンパク質発現.

HepG2細胞を播種し、ピルビン酸 (Pyr) 0.1, 1 mMまたはインスリン (Ins) 1 μ M含む培養液で24時間培養した. 試験物質添加後24時間時点で mRNAとタンパク質を回収し, それぞれReal-time RT-PCRとウエスタンブロットにより解析を行った. 得られた画像は画像解析ソフトを用いて数値化した. 各酵素のmRNA発現はグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH), タンパク質発現は β -アクチンで補正を行った. 平均値 \pm 標準誤差 (A: n=4, C: n=6). 一元配置分散分析ののち, 試験物質非添加群 (Cont) に対するDunnettによる多重比較を行った ($P<0.05$). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. A: mRNA発現. B: タンパク質発現. C: タンパク質発現画像解析. PC: ピルビン酸カルボキシラーゼ. PEPCK1およびPEPCK2: ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (細胞質ゾル型およびミトコンドリア型).

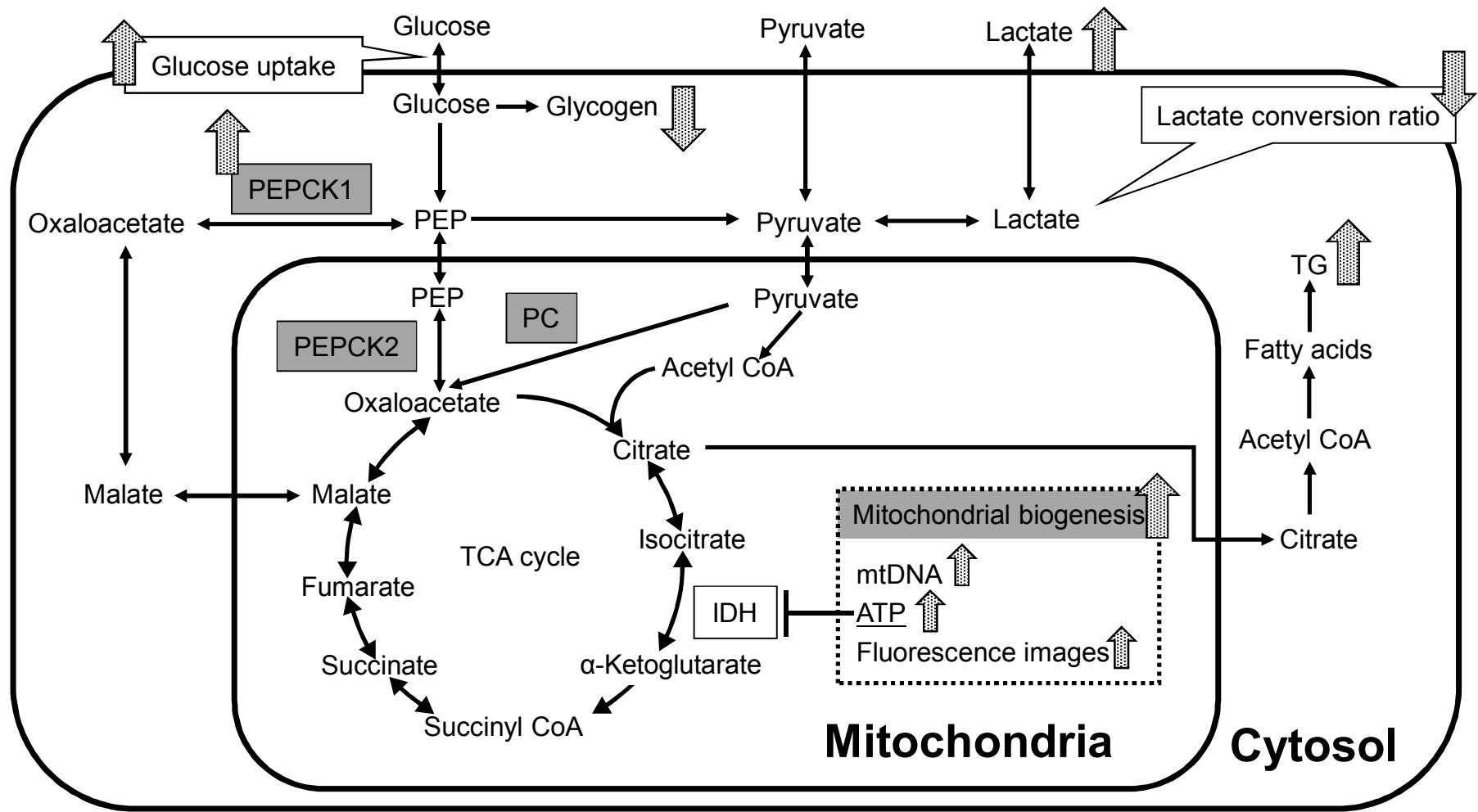


Fig. 34. 代謝マップと第3章の結果一覧.

網掛け上向き矢印はピルビン酸により促進，下向きは抑制された指標. IDH：イソクエン酸脱水素酵素. PEP：ホスホエノールピルビン酸. PEPCK1およびPEPCK2：PEPカルボキシキナーゼ（細胞質ゾル型およびミトコンドリア型）. PC：ピルビン酸カルボキシラーゼ. TG：中性脂肪.

第4章 総括

この第4章では4つの章からなる本論文について、その主体をなす第3章の概要を示した上で、各章ごとの総括を行う。

ピルビン酸は解糖系の最終代謝産物であり、エネルギー栄養素の代謝の岐路に立つ中間体である^{3,4)}。そのためピルビン酸は細胞の炭素骨格源・エネルギー源のみならずエネルギー栄養素代謝の調節においても重要な役割を担うと推定される。血液中にも一定濃度で存在しており、細胞外からの作用も推察される。しかし、細胞外ピルビン酸がエネルギー栄養素の代謝に与える影響については、生体はもとより、神経・内分泌系等の調節系から独立した培養細胞レベルにおいても不明な点が多い。培養細胞レベルでの知見は、生体丸ごとへと直接的に外挿することはできないが、細胞外物質に対する細胞応答や細胞内機構を明らかにするのに適している。こうした基礎的知見の積み上げが、生体丸ごとでの応用研究の基盤になると考えられる。そこで本研究では、肝臓由来の株細胞におけるグルコース利用に対する細胞外ピルビン酸の効果を明らかにすることを主要課題として実験に取り組んだ。細胞外ピルビン酸のグルコース利用に対する効果は、培養骨格筋細胞や培養脂肪細胞では調べられているが、エネルギー栄養素代謝の中核である肝臓由来の株細胞での検討例は見当たらなかった。また、先行研究における細胞外ピルビン酸濃度は、生理的濃度からかけ離れて高かった。本研究で用いた HepG2 細胞はヒトヘパトーマに由来する株細胞であり、肝臓代替モデルとして汎用されている。この HepG2 細胞を用いた実験では、本論文の主体をなす第3章で詳しく述べたように、いくつかの新たな知見が得られた。

4つの章のうち第1章ではピルビン酸に関する概要、ヒトや細胞実験における利用などを論述した。本研究の背景と目的を明確にし、本論文の構成を示した。

第2章では実際に研究を進めるにあたり、細胞実験スケールにも耐える乳酸、ピルビン酸、グリコーゲン、ATPの定量法を検討した。従来の方法では基質特異性や感度が低く、培養細胞スケールの定量実験の場合、検出限界以下になることが多い。これらを解決するために蛍光色素を用いた高感度測定キットが市販されているが高価であり、多数のサンプルの測定には必ずしも適していない。さらに、定量キットの付属説明書には参考文献等の記載がされていないものも見受けられ、試薬組成等も明記されていない場合が多い。また、研究環境の状況によりマイクロプレートで対応可能な蛍光や発光を検出できる機器を使用できない場合も考えられる。本章では、このような問題を解決するため高感度測定系を検討することを目的とし、さらに検出限界、蛍光または発光定量機器の代用、

細胞実験への適用可能性等を検討した。

乳酸とピルビン酸、グリコーゲンは蛍光原色素 ADHP を用いた高感度測定系を検討した。Fig. 1、Fig. 2、Fig. 7 で示したように、各基質をオキシダーゼにより酸化し、過酸化水素を発生させた。各定量系の最終段階で過酸化水素とペルオキシダーゼにより蛍光原基質 ADHP を蛍光色素であるレゾルフィンに変換し、蛍光強度を測定した。本法の定量範囲は乳酸 2-250 μM (2-250 pmol) ピルビン酸 2-2000 μM (2-2000 pmol)、グリコーゲン 0.1-20 μg (0.019-3.8 μg) であり、いずれも培養細胞スケールのグリコーゲン量の増減を検出することが可能であることが示された。また、定量範囲は狭まるが ROX フィルター装着リアルタイム定量 PCR システムを用いる蛍光測定への代用が可能であり、マイクロプレートリーダー対応蛍光分光光度計が整備されていない場合であっても本酵素蛍光法が実施可能であることが示唆された。実際に HepG2 細胞を用いた実験に本法を活用したところ、いずれも既報値とよく一致する結果が得られた。

ATP の測定にはルシフェリン-ルシフェラーゼ発光法がよく知られているが、実際に定量する際は発光量を計測できる特殊なルミノメーターが必要となる。マイクロプレートも測定できる機種となると非常に高額であり、用途も限られる。そこで、汎用性の高い装置であり、ウェスタンブロットティングによるタンパク質発現の検出等で広く用いられるケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトを併用することにより ATP の定量が可能であるか検討を行った。本法はマイクロプレート対応ルミノメーターで測定した際よりも感度は低下するが、ケミルミネッセンス撮影時の露光時間変えることにより様々な濃度の ATP 測定に対応可能であった。実際に HepG2 細胞を用いて本法で ATP を測定したところ、細胞数や栄養状態、気相中の酸素濃度による ATP 量の変化を検出することが可能であった。

第 2 章で構築した方法については本博士論文の主体を成す第 3 章の細胞実験のみならず、採取量が数 μL とごく微量な動物血液サンプルや食品中に微量に含まれている代謝産物等の測定にも応用が可能であり、適応範囲が広い。また、2-1-3-1 でも示した通り過酸化水素そのものの定量も可能である。第 2 章の研究は乳酸やピルビン酸、過酸化水素、グリコーゲン、ATP を測定する様々な分野の研究に資すると考えられる。

第 3 章では本博士論文の主体である HepG2 細胞に対するピルビン酸の作用について検討した。第 2 章の高感度測定系を実際に用いて各種測定を行った。ピルビン酸の濃度は細胞培養でよく利用されている濃度である 1-2 mM^{21-25} を上限として実験を行った。最初に細胞内グルコースの取り込みに対するピルビン酸の影響を調べたところ、ピルビン酸添加により細胞内へのグルコース取り込み量が濃度依存的に促進した。これは新たな知見であり、特に生体内と同程度の濃

度^{7, 8)}である 0.1 mM から促進作用が確認されたことから、この現象は培養細胞のみならず生体内でも起こる可能性が示唆された。

細胞内へのグルコースの取り込みが増加した要因の一つとして細胞数の増加が考えられたが、ピルビン酸添加群では細胞数は増加しなかった。これによりピルビン酸によるグルコースの取り込み促進作用は細胞数の増加ではなく、細胞の代謝に何らかの影響を与えたことが考えられた。

なぜピルビン酸によって HepG2 細胞におけるグルコースの取り込みが促進されたのか、また、取り込まれたグルコースはどのような代謝運命をたどるのか調べるため、グルコースが代謝されて最終的に行きつく出口部分として、乳酸生成量、取り込まれた基質の乳酸変換率、細胞内グリコーゲン量、中性脂肪量の 4 つの項目について測定し、どこの代謝経路に影響を与えているのか検討した。その結果、ピルビン酸添加により乳酸生成量が増加傾向にあったが、取り込まれた基質の乳酸変換率が減少した。細胞内のグリコーゲン量は濃度依存的に減少したが、反対に中性脂肪量が濃度依存的に増加した。

細胞内呼吸がミトコンドリアを利用する好氣的呼吸へシフトすると乳酸変換率が低下することと、取り込まれたグルコースを中性脂肪に変換するにはミトコンドリアに存在する TCA 回路の一部を利用しなければならないことを踏まえるとピルビン酸は HepG2 細胞のミトコンドリアの数または活性を増大させていることが考えられた。

ピルビン酸添加によるミトコンドリアへの影響については、細胞内 ATP 量、mtDNA コピー数、ミトコンドリア蛍光染色について解析を行った。その結果、いずれの指標もピルビン酸添加により増大した。細胞外ピルビン酸が HepG2 細胞におけるミトコンドリア生合成を刺激した可能性が考えられる。一方、予備的実験で、ミトコンドリア生合成に関与するとされる PGC-1 α および PGC-1 β の mRNA・タンパク質発現に対する細胞外ピルビン酸の影響も検討した。しかし、一定の方向性を示す結果が得られなかったので、第 3 章ではデータの提示また記述はしなかった。

細胞内に取り込まれたグルコースから中性脂肪を合成するには TCA 回路の中間体であるクエン酸を引き抜かなければならない。この状況下で TCA 回路を円滑に進めるためには中間体の補充すなわちアナプレロシス反応が必須である。今までの結果より、ピルビン酸がアナプレロシス反応に関連する酵素にも影響を与えている可能性が考えられた。そこで、解糖系物質からのアナプレロシス反応に関与している酵素である PC について遺伝子発現とタンパク質発現を解析した。また、糖新生経路（カタプレロシス経路）の律速酵素として広く知られているが、近年アナプレロシス経路にも関与している事が指摘されている PEPCK1 と PEPCK2 についても同様に調べた。その結果、PC および PEPCK2 の遺伝子・

タンパク質発現に対しては、ピルビン酸添加は整合性ある有意な影響を示さなかった。一方、PEPCK1のmRNA発現は1 mMピルビン酸添加により有意に増加し、タンパク質発現についてもほぼ有意 ($P=0.08$) な発現増加が認められた。近年の研究において、PEPCK1はTCA回路や解糖系の活性、中性脂肪の合成等にも関与していると報告されている^{118, 119)}。これに関連し、PEPCK1はアナプレロシスにも働く二面性を有することが明らかにされた¹²⁰⁾。

第3章をまとめると、ピルビン酸はヒト肝ガン細胞由来細胞株HepG2細胞のミトコンドリアの生合成を刺激し、グルコースの取り込みやそれに伴う中性脂肪の合成などのグルコースの利用を促進させていることが示唆された。さらにPEPCK1の発現も増加させ、これらのグルコースの利用を円滑に進めている可能性が示唆された。さらに、これらの測定結果のほとんどが生体内と同程度の濃度である0.1 mMから確認されたことから、生体内でも起こり得る可能性が推定された。

最後に、第4章では全体の総括として細胞実験にも耐えうる微量定量法とピルビン酸がHepG2細胞のエネルギー栄養素の代謝に与える影響について、本研究で実施したことと研究の意義、後述する本研究の限界・課題と今後の展望についてまとめた。

本研究において、第2章では培養細胞スケールにおける代謝産物の測定系を検討し、実際の細胞実験に応用することが可能となった。さらに第3章ではピルビン酸がミトコンドリアの生合成を刺激し、エネルギー栄養素の代謝経路に影響を与えるという新たな知見を見出したが、本研究には限界がいくつか存在する。

一つ目は、第2章において検討した定量法を用いることにより、培養条件の違いによる細胞内各代謝産物の差異を検出できたが、まだ限定的な実験にとどまっている点である。定量方法を構築するためには既存の測定方法との比較、室内再現性や室間再現性の検討、添加回収試験の実施など、詳細な検討を進める必要があると考える。

二つ目は、第3章において、細胞実験、特に培養肝細胞であるHepG2細胞のみの検討にとどまっている点である。特に細胞内へのグルコースの取り込みを調べた先行研究であるマウス骨格筋由来C2C12細胞³¹⁾とマウス由来3T3-L1前脂肪細胞³³⁾の結果と比較すると異なる結果となった。これらの差異は添加したピルビン酸濃度などの実験条件によるもの以外にも細胞種の違いも考えられる。これからより詳細な解析を進めていく中で他の細胞株を用いた実験も行う必要があると考える。

三つ目は細胞内へのグルコース取り込み量以外の結果は試験物質添加後24時

間時点の結果のみである点である。中性脂肪の蓄積などについても時系列的な解析を行い、いつ、どのような作用機序でピルビン酸が作用するか検討を重ねる必要があると考える。

四つ目は、3-4-9でも述べたように第3章で得られた結果から立てた仮説を立証するため、中性脂肪を合成するための基質である細胞内クエン酸量、ミトコンドリアから細胞質へクエン酸を輸送するための輸送体の発現、脂肪酸合成経路の酵素発現と活性などがピルビン酸添加によりどのような調節を受けているのか今後検討すべきであると考え。また、細胞外ピルビン酸によるミトコンドリア生合成やPEPCK1の発現の促進機構の解析も重要な課題であると考え。

以上により本研究では培養細胞スケールにおける乳酸、ピルビン酸、グリコーゲン、ATPの測定系を検討した。さらに、研究環境が限られている場合であっても、蛍光または発光定量機器を代用することができ、細胞実験への適用が可能であることを示した。これらの測定系を用いてピルビン酸による培養肝細胞のエネルギー栄養素の代謝に与える影響について調べたところ、グルコースの取り込みやこれにつづく細胞内のグルコースの利用とミトコンドリアの生合成を促進させていることが明らかとなった。これらの作用は生理学的濃度から確認されたことから、生体内でも起こりうる可能性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇篤なご指導ならびに本論文のご校閲を賜り、また研究の楽しさをご教授いただきました十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科 教授 志村二三夫先生に深勘なる感謝の意を表します。

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、副指導教員、主査ならびに副査として懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました十文字学園女子大学大学院人間生活学研究科 教授 長尾昭彦先生、教授 井手隆先生、教授 松本晃裕先生に深く御礼申し上げます。

実験のご指導ならびに有益な助言を賜りました帝京平成大学健康メディカル学部健康栄養学科 助教 端田寛子先生、十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科 講師 山崎優子先生、十文字学園女子大学人間生活学部健康栄養学科 講師 佐々木菜穂先生、助手 有田安那先生、に心より感謝申し上げます。

最後にこれまでの研究生活を見守り支えてくれた家族をはじめ全てのみなさまに心より深謝いたします。

参考文献

- 1) Halestrap, A. P. (2013). Monocarboxylic acid transport. *Comprehensive Physiology*, 3, 1611–1643.
- 2) Bricker, D. K., Taylor, E. B., Schell, J. C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y. C., Cox, J. E., Cardon, C. M., Van, Vranken, J. G., Dephoure, N., Redin, C., Boudina, S., Gygi, S. P., Brivet, M., Thummel, C. S. & Rutter, J. (2012). A Mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, drosophila, and humans. *Science*, 337, 96–100.
- 3) Gray, L. R., Tompkins, S. C., & Taylor, E. B. (2014). Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 2577–2604.
- 4) Rauckhorst, A. J., & Taylor, E. B. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier function and cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics and Development*, 38, 102–109.
- 5) Tanaka, M., Nishigaki, Y., Fuku, N., Ibi, T., Sahashi, K., & Koga, Y. (2007). Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion*, 7, 399–401.
- 6) The Human Metabolome Database: Pyruvate, <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000243>
- 7) Owen, O. E., Mozzoli, M. A., Boden, G., Patel, M. S., Reichard, G. A., Trapp, V., Shuman, C. R. & Felig, P. (1980). Substrate, hormone, and temperature responses in males and females to a common breakfast. *Metabolism*, 29, 511–523.
- 8) Mintun, M. A., Vlassenko, A. G., Rundle, M. M., & Raichle, M. E. (2004). Increased lactate/pyruvate ratio augments blood flow in physiologically activated human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 659–664.
- 9) 難病情報センター：ミトコンドリア病, <http://www.nanbyou.or.jp/entry/335>

- 10) Komaki, H., Nishigaki, Y., Fuku, N., Hosoya, H., Murayama, K., Ohtake, A., Goto, Y., Wakamoto, H., Koga, Y & Tanaka, M. (2010). Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800, 313–315.
- 11) Saito, K., Kimura, N., Oda, N., Shimomura, H., Kumada, T., Miyajima, T., Murayama, K., Tanaka, M. & Fujii, T. (2012). Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820, 632–636.
- 12) 黒羽泰子, 他田真理, 河内泉, 西澤正豊, 松原奈絵, 小池亮子 (2015) ピルビン酸ナトリウム療法が有効であった m.3271T>C 点変異を有するミトコンドリア病の 1 例. *臨床神経学*, 55, 412-416.
- 13) UMIN-CTR 臨床試験登録情報の閲覧 : 重症ミトコンドリア病患者に対するピルビン酸ナトリウムの治療的応用, https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000009761
- 14) Stanko, R. T., Tietze, D. L., & Arch, J. E. (1992). Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a severely restricted diet supplemented with dihydroxyacetone and pyruvate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 771–776.
- 15) Stanko, R. T., Reynolds, H. R., Hoyson, R., Janosky, J. E., & Wolf, R. (1994). Pyruvate supplementation of a low-cholesterol, low-fat diet: Effects on plasma lipid concentrations and body composition in hyperlipidemic patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, 423–427.
- 16) Koh-Banerjee, P. K., Ferreira, M. P., Greenwood, M., Bowden, R. G., Cowan, P. N., Almada, A. L., & Kreider, R. B. (2005). Effects of calcium pyruvate supplementation during training on body composition, exercise capacity, and metabolic responses to exercise. *Nutrition*, 21, 312–319.
- 17) Mallet, R. T., Olivencia-Yurvati, A. H., & Bünger, R. (2018). Pyruvate enhancement of cardiac performance: Cellular mechanisms and clinical application. *Experimental Biology and Medicine*, 243, 198–210.

- 18) NATURAL MEDICINES COMPREHENSIVE DATABASE: PYRUVATE
Monograph,
<http://naturaldatabaseconsumer.therapeuticresearch.com/nd/Search.aspx?cs=&s=NDC&pt=100&id=34&fs=NDC&searchid=53983604>
- 19) 宮城淳, 家壽多正樹, 日坂弘行, 本居聡子, 若生忠幸 (2011) ネギの官能評価と成分・物性測定値との関係. 園芸学研究, 10, 101-107.
- 20) 玉木雅子, 鵜飼光子, 村田容常, 本間清一 (2002) 北海道産タマネギの品質と調理加工特性. 日本食品保蔵科学会誌, 28, 291-298.
- 21) Kawano, A., Nakamura, H., Hata, S., Minakawa, M., Miura, Y., & Yagasaki, K. (2009). Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine*, 16, 437–443.
- 22) Kamakura, R., Son, M. J., de Beer, D., Joubert, E., Miura, Y., & Yagasaki, K. (2015). Antidiabetic effect of green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract in cultured cells and type 2 diabetic model KK-Ay mice. *Cytotechnology*, 67, 699–710.
- 23) Doi, M., Yamaoka, I., Fukunaga, T., & Nakayama, M. (2003). Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312, 1111–1117.
- 24) Charos, A. E., Reed, B. D., Raha, D., Szekely, A. M., Weissman, S. M., & Snyder, M. (2012). A highly integrated and complex PPARGC1A transcription factor binding network in HepG2 cells. *Genome Research*, 22, 1668–1679.
- 25) Nieuwoudt, S., Mulya, A., Fealy, C. E., Martelli, E., Dasarathy, S., Naga Prasad, S. V., & Kirwan, J. P. (2017). In vitro contraction protects against palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 313, C575-C583.
- 26) King, M., & Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246, 500–503.

- 27) Duguez, S., Sabido, O., & Freyssenet, D. (2004). Mitochondrial-dependent regulation of myoblast proliferation. *Experimental Cell Research*, 299, 27–35.
- 28) Kelts, J. L., Cali, J. J., Duellman, S. J., & Shultz, J. (2015). Altered cytotoxicity of ROS-inducing compounds by sodium pyruvate in cell culture medium depends on the location of ROS generation. *SpringerPlus*, 4, 269.
- 29) Sawa, K., Uematsu, T., Korenaga, Y., Hirasawa, R., Kikuchi, M., Murata, K., Zhang, J., Gai, X., Sakamoto, K., Koyama, T. & Satoh, T. (2017). Krebs Cycle Intermediates Protective against Oxidative Stress by Modulating the Level of Reactive Oxygen Species in Neuronal HT22 Cells. *Antioxidants*, 6, 21.
- 30) Nakamichi, N., Kambe, Y., Oikawa, H., Ogura, M., Takano, K., Tamaki, K., Inoue, M., Hinoi, E. & Yoneda, Y. (2005). Protection by exogenous pyruvate through a mechanism related to monocarboxylate transporters against cell death induced by hydrogen peroxide in cultured rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 93, 84–93.
- 31) Philp, A., Perez-Schindler, J., Green, C., Hamilton, D. L., & Baar, K. (2010). Pyruvate suppresses PGC1 α expression and substrate utilization despite increased respiratory chain content in C2C12 myotubes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299, C240–C250.
- 32) Wilson, L., Yang, Q., Szustakowski, J. D., Gullicksen, P. S., & Halse, R. (2007). Pyruvate induces mitochondrial biogenesis by a PGC-1 α -independent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292, C1599–C1605.
- 33) Hwang, J.-S., Kim, S.-Y., Jung, E.-H., Kwon, M.-Y., Kim, K.-H., Cho, H., & Han, I.-O. (2016). Exogenous sodium pyruvate stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 39–48.
- 34) Goodwin, M. L., Harris, J. E., Hernández, A., & Gladden, L. B. (2007). Blood lactate measurements and analysis during exercise: A guide for clinicians. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1, 558–569.
- 35) Wasserman, K., Beaver, W. L., Davis, J. A., Pu, J. Z., Heber, D., & Whipp, B. J. (1985). Lactate, pyruvate, and lactate-to-pyruvate ratio during exercise and recovery. *Journal of Applied Physiology*, 59, 935–940.

- 36) Wasserman, K., Hansen, J. E., Sue, D. Y., Stringer, W. W., Sietsema K. E., Sun, X.-G. & Whipp, B. J. (2012). Principles of Exercise Testing and Interpretation: Including Pathophysiology and Clinical Applications (5th ed.). p18-29. Wolters Kluwer Health Inc., PA, USA.
- 37) Gore, D. C., Jahoor, F., Hibbert, J. M., & DeMaria, E. J. (1996). Lactic acidosis during sepsis is related to increased pyruvate production, not deficits in tissue oxygen availability. *Annals of Surgery*, 224, 97–102.
- 38) Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315, 801–810.
- 39) Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309–314.
- 40) Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect : How does it benefit cancer cells ? *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 211–218.
- 41) Hui, S., Ghergurovich, J. M., Morscher, R. J., Jang, C., Teng, X., Lu, W., Esparza, L. A., Reya, T., Le, Zhan. Yanxiang Guo, J., White, E. & Rabinowitz, J. D. (2017). Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, 551, 115-118.
- 42) Marbach, E. P., & Weil, M. H. (1967). Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. *Clinical Chemistry*, 13, 314–325.
- 43) Artuch, R., Vilaseca, M. A., Farre, C., & Ramon, F. (1995). Determination of lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyser. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 33, 529–534.
- 44) Biagi, S., Ghimenti, S., Onor, M., & Bramanti, E. (2012). Simultaneous determination of lactate and pyruvate in human sweat using reversed-phase high-performance liquid chromatography: a noninvasive approach. *Biomedical Chromatography*, 26, 1408–1415.

- 45) Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., & Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry*, 253, 162–168.
- 46) Towne, V., Will, M., Oswald, B., & Zhao, Q. (2004). Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: Appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Analytical Biochemistry*, 334, 290–296.
- 47) Vanachayangkul, P., & Tolleson, W. H. (2012). Inhibition of heme peroxidases by melamine. *Enzyme Research*, 2012.
- 48) Lueders, C. (2013). Large scale expansion of human umbilical cordcells in a rotating bed system bioreactor for cardiovascular tissue engineering applications. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 7, 50–61. 1-6。
- 49) 矢ヶ崎一三, 末安俊明, 河秉瑾, 伊東克晃, 米澤貴之, 加藤久典 (2011) 大豆イソフラボンによるインスリン抵抗性の克服とトランスクリプトームおよびプロテオーム解析による機構解明 (第三報) . 大豆たん白質研究, 14, 1-7.
- 50) 吉川春寿, 芦田淳 編 (1994) 総合栄養学辞典 スタンダード版, 第4版, p 178-179. 同文書院, 東京.
- 51) Adeva-Andany, M. M., Perez-Felpete, N., Fernandez-Fernandez, C., Donapetry-Garcia, C., & Pazos-Garcia, C. (2016). Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience Reports*, 36, e00416.
- 52) Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical*, 5, 85–100.
- 53) Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

- 54) Morris, D. L. (1948). Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*, *107*, 254–255.
- 55) Pelletier, J., Bellot, G., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2013). Biochemical titration of glycogen in vitro. *Journal of Visualized Experiments*, *81*, 1–10.
- 56) Guo, J., Li, C., Yang, C., Li, B., Wei, J., Lin, Y., Ye, P., Hu, G. & Li, J. (2018). Liraglutide reduces hepatic glucolipotoxicity-induced liver cell apoptosis through NRF2 signaling in Zucker diabetic fatty rats. *Molecular Medicine Reports*, *17*, 8316–8324.
- 57) Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P. & Svensson, B. (2000). Glucoamylase : structure/function relationships, and protein engineering. *Science*, *1543*, 275-293.
- 58) Raba, J., & Mottola, H. A. (1995). Glucose oxidase as an analytical reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *25*, 1–42.
- 59) Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, *1250*, 77–93.
- 60) Ungaro, P., Teperino, R., Mirra, P., Longo, M., Ciccarelli, M., Raciti, G. A., Nigro, C., Miele, C., Formisano, P. & Beguinot, F. (2010). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α -driven epigenetic silencing of the human PED gene. *Diabetologia*, *53*, 1482–1492.
- 61) Liang, G., Wang, F., Song, X., Zhang, L., Qhang, Z., & Jiang, G. (2016). 3-Deoxyglucosone induces insulin resistance by impairing insulin signaling in HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports*, *13*, 4506–4512.
- 62) Terashima, M., Fujita, Y., Togashi, Y., Sakai, K., De Velasco, M. a, Tomida, S., & Nishio, K. (2014). KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase β -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget*, *5*, 7040–7050.
- 63) Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, *4*, 177–197.

- 64) Yang, W. M., Jeong, H. J., Park, S. Y., & Lee, W. (2014). Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signaling and glycogen metabolism in HepG2 cells. *FEBS Letters*, 588, 3939–3946.
- 65) Liao, B. M., McManus, S. A., Hughes, W. E., & Schmitz-Peiffer, C. (2016). Flavin-containing monooxygenase 3 reduces endoplasmic reticulum stress in lipid-treated hepatocytes. *Molecular Endocrinology*, 30, 417–428.
- 66) Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., de Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, 8, 343–357.
- 67) Yin, J., Gao, Z., Liu, D., Liu, Z., & Ye, J. (2008). Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294, E148–E156.
- 68) Tripathy, S., Chapman, J. D., Han, C. Y., Hogarth, C. A., Arnold, S. L. M., Onken, J., Kent, T., Goodlett, D. R. & Isoherranen, N. (2016). All-trans-retinoic acid enhances mitochondrial function in models of human liver. *Molecular Pharmacology*, 89, 560–574.
- 69) García-Ruiz, I., Solís-Muñoz, P., Fernández-Moreira, D., Muñoz-Yagüe, T., & Solís-Herruzo, J. A. (2015). *In vitro* treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms*, 8, 183–191.
- 70) Ni, J., Zhang, Z., Luo, X., Xiao, L., & Wang, N. (2016). Plasticizer DBP activates NLRP3 inflammasome through the P2X7 receptor in HepG2 and L02 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30, 178–185.
- 71) Eguchi, R., Akao, S., Otsuguro, K. I., Yamaguchi, S., & Ito, S. (2015). Different mechanisms of extracellular adenosine accumulation by reduction of the external Ca²⁺ concentration and inhibition of adenosine metabolism in spinal astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 128, 47–53.
- 72) Hsu, Y.-C., Lee, H.-C., Ping, Y.-H., Liu, T.-Y., Lui, W.-Y., & Chi, C.-W. (2007). Mitochondria are an essential mediator of nitric oxide/cyclic guanosine 3',5'-

monophosphate blocking of glucose depletion induced cytotoxicity in human HepG2 cells. *Molecular Cancer Research*, 5, 923–932.

- 73) 加藤博章, 中津亨 (2007) ホタルの発光色を制御する仕組み-発光酵素ルシフェラーゼの結晶構造とメカニズム-. 京都大学低温物質科学研究センター誌, 11, 44-51.
- 74) 厚生労働省 監修 (2004) 食品衛生検査指針 微生物編 2004. p71-74. 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 75) Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675.
- 76) 株式会社パーキンエルマージャパン : マイクロプレート 色の選択,
<http://www.perkinelmer.co.jp/assays/tabid/305/Default.aspx>
- 77) 北村恭朗 (2015) 検量線に関わる理論と評価方法について. 農薬調査研究報告, 7, 101-106.
- 78) Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160, 81–88.
- 79) Yin, C., He, D., Chen, S., Tan, X., & Sang, N. (2016). Exogenous pyruvate facilitates cancer cell adaptation to hypoxia by serving as an oxygen surrogate. *Oncotarget*, 7, 47494–47510.
- 80) Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432–437.
- 81) Sullivan, L. B., Gui, D. Y., Hosios, A. M., Bush, L. N., Freinkman, E., Vander Heiden, M. G. (2015). Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell*, 162 552–563.
- 82) Hereng, T. H., Elgstøen, K. B. P., Cederkvist, F. H., Eide, L., Jahnsen, T., Sklhegg, B. S., & Rosendal, K. R. (2011). Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 26, 3249–3263.

- 83) Kami, K., Fujita, Y., Igarashi, S., Koike, S., Sugawara, S., Ikeda, S., Sato, N., Ito, M., Tanaka, M., Tomita, M. & Soga, T. (2012). Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion*, *12*, 644–653.
- 84) Hamon, M., Hanada, S., Fujii, T., & Sakaif, Y. (2012). Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells in vitro. *Cell Transplantation*, *21*, 401–410.
- 85) Alberti, K. G. (1977). The biochemical consequences of hypoxia. *Journal of Clinical Pathology*, *11*, 14–20.
- 86) Zhan, Y., Zhao, F., Xie, P., Zhong, L., Li, D., Gai, Q., Li, L., Wei, H., Zhang, L. & An, W. (2015). Mechanism of the effect of glycosyltransferase GLT8D2 on fatty liver. *Lipids in Health and Disease*, *14*, 1–7.
- 87) Zhu, C., Xie, P., Zhao, F., Zhang, L., An, W., & Zhan, Y. (2014). Mechanism of the promotion of steatotic HepG2 cell apoptosis by cholesterol. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*, 6807–6813.
- 88) Yu, Y., Liu, H., Ikeda, Y., Amiot, B. P., Rinaldo, P., Duncan, S. A., & Nyberg, S. L. (2012). Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells: Relevance to cellular therapies. *Stem Cell Research*, *9*, 196–207.
- 89) Saito, K., Lee, S., Shiuchi, T., Toda, C., Kamijo, M., Inagaki-Ohara, K., Okamoto, S. & Minokoshi, Y. (2011). An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Analytical Biochemistry*, *412*, 9–17.
- 90) 倉若美咲樹 (2016) 培養肝細胞におけるグルコースの取り込みに対するピルビン酸の促進効果とその機構に関する研究. 十文字学園女子大学大学院修士論文.
- 91) Semaan, D. G., Igoli, J. O., Young, L., Gray, A. I., Rowan, E. G., & Marrero, E. (2018). In vitro anti-diabetic effect of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on the glucose uptake assays by HepG2, L6, 3T3-L1 and fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, *216*, 8–17.

- 92) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- 93) Sanders, F. W. B., & Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews*, 91, 452–468.
- 94) Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63, 895–902.
- 95) Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30409–30412.
- 96) Wallace, J. C. (2010). My favorite pyruvate carboxylase. *IUBMB Life*, 62, 535–538.
- 97) Tang, Y., Zhang, Y., Wang, C., Sun, Z., Li, L., Cheng, S., & Zhou, W. (2018). Overexpression of PCK1 gene antagonizes hepatocellular carcinoma through the activation of gluconeogenesis and suppression of glycolysis pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47, 344–355.
- 98) Croniger, C. M., Olswang, Y., Reshef, L., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., & Hanson, R. W. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited: Insights into its metabolic role. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30, 14–20.
- 99) Méndez-lucas, A., Duarte, J. A., Sunny, N. E., Satapati, S., He, T., Fu, X., Bermúdez, J., Burgess, S. C. & Perales, J. C. (2013). PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. *Journal of Hepatology*, 59, 105–113.
- 100) Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 286–300.
- 101) Pivovarova, O., Von Loeffelholz, C., Ilkavets, I., Sticht, C., Zhuk, S., Murahovschi, V., Lukowski, S., Döcke, S., Kriebel, J., de las Heras Gala, T., Malashicheva, A., Kostareva, A., Lock, J. F., Stockmann, M., Grallert, H., Gretz,

- N., Dooley, S., Pfeiffer, A. F., & Rudovich, N. (2015). Modulation of insulin degrading enzyme activity and liver cell proliferation. *Cell Cycle*, *14*, 2293–2300.
- 102) Murata, M., Okimura, Y., Iida, K., Matsumoto, M., Sowa, H., Kaji, H., Kojima, M., Kangawa, K. & Chihara, K. (2002). Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 5667–5674.
- 103) Tran, T. T., Naigamwalla, D., Oprescu, A. I., Lam, L., McKeown-Eyssen, G., Bruce, W. R., & Giacca, A. (2006). Hyperinsulinemia, but not other factors associated with insulin resistance, acutely enhances colorectal epithelial proliferation in vivo. *Endocrinology*, *147*, 1830–1837.
- 104) Miller, B. F., Fattor, J. A., Jacobs, K. A., Horning, M. A., Navazio, F., Lindinger, M. I., & Brooks, G. A. (2002). Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: Effect of exogenous lactate infusion. *Journal of Physiology*, *544*, 963–975.
- 105) Gladden, L. B. (2004). Lactate metabolism: A new paradigm for the third millennium. *Journal of Physiology*, *558*, 5–30.
- 106) Stelmańska, E. (2007). Regulation of extramitochondrial malic enzyme gene expression in lipogenic tissues. *Postepy Hig Med Dosw*, *61*. 664-671.
- 107) San Martín, A., Ceballo, S., Baeza-Lehnert, F., Lerchundi, R., Valdebenito, R., Contreras-Baeza, Y., Alegria, K. & Barros, L. F. (2014). Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS ONE*, *9*. e85780.
- 108) Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, *282*, 615–616.
- 109) Javitt, N. B. (1990). HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The FASEB Journal*, *4*, 161–168.
- 110) Luo, X., Yang, Y., Shen, T., Tang, X., Xiao, Y., Zou, T., Xia, M. & Ling, W. (2012). Docosahexaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipid accumulation

and inflammation through repressing NLRC4 inflammasome activation in HepG2 cells. *Nutrition & Metabolism*, 9, 34.

- 111) Li, M., Meng, X., Xu, J., Huang, X., Li, H., Li, G., Wang, S., Man, Y., Tang, W. & Li, J. (2016). GPR40 agonist ameliorates liver X receptor-induced lipid accumulation in liver by activating AMPK pathway. *Scientific Reports*, 6, 1–10.
- 112) Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86, 807–815.
- 113) Maeting, I., Schmidt, G., Sahm, H., & Stahmann, K. P. (2000). Role of a peroxisomal NADP-specific isocitrate dehydrogenase in the metabolism of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 10, 335–343.
- 114) Kaaman, M., Sparks, L. M., Van Harmelen, V., Smith, S. R., Sjölin, E., Dahlman, I., & Arner, P. (2007). Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*, 50, 2526–2533.
- 115) Okita, N., Ishikawa, N., Mizunoe, Y., Oku, M., Nagai, W., Suzuki, Y., Matsushima, S., Mikami, K., Okado, H., Sasaki, T. & Higami, Y. (2014). Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446, 91–97.
- 116) Li, S., Bouzar, C., Cottet-Rousselle, C., Zagotta, I., Lamarche, F., Wabitsch, M., Tokarska-Schlattner, M., Fischer-Posovszky, P., Schlattner, U., Rousseau, D. & Rousseau, D. (2016). Resveratrol inhibits lipogenesis of 3T3-L1 and SGBS cells by inhibition of insulin signaling and mitochondrial mass increase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857, 643–652.
- 117) Ochoa-Ruiz, E., & Diaz-Ruiz, R. (2012). Anaplerosis in cancer: Another step beyond the warburg effect. *American Journal of Molecular Biology*, 2, 291–303.
- 118) Burgess, S. C., He, T. T., Yan, Z., Lindner, J., Sherry, A. D., Malloy, C. R., Browning, J. D. & Magnuson, M. A. (2007). Cytosolic Phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metabolism*, 5, 313–320.

- 119) Montal, E. D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B. J., Ropell, A. E., Gordon, C., Liu, W.J., DeBerardinis, R. J., Sudderth, J., Twaddel, W., Boros, L. G., Shroyer, K. R., Duraisamy, S., Drapkin, R., Powers, R. S., Rohde, J. M., Boxer, M. B., Wong, K. K. & Girnun, G. D. (2015). PEPCK coordinates the regulation of central carbon metabolism to promote cancer cell growth. *Molecular Cell*, *60*, 571–583.
- 120) Latorre-Muro, P., Baeza, J., Armstrong, E. A., Hurtado-Guerrero, R., Corzana, F., Wu, L. E., Sinclair, D. A., López-Buesa, P., Carrodegua, J. A. & Denu, J. M. (2018). Dynamic acetylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase toggles enzyme activity between gluconeogenic and anaplerotic reactions. *Molecular Cell*, *71*, 718-732.
- 121) Méndez-Lucas, A., Hyroššová, P., Novellasdemunt, L., Viñals, F., & Perales, J. C. (2014). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 22090–22102.