

機関番号：17702

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19700523

研究課題名 (和文) カルニチンの長期投与効果—カルニチン欠乏マウスを用いたエネルギー産生機構の検討—

研究課題名 (英文) Prolonged effect of carnitine administration: Changes of energy production in carnitine-deficient mice

研究代表者

吉田 剛一郎 (YOSHIDA GOICHIRO)

鹿屋体育大学・体育学部・准教授

研究者番号：10274870

研究成果の概要 (和文)：

全身的にカルニチンを欠乏するモデル動物、JVS マウスを用いて、カルニチンの1回投与がエネルギー産生におよぼす持続的効果について検討した。生体における絶食条件下での脂肪酸代謝の評価については、マウス尾静脈より ^{14}C -パルミチン酸を投与し、呼気中の ^{14}C - CO_2 発生量をその指標とすることが妥当との結論を得た。カルニチン投与による脂肪酸代謝の亢進を認めた JVS マウスでは、AMP-activated protein kinase (AMPK) を賦活化するレプチンの血中レベルが上昇を示した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I examined the prolonged effects of single carnitine administration on the energy expenditure of fasted carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (*jvs*^{-/-}) mice. The study was able to evaluate the *in vivo* long-chain fatty acid (LCFA) oxidation activity of the mice under various conditions by intravenously injecting [^{14}C]-palmitic acid and measuring the breath or expiratory ^{14}C - CO_2 . Leptin, which stimulates the AMP-activated protein kinase (AMPK), increased in the plasma after a single carnitine administration in *jvs*^{-/-} mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

研究分野：運動生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：エネルギー産生・カルニチン・脂肪酸代謝・JVS マウス・絶食

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸代謝によるエネルギー産生では、そのコファクターとして機能するカルニチンを介して長鎖脂肪酸アシル CoA をミトコンドリアマトリックスに取り込むことが必須となる。すなわち、カルニチンは脂肪からのエネルギー獲得様式において必要不可欠なものである。しかしながら、例えば

脂肪からのエネルギー産生を必要とする連続的な運動において、カルニチン投与がそのエネルギー産生におよぼす影響については、効果ありとするもの、効果なしとするものに分かれ、明確に出来ないというのが現状であって実際の評価は難しい。その詳細を検討するために、カルニチンを先天的に欠乏し、脂肪からのエネルギー産生に

支障をきたすモデル動物 juvenile visceral steatosis (*jvs*^{-/-})マウスを入手した。*Jvs*^{-/-}マウスは、細胞膜カルニチン輸送体 OCTN2 の遺伝子異常 (*slc22a5* 遺伝子産物の L352R 変異) に基づく、全身性のカルニチン欠乏を呈するモデル動物である。*Jvs*^{-/-}マウスでは餌を除くこと (絶食) によって、暗期活動期における自発行動および酸素摂取が減少することを見出した。絶食により低下を示した *jvs*^{-/-}マウスの自発行動と酸素摂取は、カルニチンの腹腔内 1 回投与により野生型 (*jvs*^{+/+})マウスと差のないレベルにまで回復し、その投与効果は長期 (少なくとも 2 日間) にわたり続いた。呼吸商から、絶食開始後のエネルギー産生は、直ちに糖質から脂質依存へと移行し、カルニチン投与後も引き続き脂質依存を示すことが認められた。*Jvs*^{-/-}マウスに投与されたカルニチンは、血中と肝臓でヘテロ接合体マウスのレベルにまで達する顕著な取り込みを認めた。しかしながら、投与 12 時間後には元の低いレベルに復した。一方、心臓、骨格筋、精巢におけるカルニチンの取り込みは極わずかであり、脳への取り込みは認められなかった。脂肪酸代謝パラメーターである血中の遊離脂肪酸とケトン体、および肝臓総脂質量は、肝臓のカルニチンレベルに相応するように投与 12 時間後には全て元のレベルに復した。すなわち、血中や臓器のカルニチンレベルおよび脂肪酸代謝パラメーターの変動からでは、カルニチンの自発行動と酸素摂取におよぼす長時間にわたる投与効果の説明は難しい。呼気ガス分析値および尿中窒素排出量から各栄養素 (炭水化物、脂肪、タンパク質) 別の消費エネルギーを求めたところ、*jvs*^{-/-}マウスでは、カルニチン投与 2 日後においても生食投与 *jvs*^{-/-}マウスと比較して脂肪からのエネルギー産生は亢進した。さらにカルニチン投与 36 時間後に、*jvs*^{-/-}マウスの尾静脈より ¹⁴C-palmitate を投与して、呼気中に排出される ¹⁴C-CO₂ 発生量を測定したところ、生食投与 *jvs*^{-/-}マウスより多量で、絶食 *jvs*^{+/+}マウスのレベルに匹敵する脂肪酸代謝初速度を計測した。エネルギー産生という面からみると、カルニチン投与を行った *jvs*^{-/-}マウスでは、血中や臓器におけるカルニチンレベルが低下した後も、脂肪酸代謝レベルは維持されていた。このことは、カルニチン以外にも脂肪酸利用を律速する因子が存在することを示している。

2. 研究の目的

カルニチン投与を行った絶食 *jvs*^{-/-}マウスでは、血中や臓器におけるカルニチンレベルが低下した後も、脂肪酸代謝レベルは維持されており、エネルギー産生の活性化が自発行動

を回復させる要因になっていると考える。しかしながら、そのメカニズムについては不明であるので詳細に迫る。まず、カルニチンの自発行動に対する長期投与効果が認められる期間において、血中遊離脂肪酸、肝臓および epididymis 重量、肝臓トリグリセリド含量を測定し、それぞれのデータおよび ¹⁴C-palmitate を尾静脈投与して呼気中に排出された ¹⁴C-CO₂ 発生量とを比較することによって、*in vivo* における脂肪酸代謝の動態を検討する。

一方、長鎖脂肪酸の酸化は carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) によって調節されるという報告がある。そのステップは、CPT1 レベル、CPT1 の活性を阻害する malonyl-CoA レベル、CPT1 の malonyl-CoA に対する感受性である。続いて malonyl-CoA の調節に関与する acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化、その調節には AMP-activated protein kinase (AMPK) が関与しており、AMPK 自身はアデニポサイトカインであるレプチンと交感神経により活性化されるというステップである。この一連の系について、カルニチンの長期投与効果の認められる期間においてそれぞれの変化を検討する。

また最近、ミトコンドリア膜での fatty acid translocase である FAT/CD36 が CPT1 の活性と長鎖脂肪酸酸化の調節に重要な役割を果たしていると報告された。故に、*jvs*^{-/-}マウスでのカルニチン長期投与効果における FAT/CD36 の関与を検討する。

3. 研究の方法

本研究には、細胞膜カルニチン輸送体 OCTN2 を欠損する *jvs*^{-/-}マウスと、対照として野生型 (*jvs*^{+/+}) ならびにヘテロ接合体 (*jvs*^{+/-}) マウスを用いる。本動物実験は、鹿屋体育大学動物実験指針および鹿児島大学動物実験指針に基づき実施する。

(1) カルニチンの *jvs*^{-/-}マウス自発行動量・酸素摂取量におよぼす長期投与効果と脂肪酸代謝

Jvs^{-/-}マウスの自発行動量・酸素摂取量に対するカルニチンの投与効果について、その詳細なメカニズムについて検討を進める。

カルニチンの長期投与効果が認められる期間における、血中遊離脂肪酸、肝臓および epididymis 重量、肝臓トリグリセリド含量を測定する。それぞれのデータおよび ¹⁴C-palmitate を尾静脈投与して呼気中から回収される ¹⁴C-CO₂ 発生量を含めて比較検討することにより、*in vivo* における脂肪酸代謝の動態および個体差を検討する。カルニチン投与効果と脂肪酸代謝との関係をより明確化する。

(2) カルニチンの長期投与効果と CPT1、ACC、AMPK およびレプチンレベル

カルニチンの *jvs*^{-/-}マウスに対する長期投与効果の認められる期間において CPT1 の変化

を追究する。肝臓ミトコンドリアにおける CPT1 レベルについて、抗体を用いたウェスタンブロット法により検討する。

CPT1 レベルに変化のあった場合は、上流に位置して調節に関与する ACC について、そのリン酸化を免疫抗体法によって検討する。ACC のリン酸化を調節しているとされる AMPK 活性については、同じくそのリン酸化を検討する。AMPK 活性の調節に関わるレプチンレベルについては、血中レプチンレベルを ELISA 法により検討する。

ACC、AMPK の測定が困難な場合、それらを活性化すると報告された 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) を投与して、一連の系が行動量、脂肪酸代謝および CPT1 活性におよぼす影響を検討する。

(3) カルニチンの長期投与効果と Fatty acid translocase/CD36 レベル

ミトコンドリア膜における存在が報告された fatty acid translocase である FAT/CD36 について、カルニチンの長期投与効果の認められる期間における変化をウェスタンブロット法により検討する。

4. 研究成果

(1) カルニチンの *jvs*^{-/-}マウス自発行動量・酸素摂取量におよぼす長期投与効果と脂肪酸代謝

絶食を施したカルニチン欠乏 *jvs*^{-/-}マウスに、カルニチンの腹腔内 1 回投与を行うと、血中や組織におけるカルニチンレベルが元の低いレベルに復した後も脂肪酸代謝は亢進を示す。エネルギー産生の増加は、自発行動量および酸素摂取量を増加させる要因の一つと考えられるが、そのメカニズムは不明であるので詳細について検討した。とくに、脂肪酸代謝の評価方法は不明であるので検討を加えた。*Jvs*^{-/-}マウスにおいて、カルニチンの自発行動量および酸素摂取量に対する持続的投与効果が認められる期間に、脂肪酸代謝の指標と考えられる血中の遊離脂肪酸(FFA)レベルを測定した結果、カルニチン投与群と生食投与対照群の間に有意な差は認められなかった。しかしながら、¹⁴C-palmitate を尾静脈投与して呼気中から回収される ¹⁴C-CO₂ 発生量を測定したところ、カルニチン投与を行った全ての JVS マウスの ¹⁴C-CO₂ 発生量は、生食投与対照マウスの発生量を上回った。長時間における絶食下では、血中 FFA の個体差は大きい。絶食した *jvs*^{-/-}マウスでは、epididymis 重量と肝臓重量および肝臓トリグリセリド含量、肝臓重量および肝臓トリグリセリド含量と血中 FFA は正の相関を示した。すなわち、血中 FFA の変動は、体全体の脂肪含量に由来している。しかしながら、血中 FFA と ¹⁴C-CO₂ 発生量は相関を示さなかった。以上の結果より、¹⁴C-palmitate は、血中 FFA

のみだけではなく、組織トリグリセリドまたは脂肪酸によって希釈されると考えられるので、*in vivo* での絶食のような条件下における脂肪酸代謝の評価について、呼気中 ¹⁴C-CO₂ 発生量をその指標とすることは妥当である結論に至った。

(2) カルニチンの長期投与効果と CPT1、ACC、AMPK およびレプチンレベル

自発行動量および酸素摂取量の持続的な増加の要因として考えるエネルギー産生の亢進について、そのエネルギー・センサーである AMPK について測定を試みたところ、タンパク質レベルでの変化は認められなかった。その下流に位置する acetyl-CoA carboxylase (ACC) とともに、それらのリン酸化レベルは今のところ不明である。そこで、AMPK の上流にあり、交感神経系を刺激して脂肪酸代謝系を賦活化する 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) の投与を行い、自発行動量、酸素摂取量におよぼす影響を検討した。しかしながら、AICAR 投与は、糖代謝におよぼす影響が大きく、低血糖状態にある JVS マウスに適用することは困難と判断した。

そのため、交感神経系において AMPK の上流に位置するレプチンについて検討したところ、カルニチン投与後に血中レプチンレベルは増加を示した。その意義としては、AMPK を活性化し、その下流にある acetyl-CoA carboxylase および malonyl-CoA が調節を受けて、カルニチンの律速酵素である carnitine palmitoyltransferase 1 を活性化し、持続的な β 酸化を生じることにあると考える。レプチンに加えて、血中アシルグレリンのレベルも変化した。食欲に関すること以外にその意義は不明である。

(3) カルニチンの長期投与効果と Fatty acid translocase/CD36 レベル

ミトコンドリア膜での存在を認める fatty acid translocase である FAT/CD36 について、カルニチンの持続的投与効果の認められる期間における変化を検討したところ、タンパク質レベルでの変化は示されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 吉田剛一郎, 吉武 裕. カルニチン欠損マウスの自発行動減少とオレキシン神経反応の低下. 体力科学, 59(6): 751, 2010. 査読無
- ② Takeo Sakoguchi, Masahisa Horiuchi, Akihiro Asakawa, Miharuru Ushikai, Goichiro Yoshida, Mineko Fujimiya, Ikuko Kato, Masamitsu Nakazato, Toru Takeuchi,

Takeyori Saheki, Akio Inui. Failure of the feeding response to fasting in carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice: involvement of defective acyl-ghrelin secretion and enhanced corticotropin-releasing factor signaling in the hypothalamus. *Biochim Biophys Acta*, 1792(11): 1087-1093, 2009. 査読有

- ③ Goichiro Yoshida. Prolonged effect of single carnitine administration on fasted carnitine-deficient mice regarding their locomotor activity and energy expenditure. 50th ICHPER·SD Anniversary World Congress 2008 Program and Proceedings, 620-626, 2008. 査読無
- ④ 吉田剛一郎, 堀内正久, 小林圭子, 佐伯武頼. カルニチンの代謝および中枢神経系への作用—カルニチン欠損マウスを用いて—. *ビタミン*, 81(12): 601-610, 2007. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 吉田剛一郎, 吉武 裕. カルニチン欠損マウスの自発行動減少とオレキシン神経反応の低下. 第65回日本体力医学会大会, 2010年9月16日. 千葉商科大学(市川市)
- ② Yoshiki Kawano, Yutaka Yoshitake, Akiyo Higashionna, Hiroshi Nagayama, Goichiro Yoshida, Koji Zushi, Masayoshi Yamamoto, Takafumi Hamaoka. Assessment of leg muscle power using a low step height stair test. ACSM 57th Annual Meeting and Inaugural World Congress, June 4, 2010. Baltimore, USA
- ③ 吉田剛一郎, 吉武 裕. カルニチン欠損マウスの絶食による自発行動減少とオレキシン神経活動の低下. 第64回日本体力医学会大会, 2009年9月19日. 朱鷺メッセ(新潟市)
- ④ 吉田剛一郎, 吉武 裕. カルニチン欠損マウスの絶食による自発行動量低下と中枢神経系の関与. 第63回日本体力医学会大会, 2008年9月19日. ビーコンプラザ(別府市)
- ⑤ Goichiro Yoshida. Prolonged effect of single carnitine administration on fasted carnitine-deficient mice regarding their locomotor activity and energy expenditure. 50th ICHPER·SD Anniversary World Congress 2008, May 11, 2008. Kanoya, Japan
- ⑥ 吉田剛一郎, 吉武 裕. カルニチン1回投与が脂肪酸代謝におよぼす持続的効果とその評価—カルニチン欠損マウスを用いて—. 第62回日本体力医学会大会, 2007年9月15日. ノースアジア大学(秋田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 剛一郎 (YOSHIDA GOICHIRO)

鹿屋体育大学・体育学部・准教授

研究者番号: 10274870