

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25460332
研究課題名(和文)食餌性由来亜硝酸塩によるAMPK活性化機構の解明

研究課題名(英文)Activation mechanisms of AMPK by nitrite

研究代表者

土屋 浩一郎 (TSUCHIYA, Koichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：70301314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：亜硝酸塩は臓器保護作用や血圧降下作用等、多くの生理作用を有することが知られているが、これまでの検討で我々は、体内で亜硝酸塩は一酸化窒素(NO)へと還元されて薬効を示すほか、亜硝酸塩そのものがAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)を活性化することを見出した。しかしながらその機序は不明であったため検討したところ、亜硝酸塩はLKB1およびCaMKKを通じてAMPKを活性化していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have shown that dietary supplied nitrate, which substantially exists in our daily diets including vegetables, is reduced into nitrite, and becomes a significant source for NO production playing tissues- and vaso-protective roles especially in hypoxic tissues. During the study period, we found a phenomenon that nitrite directly activated the AMP-activated protein kinase (AMPK) in a concentration dependent manner. To clarify this mechanism, we investigated the activation of AMPK by a549 cells that lacks LKB1 and fails to facilitate the AMPK phosphorylation. In addition, pre-treatment of STO609, a CaMKK inhibitor, suppressed the AMPK phosphorylation. These data suggest that nitrite activates AMPK through both LKB1 and CaMKK pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：亜硝酸塩 AMPK

1. 研究開始当初の背景

最近まで、血中の無機の硝酸塩や亜硝酸塩は生体内で NO が代謝された際に生じる不活性な最終代謝物および中間代謝物と考えられ、食品中の硝酸・亜硝酸塩は不純物と考えられてきた。しかし我々は、静脈内投与や飲水に混ぜて経口で投与した亜硝酸塩は体内で NO へと還元されることを亜硝酸の安定同位体を用いて証明し、さらに他の研究者らによって硝酸塩も口腔内嫌気性細菌によって亜硝酸に還元を受け、同様に NO へと変化することが報告された。

これまで、体内の NO は L-arginine を基質とした、NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) によって生成するとされてきた。しかし NOS による NO の生成には、基質である L-arginine の他に分子状酸素が必要であり、虚血時のような酸素供給が絶たれるときの NOS による NO 生成への寄与はほとんど無いと考えられる。

一方、我々は、腎臓が虚血に至ったときには腎臓中の亜硝酸塩が NOS に代わり NO を生成することを報告した。すなわち、虚血時には亜硝酸塩からの NO 生成が大きな意味を持つことを提案した。これらの知見から、最近では血中及び組織中の硝酸塩および亜硝酸塩は、生体に負荷がかけられたときの、NOS に代わる NO 生成のためのプールだと認識されるに至っている。

セリン/スレオニンキナーゼに属する AMPK は AMP で活性化されるタンパクリン酸化酵素であり、ATP 枯渇ストレスから細胞を保護し、細胞のエネルギー恒常性を調節する役割を持つことや、脂肪酸やコレステロールなどの代謝調節にも重要な役割を持つことが知られている。AMPK は細胞内 AMP/ATP 比が上昇すると活性化され、その下流のエフェクターのリン酸化を誘導し、グルコースの細胞への取り込みを上昇させることから、2 型糖尿病に見られるインスリン抵抗性に対する標的としても注目されている。さらに、AMPK の活性化は血管内皮細胞の eNOS を活性化することで内皮血管保護作用やそれに伴う臓器保護作用の主要なプレイヤーの一つと考えられるようになった。

我々はこれまで、ヒト腎系球体内皮細胞 (HGEC) を用い亜硝酸塩投与時の AMPK 活性化について検討したところ、亜硝酸塩によって AMPK の活性化が観察され、またその下流の ACC のリン酸化、および eNOS のリン酸化が観察された。

これらの現象は亜硝酸から産生した NO が、同じく細胞から定常的に生成している活性酸素種 ($O_2^{\cdot-}$) と拡散律速速度で反応し生成した peroxynitrite ($ONOO^-$) が AMPK を活性化したためと考えていたが、興味深いことにこの現象は NO の特異的消去剤である carboxy-PTIO の添加によっても抑制されなかった。

以上の結果より、我々は『亜硝酸塩の生理作用は、これまで (我々を含めて) 亜硝酸由来の NO がその活性本体である』と信じてきたが、これらの結果は『亜硝酸塩 (イオン) そのものが生理活性物質である』という現象を示唆していると考えている。しかしながら、その詳細なメカニズムはほとんど不明である。

AMPK の活性化には上流の kinase 群の活性化や AMP/ATP 比が関与していることが知られていることから、本研究では血管内皮細胞における亜硝酸塩による腎保護作用のメカニズムを、AMPK の上流に位置する kinase 群、細胞内 AMP/ATP 比、に与える亜硝酸塩の相互作用との関連から考察し、亜硝酸塩による AMPK 活性化機序を解明することにより亜硝酸塩 AMPK 活性化臓器保護作用というカスケードの解明をすすめ、食餌性亜硝酸の生理作用の本質に迫る。

2. 研究の目的

本研究では亜硝酸塩による AMPK 活性化のメカニズムを、AMPK の上流に位置する kinase 群、および細胞内 AMP/ATP 比と亜硝酸塩との関連から考察し、食餌性亜硝酸塩による臓器保護作用の本質に迫ることを目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 高脂肪食負荷インスリン抵抗性惹起ラットに対する亜硝酸塩摂取による糖脂質代謝改善作用の検討

7 週齢の Wistar 系雄性ラットに対し高脂肪食 (60%fat) を 2 週間投与し、同時に飲水に亜硝酸 Na を添加した時の糖脂質代謝について検討した。

(2) 培養肝細胞における、亜硝酸 Na による AMPK 活性化の検討
ラット肝癌細胞である Fa0 細胞に亜硝酸 Na を添加し、AMPK の活性化の有無を WB 法にて検討した。

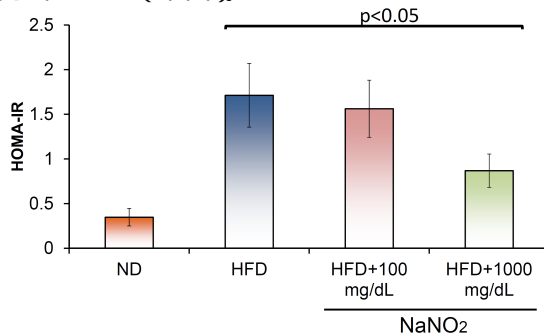
(3) AMPK 活性化の分子機構の解明
LKB1 が機能的に発現していない a549 細胞を用い、亜硝酸塩による AMPK 活性化を検討した。また、CaMKK 阻害剤 ST0609 を用い、CaMKK の関与を検討した。

4. 研究成果

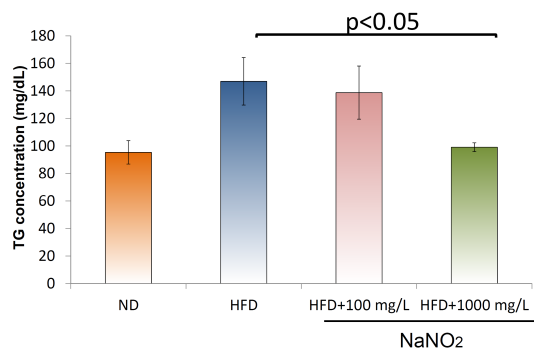
(1) 高脂肪食負荷インスリン抵抗性惹起ラットに対する亜硝酸塩摂取による糖脂質代謝改善作用の検討

Wistar 系雄性ラット (7 週齢、各群 5 ~ 8 匹) を通常食 (ND)、高脂肪食 (HFD)、高脂肪食 + 亜硝酸 Na 含有飲水 (100 mg/L)、高脂肪食 + 亜硝酸 Na 含有飲水 (1,000 mg/L) の 4 群に分け、2 週間飼育し、1 週目に経口グルコース負荷試験、2 週目にインスリン負荷試験および血液生化学的検査、遺伝子発現プロファイルを検討した。

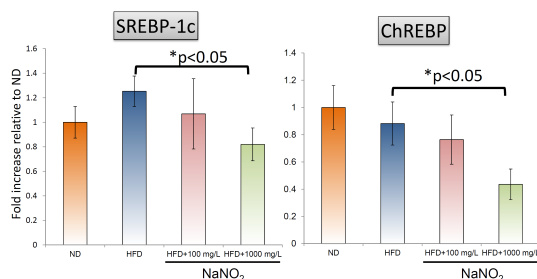
その結果、亜硝酸 Na の投与量にかかわらず高脂肪食投与群間では餌摂取量および体重に差は見られなかった。糖負荷試験では、高脂肪食単独投与群と比べ、高濃度の亜硝酸 Na 投与群で有意な血糖上昇抑制効果が観察された。血中インスリン値は高脂肪食投与によって上昇するが、亜硝酸 Na 投与の有無による違いは見出されなかった。一方、12 時間絶食後のインスリン負荷試験において、高濃度の亜硝酸 Na 投与群で有意な血糖降下が観察されたこと、さらに HOMA-IR は亜硝酸 Na の投与によって有意に改善したことから、亜硝酸 Na の投与で糖代謝が改善していることが見出された（下図）。



亜硝酸 Na 投与 2 週目における血中脂質濃度を検討したところ、先の糖代謝と同様、亜硝酸 Na の濃度依存的にトリグリセライド (TG) の低下が観察され、高濃度亜硝酸 Na 投与群では、通常食群と同程度まで TG 値を低下させた（下図）。



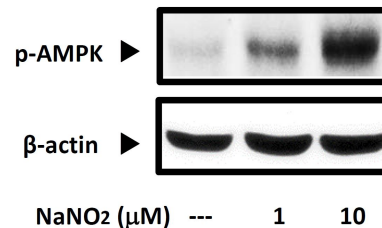
体内での TG の合成促進には、グルコースやインスリンに依存した転写活性化が関与しており、それぞれ炭水化物応答配列結合タンパク質 (ChREBP)、ステロール応答配列結合タンパク質 1c (SREBP-1c) などが報告されている。そこで肝臓におけるそれら mRNA 発現レベルを WB 法で確認した（下図）。



その結果、亜硝酸 Na はこれら遺伝子の発現を抑制することを確認した。

以上の結果より、亜硝酸塩は高脂肪食負荷インスリン抵抗性惹起ラットに対し糖脂質代謝改善作用を示し、このうち TG 抑制効果には TG 生合成系の抑制が関わっていることを *in vivo* の検討から明らかにした。

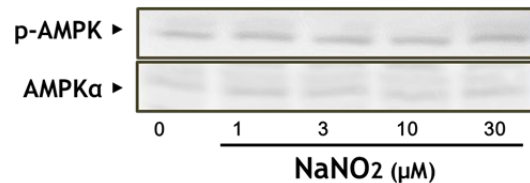
(2) 培養肝細胞における、亜硝酸 Na による AMPK 活性化の検討
亜硝酸塩による ChREBP および SREBP-1c の mRNA 発現抑制メカニズムを、培養肝細胞を用い検討した。ラット肝癌細胞である FaO 細胞に亜硝酸 Na を添加し 60 分インキュベートすると、濃度依存的に AMPK のリン酸化が観察された（下図）。



ChREBP および SREBP-1c の発現は PPAR α で制御されており、PPAR α が活性化することで ChREBP および SREBP-1c の発現が低下することが報告されている。また PPAR α の活性化は AMPK の活性化で引き起こされることから、今回の亜硝酸塩による TG 生成抑制は、AMPK-SREBP-1c/ChREBP-TG 系によるものであることが示唆された。

(3) AMPK 活性化の分子機構の解明
AMPK は Thr-172 のリン酸化によって活性化するが、そのリン酸化を調節する因子として、CaMKK と LKB1 が知られている。そこで亜硝酸塩による AMPK 上流調節機構を明らかにする目的で、培養細胞を用い検討を行った。

LKB1 pathway の検討
LKB1 遺伝子欠損細胞株である A549 細胞を用い、種々の濃度の亜硝酸塩 30 分刺激による AMPK 活性化について検討したところ、亜硝酸塩の濃度 (1~30 μ M) に関わりなく AMPK のリン酸化は観察できなかった。



CaMKK pathway の検討
ヒト腎系球体細胞 (HGEC 細胞) を用い、10 μ M 亜硝酸 Na 30 分刺激による AMPK 活性化に対する、CaMKK 阻害剤である ST0609 の影響を検討したところ、ST0609 の共存により AMPK リン酸化が抑制される傾向を見出した。

(4) まとめ
亜硝酸塩による臓器保護作用について、これまで腎保護作用について報告してきた。今回、高脂肪食負荷モデル動物において、摂取する亜硝酸塩の濃度依存的に血中 TG 濃度の上昇

抑制が見出されたことから、そのメカニズムについて検討を行ったところ、亜硝酸塩は肝臓において AMPK-SREBP-1c/ChREBP-TG 系を通じ、TG 合成抑制に関与することが示唆された。

また、AMPK 活性化の機序として、ATP/AMP 比の変動が最も大きな要因である事は知られているが、その下流に存在する LKB1 経路、また CaMKK 経路が知られている。今回の検討で、亜硝酸塩による AMPK 活性化の機序として LKB1 経路と CaMKK 経路の関与が示唆された。

本研究の当初の目的は亜硝酸塩による AMPK 活性化のメカニズム解明であったが、動物実験を進める課程において亜硝酸塩が高脂肪食によって悪化した糖脂質代謝を改善するという、食餌性亜硝酸塩による新たな保護作用を見出した。現在、この糖脂質代謝に関わる新たな鍵分子の同定を行っている。

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)

[学会発表](計6件)

1. Tsuchiya K., Miyamoto L., Tomida Y., Yamane M., Tsuchihashi Y., Tsuda K., Ikeda Y., Tamaki T. Dietary nitrite ameliorates glucose tolerance and hyperlipidemia in diet-induced obesity rats. The 9th International NO Conference, 2016年5月22日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
2. Tsuchihashi Y., Miyamoto L., Tomida Y., Yamane M., Takenomuka K., Ikeda Y., Tamaki T., Tsuchiya K. Dietary nitrite ameliorates glucose tolerance and hyperlipidemia in diet-induced obesity rats. The 6th International Conference on Food Factors, 2015年11月22日~25日, Seoul(Korea)
3. Miyamoto L., Yamane M., Tomida Y., Takenokuma K., Ishizawa K., Tamaki T., Tsuchiya K., Significance of AMPK in renal protective and metabolic actions of nitrite. SFRR12014, 2014年3月25日, 京都国際会館(京都府・京都市)
4. 富田洋輔, 宮本理人, 山根萌, 河野舞, 竹之熊和也, 石澤啓介, 玉置俊晃, 土屋浩一郎. 亜硝酸イオンの AMPK 活性化作用と糖・脂質代謝に対する効果の検証, 第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2013年10月27日, 松山大学(愛媛県・松山市)
5. 富田洋輔, 宮本理人, 山根萌, 河野舞, 竹之熊和也, 石澤啓介, 玉置俊晃, 土屋浩一郎, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013, 2013年8月31日, 熊本大学薬学部(熊本県・熊本市)
6. 宮本理人, 山根萌, 河野舞, 富田洋輔, 石澤啓介, 玉置俊晃, 土屋浩一郎, 亜硝酸塩による AMPK 活性化作用とその意義,

第13回日本NO学会学術集会, 2013年6月28日~29日, 沖縄県医師会館(沖縄県・南風原町)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 浩一郎 (TSUCHIYA, Koichiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 70301314

(2)研究分担者

玉置 俊晃 (TAMAKI, Toshiaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 80179879

池田 康将 (IKEDA, Yasumasa)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 60432754

木平 孝高 (KIHIRA, Yoshitaka)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 90377276

石澤 啓介 (ISHIZAWA, Keisuke)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 60398013