

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850087

研究課題名(和文) 酢酸によるAMPK活性化メカニズムの解明～サルコペニア予防・改善を目指して～

研究課題名(英文) Mechanisms underlying activation of AMPK by acetic acid in rat L6 myotube cells

研究代表者

吉村 征浩 (Yoshimura, Yukihiro)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：60455566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酢酸摂取はメタボリックシンドローム予防に効果的であり、ラットにおいて運動持久力を増加させ、骨格筋におけるミトコンドリア生合成の増加、筋線維の遅筋化を引き起こす。本研究ではL6筋管細胞を用い、骨格筋における酢酸の作用機序を明らかにすることを目的とした。酢酸添加による作用には、酢酸代謝に伴うAMP/ATP比の上昇を介したAMPK活性化と、短鎖脂肪酸受容体GPR43およびカルシウムシグナル伝達を介したAMPK活性化が関与することが本研究において明らかとなった。酢酸摂取は、運動と同様の効果(AMPK遅筋線維の増加)を骨格筋にもたらし、新たなサルコペニアの予防・治療法に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic intake of acetic acid induces the activation of AMPK in skeletal muscle, leading to the increase of slow muscle fiber and improvement of endurance performance. In this study, we investigated action mechanism of acetic acid using rat L6 myotube cells. Our data indicate that there are two mechanisms for the effect of acetic acid on the activation of AMPK in the cells. One is due to the increase in the AMP:ATP ratio via the activity of acetyl-CoA synthetase, and the other is due to activation of calcium signaling via a short-chain fatty acid receptor, GPR43. This study suggests the possibility that the intake of acetic acid cause the same effect as the exercise, increase in slow muscle fiber, and improve symptoms of sarcopenia.

研究分野：生化学

キーワード：酢酸 L6筋管細胞 GPR43 AMPK カルシウムシグナル 骨格筋遅筋化 ACSS3 Propionyl-CoA synthetase

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えている我が国では、要介護認定者は年々増加しており、今後も増加し続けることが予想される。サルコペニアは加齢に伴い生じる骨格筋量と骨格筋力の低下を示す症状である。サルコペニアを改善するには、運動療法、いわゆる「筋トレ」が有効であることが示されている。しかしながら、高齢者においては激しい運動を伴う筋トレは骨折の危険性があり、また合併症を抱えていたり、運動機能が低下しているため運動自体が困難な場合が多い。そのため、サルコペニアの予防・治療には栄養療法・薬物療法が重要であり、治療・予防効果の高い栄養成分の発見が望まれている。

運動により ATP が消費されると骨格筋では AMP:ATP 比が上昇し、AMPK が活性化。活性化 AMPK は下流因子である sirtuin1(SIRT1)、PPAR-coactivator1 (PGC1) を活性化し、ミトコンドリアの生成、酸化リン酸化の促進、遅筋線維の増加を惹起する(図1)。骨格筋においてアディポネクチンがその受容体に結合すると、運動とは関係なく AMPK が活性化し、下流の反応が起こることが示された(図1・灰色点線部分、Nature 464, 1313-1319, 2010)。このことは何らかの方法で、骨格筋において AMPK を活性化させることができれば、運動と同様の効果(遅筋線維の増加)が得られることを示しており、そのような方法は高齢者において運動療法に替わる新たなサルコペニアの予防・治療法に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究室では酢酸摂取が2型糖尿病モデルラットの病態を改善し、メタボリックシンドローム予防に効果的なことを示し(Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 1236-1243, 2007) 酢酸を摂取したラットの骨格筋において AMPK が活性化(リン酸化)していることを見出した(Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 570-576, 2009)。また、酢酸摂取をさせたラットにおいて運動持久力が増加することを見出しており、骨格筋においてミトコンドリア生合成の増加、筋繊維の遅筋型への移行を酢酸が惹起していることが示唆される。申請者は酢酸による AMPK 活性化のメカニズムを明らかにする目的で、ラット由来の培養筋管細胞(L6細胞)を用い研究を行ってきた。細胞内へ取り込まれた酢酸は図1の黒破線で囲まれた部分で示した代謝を受け、細胞内の AMP:ATP 比の上昇を引き起こすことが予想される(酢酸代謝に伴う AMPK 活性化)。我々は細胞内 AMP:ATP 比が上昇する時間と AMPK が活性化される時間が異なることを観察しており、酢酸による AMPK 活性化は、酢酸代謝に伴う細胞内 AMP:ATP 比上昇というメカニズムだけでは説明がつかないと考えた。酢酸は短鎖脂肪酸に分類され、現在までに知られている短鎖脂肪

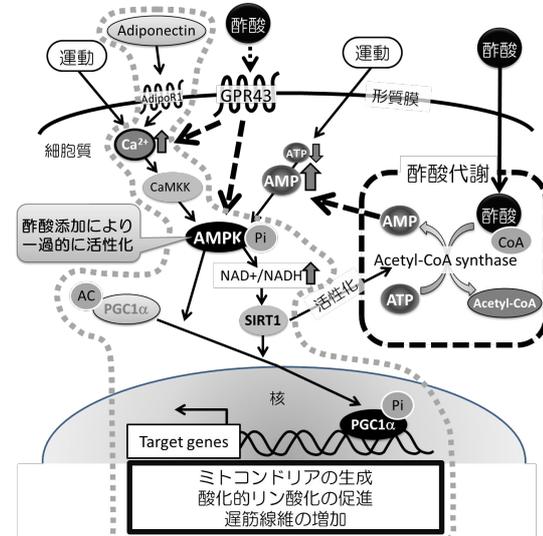


図1 運動による AMPK 活性化経路および予想される酢酸の AMPK 活性化経路

酸受容体は GPR41 および GPR43 である。PCR 解析によりラットのヒラメ筋、腓腹筋および L6 筋管細胞において GPR41 mRNA の発現はほとんど確認できず、GPR43 mRNA の発現が高いことを確認した。以上のことから、骨格筋において酢酸による AMPK 活性化は一部 GPR43 を介していると示唆された。本研究では酢酸による AMPK 活性化への GPR43 の関与を示し、AMPK 活性化メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酢酸による AMPK 活性化および下流遺伝子発現上昇

低血清(2%馬血清)処理により筋管細胞へ分化させた L6 細胞の培養液に酢酸を終濃度 0.5 mM(1 μmol/2 mL)になるように添加した。酢酸添加後のグルコース取り込み量を培養上清の残存グルコース量を測定することで定量した。また、細胞内 AMP:ATP 比を HPLC により分析し、AMPK 活性化、GLUT4、MEF2A 発現量は Western blotting によって定量した。また、各遺伝子発現量は real-time PCR を用いて相対定量した。

(2) 酢酸による AMPK 活性化における GPR43 の関与

酢酸添加によって惹起される AMPK 活性化に GPR43 が関与しているかを、GPR43 のアゴニストによる GPR43 の活性化、siRNA による遺伝子ノックダウンによって評価した。また、下流遺伝子の発現量の変化を Western blotting および real-time PCR により評価した。カルシウムシグナルの関与は、各種阻害剤によって評価した。

(3) rat acss3 遺伝子クローニング

分化した L6 筋管細胞には、これまでにクローニングされておらず、機能未知な acyl-CoA synthetase short chain family 3(acss3)が発現していた。酢酸代謝に acss3

がどのように関与するかを調べるため、遺伝子をクローニングし、大腸菌に発現させた組換え体の酵素学的性質を決定した。また、ヒト肝培養細胞における *acss3* の機能を推定するために、*siRNA* を用いた遺伝子ノックダウンを行った。

4. 研究成果

(1) 酢酸処理が L6 筋管細胞における AMPK 活性化および下流因子に与える影響

L6 筋管細胞の培養液に酢酸を添加すると、大部分の酢酸は速やかに (添加後 30 分以内に) 細胞に吸収され、添加後 2 分という非常に早い段階で細胞内 AMP:ATP 比が上昇し、AMPK 活性化が起こることが分かった。AMPK 活性化に伴い、GLUT4 ならびにミオグロビタンタンパク質および mRNA の発現量が増加し、その増加は AMPK 依存的であることが AMPK 阻害剤の処理により明らかとなった。また、筋管細胞のグルコースならびに脂肪酸の取り込みは酢酸処理によって増加し、細胞内のトリアシルグリセリドは減少した。骨格筋細胞における GLUT4 およびミオグロビンは、転写因子である MEF2A の制御を受けることが知られている。酢酸処理によって MEF2A の発現量は、AMPK 依存的にタンパク質、mRNA レベルで増加した。また、AMPK 活性化に伴って発現が増加することが知られており、筋線維の遅筋化に関与する PGC1 も酢酸処理によって AMPK 依存的にタンパク質、mRNA レベルで増加した。以上のことは、酢酸処理により筋管細胞において AMPK が活性化し、MEF2A、PGC1 発現の上昇が起こり、その結果、GLUT4 やミオグロビンの発現量が増加することを示しており、酢酸が筋管細胞においてグルコースや脂肪酸の取り込みを促進し、エネルギー代謝に影響を及ぼすことを示唆している。また、酢酸処理によって PGC1 も発現が増加することから、酢酸が骨格筋において疑似的な運動作用を及ぼすことを示唆している。

(2) 酢酸による AMPK 活性化における GPR43 の関与

上述のように、L6 筋管細胞の培養液に酢酸を添加すると速やかに AMP:ATP 比の上昇、AMPK 活性化が起こり、GLUT4 や MEF2A の発現上昇が起こる。GLUT4 や MEF2A 発現量の上昇は、酢酸添加 5 分後に観察され、その後、それらの発現量は減少し、添加 4 時間後に再び発現量が増加する。酢酸添加後の遅い時間で起こる変化は酢酸代謝に伴う AMPK 活性化を介したものではなく、他のメカニズムが働いている可能性があった。そこで、短鎖脂肪酸受容体 (GPR41 および GPR43) の関与を調査した。PCR 解析によりラットのヒラメ筋、腓腹筋および L6 筋管細胞において GPR41 mRNA の発現はほとんど確認できず、GPR43 mRNA の発現が確認された。GPR43 の選択的アゴニストもしくは酢酸処理は L6 筋管細胞において、細胞内カルシウムの放出を増加させること

が分かった。また、酢酸の添加により、GPR43 の mRNA 発現量が増加し、添加後 30 分で最大になることが分かった。酢酸添加による GPR43 mRNA 発現増加は、AMPK 阻害剤で完全に抑制することができなかったことから、AMPK 以外の経路が存在することが示唆された。酢酸添加による AMPK 活性化、GLUT4、MEF2A、PGC1 の発現増加は GPR43 の *siRNA* によって抑制され、逆に GPR43 アゴニスト処理により酢酸処理同様、AMPK 活性化が起こり、下流因子の発現増加が起こった。以上のことは酢酸による AMPK 活性化には GPR43 が関与することを示している。GPR43 の活性化により細胞内カルシウム濃度が変化することから、カルモジュリンおよびカルシニューリンの関与をそれぞれの阻害剤を用いて調べたところ、いずれにおいても酢酸添加の作用を抑制することが分かった。以上のことから、酢酸の骨格筋における作用機序には、酢酸代謝を介したもののみならず、短鎖脂肪酸受容体 GPR43 を介したカルシウムシグナルが関与するものが存在することが分かった。

(3) Acyl-CoA Synthetase Short-Chain family member 3 の機能解析

分化した L6 筋管細胞には、これまでにクローニングされておらず、機能未知な acyl-CoA synthetase short chain family 3 (*acss3*) が発現していた。酢酸代謝に *acss3* がどのように関与するかを調べるため、遺伝子をクローニングし、遺伝子産物の酵素学的性質を決定した。ラット *acss3* の発現組織を調べたところ、肝臓、腎臓で高発現していた。ヒト培養細胞に発現させたラット ACSS3 はミトコンドリアに局在し、ラット肝臓において、ACSS3 はミトコンドリアマトリックスに存在した。リコンビナント ACSS3 の基質特異性を調べた結果、プロピオン酸を最適な基質とする酵素であることがわかった。HepG2 細胞を用いて、*acss3* をノックダウンしたところ、*acss3* ノックダウン細胞の破碎液中の acyl-CoA 活性は酢酸、酪酸を基質とした場合には変化がなかったが、プロピオン酸を基質とした場合のみ活性低下がみられた。ラットの肝臓における ACSS3 の発現量が飢餓によって影響を受けるか調べたところ、飢餓状態では ACSS3 の発現量が増加し、プロピオニル CoA 合成酵素活性も増加することが分かった。以上のことから、ACSS3 は肝臓ミトコンドリアマトリックスに存在するプロピオニル CoA 合成酵素の一つであり、飢餓状態で発現が誘導されることが分かった。

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 9 件)

N. Zaima*, Y. Yoshimura*, Y. Kawamura, and T. Moriyama

*These authors contributed equally.
Distribution of lysophosphatidylcholine
in endosperm of *Oryza sativa* rice
Rapid Commun Mass Spectrom 28. 1-6, 2014
DOI : 10.1002/rcm.6927

T. Tanaka, K. Takahashi, K. Adachi, H. Ohta, Y. Yoshimura, Y. Agawa, Y. Sawada, O. Takaoka, A. Kumar Biswas, K. Takii, N. Zaima, T. Moriyama, Y. Kawamura
Molecular cloning and expression profiling of procollagen 1 (I) in cultured Pacific bluefin tuna
Fisheries Science 80. 603-612, 2014
DOI : 10.1007/s12562-014-0737-7

吉村征浩, 江木智恵美, 北川昌昭, 奥島信行, 我如古菜月, 新田陽子, 岸本妙子, 中島伸佳, 久保田恵, 伊東秀之, 山下広美, 辻英明
県大米粉麵の成分および物性に関する研究
岡山県立大学保健福祉学部紀要, 第2巻, 57-64, 2015
DOI : 10.15009/00001298

A. Araki, Y. Yoshimura, Y. Yamaguchi, H. Maruta, M. Kimoto, Y. Takahashi, H. Yamashita
Effect of exercise training with intake of acetic acid on lipid metabolism and endurance performance
岡山県立大学保健福祉学部紀要 第23巻 21-32, 2016
DOI : 10.150009/00001966

M. Yamamoto, T. Kashimoto, Y. Yoshimura, N. Tachibana, S. Kuroda, Y. Miki, S. Kitabayashi, P. Tong, J. Xiao, K. Tanaka, H. Hamamoto, K. Sekimizu, K. Yamamoto
A silkworm infection model to study the *Vibrio vulnificus* virulence genes
Molecular Medicine Reports, 14. 4243-4247, 2016
DOI : 10.3892/mmr.2016.5782. Epub 2016 Sep 26.

Y. Yoshimura, N. Goto-Inoue, T. Moriyama, and N. Zaima
Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry
Food Chemistry 210. 200-211, 2016
DOI : 10.1016/j.foodchem.2016.04.096

H. Maruta, Y. Yoshimura, A. Araki, M. Kimoto, Y. Takahashi, and H. Yamashita
Activation of AMP-Activated Protein Kinase and Stimulation of Energy Metabolism by Acetic Acid in L6 Myotube Cells.
PLoS One 11. e0158055, 2016

DOI : 10.1371/journal.pone.0158055

A. Araki, Y. Yoshimura, H. Maruta, and H. Yamashita
Changes in the 5' - AMP Concentration of Skeletal Muscles on Acetic Acid Treatment Under Fed or Starved Conditions in Rats
Annals of Obesity & Disorders 1. id1013, 2016

Y. Yoshimura, A. Araki, H. Maruta, Y. Takahashi, and H. Yamashita
Molecular Cloning of Rat acss3 and Characterization of Mammalian Propionyl-CoA Synthetase in the Liver Mitochondrial Matrix
Journal of Biochemistry, 167. 279-289, 2017
DOI : 10.1093/jb/mvw067

〔学会発表〕(計9件)
吉村征浩, 丸田ひとみ, 荒木彩, 木本眞順美, 高橋吉孝, 山下広美
酢酸はラット培養筋管細胞において AMPK 活性化を介して glut4 の発現を亢進する
日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山, 2015

Y. Yoshimura, H. Maruta, A. Araki, M. Kimoto, Y. Takahashi, H. Yamashita
Metabolism of Exogenous Acetic Acid Induces glut4 Expression through Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Rat Myotube Cells
12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, 2015

H. Yamashita, C. Araoka, Y. Yoshimura, A. Araki, M. Kimoto
Effects of chronic intake of acetate on muscle fiber type and endurance performance
12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, 2015

A. Araki, Y. Yoshimura, N. Morikami, M. Kimoto, H. Yamashita
Acetic acid increases adenosine monophosphate level and phosphorylation of AMP-activated protein kinase
12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, 2015

N. Zaima, Y. Yoshimura, Y. Kawakami, T. Moriyama
Visualization of metabolites in *Oryza sativa* rice by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry
12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, 2015

N. Zaima, Y. Yoshimura, Y. Kawakami, T. Moriyama
Characteristic Distribution of Metabolites in Oryza sativa Rice
106th AOCs Annual Meeting, Florida, USA, 2015

H. Maruta, Y. Yoshimura, A. Araki, M. Kimoto, Y. Takahashi, H. Yamashita
Activation of AMP-activated protein kinase and stimulation of energy metabolism by the treatment of acetic acid in L6 myotube cells
8th International Conference on Cachexia, Sarcopenia & Muscle Wasting, France, 2015

M. Iwata, H. Maruta, Y. Yoshimura, K. Tanaka, Y. Irie, Y. Takahashi, H. Yamashita
Effects of acetic acid on composition of gut microbiota in rat
The 10th Joint Conference on Nutrition and Food Science, Woosong University, Korea, 2016

吉村征浩, 荒木彩, 丸田ひとみ, 高橋吉孝, 山下広美
Molecular Cloning of Rat acss3 and Characterization of Mammalian Propionyl-CoA Synthetase in the Liver Mitochondrial Matrix
第 89 回日本生化学大会, 仙台, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 征浩 (YOSHIMURA, Yukihiro)
岡山県立大学・保健福祉学部・栄養学科・助教

研究者番号：60455566

(2) 連携研究者

山下 広美 (YAMASHITA, Hiromi)
岡山県立大学・保健福祉学部・栄養学科・教授

研究者番号：70254563

(4) 研究協力者

丸田 ひとみ (MARUTA, Hitomi)
荒木 彩 (ARAKI, Aya)
荒岡千尋 (ARAOKA, Chihiro)