

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390059
 研究課題名（和文） 栄養素の選択的摂取行動と代謝に及ぼす視床下部室傍核 AMP キナーゼの調節作用
 研究課題名（英文） Role of AMP kinase in the paraventricular hypothalamus in the regulation of food preference.

研究代表者

箕越 靖彦（MINOKOSHI YASUHIKO）
 生理学研究所・発達生理学研究室・教授
 研究者番号：10200099

研究成果の概要：

AMPキナーゼ(AMPK)は、細胞内AMP濃度上昇によって活性化し、グルコースや脂肪の利用、遺伝子発現、蛋白合成を調節してATPを回復させる酵素であり、“metabolic sensor”、“fuel gauge”として知られている。視床下部室傍核は古くから摂食行動調節に重要な神経核として知られている。そこで本研究では、レンチウイルスを用いて活性型AMPKをマウス視床下部室傍核の神経細胞に選択的・恒常的に発現させ、摂食量と体重の変化を調べた。その結果、室傍核に活性型AMPKを発現させたマウスは過食となり肥満することが判った。興味深いことにこのマウスは、炭水化物食を好み高脂肪食を嫌うことを見出した。さらにこのような食餌嗜好性の変化が、AMPKによる室傍核での脂肪酸酸化の変化によることを見出した。

次に、高脂肪食と炭水化物食に対する嗜好性が肥満動物ではどのように変化しているのか、また、室傍核AMPKとどのような関連にあるかを調べた。その結果、高脂肪食による肥満、KKAy肥満マウスでは脂肪に対する嗜好性が亢進することを見出した。さらに、室傍核AMPK活性及び脂肪酸酸化が低下していた。これらの実験結果は、室傍核AMPK-脂肪酸酸化機構が肥満動物の食餌嗜好性にも調節作用を営むことを示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：生理学、肥満、糖尿病、摂食行動

1. 研究開始当初の背景

AMP キナーゼ(AMPK)は、細胞内 AMP 濃度上昇によって活性化し、グルコースや脂肪の利用、遺伝子発現、蛋白合成を調節して ATP を回復させる酵素であり、“metabolic sensor”、“fuel gauge”として知られている。私どもは、AMPK が、細胞内エネルギー代謝を調節するだけでなく、レプチンやアディポネクチンの細胞内シグナル伝達分子として摂食行動、代謝を調節することを報告した(Nature, 2002, 2004)。レプチンを投与すると視床下部神経核のうち、弓状核と室傍核において選択的に AMPK 活性が低下した。

室傍核は、古くから摂食行動調節に重要な神経核として知られている。このことから、視床下部室傍核の AMPK は摂食行動に調節作用を営んでいる可能性が高い。また、AMPK は、脂肪酸酸化を促進することが明らかとなっている。このように視床下部室傍核 AMPK と脂肪酸酸化が摂食行動にどのような調節作用を営んでいるかは興味深い研究課題である。

2. 研究の目的

視床下部室傍核 AMPK がマウスの摂食行動にどのような調節作用を営んでいるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス視床下部室傍核の両側にカニューレを留置し、体重が回復した後にカニューレを通して、活性型 AMPK を発現するレンチウイルスを室傍核に接種した。活性型 AMPK を発現するレンチウイルスは、AMPK α 1 サブユニットの制御ドメインを切除して N 末端から 312 番目までの触媒ドメインのみとし、これに Thr172 をアスパラギン酸に置換したものを活性型 AMPK としてレンチウイルスベクターに組み込んだ。活性型 AMPK の N 末端には tag として Flag を付加した。このベクターとともに envelope 遺伝子(VSVg) とウイルス増殖に必要な遺伝子(gag-pol) を HEK293T 細胞に導入し、高濃度のウイルス粒子溶液を得た。活性型 AMPK の発現には、神経細胞特異的プロモーターである synapsin 1 プロモーターを用いた。対照群には、レンチウイルス(synapsin 1 プロモーター)によって EGFP を室傍核神経細胞に発現させたマウスを用いた。

(2) レンチウイルスを接種した後、マウスの体重を測定した。またウイルスを摂取して 1 ヶ月後に摂食量を測定した。食餌は、トウモロコシ澱粉を 70% 有するものを与えた。ま

た、食餌嗜好性への効果を調べるため、高蔗糖食(蔗糖 68%)と高脂肪食(ラード 60%)を自由に選択できるケージを作製し、これを用いて、どちらの食餌をマウスが選択、摂取するかを調べた。炭水化物、脂肪以外の栄養成分は同じにした。

(3) 室傍核での脂肪酸酸化の変化を調べるため、室傍核をマウスから採取し、チューブの中で、 ^3H でラベルしたパルミチン酸を作用させ、脂肪酸酸化を測定した。また脂肪酸酸化に関連する遺伝子の発現を調べた。

(4) 高脂肪食を与え肥満させたマウスと遺伝的肥満マウスである KKAy マウスの食餌嗜好性、室傍核での AMPK 活性、脂肪酸酸化の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 活性型 AMPK を発現させたマウスは、通常食(トウモロコシ澱粉 70%)において体重が著しく増加した。3 ヶ月後には、対照群が 3-4 g 程度の増加であったのに対して、活性型 AMPK を発現させたマウスは 10 g 以上体重が増加した。しかし、普通のマウスが好んで摂取する高脂肪食を与えても活性型 AMPK を発現させたマウスは肥満しなかった。

(2) 通常食、高蔗糖食(蔗糖 68%)と高脂肪食(ラード 60%)をそれぞれ両群のマウスに与えて、摂食量を測定した。その結果、活性型 AMPK を発現させたマウスは、通常食と高蔗糖食において過食となったが、高脂肪食では、対照群は過食になるにも関わらず、全く過食とならなかった。

(3) 上記の実験結果から、活性型 AMPK を室傍核に発現させたマウスは、炭水化物食に対する嗜好性が亢進すると考えられる。そこで、高蔗糖食と高脂肪食を自由に選択できるケージを作製し、これを用いてどちらの食餌をマウスが選択、摂取するかを調べた。その結果、予想した通り、対照群は高脂肪食を選択的に摂取したのに対して、活性型 AMPK を発現させたマウスは高蔗糖食をより多く摂取した。高脂肪食の摂取量は低下した。総摂取カロリーは両群で差が無かった。

(4) 活性型 AMPK を発現させたマウスの室傍核では、脂肪酸酸化関連遺伝子の発現が有意に亢進しており、ex vivo での脂肪酸酸化も亢進していた。この作用は、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化を阻害する etomoxir によって完全に抑制された。

(5) 高脂肪食を与え肥満させたマウスと遺伝的肥満マウスである KKAy マウスの食餌嗜好性を調べた。その結果、両方の肥満マウスとも高脂肪食に対する嗜好性が亢進した。

また、室傍核の AMPK 活性、脂肪酸酸化も低下していた。この実験結果から、肥満動物では、室傍核の AMPK 及び脂肪酸酸化調節機構に異常を来たしてこれらの活性が低下し、その結果、高脂肪食に対する嗜好性が亢進することが示唆される。

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)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T. Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 388-392, 2008. 査読有り
- ② Minokoshi Y, Shiuchi T, Lee S, Suzuki A, Okamoto S. Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition* 24: 786-790, 2008. 査読有り
- ③ Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y. Regulation of pancreatic β cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322: 1250-1254, 2008. 査読有り
- ④ 岡本土毅、箕越靖彦、AMPK と摂食調節
最新医学 63:2021-2028, 2008. 査読無し
- ⑤ Tanaka T, Masuzaki H, Shintaro S, Ebihara K, Shiuchi T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Yamamoto H, Hayashi T, Hosoda K, Minokoshi Y, Nakao K. Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism* 5: 395-402, 2007. 査読有り
- ⑥ Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y. Leptin stimulates fatty acid oxidation and PPAR α gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the $\alpha 2$ form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 27: 4317-4327, 2007. 査読有り
- ⑦ Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O. An increase in murine skeletal muscle PGC-1 α mRNA in response to exercise is mediated by β -adrenergic receptor activation. *Endocrinology* 148: 3441-3448, 2007. 査読有り
- ⑧ Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metabolism* 6: 55-68, 2007. 査読有り
- ⑨ Fujimoto W*, Shiuchi T*, Miki T*, Minokoshi Y, Takahashi Y, Takeuchi A, Kimura K, Saito M, Iwanaga T, Seino S. Dmbx1 is essential in AgRP action. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15514-15519 (*Contributed equally), 2007. 査読有り
- ⑩ Arai N, Masuzaki H, Tanaka T, Ishii T, Yasue S, Kobayashi N, Tomita T, Noguchi M, Kusakabe T, Tanioka H, Fujikura J, Ebihara K, Hirata M, Hosoda K, Hayashi T, Sawai H, Minokoshi Y, Nakao K. Ceramide and AMP-activated protein kinase are two novel regulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity in cultured preadipocytes. *Endocrinology* 148: 5268-5277, 2007. 査読有り
- ⑪ Nara N, Nakayama Y, Okamoto S, Tamura H, Kiyono M, Muraoka M, Tanaka K, Taya C, Shitara H, Ishii R, Yonekawa H, Minokoshi Y, Hara T. Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 282: 30794-30803, 2007. 査読有り
- ⑫ 鈴木 敦、箕越靖彦、AMP キナーゼによるエネルギー代謝調節作用 特集 メタボリックシンドローム時代の糖尿病研究の最前線、*医学のあゆみ*、220: 1099-1104, 2007. 査読無し
- ⑬ 鈴木 敦、箕越靖彦、AMP キナーゼとエネルギー代謝調節 解明が進むメタボリックシンドローム、*実験医学* 25: 2298-2305, 2007. 査読無し
- ⑭ 箕越靖彦、メタボリックシンドロームはなぜ起こる、*総研大ジャーナル* 12: 40-45, 2007. 査読無し
- ⑮ 箕越靖彦、摂食代謝調節と肥満—レプチンによるエネルギー代謝調節機構とその異常— *Adiposcience* 4: 261-269, 2007.

査読無し

[学会発表] (計 21 件)

- ① 箕越靖彦、AMP キナーゼによる代謝調節作用、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、2008、神戸 (12 月 9-12 日)
- ② 岡本土毅、食餌嗜好性を調節する視床下部室傍核 AMP キナーゼの病態生理学的意義、第 29 回日本肥満学会、2008、大分 (10 月 17、18 日)
- ③ 箕越靖彦、視床下部における摂食・代謝調節作用を目指して、第 29 回日本肥満学会、シンポジウム、2008、大分 (10 月 17、18 日)
- ④ 箕越靖彦、骨格筋の糖・脂質代謝に及ぼす視床下部の調節作用、千里ライフサイエンスセミナー「中枢神経と末梢臓器を結ぶエネルギー代謝調節のクロストーク」、招待講演、2008、大阪 (10 月 3 日)
- ⑤ Yasuhiko Minokoshi, Role of hypothalamic AMPK in food intake regulation. The 4th Scientific Meeting of the Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group, invited, 2008, Kobe (8 月 23-24 日)
- ⑥ 箕越靖彦、食餌嗜好性に及ぼす視床下部室傍核 AMP キナーゼの調節作用、第 31 回日本神経科学大会、シンポジウム、2008、東京 (7 月 9-11 日)
- ⑦ 岡本土毅、食餌嗜好性に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用、第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム、2008、東京 (5 月 22-24 日)
- ⑧ Yasuhiko Minokoshi, Regulatory role of AMP-kinase in the paraventricular hypothalamus in food preference and calorie intake. Seoul Symposium on Obesity & Diabetes (invited), 2008, Seoul, Korea (4 月 12 日).
- ⑨ 箕越靖彦、食餌嗜好性に及ぼす視床下部 AMP キナーゼの調節作用、第一回生活習慣病の転写・シグナルネットワーク研究会、2008、鎌倉 (3 月 22 日)
- ⑩ Yasuhiko Minokoshi, Role of hypothalamic AMPK in food intake regulation. 9th NPY International NPY Meeting, invited, 2008, Okinawa (3 月 16-20 日)
- ⑪ Yasuhiko Minokoshi, Activation of AMP kinase in the paraventricular hypothalamus increases the preference for high carbohydrate diet in mice. Keystone Symposia, Neuronal mechanisms controlling food intake, glucose metabolism and body weight, 2008, Banff, Alberta, Canada (2 月 19-24 日)
- ⑫ 箕越靖彦、AMP キナーゼによるエネルギー代謝調節機構、第 22 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、特別講演、2008、東京 (2 月 8-9 日)
- ⑬ 箕越靖彦、レプチン-AMPK システムによる骨格筋での脂肪酸酸化促進作用、第 28 回日本肥満学会、シンポジウム、2007、東京 (10 月 19、20 日)
- ⑭ Yasuhiko Minokoshi, Hypothalamic regulation of energy metabolism: Lessons from leptin-AMPK system. 5th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience, Plenary lecture, 2007, Kyoto (8 月 5-8 日)
- ⑮ Shiki Okamoto, Activation of AMP kinase in the paraventricular hypothalamus increases the preference for high carbohydrate diet in mice. The 25th JES Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism, invited, 2007, Aawaji (7 月 17、18 日)
- ⑯ Shiki Okamoto, Activation of AMP kinase in the paraventricular hypothalamus increases the preference for high carbohydrate diet in mice. 第 67 回アメリカ糖尿病学会、2007、Chicago, Illinois, USA (6 月 22-26 日)
- ⑰ 箕越靖彦、視床下部 AMP キナーゼによる摂食行動の調節作用、第 80 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム、2007、東京 (6 月 14-16 日)
- ⑱ 箕越靖彦、生体エネルギー代謝に及ぼす AMP キナーゼの中核・末梢性調節作用、第 108 回内分泌セミナー 招待講演、2007、東京 (6 月 1 日)
- ⑲ 箕越靖彦 AMP キナーゼによる生体エネルギー代謝調節機構 第 61 回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム、2007、京都 (5 月 17-20 日)
- ⑳ 箕越靖彦、視床下部-交感神経系による代

謝調節作用-レプチンによる代謝調節作用を中心に、第4回GPCR研究会、2007、東京（5月11・12日）

- ② Yasuhiko Minokoshi. Activation of AMP kinase in the paraventricular hypothalamus increases the preference for high carbohydrate diet in mice. Okazaki Symposium on Obesity & Diabetes, 2007, Okazaki (4月14、15日)

[図書] (計2件)

- ① 箕越靖彦、アディポネクチンのシグナル伝達—AMPキナーゼ、pp.76-87、アディポネクチンとその受容体、抗生活習慣病ホルモンの全貌（門脇孝 他 編）フジメディカル出版、2008. 査読無し
- ② 箕越靖彦、エネルギー燃焼メカニズム、pp.470-474、カラー版 糖尿病学 基礎と臨床（門脇孝 他 編）、西村書店、2007. 査読無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕越 靖彦 (MINOKOSHI YASUHIKO)
生理学研究所・発達生理学研究室・教授
研究者番号：10200099

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡本 士毅 (OKAMOTO SHIKI)
生理学研究所・発達生理学研究室・助教
研究者番号：40342919

志内 哲也 (SHIUCHI TETSUYA)
生理学研究所・発達生理学研究室・助教
研究者番号：70372729