

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590355

研究課題名（和文） AMPD2 欠損マウスを用いた肝ヌクレオチド調節による脂質代謝制御の検討

研究課題名（英文） Regulation of lipid metabolism through nucleotide levels in liver by utilizing AMPD2 KO mice

研究代表者

森崎 裕子（MORISAKI HIROKO）

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生物学部・室長

研究者番号：40311451

研究成果の概要（和文）：ヌクレオチド代謝は、既知の重要な機能に加えて調節される AMP は AMP 活性化キナーゼ（AMPK）を介して脂質代謝制御の要であることから注目されている。本研究では、独自に樹立した AMPD2 欠損マウスを詳細に解析したところ、AMPD2 欠損により全身の脂肪蓄積量が増加し、この変化は肝臓アデニンヌクレオチドの変化と AMPK のリン酸化状態亢進に関係し、AMPD2 遺伝子機能と脂質代謝との関係が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Nucleotide metabolism has an important role for lipid metabolism through AMP-activated protein kinase (AMPK) in addition to several known functions. In this study, it was found that the systemic adipose deposition was changed by AMPD2 deficiency. This change was shown to be correlated to changes in the levels of hepatic adenine nucleotide and the phosphorylated condition of AMP. Therefore, the relationship between AMPD2 function and lipid metabolism was newly identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：代謝異常学，アデニンヌクレオチド，肝臓，AMP，AMP キナーゼ，脂質代謝，AMPD

1. 研究開始当初の背景

AMPD は AMP を脱アミノ化する酵素としてアデニンヌクレオチド調節に重要な働きをしており、3種の遺伝子（AMPD1, AMPD2, AMPD3）にコードされており、この遺伝子群は細胞 AMP レベル調節に重要な役割を果たす。エネルギー代謝や糖脂質代謝に重要な役割を果たす肝臓はこれらのうち AMPD2 遺伝子を発現する。

近年の研究進展により、ヌクレオチド代

謝については、DNA・RNA 合成や ATP に関連したエネルギー維持機能のみならず、AMP 活性化キナーゼ活性の調節につながる細胞内 AMP を調節する役割も重要であるとして注目されるようになった。すでに、AMP 活性化キナーゼは全身の代謝調節に深く関わることが知られ、肝臓でも重要な機能を果たすが、その調節機構やヌクレオチド代謝との関係については十分に明らかになっていないと難しい。

一方、肝臓ヌクレオチド調節では、AMPD2 遺伝子が AMP 代謝を中心に大きな役割を果たすと考えられるが、実際に、AMPD2 遺伝子がどのように細胞内ヌクレオチドレベルを調節し、如何に AMP 量の調節を介して Adenosine 産生に影響するのか、他の代謝系にどのような影響を与えるのかについて詳細な検討はなく、AMPD2 は AMPD1 や AMPD3 のようにヒトでの酵素欠損例の報告がなく、生体での AMPD2 遺伝子の機能の理解は遅れている。従って、肝臓での主要代謝系である脂質代謝について AMPD2 が関係するのかなどについても不明であった。

こうした状況のもと、申請者の研究グループでは AMPD 遺伝子群の解析をすすめ、組織特異的に発現する複数の遺伝子 (AMPD1, 2, 3) の単離同定、さらに、遺伝子ターゲティングによる遺伝子機能欠損マウスの作製に成功し、その解析を開始した。そのなか、AMPD2 遺伝子は、肝臓のみならず骨格筋を除く全身の諸組織に発現するが、予備的検討では、AMPD2 欠損マウスは肝臓の AMP 代謝の変化がみられるとともに、内臓脂肪など全身の脂肪蓄積の低下が観察された。

2. 研究の目的

以上の研究背景と基礎的検討事項を踏まえ、本研究では、AMPD2 欠損マウスの解析により、AMPD2 遺伝子の機能、とくに肝臓ヌクレオチド調節による脂質代謝制御に焦点をあて、調節機構を明らかにすることを目的とする。研究成果は肥満・糖尿病など代謝異常症の治療などの応用につなげたいと考える。とくに、AMPD2 遺伝子の機能、なかでも肝臓でのヌクレオチド調節と脂質代謝制御との関係について、AMPD2 欠損マウスを用いて検討するが、とりわけ、AMPD2 欠損マウス肝臓の各種ヌクレオチド・ヌクレオシド量の変化、AMP 活性化キナーゼタンパク量・リン酸化タンパク量・活性その他脂質代謝制御因子の変化の検討を行い、同時に血中各種脂質や脂質代謝制御因子の変化を検討するとともに、脂質代謝制御に関係するシグナルパスウェイを解析することにより、肝臓ヌクレオチド調節による脂質代謝制御を明らかにすることを目的に研究を行った。

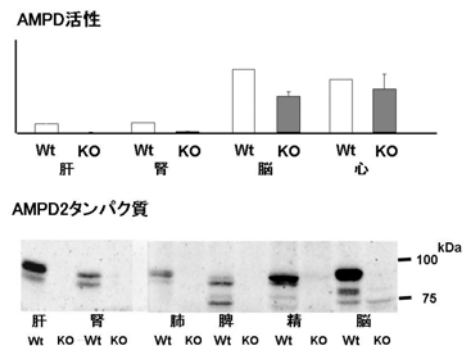
3. 研究の方法

AMPD2 欠損マウスと野生型マウスを肝臓、腎臓を中心に組織形態学的に検討を行う。さらに、初代培養細胞を用いた肝細胞の薬剤刺激前後の変化についても比較検討を行った。また、AMPD2 欠損マウス・野生型マウスのヌクレオチド・ヌクレオシド (AMP、IMP、ATP、ATP、Adenosine、GTP を含む)

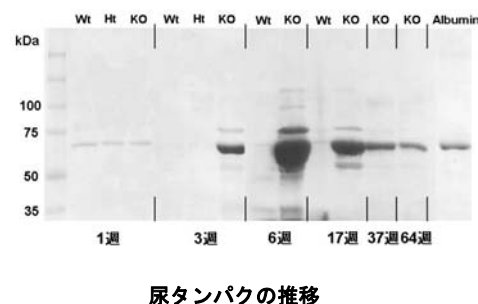
レベルを測定し比較検討した。また、食餌変化による AMPD2 欠損マウスの代謝状態を検討し AMPD2 遺伝子機能と代謝との関係を検討した。さらに、AMPD2 欠損マウスで発現が変化する遺伝子を探索し、ヌクレオチド代謝の変化により制御される遺伝子の探索を行った。AMPD2 遺伝子機能に関係が想定される AMPK や PPAR ファミリーなどとの相互関係についても検討を行った。腎臓については、AMPD2 欠損マウスにて検討前に予想されていなかったタンパク尿が観察されたため、AMPD2 欠損により惹起される腎機能障害原因についての検討を行った。

4. 研究成果

本研究で AMPD2 欠損ホモマウスの各組織の AMPD 活性を検討したところ、肝臓、腎臓で著明に減少し、脳でやや減少をみたが、心臓では野生型マウスと明らかな違いを認めなかった。また、ウエスタンブロット解析により、AMPD2 タンパク質については AMPD2 欠損ホモマウスではいずれの組織でも検出されないことを確認した。

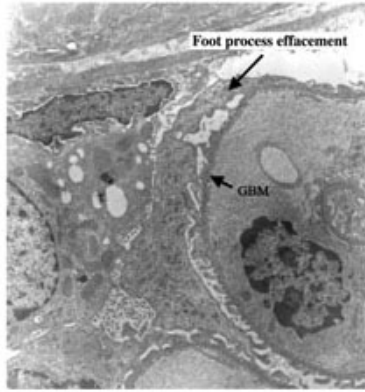


一方、AMPD2 欠損はマウスの生存に大きな影響を与えなかったが、個体の詳細な検討により、AMPD2 欠損ホモマウスでは生後3週後よりタンパク尿を認め、タンパク尿は6週齢に最大となり、以後次第に減少することが明らかとなった。



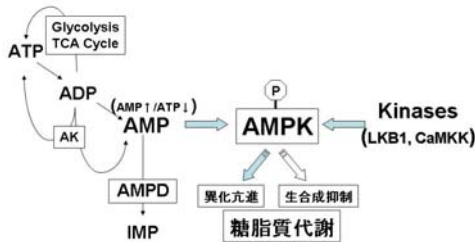
しかし、AMPD2 欠損マウスでは血清尿素窒素

を含めて血液生化学検査に著変はなく、光学顕微鏡による検討では、組織学的な変化は生後1年半を経ても明らかではなかった。電子顕微鏡による詳細な検討により、糸球体上皮細胞の足突起の消失が6週以降観察された。なお、AMPD2欠損ヘテロマウスでは以上の所見はいずれも観察されなかった。



AMPD2欠損マウス糸球体の足突起消失

さらに、C57BL6系統と交配を繰り返した後に、AMPD2欠損ホモマウスを野生型マウスと比較検討したところ、AMPD2欠損ホモマウスは雌雄とも野生型マウスに比較して体重増加が少ないことが明らかとなった。体重の変化がエネルギー摂取量の変化であるかどうかを確認するために摂餌量の比較を行ったが、野生型マウスと差を認めていない。AMPD2欠損マウスの細胞内ヌクレオチドの検討によりAMPの蓄積が示され、AMPD欠損が細胞内AMPの変化によるAMPKの機能を通して代謝の変化をもたらしていることが考えられ、現在、AMPKのリン酸化状態、シグナル下流の変化を含めて詳細な検討を進めている。



AMPDとAMPKを介した糖脂質代謝との関係

AMPD欠損症はヒトではAMPD1遺伝子の変異による筋AMPD欠損症とAMPD3遺伝子の変異による赤血球AMPD欠損症が知られているが、残る一つの遺伝子AMPD2の変異の報告はないことから、今回の検討により、骨格筋を除く各組織に発現するAMPD2(肝型AMPD)が生体においてどのように機能しているかについて貴重な情報が得られ、今後、AMPD2の腎機能・蛋白尿との関わりや糖脂質代謝制御との関係についてさらに検討することにより重

要な情報が得られることが期待される。

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2件)

- ① Toyama K, Morisaki H, Cheng J, Kawachi H, Shimizu F, Ikawa M, Okabe M, Morisaki T: Proteinuria in AMPD2-deficient mice. *Genes Cells* 17:28-38, 2012.
DOI: 0.1111/j.1365-2443.2011.01568.x
- ② Hosoyamada M, Takiue Y, Morisaki H, Cheng J, Ikawa M, Okabe M, Morisaki T, Ichida K, Hosoya T, Shibasaki T: Establishment and analysis of SLC22A12 (URAT1) knockout mouse. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 29:314-320, 2010. DOI:10.1080/15257771003738634

[学会発表] (計7件)

- ① 遠山桂子, 森崎裕子, 程 継東, 森崎隆幸: AMPD2 遺伝子と腎糸球体機能. 第45回日本痛風・核酸代謝学会総会, 奈良, 2012/2/16-17
- ② Morisaki T, Cheng J, Toyama K, Ikawa M, Okabe M, Morisaki H: Murine AMPD3 deficiency: Elevation of erythrocyte ATP does not improve anemia due to PK deficiency. 14th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Tokyo, 2011/2/18-21.
- ③ Morisaki T, Cheng J, Toyama T, Hirase T, Ikawa M, Okabe M, Morisaki H: AMPD2 plays an important role for regulation of lipid and glucose metabolism. 60th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Washington, DC, 2010/11/2-6
- ④ 森崎隆幸, 新谷拓也, 程 継東, 森崎裕子: 骨格筋 AMPD 欠損モデルマウスの樹立とその核酸代謝変化と糖脂質代謝変化. 第42回日本痛風・核酸代謝学会総会 大阪 2010/2/25-26
- ⑤ 新谷拓也, 森崎裕子, 程 継東, 杉本直美, 森崎隆幸: 骨格筋 AMPD 欠損モデルマウスの樹立と代謝変化・シグナル変化の検討. 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009/12/9-12
- ⑥ T. Morisaki, J. Cheng, K. Toyama, M. Ikawa, M. Okabe, H. Morisaki: AMPD3 Deficient Mice Exhibit Increased Erythrocyte ATP but Do Not Improve

Anemia due to PK Deficiency. 59th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Honolulu, 2009/10/20-24

- ⑦ Takayuki Morisaki, Jidong Cheng, Naomi Sugimoto, Atsushi Dohi, Erika Kimura, Takuya Shintani, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, Hiroko Morisaki: Establishment of murine model for myoadenylate deaminase deficiency. 13th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (Stockholm, Sweden) 2009/6/21-24

〔図書〕（計2件）

- ① 森崎隆幸, 程継東, 森崎裕子: アデニンヌクレオチド代謝と心血管疾患. 循環器病研究の進歩 XXXII:54-64, 2011
② 森崎隆幸, 森崎裕子: 尿酸の代謝経路. 総合臨床 59:184-189, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 裕子 (MORISAKI HIROKO)
独立行政法人循環器病研究センター・
分子生物学部・室長
研究者番号：40311451

(2) 研究分担者

森崎 隆幸 (MORISAKI TAKAYUKI)
独立行政法人循環器病研究センター・
分子生物学部・部長
研究者番号：30174410

(3) 連携研究者

なし