

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：21591167

研究課題名（和文） 骨格筋のプリン代謝に着目した糖脂質代謝制御機構の解明とその応用

研究課題名（英文） Regulation of carbohydrate and lipid metabolism in regard to purine metabolism in skeletal muscle

研究代表者

森崎 隆幸（MORISAKI TAKAYUKI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生物学部・部長

研究者番号：30174410

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで独自に開発した AMPD の骨格筋欠損マウスを利用して、AMPD1 欠損マウスで、ヌクレオチドレベルの変化と AMP 活性化キナーゼ（AMPK）を含め下流の標的因子のリン酸化状態の変化を明らかにし、アデニンヌクレオチド代謝と糖代謝脂質代謝の変化、とくにインスリン感受性との関係を明らかにし、また、AMPD 欠損と腎糸球体機能との関連についても検討を進めた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed changes in nucleotide levels, phosphorylated AMPK and other relating molecules in AMPD1 knock-out (muscle AMPD deficient) mice, indicating the close relationship between adenine nucleotide and carbohydrate/lipid metabolism. Also, we studied the relationship between AMPD deficiency and renal glomerular function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：プリン代謝，骨格筋，糖代謝，脂質代謝，AMP，AMPK

1. 研究開始当初の背景

骨格筋はヒトを含む脊椎動物で最大の容積を占める臓器であり、個体としての運動能力を付与するのみならず、糖代謝・脂質代謝を通して個体のエネルギー代謝の制御にも大きな影響を与える。メタボリック・シンドローム、肥満、糖尿病といった代謝異常状態に対して、運動療法による骨格筋の代謝状態の賦活化が効果のあることはよく知られている。プリン代謝、ことにプリンヌクレオチドサイクルに

てAMP分解系で重要な役割を果たすAMPdeaminase (AMPD) はATPレベルの調節を介して骨格筋のエネルギー代謝に重要な役割を果たし、骨格筋とりわけ速筋（白筋）で活性が高い。ヒトでは代謝性ミオパチーとAMPD筋型アインザイム (AMPD1) 機能欠損との関係が知られており、申請者らは世界で先駆けて、AMPD1につき遺伝子単離や遺伝子変異を明らかにし、AMPD1 遺伝子変異は酵素異常症のなかで最も頻度が高いことを明らかにしてきた。

また、骨格筋遅筋（赤筋）ではAMPD1に加えAMPD3も少量発現することを含め、他の臓器細胞で発現する各AMPD遺伝子（AMPD1, AMPD2, AMPD3）の解析を進めてきた。一方、AMPD1変異を持つ患者群は心不全・虚血性心疾患の予後が良好であることや、AMPD1遺伝子多型がインスリンクリアランスに関係するとの報告があり、AMPD1はATP調節のみならず広範囲な機能を有することが考えられるが、十分な理解は進んでいないので、申請者らは独自に遺伝子ノックアウトの手法によりAMPD欠損マウスを樹立した。

近年の研究により、AMP活性化プロテインキナーゼ（AMPK）が、細胞内エネルギー状態のセンサーとして糖脂質代謝を調節していることが明らかになり、骨格筋でのAMPKが全身の代謝状態を調節するとして注目されている。AMPKは細胞内AMPレベルを感知して自身の活性化により、標的分子のリン酸化を通して、糖脂質取り込みや異化合成酵素の活性調節を行うのであるから、細胞内のAMP分解を触媒するAMPDがAMPKの機能を介して糖脂質代謝調節に関係することが推察されるが、検証されていない。

2. 研究の目的

本研究では、独自に樹立し解析を進めてきたAMPD欠損マウスを利用して、先にのべたAMPKを介したAMPDと糖脂質代謝との関係に着目し、骨格筋でのプリン体ヌクレオチド・ヌクレオシドがどのように糖脂質代謝を調節するのかにつき、AMPKとその下流の因子の変化やその他の骨格筋を出発点とする糖脂質代謝制御因子の変化を検討し、プリン代謝と糖脂質代謝の関係について理解を深め、新規に制御ネットワークの関連性を明らかにすることを目的に実施した。

3. 研究の方法

（1）AMPD1欠損マウスの筋ヌクレオチド・ヌクレオシドの検討と運動機能の検討

既に独自に樹立したAMPD1欠損マウスについて、各種骨格筋の筋線維型の変化の有無、AMPD遺伝子発現ならびにAMPD活性の比較検討、AMP、アデノシンを含む各種ヌクレオチド・ヌクレオシドを検討し、さらに運動能力と筋収縮能の評価を行い、筋機能とヌクレオチド代謝の関係を比較検討した。

（2）非骨格筋でのAMPD欠損モデル（AMPD2欠損あるいはAMPD3欠損マウス）の機能解析
AMPD1欠損マウスとは対照的に骨格筋でAMPD活性の変化がほとんどみられないAMPD2欠損あるいはAMPD3欠損マウスを独自に樹立した。そこで、これらマウスについて、表現系の詳細な検討を行い、AMPDの生体での機能理解を

図る。同時に、各組織のヌクレオチドヌクレオシドの比較検討を行った。

（3）各AMPD欠損マウスの糖代謝・脂質代謝の検討

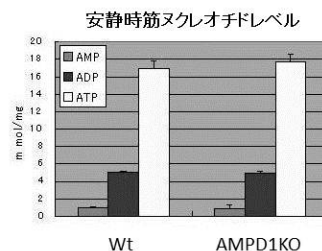
各AMPD欠損マウスについて骨格筋他の糖代謝・脂質代謝の変化を検討し、また、AMP活性化キナーゼ（AMPK）のタンパク量、リン酸化状態、活性についてAMPK抗体、リン酸化AMPK抗体などにより評価を行った。

（4）骨格筋全AMPD欠損マウスの樹立

AMPD1欠損マウスとAMPD3欠損マウスを交配させ筋肉における全AMPD欠損マウスを樹立し、骨格筋の形態的、機能的な変化の検討を進めた。

4. 研究成果

本研究では、独自に樹立したAMPD1欠損マウスについて、各種骨格筋の筋線維型の変化の有無、AMPD遺伝子発現ならびにAMPD活性の比較検討、AMP、アデノシンを含む各種ヌクレオチド・ヌクレオシドを検討し、さらに運動能力と筋収縮能の評価を行い、筋機能とヌクレオチド代謝の関係を比較検討した。AMPD1欠損ホモマウスでは、骨格筋AMPDはSoleus筋においては残存活性をみとめるものの、Gastrocnemius筋では残存活性はほとんどなく、一方、筋以外の組織でのAMPD活性は野生型とほぼ同レベルであった。組織学的検索では、AMPD1欠損ホモマウスでもとくに筋組織の変化は明らかではなく、運動能力についての比較検討でもAMPD1欠損ホモマウスは野生型と大きな違いを見いださなかった。体重、体脂肪量などについてもAMPD1欠損ホモマウスは野生型と差を認めなかった。



筋ヌクレオチドの検討では、安静時単離骨格筋のヌクレオチドレベルはAMPD1欠損ホモマウスは野生型と大きな差を認めなかったが、単離後電気刺激により収縮させた後に比較すると、AMPD1欠損ホモマウスではATPの減少とAMPの増加が野生型に比して大きな変化を示した。同時に細胞内AMPKのリン酸化レベルの増加が観察された。なお、個体レベルで運動前後での筋ヌクレオチドを検討したが、好気条件では野生型との差は見いだされなかった。ただし、動脈結紮による虚血下での運動前後で比較したところ、AMPおよびアデノシンの増加が有意に観察された。

なお、AMPD1欠損マウスとは対照的に骨格筋でAMPD活性の変化がほとんどみられないAMPD2欠損あるいはAMPD3欠損マウスを独自に樹立し、骨格筋の検討を行ったが、変化はほとんどみられなかった。

次いで、AMPD1 欠損マウスと AMPD3 欠損マウスを交配させ筋肉における全 AMPD 欠損マウスの樹立を行ったが、組織学的には骨格筋の大きな形態的な変化は認めなかった。

以上の成果をうけ、現在、それぞれの AMPD 欠損個体での各種骨格筋の AMP 活性化キナーゼ (AMPK) のタンパク量、リン酸化状態、活性、さらに下流ターゲットタンパクのリン酸化状態、下流に位置する遺伝子発現状態の比較検討を実施している。現在までのところ、これら各種 AMPD 欠損マウスの筋機能の変化は明らかでないが、虚血下での AMPK リン酸化の変化を認めることから、糖代謝脂質代謝の変化、肥満誘導との関係の詳細な検討の結果はヌクレオチド代謝と糖脂質代謝との関係について新たな知見につながると考えられた。

また、遺伝子欠損マウス解析の過程で、AMPD2 欠損と腎系球体機能との関連、AMPD3 欠損での赤血球 ATP 上昇が明らかになり、ヌクレオチド代謝の生体における役割の新たな側面が見いだされた。

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 遺伝子と腎系球体機能. 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 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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