

氏 名	とよ だ た ろう 豊 田 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1555 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on AMP independent activation of the 5'AMP - activated protein kinase involved in muscle contraction - induced glucose transport (筋収縮が引き起こす糖輸送促進に関わる AMP キナーゼの AMP 非依存的な活性化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伏 木 亨 教 授 井 上 國 世 教 授 河 田 照 雄

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋は糖を消費する最大の器官であり、運動時の骨格筋における糖吸収促進機構の解明と糖尿病など生活習慣病の病態改善や予防への応用が期待されている。収縮した骨格筋では糖輸送が促進し、これを調節する分子として 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) が注目されている。

AMPK は AMP によって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、 α , β , γ の 3 個のサブユニットから構成されている。骨格筋では α サブユニットが異なる 2 種類 ($\alpha 1$, $\alpha 2$) の AMPK が発現している。運動時には筋細胞内の ATP が消費されるため、これに応答して AMPK が活性化すると考えられてきた。しかし、AMP の増大が認められない弱い運動でも糖輸送は促進するという生理学的な結果と矛盾していた。また、薬理的な検討から、AMPK $\alpha 1$ と AMPK $\alpha 2$ は異なる機構で活性調節されていることが示唆されてきた。本論文では、AMPK $\alpha 1$ が AMPK $\alpha 2$ に比べて AMP 依存性が低いことに注目し、AMPK $\alpha 1$ を優先的に活性化する条件を検討した結果、低強度の運動が AMP 非依存的な AMPK 活性化を介して骨格筋糖輸送を促進することを明らかにした。その内容は次のように要約できる。

1. 酸化ストレスによる AMPK $\alpha 1$ の選択的活性化の発見

H₂O₂ をラット単離骨格筋に作用させると糖輸送が促進することは古くから知られていたがその機序は不明であった。本論文では単離したラットの epitrochlearis 筋を 3mM H₂O₂ で刺激することによって AMPK $\alpha 1$ の活性が増大することを明らかにした。AMPK $\alpha 2$ の活性に変化はなかった。H₂O₂ 刺激による AMPK $\alpha 1$ 活性化は抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) 処理によって抑制された。骨格筋への糖輸送速度を測定したところ、H₂O₂ 刺激による AMPK $\alpha 1$ の活性化に伴って骨格筋への糖輸送が促進され、抗酸化剤 NAC によってこの糖輸送促進が抑制された。AMPK $\alpha 1$ のみを活性化する 1mM H₂O₂ 刺激と 3mM H₂O₂ 刺激は筋肉組織の AMP 濃度を増大させなかった。一方、AMPK $\alpha 1$ と AMPK $\alpha 2$ をともに活性化する強い電気刺激による筋収縮は組織の AMP 濃度を増大させた。

2. 弱い筋収縮時の AMPK $\alpha 1$ の活性化は AMP に依存しないことの検討

電気刺激による筋収縮は AMPK を活性化する刺激として広く受け入れられているが、100Hz のような極端に強い電気収縮は AMPK $\alpha 1$ と AMPK $\alpha 2$ を短時間に一度に活性化するため、AMPK $\alpha 1$ と AMPK $\alpha 2$ の活性化の動態を詳細に追うことができない。

そこで単離したラットの epitrochlearis 筋を持続運動に匹敵する 1Hz 程度の弱い電気刺激にて刺激したところ、AMPK $\alpha 1$ のみが活性化した。AMPK $\alpha 2$ の活性化には 5Hz 以上の強度の刺激が必要であった。AMPK $\alpha 1$ を活性化させた 1Hz 程度の弱い筋収縮は組織中の AMP 濃度を全く変化させなかった。1Hz 程度の弱い筋収縮による AMPK $\alpha 1$ の選択的な活性化は細胞内 AMP 濃度に依存しないメカニズムを介すると考えられる。一方、5Hz 以上の筋収縮が組織内 AMP 濃度を増大させたことから、AMPK $\alpha 2$ の活性化は組織内 AMP 濃度の増大に依存する従来型の AMPK 活性化機序によるものと

考えられた。

3. これまでの研究との矛盾点の検討

本論文では筋収縮強度の増大に応じてまず AMPK α 1 が、続いて AMPK α 2 が活性化を受けることを示した。既報では弱い運動による AMPK の活性化は観察されておらず、運動強度の増大に伴って AMPK α 2 が、さらに激しい運動では AMPK α 1 が活性化すると述べられてきた。また、従来の研究では弱い運動時の糖吸収の増大が AMPK の活性化で説明できなかった。

本論文は単離骨格筋の処理方法やインキュベート方法による AMPK 活性化の違いを既報と比較しながら詳細に検討した。その結果、AMPK α 1 は単離直後に一過性の非生理的な活性化を受けることを明らかにした。高進した AMPK α 1 活性はクレブス緩衝液中で60分間インキュベーションすることによって一定の値まで低下し、その後は安定することを見いだした。これまでの研究は単離直後の筋肉を用いていたため、非生理的に高進した AMPK α 1 活性に隠れて生理的な活性の増大が観察できなかったことを指摘した。さらに諸条件を検討し、本論文で採用した筋肉試料単離後60分以上のインキュベートによる生理的状态の回復が、弱い電気刺激による AMPK α 1 の選択的な活性化を検出するために必要であったことを確認した。

論文審査の結果の要旨

運動時の骨格筋への糖吸収機構の解明は糖尿病など生活習慣病の病態改善や予防につながる重要な課題である。骨格筋の筋収縮によって糖の吸収促進が生じる機構には 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) の関与が注目されてきた。本論文は、持久運動のような弱い運動が AMP に依存せずに AMPK α 1 の活性化を介して骨格筋糖輸送を促進する新規の機構を明らかにした。評価できる点は次のように要約できる。

1. 単離した筋肉を用いた実験で、組織内の AMP 濃度が増大しない条件で酸化ストレスが引き金となって骨格筋 AMPK α 1 が選択的に活性化すること、さらにこの活性化は抗酸化剤処理で抑制されることを明らかにした。
2. 単離した筋肉を種々の条件で電気刺激し、穏やかな持久運動に相当する弱い筋収縮では筋肉組織内の AMP 濃度の増大が起こらないことを示すとともに、この条件で AMPK α 1 が活性化することを明らかにした。筋収縮の強さに応じて、まず AMPK α 1 の活性化が起こり、運動の強さが増すと AMPK α 2 の活性化が起こるという順序を示した。また、弱い筋収縮による筋肉への糖輸送促進に、AMPK α 1 の活性化が関与することを明らかにした。
3. 一般的に用いられてきた骨格筋の単離操作が一過性の非生理的な AMPK α 1 活性化を起こすことを明らかにした。これまで AMPK α 1 は常に活性化状態にあり、弱い運動ではそれ以上の活性の増大は起こらないとされてきたが、本論文では初期の非生理的な活性化を抑制することによって弱い運動による AMPK α 1 活性化を観察することに成功した。

以上のように本論文は運動時の筋肉への糖輸送に関わる新規の調節機構を明らかにした。その成果は糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防に資するものであり、運動生理学、栄養化学、酵素化学、食品健康科学、予防医学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 18年 2月 16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。