

黨 和夫論文内容の要旨

主論文

Down-regulation of AMP-activated protein kinase by calorie restriction in rat liver

カロリー制限はラット肝臓の AMP-activated protein kinase を抑制する

黨 和夫、山座 治義、小松 利光、林田 隆広、林 洋子、
遠山 啓亮、千葉 卓哉、樋上 賀一、下川 功

Experimental Gerontology , article in press, 2007

長崎大学大学院医学研究科 病理系専攻

指導教授：下川 功

緒言

摂取カロリーの中等度の抑制は、calorie restriction (以下 CR) と呼ばれ、自由摂食(以下 AL)と比較し生理学的老化や病気のプロセスを遅らせ寿命を延長する。CR 動物は、摂取エネルギー源が枯渇する状況(Fasted phase)ではタンパク質や脂質を代謝し、食餌摂取後、直ちに炭水化物を主なエネルギー源として代謝する (Fed phase) という、食物の利用状況に応じた metabolic shift を引き起こす。CR 動物において metabolic shift を迅速に誘導する機序は、進化生物学的に保存されていると考えられ、老化や寿命延長に寄与する遺伝子発現の変化を刺激する可能性が示唆されている。

Metabolic shift と老化を同時に制御する候補因子として、AMP-activated protein kinase (以下 AMPK) に着目した。AMPK は、長期的にエネルギー代謝を制御し、同時に様々な生理機能を制御していることが報告されている。AMPK の活性化は、筋肉での脂肪酸酸化やグルコース取り込みを刺激する一方、肝と脂肪組織での脂肪酸合成を抑制する。

今回、AMPK α の活性化型 (リン酸化、p) p-AMPK と AMPK の下流の酵素である Acetyl CoA-carboxylase (以下 ACC) をラット肝臓、骨格筋において解析した。GH-IGF-1 経路が抑制されている transgenic dwarf (以下 Tg) ラットは野生型ラットよりも長寿で、30%の CR が行われた野生型ラットの表現型 と類似している。よって、AMPK に対する GH-IGF-1 系抑制の効果についても検討した。

材料と方法

オスの Wistar ラットと Tg ラットを生後 6 週齢より、AL 群の 70% の CR-LPF diet を 12h の明暗サイクル下で与えた。CR は隔日給餌で行うため、摂食・絶食サイクル (fed-fasted cycle) を繰り返す。短期的な摂食の変動による影響を考慮し、6 カ月齢で断頭屠殺する際、CR-fed (満腹時屠殺) と CR-fasted (空腹時屠殺) に分けた。AL 群の短期的絶食の効果を評価するため、6 カ月齢のラットを一晩絶食後 (overnight fasting) に屠殺し AL-fasted とした。体幹血液から血清を分離し-30°Cで保存した。組織は碎片化し液体窒素で凍結後-80°Cで保存した。①血液生化学所見：各種 kit を用い血液生化学パラメータを測定した。②RNA 抽出と real-time RT-PCR：肝と筋肉の凍結サンプルから total RNA を抽出し定量的 real-time RT-PCR 法で遺伝子発現を解析した。③タンパク抽出と Immunoblotting：肝と筋肉の凍結サン

プルから、polyethylene glycol(PEG)沈降法により細胞質分画を抽出し、7.5%(AMPK)および 5%(ACC) SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンへ転写固定後、各ポリクローナル抗体と反応を行い[anti-AMPK pan- α antibody, anti-Thr-172-phosphorylated AMPK α antibody, anti-serine (Ser)-79-phosphorylated ACC antibody]、ECL-Plus chemiluminescence Western blot detection kit で発色し定量した。

結 果

Blood chemistry & Expression levels of hepatic metabolic genes

血中のグルコース、インスリン、脂肪酸、ケトン体などのパラメータと肝臓における代謝関連遺伝子の発現レベルの変化は、CR での fasted phase と control animal の overnight fasting が類似していることを示した。

AMPK and ACC levels

肝の AMPK α は、feeding phase 間で有意に変化しなかった。肝の p-AMPK α は AL-fed と比較して、CR-fed と CR-fasted で 60%にまで減少したが、CR-fed と CR-fasted 間で有意差はなかった。肝の p-ACC1 は、feeding phase 間で異なり、AL-fed および CR-fasted と比較し CR-fed において有意に減少した。GH 抑制および overnight fasting は、AMPK α 、p-AMPK α および p-ACC1 レベルに影響を与えなかった。

大腿四頭筋の AMPK α および p-ACC2 は、feeding phase 間で有意差はなく、GH 抑制および overnight fasting も影響を与えなかった。p-AMPK α は、AL-fed と比較し CR-fed の特に Tg ラットにおいて、有意に低値で、CR-fed と比較し CR-fasted で 65%にまで増加した。GH 抑制で有意差はなかったが、overnight fasting は、p-AMPK を 150%増加した。

考 察

今回の主要所見は、p-AMPK が CR の肝において AL と比べ約 40%減少していることであり、CR が肝の AMPK 活性を抑制したことを示唆している。overnight fasting が p-AMPK に影響しなかったことは、CR の肝における p-AMPK の抑制が、CR の長期的な効果 (long-term effect) と結論される。肝の p-ACC1 は、CR-fed と比較し CR-fasted で有意に up-regulate されたが、overnight fasting は、p-ACC1 に影響しなかった。これらの所見は、肝の ACC1 のリン酸化(=不活化)は、CR の状況下で AMPK に依存していないことを示している。AMPK の活性化は、tuberous sclerosis complex protein 1 および 2 (TSC1 と TSC2) を活性化することで mTOR pathway を抑制し、線虫においては TOR signaling の欠乏は寿命を延長する。AMPK が CR により down-regulate されたという今回の所見は、CR の寿命延長効果を考えれば意外であった。

AMPK の target は HNF4 α および TORC2 等の種々の転写因子や cofactors を含んでおり、AMPK の down-regulation が種々の細胞内機能と関連した遺伝子発現を調節することを示唆している。

骨格筋では、CR 条件下でも摂食状況によって AMPK の活性が軽度ながら変動したが、絶食に対する反応がやはり CR ラットでは低かった。

今回の研究結果は、CR が特に肝において長期的な効果として AMPK の down-regulation を生じることを示しており、この AMPK の down-regulation は、食物利用の変動に対する代謝的適応にとって有利であると考えられるが、CR の抗老化効果における AMPK レベルの減少の役割は、さらに検討が必要である。