
資 料

AMP の経口摂取による 生体エネルギー代謝調節への影響

樹山 敦子

Effect of AMP ingestion on the Energy metabolic system.

Atsuko Kiyama

I. 緒言

近年の日本における糖尿病患者の増加の一因は高齢化であるが¹⁾、一方で、現代社会の急速な生活スタイルの変化による生活習慣病発症の若年化も一因である。また、日本人は欧米人に比べて膵β細胞が脆弱でインスリン分泌能が低く、膵機能の疲弊をきたしやすいことが糖尿病患者の増加に拍車をかけていると考えられる²⁾。

糖尿病や耐糖能異常は高血圧に合併しやすく、食後高血糖は虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の独立危険因子であり³⁾、冠動脈疾患が死因となる糖尿病患者の割合は増加している⁴⁾。高齢者の寝たきりの原因として脳梗塞が突出して多いこと、透析導入患者に占める糖尿病の有病率が高いことなどから、人々の健康や我国の医療費問題を考えるうえで、耐糖能異常や糖尿病をいかに予防するか、早期に改善するかが重要であることは明白である。

2型糖尿病に至る過程は、インスリン分泌能低下を主体とする場合と、インスリン抵抗性に加えてインスリン分泌の相対的不足が生ずる場合とに大別される。糖尿病治療では食事療法・運動療法が基本となるが、インスリン抵抗性の改善には特に運動療法の効果が高い。これは、運動により消費された筋肉グリコーゲンを回復させるために、一定濃度のインスリン刺激に対してグルコースの取込みが充進するためと考えられている⁵⁾。この骨格筋での糖の取込

みと脂肪酸酸化の促進には、AMPK (Adenosine monophosphate activated kinase) が関与している。AMPK はインスリン受容体からのシグナル下流で活性化する経路とは別に、骨格筋の収縮によっても活性化される⁶⁾。

AMPK は様々な代謝経路を仲介する⁷⁾。抗肥満ホルモンであるレプチンの作用はAMPK 活性を介しており、レプチンによる脳視床下部での摂食行動抑制がAMPK 活性によって惹起されるという報告⁸⁾や、高脂肪食餌により肥満および糖尿病を発症したマウスでは、レプチン抵抗性だけでなく、脳視床下部や骨格筋でのAMPK 発現が変化しているといった報告^{9,10)}がある。これらのことから、AMPK が糖尿病や肥満の進行に深く関与していることが推測され、AMPK の活性を増強することが糖尿病や肥満症の改善につながる可能性が考えられる。そこで、本研究ではAMPK の基質であるAMP を摂取することで血糖上昇およびエネルギー代謝に関係する血中成分の動態に変化がみられるか、AMP の摂取がエネルギー代謝異常の是正に有用ではないかと考え検討を行った。

筆者は2006年度より上記目的の下に研究を行ってきた。研究を開始以降、動物実験に対する倫理的配慮から実験動物の麻酔についての規則が整備され、研究開始より積み重ねてきたデータの発表機会を逸して現在に至った。今回はこれまでに得られた結果が今後の資料として参考にされることを念じ、まとめた。

II. 方法

1. 実験動物

実験には C57 Black6 N マウスの 5 週齢雄((株)広島実験動物およびオリエンタルバイオサービス(株))を用いた。マウスはコンベクションな条件下において数日間の予備飼育後、6 週齢で実験に用いた。

2. 試料採取

マウスは実験前日より絶食自由飲水とした。第 I 実験として、AMP 投与の影響を検討するグループではマウスを平均体重がおよそ同じになるようコントロール群(以下 Cont 群)と AMP 5%, 10%, 15% 投与群(以下、AMP5% 群, AMP10% 群, AMP15% 群)の 4 グループに分けた。Cont 群には 5% Glucose 液を、AMP 投与の 3 群にはそれぞれ 5% Glucose に 5%, 10%, 15% 濃度の AMP を添加した混液をゾンデを用いて経口投与した (0.5 ml/匹)。AMP の投与量は M. J. Perez らの方法¹¹⁾を参考に、6 週齢マウスの体重を 25 g として算出した量を中心に濃度を決定した。各群とも投与前を 0 分とし、投与後 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 分後に尾末血もしくはエーテル麻酔下で心採血および肝臓・腹腔脂肪採取を行った。血漿および肝臓は速やかに凍結して -80℃ で保存し、分析に用いた。

第 II 実験として、AMP に替えて Adenosine を AMP 10% に含有される相当量 (6.8%) を添加した混液、または GMP (Guanosine monophosphate) 10% を 5% Glucose 液に添加した混液をマウスに投与して検討した。マウスは第 I 実験と同様に実験前日より絶食自由飲水とし、群ごとの平均体重がおよそ同じになるように Cont 群、Adenosine 投与群(以下 Adeno 群)、

GMP 投与群(以下 GMP 群)に分け、Glucose 液もしくは混液をそれぞれゾンデを用いて経口投与した (0.5 ml/匹)。血液採取および組織採取と保存は第 I 実験と同様に行った。表 1 (a) に第 I 実験と表 1 (b) に第 II 実験で用いた各群のマウスの匹数 (n 数) を示す。

3. 血液成分分析

血糖値は FreeStyle Freedom (ニプロ) もしくはグルコース CII-テストワコー (和光純薬(株)) にて測定した。血中中性脂肪はラボアッセイ™ トリグリセライド、血中遊離脂肪酸はラボアッセイ™ NEFA (和光純薬(株))、血中インスリンは超高感度インスリン測定キット (森永生科学研究所) を用いて測定した。

4. 統計処理

データは Mean ± S.E. で表した。統計処理には SPSS Statistics Base24 を使い、paired t-test を行った。

III. 結果

1. 血糖変動への影響

第 I 実験として、まず AMP の経口摂取による血糖変動への影響について検討するために、5% Glucose 液もしくは 5%, 10%, 15% の AMP 混液をマウスに投与し、投与後 0 分、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分時点の尾末血を用いて血糖を測定した。その結果を図 1 に示す。AMP 投与のいずれの群も投与後 60 分までの血糖値は Cont 群よりも低い値で変動した。投与後 15 分では AMP 5% 群、10% 群、15% 群のいずれも有意に低く (Cont 群 117.65 ± 5.76 mg/dl, AMP 5% 群 89.31 ± 3.49 mg/dl, AMP 10% 群 86.49 ± 3.12 mg/dl, AMP 15% 群 83.91 ± 6.01 mg/dl, p < 0.01), さらに AMP 10% 群では投与後 30 分でも Cont 群に比べて有意に低い値であった (Cont 群 113.26 ± 5.41 mg/dl, AMP 10% 群 94.99 ± 3.36 mg/dl, p < 0.01)。

AMP 10% 群で最も血糖上昇の抑制がみられたことから、AMP 10% 濃度での検討を続けることとした。これよりは心採血による試料を用いて解析した。第 I 実験の条件に基づき、AMP 投与後 5 分と 10 分についても測定したところ、投与後 10 分までは両群に差はなく、15 分から 30 分後にかけて AMP 10% 群で急速な血糖の降下が認められた。

表 1 試料採取時点ごとの群別マウスの匹数 (n)

(a) 第 I 実験		(匹)					
(min)	0	15	30	60	90	120	
Cont 群	18	19	19	19	19	19	
AMP 5% 群	11	11	11	11	11	11	
AMP 10% 群	17	19	19	19	19	19	
AMP 15% 群	8	8	8	8	8	8	

(b) 第 II 実験		(匹)						
(min)	0	5	10	15	30	60	90	120
Cont 群	9	9	13	12	13	9	5	7
AMP 10% 群		6	8	7	8	4	5	5
Adeno 群		10	10	10	10	10	10	10
GMP 群		5	5	6	5	5	5	5

(a) に第 I 実験、(b) に第 II 実験における試料採取時点ごとのマウスの匹数 (n) を示す。

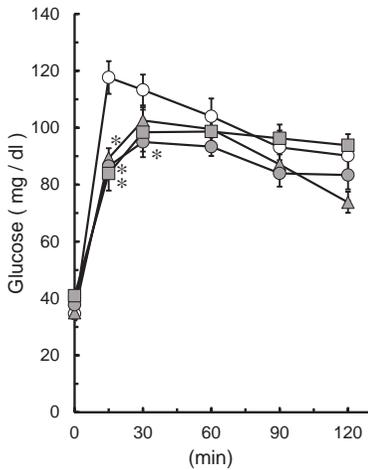


図1 濃度別AMPの経口投与による血糖動態への影響
5% Glucose 液または5% Glucose と5%, 10%, 15% のAMP 混液を経口投与し、血糖値の経時の変化を見た。グラフの記号は○: Cont 群, △: AMP 5% 群, ●: AMP 10% 群, ■: AMP 15% 群で、値は Mean ± S.E. で示す。対 Cont 群の有意差は* (p<0.01) で示す。

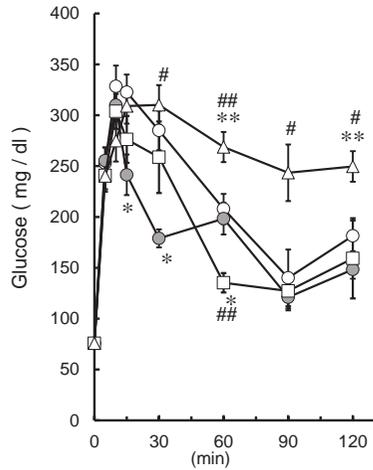


図2 AMP, Adenosine, GMP の経口投与による血糖動態への影響

5% Glucose 液または5% Glucose と10% AMP 混液または8.6% Adenosine 混液または10% GMP 混液を経口投与し、血糖値の経時の変化を見た。グラフの記号は○: Cont 群, ●: AMP 10% 群, △: Adeno 群, □: GMP 群で、値は Mean ± S.E. で示す。対 Cont 群の有意差は* (p<0.01), ** (p<0.05) で示す。対 AMP 10% 群の有意差は# (p<0.01), ## (p<0.05) で示す。

第II実験における各群の血糖値の動態を図2に示す。Adeno 群では投与後5分までは Cont 群および AMP 10% 群と同レベルだった。投与後15分にかけての血糖上昇は Cont 群と AMP 10% 群にくらべてやや緩やかであったが、その後、そのまま30分までにかけて上昇した血糖値は120分まで低下することなく、高値を保った。この時、Cont 群に対して投与後60分 (Cont 群 207.8 ± 14.8 mg/dl, Adeno 群 268.7 ± 17.3 mg/dl, p<0.05), 90分 (Cont 群 140.1 ± 27.8 mg/dl, Adeno 群 243.4 ± 14.4 mg/dl, p<0.01), 120分 (Cont 群 181.4 ± 15.0 mg/dl, Adeno 群 249.6 ± 17.4 mg/dl, p<0.05) はいずれも有意に高値であった。また、AMP 10% 群との比較では、投与後30分 (AMP 10% 群 178.9 ± 8.9 mg/dl, Adeno 群 310.1 ± 13.2 mg/dl, p<0.01), 60分 (AMP 10% 群 198.3 ± 15.6 mg/dl, p<0.05), 90分 (AMP 10% 群 121.1 ± 13.0 mg/dl, p<0.01), 120分 (AMP 10% 群 148.4 ± 9.1 mg/dl, p<0.01) で Adeno 群が有意に高値であった。GMP 群は投与後10分から30分にかけては Cont 群よりは低く、AMP 10% 群よりは高い値で推移したが、投与後30分から60分にかけての急速な低下した。投与後60分の GMP 群の血糖値は135.3 ± 9.6 mg/dl で、対 Cont 群では p<0.01, 対 AMP 群では p<0.05 で有意に低値であった。

2. その他の血液成分への影響

第I実験におけるインスリン、血中中性脂肪および血中遊離脂肪酸の変動について検討した結果を図3から図5に示す。インスリンについては Cont 群との差は認められなかった。血中中性脂肪は、投与後10分で AMP 10% 群では大きく低下し (Cont 群

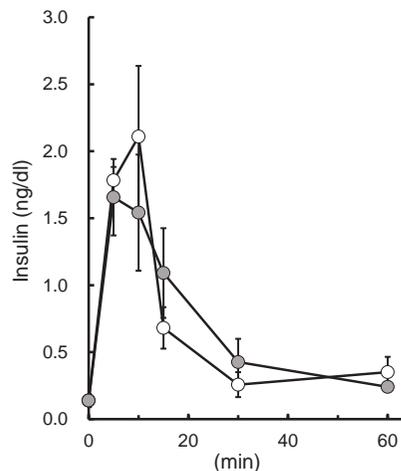


図3 AMP 経口投与によるインスリン動態への影響
5% Glucose 液または5% Glucose と10% のAMP 混液を経口投与し、インスリンの経時の変化を見た。グラフの記号は○: Cont 群, ●: AMP 10% 群で、値は Mean ± S.E. で示す。

26.4±2.41 mg/dl, AMP 10% 群 16.7±1.13 mg/dl, $p < 0.05$), その後, 再び Cont 群と同レベルに回復する動きがみられた。血中遊離脂肪酸については両群に違いは認められなかった。

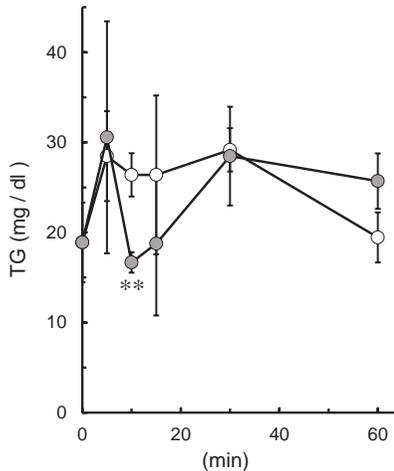


図 4 AMP 経口投与による血中中性脂肪動態への影響

5% Glucose 液または 5% Glucose と 10% の AMP 混液を経口投与し, 血中中性脂肪 (TG) の経時変化を見た。グラフの記号は○: Cont 群, ●: AMP 10% 群で, 値は Mean ± S.E. で示す。対 Cont 群の有意差は ** ($p < 0.05$) で示す。

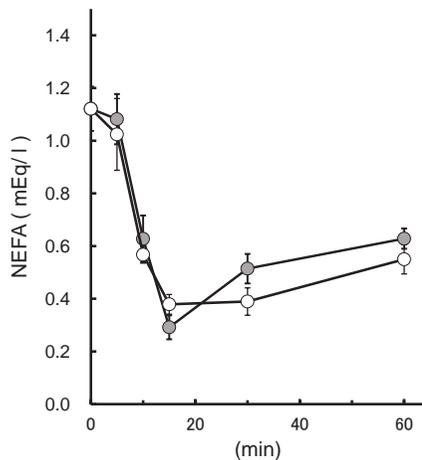


図 5 AMP 経口投与による血中遊離脂肪酸動態への影響

5% Glucose 液または 5% Glucose と 10% の AMP 混液を経口投与し, 血中遊離脂肪酸 (NEFA) の経時変化を見た。グラフの記号は○: Cont 群, ●: AMP 10% 群で, 値は Mean ± S.E. で示す。

IV. 考察

今回, 生体エネルギー代謝調節に関する AMPK の働きを増強する方法を探る目的で, マウスに AMP を経口投与し, 血糖変動及びエネルギー代謝に関する血液成分の動態をみた。

5% Glucose を投与した Cont 群に対し, 5% Glucose に AMP を 5%, 10%, 15% 濃度で添加した混液を投与した群ではいずれも血糖の上昇が抑えられることがわかった。AMP 10% 群での検討を継続し, さらに投与後の早い時間での変動を見た結果, 投与後 10 分までは Cont 群と差は認められなかったが, 10 分以降に急速に血糖値は低下した。また, この時のインスリン分泌には両群間に違いが認められなかった。さらに, 10% の AMP 相当量の Adenosine を添加した混液を投与した Adeno 群では, Cont 群に比べ高血糖状態を長く維持することが示された。これは経口投与した AMP が血糖の速やかな降下に影響していること, 加えて AMP が吸収される際にリン酸が外れ Adenosine として血糖の変動に影響しているのではないことを示唆している。血糖の取込みは, 一般にインスリンシグナルの下流で活性化した AMPK が細胞内のグルコース輸送体を細胞膜に移行させ, 血中からのグルコースを取込む経路が知られているが, インスリンシグナルを介さずに細胞内にグルコースを取込む経路も存在している。このインスリン非依存型の経路にも AMPK が関与しており⁶⁾, 例えば骨格筋収縮で細胞内の ATP が分解されて AMP 比が高くなると, AMPK が活性化してグルコース輸送体を細胞膜に移行させることでグルコースの取込みが起こる。すなわち, 今回の結果は経口摂取した AMP によって, インスリン非依存型の経路が働いた可能性を示している。しかし, なぜ Adeno 群では血糖値が高いレベルで維持されたのか, 今回は血糖値の変動のみしかデータが得られず, 推論することはできない。可能性として, 生体内のサルベージ経路の関与が考えられる。サルベージ経路においてアデニンはいノシンから IMP (Inosine monophosphate) を介して AMP や GMP に変換される。サルベージ経路は主に細胞増殖等に重要なプリンスクレオチドを合成するための経路として知られているが¹²⁾, その詳細は未だ解明されていない。もしかすると, 生体のエネルギー供給においても何らかの役割を果たしているのかもしれない。

GMP 群においても Cont 群よりも血糖上昇は抑制され, 投与後 30 分から 60 分にかけては急激な低下

を示し、60分時点での血糖値はCont群、AMP 10%群の両群に対して優位に低い値であった。GMPがGTPやATPと同様に生体内でのエネルギー供給体であり、ATPとは独立して働くことはわかってはいたが、どのようにその制御がなされているかは長らく不明であった。しかし、細胞膜に存在するPI(5)P(Phosphatidylinositol 5-phosphate)を介して細胞のシグナル伝達を制御する脂質キナーゼの一種が細胞内のGTPセンサーとして働いていることが報告され¹³⁾、GMPが細胞でのタンパク質合成やシグナル伝達の原動力となることが裏付けられた。また、がん細胞や代謝疾患では細胞内のGTP濃度が非常に高くなることも明らかにされている。ATPによる生体エネルギーの調節機構では細胞内ATP濃度変化(AMP/ATP比)に反応するAMPKが大きく関わっている。AMPがAMPKの基質であるように、GTPセンサーがGMPの存在に反応するかは不明であるが、今回の結果は生体エネルギーの供給経路のどこかにGMPが関与し、また、GMPの摂取が何らかの影響を及ぼすことも在り得ることを示唆しており、今後の検討を進めていくうえでの課題として挙げられる。

血中中性脂肪や遊離脂肪酸も生体内でのエネルギー代謝をみる際の指標として重要である。今回の検討において、AMP 10%群での血中中性脂肪の変動は、投与後10分で投与前のレベルから大きく低下し、その後再び上昇してCont群と同レベルとなった。遊離脂肪酸の変動についてはCont群と違いは認められなかった。飢餓時、生体内では肝臓グリコーゲンの分解や糖新生、脂肪分解で生じた脂肪酸の酸化によってエネルギーが供給される。また遊離脂肪酸は肝臓でケトン体となり、もしくは直接にもエネルギー体として消費される。脂肪組織での脂肪分解や脂肪酸酸化をインスリンは抑制し、AMPKは促進する。反対にグルコースが十分に供給されている時には、グルコースを原料として脂肪酸が主に肝臓で合成される。脂肪酸はエステル化されて中性脂肪となり、リポたんぱく質複合体として血中を移動し、脂肪組織に蓄えられる。この脂肪酸合成および脂肪組織への中性脂肪の貯蓄をインスリンは促進し、AMPKは抑制する方向に働く。今回の検討ではマウスは前日(約24時間前)より絶食飲水のみとしており、肝臓グリコーゲンは枯渇して、ほぼ脂質代謝によるエネルギー供給状態となっていたはずである。よって、Cont群、AMP 10%群の両群ともに投与前(0分)の遊離脂肪酸濃度が高く、投与後15

分までに急激に低下したことは、脂質代謝によるエネルギー供給からグルコースによるエネルギー供給へ切り替わったことを明確に示す結果であり、両群でインスリン分泌に違いがなかったことから合点がいく。中性脂肪の動態については、AMP 10%群で一時的な低下と再上昇が認められ、上昇した血糖の急速な低下と併せて考えると、インスリン非依存でのAMPKの活性化も生じ、インスリン作用と同時により強く脂肪細胞での脂肪分解を抑制し、グルコース優位のエネルギー供給に傾いたことを示唆するものと考えられる。

今回はAMPKの基質であるAMPを摂取することで、血糖上昇およびエネルギー代謝に関係する血中成分の動態に変化がみられるかを検討するため、血糖変動についてはAMP、Adenosine、GMPの経口摂取による影響を、また、AMPの摂取についてのみインスリン、中性脂肪、遊離脂肪酸の動態について検討した結果をまとめた。今回示した結果だけでは、AMPの経口摂取がAMPK活性を介したエネルギー調節にどのように影響しているかを論ずることは難しい。AMPK活性レベルや肝臓でのエネルギー代謝指標となるGlucose-6-phosphate活性などと併せて検討する必要があり、それには現在推奨される実験動物の取り扱いに準じた試料採取により、結果の再現を得なければならない。

今後、今回示した結果が生体エネルギーの代謝を考える上での参考資料となれば幸甚である。

V. 謝辞

本研究を実施するにあたり、マウスの飼育及び血液成分分析にご協力いただいた安田女子大学2011年度卒業生 今堀悦子さん、松田志穂さん、山田未来さん並びに京都女子大学2015年度卒業生 中西舞さん、野原仁美さん、眞塚ありさんに深謝いたします。

VI. 利益相反

本研究は2012年、2014年、2015年度京都女子大学研究経費助成および2012年研究用機器備品助成を受け実施した。

引用文献

- 1) 厚生労働省：平成28年国民健康・栄養調査報告，30-32 (2017)
- 2) K. Kodama, D. Tojjar, S. Yamada, K. Toda, C. J. Patel and A. J. Butte: *Diabetes Care.*, **36**, 6, 1789-1796 (2013)
- 3) 後藤 由夫：動脈硬化，**14**, **2**, 247-258, (1986)
- 4) H. Sone, S. Tanaka, S. Iimuro, K. Oida, Y. Yamasaki, S. Oikawa, S. Ishibashi, S. Katayama, Y. Ohashi, *et al.*: *Clin Endocrinol Metab.*, **96**, 3448-3456 (2011)
- 5) 高本 偉碩, 門脇 孝：糖尿病，**47**, **8**, 622-625 (2004)
- 6) W. W. Winder: *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1017-1028 (2001)
- 7) D. G. Hardie, D. Carling and M. Carlson; *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 821-855 (1998)
- 8) Y. Minokoshi, T. Alquire, N. Furukawa, *et al*; *Nature*, **428**, 569-574 (2004)
- 9) I. Shimomura, R. E. Hammer, S. Ikemoto, *et al*; *Nature*, **401**, 73-76 (1999)
- 10) E. A. Oral, V. Shimha, H. Masuzaki, *et al*; *N. Engl. J. Med.*, **346**, 570-578 (2002)
- 11) M. J. Perez, F. S. Medina, M. Torres, A. Gill and A. Suarez: *J. Nutrition*, **134**, **10**, 2504-2508 (2004)
- 12) 山岡 孝：痛風と核酸代謝，**25**, **2**, 105-111 (2001)
- 13) K. Sumita, Y. H. Lo, K. Takeuchi, *et al*; *Mol. Cell*, **61**, 187-198 (2016)