

氏 名 高木 一代

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1731 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Role of uncoupling protein 1 and muscle AMP-activated
protein kinase in diet-induced thermogenesis

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴
教授 箕越 靖彦
教授 西田 基宏
教授 山下 均 中部大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Energy homeostasis is tightly regulated in mammals including humans, and their body weights are kept constant for a long interval. The measurement of food intake and energy expenditure (EE) is a central feature of studies attempting to investigate the homeostatic mechanism. However, analysis of total EE is complicated due to the presence of multiple biological processes that include the resting metabolic rate (RMR), EE induced by locomotor (muscle motor) activity (Ex) and diet-induced thermogenesis (DIT). Little study examined which process is involved in change in body weight in rodents as well as humans.

Brown adipose tissue (BAT) and skeletal muscle are important organs involved in regulation of energy homeostasis in mammals. BAT thermogenesis is regulated by the sympathetic nervous system (SNS) through the intracellular mechanism including β -adrenergic receptor, protein kinase A, lipolysis, and fatty acid-induced activation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). UCP1 ablation induced obesity in mice fed laboratory chow (corn starch-based diet) as well as high-fat diet (HFD) when the mice were maintained at the thermoneutral environment ($\sim 30^{\circ}\text{C}$ for mice). However, the mice failed to induce obesity under “normal” animal house condition (i.e. $20\text{-}24^{\circ}\text{C}$). The obesity-resistant phenotype of UCP1-gene ablated mice at the subthermoneutral environment was supposed to be due to the activation of compensatory mechanism in the mice.

An alternative site for the adaptive thermogenesis may be skeletal muscle, which involves both shivering and non-shivering thermogenesis (NST). Recent studies revealed that Ca^{2+} -transport regulated by sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump (Serca) and its regulator sarcolipin involve NST in skeletal muscle, and ablation of sarcolipin caused obesity. AMP-activated protein kinase (AMPK) also plays an important role in glucose and lipid utilization in skeletal muscle during exercise and non-exercise. Previous studies revealed that leptin, an adipocyte hormone that plays a pivotal role in regulating energy homeostasis, activates AMPK and increases fatty acid oxidation in skeletal muscle, via directly acting on muscle and indirectly through the hypothalamic-SNS. However, the role of muscle AMPK in energy homeostasis remains elusive. Furthermore, it remains unknown whether AMPK involve the compensatory mechanism for the obesity-resistant phenotype of UCP1-ablated mice.

In the present study, I investigated the effect of ablation of UCP1 gene and suppression of AMPK activity in skeletal muscle in total EE in mice. First, I established the measurement of RMR, Ex and DIT in total EE. I found that total EE was highly co-related with locomotor activity in both fasting and feeding of HFD (high-calorie diet) after logarithmic conversion of the locomotor activity. Therefore

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

RMR was determined with EE at the intercept on the y-axis of the linear regression during fasting. Ex at each time point in fasting and feeding was calculated with the linear regression line during fasting period. DIT was then obtained by subtracting Ex and RMR from total EE during HFD feeding.

Second, I examined each component (RMR, Ex and DIT) of total EE in UCP1 gene-ablated mice (UCP-KO), muscle-specific dominant negative-AMPK expressing mice (dnAMPK-mTg), and UCP1-KO & dnAMPK-mTg (KO-Tg) mice. Wild type (WT) and KO-Tg mice were obtained by crossing UCP1-KO and dnAMPK-mTg mice. KO-Tg mice were impaired DIT and total EE, but not RMR or Ex, compared with that of WT mice at the subthermoneutral environment (24°C). Body weight of KO-Tg mice significantly increased even when the mice are pair-fed HFD with time-restricted feeding from 18:00-9:00, which protects HFD-induced obesity and metabolic abnormalities in WT mice. KO-Tg mice also caused glucose intolerance under lab chow feeding. UCP1-KO and dnAMPK-mTg mice did not alter EE, body weight or glucose metabolism.

Third, I found that KO-Tg mice abolished norepinephrine (NE)-induced increase in total EE. Furthermore, KO-Tg mice blunted NE-induced phosphorylation of AMPK and acetyl-CoA carboxylase (ACC), which is a target of AMPK, in muscle. In contrast, UCP1-KO mice were enhanced NE-induced phosphorylation of AMPK and ACC in muscle. These results suggest that muscle AMPK involves a compensatory mechanism to regulate energy metabolism in UCP1-KO mice.

In conclusion, I found that muscle AMPK and UCP1 play an important role in energy homeostasis in mice. Muscle AMPK and UCP1 are both necessary to maintain in normal glucose metabolism in mice. Thus the present study provides a novel insight for important role of muscle AMPK as well as UCP1 in control of energy homeostasis.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

ヒトを含む哺乳動物において、個体のエネルギーバランスは厳密に調節されており、長期間に渡って一定に保たれる。そのため摂取エネルギー量とエネルギー消費量(EE)を正確に測定することは、エネルギーバランス調節機構を明らかにするために重要である。しかし、個体全体のエネルギー消費量 (total EE) には、安静時代謝量 (RMR)、運動による熱産生 (Ex)、摂食による熱産生 (DIT) が含まれ、これまで、これらの代謝量を個別に算出する方法は確立していなかった。本研究において出願者は、マウス毎にtotal EEからRMR、Ex、DIT を算出する方法を確立することを試みた。また、その算出法を用いて、各EEに及ぼす脱共役タンパク質(UCP1、uncoupling protein 1)と骨格筋AMPK (AMP-activated protein kinase)の調節作用を調べた。実験には、UCP 1 遺伝子ノックアウトマウス (UCP1-KO)、骨格筋特異的dominant negative AMPK発現マウス (dnAMPK-mTg)、これらのマウスを交配して得たUCP1-KO x dnAMPK-mTgマウス (KO-Tg) を用いた。

出願者は、まず既報に従い、呼気中の酸素消費量と二酸化炭素産出量から、絶食時と高脂肪食摂食時のtotal EEを経時的に測定した。マウスを絶食した時のtotal EEと運動量を5分毎に集計して両測定値の関係を調べたところ、一次回帰直線を得た。一次回帰直線をマウス毎に算出し、運動量が0となるy切片との交点を各マウスのRMRとした。また、一次回帰直線の傾きをEx算出に用いた。高脂肪食摂食時のtotal EE は、高脂肪食を夜6時から与え翌朝9時までの測定値を用いた。DITは、total EEからRMRとExを差し引いて算出した。

野生型マウス (WT) に高脂肪食を与えると、total EE、Ex、DITが有意に増加した。UCP1-KO、dnAMPK-mTgも同様にこれらの代謝量が増加した。しかし、KO-TgではDITが他の3群に比べて有意に低下していた。RMRとExに差は無かった。そこで、高脂肪食を長期間各群同じ量だけ摂取させ、体重変化を調べた。その結果、KO-Tgは、WTに比べて体重が有意に増加した。UCP1-KO、dnAMPK-mTgでは、体重増加量に有意差は無かった。さらに、KO-Tgでは、インスリン抵抗性、高脂肪酸血症など、糖・脂質代謝に異常を来すことも見出した。以上の実験結果から、マウスにおいてDITが正常に惹起されるためには、UCP1と骨格筋AMPKの両方が必要であることが分かった。

DITの一部は、交感神経系の制御を受けることが知られている。そこで出願者は、マウス皮下にノルエピネフリン (NE) を投与してtotal EEの変化を調べた。その結果、WT、UCP1-KO、dnAMPK-mTgでは、NE投与によりtotal EEが増加した。しかし、KO-Tgではtotal EEが変化しなかった。さらに、NEを投与して、骨格筋AMPKとその標的酵素であるacetyl-CoA carboxylase (ACC)のリン酸化を活性の指標として測定した。WTとUCP1-KOでは、NE投与により骨格筋AMPKとACCのリン酸化が亢進した。さらに、UCP1-KOでは、NE投与による骨格筋AMPKリン酸化亢進作用がWTよりも強いことが分かった。これに対して、dnAMPK-mTgとKO-Tgでは、NEを投与しても骨格筋AMPKとACCのリン酸化が増加しなかった。

このように、本研究結果から、マウスの DIT と、体重、糖・脂質代謝の調節に、UCP1

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

と骨格筋 AMPK の両方が必要であることが明らかとなった。これらの実験結果は明瞭であり、その科学的価値は大きい。以上の理由から、審査委員会は全員一致で本論文が学位論文として相応しいと判断した。