

(続紙 1)

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	馬 嘯
論文題目	Active Ingredient of Chinese Medicinal Plant Rapidly Activates 5' AMP-Activated Protein Kinase in Skeletal Muscle（中国由来薬用植物成分による骨格筋5' AMP－活性化プロテインキナーゼの急性活性化作用に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
<p>2型糖尿病は「生活習慣病」の代表的疾患であり、現代社会における食事習慣の変化や身体活動量低下、肥満の増加などを誘因として、日本、中国を含めて世界的に罹病患者数が増加している。本論文は、古来、中国において抗糖尿病作用を有する薬用植物として利用されてきた桑葉（<i>Morus alba</i> leaf）と黄連（<i>Coptis chinensis</i>）の作用機序の解明を目的として、体内最大の代謝器官である骨格筋を対象として、糖・脂質・エネルギー代謝に深く関与する蛋白リン酸化酵素5' AMP-Activated Protein Kinase（AMPK）の活性化作用を検証したものである。</p> <p>骨格筋AMPKは、糖輸送担体GLUT4を介した糖輸送促進のみならず、GLUT4遺伝子の発現亢進とGLUT4量の増加、グリコーゲン代謝促進、インスリン感受性亢進、脂肪酸酸化促進、ミトコンドリア新生、筋線維タイプの変化などのさまざまな代謝的变化に関与すると考えられている。さらに、骨格筋AMPKは、ビッグアニドやチアゾリジン誘導体などの抗糖尿病薬、レプチンやアディポネクチンなどの脂肪由来因子によって活性化されることも知られている。</p> <p>本論文では、基本的な実験系として、ラット骨格筋を生体より単離し、酸素化されたクレブス緩衝液中でインキュベートするシステムを用いた。この手法により、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外することで、薬用植物成分の骨格筋に対する直接的な作用を定量的に検討した。</p> <p>桑葉については、乾燥桑葉を85℃の温水に浸して得た水溶性抽出物をクレブス緩衝液に溶解し、単離した滑車上筋をインキュベートする手法を用いて検討した。滑車上筋は薄く平らな筋であり、酸素透過性や薬剤吸収が良好であることから、インキュベート実験に適する筋として選択した。桑葉抽出物はAMPK活性化の指標となるAMPKαサブユニット（活性サブユニット）リン酸化を濃度・時間依存的に亢進し、4.28 mg/ml、30～60分間の刺激においてAMPKαリン酸化を非刺激時の約2倍に増強した。骨格筋にはα1、α2の2種類のαサブユニットが存在し、α1を含有するAMPK分子（AMPKα1）とα2を含有するAMPK分子（AMPKα2）とが存在するが、桑葉抽出物（4.28 mg/ml、30分間刺激）はAMPKα1、AMPKα2の酵素活性を、それぞれ1.8倍、2.7倍に亢進した。また、桑葉抽出物は、GLUT4のトランスロケーション制御に関与するAS160を</p>			

リン酸化するとともに、インスリン非依存的糖輸送活性を40%亢進した。一方、桑葉抽出物は、インスリン受容体の下流分子で、インスリン依存的糖輸送活性化に關与するAktのリン酸化には影響を与えなかった。一般に、AMPK活性は、筋細胞のエネルギー状態の低下に反応して亢進することが知られているが、エネルギー状態の指標となるアデノシン3リン酸とクレアチンリン酸を計測したところ、桑葉抽出物はこれらの含有量に影響を与えなかった。

黄連についての検討は、黄連が含有する主要アルカロイドであるベルベリンをクレブス緩衝液に溶解し、その中でラット滑車上筋とヒラメ筋をインキュベートする手法を用いて検討した。滑車上筋は速筋に分類される筋であるため、遅筋に分類されるヒラメ筋を対象に含め、両方の筋タイプで検討した。ベルベリンは滑車上筋とヒラメ筋の両者において、AMPK α リン酸化を濃度・時間依存的に亢進し、0.3 mM、30～60分間の刺激においてAMPK α サブユニットリン酸化を非刺激時の約2倍に増強した。また、ベルベリン（0.3 mM、30分間刺激）は、両方の筋タイプにおいて、AMPK α 1とAMPK α 2を活性化するとともに、AS160リン酸化とインスリン非依存的糖輸送活性を亢進させたが、Aktのリン酸化には影響を与えなかった。一方、ベルベリンは筋細胞のアデノシン3リン酸含有量には変化を与えなかったが、桑葉と異なり、クレアチンリン酸含有量を30～40%低下させた。

以上より、桑葉については細胞内エネルギー低下に依存しない機序を介して、また、黄連については細胞内エネルギー低下に依存する機序を介して骨格筋AMPKを急性的に活性化する作用を有すること、そして、両者とも、インスリン受容体を起点とするシグナル伝達経路とは独立した機序をもって、骨格筋糖輸送を促進することが示唆された。本論文が示す結果は、桑葉や黄連が抗糖尿病作用を発揮する機序として、骨格筋AMPKの活性化を介した代謝的活性化が寄与している可能性を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

5' AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) は、骨格筋における糖・脂質・エネルギー代謝の調節に関与する重要なシグナル伝達分子である。骨格筋 AMPKの活性化に伴い、糖輸送担体 GLUT4を介したインスリン非依存的糖輸送促進、GLUT4遺伝子の発現亢進と GLUT4量の増加、グリコーゲン代謝促進、インスリン感受性亢進、脂肪酸酸化促進、ミトコンドリア新生、筋線維タイプの変化など、骨格筋代謝に関わる重要な変化が惹起される。また、身体活動(運動)や、ビッグアニドやチアゾリジン誘導体などの糖尿病治療薬、レプチンやアディポネクチンなどの脂肪由来因子が、骨格筋 AMPKの活性化を介して抗糖尿病効果を発揮することも明らかにされている。本論文は、中国において、古来、抗糖尿病作用を有する薬用植物として利用されてきた桑葉 (*Morus alba* leaf) と黄連 (*Coptis chinensis*) の作用機序の解明を目的として、これらの植物が骨格筋 AMPKを活性化する可能性を検証したものである。

本論文では、基本的な実験方法として、ラットの骨格筋を生体より単離し、酸素化された緩衝液中でインキュベーションする手法を用いた。生体から筋を単離した実験環境を用いることで、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外して、植物成分の骨格筋に対する直接的作用を詳細に検討した。

桑葉については、乾燥桑葉を温水に浸して得た水溶性抽出物をクレブス緩衝液に溶解し、単離した滑車上筋をインキュベートする手法を用いて検討した。桑葉抽出物は、AMPK活性の指標となる AMPK α サブユニットのリン酸化を濃度・時間依存的に亢進した。骨格筋には $\alpha 1$ サブユニットを含有する AMPK 分子 (AMPK $\alpha 1$) と $\alpha 2$ サブユニットを含有する AMPK 分子 (AMPK $\alpha 2$) とが存在するが、桑葉抽出物は AMPK $\alpha 1$ 、AMPK $\alpha 2$ の酵素活性をともに亢進した。また、桑葉抽出物は、GLUT4トランスロケーションの促進に関与する AS160のリン酸化を増強するとともに、インスリン非依存的糖輸送活性を亢進した。一方、桑葉抽出物は、インスリン依存的糖輸送活性の促進に関与する Aktのリン酸化には影響を与えなかった。AMPK活性は、筋細胞のエネルギー状態の低下に反応して亢進することが知られているが、桑葉抽出物はエネルギー状態の指標となるアデノシン3リン酸とクレアチンリン酸の含有量に影響しなかった。

黄連についての検討は、黄連の主成分であるベルベリンをクレブス緩衝液に溶解し、その中で速筋に分類される滑車上筋、または、遅筋に分類されるヒラメ筋をインキュベートする手法を用いて検討した。その結果、滑車上筋とヒラメ筋の両者において、ベルベリンは AMPK α リン酸化を濃度・時間依存的に亢進した。また、ベルベリンは、両方の筋タイプにおいて AMPK $\alpha 1$ と AMPK $\alpha 2$ を活性化するとともに、AS160リン酸化とインスリン非依存的糖輸送

活性を亢進したが、Aktのリン酸化には影響を与えなかった。一方、ベルベリンは、筋細胞のアデノシン3リン酸含有量には変化を与えなかったが、クレアチンリン酸含有量を有意に低下させた。

以上の結果は、桑葉と黄連がともに骨格筋AMPKの活性化を惹起する成分を有すること、しかし、前者は細胞内エネルギー低下に依存しない機序を介して、また、後者は細胞内エネルギー低下に依存する機序を介してAMPKを活性化していること、さらに、両者はともに、インスリン受容体からのシグナル伝達経路とは独立した機序をもって骨格筋糖輸送を促進していることを示唆するものである。

2型糖尿病は「生活習慣病」の代表的疾患であり、現代社会における食事習慣の変化や身体活動量低下、肥満の増加などを誘因として、日本、中国を含めて世界的に罹病患者数が増加している。本論文は、古くから経験的に用いられてきた桑葉や黄連の抗糖尿病効果が、骨格筋AMPK活性化を介して誘導されている可能性を示した優れた研究である。また、本論文は、人間にとっての基本的生理機能である糖代謝機能が、環境中に存在する薬用植物によって調節を受けるしくみを提示したものであり、人間・環境学研究科 認知・行動科学講座 身体機能論分野の研究として高く評価できる。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成22年1月8日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降