

メトホルミン投与によるニワトリ血液中マンノース濃度の変化と糖新生系酵素の mRNA 発現量および活性の変動

佐藤 稲子

日本獣医生命科学大学・獣医学部獣医学科・生体分子化学教室

日獣生大研報 **61**, 16-21, 2012.

はじめに

血漿中グルコース濃度は、ヒトでは通常 60~110 mg/dL である。ニワトリは他の多くの哺乳動物に比べ、血漿中グルコース濃度は 2 倍高い値を示し^{4,5)}、長期の絶食⁹⁾でも血液中のグルコース濃度が低下しないという特徴がある。糖新生は、哺乳動物では主に肝臓で行われるが、ニワトリでは肝臓と腎臓で 7 対 3 の比率で行われること報告されている^{17,18)}。ラットやモルモットと比較して、ニワトリの肝臓中のグリコーゲン含量は非常に少なく²⁾、12 時間の絶食で、グリコーゲンは、ほぼ枯渇する³⁾。すなわち、ニワトリが低グリコーゲン量にもかかわらず高血糖を維持しているのは、ニワトリが他の生物種のそれとは異なり、糖新生調節機構を持つと予想される。

一方、マンノースはグルコースの C-2 エピマーで、糖タンパク質の合成には欠かせない単糖である。マンノースとグルコースは合成の過程においてグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) やホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) など、共通の酵素を多くもつ。ヒトやラットなどの哺乳動物では、血液中マンノースは血液中の遊離グルコースに由来するものではなく、主に肝臓中に蓄積されているグリコーゲンの分解により供給される。絶食や飢餓時にはこのグリコーゲンの分解により血液中マンノース濃度は維持され、食後ではグリコーゲンの分解は抑制されて血液中マンノース濃度が低下すると報告されている^{13,14)}。ニワトリでは、24 時間絶食しグリコーゲンが枯渇した状態で給餌すると、血漿中マンノース濃度が減少する¹¹⁾。このことから、ニワトリではマンノースの供給源がグリコーゲンではなく、別の供給源として、糖新生によりマンノースの供給が行われているのではないかと考えた。そこで、メトホルミン投与によるニワトリ血液中マンノース濃度と糖新生系酵素活性および、mRNA 発現量の変動について検討した。メトホルミンは糖尿病治療薬の一つであり、主として、糖新生を抑制する働きを持つことが知られている。また、PEPCK, G6Pase は解糖系と異なるバイパスを持つ糖新生酵素である。本研究ではメトホルミンを

投与後のこれらの酵素活性と mRNA の発現量と、血液中のグルコース、マンノース濃度を測定し、糖新生機構の違いについて哺乳動物と比較考察した。

材料および方法

試薬

試薬は、別途記述していないかぎり和光純薬から購入した。

サンプル

市販の業者から納入された白色レグホーン産卵鶏の卵 36 個から 37.8°C、湿度 60% の環境で孵卵し孵化した幼雛 36 羽 (オス n=20, メス n=16) を、37.8°C、湿度 60%、1 日 14 時間照明下で飼育した。水、エサ (幼雛育成用飼料 metabolisable energy (ME) 3.0 Mcal/kg, crude protein (CP) 24%) は自由給餌とし、21 日齢になるまで飼育した。36 羽の中から無作為に 16 羽を選択し、300 mg/mL のメトホルミン水溶液を体重 1 kg あたり 1 mL 容量になるように経口投与し、メトホルミン投与群とした。別な 16 羽に対して、水を担体として体重 1 kg あたり 1 mL 容量になるように経口投与し、コントロール群とした。まず、なにも投与しなかった 4 羽から、その後、0.5, 1, 3, 6 時間毎にメトホルミン投与群、コントロール群それぞれから 4 羽ずつ心臓から採血を行った。全ての血液は抗凝固剤にヘパリンを使用した。また、採血直後に、血液を遠心分離し、血漿を得た。血漿は分析まで -30°C に保存した。採血と同じタイミングで肝臓と腎臓を摘出し、直ちに液体窒素で凍結後、分析まで -80°C に保存した。

マンノースとグルコースの測定方法

HPLC を用いた方法¹⁰⁾ によりマンノースとグルコースの測定を行った。マイクロチューブに血漿 100 μL と、内部標準溶液 12.5 μL を入れ、除タンパクのため試験管振盪機で 10 秒間混和後、遠心分離 (13,000 g, 4°C, 20 分間) をおこなった。上清を別のマイクロチューブに 10 μL 移し、そこに ABEE 標識化試薬 (生化学工業製) を 40 μL 添加し、試験管振盪機で 5 秒間混和してから 80°C 1 時間保った後、放冷した。これを遠心分離 (13,000 g, 4°C, 10

秒間) し、蒸留水 200 μ L, クロロホルム 200 μ L を添加し、試験管振盪機で 10 秒間混和後、遠心分離 (13,000g, 4°C, 5 分間) し、上清 10 μ L を HPLC 分析に供した。

G6Pase と PEPCK の mRNA 発現量の定量

mRNA の定量は YAMAMOTO らの方法²⁰⁾ を参考にリアルタイム PCR 法より行った。約 100mg の肝臓および腎臓から Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) の用法に従い total RNA を抽出した。微量分光光度計 Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) で total RNA 溶液の濃度を測定し、1 μ g の total RNA をテンプレートにし、QuantiTect Reverse Transcription RT-PCR kit (Qiagen, Germany) の用法に従い、逆転写を行い cDNA を合成した。各サンプルについて合成した cDNA をテンプレートにし、Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen USA) の用法に従い、7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems USA) を測定機器に用いて、mRNA の発現量を測定した。リアルタイム PCR は、初期変性に 50°C 2 分間保持、95°C 2 分間保持したのち、95°C 15 秒、60°C 30 秒のサイクルを 40 回繰り返して PCR 反応させた。PCR 反応液は、2.5 μ L のテンプレート用の cDNA (total RNA 125 ng 相当), Forward, Reverse の各プライマー 1 μ L (10 μ M), Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG 25 μ L, Rox reference Dye 0.1 μ L を RNase フリー水で総量 50 μ L になるよう調製した。定量は各 cDNA を組み込んだ濃度既知のプラスミドの連続希釈系列から検量線を作成して行った。

ターゲット遺伝子の配列情報を NCBI データベース Reference Sequence (RefSeq) から得て、プライマーを次のように設計した。

G6Pase Forward : 5'-GGCAGTCATTGGTGATTGG-3' ;
G6PaseReverse : 5'-TCCCTGGTCCAGTTTCACA-3' (RefSeq No. XM_422017) ;

PEPCK-C Forward : 5'-GAGAGCCTGCCTCCACAA-3' ;
PEPCK-C Reverse : 5'-CGACCCAGCTGGCTACTT-3' (RefSeq No. NM_205471) ;

PEPCK-M Forward : 5'-CCGAGCACATGCTGATTTT-3' ;
and PEPCK-M Reverse : 5'-CGTTGGTGAAGATGGTGT-TG-3' (RefSeq No. NM_205470)

G6Pase と PEPCK の酵素活性測定

肝臓と腎臓は、およそ 400mg を切り取り sucrose/Tris/EGTA (STE) solution (0.25 mol/L sucrose, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 mmol/L EGTA) 5 mL を加え、ホモジナイズした。サイトゾル、ミトコンドリア、ミクロソームの画分は TSUJI らの方法に従った¹⁵⁾。PEPCK にはミトコンドリアに存在する PEPCK-M とサイトゾルに存在する PEPCK-C があるが、ニワトリの肝臓は PEPCK-M の活性を有し、腎臓では PEPCK-M と PEPCK-C の活性を持つ¹²⁾。G6Pase はミクロソームに存在する。PEPCK の酵素活性の測定は Jomain-Baum らの方法に従い、malic acid を基質として測定した⁶⁾。G6Pase の測定は Baginski らの方法に従い、glucose 6-phosphate を基質として測定した¹⁾。酵素活性は 37°C で測定し、基質 1 nmol に対するサンプル内のタンパク質 1 mg の活性を測定した。タンパク濃度は Bradford 法 (Protein Assay, Bio - Rad Laboratories, Inc. USA) で測定した。

統計解析

測定値はグループ毎に、平均値と標準誤差を求めた。コントロール群 (メトホルミン非投与群) とメトホルミン投与群との有意差を検証するために Student の *t* 検定を行った。

結果と考察

21 日齢のニワトリの血漿中グルコースとマンノース濃度は、メトホルミン投与 1 時間後に最も値が低くなった。3 時間後にはコントロール群と有意差がなくなり同程度と

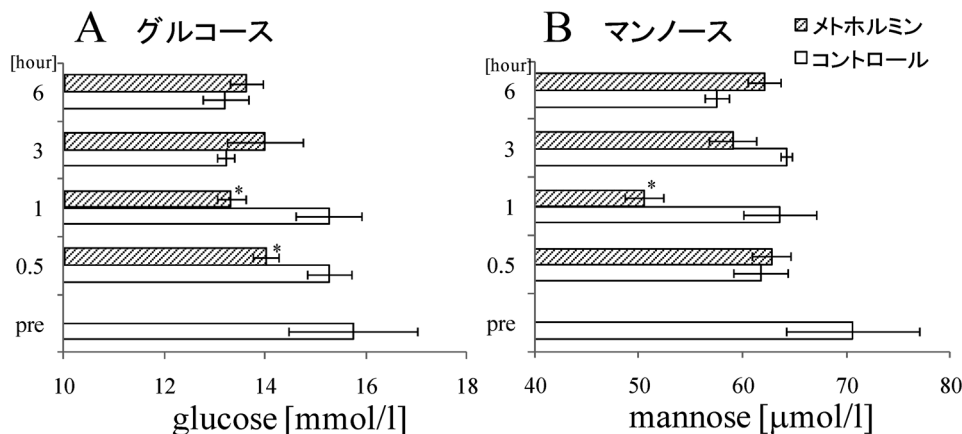


図 1. メトホルミン投与群とメトホルミン非投与群 (コントロール群) の血漿中グルコース (A) とマンノース濃度 (B)
*P<0.05 コントロール群との比較

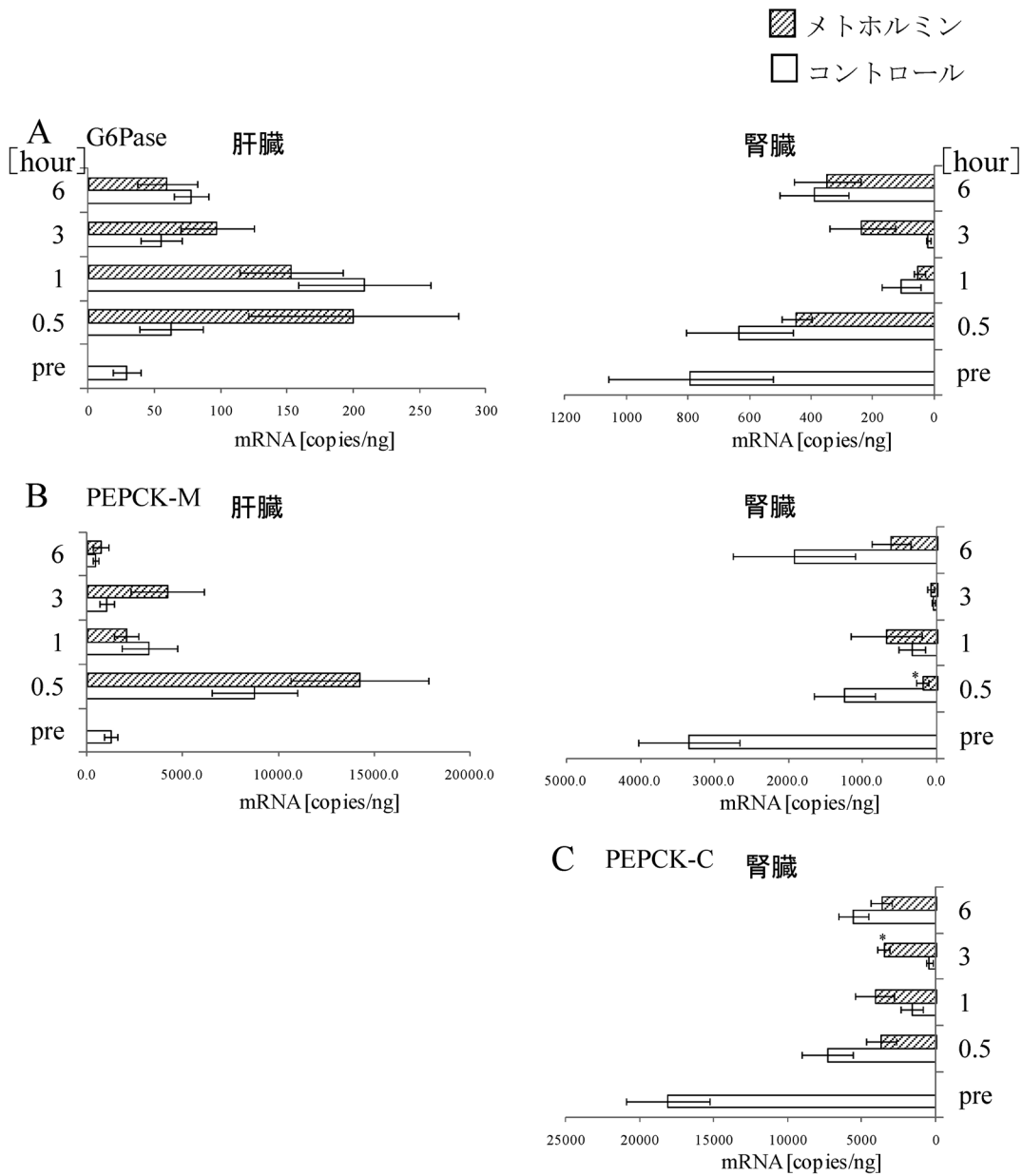


図 2. メトホルミン投与群とメトホルミン非投与群（コントロール群）の肝臓と腎臓の G6Pase の mRNA 発現量 (A), PEPCK-M の mRNA 発現量 (B), 腎臓の PEPCK-C の mRNA 発現量 (C)
* $P < 0.05$ コントロール群との比較

なった (図 1)。これらの結果は、メトホルミンによる糖新生の抑制が、短時間で起こり、また、短時間で回復することを示している。

メトホルミン投与群の腎臓の mRNA 発現量は、投与 0.5 時間後で、G6Pase が 25%、PEPCK-M が 75%、PEPCK-C が 50% 程度、コントロール群と比較して減少した。一方、同じ時間帯で肝臓の G6Pase と PEPCK の mRNA 発現量は約 0.4 倍と約 3 倍、それぞれコントロール群と比較して増加していた (図 2)。

メトホルミン投与群の腎臓では、投与 0.5 時間後で G6Pase、PEPCK-M、PEPCK-C の酵素活性が、コント

ロール群と比較して、mRNA と同様に減少していた。肝臓でも mRNA 発現量と同じように、G6Pase と PEPCK の酵素活性についてメトホルミン投与群とコントロール群を比較すると、投与 0.5 時間後で明らかに ($P < 0.05$) 増加していた (図 3)。

腎臓の G6Pase および PEPCK の酵素活性と mRNA 発現量の減少推移は、グルコース、マンノースの血漿中濃度の減少パターンの傾向が一致していた。また、どの時間帯でもメトホルミン投与群の腎臓の G6Pase 酵素活性の変動は肝臓と逆のパターンを示した。

ニワトリの血液中グルコースとマンノースは、24 時間

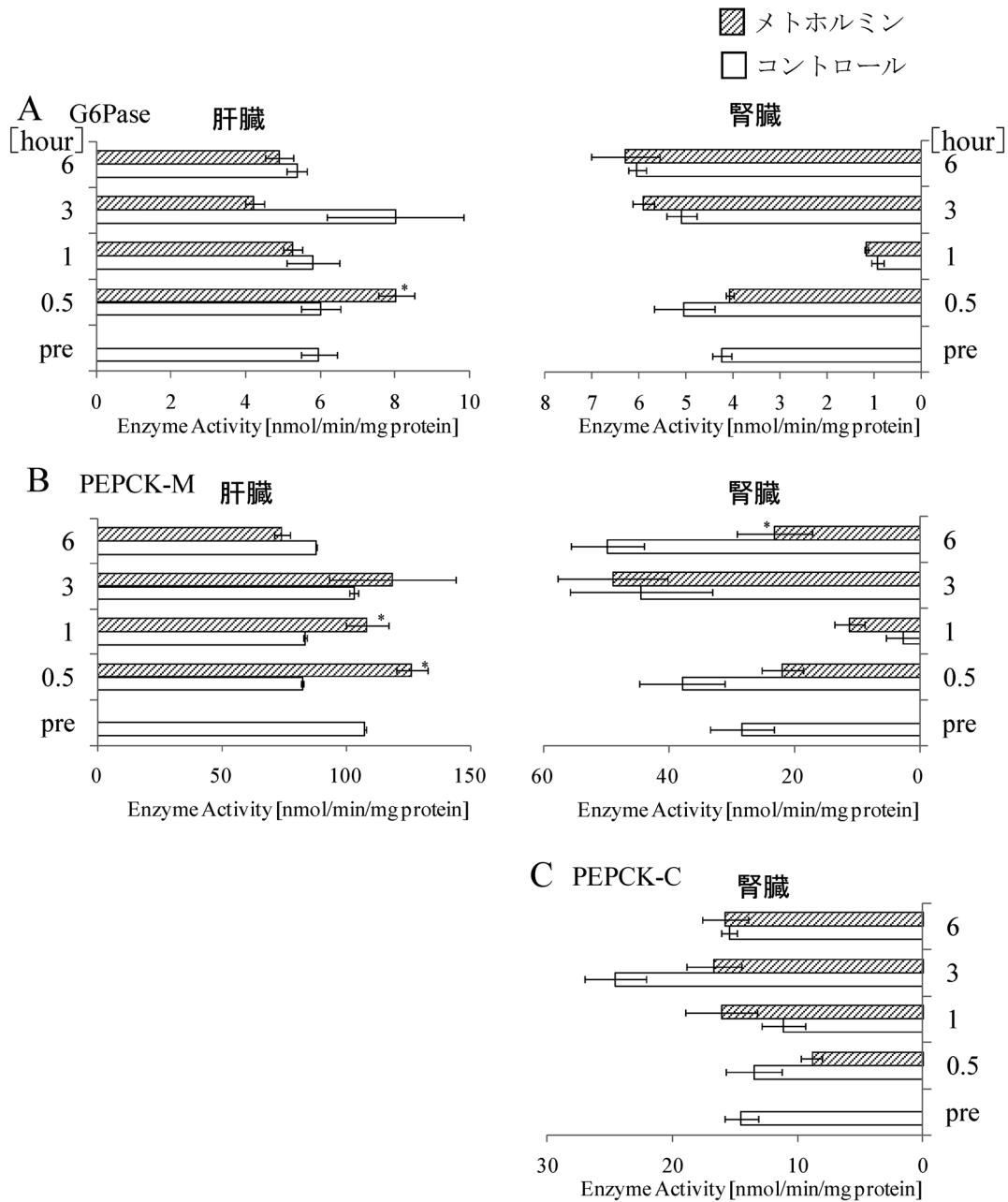


図 3. メトホルミン投与群とメトホルミン非投与群（コントロール群）の肝臓と腎臓の G6Pase の酵素活性 (A), PEPCK-M の酵素活性 (B), 腎臓の PEPCK-C の酵素活性 (C)
 *P<0.05 コントロール群との比較

絶食後も供給されるが¹¹⁾, メトホルミンを投与することで、これらの血液中単糖が減少することを発見した。これはメトホルミンが糖新生を抑制することを示唆している。

哺乳動物において、メトホルミンは AMP-activated protein kinase (AMPK) シグナルを介して、肝臓からのグルコース生成を抑制する働きを持つ。AMPK は細胞内のエネルギーが欠乏し AMP/ATP の比率が高まると活性化されるタンパク質酸化酵素である。AMPK は転写因子である HNF4α と FoxO1 を抑制し、PEPCK や G6Pase

の転写を抑制する^{16,21)}。

ラットでは、短時間の絶食に反応して、肝臓の AMPK 活性が著しく増加する^{7,19)}。しかし、Proszkowiec-Weglarz らは、ニワトリ肝臓において 24 時間の絶食で AMPK 活性の増加は起きなかった、と報告している⁸⁾。つまり、ニワトリでは肝臓での AMPK 活性化の機構が哺乳動物と異なる可能性を示唆している。

メトホルミンを投与したニワトリ腎臓の G6Pase および PEPCK の mRNA 発現量および酵素活性は、ZHOU らによ

る報告²¹⁾と同様の特徴が見られた。一方、興味深いことに、メトホルミンを投与しても、ニワトリ肝臓のG6PaseおよびPEPCKのmRNA発現量および、酵素活性は抑制されることはなかった。絶食によってニワトリではAMPKの活性化が起きなかったように、メトホルミンによる影響も、哺乳動物とニワトリの肝臓では、AMPK活性化の機構が異なるのかもしれない。

ニワトリはメトホルミンによる糖新生の抑制を肝臓より腎臓で大きく受けていた。むしろ、肝臓では腎臓での抑制を補うようにG6PaseとPEPCKのmRNA発現量および、酵素活性は増加していた。

結論として、糖新生酵素系に対するメトホルミンの影響は、ニワトリの腎臓では、哺乳動物の肝臓での反応と類似していたが、肝臓では糖新生酵素系の抑制が起きなかった。AMPKを介したメトホルミンの作用はニワトリ肝臓では哺乳動物と異なる可能性が示唆された。

これまで、ニワトリのAMPKと転写因子HNF4 α 、FoxO1の関連についての報告はまだない。メトホルミンを投与したときのニワトリの腎臓もしくは肝臓でのAMPK活性は未知である。哺乳動物において、AMPK活性化による作用は上述したG6PaseやPEPCKの抑制以外にも骨格筋グルコース取り込みの促進があることが知られている²¹⁾。すでに、哺乳動物で知られているAMPKの作用を、ニワトリでは腎臓も含めて検討することにより、ニワトリの糖新生機構について、解明が進むと考える。

参 考 文 献

- BAGINSKI, E.S., FOA, P.P. and ZAK, B. eds. (1974). *Glucose-6-phosphatase*. New York, Verlag Chemie International.
- BELO, P.S., ROMSOM, D.R. and LEVEILLE, G.A. (1976). Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken. *J. Nutr.*, **106**, 1135-1143.
- DAVISON, T.F. and LANGSLOW, D.R. (1975). Changes in plasma glucose and liver glycogen following the administration of gluconeogenic precursors to the starving fowl. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52**, 645-649.
- HARR, K.E. (2002). Clinical chemistry of companion avian species : A review. *Vet. Clin. Pathol.*, **31**, 140-151.
- HAZELWOOD, R.L. (1986). Carbohydrate metabolism. *Avian Physiology*, 303-325.
- JOMAIN BAUM, M., SCHRAMM, V.L. and HANSON, R.W. (1976). Mechanism of 3 mercaptopicolinic acid inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.*, **251**, 37-44.
- MUNDAY, M.R., MILIC, M.R., TAKHAR, S., HOLNESS, M.J. and SUGDEN, M.C. (1991). The short-term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat. *Biochem. J.*, **280**, 733-737.
- PROSZKOWIEC-WEGLARZ, M., RICHARDS, M.P., HUMPHREY, B.D., ROSEBROUGH, R.W. and MCMURTRY, J.P. (2009). AMP-activated protein kinase and carbohydrate response element binding protein : A study of two potential regulatory factors in the hepatic lipogenic program of broiler chickens. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.*, **154**, 68-79.
- SARKAR, N.K. (1971). Gluconeogenesis and the factors that control the process in chickens. *Life Sci.*, **10**, 293-300.
- SATO, T., KATAYAMA, K., ARAI, T., SAKO, T. and TAZAKI, H. (2008). Simultaneous determination of serum mannose and glucose concentrations in dog serum using high performance liquid chromatography. *Res. Vet. Sci.*, **84**, 26-29.
- SATO, T., SOEDA, S., OHTA, Y., KATAYAMA, K., ARAI, T. and TAZAKI, H. (2008). Plasma glucose, mannose, and non-esterified fatty acid concentrations in layer-type chickens. *Br. Poult. Sci.*, **49**, 731-735.
- SAVON, S.P., HAKIMI, P., CRAWFORD, D.R., KLEMM, D.J., GURNEY, A.L. and HANSON, R.W. (1997). The promoter regulatory regions of the genes for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken and the rat have different species-specific roles in gluconeogenesis. *J. Nutr.*, **127**, 276-285.
- TAGUCHI, T., MIWA, I., MIZUTANI, T., NAKAJIMA, H., FUKUMURA, Y., KOBAYASHI, I. and YABUUCHI, M. (2003). Determination of D-Mannose in plasma by HPLC. *Clin. Chem.*, **49**, 181-183.
- TAGUCHI, T., YAMASHITA, E., MIZUTANI, T., NAKAJIMA, H., YABUUCHI, M., ASANO, N. and MIWA, I. (2005). Hepatic glycogen breakdown is implicated in the maintenance of plasma mannose concentration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288**, E534-E540.
- TSUJI, A., TORRES-ROSADO, A., ARAI, T., LE BEAU, M.M., LEMONS, R.S., CHOU, S.H. and KURACHI, K. (1991). Hepsin, a cell membrane-associated protease : Characterization, tissue distribution, and gene localization. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16948-16953.
- VIOLLET, B., FORETZ, M., GUIGAS, B., HORMAN, S., DENTIN, R., BERTRAND, L., HUE, L. and ANDREELLI, F. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase in the liver : A new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol.*, **574**, 41-53.
- WATFORD, M. (1989). Hormonal and nutritional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels in chicken kidney. *J. Nutr.*, **119**, 319-322.
- WATFORD, M., HOD, Y. and CHIAO, Y.B. (1981). The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. The significance of a cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10023-10027.

- 19) WITTERS, L.A., GAO, G., KEMP, B.E. and QUISTORFF, B. (1994). Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase : Zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 413-419.
- 20) YAMAMOTO, I., KAIYA, H., TSUTSUI, C., SAKAI, T., TSUKADA, A., MIYAZATO, M. and TANAKA, M. (2008). Primary structure, tissue distribution, and biological activity of chicken motilin receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **156**, 509-514.
- 21) ZHOU, G., MYERS, R., LI, Y., CHEN, Y., SHEN, X., FENYK-MELODY, J., WU, M., VENTRE, J., DOEBBER, T., FUJII, N., MUSI, N., HIRSHMAN, M.F., GOODYEAR, L.J. and MOLLER, D.E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.*, **108**, 1167-1174.
-