

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13052

研究課題名(和文) ミトコンドリア由来新規ペプチドの日本人特異的な配列がインスリン作用に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of Amino acid replacement (K14Q) of mitochondria-derived MOTS-c on insulin action

研究代表者

福典之(FUKU, Noriyuki)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：40392526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、m.1382A>C多型によるMOTS-cのアミノ酸配列の違い(K14Q)がインスリン作用に及ぼす機序を解明することを目的とした。雄マウスではMOTS-c 14K投与群はプラセボ群やMOTS-c 14Q投与群よりも耐糖能が良好であった。一方、MOTS-c 14Q投与群はプラセボ群と同様の血糖変動を示した。雌マウスでは雄マウスの様な結果は示されなかった。また、MOTS-cの血中動態も雄マウスとは異なっていた。以上の結果は、日本人を中心とした北方アジア人に特異的な多型m.1382A>Cの有無が男性の2型糖尿病と関連するというメカニズムを説明するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Our epidemiological studies have revealed that mitochondrial DNA (m.) 1382 A>C polymorphism is associated with T2DM with lower physical activity in men, but not in women. However, the mechanism has not been proved yet. The purposes of this study is to clarify the effect of MOTS-c (K14Q) on glucose clearance in mice. CD1 mice were used in high fat diet-induced obesity and intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT). Mice were treated with MOTS-c (MOTS-c group, 0.5mg/kg/day; IP), MOTS-c (K14Q group), or distilled water (vehicle group), once in 2 days for 21 days. In male mice, body weight growth curve is lower in MOTS-c group than K14Q and vehicle group. MOTS-c group is also better in IPGTT than K14Q group. There are no differences in body weight growth curve among three type groups in female mice. These results suggest that MOTS-c amino acid replacement (K14Q) by m.1382 A>C polymorphism may influence prevalence of T2DM in lower activity men.

研究分野：スポーツ健康科学

キーワード：ミトコンドリアDNA 12S rRNA MOTS-c K14Q insulin action

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病の発症には、遺伝要因と環境要因の両方が影響を与えているが、最近のメタ解析によると、2 型糖尿病の遺伝率推定値は 72% (95% 信頼区間: 61-78%) であると報告されている (Willenssen et al. *Twin Res. Hum. Genet.*, 2015)。このように、2 型糖尿病の発症に遺伝要因が強く関与している。特に我が国における有病率は年々増加し 12.1% となっている (厚生労働省、平成 28 年国民健康・栄養調査)。東アジア系人種は肥満の有無に関わらず欧米人よりも 2 型糖尿病が発症しやすいことから、民族性に基づく遺伝的差異が 2 型糖尿病の発症に影響していることが示唆される。

ヒトのゲノムは、核ゲノムとミトコンドリアゲノム (mtDNA) から成る。mtDNA は、酸化的リン酸化系の中核的機能を担う 13 種のタンパク質と、それらの発現に必要な 2 種の rRNA (12S rRNA、16S rRNA) ならびに 22 種の tRNA をコードしている。すなわち、mtDNA にコードされる 13 種のタンパク質は、ミトコンドリアが独自に持つタンパク質合成系で翻訳される。

最近、mtDNA の 12S rRNA をコードする領域から転写される配列を用いて Mitochondrial Open-reading- frame of the Twelve S rRNA -c (MOTS-c) が核ゲノムコードを用いて翻訳されという従来の遺伝情報伝達の常識を覆す現象が報告され、その MOTS-c が骨格筋においてインスリン作用を向上させるという知見が動物を対象とした実験で得られている (Lee et al, *Cell Metab*, 2015)。この新規 MOTS-c をコードする mtDNA 塩基配列領域内には、日本人を含む北方アジア人に特異的な多型 m.1382A>C が存在する (Fuku et al, *Aging Cell*, 2015)。この多型は、MOTS-c の 14 番目のアミノ酸をリジン (K) からグルタミン (Q) に置換させることから何らかの機能的意義が存在すると考えられる。したがって、本研究課題では、このアジア人に特徴的な多型の有無とインスリン作用との関連を検討する。

2. 研究の目的

研究申請者らは、これまでに 12,000 名の一般住民コホートを有する佐賀大学との共同研究において、m.1382A>C 多型 (MOTS-c の K14Q) と身体活動量の組み合わせが 2 型糖尿病の有病率に関連するというデータを得ている (未発表資料)。

本研究課題では、この知見をさらに発展させ、m.1382A/C 多型による MOTS-c のアミノ酸置換 (K14Q) が耐糖能に与える影響について実験動物モデルを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

【実験動物】

8 週齢の CD1/ICR マウス (日本チャールス

リバー) を対象とした。明暗サイクルは 12 時間の飼育環境下で実験を行った。なお、飼料・飲料水は自由摂取させた。1 週間予備飼育をした後、各群の平均体重が等しくなるように 3 群に群分けを行った。

本実験は順天堂大学動物実験等管理規則に基づき、順天堂大学スポーツ科学部実験動物委員会の承認を受けて実施した。

【高脂肪食負荷およびペプチド投与】

飼料として 60% 脂肪食 (カロリー換算、HFD32, 日本クレア) を 3 週間自由採食させた。飼料は 2 日毎に計量し、摂餌量を求めた。また、マウスの体重を計測した。

高脂肪食開始と同時に、MOTS-c 投与を行った。3 群に対して、野生型 MOTS-c14K (0.5mg/kg/day), 変異型 MOTS-c14Q (同量) または蒸留水 (コントロール) の腹腔内投与を毎日行った。

【薬理動態学的試験】

雄性・雌性マウスそれぞれに対して野生型 MOTS-c14K を腹腔内投与し、直後の血中動態を 15 分毎に評価した。

【腹腔内グルコース負荷テスト】

Lee et al (*Cell Metab*, 2015) の方法を参考に、腹腔内グルコース負荷テストを行った。テスト当日は、空腹時のマウスに麻酔を施し、グルコース溶液 (1g/kg) を腹腔内投与した。その後、15 分毎に 120 分まで血糖値を測定した。血糖値の評価には、実験動物 (マウス) 用グルコース測定器 (ラボグルコ、FMC) を用いた。

【統計分析】

群間における体重や腹腔内グルコース負荷テストによる血糖値の変動の比較には、二元配置分散分析を行った。また、腹腔内グルコース負荷テストによる血糖値時間曲線下面積 (AUC) の比較は一元配置分散分析を行った。

4. 研究成果

【体重変動】

雄マウスでは高脂肪食負荷によって体重

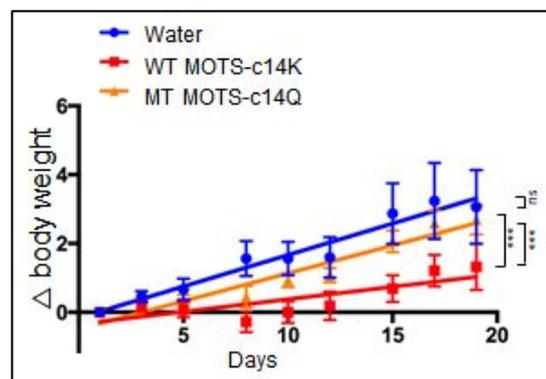


図 1 雄マウスにおける体重変動

*** P < 0.001

の増加量に群間差がみられ、野生型 MOTS-c 14K 投与群は変異型 MOTS-c 14Q 投与群やコントロール群よりも体重の増加が有意に少なかった(図1)。なお、摂餌に差はみられなかった。

雌マウスにおいては、雄マウスで観察されたような高脂肪食負荷による体重増加に群間差がみられなかった(図2)。

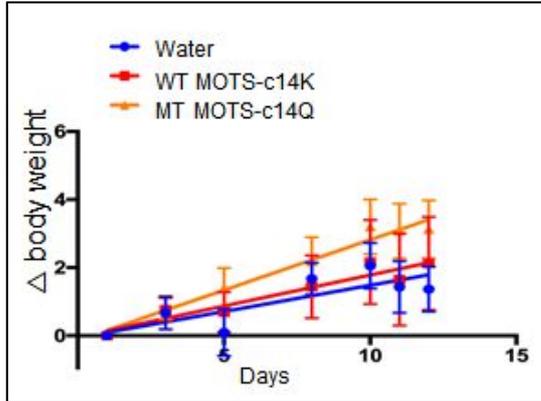


図2 雌マウスにおける体重変動

【薬理動態学的試験】

MOTS-c の腹腔内投与による血中濃度変化について、雄マウスでは30分以内に有意な濃度増加がみられたが、雌マウスでは血中変動がみられなかった。以上の結果から MOTS-c の作用に性差があると考えられた(図3)。

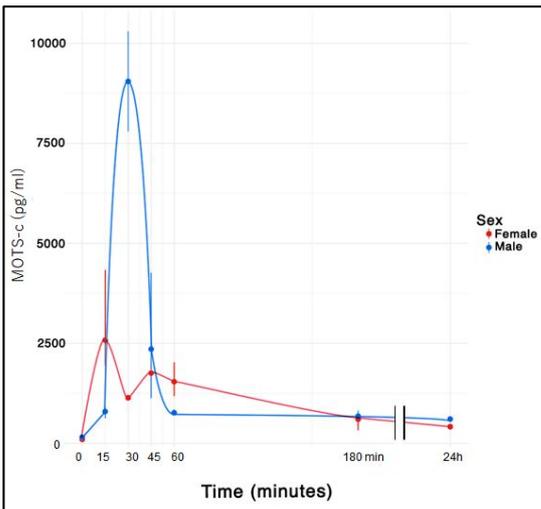


図3 MOTS-c の腹腔内投与による血中変動の性差。雄性マウスのみ大きな濃度変化がみられた。

【腹腔内グルコース負荷テスト】

雄性マウスに対する糖負荷試験において、野生型 MOTS-c14K 投与群はコントロール群や変異型 MOTS-c14Q 投与群よりも有意に耐糖能が良好であった。一方で変異型 MOTS-c14Q 投与群はコントロール群と同様の血糖変動を示した(図4)。また、時間曲線下面積も同様に、野生型 MOTS-c14K 投与群はコントロール群や変異型 MOTS-c14Q 投与群よりも有意に低

い値であった(図5)。

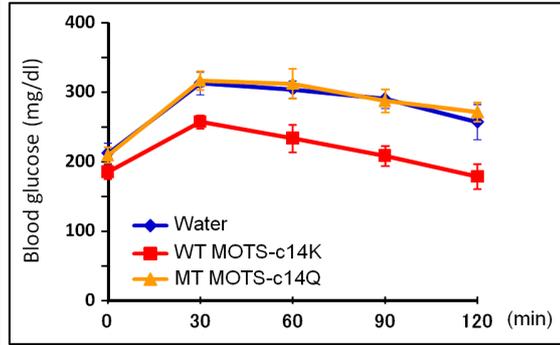


図4 腹腔内グルコース負荷テストによる雄マウスの血糖変動

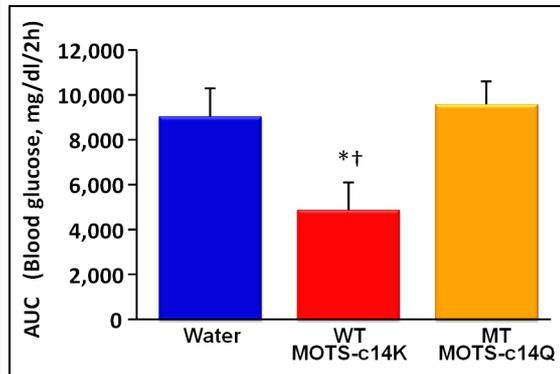


図5 腹腔内グルコース負荷テストによる雄マウスの血糖変動の時間曲線下面積

本研究の結果をまとめると、雄マウスでは野生型 MOTS-c 14K 投与群はコントロール群や変異型 MOTS-c 14Q 投与群よりも耐糖能が良好であった。一方、変異型 MOTS-c 14Q 投与群はコントロール群と同様の血糖変動を示した。雌マウスでは雄マウスの様な結果は示されなかった。また、MOTS-c の血中動態も雄マウスとは異なっていたことから、MOTS-c の作用に性差があると考えられた。以上の結果は、日本人を中心とした北方アジア人に特異的な多型 m. 1382A>C の有無が男性の2型糖尿病と関連するというメカニズムを説明するものと考えている。

今後の研究の推進方策として、MOTS-c の K14Q アミノ酸置換が肥満マウスの耐糖能に差異を与えた詳細なメカニズムを明らかにするため、組織や細胞レベルでの検討を実施する必要がある。特に、インスリンによる糖取り込みの律速段階となる糖輸送単体 (GLUT4) ならびに AMPK 経路、インスリンシグナル経路の関与を解析するため、摘出した組織を用いてリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法により遺伝子発現ならびにタンパク質発現の評価を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件) 査読ありのみ

1. Zempo H, Miyamoto-Mikami E, Kikuchi N, Fuku N, Miyachi M, Murakami H. Heritability estimates of muscle strength-related phenotypes: A systematic review and meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports*. 27(12):1537-1546, 2017.
2. Kumagai H, Tobina T, Ichinoseki-Sekine N, Kakigi R, Tsuzuki T, Zempo H, Shiose K, Yoshimura E, Kumahara H, Ayabe M, Higaki Y, Yamada R, Kobayashi H, Kiyonaga A, Naito H, Tanaka H, Fuku N. Role of selected polymorphisms in determining muscle fiber composition in Japanese men and women. *J Appl Physiol* (1985). 2018. [in press]
3. Wang G, Durussel J, Shurlock J, Mooses M, Fuku N, Bruinvels G, Pedlar C, Burden R, Murray A, Yee B, Keenan A, McClure JD, Sottas PE, Pitsiladis YP. Validation of whole-blood transcriptome signature during microdose recombinant human erythropoietin (rHuEpo) administration. *BMC Genomics*. 18(Suppl 8):817, 2017.
4. Fuku N, Díaz-Peña R, Arai Y, Abe Y, Zempo H, Naito H, Murakami H, Miyachi M, Spuch C, Serra-Rexach JA, Emanuele E, Hirose N, Lucia A. Epistasis, physical capacity-related genes and exceptional longevity: FNDC5 gene interactions with candidate genes FOXO3 and APOE. *BMC Genomics*. 18(Suppl 8):803, 2017.
5. Kikuchi N, Zempo H, Fuku N, Murakami H, Sakamaki-Sunaga M, Okamoto T, Nakazato K, Miyachi M. Association between ACTN3 R577X polymorphism and trunk flexibility in 2 different cohorts. *Int J Sports Med*. 38(5):402-406, 2017.
6. Ishioka YL, Gondo Y, Fuku N, Inagaki H, Masui Y, Takayama M, Abe Y, Arai Y, Hirose N. Effects of the APOE 4 allele and education on cognitive function in Japanese centenarians. *Age (Dordr)*. 38(5-6):495-503, 2016.
7. Zempo H, Miyamoto-Mikami E, Kikuchi N, Fuku N, Miyachi M, Murakami H. Heritability estimates of muscle strength-related phenotypes: A systematic review and meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports*. 2016. [in press]
8. Fuku N, Alis R, Yvert T, Zempo H, Naito H, Abe Y, Arai Y, Murakami H, Miyachi M, Pareja-Galeano H, Emanuele E, Hirose N, Lucia A. Muscle-related polymorphisms MSTN rs1805086 and ACTN3 rs1815739 are not associated with exceptional longevity in
9. Fuku N, Díaz-Peña R, Arai Y, Abe Y, Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F,

Santos-Lozano A, Zempo H, Naito H, Murakami H, Miyachi M, Venturini L, Ricevuti G, Nobuyoshi H, Emanuele E, Lucia A. rs2802292 polymorphism in the FOXO3A gene and exceptional longevity in two ethnically distinct cohorts. *Maturitas*. 92:110-114, 2016.

〔学会発表〕(計4件)

1. 膳法浩史、宮本(三上)恵里、菊池直樹、福典之、宮地元彦、村上晴香. 筋力関連表現型の遺伝率推定に関するメタ解析. 第71回日本体力医学会大会. 岩手, 日本, 2016年9月
2. 福典之. 理系研究者からみた体育学の未来. 日本体育学会 第68回大会. 静岡, 日本, 2017年9月
3. 膳法浩史、福典之、熊谷仁、西田裕一郎、桧垣靖樹、内藤久土、原めぐみ、田中恵太郎. ミトコンドリア DNA 由来ペプチド MOTS-c のアミノ酸置換 (K14Q) は身体活動量の低い男性における 2 型糖尿病に関連する. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 日本, 2017年9月
4. 福典之. 生活習慣病や長寿に対する mtDNA 由来新規ペプチドの日本人特異的配列の影響. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 日本, 2017年9月

〔図書〕(計3件)

1. 福典之: スポーツと遺伝、新・スポーツ生理学、村岡功監修、230 ページ、市村出版、東京、2015 年
2. Miyamoto-Mikami E, Fuku N, Tanaka M: Genetic polymorphisms associated with elite athlete status, *Sports Performance*, 388 pages, Springer, Tokyo, 2015.
3. 福典之: 遺伝的体質で適正種目の選択や効果的なトレーニング方法がわかるのか? - 運動によって大腸がんの発症は予防できるのか? - 遺伝子ドーピング、もっとなっとく使えるスポーツサイエンス、征矢英昭、本山貢、石井好二郎編集、192 ページ、講談社、東京、2017 年 4 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

順天堂大学研究者情報データベース
<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=5437>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
福典之 (FUKU Noriyuki)
順天堂大学大学院・スポーツ健康科学研究科・准教授

研究者番号：40392526

(2)研究分担者

膳法 浩史 (ZEMPO, Hirofumi)

東京聖栄大学・講師

研究者番号：90749285

熊谷 仁 (KUMAGAI, Hiroshi)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・研究員

研究者番号：00794819

(3)連携研究者

田村 好史 (TAMURA, Yoshifumi)

順天堂大学・教授

研究者番号：80420834

(4)研究協力者

宮本 恵里 (MIYAMOTO, Eri)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・助教

研究者番号：00793390