

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2006～2008

課題番号：18300220

研究課題名（和文） 運動で増加する転写補助因子等による骨格筋 GLUT4 発現増加の分子機構に関する研究

研究課題名（英文） A STUDY ON MECHANISMS OF GLUT4 EXPRESSION BY PHYSICAL EXERCISE-INDUCED PGC-1 $\alpha$  EXPRESSION

研究代表者

田畑 泉 (IZUMI TABATA)

独立行政法人 国立健康・栄養研究所 健康増進プログラム・プログラムリーダー

研究者番号：20188402

研究成果の概要：

本研究では、ラットを対象とした5日間の高強度及び低強度の水泳トレーニング後の骨格筋を骨格筋のプロテオーム解析(proteome analysis)をもちいて、タンパク質の発現変動を網羅的かつ定量的に検出した。2D-DIGE によって骨格筋で発現変動するタンパク質を解析し、興味あるタンパク質スポットを質量分析(MALDI-TOF/MS)によって同定した。その結果、LIT は有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 22 個存在し 19 個のタンパク質を同定した。HIT では有意に発現が増減したスポットが 13 個存在し、13 個すべてのタンパク質を同定した。このうち、共通して発現増加したミトコンドリア系酵素タンパク質は ATPsyn $\beta$ 、OGDH、m-MDH の 3 種類であった。これまでに運動との関連で報告のないタンパク質(ATPsyn $\alpha$ 、NDUFS1、-2、UQCRC1)が同定された。これらの結果より、高強度トレーニングにより骨格筋の有酸素性代謝能の改善に関係の深いミトコンドリアタンパク質が発現増加することが明らかになった。速筋線維で発現が高い筋弛緩因子である parvalbumin(PV)が、どの運動トレーニングによっても共通して発現減少した。特に、高強度の運動トレーニングでこの PV が減少することが初めて明らかとなった。トレーニングによる GLUT4 増加に関する機序に関連する転写因子について両トレーニングにより増加するものは同定できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008 年度	5,200,000	1,590,000	6,790,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,590,000	19,790,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：体育学

キーワード：骨格筋、GLUT4、糖代謝、PGC-1 $\alpha$ 、運動トレーニング

## 1. 研究開始当初の背景

身体トレーニングにより骨格筋の糖代謝能が向上することは、古くから知られていた。しかし、それがトレーニングによる骨格筋の糖輸送担体(glucose transporter-4: GLUT-4)の増加によるものであることが明らかとなったのは1990年(Duen et al 1990)である。その後の研究により、身体トレーニングはMEF2(myocyte enhancing factor 2)を増加させ、それがGLUT-4の新生を引き起こしていることなどが明らかになった。その後、GLUT-4 enhancing factor (GEF)やミトコンドリアの新生に関係していると思われるnuclear respiratory factor-1(NRF-1)などの転写因子も筋収縮によるGLUT-4の発現に関係している可能性を示唆する研究もあり、運動・筋収縮によるGLUT-4増加の分子生物学的機序は解明されていない。

1998年に寒冷暴露によるGLUT-4発現の機序に関係のある核内蛋白質としてPGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1)が発見された(Puigserver et al. 1998)。PGC-1 $\alpha$ は、転写活性化補助因子で、複数の蛋白質の転写因子の活性化補助因子である。申請者らは、寒冷暴露と身体運動に対する骨格筋の適応やその機序は同一の場合が多いと考え、身体運動によりPGC-1 $\alpha$ がどのように発現するかを観察し結果、身体運動によりPGC-1 $\alpha$ 蛋白質も増加することを観察した。また、その機序として、試験管内での実験により筋活動により活性化する5' AMP-activated protein kinase(AMPK)とCAMK IIが関与していることを明らかにした(Terada & Tabata,

2004)。最近では、この転写補助因子は身体活動・トレーニングにより同時に起こる骨格筋の多くの適応反応を司るタンパク質の発現のマスター・キーとしての可能性が知られており、多くの研究者がその研究を行っている。

申請者らは、いち早く、この分子の身体運動に対する反応に関する研究を開始し、PGC-1 $\alpha$ が身体トレーニングで増加することを明らかにした(Goto et al 2000)。この分子は、その後、骨格筋のGLUT-4発現にも影響を与えている可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、身体活動・トレーニングが骨格筋のGLUT-4濃度を増加させる機序を明らかにすることを目的にまず、GLUT-4との関係が知られている既知の転写因子、転写補助因子の身体運動・トレーニングに対する反応及び試験管内におけるシミュレーションを通して、メッセージレベル及びタンパク質レベルで明らかにする。また、それらの転写因子等とDNAとの結合の関係を明らかにする。また、GLUT-4の発現はDNAからmRNAへの転写過程とさらにタンパク質への翻訳過程の両方により制御されている可能性があるのが、実際の身体運動後のこの2つの過程の実際のGLUT-4の発現に対する貢献度を明らかにするための実験を行う。これらの研究により、筋収縮による筋内の情報伝達系の賦活化によるGLUT-4の転写から翻訳までの道りが定量的に明らかになると考えられる。

従来、報告されている系では、GLUT-4発現の全部は説明できない。そこで、本研究では、

未知タンパク質の網羅的解析法であるプロテオミクス法を用いて、身体運動が GLUT-4 を増加させる機序の中の未知の部分すなわち身体活動・筋収縮により増加する未知のタンパク質を探索し、それと GLUT-4 発現に係わりを明らかにし、GLUT-4 の発現の一部を制御する未知の運動関連タンパク質を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

5 日間の高強度・短時間運動及び低強度・長時間水泳運動トレーニング後のラットの筋(epitrochlearis)と安静時筋のタンパク質の発現量の差をプロテオミクス法により解析し、PGC-1 $\alpha$ 以外でその発現量が1.3倍以上に増加しているタンパク質を検索し、質量分析法やアミノ酸配列から、転写因子を含む新規のタンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

本研究では、ラットを対象とした5日間の高強度及び低強度の水泳トレーニング後の骨格筋を骨格筋のプロテオーム解析(proteome analysis)をもちいて、タンパク質の発現変動を網羅的かつ定量的に検出した。2D-DIGE によって骨格筋で発現変動するタンパク質を解析し、興味あるタンパク質スポットを質量分析(MALDI-TOF/MS)によって同定した。その結果、LIT はプロテオーム解析により有意に 1.3 倍以上発現が増減したスポットが 22 個存在し 19 個のタンパク質を同定した。HIT では有意に発現が増減したスポットが 13 個存在し、13 個すべてのタンパク質を同定した。そのうち LIT、さらに HIT でも数多くのミトコンドリア系酵素の発現が増加した。このうち、共通して発現増加したタンパク質は ATPsyn $\beta$ 、OGDH、m-MDH の 3 種類であった。これまでに運動との関連で報告のないタンパク質(ATPsyn $\alpha$ ,

NDUFS1, -2, UQCRC1)が同定された。これらの結果より、高強度トレーニングにより骨格筋の有酸素性代謝能の改善に関係の深いミトコンドリアタンパク質が発現増加することが明らかになった。速筋線維で発現が高い筋弛緩因子である parvalbumin(PV)が、どの運動トレーニングによっても共通して発現減少した。特に、高強度の運動トレーニングでこの PV が減少することが初めて明らかとなった。ミトコンドリアの酸化系タンパク質の発現に PV が影響を与えている可能性を示した先行研究と本研究の結果から、PV の減少は必ずしも筋弛緩の機能低下を示しているのではなく、このタンパク質の発現と、筋の酸化的代謝能力(ミトコンドリア酵素活性の上昇など)の向上との関係があることが示唆された。トレーニングによる GLUT4 増加に関する機序に関連する転写因子について両トレーニングにより増加するものは同定できなかった。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1) Fujimoto E, W Yamaguchi, S Terada, M Higuchi, I Tabata. Effect of low-intensity prolonged swimming exercise on exercise-induced expression of PGC-1 $\alpha$  in rat skeletal muscle. 54th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, 2007.5.31. New Orleans, USA

2) 藤本恵理、樋口満、田畑泉. 一過性の低強度長時間水泳運動後のラット滑車筋の PGC-1 $\alpha$ 濃度健康増進プログラム. 第 62 回日本体力医学会大会: 2007.9.15: 秋田市.

3) 藤本恵理、寺田新、東田一彦、樋口満、田

畑泉. 低強度長時間水泳運動後のラット骨格筋PGC-1 $\alpha$ の変化. 日本体力医学会第63回大会. 大分県別府市ビーコンプラザ. 9月18日2008.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田畑泉 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所 健康増進プログラム プログラムリーダー)

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤本恵理 (早稲田大学スポーツ科学学術院博士課程)

山口 航 (早稲田大学スポーツ科学学術院修士課程)