

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300225
 研究課題名(和文) 運動は MEF2 を介して GLUT4 を増加させるか
 研究課題名(英文) Is an increase in GLUT4 mRNA in response to exercise training mediated by MEF2?
 研究代表者
 江崎 治 (EZAKI OSAMU)
 独立行政法人国立健康・栄養研究所 基礎栄養プログラム・プログラムリーダー
 研究者番号：90191923

研究成果の概要(和文)：運動による GLUT4 発現量増加に転写因子 MEF2 が関与するかどうか調べた。骨格筋特異的に MEF2A を過剰発現させたマウスでは、GLUT4 発現量増加は認められなかった。MEF2 を活性化し、運動で増加する PGC-1 α -b と PGC-1 α -c を筋肉過剰発現したマウスでも GLUT4mRNA の増加は認められなかった。以上の結果から、MEF2 は運動による GLUT4mRNA 増加に関与していないことが想定された。

研究成果の概要(英文)：To examine whether MEF2 was involved in an increase in GLUT4 mRNA by exercise training, MEF2 overexpressed transgenic mice in skeletal muscles were produced. MEF2 overexpressed mice did not increase GLUT4 mRNA in skeletal muscles. Transcription co-activators, PGC-1 α -b and PGC-1 α -c, are increased by exercise training and activate MEF2. However, PGC-1 α -b or PGC-1 α -c overexpressed mice did not increase GLUT4 mRNA in skeletal muscles. These data suggested that MEF2 was not involved in an increase in GLUT4 mRNA by exercise training.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康 スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：インスリン抵抗性、GLUT4、運動、高脂肪食、トランスジェニックマウス、筋肉、脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病予防に重要だと思われる2つの変化が、運動を繰り返し行った後(トレーニング)の筋肉で認められる。1つはインスリン感受性糖輸送体(GLUT4)の発現量の増加であり、もう一つはミトコンドリアの数の増加である。GLUT4は、末梢組織での糖代謝の律速段階になっていて、GLUT4の増加は耐糖能を高め、糖尿病を予防する。筋肉を

動かす(急性効果)と、AMPキナーゼが活性化され、細胞内GLUT4が細胞膜へ移動し、血中の糖が筋肉へ流入すると想定されている。運動トレーニング(慢性効果)で認められる持続的なAMPキナーゼの活性化は、GLUT4の発現量増加を生じるのではないかと期待されたが、 α 2-AMPK knockout miceを運動トレーニングさせると、wild-type miceと同じようにGLUT4が増加することから、

AMP キナーゼの活性化は GLUT4 の発現量増加には関与しないことが報告された。このように、未だ GLUT4 の発現増加に関与する転写因子は同定されていない。

一方、筋肉でのミトコンドリア数の増加は、脂肪組織から放出されている FFA を処理しやすくし、間接的に抗肥満作用に関与すると考えられている。運動によるミトコンドリア数増加は転写共役因子 PGC-1 α 量の増加が原因の一つである。一方、筋細胞を用いた研究から、転写共役因子 PGC-1 α が GLUT4 を増加させ、転写因子 MEF2 を活性化させ、PGC-1 α が GLUT4 を増加させる可能性が指摘されている。しかし、*in vivo* で、運動による PGC-1 α の増加が、転写因子 MEF2 を活性化させ、GLUT4 の発現量を増加させることができるかどうかは明らかでない。

2. 研究の目的

運動による GLUT4 発現増加に関与する転写因子に至るまでの情報伝達系として、これで AMP キナーゼの関与が想定されていたが、申請者らの実験を含めいくつかの実験により否定された。これに代わる情報伝達系の酵素としてカルモジュリンキナーゼ (CaMK) や p38mitogen-activated protein キナーゼ (MAPK) が考えられている。一方、それらの下流に位置する、運動による GLUT4 遺伝子発現増加に関与する転写因子として、MEF2 がある。人においても、運動後、MEF2A/D の GLUT4 遺伝子 MEF2 結合部位への結合能が 2 倍程度亢進することが示されている (McGee S, FASEB J, 2005)。今までに我々は、MEF2 結合部位に点変異が入ったミニジーン GLUT4 トランスジェニックマウスを作製し、このマウスの表現型を分析してきた。MEF2 結合部位に点変異が入ったミニジーン GLUT4 トランスジェニックマウスでは、外来性の遺伝子ミニジーン GLUT4 は心筋には発現しないが、骨格筋には発現が認められている。しかし、他の研究グループによるレポーター遺伝子を用いる研究では、MEF2 結合部位に点変異を導入したマウスでは骨格筋でレポーター遺伝子の発現がまったく認められない (Thai MV et al, JBC, 1998, 14285)。

EST ライブラリーを検索中、PGC1- α mRNA にはスプライシングやエクソンの異なる 3 種類 (PGC1- α -a, PGC1- α -b, PGC1- α -c) が存在することを新規に見いだした。今まで知られていたのは PGC1- α -a である。PGC1- α -b, PGC1- α -c は蛋白質に翻訳された場合、PGC1- α -a に比べて少し小さいサイズになる。PGC1- α -b, PGC1- α -c はエクソン 1b を使用するのに対し、PGC1- α -a はエクソン 1a を用いる。発現調節機序も異なり、筋肉に於いて運動で増加するのは、新しく見

いだした PGC1- α -b と PGC1- α -c の mRNA であり、PGC1- α -a mRNA 量は変化しなかった。一方、肝臓において絶食で増加するのは PGC1- α -a mRNA で、PGC1- α -b と PGC1- α -c の mRNA 発現量は増加しなかった。褐色脂肪細胞で寒冷により増加するのは PGC1- α -b であり、PGC1- α -a は変化しなかった。PGC1- α -a マウスでは筋萎縮が認められているが、PGC1- α -b マウスでは筋萎縮が認められていない。

本研究では、MEF2 過剰発現トランスジェニックマウスや運動で増加する PGC-1 α (PGC1- α -b, PGC1- α -c) を過剰発現したマウスを用いて、GLUT4 発現増加に MEF2/PGC-1 α が関与するか明らかにする。

3. 研究の方法

実験 1 運動を行うと MEF2 を介した転写活性化がおこることが多数報告されている。GLUT4 の発現調節領域にも MEF2 結合部位があるため、運動による GLUT4 発現増加に MEF2 結合部位が関与している可能性がある。そこで骨格筋特異的に MEF2A を過剰発現させたマウスを作製し、1 ラインのトランスジェニックマウスを得た。

実験 2 PGC1- α -b, PGC1- α -c 過剰発現マウスを作成し、骨格筋 (Gastrocnemius) での主要な遺伝子の発現量を Real-time PCR 法で測定した。

実験 3 これまでの実験より骨格筋特異的 PGC-1 α isoform 過剰発現マウスの多くの line で活動期 (暗期) でのエネルギー代謝の亢進が認められている。そこで筋萎縮を生じない、PGC-1 α -b 過剰発現マウスの 2 の独立したラインに、高脂肪食負荷し耐糖能を悪化させた状態で、GTT, ITT, DEXA, 組織重量を測定し、糖/脂質代謝への影響を調べた。

飼料 : 飼料には通常固形飼料 CE-2 と市販の High fat diet 固形飼料 HFD-32 (日本クレア) を使用した。

動物・試験群

CE-2 群 : PGC-1 α -b line A (5 copy), female, 12 週齢, n=5

PGC-1 α -b line B (1 copy), female, 12~13 週齢, n=3

HFD-32 群 : PGC-1 α -b line A (5 copy), female, 12 週齢, n=5

PGC-1 α -b line B (1 copy), female, 12~13 週齢, n=3

対照としてそれぞれの Littermate Wild type mice を用いた。

GTT (Glucose tolerance test), ITT (Insulin

tolerance test) : 高脂肪食負荷 15 週目にこれらの検査を行った。GTT は絶食 12h 後、1mg/kg グルコース溶液の経口投与を行い、投与後の血糖を測定した。ITT は 0.75mU/kg インスリンを腹腔内投与し、その後の血糖を測定した。

解剖 : GTT, ITT 測定から 1 週間後 (高脂肪食負荷 16 週目) に解剖を行い、DEXA 及び組織重量の測定を行った。

4. 研究成果

実験 1 : 骨格筋でのみ MEF2A 発現が 2 倍程度増加し、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、肝臓、脾臓、肺、脳には発現は認められなかった。又、MEF2A によって制御されているとされる遺伝子 GLUT4 および PGC-1 α 発現量を real time PCR 法で調べたが、増加は認められなかった。GTT を行っても野生型マウスとの間に差は認められなかった。このマウスに運動負荷をかけてもその変化にトランスジェニックの影響は認められなかった。(表 1 に示さず)

実験 2 : 結果を表 1 に示す。PGC-1 α -b/A, PGC-1 α -c/C 過剰発現マウスではそれぞれのアイスフォームの増加とともに、PGC-1 α -a 発現の減少が見られた (Positive feedback は認められていない)。ミトコンドリア関連遺伝子 (mTFA, COX2, COX4), ERR α を始めとした PGC-1 α ターゲット遺伝子の発現増加は観察されたが、GLUT4 増加は認められていない。MEF2 の発現量にも影響を与えていない。ミトコンドリア関連 mRNA の発現増加が観察されていることから、ミトコンドリア数が推定される。VEGF の発現増加により血流量を増加させる ERR α も増加させていることから、毛細血管数の増加も推定される。PGC-1 α -b, c isoform トランスジェニックマウスではこれらの機序により、エネルギー代謝が亢進しているものと考えられた。

実験 3 : 結果を表 2 に示す。PGC-1 α -b/A では、高脂肪食摂取により Wt と比較し体重、体脂肪増加が認められた。GTT, ITT においても体重増加のよると考えられる耐糖能の悪化が認められ、GLUT4 は増加していないと考えられた。PGC-1 α -b/B では体重増加の抑制が見られているが、耐糖能の悪化が認められている。PGC-1 α -b/A ではの体脂肪増加は、PGC-1 α -b/B において体重増加の促進が見られないことから、遺伝子が導入された部位の影響によることが想定される。

考察 :

骨格筋特異的に MEF2A を過剰発現させたマウスを作製したが、GLUT4 発現量の増加は認め

られなかった。筋肉に於いて運動で増加する PGC-1 α -b と PGC-1 α -c を筋肉特異的に過剰発現したマウスの GLUT4 mRNA 量を測定した。PGC-1 α -b と PGC-1 α -c の両ラインの雄、雌ともミトコンドリア関連遺伝子の発現増加は認められたが、GLUT4 mRNA の増加は認められなかった。更に、PGC-1 α -b の独立した 2 つのラインの雌を用いて、高脂肪食を摂取させ負荷を与えた状態で、糖負荷試験、インスリン負荷テストを行った。興味深いことに高脂肪食により異なる表現型が得られた。PGC-1 α -b/A では、コントロールマウスに対しより肥満、PGC-1 α -b/B では、コントロールマウスに対しよりやせになったが、糖負荷試験ではどちらのラインでも耐糖能の悪化が見られ、GLUT4 機能が亢進していないことが、in vivo の結果からも推定された。

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 7 件)

- 1) The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen BR, Kitamura T, Nishino I, Suganami T, Ezaki O, Ogawa Y. *Biochem J.* 427:171-178, 2010.
- 2) Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. Kamei Y, Suganami T, Ehara T, Kanai S, Hayashi K, Yamamoto Y, Miura S, Ezaki O, Okano M, Ogawa Y. *Obesity (Silver Spring).* 18:314-321, 2010.
- 3) Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3-Knockout mice are resistant to diet-induced obesity and show increased activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. Setsuie R, Suzuki M, Kabuta T, Fujita H, Miura S, Ichihara N, Yamada D, Wang YL, Ezaki O, Suzuki Y, Wada K. *FASEB J.* 23:4148-4157, 2009.
- 4) Overexpression of FOXO1 in skeletal muscle does not alter longevity in mice. Chiba T, Kamei Y, Shimizu T, Shirasawa T, Katsumata A, Shiraishi L, Sugita S, Ogawa Y, Miura S, Ezaki O. *Mech Ageing Dev.* 130:420-428, 2009.
- 5) α 2-AMPK activity is not essential for an increase in fatty acid oxidation during

low-intensity exercise. Miura S, Kai Y, Kamei Y, Bruce CR, Kubota N, Febbraio MA, Kadowaki T, Ezaki O. Am J Physiol Endocrinol Metab. 296: E47-E55, 2009.

- 6) Isoform-Specific Increases in Murine Skeletal Muscle Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in Response to 2-Adrenergic Receptor Activation and Exercise. Miura S, Kai Y, Kamei Y, Ezaki O. Endocrinology. 149: 4527-4533, 2008.
- 7) An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by α -adrenergic receptor activation. Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O. Endocrinology. 148:3441-3448, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Fibrate treatment causes muscle atrophy with increased FOXO1 mRNA in a PPAR α -dependent manner in mice. Miura S, Kai Y, Ezaki O. The 69th American Diabetes Association Scientific Sessions, 2009. 6. 6, New Orleans, LA, USA.
- 2) QOL の視点から望ましい食事と運動の姿を考える. 江崎治. 第 10 回 日本 QOL 学会, 2009. 9. 27, 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 (東京)
- 3) 骨格筋特異的RXR γ 過剰発現マウスは糖代謝改善作用を示す. 杉田聡、亀井康富、赤池史子、菅波孝洋、金井紗綾香、三浦進司、江崎治、小川佳宏. 第 30 回日本肥満学会, 2009.10. 9, アクトシティ浜松 (静岡)
- 4) 肥満とDNAメチル化 : DNAメチル化酵素遺伝子改変マウスとメチル化促進飼料による検討. 亀井康富、菅波孝洋、江原達弥、金井紗綾香、三浦進司、江崎治、小川佳宏. 第 30 回日本肥満学会, 2009. 10. 9, アクトシティ浜松 (浜松市)
- 5) 骨格筋におけるFOXO1 によるタンパク分解酵素カテプシンL遺伝子の転写調節. 山崎芳浩、亀井康富、三浦進司、杉田聡、赤池史子、金井紗綾香、平田結喜緒、江崎治、菅波孝洋、小川佳宏. 第 30 回日本肥満学会, 2009.10. 9, アクトシティ浜松 (浜松市)

[図書] (計 1 件)

- 1) 河盛隆造・岩本安彦 編集 江崎治. 糖尿病最新の治療 2010-2012. 運動療法の効果と実際, 注意点. 南江堂 99-104, 2010.

[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

江崎 治 (EZAKI OSAMU)

独立行政法人国立健康・栄養研究所

基礎栄養プログラム・プログラムリーダー

研究者番号 : 90191923

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

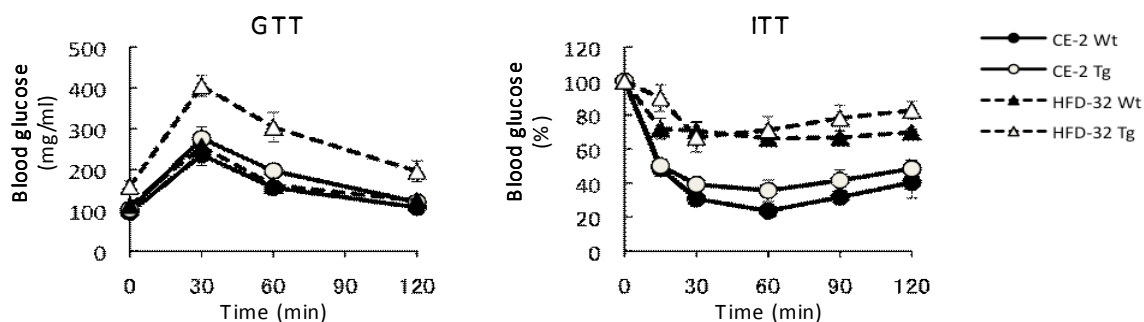
表 1

Male					
	Wt n=3	PGC-1 α -b/A n=2	PGC-1 α -c/C n=2		
PGC-1 α -a	100 \pm 15	33 \pm 0	40 \pm 2		
PGC-1 α -b	100 \pm 70	7855 \pm 206	9 \pm 3		
PGC-1 α -c	100 \pm 33	15 \pm 1	5897 \pm 1699		
Total PGC-1 α	100 \pm 37	1333 \pm 26	2143 \pm 413		
GLUT4	100 \pm 10	99 \pm 22	135 \pm 38		
PDK4	100 \pm 21	142 \pm 21	257 \pm 181		
mTFA	100 \pm 12	209 \pm 38	308 \pm 10		
COX2	100 \pm 12	207 \pm 1	212 \pm 22		
COX4	100 \pm 14	193 \pm 14	228 \pm 12		
ERR α	100 \pm 13	230 \pm 7	202 \pm 37		
MCAD	100 \pm 11	193 \pm 16	198 \pm 15		
MyHC1	100 \pm 9	75 \pm 20	62 \pm 4		
MyHC2A	100 \pm 13	79 \pm 1	91 \pm 4		
MyHC2B	100 \pm 5	39 \pm 5	44 \pm 5		
MyHC2X	100 \pm 14	119 \pm 9	127 \pm 24		
MyoD	100 \pm 8	90 \pm 0	124 \pm 25		
MEF2A	100 \pm 17	78 \pm 0	84 \pm 15		
MEF2C	100 \pm 12	99 \pm 3	125 \pm 12		
MEF2D	100 \pm 14	69 \pm 1	81 \pm 10		

Female					
	Wt n=3	PGC-1 α -b/A n=2	PGC-1 α -c/C n=2		
PGC-1 α -a	100 \pm 4	44 \pm 2	47 \pm 11		
PGC-1 α -b	100 \pm 31	6845 \pm 277	21 \pm 16		
PGC-1 α -c	100 \pm 27	8 \pm 0	4130 \pm 157		
Total PGC-1 α	100 \pm 4	1282 \pm 21	1964 \pm 545		
GLUT4	100 \pm 9	125 \pm 5	117 \pm 8		
PDK4	100 \pm 14	183 \pm 61	949 \pm 375		
mTFA	100 \pm 12	185 \pm 3	249 \pm 45		
COX2	100 \pm 10	334 \pm 13	237 \pm 15		
COX4	100 \pm 3	366 \pm 6	351 \pm 21		
ERR α	100 \pm 4	340 \pm 4	359 \pm 5		
MCAD	100 \pm 4	219 \pm 18	251 \pm 52		
MyHC1	100 \pm 18	55 \pm 17	278 \pm 10		
MyHC2A	100 \pm 10	106 \pm 15	153 \pm 17		
MyHC2B	100 \pm 3	57 \pm 5	29 \pm 4		
MyHC2X	100 \pm 22	199 \pm 8	161 \pm 21		
MyoD	100 \pm 7	75 \pm 1	190 \pm 12		
MEF2A	100 \pm 11	89 \pm 6	103 \pm 21		
MEF2C	100 \pm 14	131 \pm 7	157 \pm 25		
MEF2D	100 \pm 5	83 \pm 1	111 \pm 7		

表2

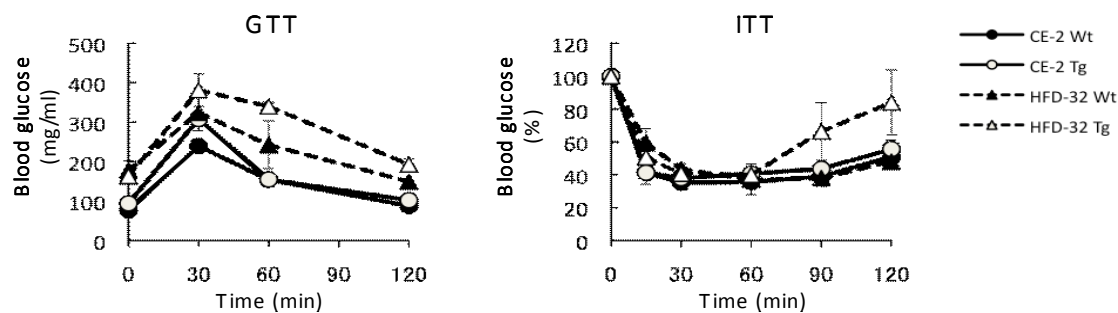
PGC-1 α -b/A



DEXA, 組織重量

	CE-2		PGC-1 α -b/A		HFD-32		PGC-1 α -b/A		Two way ANOVA		
	Wt	n=3	Wt	n=5	Wt	n=4	Wt	n=5	diet	gene	diet*gene
Body weight (g)	23.6	± 0.9	26.1	± 1.0	41.1	± 1.7	58.1	± 4.0	<.0001	0.0032	0.0188
Gastrocnemius (g)	0.253	± 0.012	0.227	± 0.005	0.295	± 0.005	0.296	± 0.010	<.0001	0.1578	0.1253
Quadriceps (g)	0.334	± 0.020	0.306	± 0.008	0.375	± 0.012	0.564	± 0.041	<.0001	0.0102	0.0014
Liver (g)	1.19	± 0.07	1.33	± 0.06	1.94	± 0.16	2.11	± 0.25	0.0008	0.3883	0.9276
Gonadal WAT (g)	0.368	± 0.030	0.693	± 0.093	3.292	± 0.421	3.677	± 0.189	<.0001	0.1605	0.9012
Subcutaneous WAT (g)	0.45	± 0.01	0.66	± 0.12	2.87	± 0.41	6.04	± 0.36	<.0001	<.0001	0.0003
BAT (g)	0.060	± 0.004	0.069	± 0.005	0.155	± 0.029	0.191	± 0.022	0.0001	0.2769	0.5155
Bone Mineral Density (g/cm ²)	0.048	± 0.001	0.044	± 0.000	0.055	± 0.002	0.048	± 0.001	0.0003	<.0001	0.1042
Lean (g)	17.40	± 0.70	17.98	± 0.33	19.60	± 0.77	22.38	± 0.65	0.0002	0.0188	0.1025
Fat (g)	4.27	± 0.12	6.22	± 0.75	18.03	± 2.55	32.52	± 3.42	<.0001	0.0055	0.0249
% Fat	19.6	± 0.2	25.3	± 2.1	47.3	± 4.7	58.6	± 2.1	<.0001	0.0112	0.3416

PGC-1 α -b/B



DEXA, 組織重量

	CE-2		PGC-1 α -b/B		HFD-32		PGC-1 α -b/B		Two way ANOVA		
	Wt	n=3	Wt	n=3	Wt	n=2	Wt	n=3	diet	gene	diet*gene
Body weight (g)	23.6	± 0.8	21.8	± 0.3	44.0	± 0.4	36.7	± 1.5	<.0001	0.0021	0.0245
Gastrocnemius (g)	0.236	± 0.018	0.181	± 0.032	0.253	± 0.005	0.254	± 0.009	0.0726	0.2445	0.2244
Quadriceps (g)	0.311	± 0.024	0.217	± 0.037	0.330	± 0.010	0.342	± 0.026	0.0425	0.2045	0.1102
Liver (g)	1.28	± 0.06	1.20	± 0.09	2.15	± 0.05	1.52	± 0.17	0.0013	0.0161	0.0478
Gonadal WAT (g)	0.377	± 0.037	0.306	± 0.005	3.591	± 0.038	2.386	± 0.162	<.0001	0.0003	0.0006
Subcutaneous WAT (g)	0.52	± 0.04	0.42	± 0.06	3.89	± 0.47	2.37	± 0.19	<.0001	0.0041	0.0075
BAT (g)	0.062	± 0.009	0.053	± 0.004	0.195	± 0.008	0.085	± 0.007	<.0001	<.0001	0.0002
Bone Mineral Density (g/cm ²)	0.049	± 0.002	0.045	± 0.001	0.051	± 0.001	0.052	± 0.001	0.0080	0.3533	0.0727
Lean (g)	17.50	± 0.59	15.40	± 0.44	18.70	± 1.00	17.77	± 0.59	0.0247	0.0458	0.3822
Fat (g)	4.13	± 0.09	4.47	± 0.23	22.00	± 1.60	16.10	± 0.76	<.0001	0.0050	0.0028
% Fat	19.1	± 0.2	22.4	± 1.3	54.1	± 3.1	47.5	± 0.4	<.0001	0.2355	0.0062