

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700652

研究課題名（和文） 運動誘発性ストレスが脂肪細胞の脂質代謝制御機構におよぼす影響の解析

研究課題名（英文） The effects of exercise-inducible factors on lipid metabolism in adipocytes

研究代表者

橋本 健志（HASHIMOTO TAKESHI）

立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：70511608

研究成果の概要（和文）：

脂肪細胞における脂肪分解の制御機構を明らかにした。脂肪分解過程で産生された脂肪酸が小胞体で再エステル化して中性脂肪となり、微小脂肪滴として出現すること、複数の脂肪滴結合タンパク質が微小脂肪滴に結合し、脂肪分解に働いていることを明らかにした。また、乳酸、活性酸素、AMP キナーゼ、一酸化窒素、カルシウムシグナルが、脂肪細胞の脂肪分解関連タンパク質の発現量やミトコンドリアバイオジェネシスを増加させ、脂肪分解活性を高めることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The study investigated the cellular origin and physiological significance of micro lipid droplets (mLDs) that emerge in the cytoplasm during active lipolysis, as well as the roles of key lipolytic proteins on mLDs in differentiated 3T3-L1 adipocytes. The results suggest that, besides the surface of pre-existing central LDs, LD-associated proteins are actively involved in lipolysis on mLDs that are formed by fatty acids re-esterification. Furthermore, the lipolytic activity was increased by exercise-inducible factors such as H₂O₂, lactate-inducible signals, increased cellular calcium levels, AMP kinase, and nitric oxide in accordance with elevated levels of LD-associated proteins and mitochondrial biogenic signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：運動生化学

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：脂質代謝、脂肪分解、脂肪滴、メタボリックシンドローム、肥満、運動、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 先行研究から、脂肪滴結合タンパク質が脂肪滴制御に重要であることと、脂肪組織が全身の代謝ホメオスタシスに寄与する組織であることが示唆されていた。

(2) メタボリックシンドロームは、脂質代謝制御機構の破綻が要因のひとつであるが、脂肪滴結合タンパク質による代謝制御機構（脂肪合成・分解制御機構）がどのように変化しているかはほとんど明らかではなかった。

(3) 分子レベルでの脂肪合成・分解の制御機構の詳細も不明であった。

(4) 運動トレーニングが、脂肪組織にどのような影響を与えるのか、特に分子レベルでの脂肪分解制御機構に与える影響については不明であった。

2. 研究の目的

(1) 肥満や糖尿病などの代謝疾患モデル動物の脂肪組織を組織化学的・生化学的に解析し、脂肪滴結合タンパク質を中心とした脂質代謝制御機構がどのような変容を来しているかを明らかにする。

(2) 脂肪細胞におけるミトコンドリアの機能低下とエネルギー代謝制御機構との関連性を明らかにする。

(3) 乳酸が脂肪細胞のミトコンドリアバイオジェネシスならびにエネルギー代謝制御機構に与える影響について明らかにする。

(4) 運動トレーニングが代謝疾患モデル動物のエネルギー代謝制御機構に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞(3T3-L1 脂肪細胞)を用いて、脂肪分解過程における脂肪滴や脂肪滴表面

タンパク質の機能解析を行った。

① Coherent Anti-Stokes Raman Scattering

(CARS) 顕微鏡は、ラマン散乱を利用し、脂肪滴を選択的に可視化できるだけでなく、脂肪滴に存在する特定の化学結合の分布を画像化できるものである。重水素標識脂肪酸を脂肪細胞に取り込ませ、重水素標識された既存の脂肪滴と脂肪分解過程で新規に形成される脂肪滴を CARS 顕微鏡で区別した。また、脂肪合成を阻害する薬剤を投与し、微小脂肪滴形成の有無を CARS 顕微鏡で観察した。

② 免疫抗体染色法により、脂肪滴結合タンパク質の脂肪分解過程における局在を観察した。

③ 微小脂肪滴形成の有無により、脂肪分解活性がどのように変化するかを生化学的に解析した。

(2) 肥満を呈したラットに対し、持久性運動トレーニングを施し、脂肪組織のミトコンドリアバイオジェネシスや脂肪滴結合タンパク質の発現量を解析した。

(3) 運動誘発性の生理的ストレスとして、乳酸、活性酸素、AMP キナーゼ、一酸化窒素、カルシウムをそれぞれ誘導する化合物や薬剤を 3T3-L1 脂肪細胞に加え、脂肪細胞の脂肪分解活性を高めることが可能かを検証した。

4. 研究成果

これまで新規の脂肪滴結合タンパク質やリパーゼが次々と発見され、それらの生理的機能が次第に明らかになってきたが、その分子レベルでの脂肪合成・分解のメカニズムについては現在の研究課題であった。我々は脂肪分解刺激に対する脂肪滴および脂肪滴結合タンパク質の応答（局在変化や加水分解活性）について 3T3-L1 脂肪細胞を用いて解析した。

その結果、脂肪分解過程で産生された脂肪酸が小胞体で再エステル化して中性脂肪となり、微小脂肪滴として出現することを明らかにした。その生理的意義は脂肪滴の表面積を増加させ、リパーゼによる加水分解活性を高めていると結論付けた。また、複数の脂肪滴結合タンパク質が微小脂肪滴に結合し、脂肪分解に働いていることを明らかにした。

一方、上述した脂肪分解制御機構を踏まえ、脂肪分解活性を高める生理的ストレスを検討した。一過性運動時の代謝変化の影響を模擬するモデルとして、骨格筋のミトコンドリアバイオジェネシスを亢進する生理的ストレスである乳酸、活性酸素、AMPキナーゼ、一酸化窒素、カルシウムをそれぞれ誘導する化合物や薬剤を3T3-L1脂肪細胞に加え、脂肪細胞の脂肪分解活性を高めることが可能かを検証した。その結果、脂肪細胞の脂肪分解関連タンパク質の発現量やミトコンドリアバイオジェネシスを増加させ、脂肪分解活性を高めることを明らかにした。さらに、これら脂肪分解活性を高めることが可能な化合物の混合物が、抗肥満作用を有することを動物実験により明らかにした。

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8件)

- ① Hashimoto T, Endo Y, Cyclic restricted feeding enhances lipid storage in 3T3-L1 adipocytes, *Lipids in Health and Disease*, in press, 査読有、2013
DOI:10.1186/1476-511X-12-76
- ② Hashimoto T, Sato K, Iemitsu M, Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes, *Journal of Applied Physiology*, in press, 査読有、2013、Epub ahead of print, DOI:10.1152/jappphysiol.00427.2013
- ③ Hashimoto T, Lipid metabolism and exercise, *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 査読有、2巻(2)、2013、pp.1-6,
- ④ Yamada T, Furuichi Y, Takakura H, Hashimoto T, Hanai Y, Jue T, Masuda K, Interaction between myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 査読有、114巻(4)、2012、pp.490-497,
DOI : 10.1152/jappphysiol.00789.2012.
- ⑤ Hashimoto T, Segawa H, Okuno M, Kano H, Hamaguchi HO, Haraguchi T, Hiraoka Y, Hasui S, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T, Active involvement of micro-lipid droplets and lipid droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. *Journal of Cell Science*, 査読有、125巻(24)、2012、pp. 6127-6136,
DOI : 10.1242/jcs.113084.
- ⑥ Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Yanase T, Otsu K, Usuda N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose F, Osumi T, Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects the heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、287巻(28)、2012、pp. 23852-23863,
DOI : 10.1074/jbc.M111.328708.
- ⑦ Furuichi Y, Sugiura T, Kato Y, Takakura H, Hanai Y, Hashimoto T,

Masuda K、Muscle contraction increases carnitine uptake via translocation of OCTN2、Biochemical and Biophysical Research Communication、査読有、418巻、2012、pp.774-779、

DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.01.101.

- ⑧ Takakura H, Masuda K, Hashimoto T, Iwase S and Jue T. Quantification of myoglobin deoxygenation and intracellular partial pressure of O₂ during muscle contraction during haemoglobin-free medium perfusion、Experimental Physiology、査読有、95巻 (5)、2010、pp.630-640、DOI : 10.1113/expphysiol.2009.050344

[学会発表] (計 9 件)

- ① 発表者 : Endo Y, Hashimoto T、発表標題 : Modest hypoxia significantly reduces triglyceride content and lipid droplet size in 3T3-L1 adipocytes、学会名 : Obesity2012 : The Obesity Society 30th Annual Scientific Meeting、発表年月日 : 2012年9月21日、発表場所 : テキサス (アメリカ)
- ② 発表者 : Hashimoto T, Endo Y, Sato K, Iemitsu M、発表標題 : Control of lipolysis by lipid droplet-associated proteins in 3T3-L1 adipocytes、学会名 : Obesity2012 : The Obesity Society 30th Annual Scientific Meeting、発表年月日 : 2012年9月21日、発表場所 : テキサス (アメリカ)
- ③ 発表者名 : Hashimoto T, Endo Y, Takashi Y, Nakagawa H, and Enoki T、発表標題 : Nutrient pattern influences BMAL1 and lipogenic proteins

expression in adipocytes、学会名 : 15th International Biochemistry of Exercise Congress, 2012、発表年月日 : 2012年6月17日~21日、発表場所 : ストックホルム (スウェーデン)

- ④ 発表者 : Hashimoto T, Endo Y, Okumura M, Sato K, Iemitsu M、発表標題 : Identification of exercise-inducible factors to promote lipolysis in adipocytes 学会名 : 1st International conference on adipose tissue、2011年12月1日~3日、発表場所 : ベネチア (イタリア)
- ⑤ 発表者名 : Hashimoto T, Sato K, Iemitsu M、発表標題 : In Vivo and in vitro analyses of exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes、学会名 : 16th European College of Sport Science、発表年月日 : 2011年7月6日~9日、発表場所 : リバプール (イギリス)
- ⑥ 発表者 : Hashimoto T、発表標題 : Dynamic behaviors of lipid droplets and lipid droplet-associated proteins during stimulated lipolysis in adipocytes – Functional implications、学会名 : The 30th Naito Foundation Conference, 2011、発表年月日 : 2011年6月28日~7月1日、発表場所 : シヤトレーゼガトーキングダムサッポロ (北海道)
- ⑦ 発表者名 : Hashimoto T, Hasui S, and Osumi T、発表標題 : Physiological significance of micro-lipid droplets and intracellular traffic of lipid droplet-associated proteins in adipocyte lipolysis 学会名 : Keystone symposia "Lipid biology and lipotoxicity", 2011、発

表年月日：2011年5月12日～15日、発表場所：キラニー（アイルランド）

- ⑧ 発表者名：Hashimoto T, Hasui S, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kano H, Hamaguchi H, Yamaguchi T and Osumi T、発表標題：Molecular mechanisms of active lipolysis in 3T3-L1 adipocytes、学会名：Integrative Physiology of Exercise、発表年月日：2010年9月21日、発表場所：マイアミ（アメリカ）
- ⑨ 発表者名：Hashimoto T, Hasui S, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kano H, Hamaguchi H, Okamura T, Hirose F, and Osumi T、発表標題：Physiological relevance of lipid droplet and lipid-associated protein during lipolytic activation in adipocytes、学会名：American College of Sports Medicine 57th annual meeting、発表年月日：2010年6月4日、発表場所：ボルティモア（アメリカ）

〔図書〕（計7件）

- ① 著者名：橋本健志、出版社名：日本医療企画、書名：ヒューマンニュートリション「骨格筋のエネルギー代謝」、発行年：2012、総ページ数：53-59
- ② 著者名：橋本健志、出版社名：杏林書院、書名：体育の科学「筋肉の脂肪と内臓の脂肪」、発行年：2012、総ページ数：823-830
- ③ 著者名：橋本健志、出版社名：講談社、書名：健康・運動の科学「運動と脂肪細胞」、発行年：2012、総ページ数：125-132
- ④ 著者名：橋本健志、出版社名：文光堂、書名：エクササイズ科学 代謝とエクササイズ「脂質代謝」、発行年：2012、総ページ数：30-39

- ⑤ 著者名：橋本健志、出版社名：文光堂、書名：臨床スポーツ医学「運動中の乳酸動態は運動強度の基準となるか?」、発行年：2011、総ページ数：28/10, 1123-1128
- ⑥ 著者名：橋本健志、出版社名：真興交易（株）医書出版部、書名：運動生理学のニューエビデンス Section 7「運動と代謝『乳酸』」、発行年：2010、総ページ数：196-203
- ⑦ 著者名：橋本健志、出版社名：丸善(株)出版事業部、書名：スポーツサイエンス入門 第2章「スポーツにおけるエネルギーを生み出す仕組み」、発行年：2010、総ページ数：16-26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 健志 (HASHIMOTO TAKESHI)
立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号：70511608