

## 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24年 5月23日現在

機関番号：82613

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300240

研究課題名（和文）運動によるエネルギー代謝亢進のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of increase in exercise induced energy expenditure

研究代表者

三浦 進司 (MIURA SHINJI)

独立行政法人国立健康・栄養研究所 基礎栄養研究部 脂質・糖代謝研究室 室長

研究者番号：10342932

研究成果の概要（和文）：運動トレーニングは心機能や骨格筋の性質を変化させて運動持久力を増加させる。骨格筋の変化には、遺伝子発現調節因子の Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) の関与が推測されている。本研究では、PGC-1 $\alpha$ のうち、運動刺激に最も反応性の高い PGC-1 $\alpha$ -b の関与を調べ、骨格筋 PGC-1 $\alpha$ -b が運動時の脂肪利用効率を向上させて全身持久運動の向上に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Trained subjects have a high  $VO_{2max}$  due to a high cardiac output and high metabolic capacity of skeletal muscles. Because exercise training increases peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in skeletal muscle, PGC-1 $\alpha$ -mediated changes may contribute to the improvement of exercise capacity and  $VO_{2max}$ . There are three isoforms of PGC-1 $\alpha$  mRNA. PGC-1 $\alpha$ -b protein is a predominant PGC-1 $\alpha$  isoform in response to exercise. In this study, we showed that PGC-1 $\alpha$ -b induced increased mitochondrial biogenesis, capillaries, and fatty acid transporters in skeletal muscles may contribute to improved exercise capacity via an increase in fatty acid utilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

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：エネルギー代謝

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋は安静時や低強度運動の際には、脂肪をエネルギー源として優先的に利用する。AMP-activated protein kinase (AMPK) は組織内の AMP/ATP 比が増加すると活性化され、脂肪酸のミトコンドリアへの流入量を高

めて脂肪酸酸化を亢進する。運動は骨格筋の AMPK を活性化すると考えられ、低強度運動による脂肪燃焼亢進が AMPK 活性化によるものと推測された。申請者らは運動の急性効果を骨格筋の AMPK 活性化で説明できると考え、骨格筋特異的に AMPK 活性を抑制した「優性

抑制型変異体 AMPK $\alpha$ 1 発現マウス (AMPK-DN マウス)」を作製して検討したが、低強度運動時の脂肪燃焼亢進に骨格筋の AMPK の関与が低いことが明らかになった。一方、AMPK は AMPK kinase によってリン酸化されて活性化されるが、LKB1 が AMPK kinase の一つであることが明らかになり、AMPK に依存した生理作用には LKB1 が必要なものがあることが示された。研究代表者らは骨格筋特異的に LKB1 活性を抑制した「優性抑制型変異体 LKB1 発現マウス (LKB1-DN マウス)」を作製し、その低強度運動時の脂肪燃焼変化につき予備的に検討したところ、LKB1-DN マウスでは運動時における脂肪燃焼亢進が抑制され、LKB1 が骨格筋の fuel sensor の一つである可能性が示唆された。

(2) 運動トレーニングは生体の脂肪燃焼能力を高めるが、それは筋肉細胞内でのミトコンドリア量増加や機能亢進による脂肪酸酸化量の増加、筋肉細胞内への脂肪酸取り込みに重要な lipoprotein lipase (LPL) 活性化など、筋肉細胞の機能変化によるものと考えられている。PGC-1 $\alpha$  はミトコンドリア生合成を促進する因子で、骨格筋では運動により発現量が増加する。研究代表者らが作製した「PGC-1 $\alpha$  を骨格筋に過剰発現させたマウス (PGC-1 $\alpha$  マウス)」では、骨格筋のミトコンドリア量の著しい増加が認められ、安静時脂肪酸酸化と酸素消費量が亢進した。これまでに運動による PGC-1 $\alpha$  発現調節機序に関する研究も多数行われ、研究代表者らは、当初想定されていた AMPK 活性化の関与よりも、 $\beta$ 2-adrenergic receptor (AR) の関与が大きいことを明らかにした。また、研究代表者らは、PGC-1 $\alpha$  には異なった第 1 エキソンを持ったアイソフォームが新たに 2 種類存在することを明らかにし、運動によって発現増加するのはこれまで知られていた isoform (PGC-1 $\alpha$ -a) ではなく、新規アイソフォーム PGC-1 $\alpha$ -b と PGC-1 $\alpha$ -c であり、これらの増加にも  $\beta$ 2-AR 刺激が大きく寄与していること、PGC-1 $\alpha$ -b と PGC-1 $\alpha$ -c にも転写共役因子としての機能があり、ミトコンドリア生合成や脂肪燃焼に関与する遺伝子発現を促進することを明らかにした。これら知見より、運動が  $\beta$ -AR 刺激を介して骨格筋のミトコンドリア機能や脂肪燃焼を正に制御する PGC-1 $\alpha$ -b および -c の発現量を増やすことが、運動の慢性効果に必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では運動の脂肪燃焼亢進への急性効果と慢性効果が LKB1、PGC-1 $\alpha$  新規アイソ

フォームなどで説明できるか、運動による抗肥満効果にそれぞれがどの程度貢献しているのかを、主にモデルマウスを用いて検討することを目的とした。

(1) 急性効果と LKB1 : 運動による脂肪燃焼亢進に骨格筋の LKB1 が必要かどうかを、マウス個体レベルと筋肉組織レベルから明らかにする。そして、その情報伝達系に関わる分子を同定し、その機能を明らかにする。

(2) 慢性効果と PGC-1 $\alpha$  新規アイソフォーム : 運動による PGC-1 $\alpha$  新規アイソフォーム発現増加で、運動トレーニングによる筋肉の機能変化や、脂肪燃焼やエネルギー代謝量の変化を説明できるか調べる。

(3) 運動による抗肥満効果への急性効果と慢性効果の貢献度 : これらモデルマウスを用いて、運動の抗肥満作用にはどの分子の貢献度が高いか明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 急性効果と LKB1 : A) LKB1-DN マウスの安静時エネルギー代謝を間接カロリーメトリー法で自由摂食と絶食の条件で各 24 時間測定し、骨格筋 LKB1 活性が安静時のグルコース・脂肪燃焼量に影響を及ぼしているか調べた。B) LKB1-DN マウスの安静時・低強度運動時の骨格筋を摘出し、摘出筋での脂肪酸酸化量、中性脂肪 (TG) 合成量を測定し、低強度運動時の全身の脂肪燃焼量低下が骨格筋の脂肪酸燃焼低下に起因するのか調べた。C) LKB1-DN マウスで低強度運動時の脂肪燃焼増加が抑制されることにより骨格筋内のエネルギー量が低下しているか検討するため、骨格筋内の ATP、ADP、AMP、Malonyl CoA 量を測定した。また、糖質代謝への影響を調べるため骨格筋内のグリコーゲン蓄積量を測定した。D) 低強度運動時の脂肪燃焼が運動継続能力に及ぼす影響を調べるため、低強度運動継続時間を LKB1-DN マウスと野生型マウスで比較した。E) 運動時の脂肪燃焼は、主に骨格筋のミトコンドリアで行われていると考えられ、LKB1-DN マウスが運動時に脂肪燃焼を亢進できない原因の一つとしてミトコンドリアの機能不全が疑われる。そこで、ミトコンドリア機能について詳細に解析した。E) 呼吸筋の代表である横隔膜の変化について検討した。

(2) 慢性効果と PGC-1 $\alpha$  新規アイソフォーム : A) 安静時・運動時のエネルギー代謝態を間接カロリーメトリー法によって調べ、骨格筋で PGC-1 $\alpha$ -b または -c が増加することにより、基礎代謝あるいは運動時代謝が亢進するか調べた。B) 骨格筋でのエネルギー代謝変化が PGC-1 $\alpha$ -b または -c の発現増加によるミトコンドリア量や機能変化に起因するか検討するため、各マウスの骨格筋のミトコンドリア量を測定し、さらにミトコンドリア画

分の呼吸鎖機能を測定した。C) PGC-1 $\alpha$ -a を骨格筋に過剰発現させると筋肉が赤筋化する。そこで、PGC-1 $\alpha$ -b または -c も筋肉を赤筋化させるか検討した。D) 骨格筋の脂肪燃焼能力増加が、筋肉内エネルギー産生量や運動継続能力に与える影響を検討した。E) PGC-1 $\alpha$ -a は脂質代謝のみならず、糖代謝にも影響することが示されている。そこで、骨格筋に PGC-1 $\alpha$ -b および -c を過剰発現させたマウスでの糖代謝変化について調べた。

(3) 運動による抗肥満効果への急性効果と慢性効果の貢献度：前述したエネルギー代謝が変化しているモデルマウスに高脂肪食を与えると、肥満や糖尿病発症に影響するのかが検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 急性効果と LKB1：A) LKB1-DN マウスの LKB1 活性は骨格筋でのみ失活し、心臓での活性には変化なかった。また、標的タンパク質 (AMP キナーゼ  $\alpha 2$ , MARK4, QSK) の活性抑制、AMP キナーゼおよび acetyl-CoA carboxylase のリン酸化の阻害が確認された。LKB1-DN マウスの安静時代謝には野生型マウスとの差異は認められなかった。しかし、運動中の酸素摂取量および脂肪酸酸化量は LKB1-DN マウスで著しく低下していた。B) LKB1-DN マウスの運動前、運動後の骨格筋を摘出して脂肪酸酸化量を測定したが、LKB1-DN マウス由来の摘出筋で脂肪酸酸化が低下していることは認められなかった。C) ATP 量、Malonyl-CoA 量、グリコーゲン量も野生型マウスと同程度であった。しかし、運動後の AMP 量の著しい増加が LKB1-DN マウス骨格筋で認められた。LKB1-DN マウスは低強度運動を行うことは可能であったが、高強度運動を継続することができなかった。低強度運動時の脂肪酸燃焼量は、野生型では増加が認められたが、LKB1-DN マウスでは増加が認められなかった。糖質の酸化には影響はなかった。D) 運動継続能力は LKB1-DN マウスで著しく低下しており、また血中乳酸濃度の増加も野生型マウスよりも弱い強度の運動負荷において認められた。E) LKB1-DN マウス骨格筋よりミトコンドリアを調整して呼吸鎖活性を測定したが、障害は認められなかった。F) LKB1-DN マウスの横隔膜において筋線維タイプの変化 (Type IIB 増加) が認められた。活動筋である下肢筋ではそのような変化は認められなかった。以上の結果より、LKB1-DN マウスでは横隔膜機能に異常がおこり、酸素消費量が低下して運動継続能力が著しく低下するものと考えられた。また、LKB1-AMPK 情報伝達系では運動の急性効果 (脂肪酸燃焼増加効果) を説明することはできなかった。

(2) 慢性効果と PGC-1 $\alpha$  新規アイソフォーム：A) PGC-1 $\alpha$ -b マウスでは、運動中の脂肪

酸化量の増加が認められた。B) PGC-1 $\alpha$ -b マウスの骨格筋ではミトコンドリア量の著しい増加が認められた。単離ミトコンドリアの呼吸鎖活性は、野生型と同等であった。C) PGC-1 $\alpha$ -b マウスの骨格筋では、Type IIA 線維の増加が認められた。また、毛細血管数の増加も認められた。D) PGC-1 $\alpha$ -b マウスにおいて運動継続時間、 $VO_{2max}$  の増加が認められた。血中乳酸値は野生型で増加が認められる運動強度においても、PGC-1 $\alpha$ -b マウスでは安静時と同レベルであった。E) PGC-1 $\alpha$ -b マウスでは、運動時の糖利用率が低下しており、また骨格筋での解糖に関する遺伝子発現量が低下していた。

以上の結果より、骨格筋での PGC-1 $\alpha$ -b の増加は、骨格筋の赤筋化、ミトコンドリア生合成の増加、毛細血管数の増加を引き起こし、運動時の脂肪燃焼効率を向上させて運動継続能力を増加させていることがわかった。

(3) 運動による抗肥満効果への急性効果と慢性効果の貢献度：LKB1-DN マウスおよび PGC-1 $\alpha$ -b マウスを用いて肥満への影響について検討したが、野生型マウスとの間に際違った差異は認められなかった。

#### 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 5 件)

- ① Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kano, Y., Oishi, Y., and Ezaki, O. : Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 $\alpha$ -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS ONE*, 6(12): e28290 (2011).  
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0028290>
- ② Kano, Y., Poole, D. C., Sudo, M., Hirachi, T., Miura, S., and Ezaki, O. : Control of microvascular P02 kinetics following onset of muscle contractions: Role for AMPK. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 301, R1350-R1357 (2011).
- ③ Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kawasaki, E., Koshinaka, K., Kawanaka, K., Nagata, J., Oishi, Y., and Ezaki, O. : Effect of exercise intensity and AICAR on isoform-specific expressions of murine skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  mRNA: a role of  $\beta 2$ -adrenergic receptor activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 300, E341-E349 (2011).
- ④ Setsuie, R., Suzuki, M., Kabuta, T., Fujita, H., Miura, S., Ichihara, N.,

Yamada, D., Wang, YL., Ezaki, O., Suzuki, Y., and Wada, K.: 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. *FASEB J.*, 23, 4148-4157 (2009).

- ⑤ Miura, S., Kai, Y., Kamei, Y., Bruce, C.R., Kubota, N., Febbraio, M.A., Kadowaki, T., and Ezaki, O.:  $\alpha$ 2-AMPK activity is not essential for an increase in fatty acid oxidation during low-intensity exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 296, E47-E55 (2009).

[学会発表] (計12件)

国際学会 (一般演題)

- ① Kano Y., Poole DC, Sudo M, Miura S., Ezaki O.: The role of AMPK in skeletal muscle on microvascular  $PO_2$  kinetics following onset of muscle contraction., Integrative Physiology of Exercise, 2010. 9. 22-25, Miami Beach, Florida, USA
- ② Miura S., Kai Y, Tadaishi M, Ezaki O.: LKB1 activity in skeletal muscle is essential for an increase in fatty acid oxidation during low-intensity exercise., 70th Scientific Sessions, American Diabetes Association, 2010. 6. 26, Orland, Florida, USA

国内学会 (シンポジウム)

- ① 江崎治, 三浦進司, 野田光彦: NEATの測定意義と脂肪燃焼の分子機序, 第32回日本肥満学会, 2011. 9. 24, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)
- ② 三浦進司: 運動はどのようにして脂肪酸酸化を亢進するのか, 日本農芸化学会 2010 年度大会シンポジウム (骨格筋機能と生活習慣病), 2010. 3. 30, 東京大学 (東京)
- ③ 三浦進司: 運動による骨格筋PGC-1 $\alpha$ 新規アイソフォームの発現, 第1回分子骨格筋代謝研究会, 2009. 3. 28, 京都大学 (京都)

国内学会 (一般演題)

- ① 只石幹, 三浦進司, 江崎治: 骨格筋特異的PGC-1 $\alpha$ -b過剰発現による脂肪燃焼効率の向上, 第32回日本肥満学会, 2011. 9. 24, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)
- ② 三浦進司, 只石幹, 江崎治: 運動による脂肪酸酸化亢進メカニズム: 骨格筋LKB1-AMPK情報伝達系の関与, 第32回日本肥満学会, 2011. 9. 23, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)
- ③ 三浦進司, 只石幹, 江崎治: 運動による

脂肪酸酸化亢進メカニズム, 第66回日本体力医学会大会, 2011. 9. 17, 海峡メッセ下関 (山口)

- ④ 只石幹, 三浦進司, 江崎治: 骨格筋PGC-1 $\alpha$ -b過剰発現が運動継続能力,  $VO_{2max}$ に及ぼす影響, 第66回日本体力医学会大会, 2011. 9. 16, 海峡メッセ下関 (山口)
- ⑤ 三浦進司, 只石幹, 江崎治: 骨格筋LKB1活性は低強度運動時の脂肪酸酸化亢進に必須である, 第65回日本体力医学会大会, 2010. 9. 17, 千葉商科大学 (千葉)
- ⑥ 只石幹, 三浦進司, 川中健太郎, 江崎治: 運動強度の違いがPGC-1 $\alpha$  isoform mRNA発現に及ぼす影響, 第65回日本体力医学会大会, 2010. 9. 16, 千葉商科大学 (千葉)
- ⑦ 三浦進司: 低強度運動による脂質代謝亢進に骨格筋AMPKの活性化は必須ではない, 第64回日本体力医学会, 2009. 9. 18, 朱鷺メッセ (新潟市)

[図書] (計8件)

- ① 江崎治, 三浦進司: 運動療法-運動療法の理論, すべてがわかる最新・糖尿病, 照林社; 120-124, 2011.
- ② 三浦進司, 只石幹, 江崎治: 生活習慣病の栄養管理「糖分摂取過剰と生活習慣病」、成人病と生活習慣病、41(11), 1297-1302, 2011
- ③ 江崎治, 三浦進司: AMPキナーゼによる糖の取り込み制御、内分泌・糖尿病・代謝内科、33(2), 86-92, 2011
- ④ 江崎治, 三浦進司: PGC-1 $\alpha$ とミトコンドリア機能、エネルギー代謝、Adiposcience, 6(4), 311-318, 2010
- ⑤ 三浦進司, 只石幹, 江崎治: 肥満症 (2) PGC-1、日本臨床 増刊号、68(2), 189-194, 2010.
- ⑥ 江崎治, 千葉剛, 三浦進司: 肥満症 (2) 筋肉などでの代謝調節、日本臨床 増刊号、68(2), 167-171, 2010.
- ⑦ 江崎治, 三浦進司: PGC-1の多彩な機能と糖・脂質代謝制御における意義-糖・脂質代謝制御におけるPGC-1 $\alpha$ アイソフォーム a, b, cの意義、内分泌・糖尿病科; 29(2), 96-103 2009
- ⑧ 三浦進司, 江崎治: 運動の抗肥満効果、ILSI JAPAN; 96, 10-22, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 進司 (MIURA SHINJI)

独立行政法人国立健康・栄養研究所 基礎栄養研究部 脂質・糖代謝研究室 室長

研究者番号: 10342932

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者

江崎 治 (EZAKI OSAMU)

独立行政法人国立健康・栄養研究所 基礎栄  
養研究部 部長

研究者番号：90191923

亀井 康富 (KAMEI YASUTOMI)

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 特任  
教授

研究者番号：70300829

狩野 豊 (KANO YUTAKA)

電気通信大学 情報理工学部 准教授

研究者番号：90293133