

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390234

研究課題名(和文) PGC1 新規アイソフォームの機能解析を通じた運動による代謝改善機構の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of exercise-induced metabolic alteration through the investigation of the function of novel isoforms of PGC1 α

研究代表者

小川 渉 (Wataru, Ogawa)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40294219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写コアクチベータPGC1 新規アイソフォーム(PGC1 b及び、PGC1 c)を特異的に欠損するマウスの解析等を通じて、これらの分子の生理的機能を検討した。PGC1 新規アイソフォームは運動時に骨格筋で顕著に発現が増強し、骨格筋の脂肪酸酸化能とプロトンリークを増大させることにより骨格筋のエネルギー消費を増強させることが明らかとなった。このような機能は運動対応能の維持にも重要な機能を果たすと考えられた。一方、PGC1 b及びPGC1 cと同一のエクソンから転写が開始されるPGC1 新規アイソフォーム(PGC1 2, 3, 及び4)はこのような代謝制御に対する機能は持たないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have characterized the physiological function of novel isoforms of PGC1 mainly by the investigation of metabolic phenotypes of mice that specifically lack the genes for these isoforms. These novel isoforms, PGC1 b and PGC1 c, are greatly induced in skeletal muscle in response to exercise and increased energy expenditure through stimulating fatty acid metabolism and mitochondrial proton leakage. These isoforms also play an important role for the maintenance of exercise capacity. Novel isoforms that transcribed from the same exon as PGC1 b and PGC1 c were transcribed were identified, and termed PGC1 2, 3, and 4. PGC1 2, 3, and 4 however do not possess such metabolic function in skeletal muscle.

研究分野：代謝学

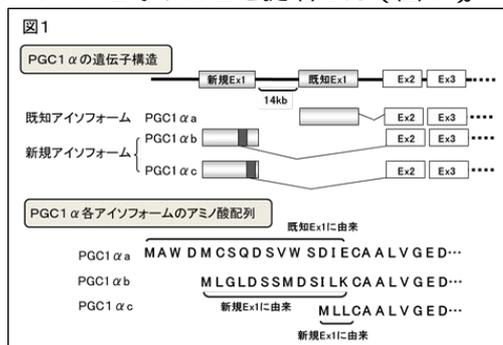
キーワード：糖尿病 エネルギー代謝 肥満 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

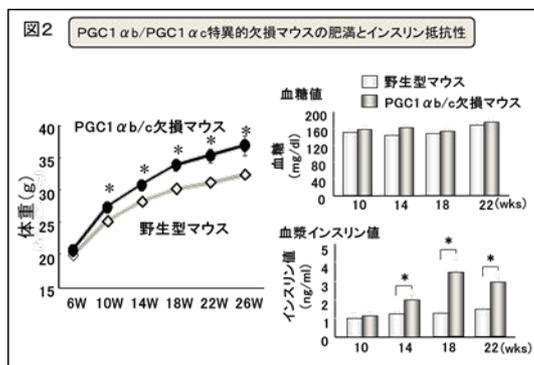
身体運動の低下は2型糖尿病の発症要因の一つであり、運動療法は最も基本的かつ重要な2型糖尿病の治療法である。身体運動によって耐糖能が改善する際には、骨格筋の代謝関連遺伝子の発現が増加し、インスリン感受性が増強することが重要と考えられているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。PGC-1は運動時に骨格筋で発現が増加する転写コアクチベーターであり、種々の糖代謝、脂肪酸代謝関連遺伝子の転写を活性化することから、運動による代謝改善に重要な機能を果たす可能性が広く注目されてきた。しかし、PGC-1を全身あるいは骨格筋で欠損したマウスはインスリン感受性の低下や運動による代謝改善の障害は認めず、PGC-1

が運動による耐糖能やインスリン感受性の改善に関わることを示す直接の証拠はなかった。

代表者らは既知 PGC-1 の第一エクソン上流 14kb に存在する新規な第一エクソンから転写が開始される PGC-1 の新規アイソフォーム2種を同定し、既知 PGC-1 を PGC-1 a、新規アイソフォームを PGC-1 b 及び PGC-1 c と呼ぶことを提唱した(図1)。



既知 PGC-1 (以後 PGC-1 a と呼ぶ) が広範な臓器分布を示すのに対し、PGC-1 b 及び PGC-1 c は活発なエネルギー消費臓器である骨格筋、褐色脂肪及び心筋に局限していた。また、運動により骨格筋では PGC-1 b 及び PGC-1 c の発現が安静時の数 10 数倍から 100 倍以上と著しく増加するのに対し既知 PGC-1 の発現増加はごく軽微であり、運動による PGC-1 の発現増加の本態は PGC-1 b 及び PGC-1 c が担うことを明らかとした。



また、代表者らは、これらの新規アイソフ

ォーム PGC-1 b 及び PGC-1 c を特異的に欠損するマウスを作成したところ、本マウスでは脂肪酸酸化やエネルギー消費が抑制され、その結果、肥満とインスリン抵抗性を示すことも見出している(図2)。

これらの結果は、骨格筋において運動によって発現が増加し、運動による代謝改善機能を担うのは、既知 PGC-1 ではなく代表者らが同定した新規アイソフォーム PGC-1 b 及び PGC-1 c であることを示す。

2. 研究の目的

本研究ではこのような代表者の今までの研究成果の蓄積を踏まえ、PGC-1 新規アイソフォームの機能解析を中心に運動による代謝改善のメカニズムについて検討を進める。具体的には PGC-1 b 及び PGC-1 c 欠損マウスの肥満とインスリン抵抗性の発症メカニズムを更に解析するとともに、PGC-1 b 及び PGC-1 c の運動による著明な発現誘導や肥満動物での発現誘導抑制のメカニズムについても解析を進める。また、ヒトにおける PGC-1 b 及び PGC-1 c のプロモーター領域の遺伝子多型とインスリン抵抗性の関連の解析を進めるとともに、本遺伝子多型と運動による骨格筋での代謝関連遺伝子発現誘導能やエネルギー消費の刺激能などの関連を解析することにより、PGC-1 b 及び PGC-1 c の糖尿病の発症や病態との関わりについて明らかにする。

3. 研究の方法

PGC-1 b/PGC-1 c 特異的欠損マウス及び野生型マウスの安静時及び運動負荷時の骨格筋及び脂肪組織の遺伝子発現変動の網羅的解析、骨格筋及び脂肪組織の脂肪酸酸化能の変化や各種の糖、脂質代謝産物のメタローム解析などを通じて、運動時のどのような代謝適応を PGC-1 b 及び PGC-1 c が制御するかについて明らかとする。また培養筋肉細胞における PGC-1 b 及び PGC-1 c の強制発現の効果や、各種薬剤の反応性を解析することにより、PGC-1 b 及び PGC-1 の遺伝子発現誘導機構や運動によるエネルギー消費制御機構に関する新規知見を明らかとする。

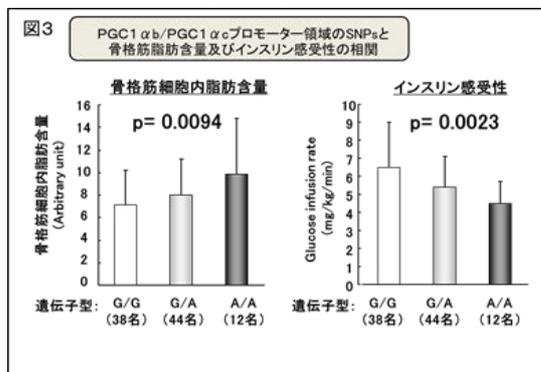
さらに、ヒトで PGC-1 b/PGC-1 c のプロモーター領域の SNP が PGC-1 b 及び PGC-1 c の発現量に影響を及ぼし、骨格筋脂肪含量やインスリン感受性の決定要因となっている可能性が高い。そこで、研究期間内に複数のコホートでプロモーター領域の SNP と種々の臨床指標との関連解析を行い、PGC-1 b 及び PGC-1 c 上流プロモーター領域の SNP と骨格筋脂肪含量やインスリン感受性との関係を明らかとする。

4. 研究成果

PGC-1 b/PGC-1 c 特異的欠損マウスの急性運動刺激時の骨格筋の遺伝子発現変動をも網羅的に解析したところ、脂肪酸酸化制御

にかかわる PPAR や ACOT1, ACOT2 などの遺伝子に加えて、熱産生系に重要な機能を担う遺伝子である UCP2 の発現が、野生型マウスでは運動によって増強し、遺伝子欠損マウスではその発現誘導が抑制されることが明らかとなった。このような遺伝子の運動時に発現誘導不全により、エネルギー消費の低下が生じると考えられた。また、DNA マイクロアレイ解析により、転写因子や液性因子等、PGC-1 b/PGC-1 c によって発現が制御される新規な運動誘導性遺伝子を数多く見出した。PGC-1 b/PGC-1 c 特異的欠損マウスに食事制限を行い野菜型と同程度に体重を維持させると、インスリン抵抗性はほぼ件前医改善した。このことから、本マウスのインスリン抵抗性は肥満に起因すると考えられた。

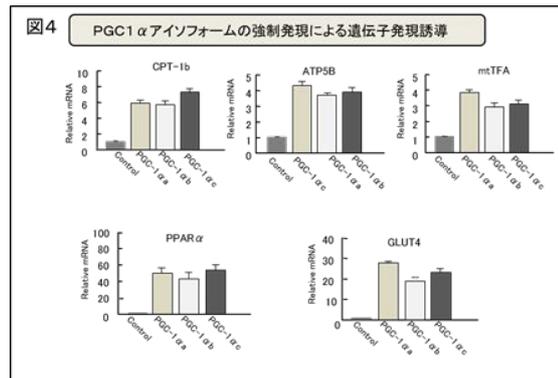
2 型糖尿病患者を対象とした PGC-1 b/PGC-1 c のプロモーター領域の SNP 解析の結果、特定の SNP の有無が、骨格筋細胞内脂肪含量や高インスリン正常血糖クランプで解析したインスリン感受性と相関があるという結果を得た (図 3)。



別コホートを対象とした研究により、この結果を検証すべく、非糖尿病日本人および 2 型糖尿病ヨーロッパ人を対象とした共同研究を行ったが、いずれのコホートでも同様の結果は得られず、当該 SNP の肥満やインスリン抵抗性の遺伝的決定要因としての位置付けは十分に明らかにすることができなかった。

PGC-1 b/PGC-1 c と同一のエクソンから転写が開始される新規なアイソフォームである PGC-1 2, PGC-1 3, PGC-1 4 の存在が報告されたため、これらのアイソフォームの機能解析も行った。PGC-1 b/PGC-1 c を培養筋細胞に過剰発現したところ、既知の PGC-1 である PGC-1 a と同様に、ミトコンドリア関連遺伝子、糖代謝関連遺伝子、脂質酸化系関連遺伝子などの遺伝子発現をいずれのアイソフォームも同じ程度誘導した (図 4)。ところが、PGC-1 2, PGC-1 3, PGC-1 4 は、このような代謝関連遺伝子の発現には全く影響を及ぼさなかった。また、PGC-1 a, PGC-1 b 及び PGC-1 c は、培養細胞への強制発現により、ミトコンドリア呼吸能の増大とプロトンリークの増大を認めたが、やはり PGC-1 2, PGC-1 3, PGC-1 4 にはこのような機能を認めなかった。PGC-1

2, PGC-1 3, PGC-1 4 の発現誘導機構や相対的発現量を検討したところ、これらのアイソフォームは PGC-1 b/PGC-1 c と同様に、骨格筋、褐色脂肪、心筋に局限して発現し、運動刺激や アドレナリン刺激により発現が顕著に増大した。ところがその相対的発現量は PGC-1 b/PGC-1 c と比較すると 0.1~0.01% 著明に少ないことも明らかとなった。



このように PGC-1 2, PGC-1 3, PGC-1 4 は発現量が極端に少ない事、また、代謝関連遺伝子の発現誘導には関与しないこと等から、PGC-1 b/PGC-1 c 特異的欠損マウスは同一の第一エクソンから発現が開始される PGC-1 2, PGC-1 3, PGC-1 4 をも欠損するものの、その代謝異常の表現型には PGC-1 b/PGC-1 c の欠損が重要な機能を果たすと考えられた。

また PGC1 発現誘導薬のスクリーニングを目的として PGC-1 b/PGC-1 c のプロモーター部分とルシフェラーゼ遺伝子の融合遺伝子を安定的に発現する細胞株を樹立した。本細胞株を用いたアッセイ及び内因性の遺伝子発現誘導の検討により、アドレナリン刺激による PGC-1 b/PGC-1 c の発現誘導を強く増強する物質を同定した。この物質の作用機構を明らかとするため、各種のシグナル伝達分子の関与を検討したところ、

以上のような知見から PGC-1 b/PGC-1 c は運動時に主に アドレナリン刺激によって骨格筋で顕著に発現が増強し、骨格近における脂肪酸代謝を活性化するとともに、プロトンリークを増大させることより、エネルギー消費を ATP 産生から熱産生にシフトさせ、運動時のエネルギー消費の増大を生むと考えられた。また PGC-1 b/PGC-1 c 欠損マウスは通常飼育下での運動量や運動の概日パターンには変化が無く、また軽度の運動負荷も野生型マウスと同程度に完遂することが可能であった。しかし、中等度以上の運動負荷を与えると、その持続量は顕著に低下し、運動対応能が低下していることが明らかとなった。すなわち、PGC-1 b/PGC-1 c は熱産生の増大とエネルギー効率の低下と引き換えに、骨格筋の運動対応能を増加させるという役割を生理的に担うと考えられた。

また代表者らは PGC-1 b/PGC-1 c の発現誘導物質の開発を目指して、プロモーターア

ッセイ系を確立し、 アドレナリン刺激存在下でのみ、PGC-1 b/PGC-1 c の発現を増強する物質を見出した。運動による PGC-1 b/PGC-1 c の発現誘導に アドレナリン刺激が重要な機能を担うことを踏まえると、本物質は骨格筋のエネルギー代謝に関して、運動効果を増強する薬剤と捉えることが出来る。このような「運動効果増強剤」というコンセプトで代謝疾患治療薬の開発の報告は過去になく、今後、ユニークな視点を持った橋渡し研究に繋がる可能性がある。本物質はその科学的特性上、直接の臨床応用は困難と考えられるが、今後同様の性格を持つ物質を同定することにより、臨床応用に繋げていきたいと考えている。

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4件)

Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, Onoue T, Yamazoe R, Ueda M, Adachi M, Miyoshi T, Shiraiishi N, Ogawa W, Fukuda K, Kondo T, Matsumura T, Araki E, Tomita K, Kitamura K. The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun*. 査読有 5, 2014, 3428.

Kubota H, Noguchi R, Toyoshima Y, Ozaki Y, Uda S, Watanabe K, Ogawa W, Kuroda S. Temporal coding of insulin action through multiplexing of the AKT pathway. *Mol Cell*. 査読有 46, 2012, 820-832

Takenaka N, Izawa R, Wu J, Kitagawa K, Nihata Y, Hosooka T, Noguchi T, Ogawa W, Aiba A, Satoh T. A critical role of the small GTPase Rac1 in Akt2-mediated GLUT4 translocation in mouse skeletal muscle. *FEBS J*. 査読有 281, 2014, 1493-504

Kikani CK, Verona EV, Ryu J, Shen Y, Ye Q, Zheng L, Qian Z, Sakaue H, Nakamura K, Du J, Ji Q, Ogawa W, Sun LZ, Dong LQ, Liu F. Proliferative and antiapoptotic signaling stimulated by nuclear-localized PDK1 results in oncogenesis. *Sci Signal*. 査読有 5, 2012, ra80

[学会発表](計 件)

野村和弘, 小川渉. PGC1 の機能解析を通じた代謝改善機構の解析. 第 35 回日本肥満学会, 2014 年 10 月 24-25 日, 宮崎

野村和弘, 水崎奈央, 細岡哲也, 佐々木努, 北村忠弘, 阪上浩, 春日雅人, 小川渉. 骨格筋のアドレナリン抵抗性は PGC1 の誘導不全により肥満を惹起する. 第 57

回日本糖尿病学会学術集会, 2014 年 5 月 22-24 日, 大阪

水崎奈央, 野村和弘, 細岡哲也, 春日雅人, 小川渉. PGC1 各種アイソフォームの発現パターンと機能の解析. 第 57 回日本糖尿病学会学術集会, 2014 年 5 月 22-24 日, 大阪

野村和弘, 水崎奈央, 細岡哲也, 佐々木努, 北村忠弘, 阪上浩, 春日雅人, 小川渉. 骨格筋のアドレナリン抵抗性は PGC1 の誘導不全により肥満を惹起する. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 福岡

小川渉, 野村和弘, 細岡哲也. PGC1 による骨格筋とエネルギー制御のメカニズム. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 福岡

水崎奈央, 野村和弘, 細岡哲也, 春日雅人, 小川渉. PGC1 の各種アイソフォームの発現と機能の解析の役割. 第 34 回日本肥満学会, 2013 年 10 月 11-12 日, 東京

野村和弘, 水崎奈央, 細岡哲也, 佐々木努, 北村忠弘, 阪上浩, 春日雅人, 小川渉. 肥満病態形成における PGC1 新規アイソフォームの役割. 第 34 回日本肥満学会 2013 年 10 月 11-12 日, 東京

小川渉. PGC1 の各種アイソフォームの発現と機能の解析の役割. 第 13 回日本抗加齢医学会, 2013 年 6 月 28-30 日, 横浜

野村和弘, 水崎奈央, 細岡哲也, 佐々木努, 北村忠弘, 阪上浩, 春日雅人, 小川渉. 肥満病態形成における PGC1 新規アイソフォームの役割. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013 年 4 月 25-27 日, 仙台

野村和弘, 細岡哲也, 佐々木努, 北村忠弘, 阪上浩, 春日雅人, 小川渉. PGC1 アイソフォームの肥満病態形成における意義. 第 33 回日本肥満学会. 2012 年 10 月 11-12 日, 京都

[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]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 渉 (OGAWA, Wataru)

研究者番号: 40294219