

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700525
 研究課題名（和文）加齢に伴う骨格筋エネルギー代謝の低下における蛋白質翻訳後酸化修飾の関与
 研究課題名（英文）The effect of oxidative protein modification on impairment of energy metabolism in skeletal muscle with aging
 研究代表者
 青井 渉（AOI WATARU）
 京都府立大学・生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：60405272

研究成果の概要（和文）：自由摂餌、活動制限下において加齢させたマウス（c57BL/6系統）では体脂肪の蓄積、耐糖能異常とともに骨格筋酸化障害が認められる。本研究では、加齢性代謝不全モデルとして20ヶ月齢のc57BL/6マウスを用い、エネルギー代謝に関連する骨格筋蛋白質の翻訳後酸化修飾について解析し、病態との関わりについて検討した。その結果、若齢マウスと比較して加齢マウスでは、細胞内のAMP量を調節する酵素Adenylate kinase 1がニトロ化修飾を受けることを観察した。このことが、AMP依存性protein kinaseの活性を調節し、筋細胞膜における糖取り込み能の減弱に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：c57BL/6 mice kept with free access to chow and sedentary to old age show lipid accumulation and impairment of glucose tolerance as well as oxidative damage in skeletal muscle. In this study, we investigated oxidative protein modification in skeletal muscle associated with impairment of energy metabolism using the animal model as a model of glucose metabolism disorder. Consequently, it has been shown that nitration of tyrosine residues in adenylate kinase 1, which regulates intracellular AMP content, was increased. This may lead to the impairment of glucose uptake in skeletal muscle via lower activity of AMP-activated protein kinase in old mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：体力科学

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：骨格筋、エネルギー代謝、加齢、酸化ストレス、プロテオミクス、蛋白質翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

中・高齢者における肥満、内臓脂肪の蓄積は、エネルギーの需要供給バランスの破綻に起因する。特に最大の代謝臓器である骨格筋におけるエネルギー代謝能の低下が、その主な原因の一つと考えられているが、どのような機序で代謝能が低下するのかについては不明である。

一方、加齢した骨格筋では酸化生成物の蓄積が認められ、細胞構成成分の酸化障害が確認されている。酸化障害の標的は脂質だけでなく様々な蛋白質にも及ぶことが推察され、加齢にともなう骨格筋エネルギー代謝能の低下に翻訳後酸化修飾による代謝関連蛋白質の機能低下が関与する可能性がある。

2. 研究の目的

加齢性糖代謝不全マウスの骨格筋において、エネルギー代謝に関連する蛋白質の翻訳後酸化修飾について着目し、加齢によるエネルギー代謝能の低下との関わりについて検討する。

3. 研究の方法

3ヵ月齢 (Young) および20ヶ月齢 (Old) の雄性 c57BL/6 マウスを用いた。体重および副睾丸脂肪組織重量を測定するとともに、下肢筋を摘出してラベリングしたグルコースの取り込み能を測定した。さらに、筋から抽出した蛋白質を2次元電気泳動によって分離し、抗 nitrotyrosine 抗体、抗 hydroxynonenal 抗体および抗 argpyrimidine 抗体を用いて blotting を行い、酸化関連修飾蛋白質の探索を行った。修飾の認められたスポットをゲルから抽出し、生成を行った後に質量分析

(MS/MS) によりアミノ酸配列を決定し、修飾蛋白質を同定した。

一方、筋から抽出した蛋白質を用いて、AMP 依存性 protein kinase (AMPK) およびリン酸化 APMK の発現量を western-blotting によって定量を行った。

4. 研究成果

1) Young マウスと比較して Old マウスにおいて、体重および副睾丸脂肪重量の有意な増大がみられた。一方、腓腹筋重量は両群間で有意差は認められなかった。

また、Old マウスの骨格筋では、グルコース取り込み能の低下が観察され、糖代謝不全が起こっていることが示された (Fig. 1)。

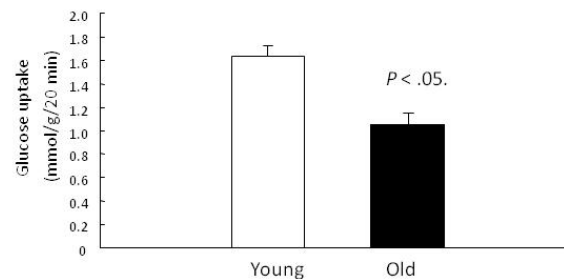


Fig. 1. 骨格筋におけるグルコース取り込み能

2) Young マウスと比較して Old マウスにおいて、nitrotyrosine および argpyrimidine 修飾を受けた蛋白質の増大が認められた。修飾蛋白質をゲルから抽出したあと、質量分析によってアミノ酸配列を決定し、蛋白質の同定を試みた。その結果、nitrotyrosine 修飾を受ける蛋白質として、Adenylate kinase 1 (AK1) の同定に成功した (Fig. 2)。

AK1 のニトロ化修飾について確証を得るために、抗 AK1 抗体によって免疫沈降を行い、沈降物を抗 nitrotyrosine 抗体で blotting を行った。その結果、Old マウスの骨格筋では Young マウスの骨格筋と比較して、AK1 ニトロ化の増大が認められ、質量分析結果についての確証を得た。一方、AK1 の蛋白質量については両群間で有意な変動は認められなかった。

AK1 は 194 のアミノ酸から構成される分子量 21,400 の酵素蛋白質で、ADP→ATP+AMP を触媒することにより、細胞内の AMP 量を調節する。そのため、nitrotyrosine 修飾による AK1 活性の低下は細胞内の AMP 量を低下させることが考えられる。

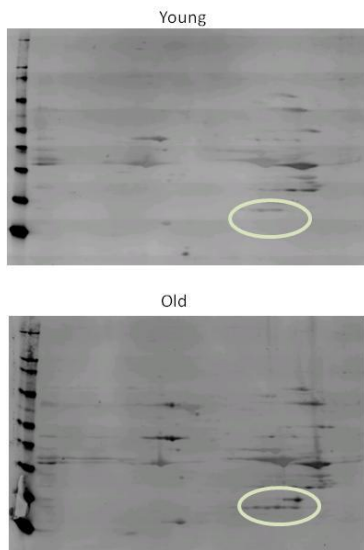


Fig. 2. Old マウスにおいて増大の認められた Nitrotyrosine 修飾蛋白質

3) 筋細胞内の AMP 量は、糖取り込みを制御する律速酵素 AMPK の活性を調節することにより、細胞膜における糖取り込み能を規定する。そこで、AMPK のリン酸化レベルを測定したところ、Young マウスと比較して Old マウスでは低下が認められた (Fig. 3)。このことは、AK1 のニトロ化修飾が細胞内の AMP 量の低下を介して AMPK 活性の低下へと導いたことを示唆している。

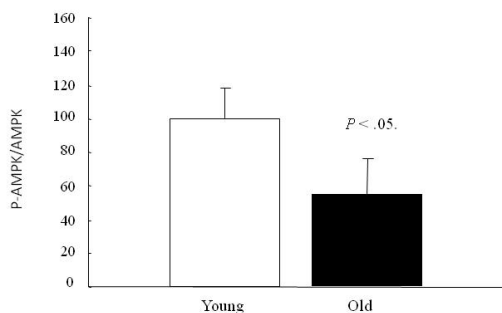


Fig. 3. 骨格筋における AMPK リン酸化レベル

以上、本研究において、自由摂餌、活動制限下で加齢したマウスの骨格筋では、①グルコース取り込み能が低下すること、②AK1 のチロシン残基がニトロ化修飾を受けること、③AMPK のリン酸化レベルが低下することが明らかになった。これらの結果より、加齢性

糖代謝不全マウスでは、AK1 がニトロ化修飾を受けることにより活性が低下し、このことが AMPK 活性の低下を介した糖取り込み能の減弱に関与している可能性が示唆された。

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)

①Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, Yoshikawa T, The microRNA miR-696 regulates PGC1alpha in mouse skeletal muscle in response to physical activity, *Am J Physiol Endocrinol Matab*, 298, 2010, E799-E806. 査読有

②Aoi W, Takanami Y, Kawai Y, Morifuji M, Koga J, Kanegae M, Mihara K, Yanohara T, Mukai J, Naito Y, Yoshikawa T, Dietary whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: A comprehensive protein analysis, *Nutrition*, 2010 (in press). 査読有

③Aoi W, Takanami Y, Kawai Y, Otsuki T, Kawake T, Naito Y, Yoshikawa T, Relaxant effect of microtitan via regulation of autonomic nerve activity in mice, *Life Sci*, 85, 2009, 408-411. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

①青井 渉, 高波嘉一, 川合ゆかり, 市川寛, 吉川敏一. 糖代謝不全マウスにおける骨格筋蛋白質の酸化的翻訳後修飾. 第 64 回日本体力医学会大会, 2009 年 9 月 19 日, 新潟.

②Aoi W, Takanami Y, Kawai Y, Naito Y, Yoshikawa T, Exercise-induced oxidative CPT I modification and lipid metabolism in skeletal muscle, 56th American College of Sports Medicine, May 28, 2009, Seattle, WA, USA.

③Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Osawa T, Yoshikawa T, Takahashi J, Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise, 15th International Symposium on Carotenoids, 2008 年 6 月 24

日，沖縄.

〔図書〕（計6件）

①Aoi W, Food factors for Health Promotion (担当部分：Exercise and Food Factors), KARGAR, 2009, pp147-155.

②青井渉，吉川敏一．スポーツ栄養・食事ガイド（担当部分：日常の食生活とサプリメントの応用），文光堂，2009，pp380-386.

③青井渉，アスタキサンチンの科学（担当部分：アスタキサンチンの抗疲労作用），成山堂書店，2009，pp60-70.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青井 渉 (AOI WATARU)

京都府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：60405272

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：