

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 6 月 1 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21500640

研究課題名（和文） 運動が筋のインスリン感受性を上昇させる分子機序：
NR4A 遺伝子発現に着目した研究研究課題名（英文） The mechanism of exercise-induced increase in insulin sensitivity：
Effect of exercise on NR4A receptor gene expression

研究代表者

川中 健太郎 (KAWANAKA KENTARO)

新潟医療福祉大学・健康科学部・准教授

研究者番号：80339960

研究成果の概要（和文）：

運動を行うと骨格筋のインスリン感受性が上昇する。これは、運動が糖尿病の予防・治療に有効な理由のひとつである。本研究では、「運動を行うと活動筋において核内受容体 NR4A 遺伝子発現が増加し、それを介して筋のインスリン感受性が上昇する」との仮説を検討したが、その可能性を示すことはできなかった。しかし、「不活動によって NR4A 遺伝子発現量が減少し、それを介してインスリン抵抗性が引き起こされる」可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Exercise increases insulin sensitivity of glucose transport in skeletal muscle. Our study aimed to examine the possibility that exercise-induced increase in insulin sensitivity is mediated by the increased expression of NR4A receptors in skeletal muscle. However, this possibility is unlikely since exercise increased NR4A mRNA but not protein expression in rat skeletal muscle. On the other hand, our study showed that hindlimb immobilization decreased NR4A protein expression in rat postural muscle, suggesting the possibility that inactivity-induced insulin resistance is mediated by the reduced expression of NR4A receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：骨格筋 インスリン感受性 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

- (1) 急性運動を行うと、運動終了から数時間以上経過した後に、活動筋では一定量の

インスリン刺激に対してより多くの血糖を取り込めるようになる。すなわち、骨格筋のインスリン感受性が上昇する。こ

れは、運動が糖尿病の予防・治療に有効な理由のひとつである。しかし、運動による筋のインスリン感受性上昇の分子メカニズムについては不明である。

- (2) 先行研究によると、脂肪細胞に核内受容体である Nuclear Receptor subfamily 4 group A (NR4A) 遺伝子を過剰発現させるとインスリン感受性が上昇する。また、骨格筋にも NR4A 遺伝子が発現しており、インスリン抵抗性を有する糖尿病動物の骨格筋において NR4A 遺伝子発現が減少しているとの報告がある。
- (3) 我々は、運動を行うと、活動筋で NR4A 遺伝子発現が増加し、それを介して筋のインスリン感受性が上昇するとの仮説を考えた。

2. 研究の目的

- (1) 運動を行うと骨格筋における NR4A 遺伝子発現が増加するか検討する。
- (2) 運動によって筋の NR4A 遺伝子発現が増加する場合は、運動由来のどのようなシグナルが NR4A 遺伝子発現を増加させるのか検討する。
- (3) 運動不足(不活動)によって筋の NR4A 遺伝子発現が減少するか検討する。
- (4) 骨格筋における NR4A 遺伝子発現とインスリン感受性の因果関係について検討する。

3. 研究の方法

(1) 運動実験のプロトコール

5 週齢の雄性ラットに対して、一過性のトレッドミル走行運動(分速 9m、傾斜 15%、3 時間)もしくは水泳運動(錘無し、3 時間)を負荷した。運動終了直後、4 時間後、および 8 時間後に上肢の上腕三頭筋と下肢のヒラメ筋を摘出した。摘出した筋は NR4A の mRNA ならびにタンパク質発現量の測定に用いた。

(2) 電気刺激実験のプロトコール

5 週齢の雄性ラットについて片側のみの坐骨神経を 100Hz の周波数で電気刺激した (250ms-train, 60trains/min)。電気刺激は 9 分間×5 セット(セット間は 1 分間休止)を行った。電気刺激終了後、両側の前脛骨筋を摘出した。非電気刺激脚の前脛骨筋はコントロールとした。摘出した筋は NR4A の mRNA ならびにタンパク質発現量の測定に用いた。

(3) 摘出筋インキュベーション実験のプロトコール

5 週齢の雄性ラットから上肢の Epitrochlearis 筋(滑車上筋)を摘出した。摘出した滑車上筋を AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) の薬理的活性剤である AICAR(0.5mM)とともに 6 時間フラスコ内でインキュベーションした。その後、摘出した筋は NR4A の mRNA ならびにタンパク質発現量の測定に用いた。

(4) 不活動実験のプロトコール

5 週齢の雄性ラットについて片側のみの下肢にギブスを装着して固定した。ギブス固定後は通常ケージで飼育した。ギブス装着から 6 時間経過した後、両脚のヒラメ筋を摘出した。非ギブス固定脚のヒラメ筋はコントロールとした。摘出した筋は NR4A の mRNA ならびにタンパク質発現量の測定に用いた。

(5) ウェスタンブロットング解析

摘出された筋についてホモジナイズ後に可溶化処理を施した。サンプルを SDS ポリアクリルアミド電気泳動に流して分子量によって分けた後、PVDF 膜への電氣的転写を行った。PVDF 膜上の NR4A3 タンパク質を NR4A3 に対する特異的抗体 (Perceus Proteomics)を用いて検出した。

(6) リアルタイム PCR 解析

摘出された筋から RNA を抽出・精製した。その後、逆転写酵素を用いて RNA から cDNA

を合成した。さらに、得られた cDNA に SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) と目的遺伝子 (NR4A1 ならびに NR4A3) に特異的なプライマーを加えて、ABI7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。そして、増幅された cDNA の発光強度を mRNA 発現量として定量した。

(7) エレクトロポレーション

NR4A3 Human cDNA ORF Colne (#RC218250, OriGene Technologies Inc) を大腸菌に組み込んで増殖させた。増殖・精製したプラスミドをラット前脛骨筋に注入した後、筋に対して 50V/cm で 8 回の電気刺激を行った。

4. 研究成果

(1) 運動は活動筋において NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量を増加させる

ラットに 3 時間の水泳運動を負荷したところ、運動終了直後に水泳運動の活動筋である上腕三頭筋において NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が増加した(図 1)。一方、ラットに 3 時間のトレッドミル走行を負荷したところ、運動終了直後に走行運動の活動筋であるヒラメ筋において NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が増加した(図 2)。これらの活動筋ではインスリン感受性が上昇することが確かめられており、運動によるインスリン感受性上昇と NR4A mRNA 発現増加との相関性が認められた。

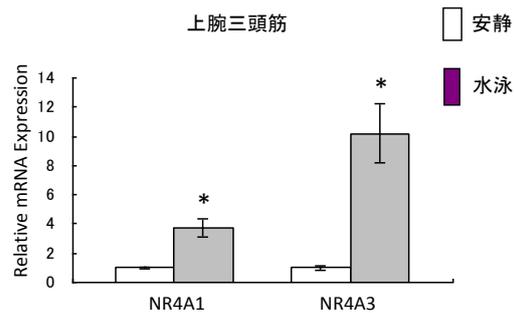


図1. 3時間水泳運動終了直後の上腕三頭筋におけるNR4A mRNA発現量

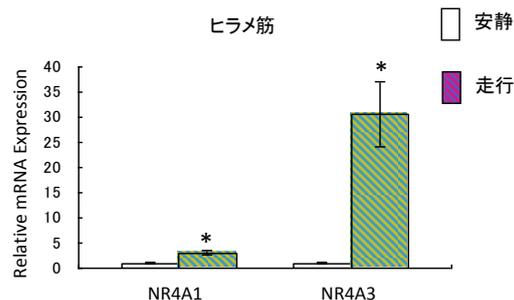


図2. 3時間トレッドミル走行運動終了直後のヒラメ筋におけるNR4A mRNA発現量

(2) 電気刺激による局所的な筋活動は NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量を増加させる

麻酔下でラット片脚の坐骨神経を電気刺激することによって前脛骨筋を筋収縮させたところ、対側の非刺激脚に比べて NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が増加した(図 3)。先行研究では、交感神経活動や血中カテコラミン上昇などの神経性・体液性因子によって NR4A 遺伝子発現量が変化することが報告されていたが、この実験結果は運動由来に局所的に NR4A 遺伝子発現量が調節されることを示す。

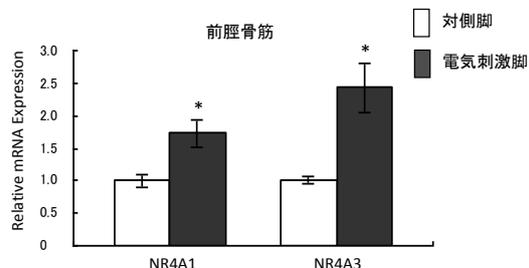


図3. 電気刺激(100Hz, 9分間×6)による筋収縮終了直後の前脛骨筋におけるNR4A mRNA発現量

(3) 薬理的な AMPK 活性化は NR4A1 ならび

に NR4A3 mRNA 発現量を増加させる運動にともなった骨格筋における高エネルギーリン酸化合物(ATP や CrP)の減少は AMP 依存性プロテインキナーゼ(AMPK)を活性化する。筋活動は AMPK 活性化をシグナルとして様々な適応現象を局所的に引き起こすことが知られている。ラット上肢から摘出した滑車筋をプラスチック容器内で薬理的 AMPK 活性化剤である AICAR とともにインキュベーションするだけでも NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が増加した(図 4)。これは、運動が AMPK 活性化を介して局所的に NR4A 遺伝子発現量を調節する可能性を示す。

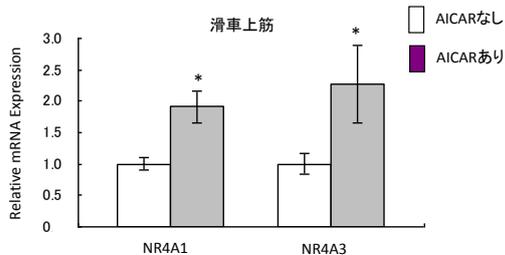


図4. AICARによるインキュベーション(6時間)終了直後の滑車筋におけるNR4A mRNA発現量

(4) 運動は NR4A mRNA 発現量を増加させるものの、NR4A3 タンパク質発現量を増加させない。

mRNA の遺伝情報はタンパク質に翻訳される。すなわち、mRNA 発現量が変化してもタンパク質量が変化しなければ機能的な変化は生じない。そこで NR4A タンパク質発現量の変化を検討した。ラットに 3 時間の水泳運動を负荷したところ、活動筋である上腕三頭筋においてインスリン感受性が上昇するとともに、NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が増加した(図 1)。しかし、このとき NR4A3 タンパク質発現量の増加はみられなかった(図 5)。また、ラットに 3 時間のトレッドミル走行運動を负荷したところ、活動筋であるヒラメ筋においてインスリン感受性

が上昇するとともに、NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が増加した(図 2)。しかし、このとき NR4A3 タンパク質発現量の増加はみられなかった(図 6)。すなわち、少なくとも我々の実験モデルにおいては、運動による活動筋でのインスリン感受性上昇に NR4A3 タンパク質発現量の変化は関与しないことが示された。尚、NR4A1 タンパク質発現量については特異的抗体を入手することができなかったために検討できなかった。

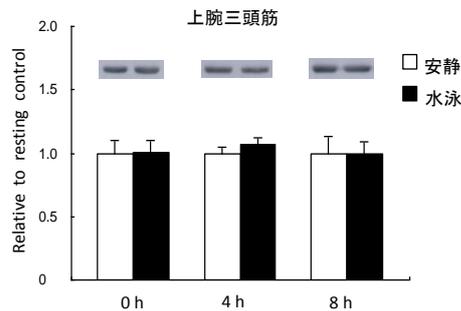


図5. 3時間水泳運動終了0, 4, および8時間後の上腕三頭筋におけるNR4A 3タンパク質発現量

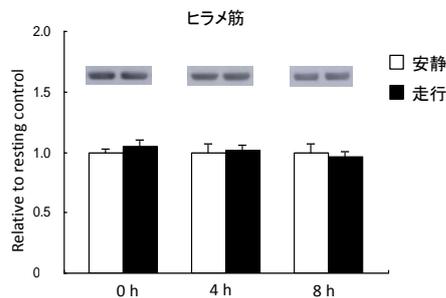


図6. 3時間トレッドミル走行運動終了0, 4, および8時間後のヒラメ筋におけるNR4A 3タンパク質発現量

(5) 不活動は NR4A mRNA 発現量を減少させるとともに、NR4A タンパク質発現量を減少させる。

ラットの片脚に 6 時間のギブス固定を施すと、ヒラメ筋の NR4A1 ならびに NR4A3 mRNA 発現量が対側の非固定脚に比べて減少するとともに((図 7)、NR4A3 タンパク質発現量の減少も認められた(図 8)。この実験結果は立位・歩行にともなった筋活動が局所的に NR4A3 タンパク質発現量を減少させて、それにもなってインスリン感受性を減少

させる可能性を示す。

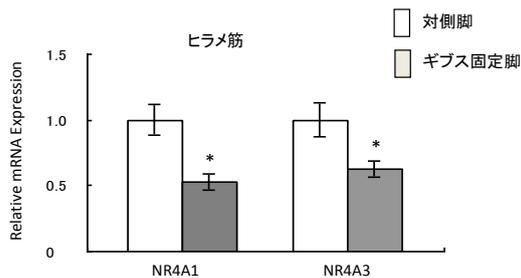


図7. 6時間ギブス固定終了直後のヒラメ筋におけるNR4A mRNA発現量

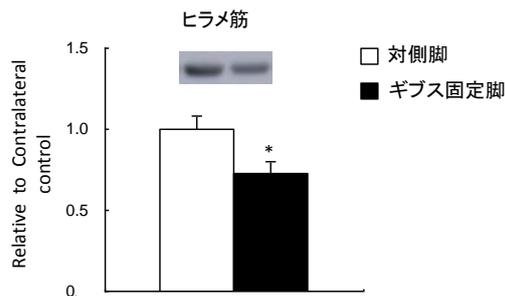


図8. 6時間ギブス固定終了直後のヒラメ筋におけるNR4A 3タンパク質発現量

(6) 骨格筋におけるNR4A遺伝子発現とインスリン感受性の因果関係を検討する試み
標記について検討するために、DNA エレクトロポレーション法を用いてNR4A3遺伝子を組み込んだプラスミドをラット前脛骨筋に急性に導入した。しかし、NR4A3タンパク質発現量の増加を観察することができず、過剰発現にともなったインスリン感受性上昇の有無の評価にまでは至らなかった。

(7) まとめ

運動を行っても活動筋においてNR4A3タンパク質発現量は増加しなかった。したがって、運動終了後に活動筋で生じるインスリン感受性上昇にはNR4A3遺伝子発現は関係していない。一方、立位・歩行活動の不足、すなわち不活動にともなってNR4A3タンパク質発現量の減少が認められた。したがって、不活動による筋のインスリン感受性低下にはNR4A3タンパク質発現量減少が関わっているかもしれない。運動や不活動によるNR4A1タンパク質発現量の変化、また、

NR4A遺伝子発現とインスリン感受性の因果関係についてはさらに検討する必要がある。

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2件)

- 1) Kawasaki, E., Hokari, F., Sasaki, M., Sakai, A., Koshinaka, K., and K. Kawanaka. The effects of beta-adrenergic stimulation and exercise on NR4A3 protein expression in rat skeletal muscle. *J. Physiol. Sci.* 61: 1-11, 2011.

[DOI 10.1007/s12576-010-0114-y](https://doi.org/10.1007/s12576-010-0114-y)

- 2) Kawasaki, E., Hokari, F., Sasaki, M., Sakai, A., Koshinaka, K., and K. Kawanaka. Role of local muscle contractile activity in the exercise-induced increase in NR4A receptors mRNA expression. *J. Appl. Physiol.* 106: 1826-1831. 2009.

<http://www.jap.org>

[学会発表] (計3件)

- 1) 川中健太郎,川崎絵美. 運動が骨格筋における核内受容体 NR4A3 遺伝子発現に及ぼす影響. 第9回新潟医療福祉学会学術集会 (新潟), 2009年. 10月
- 2) 川崎絵美,保莉芙美,酒井篤,川中健太郎. 運動および不活動が核内受容体 NR4A3タンパク質発現に及ぼす影響. 第64回日本体力医学会大会 (新潟), 2009. 9. 18-20.
- 3) 川崎絵美,酒井篤,川中健太郎. ギブス固定がラットヒラメ筋の糖取り込みに及ぼす影響. 第17回日本運動生理学会(東京), 2009.7. 25-26.

〔図書〕（計 0 件）

〔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

川中 健太郎 (KAWANAKA KENTARO)
新潟医療福祉大学・健康科学部・准教授
研究者番号：80339960

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

寺田 新 (TERADA SHIN)
早稲田大学・付置研究所・講師
研究者番号：00460048
(H21 連携研究者)

