

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34522

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560407

研究課題名(和文)オートファジーによる脂肪滴形成・分解に対する運動効果の解明

研究課題名(英文)Effect of voluntary exercise on the regulation of lipid droplet formation and degradation by autophagy

研究代表者

北村 裕美 (Kitamura, Hiromi)

流通科学大学・人間社会学部・准教授

研究者番号：00360090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は肥満の予防改善に対する運動の分子メカニズム的效果をオートファジーに着目して検討することであった。

K05マウスでは、20週間の自発運動により副睾丸周囲脂肪量や肝脂肪滴が顕著に減少した。脂肪組織中mRNA発現は、Atg5、Atg7が自発運動により増強し、LC3bが減弱した。脂肪組織中LC3⁻/LC3⁺比は自発運動によりWTマウスでは減弱し、K05マウスでは増強した。K05マウスでは、自発運動により腸内細菌多様性が低下し、Firmicutes門が減少した。オートファジー関連因子とFirmicutes門やBacteroidetes門との間に有意な関係は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)： In this study, to elucidate the molecular mechanism of exercise on improvement of obesity and related diseases, we studied using TLR5 deficient (K05) mice.

As results, voluntary exercise for 20 weeks decreased fat mass in epididymal and lipid droplets in liver on K05 mice. In adipose tissues, the mRNA expressions of Atg5 and Atg7 were significantly enhanced by voluntary exercise, although LC3b mRNA was downregulated. The LC3⁻/LC3⁺ ratio in adipose tissues attenuated in that of WT mice by voluntary exercise but enhanced in that of K05 mice. Voluntary exercise decreased microbiota diversity and Firmicutes phylum related to obesity on K05 mice. However, there were no significant correlations between autophagy-related proteins and Firmicutes or Bacteroidetes phylums.

研究分野：応用健康科学

キーワード：オートファジー 自発運動 脂肪組織 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞成分の分解を行うリソソーム分解経路であり、飢餓状態における栄養源の確保が主な役割として知られるが、現在ではさまざまな疾患の制御に関与することが示されている。

近年、脂肪滴形成・分解にもオートファジー(リポファジー)の関与が示され(Singh R, et al., 2009), 肥満症の脂肪組織での活性化が明らかとなった(Zhang Y, et al., 2009, Kovsan J, et al., 2011)。肥満症にともなう過剰な脂質は、耐糖能の悪化、慢性炎症の発症やアポトーシス誘導など「脂肪毒性」と呼ばれる悪影響を及ぼすことから、積極的なリポファジーによる脂肪滴形成・分解には生理学的意義、すなわち正常細胞を保護する作用があるものと考えられるが(Singh R and Cuervo AM, 2012)、運動の直接的な影響は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、肥満やそれに伴う疾患の予防改善に対する運動の分子メカニズム的効果を解明することを目的として、オートファジー関連分子に及ぼす運動の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と実験条件

本研究では、肥満を呈する toll-like receptor (TLR)5 遺伝子欠損 (K05) マウスと C57BL/6 野生型 (WT) マウスを用いた。自発運動群 (WR) とコントロール群 (Ctrl) に分け、20 週間個別飼育した。

(2) サンプリングと測定項目

20 週間後、安静状態で麻酔下にて採血および組織を摘出し、心臓・副腎・ヒラメ筋、副腎丸周囲脂肪の質重量を測定した。肝・脂肪組織の一部は測定まで液体窒素で凍結した後分析まで -80℃ 保存した。また、肝組織の一部は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作製した。

肝脂肪滴は hematoxylin-eosin (HE) 染色により評価し、オートファジーおよび肥満関連因子の組織中 mRNA 発現、およびタンパク質発現は、それぞれリアルタイム RT-PCR 法とウエスタンブロッティング法を用いて評価した。また、24 時間糞便を回収し、次世代シーケンズ法を用いて腸内フローラのメタゲノム解析を実施した。

(3) リアルタイム RT-PCR 法

Total RNA は組織を TRizol (Invitrogen 社) によりホモジナイズした後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出、Nano Drop system (Nano Drop Technologies 社) を用いて RNA 濃度を測定した。その後 Total RNA は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社) を用いて逆転写反応させ、cDNA を合成した。cDNA は、Fast

SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 社) により定量した。用いたターゲットプライマーのシーケンスは次に示す。Autophagy related gene (Atg)5; Forward, 5' - GATGTGCTTCGAGATGTG -3', Reverse, 5' - CAACGTCAAATAGCTGAC -3', Atg7; Forward, 5' - CCATGATGTCATCTTCT -3', Reverse, 5' - TCTTCAGCCATGTCTCA -3', microtubule-associated protein light chain (LC) 3 b; Forward, 5' - ACCAAGCCTTCTTCTCTCC -3', Reverse, 5' - TGTCCCGAATGTCTCTCTG -3', glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); Forward, 5' - GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG -3', Reverse, 5' - ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA -3'。

(4) ウエスタンブロッティング法

肝・脂肪組織はホモジナイズし、ウエスタンブロット用の溶液に懸濁した後タンパク濃度を測定して用いた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施し、PVDF メンブレンにタンパクを転写した。そして、Ponceau 染色にて転写が正常に行われたことを確認した。その後、メンブレンを ECL Prime blocking agent (GE ヘルスケア・ジャパン社) を含む TBST にてブロッキングし、一次抗体と反応させた。一次抗体は LC3 A/B (4108, 1:1000), Atg5 (12994, 1:1000), Atg7 (8558, 1:1000) を用いた(すべて Cell Signaling Technology 社)。また、内在コントロールとして GAPDH (2118, 1:5000, Cell Signaling Technology 社) を使用した。そして、二次抗体 (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, 7074, 1:10000, Cell Signaling Technology 社) とメンブレンを反応させ、化学発光検出試薬にて発色しイメージアナライザー (LAS-1000, GE ヘルスケア・ジャパン社) で観察した。

(5) 統計処理

統計解析には、2 元配置の分散分析、あるいは相関分析を用い、有意確率は 5% 未満とした。

4. 研究成果

(1) 各組織に対する自発運動の影響

K05 マウスは明らかな肥満を呈したが、20 週間の自発運動により副腎丸周囲脂肪量や肝脂肪滴の顕著な減少が観察された。また自発運動によって、WT マウス、K05 マウスともに心臓およびヒラメ筋の肥大を認めた。

(2) 肝臓および脂肪組織におけるオートファジーに及ぼす自発運動の影響

肝臓のオートファジー関連分子 Atg5, Atg7、および LC3b の mRNA 発現には、自発運動による有意な抑制が観察された (Atg5, Atg7; それぞれ $p < 0.01$, LC3b; $p < 0.05$)。しかしながら、タンパク質発現レベルには差はなく、ま

た TLR5 遺伝子欠損による影響も観察されなかった (図 1, 2)。

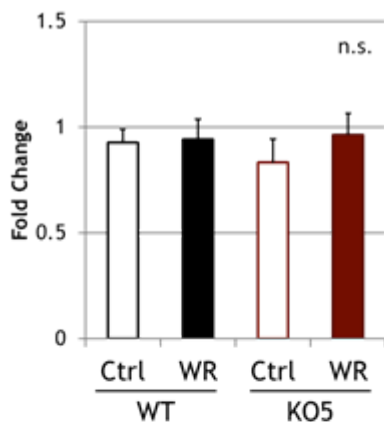


図1 肝臓中Atg5タンパク質発現

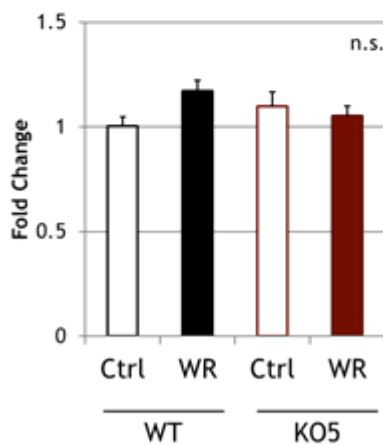


図2 肝臓中LC3-II/LC3-I比

一方、脂肪組織では、オートファジーの活性化が観察された。すなわち、脂肪組織の Atg5 と Atg7 の mRNA 発現は、自発運動により有意に増強され (Atg5; $p < 0.01$, Atg7; $p < 0.05$)、LC3b mRNA 発現は有意に抑制された ($p < 0.05$)。さらに、KO5 マウスは WT マウスと比較して脂肪組織の Atg5 タンパク質発現レベルで有意な増強が確認された (図 3, $p < 0.05$)。加えて、WT マウスで自発運動により有意に低下した LC3- / LC3- 比は、KO5 マウスでは逆に有意に増強していた (図 4, それぞれ $p < 0.05$)。

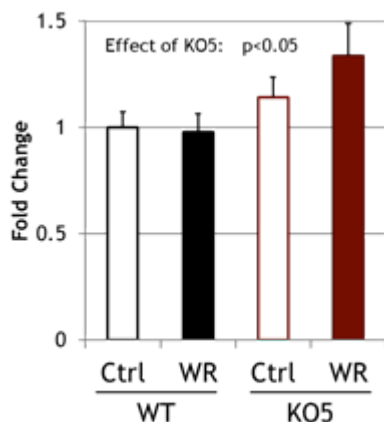


図3 脂肪組織中Atg5タンパク質発現

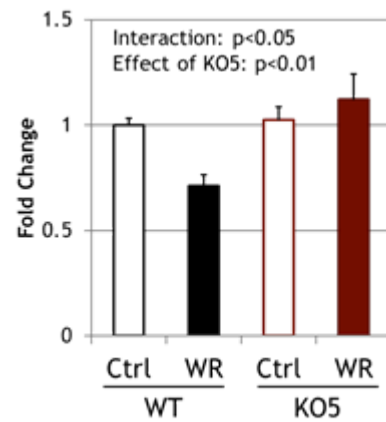


図4 脂肪組織中LC3-II/LC3-I比

したがって、自発運動による KO5 マウスの肝脂肪滴減少には、オートファジー機構による脂肪毒性回避の積極的な作用とは異なる現象である可能性が示唆された。その一方で、脂肪組織でのオートファジー機構には、自発運動の影響、ならびに TLR5 遺伝子欠損の影響が示された。

(3) 腸内フローラに及ぼす自発運動の影響

KO5 マウスの腸内細菌叢は、肥満にともない変化することが知られている。今回、20 週間の自発運動による腸内フローラ変化について検討した結果、腸内細菌種の OTU の値は、Ctrl 条件では KO5 マウスが WT マウスよりも有意に高く、KO5 マウスにおいて自発運動により有意に減少した (それぞれ $p < 0.01$)。肥満の指標とされる Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の比 (F/B 比) については、KO5 マウスは WT マウスよりも有意な低値を示し ($p < 0.05$)、KO5 マウスでは自発運動により F/B 比が有意に低下した ($p < 0.01$)。この理由は Firmicutes 門の有意な減少によるものであった ($p < 0.01$)。

Actinobacteria 門は、KO5 マウスで自発運動により有意に減少した ($p < 0.05$)。また Proteobacteria 門やその他の総腸内細菌 (門のレベルでの比較) では、KO5 マウスの方が WT マウスよりも有意に多く (それぞれ $p < 0.05$)、自発運動により有意に減少した (Proteobacteria 門; $p < 0.01$, その他の総腸内細菌; $p < 0.05$)。

Verrucomicrobia 門や Tenericutes 門は WT マウスで確認されたが、KO5 マウスではほとんど検出されなかった (Verrucomicrobia 門; $p < 0.05$, Tenericutes 門; $p < 0.01$)。WT マウスではほとんど検出されなかった TM7 門や Cyanobacteria 門が KO5 マウスで確認された (それぞれ $p < 0.01$)。

これらのことから、20 週間の自発運動は腸内フローラを変化させること、さらには、肥満を呈する KO5 マウスにおいて、自発運動が腸内細菌の多様性を低下させ、肥満に関与する Firmicutes 門を減少させることが明らかになった。

(4) オートファジー関連タンパク質と腸内フローラの関係

オートファジー関連因子タンパク質発現と腸内フローラとの関係について解析したところ、肥満にかかわる F/B 比との間に有意な相関関係は確認されなかった。しかしながら、肝臓の Atg5 と OD1 門, TM6 門, 腸内細菌多様性との間には、それぞれ有意な負の相関関係が確認された (それぞれ $p < 0.05$)。また肝臓の Atg7 と OD1 門, TM6 門, 腸内細菌多様性との間にもそれぞれ有意な負の相関関係が確認された (それぞれ $p < 0.05$)。

一方、脂肪組織の Atg5 と Cyanobacteria 門, TM7 門の間にそれぞれ有意な正の相関関係が認められ (Cyanobacteria 門; $p < 0.01$, TM7 門; $p < 0.05$)、Tenericutes 門との間には有意な負の相関関係が認められた ($p < 0.01$)。また脂肪組織の Atg7 と Actinobacteria 門, Cyanobacteria 門との間にそれぞれ有意な正の相関関係が確認された (それぞれ $p < 0.05$)。さらに、脂肪組織の LC3- / LC3- 比と Proteobacteria 門との間にも有意な正の相関関係がみられた ($p < 0.05$)。

脂肪組織で観察された、オートファジー関連分子の変化が、腸内細菌叢の変化に関連するののかについては、今後の検討課題となってしまったが、少なくとも脂肪組織におけるオートファジー関連分子の運動による変化と、腸内フローラの変化については示すことができた。その作用機序や生理学的な意義についてはさらなる解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

北村裕美, 内田昌孝, 小柳えり, 矢野博己, 自発運動がオートファジー関連分子におよぼす影響, 第 70 回日本体力医学会大会, 2015 年 9 月 21 日, 和歌山県民文化会館 (和歌山県和歌山市)

北村裕美, 内田昌孝, 小柳えり, 矢野博己, 自発運動トレーニングがオートファジー関連因子発現におよぼす影響, 第 69 回日本体力医学会大会, 2014 年 9 月 19 日, 長崎大学文教キャンパス (長崎県長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 裕美 (KITAMURA, Hiromi)
流通科学大学・人間社会学部・准教授
研究者番号: 00360090

(2) 研究分担者

矢野 博己 (YANO, Hiromi)
川崎医療福祉大学・医療福祉学部・教授
研究者番号: 20248272