

平成 19 年度

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

修士論文

一過性の低強度・長時間水泳運動が骨格筋 Lipin-1
および YY1 の mRNA 発現量に及ぼす影響

**Effects of acute bout of low-intensity prolonged exercise on Lipin-1
and YY1 mRNA expression in rat skeletal muscle**

指導教員 (主査) 樋口 満 教授

(副査) 村岡 功 教授

(副査) 坂本 静男 教授

スポーツ科学研究科 スポーツ科学専攻

5006A059-5

東田 一彦

Higashida Kazuhiko

目次

第1章. 緒言	1
第2章. 文献研究	4
I. ミトコンドリアの構造と機能	5
II. ミトコンドリア増加のメカニズム	5
1. ミトコンドリア DNA と遺伝子発現調節	5
2. 核 DNA にコードされているミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節	5
(1) 核 DNA に存在するミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節	5
(2) ミトコンドリア内へのタンパク質の輸送	7
(3) PGC-1 α によるミトコンドリアタンパク質の転写活性化	8
3. PGC-1 α ノックアウトマウスの骨格筋におけるミトコンドリア	8
III. 身体運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加	10
1. 身体運動と転写因子	11
2. AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK)	12
3. 体液性因子	13
(1) カテコールアミン	13
(2) 遊離脂肪酸	14
(3) PGC-1 α が関与しない骨格筋ミトコンドリアの増加	15
III. Lipin ファミリー	16
1. Lipin-1 の分布	16
2. Lipin-1 の機能	17
(1) Phosphatidate phosphatase としての機能	17
(2) 転写活性化因子としての機能	17
IV. Yin-Yang 1 (YY1)	18
1. YY1 の分布と機能	18
2. YY1 による転写調節	18
第3章. 研究の目的および研究課題	24
第4章. 研究課題	
課題1: 一過性の低強度・長時間水泳運動がラット骨格筋 Lipin-1 および YY1mRNA の発現量に及ぼす影響の検討	25
I. 目的	25

II. 方法	25
1. 実験動物	25
2. 実験プロトコール	25
3. 分析方法	26
(1) 骨格筋サンプル採取	26
(2) Total RNA の抽出	26
(3) 骨格筋 Lipin-1 および YY1 mRNA 発現量の測定	27
4. 統計処理	28
III. 結果	28
1. 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量	28
2. 骨格筋 YY1 mRNA 発現量	28
IV. 考察	28
課題 2: 骨格筋 Lipin-1 発現量増加を引き起こす細胞内情報伝達経路の検討	35
I. 目的	35
1. 実験動物	35
II. 方法	35
実験 1. 一過性の低強度・長時間水泳運動がラット骨格筋 AMPK、 グリコーゲン含量および血液生化学指標に及ぼす影響	35 36
1. 運動プロトコール	36
2. 分析方法	36
(1) 骨格筋サンプル採取	36
(2) 血液採取	36
(3) 血清遊離脂肪酸濃度の測定	36
(4) 血漿アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度の測定	37
(5) 骨格筋グリコーゲン含量の測定	37
(6) 骨格筋 Phospho-AMPK 量の測定	37
i) ホモジナイズおよびホモジネイトの調節	37
ii) 電気泳動用サンプルの調整	38
iii) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	38
iv) ウェスタンブロッティング	38
実験 2. 脂質投与がラット骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量に及ぼす影響	39
1. 実験プロトコール	39

2. 分析方法	40
(1) 骨格筋サンプル採取	40
(2) 血液採取	40
(3) Total RNA の抽出	40
(4) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量の測定	40
(5) 血清遊離脂肪酸濃度の測定	40
実験 3. $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト投与がラット骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量に及ぼす影響	41
1. 実験プロトコール	41
2. 分析方法	41
(1) 骨格筋サンプル採取	41
(2) Total RNA の抽出	41
(3) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量の測定	41
実験 4. AICAR 投与がラット骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量に及ぼす影響	42
1. 実験プロトコール	42
2. 分析方法	42
(1) 骨格筋サンプル採取	42
(2) Total RNA の抽出	43
(3) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量の測定	43
(4) 骨格筋 Phospho-AMPK 量の測定	43
4. 統計処理	43
III. 結果	43
実験 1	43
(1) 血清遊離脂肪酸濃度	43
(2) 血漿アドレナリン濃度	43
(3) 血漿ノルアドレナリン濃度	44
(4) 骨格筋グリコーゲン濃度	44
(5) 骨格筋 Phospho-AMPK 量	44
実験 2	44
(1) 血清遊離脂肪酸濃度	44
(2) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量	44
実験 3	44
(1) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量	45

実験 4	・ ・ ・	45
(1) 骨格筋 Phospho-AMPK 量	・ ・ ・	45
(2) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量	・ ・ ・	45
IV. 考察	・ ・ ・	45
 第 5 章. まとめ	・ ・ ・	61
 参考文献	・ ・ ・	63
 謝辞	・ ・ ・	70

第1章 緒言

持久的なトレーニングにより、骨格筋のミトコンドリアが増加することが良く知られている。このことは、運動時の脂質利用の割合を増加させ、筋および肝グリコーゲンの節約、さらには持久的運動能力の改善に寄与していると考えられている。1967年に Holloszy (1967) が持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加を発見して以来、持久的トレーニングと骨格筋のミトコンドリア適応に関する研究が数多く行われている。しかしながら、その多くは、「どのようなトレーニングで、ミトコンドリアがどの程度増加したか」といった記述的なものが多い。したがって、持久的トレーニングが、どのような分子機序によって骨格筋のミトコンドリアを増加させているかについては不明な点が多く残されている。今日、医療現場においては、科学的根拠に基づいた医療 (Evidence based medicine) が求められている。したがって、健康増進・スポーツ科学の分野においても同様に、分子生物学的アプローチによるトレーニング効果のメカニズム解明と、それに基づいた効果的なトレーニング処方確立が必須であると考えられる。

ミトコンドリアなどのタンパク質の合成は、細胞核に存在する生体の遺伝情報である DNA から mRNA を作成する転写から始まる。この転写には、mRNA 合成酵素などの基本転写因子群に加えて、これらを活性化する転写因子や転写補助因子が必要である。近年、寒冷暴露による褐色脂肪細胞のミトコンドリアの増加機序において、Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) と呼ばれる転写補助因子が重要な役割を果たしていることを示す実験結果が数多く報告されている (Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999)。PGC-1 α は、PPAR、NRF-1、ERR α や TR などの数多くの転写因子群と協働し、ミトコンドリア系酵素の遺伝子発現を包括的に調節していると考えられている。持久的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリア増加のメカニズムとの関係においても PGC-1 α に関する研究が進み、一過性の持久的運動およびトレーニングによって骨格筋の PGC-1 α 発現

量が増加することや(Baar et al., 2002; Terada et al., 2002)、遺伝工学的手法を用いて骨格筋において PGC-1 α を過剰発現させるとミトコンドリア含量が増加することなどが相次いで報告されている (Lin et al. 2002; Miura et al. 2006; Wende et al. 2007)。以上の知見から、持続的トレーニングによる骨格筋ミトコンドリア増加の機序においても PGC-1 α が重要な役割を果たしていると考えられている。

一方で、PGC-1 α をノックアウトしたマウスの骨格筋では、ミトコンドリアが顕著に減少するものの、完全に消失することはないこと(Leone et al., 2005)、さらには PGC-1 α のノックアウトマウスに運動を負荷すると野生型のマウスと同様にミトコンドリアが増加することが報告されている(Leick et al., 2007)。したがって、骨格筋のミトコンドリアが増加するメカニズムに関して、PGC-1 α 以外に重要な因子が存在する可能性が示されている。

最近、Finck et al. (2006) は、Lipin-1 という新規の転写補助因子が、肝細胞において PGC-1 α や PPAR α などの転写因子群と複合体を形成し、ミトコンドリア系酵素、特に脂肪酸 β 酸化に関わる酵素の遺伝子発現調節に関与していることを報告している。また、転写因子の一つである Yin-Yang 1 (YY1) を Human Embryo Kidney (HEK) 細胞に高発現させることで、PGC-1 α と協働してミトコンドリア系酵素の発現量を高めることも近年報告された (Cunningham et al., 2007)。

以上のように、ミトコンドリア新生におけるマスターレギュレーターであると考えられてきた PGC-1 α 以外にもミトコンドリア新生に関与する因子が近年発見されている。ミトコンドリアは生体を構成する様々な細胞においてエネルギーの産生を担う共通の器官であり、その重要性から、上述の転写因子・転写補助因子は骨格筋細胞においても他の細胞同様に機能しており、運動による骨格筋ミトコンドリア増加の機序に関与している可能性が考えられる。そこで、研究課題 1 として、まず、身体運動による骨格筋ミトコンドリア新生にこれらの転写因子・転写補助因子が関与しているかどうかを検討するために、一過性

の運動が骨格筋 Lipin-1 および YY1mRNA 発現量に及ぼす影響を検討することを目的とした。

また、運動時に骨格筋では数多くの細胞内情報伝達経路が活性化される。これらの情報伝達経路のうち、どの経路が運動によるミトコンドリアの新生を引き起こしているのかは必ずしも明らかではない。しかしながら、近年の研究により、持久的トレーニングが骨格筋ミトコンドリアの増加を引き起こす際の情報伝達経路として、1)遊離脂肪酸濃度上昇による核内受容体 PPAR δ の活性化、2)カテコールアミンの増加による β 2 受容体の活性化、および 3)高エネルギーリン酸化合物の減少に伴う AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化、などが有力視されている。

そこで、本研究では、持久的トレーニングによるミトコンドリア増加の情報伝達経路として有力視されているこれらの因子と、研究課題 1 で運動による発現増加が認められた転写因子・転写補助因子との関係を検討することを第二の目的とした。

以上 2 つの研究課題から、身体トレーニングが骨格筋ミトコンドリアを増加させる分子機序の解明に貢献することを目指す。

第2章 文献研究

本章では、まず、ミトコンドリアに関する基礎的な知見から、身体運動が骨格筋ミトコンドリアを増加させるメカニズムとしてこれまでに報告されている研究結果についてまとめることとする。また、最後に、本研究で取り上げる、Lipin-1 と YY1 に関してこれまでに得られている知見について述べる。

I. ミトコンドリアの機能と構造

ミトコンドリアは、外膜と内膜の 2 重の膜により形成される細胞内小器官である。内膜の内部にはマトリクスと呼ばれる、ひだ構造（クリステ）を形成している。このクリステには ATP 産生のために必要な呼吸鎖と酵素が存在している。細胞質で反応が進む解糖やミトコンドリア内で行われる β 酸化により合成されるアセチル CoA を基質とし、クエン酸回路での反応が進むことで NADH や FADH_2 が生成され電子伝達系の基質として ATP 合成に利用される。

電子顕微鏡を用いた研究結果から、ミトコンドリアには、骨格筋細胞中での局在が異なる 2 つの種類が存在することが明らかにとなっている。一方は、筋線維鞘の近くに存在する筋線維鞘下（subsarcolemmal mitochondria ; SS）ミトコンドリアであり、もう一方は、筋原線維間に存在する筋原線維間（intermyofibrillar Mitochondria ; IMF）ミトコンドリアである。SS ミトコンドリアは骨格筋ミトコンドリアの 10~15% の割合を占めており、筋活動の増加および不活動などの刺激に対して反応速度が速く、細胞膜の機能維持のために必要な ATP をすみやかに供給することが主な役割であると考えられている(Krieger et al., 1980)。また、IMF ミトコンドリアは SS ミトコンドリアと比較して、酵素活性、呼吸速度やミトコンドリアタンパク質前駆体の取り込み速度が高いことが知られている(Hood, 2001)。

II. ミトコンドリア増加のメカニズム

1. mitochondria (mt) DNA と遺伝子発現調節

ミトコンドリアは、核の遺伝子とは異なる固有の遺伝子、mtDNA を持つ。mtDNA は核 DNA とは構造が異なり、環状 2 重鎖 DNA であり、多くの RNA をコードしている重鎖と、もう一方の軽鎖からなる。ヒト mtDNA は 16569 塩基対から構成されており、核 DNA と比較すると極めて小さい。一つのミトコンドリアには数個の mtDNA が収納されているが、一つの骨格筋細胞にミトコンドリアは数千個存在するので一つの細胞内の mtDNA の数は非常に多い。このことは、mtDNA は非常に変異を起こしやすく、変異を修復する能力が低いいため、少数の mtDNA が変異を起こしても、その他多くの正常な mtDNA が細胞内の機能を保つのに役立っていると考えられている。

mtDNA は 2 種類のリボゾーム RNA、22 種類のトランスファーRNA と 13 種類のタンパク質をコードしている。また、mtDNA には、わずかながら遺伝子をコードしていない配列が存在し、この領域は D-loop と呼ばれる。重鎖 DNA の転写は、重鎖プロモーター (H-strand promoter ; HSP) 領域内の転写開始点にミトコンドリア RNA ポリメラーゼが結合することで開始する。軽鎖 DNA の転写も同様に、軽鎖プロモーター領域内の転写開始点に RNA ポリメラーゼが結合することで開始する。重鎖と軽鎖 DNA とともに、それぞれのプロモーター領域のすぐ上流に転写調節因子の結合部位が存在する。そこに mitochondrial transcription factor A(Tfam)と呼ばれる転写調節因子が結合し、RNA ポリメラーゼと協働して mtDNA にコードされているミトコンドリアを構成する遺伝子の転写が促進される。

2. 核 DNA にコードされているミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節

(1)核 DNA に存在するミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節

一般的に、タンパク質の合成は、細胞核に存在する DNA から mRNA を作成すること (転

写) から始まる。転写の開始は、転写因子と呼ばれるタンパク質が遺伝子上流の転写開始を調節している領域に結合することにより制御されている。前項で述べたように、mtDNA には 13 個のタンパク質の遺伝子しか存在せず、ミトコンドリアを構成するために必要なタンパク質の遺伝子の大部分は核 DNA に存在する。また、mtDNA の遺伝子発現を調節している Tfam の遺伝子も mtDNA ではなく、核 DNA に存在する。よって、ミトコンドリアの増加には、mtDNA に存在する遺伝子と核 DNA に存在する遺伝子との協調した発現調節が行われる必要がある。

ミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節を解明する研究の過程で、Nuclear respiratory factor-1(NRF-1)と呼ばれる転写因子が、核 DNA に存在するミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節において重要な働きをしていることが明らかとなった。NRF-1 は cytochrome c、ATP synthase γ subunit や他のミトコンドリア系酵素遺伝子のプロモーター部位に結合することでその転写を促進することが知られており、これはミトコンドリアを構成している様々なタンパク質が同じ機序により調節され、発現量のバランスが保たれていることを示している(Chau et al., 1992)。さらに、NRF-1 は mtDNA にコードされているミトコンドリアタンパク質の転写に関与している Tfam の転写を活性化することが報告されている(Virbasius et al., 1993)。したがって、NRF-1 が核 DNA にコードされている多くのミトコンドリア系タンパク質の転写を促進するだけでなく、Tfam 発現量の増加を介して mtDNA にコードされている遺伝子の発現も活性化することで協調した遺伝子の発現調節を行っていると考えられている。

また、ミトコンドリアタンパク質、特に脂肪酸 β 酸化に関わる酵素群の遺伝子発現調節を担っている転写因子として、Peroxisome Proliferator-activated receptors (PPARs)が近年注目を集めている。PPARs は細胞核に存在する受容体(核内受容体)であり、 α 、 γ 、 δ の 3 つのサブタイプが存在し、主に不飽和脂肪酸により活性化され、標的遺伝子の転写を活性化す

る。PPAR α 、 γ 、 δ はそれぞれ、肝臓、脂肪組織、骨格筋で主に発現していることが知られている(Smith and Muscat, 2005)。また、PPARs は各組織のエネルギー代謝において重要な役割を担っていると考えられているため、現在では代謝性疾患治療薬の標的として注目が集っており、PPARs の各サブタイプ特異的な活性化剤が開発されている(Berger et al., 2005)。Tanaka et al. (2003) はマウスに PPAR δ の活性化剤である GW501516 を 8 週間経口投与した結果、骨格筋における β 酸化に関わる酵素の発現量が増加したことを報告している。また、これらの酵素の発現量の増加は、PPAR α や γ の活性化剤では引き起こされないことも示されており、骨格筋において PPAR δ もミトコンドリア系酵素の発現調節において重要な働きをしていると考えられる。

(2)ミトコンドリア内へのタンパク質の輸送

Fig.2-1 に、ミトコンドリアタンパク質の細胞内輸送に関わるタンパク質複合体および分子シャペロンの概略を示す。核 DNA より転写された mRNA は通常は、核を覆っている核膜を通過し細胞質に流出する。そして細胞質に存在するリボゾームによりその塩基配列に合ったアミノ酸が組み合わされ、タンパク質が合成される。しかしながら、ミトコンドリア内で働くタンパク質は転写された後にリボゾームで mRNA の塩基配列に対応したアミノ酸がつなぎ合わされるが、このとき合成されるのは、通常の機能を有したタンパク質ではなく、タンパク質前駆体である。このタンパク質前駆体の末端にはシグナルペプチドと呼ばれる配列が存在し、この配列により正確にミトコンドリア内に輸送される。また、タンパク質前駆体は Heat shock protein70(HSP70)や mitochondrial import stimulating factor(MSF)などの分子シャペロンと呼ばれるタンパク質と結合し、その後、ミトコンドリアの外膜に存在する translocase of the outer membrane (Tom) 複合体および内膜に存在する translocase of the inner membrane (Tim) 複合体によりミトコンドリア内に取り込まれる。そして、最終的に

ミトコンドリアのマトリクスにおいて末端に存在するシグナルペプチドが切断され、通常のタンパク質同様折りたたまれることで高次構造をとり、タンパク質として機能する(Hood, 2001)。

(3) PGC-1 α によるミトコンドリア酵素の転写活性化

褐色脂肪細胞は骨格筋と同様に多くのミトコンドリアが存在する細胞である。白色脂肪細胞がエネルギー貯蔵器官として働いているのに対し、褐色脂肪細胞は熱産生器官として働いており、その重要な役割を担っている脱共役タンパク質-1 (uncoupling protein-1 ; UCP-1) が特異的に発現している(Enerback et al., 1997)。UCP-1 のプロモーター部位には PPAR γ と呼ばれる核内受容体の結合部位が存在し、PPAR γ の活性化剤をラットに投与した結果、褐色脂肪細胞が肥大することが報告されているため、PPAR γ は褐色脂肪細胞への分化に必要な転写因子であると考えられてきた(Tai et al., 1996)。しかしながら、白色脂肪細胞にも PPAR γ が発現していることから、褐色脂肪細胞における UCP-1 の発現には PPAR γ 以外の因子が関与している可能性が示唆されていた。Puigserver et al. (1998) は褐色脂肪細胞特異的に発現し、PPAR γ と相互に作用する転写補助因子をクローニングし、Peroxisome Proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) と名付けた。

前駆脂肪細胞および骨格筋細胞に PGC-1 α 遺伝子を外因的に導入し、PGC-1 α を高発現させることで、UCP-1 やミトコンドリアを構成する酵素の mRNA が増加することが報告されている(Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999)。さらに、PGC-1 α を骨格筋組織特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスが作成され、そのマウスの骨格筋ではミトコンドリアを構成するタンパク質の mRNA、酵素活性および mtDNA コピー数が増加することが報告されている(Lin et al., 2002; Miura et al., 2006; Wende et al., 2007)。

Wu et al. (1999) は骨格筋細胞に PGC-1 α 遺伝子を導入することで、NRF-1 mRNA 発現量

が増加し、それに伴い、ミトコンドリア系酵素の遺伝子の転写活性が高まることを報告している。さらに、PGC-1 α は NRF-1 に直接結合し、複合体を形成することや、NRF-1 の転写活性化部位を欠損したドミナントネガティブ変異体遺伝子を骨格筋細胞に組み込むと、PGC-1 α による転写活性が完全に阻害され、ミトコンドリアの増加作用が引き起こされなかったことが明らかとなっている。上述したように、NRF-1 は Tfam の発現量を増加させ、ミトコンドリア DNA にコードされているタンパク質の転写活性を増大させることが知られている。PGC-1 α 遺伝子を組み込んだ培養細胞では、NRF-1 mRNA だけでなく、Tfam mRNA 発現量が増加することも報告されている(Wu et al., 1999)。さらに、Human Embryo Kidney (HEK) 細胞に PGC-1 α と PPAR δ を発現させ、免疫沈降法により PPAR δ と結合しているタンパク質を観察したところ、PGC-1 α が PPAR δ と結合すること、さらにその結合は PPAR δ 活性化剤、GW501516 を作用させることで増強されることが報告されている(Wang et al., 2003)。

以上の先行研究より、PGC-1 α は NRF-1、Tfam の増加を引き起こし、さらに NRF-1 や PPAR δ と複合体を形成し、その転写作用を活性化することで、包括的にミトコンドリアタンパク質の発現量を調節している因子であると考えられている。

3. PGC-1 α ノックアウトマウスの骨格筋におけるミトコンドリア

PGC-1 α をノックアウトしたマウスの骨格筋におけるミトコンドリアに関する知見も得られている。Leone et al. (2005) は、全身の細胞において PGC-1 α が欠損した PGC-1 α ノックアウトマウスを作成した。その PGC-1 α ノックアウトマウスの骨格筋ではミトコンドリアが顕著に減少しており、それに伴い筋の酸素消費量も低下していた。したがって、この研究結果からも PGC-1 α がミトコンドリア発現調節において重要な働きを担っていることが支持される。しかしながら、PGC-1 α ノックアウトマウスの骨格筋においてもミトコンドリア

は完全に消失することではなく、わずかながら存在しているため、PGC-1 α はミトコンドリアの発現において重要な働きを担っているものの、PGC-1 α だけではそのすべてを説明することはできないと考えられる。

以上、本項に示した知見をまとめると、PGC-1 α 発現量の増加が起点となり、NRF-1 および Tfam の増加を引き起こし、さらに、NRF-1 や PPAR δ を活性化することで、核 DNA および mtDNA にそれぞれコードされているミトコンドリアタンパク質の発現量が増加すると考えられる。しかしながら、PGC-1 α ノックアウトマウスの骨格筋においてもミトコンドリアが存在していることが報告されており、PGC-1 α 以外にもミトコンドリアの発現を調節している因子が存在する可能性が考えられる。

Ⅲ．身体運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加

持久的トレーニングを行うと、骨格筋のミトコンドリア含量が増加することは古くから知られており、1967 年に Holloszy によって初めて報告された(Holloszy, 1967)。彼は、持久的運動トレーニングを負荷したラットの骨格筋ではミトコンドリア酵素活性がおよそ 2 倍に増加したことを報告している。エネルギー基質を 2 倍酸化することが可能になれば、ATP を 2 倍産生することが可能になる。実際、Wibom et al. (1992) は、持久的トレーニングに対する骨格筋代謝の適応を検証するために、6 週間の自転車を用いた持久的トレーニング後、摘出した外側広筋にリンゴ酸とパルミトイル-L-カルニチンを添加することにより、ATP 合成速度がトレーニング前と比較して最大 90%増大したことを報告している。

この結果から、持久的トレーニングによってもたらされるミトコンドリア酵素の増加が、ATP 産生能力を向上させることが示唆される。ATP 産生能力の増大は、運動により低下した骨格筋内 ATP の速やかな再合成を可能にし、ADP や AMP 濃度の上昇の抑制をもたらす。その結果、AMP、および NH $_4^+$ の産生が抑制される。Pi、AMP および NH $_4^+$ の蓄積は筋疲労

を招く要因であると考えられていることから、これらの代謝産物の生成を抑制することにより、筋疲労の出現を遅延させることが可能である。さらに、AMP と Pi は解糖系酵素であるグリコーゲンホスホリラーゼの活性化因子でもある。したがって、ミトコンドリアの酸化能力の向上によって ADP 濃度の上昇を抑制できれば、筋グリコーゲンの分解が抑制され、結果として体内に存在する糖質の節約効果に繋がるものと考えられる。

また、解糖系の最終段階で生成されたピルビン酸の大部分は、ミトコンドリア内に取り込まれ、酸化的に分解される。しかしながら、高強度運動など、筋グリコーゲンが多量に分解されて、ミトコンドリアの酸化能力を超過した場合、ピルビン酸は乳酸脱水素酵素により乳酸に還元される。乳酸から遊離したプロトンは筋細胞内の pH を低下させるため、高強度運動時におけるパフォーマンスの制限要因になると考えられている(Dudley et al., 1982)。したがって、トレーニングによって骨格筋ミトコンドリアが増加すると、より多くのピルビン酸の酸化が可能となり、結果として、高い強度の運動において乳酸の蓄積を回避することが可能になると考えられる。

以上のように、ミトコンドリアの増加が、疲労耐性および運動パフォーマンスの向上に繋がることから、身体トレーニングによるミトコンドリア増加のメカニズムを明らかにするために多くの研究が行われている。しかしながら、未だ不明な点が多く残されている。そこで本項では、これまでに身体運動トレーニングにより骨格筋ミトコンドリアが増加する機序について明らかにされているメカニズムについてまとめる。また、ここで述べる、運動により骨格筋のミトコンドリア新生が引き起こされる機序の概略を Fig.2-2 に示した。

1. 身体運動と転写因子

ミトコンドリア新生において重要な役割を果たしている PGC-1 α 、NRF-1 や PPAR δ といった転写因子・転写補助因子は、身体運動を行うことで発現量の増加が引き起こされることが

近年の研究により明らかにされている。

Murakami et al. (1998) は、ラットに 90 分間の一過性のトレッドミル走を行わせたところ、運動終了 6 時間後において、骨格筋 NRF-1 mRNA が有意に増加したことを報告している。また、一過性の運動や持久的トレーニングにより骨格筋 PGC-1 α 発現量が増加することが数多くの研究により報告されている(Baar et al., 2002)。上述したように、PGC-1 α は NRF-1 を増加させ、さらに NRF-1 と結合することでその転写活性を亢進させる。したがって、身体運動による骨格筋ミトコンドリアの増加には PGC-1 α や NRF-1 といった転写因子群の発現量の増加が関与している可能性が強く考えられる。さらに、マウスに 6 週間の水泳運動を行わせることで、PPAR δ 発現量が増加することが報告されている(Luquet et al., 2003)。また、彼らは骨格筋特異的に PPAR δ を過剰発現させたマウスの骨格筋において、ミトコンドリアタンパク質が増加したことを報告している。したがって、PPAR δ は活性化だけでなく、運動トレーニングで発現量が増加することでもミトコンドリア系酵素の発現量の増加に寄与していると考えられている。

2. AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK)

細胞内の ATP や PCr 濃度が低下することによって活性化される酵素、AMPK が骨格筋ミトコンドリア新生に関与している可能性が報告されている。AMPK は α 、 β 、 γ のサブユニットからなる 3 量体タンパク質で、 α サブユニットはキナーゼ活性を持つ触媒サブユニットで、 β と γ は調節サブユニットである。各ユニットは 2 もしくは 3 個 (α 1、2、 β 1、2、 γ 1、2、3) のアイソフォームが存在することが報告されている(Carling, 2005)。

AMPK は AMP が結合することでアロステリックな調節により 10 倍にもその活性が増加することが知られており、ATP が結合することでその活性は低下する(Carling et al., 1987)。また、AMPK はそのシグナル経路の上流のキナーゼ活性を持つ LKB1 や CaMKK によりリ

ン酸化されることで通常の 100 倍のも活性を発揮することが示されている(Jensen et al., 2007)。さらに、実際に運動を行うと骨格筋の AMPK 活性が上昇することが知られている(Fujii et al., 2000)。この AMPK を活性化する作用を持つ 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) をラットに体重 1g あたり 1mg、4 週間皮下投与することにより、骨格筋のクエン酸合成酵素やコハク酸脱水素酵素などのミトコンドリア系酵素の発現量が増加することが報告されている(Winder et al. 2000)。また、Terada et al. (2002) はラットから摘出した骨格筋を、0.5mM AICAR を含んだ培養液で 18 時間インキュベーションすることにより PGC-1 α の mRNA 発現量が増加したことを報告している。これらの先行研究から、運動トレーニングによるミトコンドリアの増加の機序において、AMPK の活性化による PGC-1 α の増加という経路が関与していると考えられる。

3. 体液性因子

身体運動を行うと、アドレナリンやノルアドレナリンといったカテコールアミンの分泌量が増加する(Lancaster et al., 2004)。そのため、これらのホルモンが骨格筋の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が十分に考えられる。また、身体運動を行うと、エネルギー基質となる脂肪酸の血液中での濃度が増加する。脂肪酸自身が骨格筋における遺伝子発現を調節するリガンドとなりうることが報告されているため(Watt et al., 2006)、身体運動による脂肪酸濃度の上昇が、骨格筋における転写の調節を担っているかもしれない。よって、身体運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加に関して、体液性の因子による調節機構が存在する可能性も考えられる。

(1) カテコールアミン

川中ら（1994）は、ラットに水泳トレーニングとトレッドミルによる走行トレーニングを行わせた結果、それぞれの運動時に動員される筋群、すなわち、水泳トレーニング群では滑車上筋において、走行トレーニングではヒラメ筋においてのみクエン酸合成酵素活性が増加したことを報告している。この結果は、身体運動による骨格筋ミトコンドリア新生に関しては、体液性因子の影響はなく、筋収縮活動自体がミトコンドリア増加を引き起こしていること示している。しかしながら、Harri et al.（1980）はラットに β アドレナリン受容体活性化剤である Isoprenaline を 5 週間投与した場合、骨格筋のクエン酸合成酵素、コハク酸合成酵素およびリンゴ酸脱水素酵素の活性が増加することを報告している。また、近年、Miura et al. (2007) はマウスに β_2 アドレナリン受容体特異的アゴニストである Clenbuterol を投与した場合、PGC-1 α の mRNA 発現量が骨格筋において増加すること、さらには、 β 受容体遮断薬の Propranolol を投与することで運動による骨格筋 PGC-1 α の増加が抑制されることを報告している。身体運動により血液中に増加したアドレナリンやノルアドレナリンが、 β アドレナリン受容体に結合し、セカンドメッセンジャーである cAMP が合成される。cAMP は、Protein kinase A (PKA) を活性化し、cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化、さらには CREB と CBP、p300 との複合体形成を促進することで、転写活性を調節していることが知られている (De Cesare et al., 1999)。さらに、不活性型 CREB を発現させた骨格筋細胞では、PGC-1 α の発現量が低下することも報告されている (Herzig et al., 2001)。したがって、これらの研究結果から身体運動による骨格筋ミトコンドリアの増加に血中カテコールアミン濃度の上昇が関与している可能性が示唆される。

(2) 遊離脂肪酸

Miller et al. はラットに 5 週間の高脂肪食を摂取させた結果、普通食群と比較して骨格筋のミトコンドリア系酸化酵素の活性が増大し、トレッドミル走での疲労困憊にいたるまでの

時間が延長したことを報告している。また、Garcia-Roves et al. (2007) は、長期の高脂肪食摂取とヘパリン投与の組み合わせにより上昇した遊離脂肪酸が、骨格筋ミトコンドリア系酵素の発現量を顕著に増加させたことを報告している。これらの結果から、食事などで誘発される血中遊離脂肪酸濃度の上昇が骨格筋ミトコンドリア新生に関与していると考えられている。高脂肪食摂取と同様に、身体運動を行うと、運動開始直後から血液中の遊離脂肪酸濃度が増加することが知られている。それゆえ、身体運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加において、血中遊離脂肪酸濃度の変化が関与しているかもしれない。

脂肪酸により活性化される転写因子として、核内に存在する受容体である、PPARs が知られている。先述したように、骨格筋においては、主に PPAR δ が発現しており、骨格筋における転写調節に関与していると考えられている。現在では、GW501516 や L165,041 などの PPAR δ 特異的な活性化剤が開発されており、C2C12 骨格筋培養細胞に GW501516 を作用させると脂肪酸酸化に関わるミトコンドリア内の酵素の発現量が増加したことが報告されている(Hondares et al., 2007)。また、先述したように、6 週間の持続的トレーニングにより骨格筋の PPAR δ の発現量が増加することも報告されている(Luquet et al., 2003)。これらの先行研究より、身体運動による骨格筋ミトコンドリア新生には、血液中の遊離脂肪酸濃度の増加が引き金となり、PPAR δ が活性化されることによって遺伝子発現が調節される経路も寄与している可能性が考えられる。

4. PGC-1 α が関与しない骨格筋ミトコンドリアの増加

身体運動によるミトコンドリア新生において PGC-1 α が重要な働きを担っていることを示す研究が数多く報告されている(Baar et al., 2002; Terada and Tabata, 2004)。しかしながら、近年、身体運動によるミトコンドリアの増加に必ずしも PGC-1 α が必要でないことを示す研究が報告された。Leick et al. (2007) は PGC-1 α ノックアウトマウスに 5 週間のトレッドミ

ルによる走行トレーニングを負荷した結果、PGC-1 α ノックアウトマウスの骨格筋において、野生型と同様に cytochrome c や COX I などのミトコンドリア酵素の発現量が増加したことを報告している。この研究結果は、PGC-1 α がミトコンドリア新生に必要な不可欠な因子ではないことを示しており、PGC-1 α 以外の因子を介したミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現調節機構が存在することを意味している。

III. Lipin ファミリー

1. Lipin-1 の分布

Lipin-1 は 2001 年に fatty liver dystrophy (fld) を引き起こす原因遺伝子として、ポジショナルクローニングによって同定された(Peterfy et al., 2001)。Lipin-1 は白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、骨格筋および睾丸において高いレベルで発現しており、肝臓、末梢神経、脳、腎臓および膵臓 β 細胞においても発現している。

哺乳類では、Lipin1~3 の 3 つのアイソフォームが存在することが明らかにされている。また、マウスとヒトでは、Lipin-1 の mRNA がスプライシングの過程でさらに二つのアイソフォームに分けられる (Lipin-1 α 、Lipin-1 β)。また、Lipin-2 と Lipin-3 のアミノ酸配列は、Lipin-1 と 44~48% の相同性を有していることが明らかにされている(Peterfy et al., 2001)。Lipin-2 は肝臓と脳で主に発現しており、Lipin-3 はいくつかの組織で発現しているものの、その発現量は低い。

Lipin 遺伝子の相同遺伝子は哺乳類以外の生物にも存在する。魚類と植物は Lipin と関連のある遺伝子を 2 つ持っており、線虫、ミバエやマラリア原虫も 1 つの Lipin 相同遺伝子を持っている。よって、Lipin 遺伝子は下等な真核生物から高等真核生物にわたる多くの生物において保存されている遺伝子であり、生命維持に重要な働きをしていると考えられる。

2. Lipin-1 の機能

(1) Phosphatidate phosphatase としての機能

Lipin-1 の機能について不明な点が多いものの、現時点では、2 つの機能が明らかにされている。1 つは中性脂肪 (triacylglycerol ; TAG) とリン脂質の合成に関わる酵素としての機能である。哺乳類の細胞ではほとんどの TAG は diacylglycerol (DAG) より合成されるが、DAG は Phosphatidate phosphatase-1(PAP1)の働きによりホスファチジン酸から合成される。Carman et al. (2006) は線虫の PAP1 の働きを明らかにし、さらにそのアミノ酸配列より PAP1 が酵母の Lipin-1 相同遺伝子、すなわち Smp2pであることを同定した。また、fld マウスの組織を用いた研究から、Lipin-1 は褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞、骨格筋などの Lipin-1 の発現量が高い組織での PAP1 活性のすべてを説明できることが報告されている(Donkor et al., 2007)。この PAP1 の働きが欠損しているために、fld マウスの脂肪細胞では TAG 蓄積量の低下が観察され、また、Lipin-1 を脂肪細胞特異的に過剰発現させたマウスの脂肪細胞では、TAG 蓄積の増加が起これと考えられる(Phan and Reue, 2005)。

(2) 転写活性化因子としての機能

Santos-Rosa et al. (2005) は、クロマチン免疫沈降法を用いて、酵母における Lipin-1 相同遺伝子、Smp2p がリン脂質合成に関与している遺伝子の転写調節に関係していることを報告している。しかしながら、Smp2p および Lipin-1 には DNA と結合する配列が存在しないため、転写調節を引き起こす機序については明らかにされていなかった。

近年、Lipin-1 が転写調節を行う機序を Finck et al. (2006) が in vivo および in vitro の実験系を用いて、報告している。彼らは、マウスの肝臓にアデノウイルスを用いて Lipin-1 を過剰発現させると、転写補助因子として PGC-1 α や PPAR α といった転写因子群と結合・協働することで、PPAR α の標的遺伝子であるミトコンドリア β 酸化に関わる酵素の発現量が増

加することを報告した (Fig.2-3)。また、同時に、血液中の中性脂肪や遊離脂肪酸濃度が低下し、脂質代謝が亢進したことも明らかにしている。先述したように、Lipin-1 は骨格筋においても発現量が高いことが報告されている。さらに、Lipin-1 との結合能を有する PGC-1 α や PPAR δ も骨格筋で発現しており、Lipin-1 は肝臓と同様に、骨格筋においてもミトコンドリア系酵素の転写調節を担い、運動によるミトコンドリア新生に寄与している可能性も高い。

IV. Yin-Yang 1 (YY1)

1. YY1 の分布と機能

YY1 は 1991 年に二つの研究グループにより同時に発見された転写因子である (Park and Atchison, 1991; Shi et al., 1991)。YY1 は生体を構成するすべての細胞に存在し、細胞周期、分化や増殖といった細胞の安定性や基本的な機能を調節する役割を担っている。YY1 の他の転写因子との決定的な違いは、ある条件下では標的となる遺伝子の転写を活性化することにもかかわらず、生体内の環境が変化すると転写を抑制する働きを有していることである。それにより、この遺伝子は Yin (陰) Yang (陽) 1 と命名された。

2. YY1 による転写調節

YY1 の転写活性化機序として、YY1 に他の転写因子が結合することで、YY1 による転写が活性化するモデルが提唱されている。Nguyen et al. (2004) は TATA-binding protein (TBP) や転写因子 II B などの転写因子群が YY1 に結合することで、その標的遺伝子の転写を活性化することを報告している。

また、YY1 が転写を抑制する機序としては、特定の転写因子が結合する DNA 上の配列に YY1 が結合すること、すなわち他の転写因子と競合することで遺伝子発現を抑制するモデ

ルが提唱されている。この例として、Rafalski et al.(2007)はラットに1週および10週間のトレッドミル走を行わせた結果、YY1の α -MHCのプロモーター部位への結合がコントロール群と比べて低下し、左心室の α -MHC発現量が増加したことを報告している。これは、 α -MHCのプロモーター部位に α -MHCの転写を活性化する他の転写因子が結合することで、抑制的に機能していたYY1結合量が低下し、 α -MHCの転写活性が増加したと考えられる。

また、近年、Cunningham et al. (2007)はYY1とPGC-1 α が協働することでミトコンドリア系酵素の遺伝子発現を調節していることを報告した。彼らは、胚線維芽細胞にmammalian target of rapamycin (mTOR)の阻害剤であるラパマイシンを作用させると、YY1とPGC-1の結合が低下し、ミトコンドリア系酵素の発現量が低下したことを明らかにした(Fig.2-4)。また、C2C12細胞にshRNAを用いてYY1をノックダウンした場合、cytochrome cの発現量が低下したこと、さらに、HEK細胞にYY1を過剰発現させることでcytochrome cの発現量が増加したことを報告している。したがって、YY1はPGC-1 α と協働することでミトコンドリアを構成する酵素の遺伝子発現調節において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、運動が骨格筋YY1に及ぼす影響についての報告は現時点では存在しないが、運動による骨格筋のミトコンドリア新生においても重要な働きを担っている可能性が考えられる。

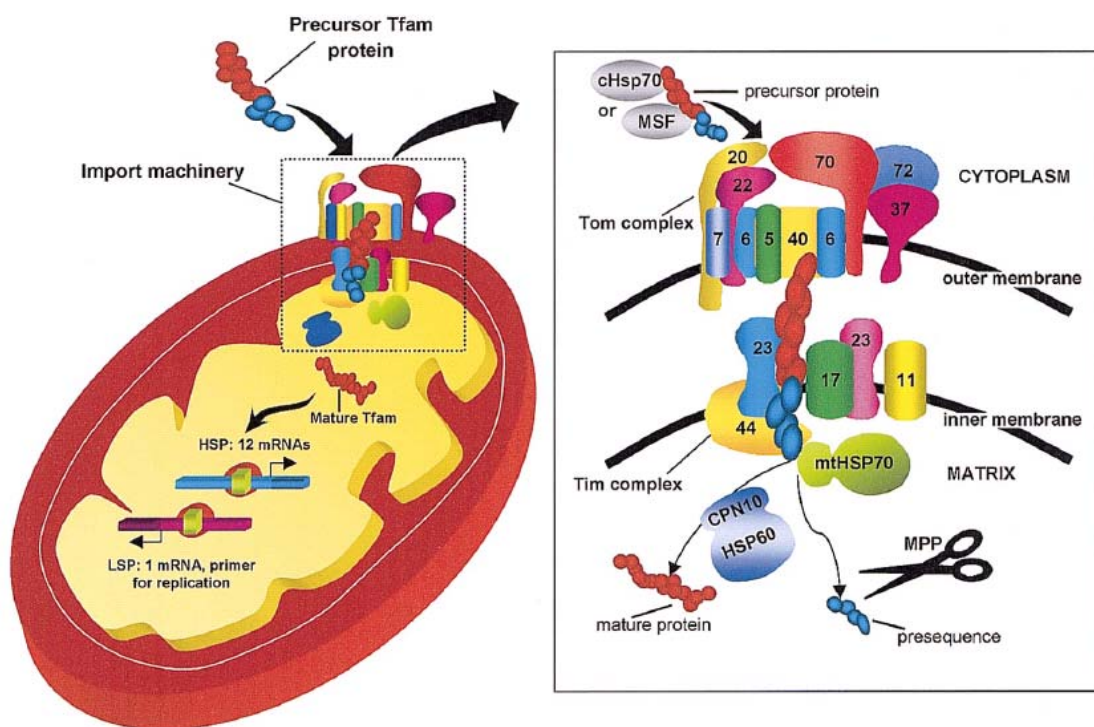


Fig. 2-1 Model of the components of the protein import machinery (Hood. 2000).

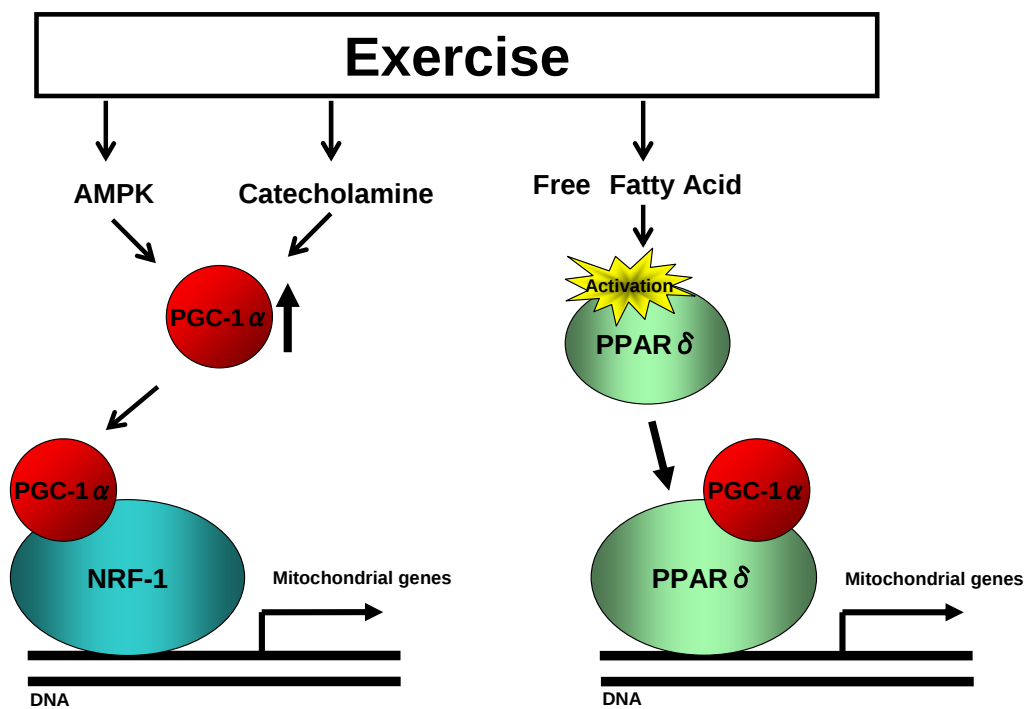


Fig. 2-2 Graphical summary of exercise-induced mitochondria biogenesis in skeletal muscle.

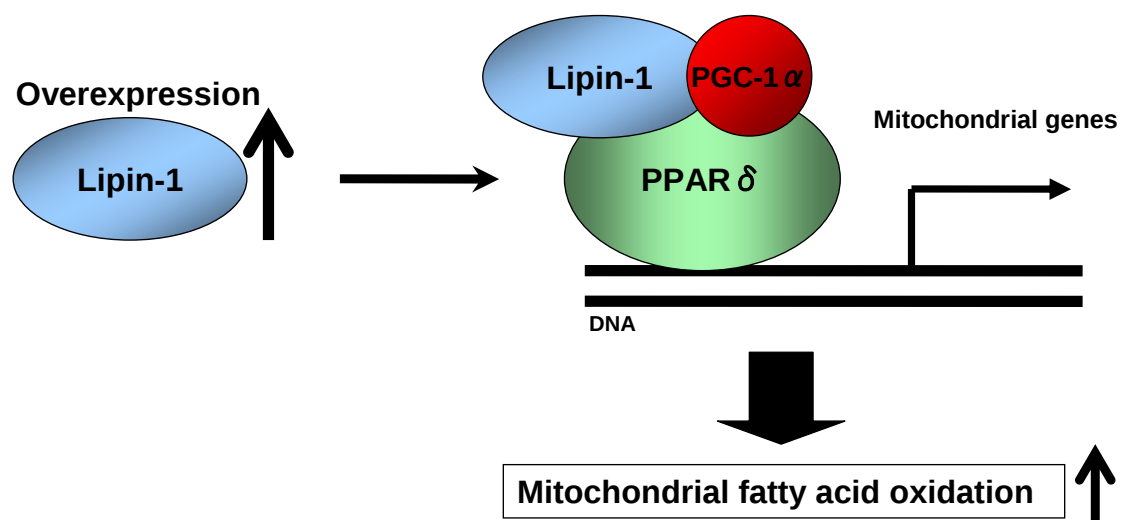


Fig.2-3 A schematic representation of the involvement of Lipin-1 in gene expressions of fatty acid oxidation enzymes in liver.

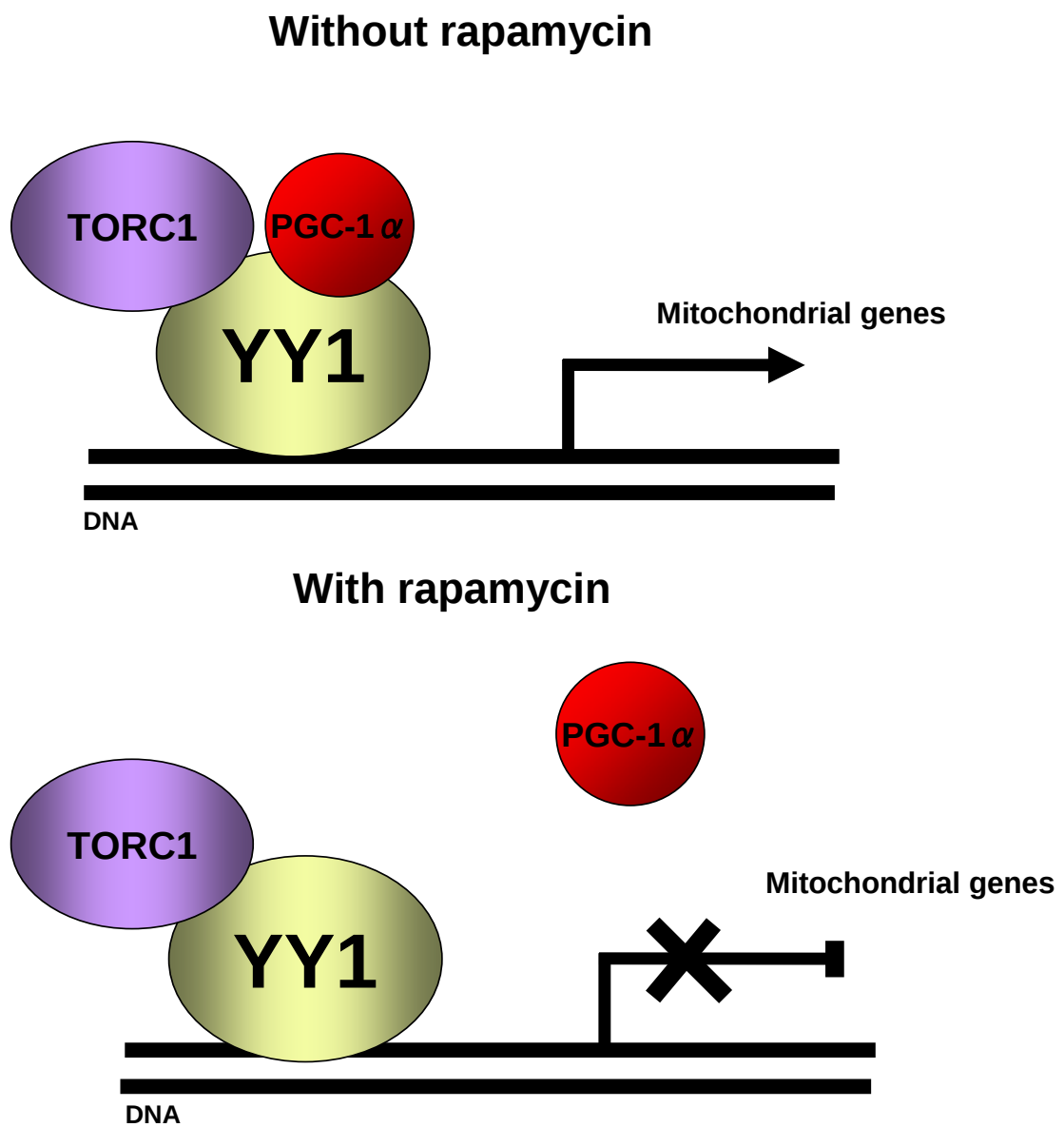


Fig. 2-4 the regulation of mitochondrial genes transcription by YY1-PGC-1 α complex in cultured cell.

第3章 研究の目的および研究課題

身体運動トレーニングを行うことで、骨格筋のミトコンドリア含量が増加することが古くから知られている。しかしながら、身体運動がどのような分子メカニズムによって骨格筋ミトコンドリア含量を増加させているかについては不明な点が多い。

そこで、本研究では、課題 1 として、他の組織・細胞でミトコンドリアの発現調節に関与していることが最近明らかとなった新規転写因子群、Lipin-1、YY1 が身体運動による骨格筋ミトコンドリア新生に関与しているか否かを検討するために、一過性の低強度・長時間水泳運動が骨格筋 Lipin-1 mRNA および YY1 mRNA 発現量に及ぼす影響を検討した。

次に、課題 2 として身体運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加に関与していると考えられている細胞内情報伝達経路と課題 1 で一過性の水泳運動により発現量の増加が観察された転写因子・転写補助因子との関係を明らかにすることを目的に研究を行った。

第4章 研究課題

「一過性の低強度・長時間水泳運動が骨格筋 Lipin-1 および YY1 の mRNA 発現量に及ぼす影響の検討」

課題 1 一過性の低強度・長時間水泳運動がラット骨格筋 Lipin-1 および YY1 の mRNA 発現量に及ぼす影響

I.目的

課題 1 では、他の組織・細胞でミトコンドリアの発現調節に関与していることが最近明らかとなった新規転写因子群、Lipin-1、YY1 が身体運動による骨格筋ミトコンドリア新生に関与しているか否かを検討するために、一過性の低強度・長時間水泳運動が骨格筋 Lipin-1 mRNA および YY1 mRNA 発現量に及ぼす影響を検討することを目的とした。

II.方法

1.実験動物

実験動物として体重が 90～100g の雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラットを日本クレア株式会社より購入した。ラットは室温 22℃、湿度 60±5% に管理された飼育室内で実験動物用飼料 CE-2 (日本クレア社製) および飲料水を自由摂取させながら飼育した。

2.実験プロトコール

3 日間の予備飼育後、水泳運動に慣れさせるため、全てのラットに 2 日間、10 分間の水泳運動を行わせた。その後、ラットを 1) コントロール (Cont ; n=18) 群、2) 水泳運動 (Ex ; n=18) 群に無作為に分けた。さらに、水泳運動群は、3 時間水泳運動 (3h Ex ; n=6) 群、6

時間水泳運動（6h Ex ; n=6）および 6 時間水泳運動-6 時間安静（6h Ex-6h Re ; n=6）群に分けた。この長時間・低強度水泳運動をもちいた数日間のトレーニングにより、ミトコンドリア系酵素の発現量が顕著に増加することが報告されているため(Baar et al., 2002)、本研究ではこの運動形態を用いた。

全ての水泳運動は、深さ 50cm まで 35℃の水を入れた円形のプラスチック製バケツを用いて行わせた。水泳運動は、6 匹のラットを同時に無負荷で、3h Ex 群は 3 時間、6h Ex 群および 6h Ex-6h Re 群は 3 時間の水泳運動を 45 分の休憩を挟み 2 セット（合計 6 時間）泳がせた。また、6h Ex-6h Re 群は水泳運動終了後、飼育ケージにて 6 時間安静に飼育した。運動後の飼育中は、水および食餌は自由摂取とした。尚、水泳運動の前日は午後 5 時から食餌量を 8g に制限した。

3.分析方法

(1) 骨格筋サンプル採取

3h Ex 群および 6h Ex 群は、水泳運動終了直後に上腕三頭筋（Triceps branchii muscle ; Triceps）をペントバルビタールナトリウム（5mg/100g Body weight）による麻酔下にて摘出した。6h Ex-6h Re 群は、水泳運動終了の 6 時間後に解剖を行い、同様に Triceps を摘出した。ラットの水泳運動時には、主に前肢を動員することから、本研究では Triceps をサンプルとして用いた。それぞれの Ex 群に対して、Cont 群として 6 匹ずつ解剖した。Lipin-1mRNA および YY1mRNA 発現量測定用の骨格筋サンプルは、摘出後、液体窒素で凍結し、測定まで -80℃で保存した。

(2) Total RNAの抽出

摘出したTricepsを、乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で粉碎した。2mlのTRizol（Invitrogen

社製) 中にて、ポリロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、1.5mlのホモジネイトをMaXtract High Density チューブ (QIAGEN社製) に分注した。5分間室温で放置した後、0.3mlのクロロホルムを加え、混和した後に、12000×gで10分間遠心分離した。得られた上清を別のチューブに移し、0.75mlのイソプロピルアルコールを加え、10分間室温で放置した後に12000×gで10分間遠心分離した。得られた上清を捨て、チューブに1mlの75%エタノールを加え、混和した後に、さらに7500×gで5分間遠心分離した。ペレットを室温で乾燥させたのち、RNA storage solution (Invitrogen社製) で溶解し、DNA Free (Ambion社製)を用いて混入したDNAの分解処理を行い、total RNAを抽出した。その後、Nano Drop(SCRUM社製)を用いてtotal RNA濃度の測定を行った。total RNA濃度は260nmの吸光度の値から算出した。

(3) Lipin-1mRNAおよびYY1mRNA発現量の測定

Lipin-1mRNAおよびYY1mRNA発現量の測定は Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて行った。上述の方法により抽出したtotal RNAをRNA storage solutionで希釈し、RNA含量が1μg/μlに調整した後、その内の2μlと18μlのReaction buffer (4μl 25mM MgCl₂、2μl Reverse transcription 10×Buffer、2μl 10mM dNTP mixture、0.5μl Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor、15U AMV Reverse Transcriptase、1μl Random primers、9.9 μl Nuclease free water ; Reverse Transcription System (Promega社製)) を混和し、25℃、42℃、および95℃でそれぞれ10分、15分、5分加熱することで逆転写を行い、cDNAを合成した。合成したcDNA 2μlに対しPCR用溶液 (25μl PCR Master Mix (Promega社製)、16.8μl Nuclease free water、2μl forward primer、2μl reverse primer、 2.2μl 18S Competitor /18S Primer (Ambion社製))、をそれぞれ加えPCRを行った。PCRはTechne (Techgene社製) 上で行った。PCRの条件は、Denatureを94℃で1分間、Annealingを57℃で1分間、Elongationを72℃で1分間というサ

イクルを40セット繰り返すというものであった。PCRに用いたプライマーはTable 1に示した。PCR終了後、合成されたPCR産物の内、20 μ lを染色液と5対1の割合で混和し、SYBR Safe (Invitrogen社製)を含んだ2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動後、アガロースゲルをLAS-3000 (FUJI FILM社製)で1秒間露光し、発光の強度を定量した。尚、Lipin-1mRNAおよびYY1mRNA発現量は各サンプル内の18rRNAを内部コントロールとし、それぞれのmRNAと18rRNAとの比率を算出し、得られた数値をLipin-1およびYY1の mRNA 発現量とした。

4.統計処理

Lipin-1mRNA および YY1mRNA 発現量は、すべての Cont 群の平均値に対する相対値で表した。測定値は平均 $\pm$ 標準誤差で表した。測定項目の分析には SPSS (SPSS JAPA 社製)を用いた。すべての測定項目は対応のない t 検定を行った。有意水準は危険率 5%未満とした。

III. 結果

1. 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量

骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量は、Cont 群と比較して 3h Ex 群では 85%有意に高い値を示した ($p<0.01$)。また、Cont 群と比較して 6h Ex 群では 71%有意に高い値を示した($p<0.05$)。しかしながら、6h Ex-6h Re 群と Cont 群の間に有意な差は認められなかった (Fig.4-1)。

2. 骨格筋 YY1mRNA 発現量

骨格筋 YY1 mRNA 発現量は、3h Ex、6h Ex、および 6h Ex-6h Re 群の全てにおいて Cont 群の間に有意な差は認められなかった (Fig .4-2)。

IV. 考察

課題 1 で得られた主な知見は、一過性の低強度・長時間水泳運動により骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量が増加したことである。

Lipin-1 は当初、肝臓において、絶食や糖尿病により血中遊離脂肪酸濃度が上昇することでその発現が増加する転写補助因子であると考えられてきた(Finck et al., 2006)。本研究課題では、骨格筋において身体運動により発現量が増加することが初めて明らかとなった。

Finck et al. (2006) は、アデノウィルスを用いてマウスの肝臓で Lipin-1 を過剰発現させた結果、ミトコンドリアを構成する酵素、特に脂肪酸の β 酸化に関わる酵素群の発現量が増加したことを報告しており、Lipin-1 がミトコンドリア新生に関与している可能性を示唆している。本研究において、一過性の身体運動により、骨格筋で Lipin-1 mRNA 発現量が増加したことから、身体運動による骨格筋ミトコンドリアの増加に Lipin-1 が関与している可能性が考えられる。さらに、Donkor et al. (2007) は、脂肪細胞や骨格筋に存在する Lipin-1 は脂質合成を行う酵素としての働きを有していることを報告している。骨格筋細胞内では、脂質は TAG として蓄積する。TAG は DAG から合成されるが、DAG をホスファチジン酸から合成する際に Lipin-1 はこの反応を触媒する酵素として働くことが報告されている。持久的トレーニングを行うと、骨格筋内の TAG 含量が増加しエネルギー源として利用されることが知られている(Lithell et al., 1979)。したがって、身体運動による骨格筋 Lipin-1 発現量の増加は、ミトコンドリアの増加だけでなく、エネルギー源としての骨格筋内の TAG 量増加にも関与しているかもしれない。

本研究では、3 時間の水泳運動で約 2 倍に増加し、また、運動終了 6 時間後には骨格筋 Lipin-1 発現量が安静レベルまで回復していた (Fig.4-1)。したがって、Lipin-1 は、一過性の運動後、非常に早い段階で発現量が増加し、さらに、運動終了後速やかに発現量が減少する転写補助因子であることが示唆された。

Wright et al. (2007) はラットに 6 時間の水泳運動を負荷した場合、運動直後に ALAS や cytochrome c などのミトコンドリア系酵素の mRNA 発現量が増加することを報告している。しかしながら、運動直後において細胞全体の PGC-1 α タンパク発現量には変化が認められないものの、核分画における PGC-1 α の量が増加していたことから、彼らはこの結果を、PGC-1 α が運動により活性化されることで核内に移行し、ALAS や cytochrome c の転写を促進したためだと結論づけている。実際、多くの転写活性化因子は、細胞内での局在の変化、リン酸化や脱アセチル化などの修飾を受けることで、その転写活性が調節されていることが知られている。Lipin-1 に対する抗体がないため本研究では Lipin-1 タンパク質量は測定していないが、本研究においても各運動の直後の時点では PGC-1 α と同様に Lipin-1 タンパク質は増加していない可能性が高い。よって、一過性の運動の直後においては、Lipin-1 が運動により活性化されることでミトコンドリアタンパク質の転写を促進しているかもしれない。この仮説を支持する先行研究として、Lipin-1 には上述の PGC-1 α と同様に、リン酸化部位がいくつか存在することが報告されている(Harris et al., 2007)。したがって、Lipin-1 がリン酸化という修飾を受けることでミトコンドリアタンパク質の転写を促進する可能性も考えられる。また、本実験で用いたような運動を繰り返し行うことで Lipin-1 のタンパク発現量が増加することが予測される。Lipin-1 タンパク質量が増加することは、恒常的にミトコンドリアタンパク質の発現量を高く維持するのに寄与するかもしれない。

一方で、骨格筋 YY1 mRNA 発現量は、一過性の水泳運動後のいずれの時点においても Cont 群と比較して有意な差は見られなかった (Fig.4-2)。Cunningham et al. (2007) は、HEK 細胞で YY1 発現量を増加させたところ、ミトコンドリア系酵素である cytochrome c の発現量が増加したことを報告している。また、彼らは、マウス由来の骨格筋培養細胞である C2C12 において、YY1 をノックアウトした場合、PGC-1 α やミトコンドリアの遺伝子発現および酸素消費が低下することを報告している。これらの結果は、YY1 がミトコンドリアを構成す

るタンパク質の発現調節を行っている可能性を示唆するものである。しかしながら、本研究において、一過性の身体運動では骨格筋 YY1 mRNA 発現量は増加しなかった (Fig.4-2)。

したがって、YY1 は安静状態におけるミトコンドリアの発現調節を担っているものの、身体運動によるミトコンドリア系酵素の転写活性化には関与していない可能性が考えられる。

YY1 が骨格筋に関わる遺伝子の発現調節に関係しているかどうかを検討した研究はほとんど行われていない。心筋については、Rafalski et al. (2007) はラットに 1 週間および 10 週間のトレッドミル走トレーニングを負荷した結果、YY1 mRNA 発現量は、安静群と比較して 1 週間および 10 週間の運動トレーニング群で変化しなかったことを報告している。心筋には疲労耐性の高い Myosin Heavy Chain β が多く存在するため本研究で用いた Triceps と筋線維組成は同じではないが、収縮活動が増加することで YY1 mRNA が増加しない、という点においては先行研究と本研究の結果は一致するものであった。よって、YY1 は心筋および骨格筋において、身体活動などにより引き起こされる筋収縮活動の増加では発現量に変化しないと考えられる。

以上、本研究課題をまとめると、一過性の水泳運動を行うと、YY1 の発現量には変化が認められないものの、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は速やかに増加することが明らかになった。したがって、運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加に Lipin-1 が関与している可能性が示唆された。

Table 4-1 Summary of Primer pairs

Genes	Primer (Forward)	Primer (Reverse)
Lipin-1	5'-CCCTCGATTTC AACATATCCC-3'	5'-GCAGCCTGTGGCAATTCA-3'
YY1	5'-CCGACCCGGGTAATAAGAAAG-3'	5'-CTGGCAAATTCTGCCAGTTG-3'

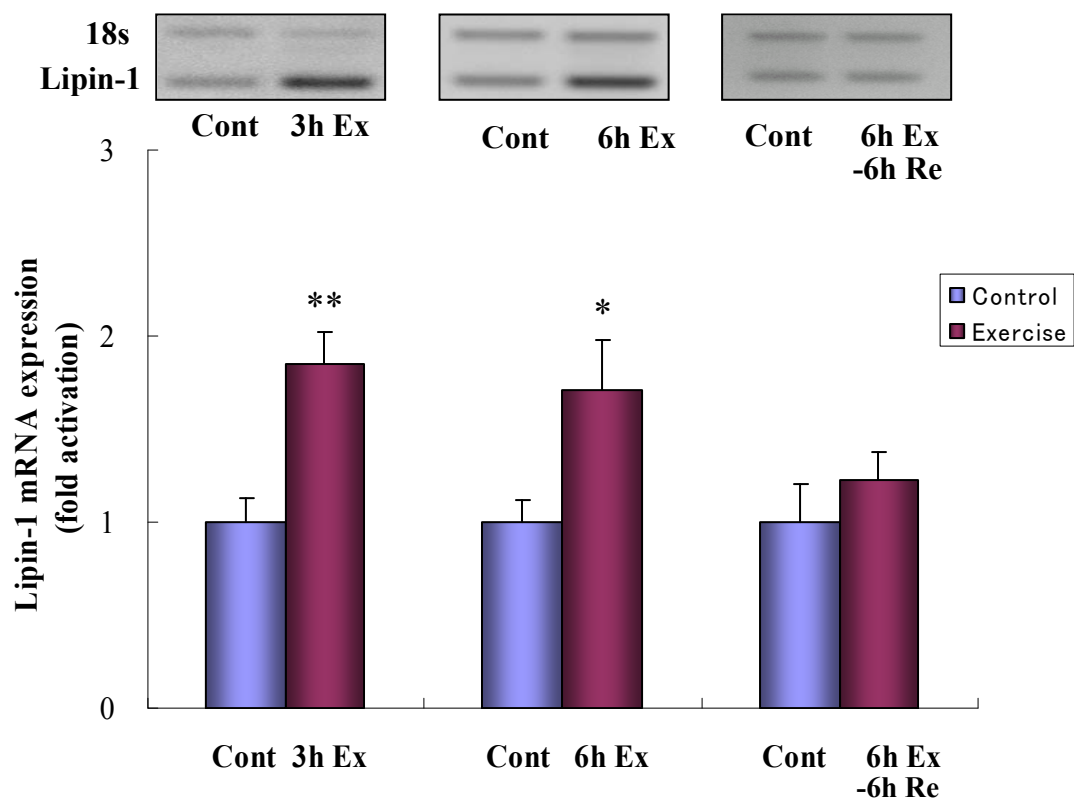


Fig.4-1 Lipin-1 mRNA expression level in rat triceps muscle immediately after 3-h , 6-h swimming and 6-h after 6-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM. * Indicates significant difference in the values obtained in control group at a level of $p < 0.05$. ** Indicates significant difference in the values obtained in control group at a level of $p < 0.01$.

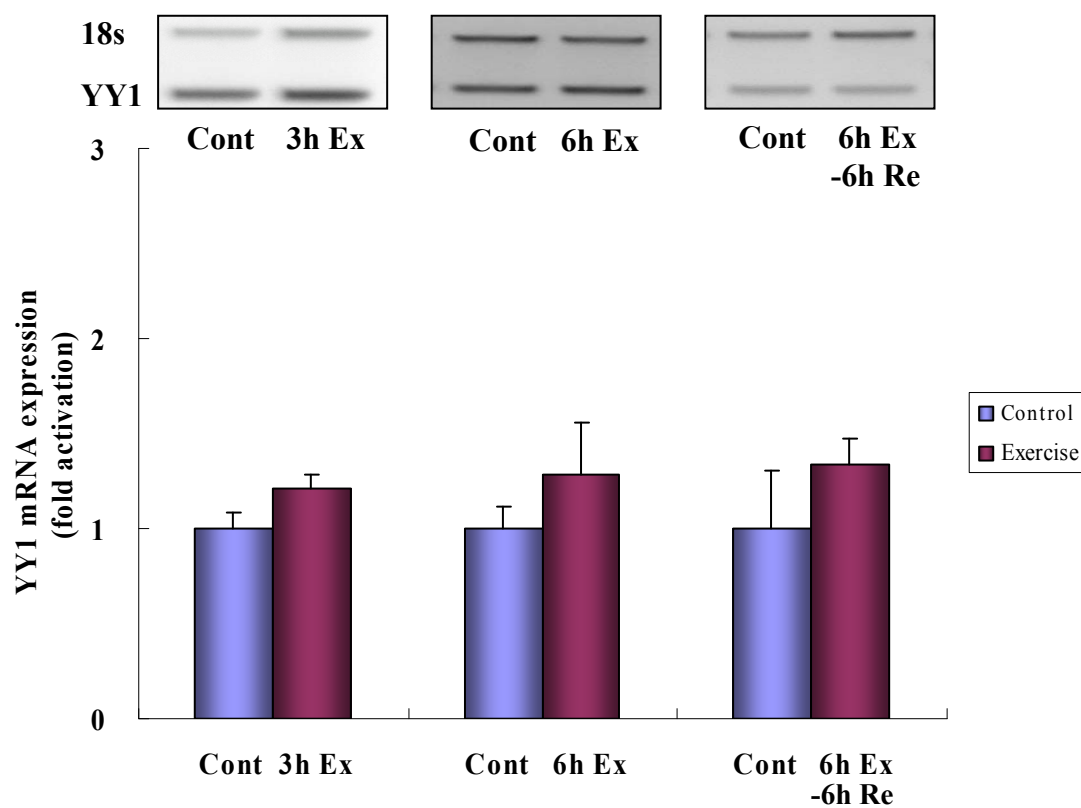


Fig.4-2 YY1 mRNA expression level in rat triceps muscle immediately after 3-h , 6-h swimming and 6-h after 6-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM.

課題 2 骨格筋 Lipin-1 発現量増加を引き起こす細胞内情報伝達経路の検討

I. 目的

課題 2 では、一過性の運動による骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量の増加を引き起こすメカニズムを検討することを目的とした。

近年の研究により、身体運動により骨格筋ミトコンドリアの増加を引き起こす細胞内情報伝達経路として、1)血中遊離脂肪酸濃度上昇による核内受容体 PPAR δ の活性化、2)カテコールアミンの増加による β 2 アドレナリン受容体の活性化、および 3)高エネルギーリン酸化合物の減少に伴う AMPK の活性化、などが有力視されている。そこで、まず、課題 2 の実験 1 では、一過性の水泳運動時にこれらの因子がどのように変化するかを検証した。また、実験 2 から 4 では、薬理学的手法を用いて、ミトコンドリアの増加に関与している因子を活性化させることで骨格筋の Lipin-1 の mRNA 発現量が増加するかどうかを検討した。

II. 方法

1. 実験動物

実験動物として、80~100g の雄性 SD 系ラットおよび Wistar-Imamichi ラットをそれぞれ日本クレア株式会社または財団法人動物繁殖研究所より購入した。ラットは室温 22℃、湿度 60 $\pm$ 5%に管理された飼育室内で実験動物用飼料 CE-2（日本クレア社製）および飲料水を自由摂取させながら飼育した。

実験 1 一過性の低強度・長時間水泳運動がラット骨格筋 AMPK リン酸化、グリコーゲン含量および血液生化学指標に及ぼす影響の検討

1.運動プロトコール

3 日間の予備飼育後、水泳運動に慣れさせるため、全てのラット（n=12）に 2 日間、10 分間の予備水泳運動を行わせた。その後、ラットを 1)、安静（Cont ; n=6）群、2) 1 時間水泳運動（Ex ; n=6）群に無作為に分けた。Ex 群は、深さ 50cm まで 35℃の水を入れた円形のプラスチック製バケツで水泳運動を行わせた。水泳運動は、無負荷で、6 匹のラットを同時に、1 時間の水泳運動を行わせた。なお、水泳運動の前日は午後 5 時から食餌量を 8g に制限した。

2.分析方法

(1) 骨格筋サンプル採取

筋グリコーゲンおよび AMPK リン酸化（Phospho-AMPK）測定用にペントバルビタールナトリウム（5mg/100g Body weight）による麻酔下にて水泳運動終了直後に上腕三頭筋（Triceps）を摘出した。筋サンプルは摘出後、直ちに液体窒素で凍結し、測定まで-80℃で保存した。

(2) 血液採取

血清遊離脂肪酸、血漿アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度を測定するために、解剖時に心臓より血液を採取した。血清遊離脂肪酸濃度測定用のサンプルは、3000rpm で 10 分間遠心分離し血清を得た後、測定まで-80℃で保存した。また、血漿アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度を測定するために EDTA-2Na 入りの真空管に血液を採取し、3000rpm で 10 分間遠心分離し血漿を得た後、測定まで-80℃で保存した。

(3) 血清遊離脂肪酸濃度の測定

血清遊離脂肪酸濃度は、NEFA テストワコー(和光純薬社製)を用いて測定した。

(4) 血漿アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度の測定

血漿アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度の測定は SRL 株式会社に依頼し分析を行った。

(5) 骨格筋グリコーゲン含量の測定

骨格筋グリコーゲン含量は、F-kit (J.K.インターナショナル社製)を用いて測定した。摘出したTricepsを3mlの0.3M 過塩素酸でホモジナイズした。25 μ lのホモジネートを1mlの1M 塩酸に加え、2時間、100℃で加熱することでグリコーゲンのグルコシド結合を分解し、全てのグリコーゲンをグルコースに分解した。加熱後、室温に戻してから、1mlの1M 水酸化ナトリウムを加え中和した。中和したサンプルを96穴のプレートに200 μ l加え、溶液 I (110mg NADP、 260mg ATP、 Triethanolamine buffer pH7.6、 硫酸マグネシウム、安定化剤) を45ml の超純水で溶解したものを100 μ l加え、3分間放置した後に340nmでの吸光度を分光光度計 (DTX880 MULTIMODE DETECTOR BECKMAN COULTER社製) を用いて測定した。さらに、溶液 II (320U ヘキソキナーゼ、160U グルコース6リン酸脱水素酵素)を6 μ l加え、混合した後に37℃で10分間過熱した後に、再度340nmでの吸光度を測定し、酵素反応前後の変化量を算出し、予め作成した検量線から筋湿重量あたりのグリコーゲン含量を求めた。

(6) 骨格筋 Phospho-AMPK 量の測定

i) ホモジナイズおよびホモジネートの調節

AMPK は上流に位置する LKB1 や CaMKK というキナーゼにより α サブユニットの 172 番目の Threonine (Thr172) がリン酸化されることで活性化することが知られている。そこ

で本研究ではリン酸化した AMPK、すなわち Phospho-AMPK を AMPK 活性化の指標として用いた。摘出した Triceps を液体窒素下で凍結した状態で粉碎し、3ml の RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、0.25% deoxycholic acid、1% NP-40、1mM EDTA、1mM Na₃VO₄、1mM NaF、0.1mM bpV、0.002% β-glycerophosphate) に Protease inhibitor cocktail(Sigma 社製)を添加した溶液で氷中にてホモジナイズした。その後、凍結-溶解を 2 回繰り返す、たんぱく質を可溶化するために 4℃にて 1 時間浸漬した。

ii) 電気泳動用サンプルの調整

調整したホモジネートと BCA protein assay reagent(PIERCE 社製)溶液とを混合し、30 分間、37℃で加熱した後に、562nm での吸光度を分光光度計 (DTX880 MULTIMODE DETECTOR BECKMAN COULTER 社製) を用いて測定した。その濃度を元に、RIPA lysis buffer と Laemmli sample buffer をサンプルに加えてたんぱく質濃度が 5μg/μl となるように調整し、95℃で 5 分間加熱した。

iii) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

たんぱく質の分離は、Laemmli et al.(1970)の方法に基づき、厚さ 2mm の 7.5% resolving gel および 4% stacking gel と用いた SDS-polyacrylamide gel electrophoresis により行った。ゲルには各サンプル 20μl (100μg/sample) をローディングし、サンプルがゲルの下端に達するまで 100V で通電した。

iv) ウェスタンブロッティング

電気泳動終了後、速やかにゲルを取り出し、ゲル内のたんぱく質を PVDF メンブレンに転写した。転写終了後、メンブレンをブロッキング溶液 (10%スキムミルク/TBS-0.1%

Tween20 (TBST)) に 1 時間浸し、TBST で洗浄した後、5%BSA/ TBST で 200 倍に希釈した一次抗体 (anti-Phospho-APMK、Cell Signaling 社製) と 4℃で反応させた。その後、メンブレンを TBST で洗浄し、1% スキムミルク/TBST で 5000 倍に希釈した二次抗体 (anti-rabbit IgG) と室温で 1 時間反応させた。反応終了後、TBST および TBS でメンブレンを洗浄し、軽く乾かした後に、化学発光検出試薬 (ECL reagent、 Amersham Biosciences 社製) と反応させた。その後、メンブレンを乾かし、LAS-3000 (FUJIFILM 社製) を用いて抗原の検出を行った。検出されたバンドの画像をコンピューターに取り込み、SIGMAGEL (STATCON 社製) を用いて定量し、その値をコントロール群に対する相対比で表した。

実験 2 脂質投与がラット骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量に及ぼす影響

1.実験プロトコール

2 日間の予備飼育の後、実験前日は食餌量を 1 匹あたり 8g に制限した。10 匹のラットを無作為に、コントロール (Cont; n=5) 群、Olive oil 投与 (Olive; n=5) 群に分けた。Garcia-Roves et al. (2007) は、Olive oil を含む高脂肪食を摂取させることで、ラット骨格筋におけるミトコンドリア系酵素の mRNA 発現量が増加することを報告している。さらに、Olive oil は PPAR δ を活性化させる働きを持つ不飽和脂肪酸を多く含んでいるため、本研究では投与する脂質として Olive oil を選択した。血中の遊離脂肪酸濃度を上昇させるため、Olive 群に実験当日の午前 10 時に、5ml の Olive oil をゾンデを用いて経口投与した。Cont 群には同量の水を経口投与した。さらに、血中遊離脂肪酸濃度を上昇させるため、Hickson et al. (1977) の方法と同様に、脂質投与の 3 時間後にヘパリン (75U/100g BW) を皮下より注入した。また、Cont 群には同量の生理食塩水を投与した。尚、脂質の投与およびヘパリン投与の終了

後から解剖までは、水は自由摂取とし、食餌は与えなかった。

2.分析方法

(1) 骨格筋サンプル採取

ヘパリンの注入から 5 時間後に、ペントバルビタールナトリウム (5mg/100g Body weight) による麻酔下にて解剖を行い、Triceps を摘出した。摘出した骨格筋サンプルは、直ちに液体窒素にて凍結した。凍結した骨格筋サンプルは、Lipin-1mRNA 発現量の測定まで -80°C で保存した。

(2) 血液採取

血清遊離脂肪酸濃度を測定するために、心臓より血液を採取した。採取した血液は、3000rpm で 10 分間遠心分離し血清を得た後、測定まで -80°C で保存した。

(3) Total RNA 抽出

Total RNA の抽出は課題 1. と同様の方法を用いて実施した。

(4) 骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量の測定

Lipin-1mRNA 発現量の測定は、課題 1. と同様の方法を用いて行った。

(5) 血清遊離脂肪酸濃度の測定

血清遊離脂肪酸濃度は、課題 1. と同様の方法を用いて測定した。

実験3 $\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト投与がラット骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量に及ぼす影響

1. 実験プロトコール

3 日間の予備飼育の後、実験前日は食餌量を 1 匹あたり 8g に制限した。10 匹のラットを無作為に、コントロール (Cont ; n=5) 群、Clenbuterol 投与 (Clen ; n=5) 群に分けた。Miura et al. (2007) はマウスに $\beta 2$ アドレナリン受容体特異的活性化剤である Clenbuterol を投与した結果、骨格筋 PGC-1 α の mRNA 発現量が増加したことを報告している。さらに、Clenbuterol 投与では脂肪分解による血中遊離脂肪酸濃度の上昇は観察されなかったことから、Lipin-1 の mRNA 発現量におよぼす脂肪酸の影響を排除できると考えられる。Clen 群に実験当日の午後 1 時に Clenbuterol (0.1mg/100g body weight) を生理食塩水で溶解し皮下より注入した。また、Cont 群には同量の生理食塩水を投与した。尚、解剖までは、水は自由摂取とし、食餌は与えなかった。

2. 分析方法

(1) 骨格筋サンプル採取

Clenbuterol の投与から 6 時間後に、ペントバルビタールナトリウム (5mg/100g Body weight) による完全麻酔下にて解剖を行い、Triceps を摘出した。摘出した骨格筋サンプルは Lipin-1 mRNA 発現量の測定まで -80°C で保存した。

(2) Total RNA 抽出

Total RNA の抽出は課題 1. と同様の方法を用いて実施した。

(3)骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量の測定

Lipin-1mRNA 発現量の測定は、課題 1. と同様の方法を用いて行った。

実験 4 AICAR 投与がラット骨格筋の Lipin-1mRNA 発現量に及ぼす影響

1. 実験プロトコール

3 日間の予備飼育の後、実験前日は食餌量を 1 匹あたり 8g に制限した。18 匹のラットを無作為に、コントロール（Cont；n=10）群、5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside（AICAR）投与（AICAR；n=9）群に分けた。AICAR は細胞内に取り込まれた後、AMP の類似化合物である ZMP に変換され、AMPK を活性化する。AICAR 群には実験当日に（0.5mg/g body weight）を生理食塩水で溶解し、皮下より注入した。Cont 群には同量の生理食塩水を投与した。また、解剖までは、水は自由摂取とし、食餌は与えなかった。

2. 分析方法

(1) 骨格筋サンプル採取

Lipin-1mRNA 発現量を測定するために、AICAR 投与から 6 時間後にペントバルビタールナトリウム（5mg/100g Body weight）による麻酔下にて Triceps を摘出した（Cont；n=5、AICAR；n=4）。摘出した骨格筋サンプルは Lipin-1mRNA 発現量の測定まで -80°C で保存した。Holmes et al.（2005）はラットに AICAR を皮下投与したところ、投与後 1~2 時間で骨格筋 AMPK が活性化（リン酸化）していることを報告している。そこで本研究でも AICAR 投与により AMPK が活性化（リン酸化）されていることを確認するために、AICAR 投与か

ら 2 時間後にペントバルビタールナトリウム (5mg/100g Body weight) による麻酔下にて Triceps を摘出した (Cont ; n=5、 AICAR ; n=5)。

(2) Total RNA 抽出

Total RNA の抽出は課題 1. と同様の方法を用いて行った。

(3) Lipin-1mRNA 発現量の測定

骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量の測定は課題 1.同様の方法を用いて行った。

(4) 骨格筋 Phospho-AMPK 量の測定

Phospho-AMPK 量の測定は課題 2 の実験 1.と同様の方法で行った。

4. 統計処理

骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量および Phospho-AMPK 含量は、Cont 群の平均値に対する相対値で表した。測定値は平均±標準誤差で表した。測定項目の分析には SPSS (SPSS JAPAN 社製)を用いて対応のない t 検定を行った。有意水準は危険率 5%未満とした。

Ⅲ.結果

実験 1

(1) 血清遊離脂肪酸濃度

血清遊離脂肪酸濃度は Cont 群と比較して Ex 群で 51%有意に高い値を示した($p<0.001$) (Fig.4-3)。

(2) 血漿アドレナリン濃度

血漿アドレナリン濃度は Cont 群で $338 \pm 85 \text{ pg/ml}$ 、Ex 群では $2640 \pm 452 \text{ pg/ml}$ であり、Ex 群で有意に高い値を示した ($p < 0.001$) (Fig.4-4)。

(3) 血漿ノルアドレナリン濃度

血漿ノルアドレナリン濃度は Cont 群で $592 \pm 64 \text{ pg/ml}$ 、Ex 群では $1939 \pm 353 \text{ pg/ml}$ であり、Ex 群で有意に高い値を示した ($p < 0.01$) (Fig.4-5)。

(4) 骨格筋グリコーゲン含量

骨格筋グリコーゲン含量は、Cont 群と比較して Ex 群では 45% 有意に低い値を示した ($p < 0.001$) (Fig.4-6)。

(5) 骨格筋 Phospho-AMPK 量

骨格筋 Phospho-AMPK 量は、Cont 群と比較して Ex 群で 91% 高い値を示した ($p < 0.05$) (Fig.4-7)。

実験 2

(1) 血清遊離脂肪酸濃度

Cont 群と比較して、Olive 群の血清遊離脂肪酸濃度は 194% 有意に高い値を示した ($p < 0.001$) (Fig.4-8)。

(2) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量

骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は、Cont 群と Olive 群の間では有意な差は認められなかつ

た (Fig.4-9)。

実験 3

(1) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量

Cont 群と比較して、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は Clen 群で 236%有意に高い値を示した($p<0.001$) (Fig.4-10)。

実験 4

(1) 骨格筋 Phospho-AMPK 量

Cont 群と比較して、骨格筋 Phospho-AMPK 量は AICAR 群では 66%高い値を示した($p<0.05$) (Fig.4-11)。

(2) 骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量

Cont 群と比較して、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は AICAR 群で 136%有意に高い値を示した($p<0.01$) (Fig.4-12)。

IV.考察

課題 2 で得られた主な知見は、Olive oil 投与およびヘパリン投与により誘導した高遊離脂肪酸血症では、骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量が増加しなかったが、Clenbuterol および AICAR 投与により骨格筋 Lipin-1mRNA 発現量が増加したことである。 $\beta 2$ アドレナリン受容体および AMPK の活性化は、運動トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加に関与している可能性が報告されている(Harri, 1980; Miura et al., 2007; Winder et al., 2000)。これらの刺激により Lipin-1 発現量が増加したことは、運動トレーニングによるミトコンドリア新生にお

いて Lipin-1 が関与している可能性を示唆している。

ミトコンドリアの酸化系酵素の発現量調節に関与している核内受容体として、PPAR が挙げられる。PPAR のサブタイプである PPAR δ は、主に骨格筋で発現しており、脂肪酸が PPAR δ を活性化することが知られている(Berger et al., 2005)。近年、Garcia-Roves et al. (2007) は高脂肪食の摂取による血中遊離脂肪酸濃度の上昇が、PPAR δ の活性化を介してミトコンドリア系酵素の発現量を増加させていることを報告した。また、脂肪細胞では主に PPAR γ が発現しているが、Yao-Borengasser et al. (2006) は脂肪細胞に PPAR γ の活性化剤であるチアゾリシン誘導体を作用させることで、Lipin-1 mRNA 発現量が増加したことを報告している。これらの先行研究から、PPAR のサブタイプである PPAR δ が、骨格筋において脂肪酸により活性化されることで Lipin-1 の発現量を増加させ、それによりミトコンドリア系酵素の発現を誘導している可能性が考えられた。

本研究では、Olive oil 投与後にさらにヘパリンを投与し、血中遊離脂肪酸濃度が高い状態を維持させた。解剖は Olive oil 投与から 8 時間経過してから実施したが、血清遊離脂肪酸濃度は Cont 群と比較して Olive 群で高値を示しており、Olive oil およびヘパリンの作用が 8 時間持続していたと考えられる。また、Olive oil 投与によって得られた遊離脂肪酸濃度の増加は、実験 1 で見られた水泳運動終了後の遊離脂肪酸濃度と比較して高いものであった。よって、運動により引き起こされる血中遊離脂肪酸濃度の増加が PPAR δ を活性化し、骨格筋 Lipin-1 発現量に影響を及ぼすと考え、実験 2 において Olive oil とヘパリン投与により血中遊離脂肪酸濃度を強制的に上昇させた場合でも、十分に PPAR δ が活性化されていると考えられる。

しかしながら、実験 2 では Cont 群と Olive 群の間に Lipin-1 mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。したがって、運動による Lipin-1 mRNA 発現量の増加には遊離脂肪酸の上昇とそれに伴う PPAR δ の活性化は関与していない可能性が示唆された。

Fig.4-4、5 に示したように、一過性の運動後に、血中アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度が Cont 群と比較してそれぞれ 7 倍および 3 倍高い値を示した。運動により血中に増加した血中アドレナリン・ノルアドレナリンは、骨格筋に多く発現している $\beta 2$ アドレナリン受容体を活性化する。Harri et al. (1980) は、ラットに β アドレナリン受容体アゴニストである Isoprenaline を 5 週間投与した結果、骨格筋のクエン酸合成酵素やリンゴ酸脱水素酵素などのミトコンドリア系酵素の活性が増大することを報告した。これらの結果は、運動によるアドレナリン・ノルアドレナリンの増加が骨格筋ミトコンドリアの増加を引き起こしている可能性を示唆している。本研究においても、Fig.4-10 に示したように、Clen 群で Cont 群と比較して Lipin-1 mRNA 発現量が有意に増加することが明らかとなった。本結果は、運動による血中カテコールアミン濃度の上昇が、骨格筋の Lipin-1、さらにはミトコンドリア系タンパクの発現量増加の機序に関与している可能性を示唆している。

アドレナリンやノルアドレナリンなどのホルモンがアドレナリンレセプターに結合した後の情報伝達機構として、アデニル酸シクラーゼの活性化による細胞内 cAMP の増加が挙げられる。細胞内での cAMP 濃度の上昇は、PKA を活性化し、CREB のリン酸化、さらには、CREB と CBP、p300 との複合体形成を促進することで、転写を活性化する。Lipin-1 のプロモーター部位に CREB が結合する cyclic AMP responsive element (CRE) が存在するかどうかは報告されていないため、現時点では cAMP 濃度の上昇がこれらの情報伝達経路を通して、直接的に Lipin-1 の転写を活性化させている可能性は不明である。しかしながら、CREB が PGC-1 α 遺伝子のプロモーター部位に存在する CRE に結合することで PGC-1 α mRNA の発現量が増大することが報告されている(Herzig et al., 2001)。さらに、Finck et al. (2006) は、PGC-1 α のアデノウィルスを用いて肝臓で PGC-1 α を高発現させた結果、Lipin-1 の発現量が増加したことを報告している。これらの先行研究から、Clenbuterol 投与による Lipin-1 mRNA 発現量の増加は、細胞内の cAMP 濃度が増加することにより、PGC-1 α 発現量

が増加し、その結果 Lipin-1 の転写が促進された可能性が考えられる。また、PGC-1 α には PKA によりリン酸化される部位が3つ存在することが報告されているため(Puigserver et al., 1998)、活性化した PKA が PGC-1 α をリン酸化することにより、Lipin-1 mRNA の転写活性化が引き起こされたかもしれない。これらの先行研究から、 β 2 アドレナリン受容体を介した骨格筋 Lipin-1 の発現量増加には PGC-1 α が関与している可能性が考えられる。

Winder et al. (2000) はラットに対し、体重 1g あたり 1mg の AICAR を 28 日間、皮下投与することにより、骨格筋ミトコンドリアの酸化系酵素の活性が増加したことを報告している。したがって、運動による骨格筋のミトコンドリア増加に関して、AMPK の活性化が重要な働きを担っていることが有力視されている。本研究では、Winder et al.と同様の方法を用い AICAR を皮下投与した結果、AMPK のリン酸化の上昇とそれに伴う骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量の増加が認められた (Fig. 4-12)。さらに、実験 1 において一過性の水泳運動後の Triceps では、グリコーゲン含量が低下し、Phospho-AMPK 量が AICAR 投与時と同程度に増加していた(Fig.4-6,7)。以上の結果から、AMPK の活性化により骨格筋 Lipin-1 の発現量が増加すること、さらには、研究課題 1 で観察された一過性の水泳運動による骨格筋 Lipin-1 の発現量の増加に AMPK が関与している可能性が示唆された。

AMPK の活性化がどのようなメカニズムにより Lipin-1 の発現調節を行っているかは明らかではない。上述したように、Lipin-1 の発現調節に PGC-1 α が関与している可能性が示唆されている。Terada et al. (2002) は摘出骨格筋 (epitrochlearis) を AICAR と組織培養液中でインキュベーションすることにより、PGC-1 α の発現量が増加することを報告している。さらに、最近、Jeger et al. (2007) が、AMPK が PGC-1 α と結合し、リン酸化することで、転写活性化作用を増加させていることを報告している。したがって、AMPK による Lipin-1 の発現調節において、PGC-1 α が関与している可能性も考えられる。

以上、課題 2 から得られた研究結果をまとめると、脂質投与により引き起こされる高

脂肪酸血漿では、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は増加しないものの、Clenbuterol 投与および AICAR 投与は、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量を顕著に増加させることが明らかとなった。したがって、身体運動による $\beta 2$ アドレナリン受容体および AMPK の活性化が骨格筋 Lipin-1 発現量を増加させ、さらにはミトコンドリアの増加を引き起こす可能性が示唆された。

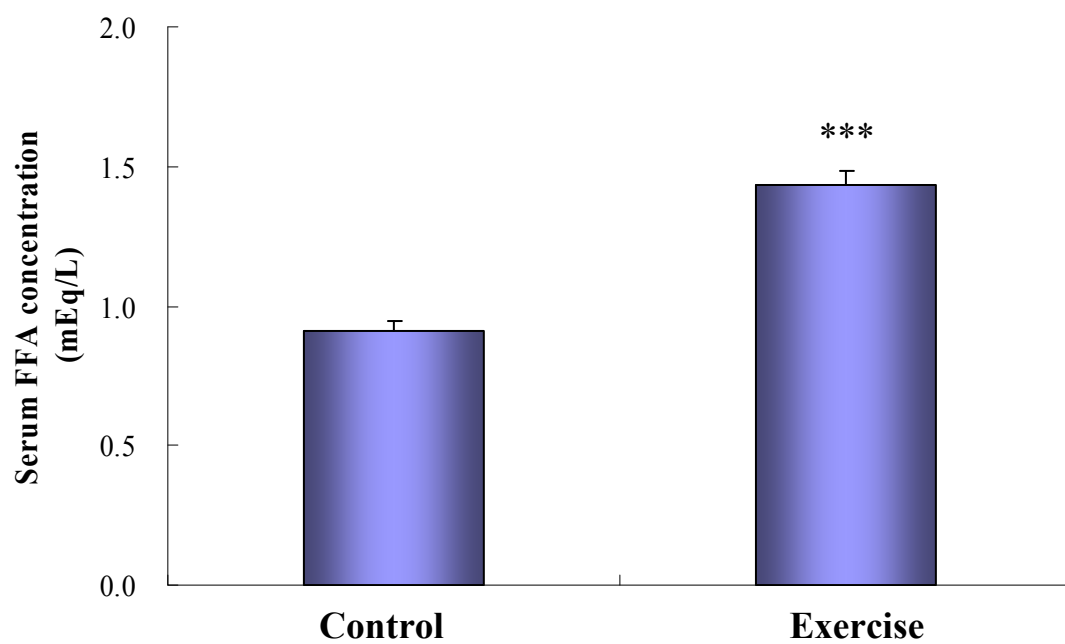


Fig.4-3 Serum free fatty acid concentration immediately after 1-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM. *** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.001$.

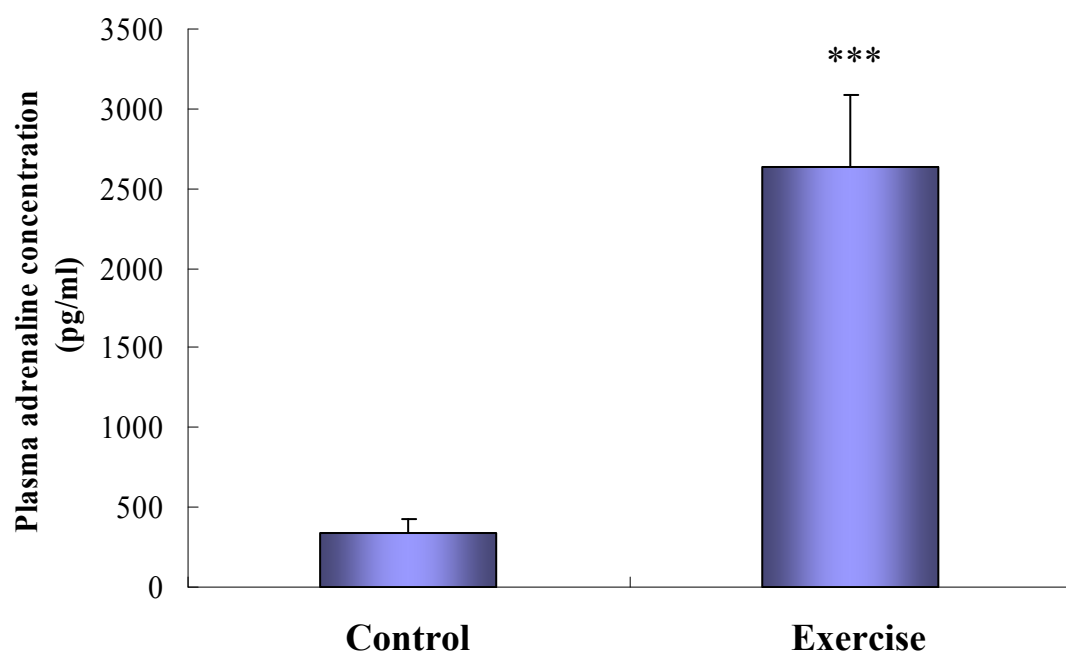


Fig.4-4 Plasma adrenaline concentration immediately after 1-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM. *** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.001$.

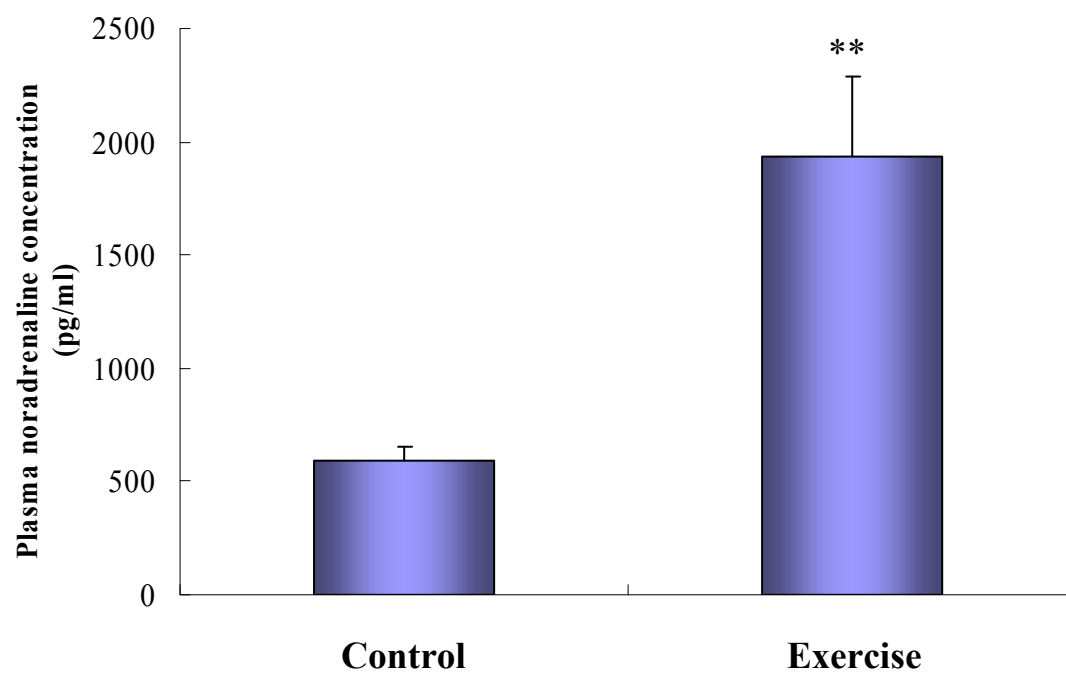


Fig.4-5 Plasma nor adrenaline concentration immediately after 1-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM. ** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.01$.

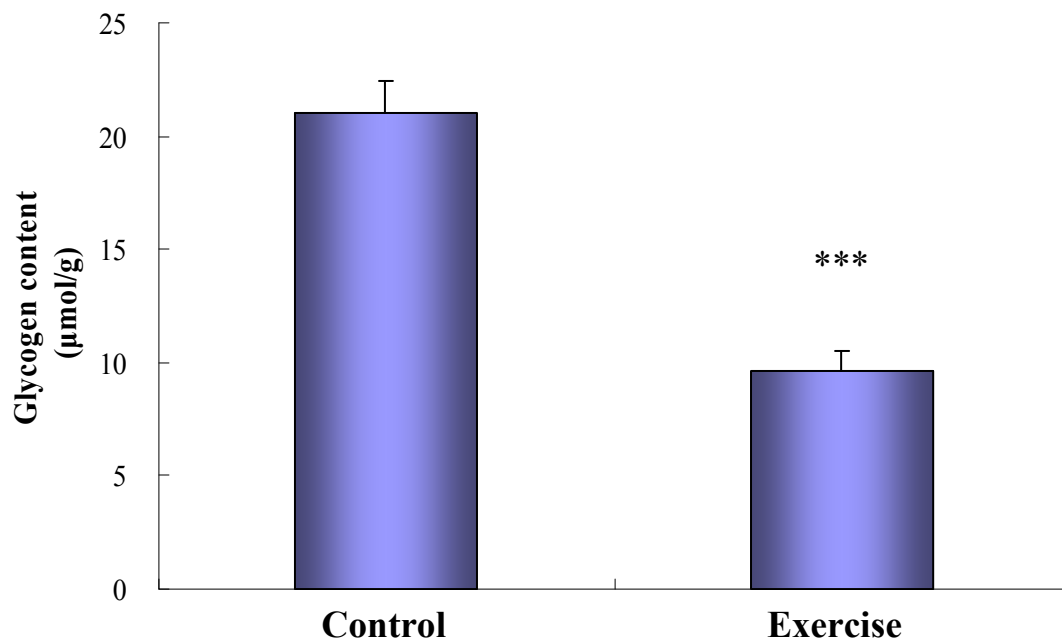


Fig.4-6 Glycogen content in rat triceps muscle immediately after 1-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM. *** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.001$.

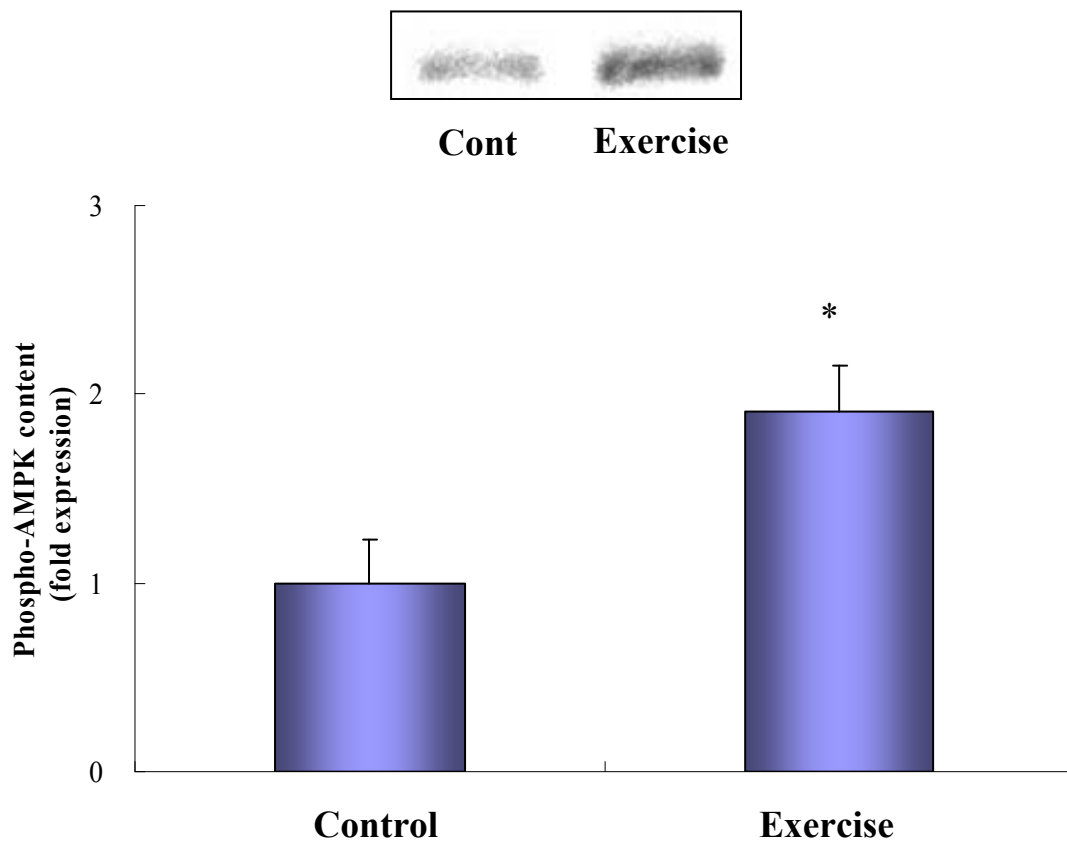


Fig.4-7 Phospho-AMPK content in rat triceps muscle immediately after 1-h swimming exercise. Values are means $\pm$ SEM. * Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.05$.

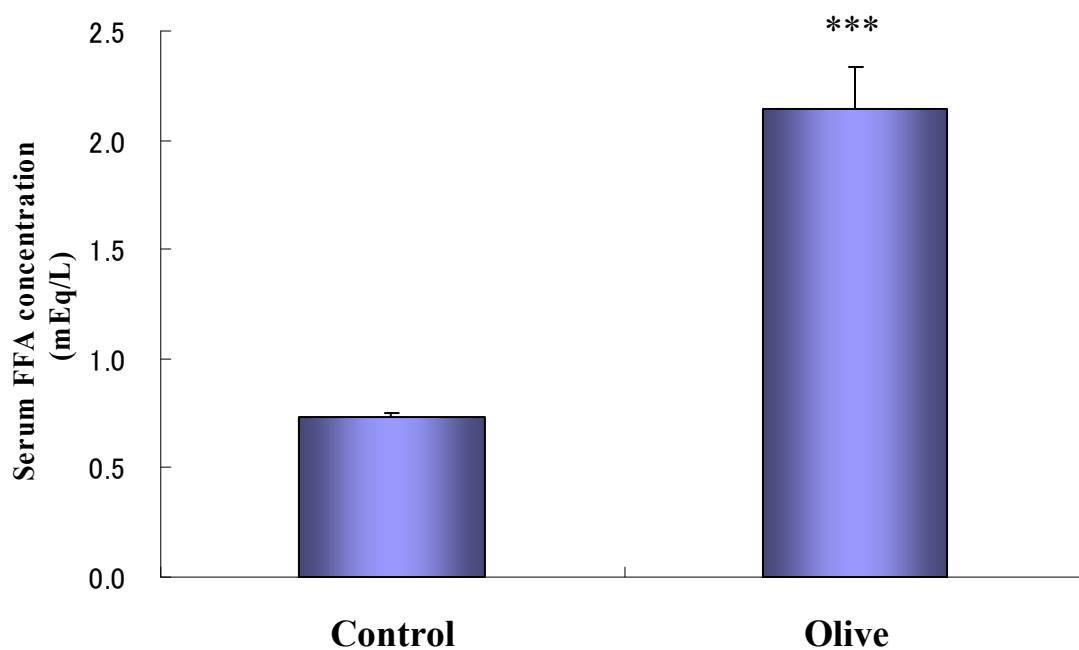


Fig.4-8 Serum free fatty acid concentration 8-h after injection of olive oil . Values are means $\pm$ SEM. *** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.001$.

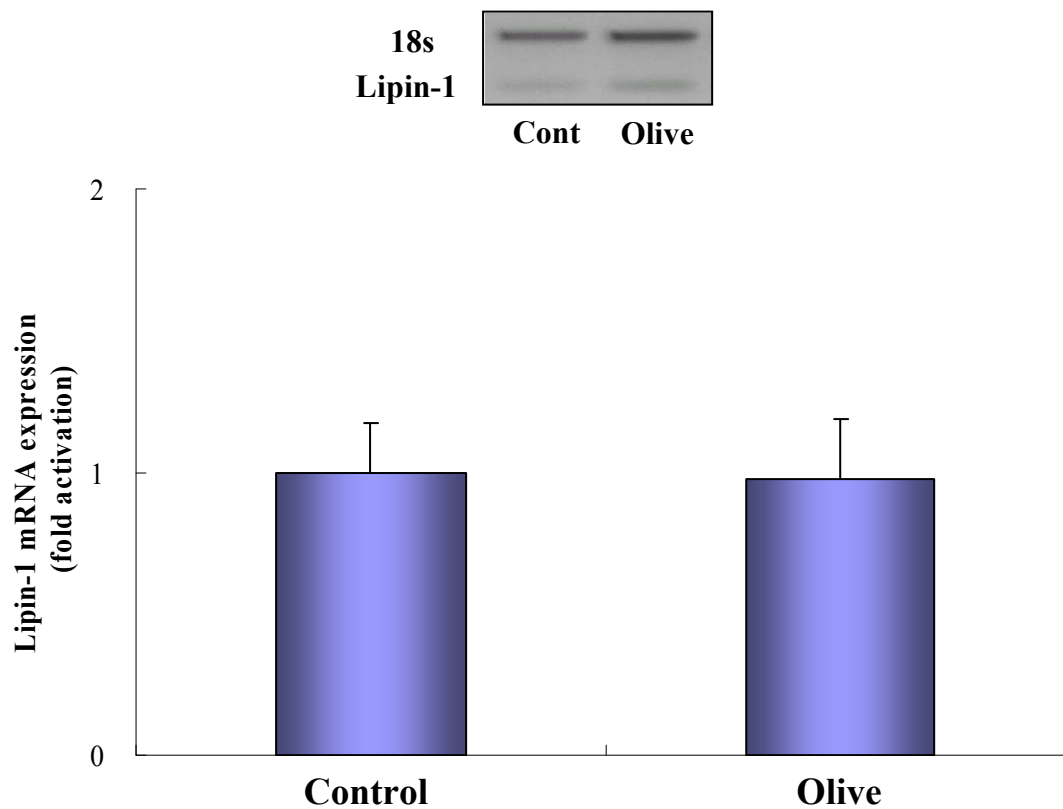


Fig.4-9 Lipin-1 mRNA expression in rat triceps muscle 8-h after injection of olive oil. Values are means $\pm$ SEM. *** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.001$.

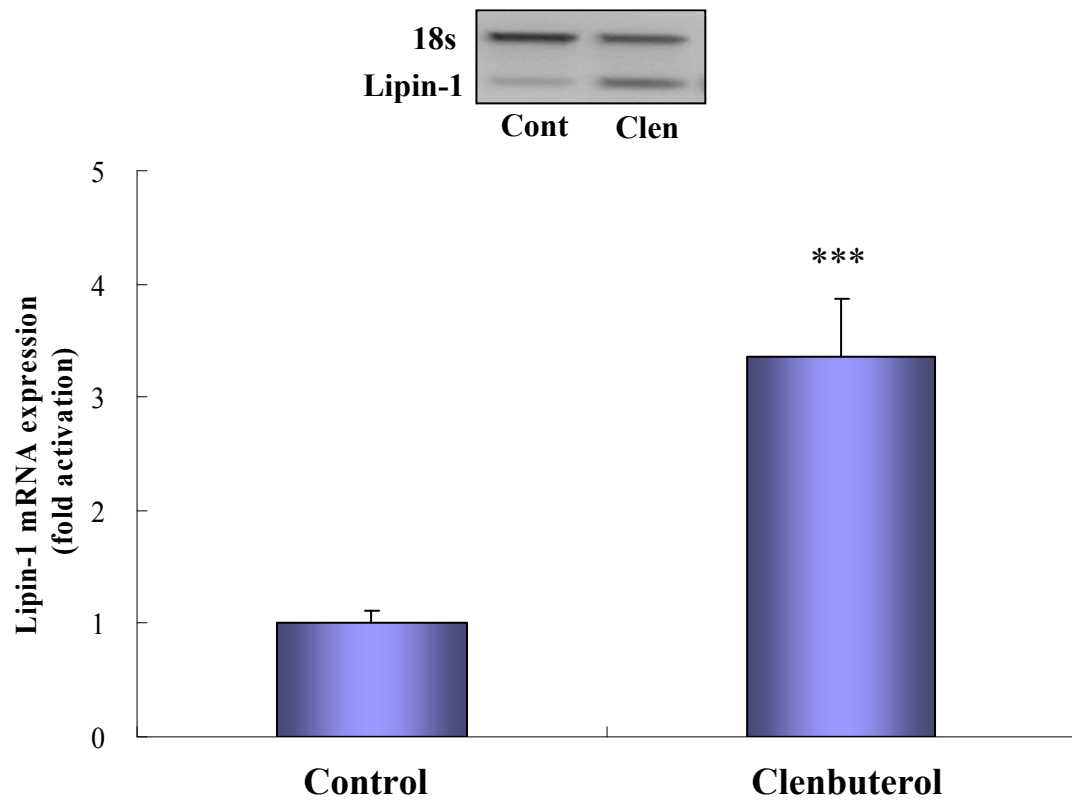


Fig.4-10 Lipin-1 mRNA expression in rat triceps muscle 6-h after injection of clenbuterol. Values are means $\pm$ SEM. *** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.001$.

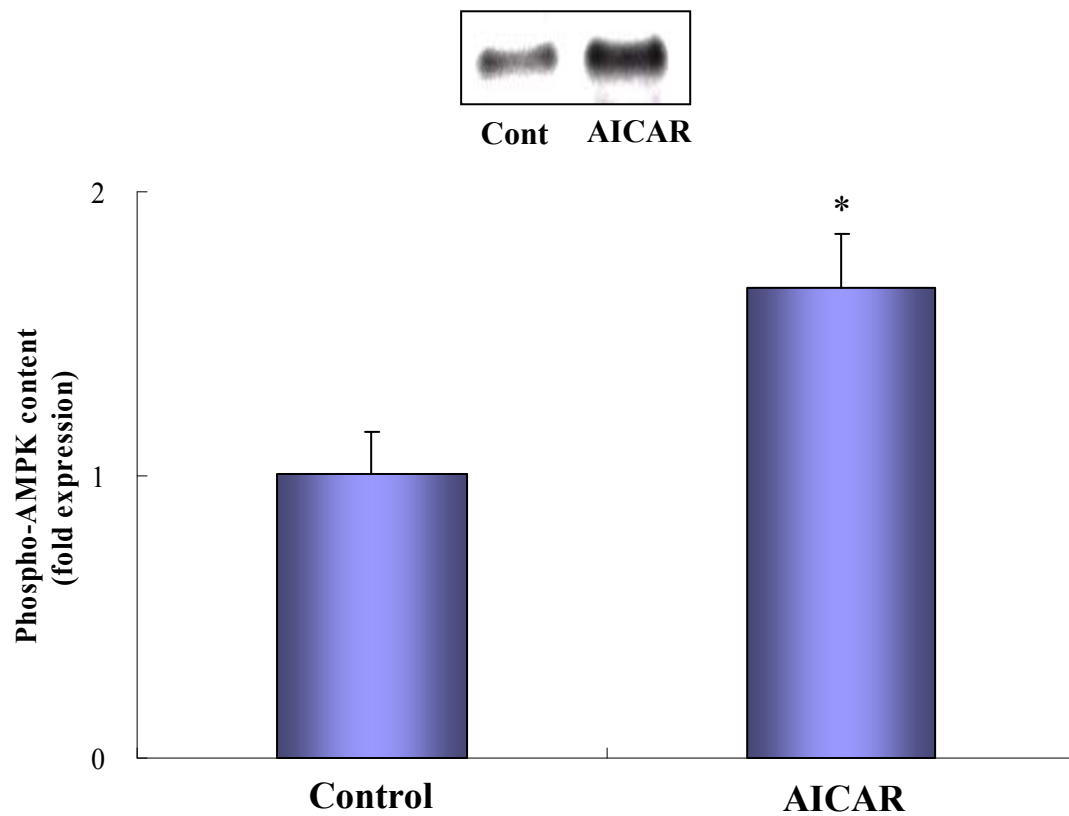


Fig.4-11 Phospho-AMPK content in rat triceps muscle 6-h after injection of AICAR. Values are means $\pm$ SEM. * Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.05$.

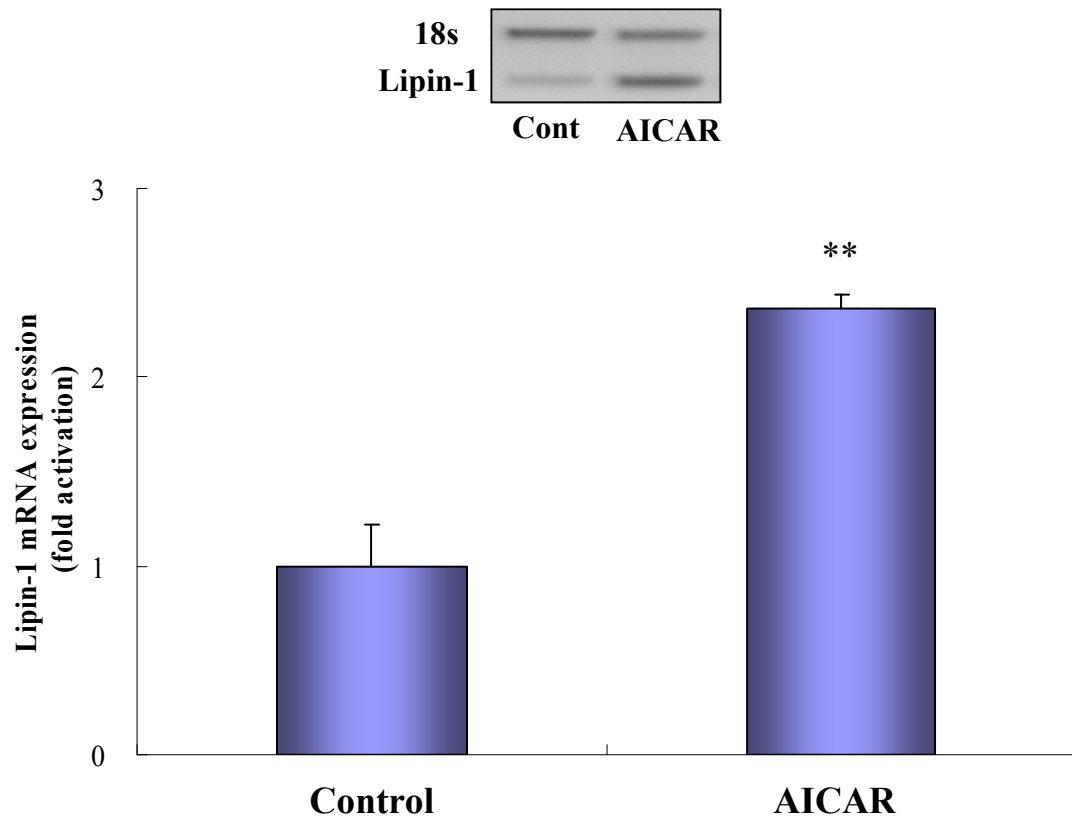


Fig.4-12 Lipin-1 mRNA expression in rat triceps muscle 6-h after injection of AICAR. Values are means $\pm$ SEM. ** Indicates significant difference from the values obtained in control group at a level of $p < 0.01$.

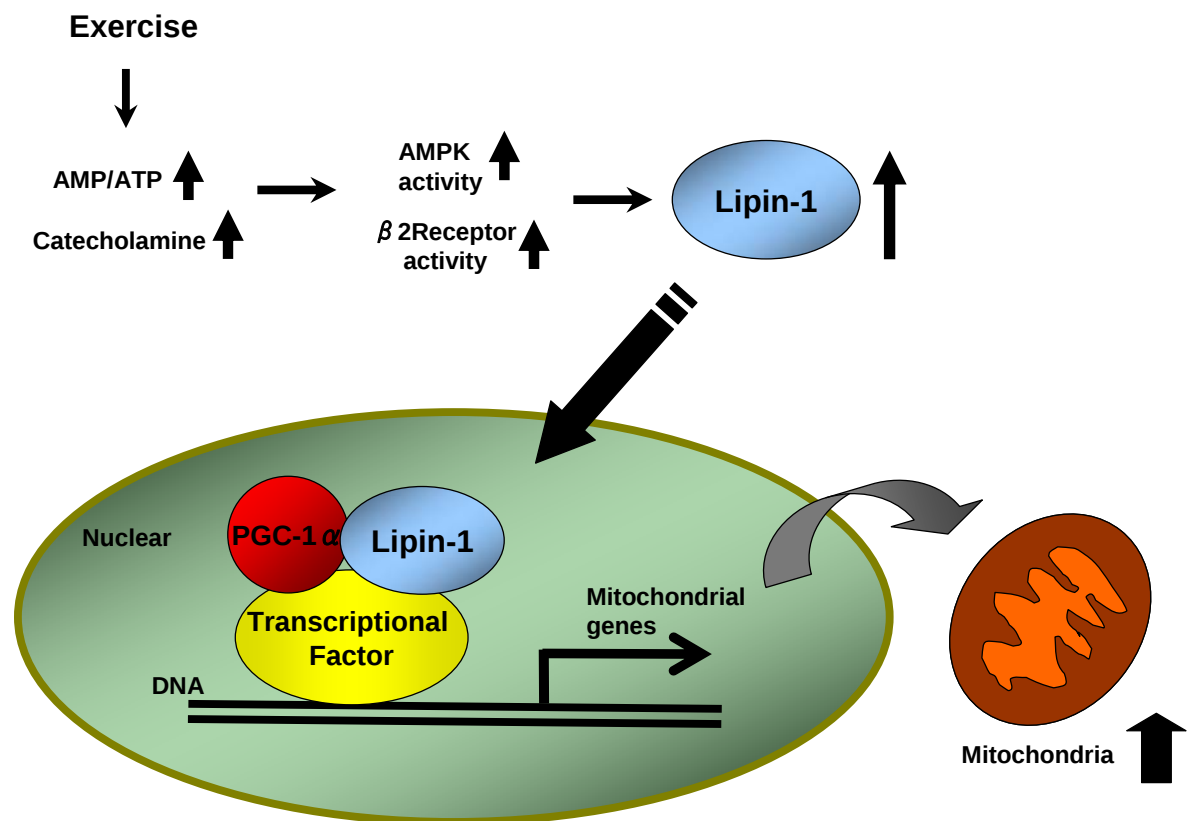


Fig. 4-13 A schematic representation of the involvement of Lipin-1 to mitochondria biogenesis.

第5章 まとめ

I. 研究目的

本研究の目的は、1) 一過性の低強度・長時間水泳運動を行うことで、骨格筋 Lipin-1 および YY1 mRNA 発現量が増加するか否かを検証すること、2) 運動による骨格筋 Lipin-1 mRNA の発現量増加を引き起こす細胞内情報伝達経路を検証することであった。

II. 結果

課題 1 から得られた結果は以下の通りである。

- (1) 一過性の低強度・長時間水泳運動を行うと、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量が増加した。
- (2) 一過性の低強度・長時間水泳運動では骨格筋 YY1 mRNA 発現量の変化は認められなかった。

課題 2 から得られた結果は以下の通りである。

- (1) Olive oil およびヘパリン投与では、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は変化しなかった。
- (2) Clenbuterol 投与を行うと、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は増加した。
- (3) AICAR 投与では、骨格筋 Lipin-1 mRNA 発現量は増加した。

本研究の結果をまとめると、ミトコンドリアの発現調節に関与していると考えられている Lipin-1 が一過性の運動により骨格筋において増加することが明らかとなった。また、身体運動による骨格筋 Lipin-1 の増加には、 $\beta 2$ アドレナリン受容体および AMPK の活性化が関係している可能性が示唆された。

Ⅲ. 今後の課題

一過性の持久的運動により、骨格筋の Lipin-1 が増加したことから、Lipin-1 が持久的トレーニングに対する骨格筋適応、すなわちミトコンドリアの増加において重要な役割を果たしている可能性が高い。しかしながら、本研究では、間接的な証拠を示したにすぎず、今後、遺伝工学的手法を用いて Lipin-1 遺伝子を骨格筋細胞内に導入することで、実際にミトコンドリアが増加するかどうかを明らかにすることが必要であると考えます。また、 β 受容体および AMPK の活性化に引き続いて Lipin-1 の発現増加に関与する情報伝達経路についてさらに詳細な検討を加える必要があると思われる。

参考文献

- Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P., and Holloszy, J.O. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J* 16, 1879-1886.
- Berger, J.P., Akiyama, T.E., and Meinke, P.T. (2005). PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 26, 244-251.
- Carling, D. (2005). AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie* 87, 87-91.
- Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223, 217-222.
- Carman, G.M., and Han, G.S. (2006). Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 31, 694-699.
- Chau, C.M., Evans, M.J., and Scarpulla, R.C. (1992). Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem* 267, 6999-7006.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736-740.
- De Cesare, D., Fimia, G.M., and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 24, 281-285.
- Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D.N., and Reue, K. (2007). Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* 282, 3450-3457.
- Dudley, G.A., Abraham, W.M., and Terjung, R.L. (1982). Influence of exercise intensity and

duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 53, 844-850.

Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., and Kozak, L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.

Finck, B.N., Gropler, M.C., Chen, Z., Leone, T.C., Croce, M.A., Harris, T.E., Lawrence, J.C., Jr., and Kelly, D.P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab* 4, 199-210.

Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M.F., Smith, J.T., Habinowski, S.A., Kaijser, L., Mu, J., Ljungqvist, O., Birnbaum, M.J., Witters, L.A., Thorell, A., and Goodyear, L.J. (2000). Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 1150-1155.

Garcia-Roves, P., Huss, J.M., Han, D.H., Hancock, C.R., Iglesias-Gutierrez, E., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2007). Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10709-10713.

Harri, M.N. (1980). Physical training under the influence of beta-blockade in rats. III. Effects on muscular metabolism. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 45, 25-31.

Harris, T.E., Huffman, T.A., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Kumar, A., and Lawrence, J.C., Jr. (2007). Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J Biol Chem* 282, 277-286.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., and Montminy, M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.

Hickson, R.C., Rennie, M.J., Conlee, R.K., Winder, W.W., and Holloszy, J.O. (1977). Effects of increased plasma fatty acids on glycogen utilization and endurance. *J Appl Physiol* 43, 829-833.

Holloszy, J.O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on

mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 242, 2278-2282.

Holmes, B.F., Sparling, D.P., Olson, A.L., Winder, W.W., and Dohm, G.L. (2005). Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E1071-1076.

Hondares, E., Pineda-Torra, I., Iglesias, R., Staels, B., Villarroya, F., and Giralt, M. (2007). PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 1021-1027.

Hood, D.A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90, 1137-1157.

Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12017-12022.

Jensen, T.E., Rose, A.J., Jorgensen, S.B., Brandt, N., Schjerling, P., Wojtaszewski, J.F., and Richter, E.A. (2007). Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1308-1317.

川中健太郎、樋口満、大森肇、勝田茂 筋の活動量および種類による糖輸送体濃度の変化
体力科学 43 : 269-276,1994

Krieger, D.A., Tate, C.A., McMillin-Wood, J., and Booth, F.W. (1980). Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol* 48, 23-28.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lancaster, G.I., Halson, S.L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A.E., Drayson, M.T., and Gleeson, M. (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev* 10, 91-106.

Leick, L., Wojtaszewski, J.F., Johansen, S.T., Kiilerich, K., Comes, G., Hellsten, Y., Hidalgo, J., and Pilegaard, H. (2007). PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*

Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., Chen, Z., Holloszy, J.O., Medeiros, D.M., Schmidt, R.E., Saffitz, J.E., Abel, E.D., Semenkovich, C.F., and Kelly, D.P. (2005). PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3, e101.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R., and Spiegelman, B.M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.

Lithell, H., Orlander, J., Schele, R., Sjodin, B., and Karlsson, J. (1979). Changes in lipoprotein-lipase activity and lipid stores in human skeletal muscle with prolonged heavy exercise. *Acta Physiol Scand* 107, 257-261.

Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., and Grimaldi, P.A. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *Faseb J* 17, 2299-2301.

Miller, W.C., Bryce, G.R., and Conlee, R.K. (1984). Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats. *J Appl Physiol* 56, 78-83.

Miura, S., Kawanaka, K., Kai, Y., Tamura, M., Goto, M., Shiuchi, T., Minokoshi, Y., and Ezaki, O. (2007). An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by beta-adrenergic receptor activation. *Endocrinology* 148, 3441-3448.

Miura, S., Tomitsuka, E., Kamei, Y., Yamazaki, T., Kai, Y., Tamura, M., Kita, K., Nishino, I., and Ezaki, O. (2006). Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ

co-activator-1alpha leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am J Pathol* 169, 1129-1139.

Murakami, T., Shimomura, Y., Yoshimura, A., Sokabe, M., and Fujitsuka, N. (1998). Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta* 1381, 113-122.

Nguyen, N., Zhang, X., Olashaw, N., and Seto, E. (2004). Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *J Biol Chem* 279, 25927-25934.

Park, K., and Atchison, M.L. (1991). Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9804-9808.

Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., and Reue, K. (2001). Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 27, 121-124.

Phan, J., and Reue, K. (2005). Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* 1, 73-83.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

Rafalski, K., Abdourahman, A., and Edwards, J.G. (2007). Early adaptations to training: upregulation of alpha-myosin heavy chain gene expression. *Med Sci Sports Exerc* 39, 75-82.

Santos-Rosa, H., Leung, J., Grimsey, N., Peak-Chew, S., and Siniossoglou, S. (2005). The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth. *Embo J* 24, 1931-1941.

Shi, Y., Seto, E., Chang, L.S., and Shenk, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67, 377-388.

Smith, A.G., and Muscat, G.E. (2005). Skeletal muscle and nuclear hormone receptors:

implications for cardiovascular and metabolic disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2047-2063.

Tai, T.A., Jennermann, C., Brown, K.K., Oliver, B.B., MacGinnitie, M.A., Wilkison, W.O., Brown, H.R., Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Morris, D.C., and Graves, R.A. (1996). Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 271, 29909-29914.

Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., and Sakai, J. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15924-15929.

Terada, S., Goto, M., Kato, M., Kawanaka, K., Shimokawa, T., and Tabata, I. (2002). Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 350-354.

Terada, S., and Tabata, I. (2004). Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E208-216.

Virbasius, C.A., Virbasius, J.V., and Scarpulla, R.C. (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 7, 2431-2445.

Wang, Y.X., Lee, C.H., Tjep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159-170.

Watt, M.J., Steinberg, G.R., Chen, Z.P., Kemp, B.E., and Febbraio, M.A. (2006). Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J Physiol* 574, 139-147.

Wende, A.R., Schaeffer, P.J., Parker, G.J., Zechner, C., Han, D.H., Chen, M.M., Hancock, C.R., Lehman, J.J., Huss, J.M., McClain, D.A., Holloszy, J.O., and Kelly, D.P. (2007). A Role for the Transcriptional Coactivator PGC-1 α in Muscle Refueling. *J Biol Chem* 282, 36642-36651.

Wibom, R., Hultman, E., Johansson, M., Matherei, K., Constantin-Teodosiu, D., and Schantz, P.G. (1992). Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73, 2004-2010.

Winder, W.W., Holmes, B.F., Rubink, D.S., Jensen, E.B., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88, 2219-2226.

Wright, D.C., Han, D.H., Garcia-Roves, P.M., Geiger, P.C., Jones, T.E., and Holloszy, J.O. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression. *J Biol Chem* 282, 194-199.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., and Spiegelman, B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Varma, V., Miles, L.M., Phanavanh, B., Starks, T.N., Phan, J., Spencer, H.J., 3rd, McGehee, R.E., Jr., Reue, K., and Kern, P.A. (2006). Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Diabetes* 55, 2811-2818.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な御指導ならびに激励を賜りました本研究科の樋口満教授に深甚なる謝意を表します。

本研究科の村岡功教授、坂本静男教授には本論文を終えるにあたり、暖かい激励ならびに御指導を賜りましたことを心から御礼申し上げます。

RNA 量測定のための分析機器を使用させていただきました人間科科学学術院の鈴木克彦先生に、厚く御礼申し上げます。

本稿作成や大学院生活を様々な方面から支えてくださった、本研究科の薄井澄誉子助手、緒方知徳助手や樋口研究室の皆様にご心より感謝いたします。

奈良教育大学教育学部中谷昭教授には、研究に関する御助言をいただきましたこと深く感謝いたします。

本論文作成のための大学院生活を物心両面で支えていただいた両親にご心より感謝いたします。

最後に、本研究の遂行に際して、早稲田大学先端科学・健康医療融合研究機構の寺田新先生には、常に御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました。ここに心から感謝の意を表します。

