

し、微生物感染や発癌防御において重要な役割を果たしている (Cunha, et al., 1993)。我々は M1(マウス白血病細胞)から Mm1(マクロファージ細胞)へ分化する過程に伴う UCP2mRNA 及び蛋白レベルを調べた結果、Mm1 の UCP2 タンパクの発現量は M1 より顕著に高く、5 倍以上あることを見出した。しかし UCP2mRNA レベルでは Mm1 は M1 の 1.5 倍に過ぎなかった。UCP2mRNA レベルと UCP2 タンパクの発現が一致しないことがすでに報告されている。原因のひとつとしては UCP2 遺伝子の exon 2 にアップストリーム ORF が存在し、その中の複数の開始コドン ATG を含む RNA 構造が UCP2 タンパクの翻訳を強く阻害していることが指摘された (Pecqueur et al., 2000)。そこでタンパク翻訳調節因子について抗 p-70S6 (Thr389) kinase, p-44/42 MAPK (Thr202/thr204), p-AKT(Ser423), p-eIF2, 4EBP1(Thr70), 4EBP1(Ser65)などの抗体を用いて、M1 と Mm1 細胞の UCP2 mRNA の翻訳制御メカニズムを解析した結果、M1 及び Mm1 細胞における翻訳調節因子の活性の違いが明らかとなり、UCP2 タンパクの翻訳はこれらの調節因子による制御を受けるものと推測された。

2. マクロマージでの UCP2 の発現は UCP2 の免疫及び炎症反応における重要な役割を示唆している (Fleury, et al., 1997; Gimeno, et al., 1997; Larrory, et al., 1997)。脾臓、肺での UCP2 mRNA 及び蛋白レベルは、ob/ob マウスのマクロファージ及び肝細胞ミトコンドリアの H₂O₂ 産生と関連している (Chavin, et al., 1999; Lee, et al., 1999)。人を含む加齢動物は細菌感染に対する抵抗性の低下が一般的に認められる変化である。今回我々は老齡ラット脾臓の UCP2 蛋白は若齡ラットより低

いレベルを示し、また免疫蛍光染色及び FISH 等の解析の結果、老齡ラット肺、脾臓、肝臓、小腸などの各臓器に存在するマクロファージの UCP2 レベルは若齡ラットより低いことが分かった。UCP2 の機能低下は加齢動物の免疫機能低下につながる可能性が示唆される。従って、UCP2 の機能の維持と活性化は老化防止、免疫機能の向上に機能すると思われる。

E. 結論

免疫系細胞であるマクロファージは活性酸素を産生し感染防御において重要な役割を果たす。一方過剰な活性酸素は組織を損傷し炎症を引き起こす。UCP2 の分化マクロファージにおける発現は過剰な活性酸素の制御に機能していると考えられ、その翻訳レベルでの調節に翻訳開始因子のリン酸化レベルやそれらのリン酸化酵素レベルが関与することが示唆された。UCP2 蛋白レベルは動物個体の老化により種々の組織で低下していた。加齢により UCP2 蛋白の発現が減少し活性酸素産生に対する制御が不調となることが示唆される。UCP2 は免疫系細胞の機能調節や炎症の制御、さらに老化の抑制に機能することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., Mimura, A. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2001 Oct;116(4):321-7

2. 学会発表

喬善楼、山下均、西尾康二：免疫系細胞の分化と UCP の発現：分化型マクロファージ

ジ様細胞 Mm1 における UCP2 の動態と機能。日本基礎老化学会 2001 年度大会、
2,001 年 6 月、大阪

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

骨格筋におけるエネルギー代謝および熱産生と加齢変化

分担研究者 佐藤 祐造 名古屋大学総合保健体育科学センター 教授

研究要旨 老化による骨格筋の萎縮は運動機能に対する影響ばかりでなく、熱産生とエネルギー消費機能に対しても大きく影響すると考えられる。これらの筋機能低下とミトコンドリア脱共役蛋白質-3 (UCP3) の役割を明らかにするために老若ラットを用いて検討を行った結果、加齢による速筋の萎縮、UCP3蛋白量の低下と脂質含量の増加が観察された。寒冷環境下では遅筋のUCP3レベルは大きく低下したのに対して、速筋でのレベルは維持されていたことから、老化個体における速筋の萎縮はその耐寒性に大きく影響すると考えられる。また、骨格筋の萎縮は座骨神経切除によっても誘導されミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関連する分子の遺伝子発現の低下がみられたが、予想に反してUCP3とUCP2のmRNAレベルは上昇していた。これは筋萎縮による熱産生とエネルギー消費のcapacityの低下を代償する反応かもしれない。骨格筋UCP機能の維持は熱産生およびエネルギー消費機能の低下を予防し高齢者の健康に大きく寄与するものと考えられる。

A. 研究目的

からだの中で最大の組織である骨格筋は、個体の様々な活動や運動を支えるばかりでなく“ふるえ”による熱産生を行う臓器として、エネルギー代謝において中心的役割を果たす。筋萎縮（サルコペニア）は、老化の過程で一般的にみられる現象であり、エネルギー消費や熱産生機能の減退を伴うと考えられる。しかしながら、加齢の影響が骨格筋タイプにより異なるのかなどを含めて、それらの機能低下の分子レベルでの

理解は十分なされていない。熱産生蛋白質として発見されたミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP）は、体温調節、余剰エネルギーの消費、活性酸素制御など重要かつ多彩な機能をもつ分子として近年注目を集めている。現在5種類のアイソフォームが知られているが、本研究では骨格筋特異性の高いUCP3の役割を中心にエネルギー代謝関連遺伝子群の発現と老化、筋萎縮とエネルギー代謝や耐寒性の低下との関連を明らかにし、骨格筋機能低下を予防するための基

礎的知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

国立療養所中部病院長寿医療研究センターの実験動物飼育施設の Aging farm において飼育された6ヵ月齢、及び24-26ヵ月齢 F344/N ラット(雄)を 5℃環境下で 24 時間飼育した後、腓腹筋(White gastrocnemius muscle)とヒラメ筋(Soleus muscle)を採取した(実験1)。また、老若ラットの片足の座骨神経を切除して7日後に実験1同様の骨格筋を採取した(実験2)。採取した骨格筋よりミトコンドリア蛋白質や total RNA を調製した後、ノーザンブロット法とウエスタンブロット法を用いて UCP3, UCP2, 骨格筋型脂肪酸結合蛋白質(HFABP), グルコース輸送体 4 型(GLUT4), チトクロームオキシダーゼ(COX)などの mRNA や蛋白質発現量を解析した。また、各骨格筋中のグリコーゲン、中性脂肪、遊離脂肪酸含量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立療養所中部病院長寿医療研究センターに設置される実験動物委員会の承認を得、動物使用の倫理規定に従って実施した。

C. 研究結果

(実験1)

H12年度の研究から、老若ラット間や骨格筋タイプ間で寒冷曝露に対する UCP3 と UCP2 の mRNA の誘導性に大きな違いがあることが明らかになった。今回、ミトコンドリア総蛋白量、各 UCP 蛋白レベルを調べた結果、ヒラメ筋と腓腹筋のどちらにおいても老化によるミトコンドリア含量

の低下が明らかになった。一方、寒冷曝露により若齢ラットの腓腹筋でミトコンドリア含量の増加が観察されたが、老齢ラットでは変化は認められなかった。同様に、UCP3 と UCP2 の蛋白レベルも若齢ラットに比べて老齢ラットの両骨格筋で低かった (UCP3: ヒラメ筋, 28.5%; 腓腹筋, 45.1%, UCP2: ヒラメ筋, 12.0%; 腓腹筋, 51.0%)。面白いことに寒冷曝露により若齢ラットのヒラメ筋 UCP3 はほぼ消失したのに対して、腓腹筋の UCP3 レベルは曝露前のレベルを維持していた。UCP2 についても同様の傾向がみられた。これらの結果は、mRNA レベルの変化とよく一致していた。一方、老齢ラットにおいては、寒冷曝露の各 UCP 蛋白レベルに対する影響はどちらの骨格筋タイプにおいてもほとんどみられなかった。

(実験2)

既に報告されているように、老化による筋萎縮は速筋である腓腹筋で観察されたが、座骨神経切除では両骨格筋タイプで顕著な萎縮が誘導された。萎縮した老齢ラットの腓腹筋では、筋中の遊離脂肪酸と中性脂肪レベルの上昇が明らかとなった。神経切除によりこれらのパラメーターは変化しなかったが、グリコーゲンレベルの上昇が観察された。

次に、UCP3 と UCP2 の遺伝子発現について検討した。その結果、神経切除により老若ラットの両骨格筋タイプにおいて同じミトコンドリア蛋白質である COX mRNA レベルの低下とは逆に、UCP3 mRNA レベルは2~3倍上昇した。UCP2 mRNA レベルは腓腹筋では有意に上昇したが、ヒラメ筋では変化はみられなかった。

D. 考察

本研究から老化過程における骨格筋の萎縮は遅筋（ヒラメ筋）よりも速筋（腓腹筋）でより大きく、神経支配に大きく依存していることが明らかになった。加齢と共に早く力強い動きが減り、高齢者のゆっくりとした動きや同じ体勢を維持した生活パターンは、各筋タイプの特性と速筋系の萎縮という事実から十分理解される。また、加齢による活動量の低下は、活動そのものからの熱産生の減少ばかりでなく、UCP3 含量の豊富な速筋の萎縮を助長し、熱産生の capacity はさらに低下すると考えられる。寒冷曝露の実験からも、ふるえ熱産生における速筋の役割は極めて重要であり、温度変化に対して UCP 機能をいかに誘導し、維持できるかがスムーズな温度適応において重要と思われる。UCP3 と UCP2 は脂質や糖代謝とも関連していることが示唆されている。すなわち、UCP 熱産生は脂質や糖の消費を伴うことから老齢ラットの速筋の遊離脂肪酸と中性脂肪含量の増加は UCP 機能の低下と関連している可能性が高い。老齢ラットは若齢ラットに比べて体脂肪量が高く肥満傾向であることから、骨格筋 UCP 機能が全身のエネルギー代謝に大きな影響を及ぼしていることが示唆される。

一方、神経切除により老若ラットの速筋において UCP2 と UCP3 の mRNA レベルが顕著に増加したことは、筋萎縮による熱産生とエネルギー消費の capacity の低下を代償する反応かもしれない。神経切除により UCP2 と UCP3 遺伝子が誘導されたことは、これらの UCP が褐色脂肪組織の UCP1 と異なり交感神経系以外の因子

の転写調節も受けることを意味し興味深い。また、GLUT4 mRNA レベルが大きく低下し、グリコーゲン含量の上昇がみられたことは、神経切除によるグルコース利用の低下を強く示唆する。

E. 結論

加齢による骨格筋の熱産生およびエネルギー消費機能の低下に UCP 機能の低下が関連する。骨格筋 UCP 機能の維持は高齢者の健康に大きく寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M.Obayashi, Y.Sato, R.A.Harris and Y.Shimomura. Regulation of the activity of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (BCODH) complex by binding BCODH kinase. FEBS Lett. 491: 50-54, 2001.
- 2) Y.Nishida, Y.Higaki, K.Tokuyama, K.Fujimi, A.Kiyonaga, M.Shindo, Y.Sato and H.Tanaka. Effect of mild exercise training on glucose effectiveness in healthy men. Diabetes Care 24:1008-1013, 2001.
- 3) T.Fushimi, K.Tayama, M.Fukaya, K.Kitakoshi, N.Nakai, Y.Tsukamoto and Y.Sato. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. J.Nutr. 131:1973-1977, 2001.
- 4) M.Xu, M.Nagasaki, M.Obayashi, Y.Sato, T.Tamura and Y.Shimomura. Mechanism of activation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex by exercise. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287:752-756, 2001.

2. 学会発表

1)佐藤 祐造：運動療法の適応と実際。第44回日本糖尿病学会年次学術集会教育講演。京都。2001年4月。

2)長崎 大、下村 吉治、中井 直也、徐明、押田 芳治、佐藤 祐造。運動トレーニング経験の有無が骨格筋糖輸送能の亢進過程に及ぼす影響-過去の運動経験はトレーニング効果を高めるか?-。第44回日本糖尿病学会年次学術集会。京都。2001年4月。

3)山之内 国男、白井 邦子、入山 愛子、岡林 直実、加藤 宏一、楠 正隆、榊原文彦、佐藤 祐造。肥満耐糖能障害におけるインスリン抵抗性に対する運動トレーニング効果-グルコースクランプ法とHOMA-Rによる男女別比較検討-。第44回日本糖尿病学会年次学術集会。京都。2001年4月。

4)T.Kajioka, K.Masaki, R.Chen, R.Abbott, K.Yano, BL Rodriguez, H.Shimokata, Y.Sato and JD Curb. The association of sagittal abdominal diameter with metabolic risk factors for cardiovascular disease in elderly Japanese-American men. The 5th International Conference on Preventive Cardiology. Osaka. 2001年5月。

5)山下 均、紺谷靖英、王作成、鈴木友子、佐藤祐造、森 望：ミトコンドリア脱共役蛋白質 I 型(UCP1)欠損マウスの表現型の加齢変化。第24回日本基礎老化学会大会、2001年6月、大阪。

6)佐藤 祐造。「スポーツ歯科医学 21世紀の展望」スポーツ医学の立場から。第12回日本スポーツ歯科医学会学術大会特別講演。名古屋。2001年6月。

7)T.Kajioka, R.Chen, K.Masaki, RD Abbott, K.Yano, H.Shimokata, Y.Sato, BL Rodriguez and JD Curb. Body mass index and abdominal adiposity measures as predictors of mortality in elderly Japanese-American men. 2001 Congress of Epidemiology. Toronto. 2001年6月。

8)H.Yamashita, Y.Kotani, Z Wang, T.Furuyama, Y.Sato and N.Mori. Effects of aging and denervation on the gene expression of UCPs, GLUT4 and FABP in skeletal muscles of rats. 2001 Gordon Research Conferences: Biology of Aging. Oxford. 2001年7月。

9) X-C Hu, B.Quin, J.Sato and Y.Sato. Effects of gosha-jinki-gan (nin-ceh-sehn-qi-wan) chinese medicine on insulin resistance in streptozotocin-induced diabetes rats. New York 21st Century Chinese Medicine Forum. New York. 2001年8月。

10)柳本 有二、岩本 豪人、八木 莊一郎、押田 芳治、佐藤 祐造。運動継続を目的とした健康・スポーツ教室参加者の体力及び骨強度の変化について。第56回日本体力医学会大会。仙台。2001年9月。

11)長崎 大、下村 吉治、中井 直也、徐明、押田 芳治、佐藤 祐造。運動トレーニング経験が骨格筋糖輸送能の亢進過程および5'AMP-activated protein kinase(AMPK)に及ぼす影響。第56回日本体力医学会大会。仙台。2001年9月。

12)柴田 優子、押田 芳治、渡辺 智之、佐藤 祐造。運動負荷が骨代謝に及ぼす影響。第56回日本体力医学会大会。仙台。2001年9月。

13) ZC. Wang, T. Mizuno, Y.Kotani, Y.Sato, N.Mori and H.Yamashita. Change of cold-

induced expression of UCP3 in skeletal muscle during aging. 第74回日本生化学会大会. 京都. 2001年10月。

14) 佐藤 祐造. レクチャーシリーズ 5 肥満の予防、治療における運動療法の意義. 第22回日本肥満学会. 前橋. 2001年10月。

15) 澤 貴広、牧田 茂、間嶋 満、佐藤 祐造. 脳卒中患者の AT レベルの運動療法によるインスリン感受性改善効果の検討. 第12回日本臨床スポーツ医学会学術集会. つくば. 2001年11月。

16) 佐藤 祐造. ランチョンセミナー「生活習慣病の予防と運動」. 第23回日本健康増進学会. 淡路. 2001年11月。

G. 知的所有権の取得状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|-------------------|----|-----------|------|
| Mori, N., Mizuno, T., Murai, K., Nakano, I., and Yamashita, H. | Effect of age on the gene expression of neural-restrictive silencing factor NRSF/REST. | Neurobiol. Aging | 23 | 255-261 | 2002 |
| Furuyama T., Yamashita, H., Kitayama, K., Higami, Y., Shimokawa, I., and Mori, N. | Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3 and 4 (FKHR, FKHL1 and AFX) in the rat skeletal muscles. | Micro. Res. Tech. | | In press | 2002 |
| Anunciado, R.V.P., Nishimura, M., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Ohno, T. and Namikawa, T. | Quantitative trait loci for body weight in the intercross between SM/J and A/J mice. | Exp. Anim. | 50 | 319-324 | 2001 |
| Ohno, T., Horio, F., Kitoh, J., Tanaka, S., Nishimura, M. and Namikawa, T.: | Blood and liver concentrations in EDS Shrews exhibiting spontaneous non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). | Exp. Anim. | 50 | 427-429 | 2001 |
| Horio, F., Hayashi, K., Mishima, T., Takemori, K., Oshima, I., Makino, S., Kakinuma, A. and Ito, H.: | A newly established strain of spontaneously hypertensive rat with a defect of ascorbic acid biosynthesis. | Life Sci., | 69 | 1879-1890 | 2001 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------------|-----|---------------|------|
| Minakata,K., Nozawa,H., Watanabe-Suzuki,K., Suzuki,O., Kawai,K. and Horio,F.: | A rapid and sensitive procedure for determination of copper in running water, urine and plasma by ESR. | Jpn. J.Forensic Toxicol. | 19 | 236-242 | 2001 |
| Morimitsu,Y., Nakagawa,Y., Hayashi,H., Hujii,H., Kumagai,T., Nakamura,Y., Osawa,T., Horio,F., Itoh,K., Iida,K., Yamamoto,M. and Uchida,K. | A sulfonate analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. | J. Biol. Chem. | 277 | 3456 -3463 | 2002 |
| Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., Mimura, A. | Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. | Histochem. Cell Biol. | 116 | 321-327 | 2001 |
| Obayashi, M., Sato, Y., Harris, R. and Shimomura, Y. | Regulation of the activity of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (BCODH) complex by binding BCODH kinase. | FEBS Lett. | 491 | 50-54 | 2001 |
| Nishida, Y., Higaki, Y., Tokuyama, K., Fujimi, K., Kiyonaga, A., Shindo, M., Sato, Y., and Tanaka, H. | Effect of mild exercise training on glucose effectiveness in healthy men. | Diabetes Care | 24 | 1008 -1013 | 2001 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|--------------------------------|-----|---------------|------|
| Fushimi, T., Tayama, K., Fukaya, M., Kitakoshi, K., Nakai, N., Tsukamoto, Y., and Sato, Y. | Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. | J. Nutr. | 131 | 1973 -1977 | 2001 |
| Xu, M., Nagasaki, M., Obayashi, M., Sato, Y., Tamura, T., and Shimomura, Y. | Mechanism of activation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex by exercise. | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 287 | 752-756 | 2001 |

20010230

以降P29－P103は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P26－P28「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください