

平成14年度 厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化による熱産生機能低下の原因解明と
予防に関する基礎的研究

(H12-長寿-012)

研 究 報 告 書

主任研究者 山下 均

平成15年3月

目次

| | |
|--------------------------------------------|----------|
| I. 総括研究報告 | |
| 老化による熱産生機能低下の原因解明と予防に関する基礎的研究 | ----- 1 |
| 山下 均 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 熱産生蛋白質欠損マウスを用いた老化過程における熱産生機能低下のメカニズムの解明 | ----- 8 |
| 山下 均 | |
| 2. 熱産生に対する栄養条件の影響に関する分子遺伝学的解析 | ----- 11 |
| 堀尾 文彦 | |
| 3. 免疫系細胞における熱産生誘導機構と細胞老化に関する研究 | ----- 15 |
| 西尾 康二 | |
| 4. 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 | ----- 18 |
| 佐藤 祐造 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 23 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 26 |

老化による熱産生機能低下の原因解明と予防に関する基礎的研究

主任研究者 山下 均 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター
分子遺伝学研究部 分子生物学研究室 室長

研究要旨 熱産生蛋白質として見出されたミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP）は、生体防衛の中で多彩な役割を果たすことが明らかになってきた。我々は、ユニークなマウスモデル系、加齢ラットおよび細胞培養系を用いて、老化による種々の機能低下や病態とUCP分子群との関連、その原因を解明すべく研究を行った。その結果、①加齢による肥満の進展や耐寒性低下の原因がUCP1消失、ならびに骨格筋におけるUCP3発現レベルの低下と密接に関連していること、②骨格筋UCP3と肝臓UCP2の発現レベルの低下が各々の組織における脂肪蓄積と耐糖能異常に係わること、③UCP2の活性制御に新たなメカニズムが存在する可能性、が明らかとなった。UCP分子群の発現制御および活性化は老化の予防に重要と考えられる。

分担研究者

堀尾文彦 助教授

名古屋大学大学院生命農学研究科

応用分子生命科学専攻バイオモデリング講座

西尾康二 助手

名古屋大学大学院医学研究科

機能形態学講座

佐藤祐造 教授

名古屋大学総合保健体育科学センター

導性熱産生）の低下により肥満を引き起こすことが明らかになっている。多くの疫学的研究は、肥満者が痩せると平均余命が延びることを示している。しかし、このように生命活動の様々な領域で作用する基本的な機能であるにもかかわらず、熱産生機能については今尚不明な点が多く残されている。

熱産生蛋白質として発見された脱共役蛋白質（UCP）は、エネルギー産生のあるミトコンドリアに存在し、グルコースや中性脂肪などの酸化的リン酸化により生じたプロトンをATP合成と共役することなく熱として消費する働きを有すると考えられている。また、ミトコンドリアの呼吸鎖で生じたプロトンは活性酸素生成の要因ともなるが、UCPは余剰のプロトンを消費することにより活性酸素生成を抑制する機能を持つことが最近示唆されている。本研究は、UCPの働きを中心に体熱制御、エネルギー制御のメカニズムの理解、

A. 研究目的

熱産生機能は、体温の調節・維持のみならず、エネルギーの備蓄と消費、感染防御などと密接に係る重要な生理機能である。これらの熱産生機能の低下は、ヒトを含む加齢動物で一般的に認められる変化であり、細菌感染に対する抵抗性（免疫応答性熱産生）や耐寒性（寒冷誘導性熱産生）の低下、あるいは過剰に摂取したエネルギーの消費能力（食事誘

並びに加齢に伴う耐寒性や免疫機能の低下、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症との関連を理解することを通して老化による熱産生機能低下の原因を解明し、その予防法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 非ふるえ熱産生において中心的役割を果たすミトコンドリア脱共役蛋白質 I 型(UCP1) 欠損マウスを用いて、UCP1 欠損が全身のエネルギー代謝、体熱制御、寿命に与える影響とそれらの加齢や栄養条件による修飾を、生理学、並びに分子生物学的手法を用いて検討した。

(2) 5 週齢の雄 SMXA-5 に、高炭水化物食又は高脂肪食を与え、20 週齢時にマウスより骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓を採取し、UCPs や PPARs の遺伝子発現レベルおよび骨格筋と肝臓の中性脂肪濃度を測定した。また、SMXA-5 系統と SM/J 系統とを交配して得た F2 インタークロスマウス 254 匹を用いて前実験と同様の糖尿病形質の解析を行った。各個体についてゲノム DNA を調製し、約 60 種類のマイクロサテライトマーカーによる全ゲノムタイピング(genotyping) と糖尿病形質値との結果を用いて、QTL 解析を進めた。

(3) UCP2 にはプリンヌクレオチドが結合し、活性制御に係わる可能性がある Walker モチーフ (GXXGXXK) が存在する。このモチーフに変異を導入し、その膜ポテンシャルへの影響を調べた。また Walker モチーフの変異型 UCP2 蛋白の恒常発現細胞を作成し、そのミトコンドリア膜ポテンシャル、細胞形態の変化、並びに細胞死を観察した。

(4) ふるえ熱産生やエネルギー代謝における

骨格筋の役割と老化による筋萎縮 (サルコペニア) との関連から、寒冷曝露や座骨神経切除した老若ラットの骨格筋における UCP3、UCP2 やエネルギー代謝関連分子などの遺伝子発現の違いを分子生物学的手法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、国立療養所中部病院長寿医療研究センター、または名古屋大学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験を行った。

C. 研究結果

(1) 昨年度に引続き、UCP1-KO マウスの表現型の加齢変化と寿命解析を行った結果、KO マウスは加齢および高脂肪食摂取により肥満になり易いことが確認された。特に、KO マウスと野生型マウスの体重増加の違いは、5~6 ヶ月齢くらいから明らかとなった。雌 KO マウスでは、血中インスリンおよびレプチンレベルの上昇がみられインスリン抵抗性、レプチン耐性の進行も示唆された。一方、普通食飼育群を用いた解析から、野生型マウスに比べて KO マウスでは加齢に伴う耐糖能の低下が認められたが、平均寿命に差はみとめられなかった。高脂肪食を摂取した KO マウスでは、肥満度の上昇に加えて褐色脂肪組織の著しい肥大がみられ、遺伝子発現の解析から UCP2、 α 2、PPAR γ などの発現レベルの上昇が明らかとなった。

(2) SMXA-5 系統は、高炭水化物食を摂取した場合には2カ月齢前後から全個体が軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症を呈した。また、インスリン作用不全 (インスリン抵抗性)、インスリン分泌不全の両方が観察された。各組織の UCP mRNA レベルを測定し

た結果、骨格筋の UCP3、肝臓の UCP2 mRNA レベルが SM/J および A/J に比べて有意に低いことが明らかとなった。SMXA-5 では両組織において PPAR α の mRNA レベルが対照系統に比べて有意に低いことが判明した。骨格筋および肝臓のトリグリセリド濃度は、SMXA-5 では対照系統に比べて有意な高値であった。一方 QTL 解析の結果、耐糖能試験 120 分値を規定する有意な QTL を Chr.2 に検出した (LOD score=12.5)。この QTL 領域は、絶食時および非絶食時血糖値、肥満度、体重も有意に規定した。

(3) 野生型並びに変異型 UCP2 遺伝子の C 末側に GFP 遺伝子を結合させた発現ベクターを Cos7 細胞に一過性に発現させた場合、野生型 UCP2-GFP の発現によりミトコンドリア膜ポテンシャルの低下が観察された。しかし Walker モチーフの変異型 UCP2-GFP (G171L、G174L、K177E、K177R、G174L/K177E) を発現させた場合、ミトコンドリア膜ポテンシャルに変化は見られず、本モチーフの UCP2 機能における重要性が示唆された。

(4) 遺伝子発現の解析から、老齢ラット腓腹筋において UCP3、HFABP、GLUT4 の mRNA レベルの低下が明らかとなったが、ヒラメ筋では変化はみられなかった。一方、座骨神経切除により両骨格筋の UCP3 mRNA レベルは顕著に増加した。UCP3 蛋白質レベルはヒラメ筋では変化がみられなかったが、腓腹筋では mRNA レベルとは逆に大きく低下していた。寒冷応答と UCP3 発現についても、老若ラット間や骨格筋タイプ間での違いが明らかになった。また今回我々は、UCP3 蛋白質 short form の検出に世界で初めて成功した。寒冷曝露によりヒラメ筋での UCP3 蛋白質レベルの

低下が明らかとなったが、それは特に long form で顕著であることから二つの form の安定性などに違いがあり、UCP3 レベルが翻訳以降の調節を受けていることが示唆された。

D. 考察

UCP1-KO マウスは加齢や高脂肪食摂取といったエネルギーバランスの変化にうまく適応できず肥満になり易いことが明らかとなった。KO マウスの肥満は、ヒトでは 25 才前後の青年期に相当する 5~6 ヶ月齢くらいから明らかになってくるが、このことはヒトでみられる加齢と肥満の増加とよく一致する。一方、脂肪含量の低い食餌を摂取する限り KO マウスは野生型マウスと同様に生きることができ寿命に差がないことは、UCP1 をほとんど持たない我々ヒトにおいて改めて食生活の重要性を教える結果となった。このような意味からもヒトでは UCP1 のホモログである UCP2 や UCP3 の役割も重要となる。実際に、高炭水化物食の摂取により軽度の肥満と耐糖能異常を示す SMXA-5 マウスの解析から、その骨格筋の UCP3 と肝臓の UCP2 の遺伝子発現レベルが低いことが示唆され、そのことが骨格筋および肝臓のトリグリセリド濃度が高いことやインスリン抵抗性の発症の一つの原因ではないかと推測された。同様に、老化と筋萎縮、耐寒性と関連して骨格筋における UCP3 を中心とする遺伝子発現制御に対する老化の影響について種々の知見が明らかとなった。特に、遅筋に比べて UCP3 発現レベルの高い速筋が加齢や種々のストレスなどの影響を受け易いことから、運動などによる速筋の機能の維持と強化が、老化による耐寒性の低下の予防に効果があることが考えられる。一方、UCP の活性制御については今尚十分理

解されていない。我々が UCP2 のアミノ酸配列中に見出した Walker モチーフは、ATP の結合を介して UCP2 の脱共役機能や活性酸素制御機能に影響を及ぼす可能性が示唆されたことは、UCP2 活性の制御メカニズムを解明する上で興味深い知見と思われる。

E. 結論

UCP1-KO マウスはヒトの肥満モデルとして、また SMXA-5 マウスは糖尿病の新しいモデルとして有用であり、それらの病態の解明ならびに予防薬や治療薬の開発、評価に有用と考えられる。また、UCP2 や UCP3 の活性化は、その発現レベルの高い免疫系や骨格筋機能の低下を抑制し、老化予防に対する効果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kontani, Y., Wang, Z., Furuyama, T., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. (2002) Effects of aging and denervation on the expression of uncoupling proteins in slow- and fast-twitch muscles of rats. *J. Biochem.*, 132: 309-315.
- 2) Furuyama T., Yamashita, H., Kitayama, K., Higami, Y., Shimokawa, I., and Mori, N. (2002) 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.*, 59: 331-334.
- 3) 山下 均, 紺谷靖英、王作成、汪幼学、佐藤祐造、森 望 (2002) 加齢にともなう肥満の進展と UCP1 の役割。肥満研究 8:131-135.
- 4) Ueno, Y., Horio, F., Uchida, K., Naito, M., Nomura, H., Kato, Y., Tsuda, T., Toyokuni, S. and Osawa, T.; Increase in oxidative stress in kidneys of diabetic Akita mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66,869-872 (2002)
- 5) Tsuda, T., Horio, F., Kato, Y. and Osawa, T.: Cyanidin 3-O- β -D-glucoside attenuates the hepatic Ischemia-reperfusion injury through a decrease in the neutrophil chemoattractant production in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48,134-141 (2002)
- 6) Minakata, K., Suzuki, O., Saito, S., Kawai, K. and Horio, F.: Effects of paraquat on essential antioxidant elements in osteogenic disorder Shionogi rat. *J. Toxicol. Environ. Health*, 65,143-147 (2002)
- 7) Minakata, K., Kawai, K., Horio, F., Nozawa, H., Watanabe-Suzuki, K. and Suzuki, O.: Diquat markedly changes iron and copper concentrations in tissues and plasma of ODS rats. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, 20,277-283 (2002)
- 8) Yu, W., Niwa, T., Miura, Y., Horio, F., Teradaira, S., Ribar, T.J., Means, A.R., Hasegawa, Y., Senda, T. and Niki, I.: Calmodulin overexpression causes Ca²⁺-dependent apoptosis of pancreatic β cells, which can be prevented by inhibition of nitric oxide synthase. *Lab. Invest.*, 82,1229-1239 (2002)
- 9) Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T.: Cyanidin 3-O- β -D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48,305-310 (2002)
- 10) Anunciado, R.V.P., Nishimura, M., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Ohno, T. and Namikawa, T.: Quantitative trait locus analysis of serum insulin, triglyceride, total cholesterol and phospholipid levels in the (SM/JxA/J)F2 mice. *Exp. Anim.* 52,37-42 (2003)
- 11) Kobayashi, M., Ohno, T., Tsuji, A., Nishimura, M. and Horio, F.: Combinations of non-diabetic parental genomes elicit impaired glucose tolerance in mouse SMXA RI strains. *Diabetes*, 52,180-

186 (2003)

- 12) Kawai, K., Ito, H., Kubota, H., Takemori, K., Makino, S. and Horio, F.: Changes in catecholamine metabolism by ascorbic acid deficiency in spontaneously hypertensive rats unable to synthesize ascorbic acid. *Life Sci.*, 72,1717-1732 (2003)
- 13) Sato Y.: Effects of physical exercise on the decreased insulin action caused by aging. *Muscle Metabolism* (Zierath JR and Wallberg-Henriksson H eds.). Taylor & Francis, London, 2002, pp. 365-371.
- 14) Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y., Naoi M: Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transmission.* 2002, 109:1-13.
- 15) Kajioka T, Tsuzuku S, Shimokata H, Sato Y.: Effects of intentional weight cycling on non-obese young women. *Metabolism.* 2002, 51(2):149-154.
- 16) Fuku N, Oshida Y, Takeyasu T, Guo LJ, Kurata M, Yamada Y, Sato Y., Tanaka M: Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome b gene polymorphisms in young obese adults. *BBRC.* 2002, 290:1199-1205.
- 17) Nomura T, Kawano F, Ishihara A, Sato Y., Mitarai G, Iwane S, Kamiya A, Mano T, Ohira Y: Enhanced Hoffman-reflex in human soleus muscle during exposure to microgravity environment. *Neuroscience Letters.* 2002, 316:55-57.
- 18) Nomura T, Kawano F, Kang MS, Lee JH, Han EY, Kim CK, Sato Y., Ohira Y: Effects of long-term cold exposure on contractile properties in slow-and fast-twitch muscles of rats. *Jap. J. Physiol.* 2002, 52:85-93.
- 19) Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, Kitakoshi K, Nakai N, Tsukamoto Y, Sato Y.: The efficacy of acetic acid for glycogen repletion in rat skeletal muscle after exercise. *Int. J. Sports Med.* 2002, 23:218-222.
- 20) Nakai N, Miyazaki Y, Sato Y., Oshida Y, Nagasaki M, Tanaka M, Nakashima K, Shimomura Y: Exercise training increases the activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle of diabetic rats. *Endocrine J.* 2002, 49(5):547-554.
- 21) Yamanouchi K, Abe R, Takeda A, Atsumi Y, Tanaka M, Fuku N, Takeyasu T, Guo LJ, Hirose R, Kurata M, Borgeld HJW, Yamada Y, Maruyama W, Arai Y, Hirose N, Oshida Y, Sato Y., Hattori N, Mizuno Y, Iwata S, Yagi K: Golden mean to longevity: rareness of mitochondrial cytochrome b variants in centenarians but not in patients with Parkinson's disease. *J. Neuroscience Res.* 2002, 70:347-355.
- 22) Nishida Y, Tokuyama K, Nagasaka S, Higaki Y, Fujimi K, Kiyonaga A, Shindo M, Kusaka I, Nakamura T, Ishikawa SE, Saito T, Nakamura O, Sato Y., Tanaka H: S(G), S(I), and EGP of exercise-trained middle-aged men estimated by a two-compartment labeled minimal model. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 283(4):E809-E816.
- 23) Toda K, Oshida Y, Tokudome M, Manzai T, Sato Y.: Effects of moderate exercise on metabolic responses and respiratory exchange ratio (RER). *Nagoya J. Medical Sci.* 2002, 65:109-113.
- 24) 佐藤祐造 (編集): 高齢者運動処方ガイドライン、南江堂、東京、2002, pp.1-113.

2. 学会発表

- 1) 紺谷靖英、王作成、汪幼学、佐藤祐造、森 望、山下 均：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2報)、第25回日本基礎老化学会大会、2002年5月、つくば。
- 2) 古山達雄、山下 均、北山和子、森 望：絶食時筋肉における転写因子 FKHR の発現誘導、第25回日本基礎老化学会大会、2002年5月、つくば。
- 3) Yamashita, H., Kontani, Y., Wang, Z., Wang, Y., Sato, Y., and Mori, N. Loss of UCP1 function increases susceptibility to obesity with aging. 2002 CSHL meeting: Molecular Genetics of Aging, Oct. 2002, Cold Spring Harbor.
- 4) 山下 均、王作成、紺谷靖英、汪幼学、古山達雄、佐藤祐造、森 望：温度受容機能の低下による体熱制御の変化とミトコンドリア脱共役蛋白質の役割。第75回日本生化学会大会、2002年10月、京都。
- 5) 津田孝範、堀尾文彦、青木宏光、内田浩二、大澤俊彦：高脂肪投与マウスに対する紫トウモロコシ色素の作用。日本農芸化学会2002年度大会(仙台) 2002.3
- 6) 河合香里、西尾菜穂子、竹森久美子、伊藤浩行、堀尾文彦：アスコルビン酸合成不能高血圧自然発症ラット (SHR-od) のアスコルビン酸代謝に関する解析。日本農芸化学会2002年度大会(仙台) 2002.3
- 7) 木山圭一郎、津田孝範、小田裕昭、伊藤浩行、堀尾文彦：アスコルビン酸欠乏による血中および組織中の cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)濃度の上昇と、その発現変動。日本農芸化学会2002年度大会(仙台) 2002.3
- 8) 堀尾文彦：アスコルビン酸合成不能 ODS ラ

- ットを用いたアスコルビン酸欠乏初期に変動する遺伝子発現の解析。日本ビタミン学会第54回大会(東京)2002.4
- 9) 河合隆博、井尾房代、小林美里、大野民生、西村正彦、堀尾文彦：高脂肪食摂取下における糖尿病原因遺伝子座の染色体マッピング。第56回日本栄養・食糧学会大会(札幌)2002.7
- 10) 津田孝範、堀尾文彦、内田浩二、青木宏光、大澤俊彦：体脂肪蓄積とインスリン抵抗性に対する紫トウモロコシ色素の作用。第56回日本栄養・食糧学会大会(札幌)2002.7
- 11) 井尾房代、河合隆博、小林美里、大野民生、西村正彦、堀尾文彦：SMXA-5 と SM/J マウスを用いた、高脂肪食摂取下における糖尿病遺伝子の染色体マッピング。第17回日本糖尿病動物研究会年次学術集会(八戸)2003.1
- 12) 宇野 智子、徳留 みずほ、押田 芳治、佐藤 祐造：糖尿病患者のインスリン作用に及ぼす漢方薬(牛車腎気丸)の影響。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5
- 13) 酒井 和子、大澤 功、後藤 慎一、押田 芳治、佐藤 祐造：グルコシダーゼ阻害薬の臨床的有用性に関する研究-meta analysis による副反応の評価。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5
- 14) 韓 艶清、押田 芳治、越中 敬一、大澤 功、J. Wahren、佐藤 祐造：C-peptide のインスリン作用に及ぼす影響(第9報)-C-peptide の生活活性部位について-。第45回日本糖尿病学会年次学術集会。東京、2002.5
- 15) 越中 敬一、押田 芳治、長崎 大、韓 艶清、大澤 功、佐藤 祐造：高脂肪食誘発インスリン抵抗性モデルにおける AMPK 系障害の有無。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5

16)福 典之、押田 芳治、武安 岳史、郭 麗君、広瀬 信義、新井 康通、佐藤 祐造、田中 雅嗣：青年肥満者におけるミトコンドリア cytochrome b 遺伝子の SNPs の解析。第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5

17)長崎 大、下村 吉治、中井 直也、徐 明、佐藤 祐造：運動による骨格筋糖輸送能および GLUT-4 蛋白質量に及ぼす運動トレーニング経験の影響。第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5

18)郭 麗君、押田 芳治、福 典之、武安 岳史、山之内 国男、広瀬 信義、新井 康通、佐藤 祐造、田中 雅嗣：糖尿病患者におけるミトコンドリア cytochrome b 遺伝子の SNPs の解析-百寿者との比較-。第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5

19)押田 芳治、長崎 大、佐藤 祐造：ワークショップ「運動療法の生理生化学」身体トレーニングとインスリン抵抗性：分子生物学的検討。第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2002.5

20)徳留 みずほ、長崎 大、島岡 清、佐藤 祐造：高齢者におけるレジスタンス運動の脂質代謝に及ぼす影響。第 44 回日本老年医学会学術集会、東京、2002.6

21)佐藤 祐造：教育講演 健康日本 21 世紀と運動指標-急増する高齢者をどのようにしたら良いか-。第 56 回日本栄養・食糧学会大会、札幌、2002.7

22)佐藤 祐造：シンポジウム V「高齢者の健康づくりと運動」高齢者糖尿病の運動療法。第 10 回日本運動生理学会大会、つくば、2002.7

23)G. Baggio, Y. Shimomura, T.Murakami and Y.Sato : low activity of muscle pyruvate dehydrogenase(PDH)

complex is related with the development of diabetes in the obese-type II diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. 9th International Congress on Obesity. Sao Paulo, Brazil, 2002.8

24)Y.Sato, T.Kondo, T.Kawamura and A.Ando : Frequency of obesity and its relation to hypertension in University students in Japan. 9th International Congress on Obesity, Sao Paulo, Brazil, 2002.8

25)G.Bajotto, 下村 吉治、長崎 大、村上 太郎、佐藤 祐造 : Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラット骨格筋のピルビン酸脱水素酵素複合体 (pyruvate dehydrogenase complex: PDC)活性がインスリン抵抗性に及ぼす影響。第 57 回日本体力医学会大会、高知、2002.9

26)越中 敬一、押田 芳治、長崎 大、韓 艶清、佐藤 祐造 : インスリンと AICAR 刺激による骨格筋グルコース取り込みに関する研究-高脂肪食誘発インスリン抵抗性モデルでの検討-。第 57 回日本体力医学会大会、高知、2002.9

27)佐藤 祐造 : 会長講演「糖尿病運動療法の今日的課題」。第 13 回日本臨床スポーツ医学会学術集会、名古屋、2002.11

G. 知的所有権の取得状況

なし

熱産生蛋白質欠損マウスを用いた老化過程における熱産生機能低下のメカニズムの解明

主任研究者 山下 均 国立療養所中部病院長寿医療研究センター

分子遺伝学研究部 分子生物学研究室 室長

研究要旨 熱産生蛋白質であるミトコンドリア脱共役蛋白質I型欠損（UCP1-KO）マウスの表現型の加齢変化について解析を進めた結果、正常マウスに比べてKOマウスは加齢および高脂肪食摂取により肥満になることが明らかになった。組織学的解析から、KOマウスの肥満はヒトでは25才前後に相当する5～6ヶ月齢から顕在化し、褐色脂肪組織の肥大と脂肪肝を伴うことが明らかとなった。また、肥満が明らかとなる月齢は骨格筋の発達がほぼ終了する時期と良く一致していた。分子生物学的解析から、KOマウスの褐色脂肪組織におけるUCP2、aP2、PPAR γ などの遺伝子発現レベルの上昇が明らかとなった。UCP2やaP2はPPAR γ による転写調節を受けるターゲット遺伝子であることから、UCP1欠損を代償する為に褐色脂肪組織の分化・増大とエネルギー代謝を亢進するためのシグナルの増強が示唆された。しかし、加齢や高脂肪ストレスに対するこれらの遺伝子の代償的発現調節には限界があり、肥満が進展するものと考えられた。

A. 研究目的

老化によるエネルギー代謝及び熱産生機能の低下は、肥満や耐寒性の低下と関連し、中高年者の健康にとって重大な問題である。熱産生蛋白質として知られるミトコンドリア脱共役蛋白質(Uncoupling protein, UCP)は、熱産生を介してエネルギーを消費し、エネルギー代謝に深く関わる。また、細胞内の活性酸素レベルの調節にも関連することが示唆されている。しかし、褐色脂肪組織のみに存在するUCP1の役割は、げっ歯類に比べてヒトでは極めて小さくUCP1に依存しない機構の重要性が示唆される。一方、最近新たにUCP1のホモログとして発見されたUCP2とUCP3は、ヒト成人でも白色脂肪組織や骨格筋などで発現が認められている。本研究は、UCP1

欠損（UCP1-KO）マウスを用いて老化過程における熱産生機能及びエネルギー代謝の低下のメカニズムを明らかにすると共に、UCP1欠損型肥満の予防法、治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

(1) UCP1 欠損（UCP1-KO）マウスの表現型の加齢変化の解析

動物個体の表現型は、その個体の遺伝的背景と環境要因により大きく影響を受ける。特に加齢の効果を検討する場合、飼育環境の均質化とコンジェニックな実験動物の利用が重要である。我々は、コンジェニックなUCP1-KOマウス（C57BL/6J background）を作製し、本研究に使用した。Wild type マウスとUCP1-

KO マウス (N12~N14) は生後 3 ヶ月間標準食で飼育した。次に各マウスを 2 群に分け、それぞれ標準食 (CE-2, 日本クレア) 又は高脂肪食 (CE-2+粉末牛脂 20%) で飼育を開始し、1 ヶ月毎に血糖量、食餌摂取量、体重の測定を行った。また、3 ヶ月毎に血液サンプルを用いてインスリン、レプチン、遊離脂肪酸、コレステロールなどを測定した。標準食群の耐糖能を 3, 6, 12, 18, 24 ヶ月齢で測定した。耐糖能は、15 時間絶食後 1.5 g/kg 体重のグルコースを腹腔に投与し、0, 30, 60, 120 分後に血糖値を測定した。さらに、種々の月齢のマウスの組織サンプリングを行い、Total RNA と蛋白質分画を調製して UCP 遺伝子発現などの検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、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験を行った。

C. 研究結果

昨年度に引続き、UCP1-KO マウスの表現型の加齢変化と寿命解析を行った。結果としては、KO マウスは加齢および高脂肪食摂取により肥満になり易いことが確認された。特に、KO マウスと野生型マウスの体重増加の違いは、5~6 ヶ月齢くらいから明らかとなった。体重増加とエネルギー消費のデータから、摂取エネルギー当たりの体重増加は、雄マウスでは両群間に差はなかったが、雌マウスでは KO マウスが有意に高く、太り易いことが明らかとなった。雌 KO マウスでは、血中インスリンおよびレプチンレベルの上昇がみられインスリン抵抗性、レプチン耐性の進行も示唆された。継続的に高脂肪食を摂取したマ

ウスの体重は、12~15 ヶ月齢でピークとなり、その後急激に体重減少する個体が認められた。一方、普通食飼育群を用いた解析から、野生型マウスに比べて KO マウスでは加齢に伴う耐糖能の低下がみられたが、平均寿命に差は認められなかった。高脂肪食を摂取した KO マウスでは、肥満度の上昇に加えて褐色脂肪組織の著しい肥大がみられ、遺伝子発現の解析から UCP2、αP2、PPAR γ などの発現レベルの上昇が明らかとなった。

D. 考察

UCP1-KO マウスは加齢や高脂肪食摂取といったエネルギーバランスの変化にうまく適応できず肥満になり易いことが明らかとなった。KO マウスの肥満は、ヒトでは 25 才前後の青年期に相当する 5~6 ヶ月齢くらいから明らかになってくるが、このことはヒトでみられる加齢と肥満の増加とよく一致する。この原因は明らかではないが、マウスでは骨格筋 (腓腹筋) 量の増加が 5~6 ヶ月齢でプラトーに達し、体重当たりの筋量はその後加齢と共に低下していくことから、骨格筋を含めた相対的な基礎代謝量の減少が肥満の進展と関連している可能性が考えられる。加えて、若齢期にみられた UCP2 や UCP3 の代償作用の低下が肥満の進展を助長していると思われる。一方、脂肪含量の低い食餌を摂取する限り KO マウスは野生型マウスとほぼ同様に生きることができ寿命に差がないことは、UCP1 をほとんど持たない我々ヒトにおいて改めて食生活の重要性を教える結果となった。以上のように、UCP1-KO マウスの肥満はヒトにおける肥満発症パターンに極めて良く似ており、従来にない肥満モデルとしてその予防薬や治療薬の開発、評価に有用と考えられる。

E. 結論

UCP1-KO マウスはヒトの肥満モデルとして有用であり、肥満の予防は寿命の短縮を抑制する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kontani, Y., Wang, Z., Furuyama, T., Sato, Y., Mori, N., and Yamashita, H. (2002) Effects of aging and denervation on the expression of uncoupling proteins in slow- and fast-twitch muscles of rats. *J. Biochem.*, 132: 309-315.

2) Furuyama T., Yamashita, H., Kitayama, K., Higami, Y., Shimokawa, I., and Mori, N. (2002) 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.*, 59: 331-334.

3) 山下 均, 紺谷靖英, 王作成, 汪幼学, 佐藤祐造, 森 望 (2002) 加齢にともなう肥満の進展と UCP1 の役割. *肥満研究* 8:131-135.

2. 学会発表

1) 紺谷靖英, 王作成, 汪幼学, 佐藤祐造, 森 望, 山下 均: 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 2 報), 第 25 回日本基礎老化学会大会, 2002 年 5 月, つくば.

2) 古山達雄, 山下 均, 北山和子, 森 望: 絶食時筋肉における転写因子 FKHR の発現誘導, 第 25 回日本基礎老化学会大会, 2002 年 5 月, つくば.

3) Yamashita, H., Kontani, Y., Wang, Z., Wang, Y., Sato, Y., and Mori, N. Loss of UCP1 function increases susceptibility to obesity with aging. 2002

CSHL meeting: Molecular Genetics of Aging, Oct. 2002, Cold Spring Harbor.

4) 山下 均, 王作成, 紺谷靖英, 汪幼学, 古山達雄, 佐藤祐造, 森 望: 温度受容機能の低下による体熱制御の変化とミトコンドリア脱共役蛋白質の役割. 第 75 回日本生化学会大会, 2002 年 10 月, 京都.

G. 知的所有権の取得状況

なし

熱産生に対する栄養条件の影響に関する分子遺伝学的解析

分担研究者 堀尾 文彦 名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授
応用分子生命科学専攻バイオモデリング講座

研究要旨 (1) SMXA-5 系統は、2カ月齢前後から全個体が軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症、脂肪肝を呈する新規な2型糖尿病モデルマウスである。これらの肥満、糖尿病形質は、高脂肪食を摂取することによって著明に増強される。SMXA-5 の肥満、糖尿病形質の発症機構を考える上で UCP 発現に着目して検討したところ、骨格筋の UCP3 mRNA レベルと肝臓の UCP2 mRNA レベルが低く、このことは両組織での転写因子である PPAR α の発現量が低いことに起因する可能性を得た。そして、SMXA-5 の骨格筋、肝臓では中性脂肪の蓄積が見られ、インスリン作用の低下の原因であることが推測された。

(2) 高脂肪食摂取によって糖尿病を発症しやすい SMXA-5 系統と、発症しにくい SM/J 系統とを交配して、F2 インタークロスマウス 254 匹を得た。これらの F2 マウスに高脂肪食 (30%ラード含有) を与えて、耐糖能、血糖値、血中インスリン濃度などを測定した。これらの形質値と、各 F2 マウスの genotyping の結果を用いて Quantitative Traits Loci (QTL) 解析を行ったところ、2番染色体(Chr.2)に耐糖能を強力に支配する QTL が検出された。

A. 研究目的

SMXA-5 系統は、SM/J と A/J マウスより作出されたリコンビナント・インブリード (RI) 系統の1系統である。SMXA-RI 系統の各系統は近交系であり、各系統の広範な染色体部位について、それらが SM/J 由来であるのか、A/J 由来であるのかが詳細に調べられている。我々は SMXA-5 が、軽度の肥満と糖尿病を発現する新規な2型糖尿病モデルであることを見いだした。このマウスの肥満・糖尿病形質の発症機構を明らかにするために、脱共役タンパク質 (UCP) に着目して特性解析をすることを本研究の目的とした。

さらに、この SMXA-5 の肥満および糖尿病形質は複数の原因遺伝子によって支配されていると考えられるが、この原因遺伝子の染色体マッピングをすることも本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1) 新規な肥満・糖尿病モデルマウスとしての SMXA-5 系統の、熱産生に着目した特性解析。

5週齢の雄の SMXA-5 に、高炭水化物食を与える群と高脂肪食を与える群とをもうけて、20週齢時にマウスを屠殺し解析した。対照

系統として、SM/J および A/J 系統を用い、同様の飼料群をもうけた。骨格筋（ヒ復筋）、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓の UCP の発現を mRNA レベルで解析した。また、各組織の PPAR α あるいは PPAR γ の mRNA レベルを測定した。骨格筋と肝臓の中性脂肪（トリグリセリド）濃度も測定した。

（2）高脂肪食摂取下における糖尿病原因遺伝子の染色体マッピング

高脂肪食摂取によって糖尿病を誘発しやすい系統である SMXA-5 系統の雄と、発症しにくい系統である SM/J 系統の雌とを交配して F1 マウスを得た。この F1 マウス同士を交配して、F2 マウスの雄 254 匹を作出した。この F2 マウスに 6 週齢から高脂肪食（30%ラード、20%カゼイン含有）を 6 週間与えて、前実験と同様の糖尿病形質の解析を行った。各個体についてゲノム DNA を調整し、約 60 種類のマイクロサテライトマーカーを用いて全ゲノムタイピング(genotyping)を行った。糖尿病形質値と genotyping との結果を用いて、QTL 解析を進めた。

（倫理面への配慮）

動物実験は、名古屋大学実験動物委員会の承認を得、動物利用倫理規定に従って実施した。

C. 研究結果

（1）新規な肥満・糖尿病モデルマウスとしての SMXA-5 系統の、熱産生に着目した特性解析

SMXA-5 系統は、高炭水化物食を摂取した場合には 2 カ月齢前後から全個体が軽度の肥満、耐糖能異常、高インスリン血症を呈した。また、高脂肪食（30%ラード含有）を摂取させると、さらに若齢期からより顕著な肥満・糖尿病症状を発症した。対照系統である SM/J、

A/J では、高脂肪食の摂取時においても、糖尿病は発症しなかった。SMXA-5 では、インスリン作用不全（インスリン抵抗性）、インスリン分泌不全の両方が観察された。各組織の UCP mRNA レベルを測定した結果、骨格筋の UCP3、肝臓の UCP2 mRNA レベルが SM/J および A/J に比べて有意に低いことが明らかとなった。褐色脂肪組織の UCP1 mRNA レベル、および白色脂肪組織の UCP2 mRNA レベルは対照系統に比べて違いはなかった。骨格筋の UCP3 および肝臓の UCP2 は転写因子である PPAR α によって正に発現制御されているが、SMXA-5 では両組織において PPAR α の mRNA レベルが対照系統に比べて有意に低いことが判明した。骨格筋および肝臓のトリグリセリド濃度は、SMXA-5 では対照系統に比べて有意な高値であった。

（2）高脂肪食摂取下における糖尿病原因遺伝子の染色体マッピング

QTL 解析の結果、耐糖能試験 120 分値を規定する有意な QTL を Chr.2 に検出した。この QTL の LOD score は 12.5 と高いものであった。この QTL 領域は、絶食時および非絶食時血糖値、肥満度、体重も有意に規定した。他の染色体に耐糖能 120 分値を規定する有意な QTL は検出されなかった。この QTL は A/J 由来のものが耐糖能を悪化させ、血糖値を上昇させた。

D. 考察

（1）UCP は数種の subtype の発見とともに、様々な動物種において共通したエネルギー代謝の鍵タンパク質としての生理的意義が注目されている。本結果より、SMXA-5 は骨格筋の UCP3 と肝臓の UCP2 の発現が低いことが示唆された。今後、UCP タンパク質レベルの

測定が必要であるが、これらの UCP の低レベルが、骨格筋および肝臓のトリグリセリド濃度が高いことの原因ではないかと推測している。骨格筋と肝臓のトリグリセリド濃度の上昇は、これらの臓器のインスリン作用を低下させることが近年明らかにされており、SMXA-5 のインスリン抵抗性の発症メカニズムの一つではないかと考えている。SMXA-5 は、インスリン抵抗性に加えてインスリン分泌も不全なモデルである。しかし、インスリン抵抗性の発現は若齢期から見られ、このマウスの糖尿病形質の主要因と考えられる。

(2) SMXA-5 と SM/J を用いた交配系の結果より、高脂肪食摂取下での強力な糖尿病原因遺伝子座をマッピングできた。今回検出した Chr.2 領域の A/J 由来のものを SM/J マウスに導入したコンジェニックマウスを作成中である。このマウスを用いて、Chr.2 領域に催糖尿病効果があるかを検証していく。また、この領域をさらに細かく分断した断片を有するサブコンジェニックマウスを作出して、糖尿病原因遺伝子の詳細な位置を確定してその同定を目指す。

E. 結論

SMXA-5 系統マウスは、若齢期から軽度の肥満、著明な耐糖能異常を発症する新規の 2 型糖尿病モデルであることが示された。このモデルは、骨格筋の UCP3、および肝臓の UCP2 の発現レベルが低く、それらは転写因子である PPAR α の発現量が低いことに起因する可能性を得た。SMXA-5 では、骨格筋と肝臓でのトリグリセリドの蓄積が観察され、このマウスのインスリン抵抗性を引き起こしていることが考えられる。上記の UCPs の低発現が各組織のトリグリセリドの蓄積に寄与している

だろう。

SMXA-5 の糖尿病原因遺伝子を同定する目的で、SM/J との交配より得た F2 マウス 254 匹を用いて QTL 解析を行ったところ、高い LOD score (10 以上) を有する耐糖能、血糖値、肥満度、体重を同時に規定する遺伝子座を検出できた。今後、この遺伝子の同定を目指して、コンジェニック系統を用いた解析を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueno, Y., Horio, F., Uchida, K., Naito, M., Nomura, H., Kato, Y., Tsuda, T., Toyokuni, S. and Osawa, T.: Increase in oxidative stress in kidneys of diabetic Akita mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 869-872 (2002)
- 2) Tsuda, T., Horio, F., Kato, Y. and Osawa, T.: Cyanidin 3-O- β -D-glucoside attenuates the hepatic Ischemia-reperfusion injury through a decrease in the neutrophil chemoattractant production in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 134-141 (2002)
- 3) Minakata, K., Suzuki, O., Saito, S., Kawai, K. and Horio, F.: Effects of paraquat on essential antioxidant elements in osteogenic disorder Shionogi rat. *J. Toxicol. Environ. Health*, 65, 143-147 (2002)
- 4) Minakata, K., Kawai, K., Horio, F., Nozawa, H., Watanabe-Suzuki, K. and Suzuki, O.: Diquat markedly changes iron and copper concentrations in tissues and plasma of ODS rats. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, 20, 277-283 (2002)
- 5) Yu, W., Niwa, T., Miura, Y., Horio, F., Teradaira, S., Ribar, T.J., Means, A.R., Hasegawa, Y., Senda, T. and Niki, I.: Calmodulin overexpression causes Ca²⁺-dependent apoptosis of pancreatic β cells, which can be prevented by inhibition of nitric oxide

synthase. *Lab. Invest.*, 82,1229-1239 (2002)

6) Tsuda, T., Horio, F. and Osawa, T.: Cyanidin 3-O- β -D-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48,305-310 (2002)

7) Anunciado, R.V.P., Nishimura, M., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Ohno, T. and Namikawa, T.: Quantitative trait locus analysis of serum insulin, triglyceride, total cholesterol and phospholipid levels in the (SM/JxA/J)F2 mice. *Exp. Anim.* 52,37-42 (2003)

8) Kobayashi, M., Ohno, T., Tsuji, A., Nishimura, M. and Horio, F.: Combinations of non-diabetic parental genomes elicit impaired glucose tolerance in mouse SMXA RI strains. *Diabetes*, 52,180-186 (2003)

9) Kawai, K., Ito, H., Kubota, H., Takemori, K., Makino, S. and Horio, F.: Changes in catecholamine metabolism by ascorbic acid deficiency in spontaneously hypertensive rats unable to synthesize ascorbic acid. *Life Sci.*, 72,1717-1732 (2003)

2. 学会発表

1) 津田孝範、堀尾文彦、青木宏光、内田浩二、大澤俊彦: 高脂肪投与マウスに対する紫トウモロコシ色素の作用。日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台) 2002.3

2) 河合香里、西尾菜穂子、竹森久美子、伊藤浩行、堀尾文彦: アスコルビン酸合成不能高血圧自然発症ラット (SHR-od) のアスコルビン酸代謝に関する解析。日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台) 2002.3

3) 木山圭一郎、津田孝範、小田裕昭、伊藤浩行、堀尾文彦: アスコルビン酸欠乏による血中および組織中の cytokine-induced

neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) 濃度の上昇と、その発現変動。日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台) 2002.3

4) 堀尾文彦: アスコルビン酸合成不能 ODS ラットを用いたアスコルビン酸欠乏初期に変動する遺伝子発現の解析。日本ビタミン学会第 54 回大会 (東京) 2002.4

5) 河合隆博、井尾房代、小林美里、大野民生、西村正彦、堀尾文彦: 高脂肪食摂取下における糖尿病原因遺伝子座の染色体マッピング。第 56 回日本栄養・食糧学会大会 (札幌) 2002.7

6) 津田孝範、堀尾文彦、内田浩二、青木宏光、大澤俊彦: 体脂肪蓄積とインスリン抵抗性に対する紫トウモロコシ色素の作用。第 56 回日本栄養・食糧学会大会 (札幌) 2002.7

7) 井尾房代、河合隆博、小林美里、大野民生、西村正彦、堀尾文彦: SMXA-5 と SM/J マウスを用いた、高脂肪食摂取下における糖尿病遺伝子の染色体マッピング。第 17 回日本糖尿病動物研究会年次学術集会 (八戸) 2003.1

G. 知的所有権の取得状況

なし

免疫系細胞における熱産生誘導機構と細胞老化に関する研究

分担研究者 西尾 康二 名古屋大学大学院医学研究科 助手
機能形態学講座

研究要旨 ATPase などの ATP Binding Cassette ファミリー分子には ATP 結合部位として Walker モチーフが存在する。このモチーフの変異は多くの場合、各分子の活性制御に影響することが示されている。我々は、UCP 2 がこのモチーフに類似のアミノ酸配列を有することを見出した。そこで本年度は、この UCP 2 の Walker モチーフに変異を導入し、その膜ポテンシャルへの影響を調べた。また Walker モチーフの変異型 UCP 2 蛋白の恒常発現細胞を作成し、そのミトコンドリア膜ポテンシャル、細胞形態の変化、並びに細胞死を観察した。野生型並びに変異型 UCP 2 遺伝子の C 末側に GFP 遺伝子を結合させた発現ベクターを構築した。これを Cos 7 細胞に一過性に発現させた場合、野生型 UCP 2-GFP の発現によりミトコンドリア膜ポテンシャルの低下が観察された。しかし Walker モチーフの変異型 UCP 2-GFP を発現させた場合、ミトコンドリア膜ポテンシャルに変化は見られなかった。即ち、Walker モチーフの変異は、UCP 2 の膜ポテンシャル低下の機能を消失させ、このモチーフが UCP 2 の機能の発現に必須であることが強く示唆された。

A. 研究目的

UCP 2 はマクロファージ等の食食細胞の活性酸素制御に働くことが示唆されている。前年度の研究において、実験動物の加齢と UCP 2 蛋白レベルの減少が一致する傾向を見出した。老化した細胞は分裂を停止し、その形態は肥大化することが特徴である。ヒト皮膚線維芽細胞において、老化に伴う細胞骨格蛋白であるピメンチンの増加が細胞形態の肥大化を起こすことが示されている。しかし、その細胞形態変化の上流のメカニズムは依然として不明である。UCP 2 の機能によりミトコンドリアにおける活性酸素産生、並びに ATP 産生も低下することが予想される。本年度は UCP 2 のミトコンドリア膜ポテンシ

アル制御機能と Walker モチーフ (GIRGLWK) の関与、並びに UCP 2 蛋白の恒常的発現による細胞形態や細胞増殖への影響などについて検討した。

B. 研究方法

1. UCP 2 の Walker モチーフへの変異導入とその一過性発現

マウスの野生型 UCP 2 cDNA を EGF P 発現ベクター pEGFP-N1 の上流に挿入し、UCP 2-EGFP 融合蛋白発現ベクターを構築した。この発現ベクターの使用は、EGFP の発現を観察することにより UCP 2 の発現を in situ で観察可能とするものである。得られた野生型 UCP 2-EGFP ベク

ターを鋳型に用いて、Walkerモチーフの変異型UCP2-EGFP発現ベクターをPCR法により作成した。変異型UCP2-EGFPの発現によるミトコンドリア膜ポテンシャルへの影響を調べるため、サル腎臓由来のCos7細胞に野生型UCP2及びWalkerモチーフ変異型UCP2-EGFPをトランスフェクションし、一過性にUCP2-EGFP蛋白を発現させた。トランスフェクションの24時間後、還元型Mitotracker Redを用いてミトコンドリア膜ポテンシャルを可視化し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2. UCP2蛋白の恒常発現細胞の作成

1で作成した野生型及び変異型UCP2-EGFP発現ベクターをCos7細胞にトランスフェクションした。24時間後にG418を用いて薬剤耐性スクリーニングを開始し、UCP2-EGFPの恒常的発現細胞を選択した。その後3週間ほどで、野生型UCP2、Walkerモチーフ変異型UCP2を安定に発現する細胞株を得た。この細胞を還元型Mitotracker Redでラベルし、ミトコンドリア膜ポテンシャルの変化を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。細胞核或いはDNAをDAPI染色し、細胞の生存、細胞壊死や細胞死を判定した。

C. 研究結果

EGFPのみを発現したCos7細胞では、そのミトコンドリア膜ポテンシャルは、コントロールの細胞と同様であった。野生型UCP2-EGFPを発現した細胞では、コントロールに比較してそのミトコンドリア膜ポテンシャルは顕著に低下した細胞が多く観察された。Walkerモチーフにアミノ酸置換変異を導入した変異型(G171L、G1174L、K177E、K177R、G174L/K177E)UCP2-EGFPを一過

性に発現したCos7細胞では、そのミトコンドリア膜ポテンシャルは低下しなかった。即ち、Walkerモチーフへの変異導入がUCP2のミトコンドリア膜ポテンシャル制御機能を失わせることが強く示唆された。

恒常的発現細胞系において、変異型UCP2(K177E、K177R、G174L/K177E)-EGFP発現細胞の増殖は野生型UCP2発現細胞よりも早く、それらの細胞形態はコントロールのCos7細胞と同様に小型であった。選択当初の野生型UCP2発現細胞は、形態は小型でやや増殖した。しかし、選択後2週目ごろから肥大化し突起を多く形成し、不定形な老化細胞様の形態を呈し始めた。その後1ヶ月後には増殖能を失い、死細胞が多く観察された。細胞が死ぬ前には異常に肥大化した形態を示す細胞が多く観察された。これらの細胞の核及びDNAをDAPI染色で観察したところ、DNAは細胞全体に分布し、細胞核の構造は認められなかった。野生型UCP2の恒常的発現系で観察された増殖停止、細胞形態の変化並びに細胞死は、細胞内のATPレベルの急激な低下が原因として推測された。

D. 考察

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)。UCP2タンパクの合成は翻訳調節因子による制御をうけると推測される。従って、Cos7細胞ではUCP2 mRNAの発現が認められるものの、その内在性のUCP2蛋白レベルは非常に低いため、その検出は極めて難しい。この理由により、UCP2の機能解析のモデル細胞としてCos7が適していると考えられた。UCP2の機能を調節する部位の有力候補としてA

T P 結合部位とされる Walker モチーフを想定し、Cos7 細胞を用いてこのモチーフの機能を解析した。Walker モチーフの変異は、UCP2 の機能を失わせることから、ATP 結合部位が UCP2 の機能に必須であることが強く示唆された。実際にミトコンドリアに発現された野生型 UCP2 蛋白の同モチーフが ATP と結合しうるのか興味のある点である。また、野生型 UCP2 の恒常的発現細胞が増殖を停止し、最終的に細胞死に至る原因として、UCP2 による膜ポテンシャルの低下、即ち ATP レベルの急激な減少が考えられた。

細胞老化の観点から、老化細胞は細胞内の ATP レベルが非常に低下していることが容易に想像される。ATP レベルの低下が老化細胞に特徴的な不定形の肥大化形態の発現をもたらすかどうか興味のある点であろう。今後、ATP 産生阻害による老化細胞形態誘導の可能性について検討してみたい。

E. 結論

マウス UCP2 の Walker モチーフへの変異導入は UCP2 の機能を阻害した。ATP 結合部位とされるこのモチーフが UCP2 の機能に必須であることが明らかになった。また UCP2 蛋白の恒常的発現は、細胞増殖停止、細胞死並びに老化様形態を誘導した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Qiao, S., Yamashita, H., and Nishio, K. Translational Regulation of Uncoupling Protein 2 Correlates with Macrophage Cell Differentiation of Mouse Myeloid Leukemia Cells. *J. Biol. Chem.* (submitted)

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

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 老若ラット骨格筋におけるミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP）を含むエネルギー代謝関連分子の遺伝子発現を解析した結果、加齢による速筋の萎縮とUCP3発現量の低下が明らかになった。座骨神経を切除した速筋で同様の変化が認められたが、遅筋では加齢および座骨神経切除の影響は小さかった。一方、我々はUCP3蛋白質のlong formに加えてshort formを世界で初めてin vivoにおいて検出することに成功し、寒冷環境下での遅筋のUCP3蛋白質レベルの減少がlong formでより大きいこと、その結果として速筋のUCP3蛋白質の役割の重要性が高まることを見出した。以上のことから、老化動物では速筋UCP3によるふるえ熱産生機能の低下が耐寒性低下と深く関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

熱産生能は、体温の調節や余剰エネルギーの消費のために必須の重要な生理機能の一つである。この熱産生機能の中で重要な役割を果たすミトコンドリア脱共役蛋白質（UCP）には、5種類のアイソフォームが存在するが、骨格筋には我々ヒトではUCP3が特異的に発現していることが知られている。骨格筋は“ふるえ”熱産生器官であり、基礎代謝の多くの部分を占める。骨格筋の組織量並びにその機能の加齢に伴う低下が、エネルギー消費や熱産生機能の減退と関連すると考えられる。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かった。本研究では、ふるえ熱産生の主要組織である骨格筋で高い発現の認められるUCP3に注目し、その発現誘導に対する座骨神経切除および寒冷刺激の効果について老若ラットを用いて比較検討し、耐寒性や熱産生能の低下との関連を明らかにす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)片足の座骨神経を切除7日後に腓腹筋(White gastrocnemius muscle)とヒラメ筋(Soleus muscle)を採取した(実験1)。また、老若ラットを5℃環境下で24時間飼育した後、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。UCP3のlong formとshort formをコードする組換え蛋白質を大腸菌を用いて調製し、ポジティブコントロールとして用いた。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)

動物実験に関しては、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