学　位　論　文　要　旨

学位論文題名

（和文題名）

脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構

（英文題名）

The mechanism of mitochondrial biogenesis induced by fatty acids in skeletal muscles.

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻　動態生理学講座

学籍番号　1123032302
氏　　名　石澤 里枝

Abstract

An important muscle adaptation to endurance exercise is the ability to increase mitochondrial density and oxidative enzyme activity. Feeding a long-chain fatty acid (LCFA)-based diet was found to induce an increase in mitochondrial biogenesis in muscles by activating the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) family of nuclear transcription factors. Long-chain saturated and fatty acids (C16-C20) are natural PPARs ligands. However, it remains unclear whether mitochondrial biogenesis in skeletal muscle is similarly influenced by medium-chain fatty acids (MCFA) and whether these also bind PPARs. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of MCFA on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle fibers and on coactivator recruitment to PPARα and PPARδ *in vitro*. To examine the effects of dietary MCFA on mitochondria-related protein expression, we measured mitochondrial enzyme activity in rodent skeletal muscle after feeding an MCFA-based high-fat diet for four weeks. The results showed that citrate synthase activity increased in both fast- and slow-twitch muscle fibers of the MCFA-fed rats, without increased fat accumulation. Next, mouse skeletal muscle cells (C2C12 cells) were treated with 50, 100, 500, and 1000 μM of octanoate (MCFA, C8:0), decanoate (MCFA, C10:0), dodecanoate (MCFA, C10:0), or β-hydroxybutyrate (ketone body) for 24 h. After incubation with each solution, voltage-dependent anion channel (VDAC) and Complex IV (COX IV) proteins were measured using western blot. Expression of VDAC and COX IV proteins was significantly higher following treatment with decanoate and β-hydroxybutyrate compared to that in the controls. Thus, it was clear that decanoate from MCFAs and β-hydroxybutyrate from ketone bodies increased mitochondrial protein expression. Furthermore, to examine MCFA and β-hydroxybutyrate binding to PPARα and PPARδ, we measured the interaction of a coactivator peptide and PPARs using a Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) assay *in vitro*. This study demonstrates that LCFAs bind both PPARα and PPARδ. Conversely, MCFAs do not bind PPARs *in vitro*, suggesting that PPAR binding is dependent on carbon chain length. In conclusion, we demonstrate that decanoate and β-hydroxybutyrate enhance mitochondrial biogenesis in skeletal muscle independently of PPARs interaction.

I. 緒言

過去十数年間の研究の発展によって、脂質が単に膜の構成成分として機能するだけでなく、脂質が固有の役割を担っていることが明らかとなっている。生体内において様々な脂質分子が存在しているが、その基本成分や前駆体としての役割を担っているのが脂肪酸である。脂肪酸は炭素鎖長や不飽和度の違いといった構造の多様性に富み、脂肪酸の機能も非常に多彩である。

ミトコンドリアはアデノシン三リン酸（ATP; adenosine triphosphate）の再合成に重要な役割を担っている細胞小器官である。Holloszy and Booth（1976）によって初めて持久性トレーニングは骨格筋の cytochrome c 含量やミトコンドリア関連酵素活性を亢進させることが報告され、運動による骨格筋の重要な適応はミトコンドリアの増殖であるということが示唆された。さらに、Miller et al.（1983）によって、炭素数 14 以上の長鎖脂肪酸（LCFA; long-chain fatty acid）を含む脂質摂取は普通食と比較してラット骨格筋のミトコンドリアを増加させ、持久性運動時間を延長させることが報告された。このように骨格筋ミトコンドリア生合成の適応はトレーニングだけでなく、脂質摂取によっても生じることがいくつかの研究によって支持されている（Hancock et al., 2008; Han et al., 1997; Miller et al., 1983）。脂質摂取による骨格筋のミトコンドリア生合成は、核内受容体 PPARs（peroxisome proliferator-activated receptors）に対する LCFA の共有結合によって誘発される（Xu et al., 1999）。Xu et al.（1999）によって、多価不飽和脂肪酸（PUFA; polyunsaturated fatty acid）は飽和脂肪酸（SFA; saturated fatty acid）よりも PPARs に対してリガンド活性が高いことが報告されている。

しかしながら、長期間にわたる LCFA の摂取は体脂肪を蓄積させ、インスリン抵抗性を引き起こすという問題点を有する（Han et al., 1997）。一方で、LCFA よりも炭素数の少ない MCFA（炭素数 8〜12 個）は体脂肪を蓄積させない特性を有する（Bach and Babayan, 1982）。MCFA が体脂肪を蓄積させない理由として、LCFA と異なる消化吸収および代謝経路を経ることが挙げられる（Bach and Babayan, 1982）。MCFA は LCFA よりも分子量が小さいため、小腸上皮細胞に容易に吸収され、遊離脂肪酸（FFA; free fatty acid）として門脈を経て肝臓へ運ばれて、肝臓や骨格筋において速やかにエネルギー源として利用される。このように MCFA も骨格筋へ取り込まれることから、LCFA や不飽和 LCFA と同様にシグナル分子として骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させる可能性が考えられる。しかしながら、MCFA による骨格筋のミトコンドリア生合成に対する作用については明らかとなっていない。さらに、MCFA による転写関連因子に対する作用はこれまでほとんど報告されておらず、PPARs に対する MCFA の結合の有無に関しても明らかとなっていない。

そこで、本研究では MCFA が LCFA と同様に、骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させ、その機序に PPARs が関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、

MCFA による骨格筋のミトコンドリアの変化を組織および細胞レベルで検証し、さらに PPARs に対する MCFA の結合の有無を検証した。

II. 研究課題

本研究では上述の目的を達成するために、以下の研究課題を設定した。

【研究課題 1】MCFA 脂質食によるラット骨格筋ミトコンドリア関連酵素の増加（実験 I）

MCFA も LCFA と同様に骨格筋に取り込まれる脂肪酸でありながら、これまで骨格筋ミトコンドリアに対する MCFA の機能についてはほとんど研究されてきていない。そこで本実験 I では、4 週間にわたる MCFA 脂質食を摂取したときのラット骨格筋のミトコンドリア酸化関連酵素活性の変化を検証した。

【研究課題 2】MCFA による骨格筋細胞ミトコンドリア関連タンパク質の変化（実験Ⅱ）

実験 I では MCFA 脂質食摂取による骨格筋ミトコンドリアの変化を検証したものの、MCFA が骨格筋細胞のミトコンドリアタンパク質を増加させる基質として作用しているのかについては不明である。そこで、実験 II では骨格筋培養細胞を用いて、3 種類の MCFA（オクタン酸 C8:0、デカン酸 C10:0 およびドデカン酸 C12:0）のうちどの MCFA が骨格筋細胞のミトコンドリアを増加させる基質として作用しているのかについて検証した。さらに、MCFA の中間代謝産物であるケトン体は骨格筋細胞のミトコンドリアを増加させる基質として作用しているのかについても検証した。

【研究課題 3】PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合評価（実験Ⅲ）

実験Ⅰ、Ⅱでは MCFA とケトン体による骨格筋ミトコンドリアの増加を検証した。しかしながら、これら基質によるミトコンドリアの増加機序については不明であり、MCFA とケトン体が PPARs に対して結合するのかについては明らかとなっていない。そこで実験Ⅲでは PPARs に対する MCFA および β-ヒドロキシ酪酸の結合の有無について検証した。

III. 方法および結果

【実験 I】MCFA 脂質食によるラット骨格筋ミトコンドリア関連酵素の増加

実験では MCFA を約 90%含む MCFA 食を 4 週間 にわたり摂取させて、ヒラメ筋、上腕三頭筋および腓腹筋深層部・表層部におけるミトコンドリア関連酵素活性および脂肪酸結合タンパク質を検出した。さらに 4 週間の介入後、副睾丸脂肪重量、血中レプチンおよびアディポネクチンの検出を行った。その結果、MCFA 脂質食によってヒラメ筋、上腕三頭

筋、腓腹筋深層部および腓腹筋表層部における CS（citrate synthase）活性が亢進した。さらに、腓腹筋表層部において MCFA 脂質食の CS 活性は、LCFA 脂質食と比較して増加する傾向を示した（Figure I）。また、3-HAD（3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase）活性の亢進は MCFA 脂質食においてみられた。これらの結果は、MCFA 脂質食によって遅筋線維および速筋線維双方においてミトコンドリア生合成を誘発することを示唆している。

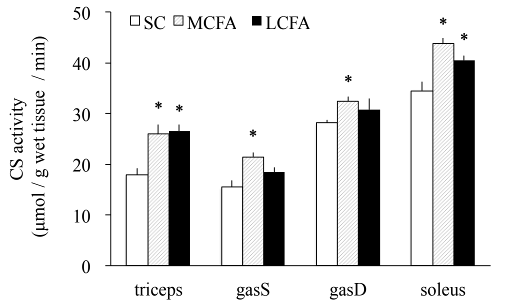

Figure I. Citrate synthase (CS) activity in skeletal muscles of rats fed with the SC (□), MCFA-rich (▨) and LCFA-rich (■) diets. Data represent mean ± SE (n = 5-7). *: $p < 0.05$ vs. SC group. gasD, deep portion of gastrocnemius; gasS, surface portion of gastrocnemius; MCFA, medium-chain fatty acid; LCFA, long-chain fatty acid; SC, standard chow.

【実験 II】MCFA による骨格筋細胞ミトコンドリア関連タンパク質の変化

実験 II では、3 種類の MCFA と、MCFA の中間代謝産物であるケトン体のうちどの基質が骨格筋細胞のミトコンドリア関連タンパク質を増加させるのかについて検証した。マウス骨格筋培養細胞（C2C12 細胞）に 50、250、500、1000 μM のオクタン酸、デカン酸、ドデカン酸および β-ヒドロキシ酪酸をそれぞれ 24 時間添加し、コントロールには 2% BSA のみを添加した。添加後、Western blot 法を用いて筋細胞内の COX-IV（complex-lV）、VDAC（voltage-dependent anion channels）および UCP3（uncoupling protein3）の各タンパク質を検出した。その結果、デカン酸（Figure II）および β-ヒドロキシ酪酸が骨格筋細胞の COX-IV、VDAC タンパク質含量を増加させた。これらの結果はデカン酸および β-ヒドロキシ酪酸は骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発することを示唆している。

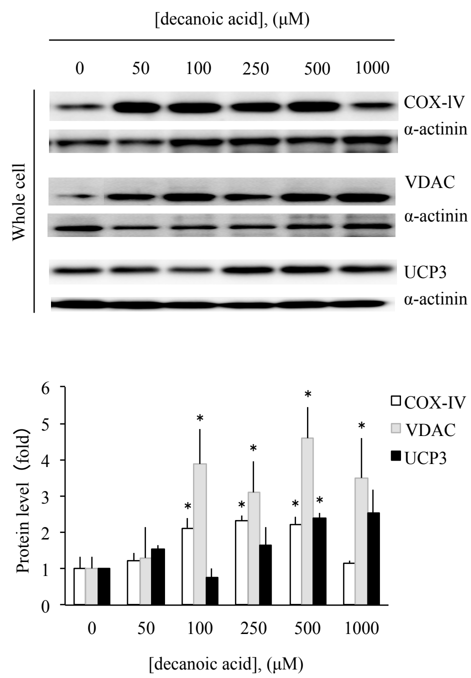

Figure II. COX-IV, VDAC and UCP3 proteins of C2C12 cell treated with decanoic acid. Data represent mean ± SD (n = 6). *: $p < 0.05$ vs. 0 μM. COX-lV, complex-lV; UCP3, uncoupling protein3; VDAC, voltage-dependent anion channels.

【実験 III】PPARs に対する MCFA およびケトン体の結合評価

これまでの結果から我々はデカン酸および β-ヒドロキシ酪酸が筋細胞内のミトコンドリア生合成を誘発させることを示唆したが、その分子機構は明らかではない。そこで実験 III では、デカン酸および β-ヒドロキシ酪酸が PPARα および PPARδ へ結合することによって、コアクチベーターが PPARs に動員されるか否かについて検証した。各脂肪酸および β-ヒド

ロキシ酪酸を用いて Lantha Screen TR-FRET PPARs Coactivator Assay を行った。0.5 nM GST-PPAR LBD、0.5 nM Fluorescein をサンプル溶液中に加えた。さらに 0.5 nM Terbium-GST 抗体、0.5 nM PPAR Coactivotor を加えて、1 時間インキュベートした。その後、発光波長 495 nm および 520 nm における蛍光強度を測定した。その結果、MCFAs のうちオクタン酸のみが PPARα に対するコアクチベーターの動員を促すことを示したが、オクタン酸の PPARα における EC50 値は 5.6 mM であり、γリノレン酸（EC50: 4.1 μM）と比較すると非常に高い値を示した。さらに骨格筋細胞においてオクタン酸を添加したところ、PPARα および PPARδ タンパク質を変化させなかった。また、デカン酸や β-ヒドロキシ酪酸において PPARα および PPARδ に対する蛍光強度比の増加は示されなかった。これらの結果は、本実験の仮説に反して MCFA およびケトン体は PPARs に対して結合しないことを示唆している。

Ⅳ. 結論

本研究では MCFA による骨格筋ミトコンドリア生合成の作用を検証した。その結果、LCFA 脂質食と同様に MCFA 脂質食によっても骨格筋ミトコンドリア生合成が誘発され、さらにミトコンドリア生合成を促す基質としてデカン酸と β-ヒドロキシ酪酸が同定された。また、LCFA とは異なり、これらの基質による骨格筋ミトコンドリア生合成に PPARs は関与しないことを示唆した。したがって、MCFA は LCFA と同様に遺伝子発現を制御するシグナル分子として作用することを示唆している。さらにミトコンドリア遺伝子発現の様相は同一でも脂肪酸鎖長の違いによって遺伝子発現のシグナル経路に違いがもたらされることが考えられた。本研究の結果からは、どのような機序でデカン酸や β-ヒドロキシ酪酸が骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発させているのか明らかにすることはできなかった。今後は、デカン酸や β-ヒドロキシ酪酸によるミトコンドリア増加機序に対して、PPARs 以外の他の転写因子との相互作用を検討する必要がある。

Ⅴ. 参考文献

Bach, A. C. and Babayan, V. K. (1982) Medium-chain triglycerides: an update. Am. J. Clin. Nutr. 36: 950-962.

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.

Hancock, C. R., Han, D. H., Chen, M., Terada, S., Yasuda, T., Wright, D. C. and Holloszy, J. O. (2008) High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 7815-7820.

Han, D. H., Hansen, P. A., Host, H. H., and Holloszy, J. O. (1997) Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. Diabetes 46: 1761-1767.

Holloszy, J. O. and Booth, F. W. (1976) Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. Annu. Rev. Physiol. 38: 273-291.

Miller, W. C., Bryce, G. R. and Conlee, R. K. (1983) Adaptations to a high fat diet which increase exercise endurance in male rats. J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol. 26: 78-83.

Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J. and Milburn, M. V. (1999) Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. Mol. Cell 3: 397-403.

平成 27 年 1 月 27 日

学位論文審査報告書（甲）

1．学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構

2．論文提出者　(1) 所　　属　生命科学 専攻

(2) 氏(ふり)　　名(がな)　石澤(いしざわ)　里枝(りえ)

3．審査結果の要旨（600～650 字）

本論文では中鎖脂肪酸によるミトコンドリア生合成機構を明らかにするために、中鎖脂肪酸による骨格筋ミトコンドリアの変化および中鎖脂肪酸と核内受容体 PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) との親和性について検証した。先ず中鎖脂肪酸摂取によってラット骨格筋のミトコンドリア生合成の亢進を確認した。マウス由来筋芽細胞（C2C12）を用いた実験では中鎖脂肪酸の中でも特にデカン酸と中鎖脂肪酸の代謝産物であるβ-ヒドロキシ酪酸（β-OHB）がミトコンドリア生合成を亢進させていた。続いて、TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) 法による PPARs と基質（脂肪酸）との親和性評価から、デカン酸およびβ-OHB と PPARs との相互作用は極めて低いことが示唆された。長鎖脂肪酸と PPARs の結合や長鎖脂肪酸添加によるミトコンドリア生合成の亢進についてはコンセンサスのある結果が得られていることから、デカン酸とβ-OHB は PPARs 非依存的に骨格筋ミトコンドリア生合成を亢進させることを示唆した。本論文では、中鎖脂肪酸による骨格筋ミトコンドリアの遺伝子発現機序を特定するには至らなかったものの、特定の中鎖脂肪酸がミトコンドリア生合成を亢進させることと、脂肪酸鎖長の違いによって遺伝子発現機序が異なることを示唆した。これらの成果を受けて、審査委員会は本論文が博士 (学術) に値すると判定した。(648 文字)

4．審査結果　(1) 判　　定（いずれかに○印）$\boxed{\text{合　格}}$・　不合格

(2) 授与学位　博　士（ 学術 ）