

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800021

研究課題名（和文）乳酸がミトコンドリア増殖のシグナルとなる可能性の検討

研究課題名（英文）Potential role of lactate in exercise-induced mitochondrial biogenesis

研究代表者

星野 太佑（HOSHINO DAISUKE）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：70612117

研究成果の概要（和文）：本研究では、乳酸が運動による骨格筋ミトコンドリア増殖のシグナル因子となるのか明らかにすることを目的とし、研究を行った。まず、マウスへの運動前のジクロロ酢酸摂取が、運動中の体内の乳酸濃度を低下させることを確認した。その DCA 摂取を用いて、マウスに乳酸濃度の低い運動を継続して行うトレーニングを4週間行わせた結果、同じ強度でも乳酸濃度の低い運動トレーニングを行った群では、通常トレーニングによって引き起こされるミトコンドリアの増加が抑制されることが明らかとなった。このことは、乳酸がミトコンドリア増殖のシグナル因子になりうる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

We examined whether lactate accumulation associate with exercise-induced mitochondrial biogenesis. We found that dichloroacetate (DCA) injection can decrease muscle and plasma lactate concentration during exercise. DCA injection and exercise were performed in mice for 4 weeks. As a result, the decrease in lactate accumulation by DCA administration attenuated increases in mitochondrial proteins with exercise training. This result suggests that lactate can be a signal for exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：乳酸、ミトコンドリア、骨格筋、運動

1. 研究開始当初の背景

これまで乳酸は解糖の最終産物であり、疲労の原因となる老廃物であると言われてきた。しかし、近年では、乳酸はエネルギー源であり、運動中や安静時にミトコンドリアで酸化され利用されていることが広く知られ

るようになってきている。ミトコンドリアは、脂肪酸やピルビン酸などを酸化して有酸素的にエネルギーに変換する細胞内小器官である。エネルギー代謝の観点から、ミトコンドリアは非常に重要な細胞内小器官であるので、ミトコンドリア増殖のメカニズムを明

らかにすることは大変重要である。

Hashimoto ら (2007)は乳酸がミトコンドリア増殖を活性化させる因子となりうる可能性を、L6 細胞を用いた実験により証明した。10 mM および 20 mM の乳酸を添加した L6 細胞では、ミトコンドリアやミトコンドリアや脂肪酸代謝に関わるタンパク質の発現のマスターレギュレーターと言われている peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)のタンパク質量が増加したのである。これまで乳酸は糖分解の最終産物であり、疲労物質の一つであると考えられてきた。しかし、乳酸は運動中や安静時のエネルギー源であり、ミトコンドリアで酸化される重要な基質であることが私たちのグループや他の研究チームが明らかとしている (Hatta 1990; Brooks et al. 1980)。Hashimoto らの研究結果は、乳酸のエネルギー源としての役割だけでなく、シグナル伝達因子としての可能性を示唆したものである。乳酸は、ある一定の運動強度を超えたあたりから骨格筋から血中への放出が高まり、体内の乳酸濃度が増加し、乳酸の酸化的利用も増加する。よって、運動による骨格筋の適応に対して、乳酸は生理学的な意義がある可能性が考えられる。ヒトでの実験では、血中乳酸濃度が増加し始める強度 (lactate threshold) を超えた運動強度が、PGC-1 α を増加させることに必要であることが明らかとされている (Tobina et al. 2011)。しかし、産生された乳酸や高まった血中および筋中乳酸濃度が PGC-1 α の発現やミトコンドリア増殖に直接的な影響を与えるのか個体レベルで検討した研究はない。

ここで、ミトコンドリアを増加させるシグナル経路として、ATP/AMP 比の変化による AMP kinase (AMPK) の活性化、Ca²⁺ の増加による calmodulin kinase (CaMK) の活性化、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の増加などが明らかとされている (Olesen et al. 2010)。乳酸は、ROS の増加に関わる可能性があることが示されているが (Hashimoto et al. 2007)、その他のシグナル伝達に影響を与えるのかははっきりとされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳酸運動によるミトコンドリア増殖のシグナル因子になりうるのか明らかにすることであった。その目的を達成するために以下の 2 点を明らかにした。

(1) 運動中の乳酸の蓄積を抑えると、トレーニングによるミトコンドリアの増殖は抑制されるのか。

(2) 体内の乳酸濃度を増加させると、運動によるミトコンドリアの増殖を増強させるのか。

3. 研究の方法

以下の 3 つの実験を行った。

(1) 一過性運動における乳酸濃度の低下が、運動によるミトコンドリア酵素の mRNA 量の増加を抑制するのか検討した。本研究では、運動中の乳酸の蓄積を抑制する薬剤として、ジクロロ酢酸 (DCA) を用いた。DCA は、ピルビン酸脱水素酵素の活性化剤であり、多くの先行研究で体内の乳酸濃度の低下が報告されている (Hatta et al. 1991)。ICR 雄マウスを DCA 投与群と生理食塩水 (Saline) 投与群にわけ、DCA 群には DCA (200 mg/kg) を Saline 群には同量の Saline を腹腔内投与した。10 分後、1 分間のトレッドミル走 (40 m/min) を 1 分間休息を入れて 10 回行った。運動直後と運動後 3 時間後に血液及び腓腹筋の白色部位を摘出した。直後の筋から、酵素法を用いて乳酸濃度とウエスタンブロッティング法を用いてシグナル伝達因子のリン酸化を測定した。3 時間後の筋から、ミトコンドリアの転写活性化因子である PGC-1 α とミトコンドリアの酵素の mRNA 量を real-time PCR 法を用いて測定した。

(2) トレーニングによるミトコンドリアの増加を、DCA による運動中の乳酸濃度の低下が抑制するのか検討した。ICR 雄マウスを、生理食塩水群、生理食塩水+トレーニング群、DCA+トレーニング群に分けた。一過性運動実験と同様の投与と運動を行った (1 週: 3 days/wk, 2-4 週: 5 days/wk)。4 週間後、ミトコンドリアのタンパク質量をウエスタンブロッティング法を用いて測定した。

(3) 乳酸摂取による体内の乳酸濃度の増加が、運動トレーニングのミトコンドリアの増加を増強するのかを検討した。ICR 雄マウスを生理食塩水+トレーニング群、乳酸+トレーニング群に分けた。乳酸摂取 (2.5 mg/g) と生理食塩水 (乳酸と同量) の摂取は経口投与で運動直後に行った。運動は 25 m/min を 40 分間のトレッドミル走を週 6 回 3 週間行った。3 週間後、前脛骨筋を摘出し、ミトコンドリアのタンパク質量をウエスタンブロッティング法を用いて測定した。さらに、筋グリコーゲン濃度を測定した。

4. 研究成果

本研究により得られた知見は以下のとおりである。

(1) 一過性運動における乳酸濃度の低下が、運動によるミトコンドリア酵素の mRNA 量の増加を抑制するのかが検討した。まず、一過性トレッドミル走直後の血中と筋中乳酸濃度 (腓腹筋)において、DCA 群が Saline 群に比べて有意に低下していたことを確認した (図 1)。

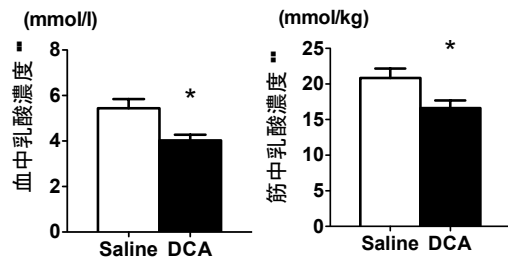


図 1 運動直後の血中と筋中乳酸濃度 (平均値±標準誤差、* $p<0.05$)

次に、運動直後の腓腹筋においてミトコンドリアの増加に対する重要なシグナル伝達因子である AMPK、CaMK のリン酸化状態、活性酸素種の増加を意味する酸化型と還元型グルタチオンの比を測定した。その結果、AMPK のリン酸化のみ DCA 群が Saline 群に比べて低い傾向がみられた。このことは、AMPK の活性化が乳酸濃度とリンクしている可能性を示唆している。さらに、運動 3 時間後の腓腹筋の PGC-1 α とミトコンドリアの酵素の mRNA 量を測定した。その結果、運動による PGC-1 α 、ミトコンドリアの酵素の mRNA の増加には乳酸濃度の低下による影響はみられなかった。これらのことから、一過性の運動によるミトコンドリアの mRNA 量の増加 (転写の活性化)は、DCA 摂取による乳酸濃度の低下で抑制されないことが明らかとなった。ただし、DCA による運動中の乳酸濃度の低下は AMPK のリン酸化を抑制する傾向が見られたことから、運動による転写の活性化以外の適応に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

(2)DCA 摂取による乳酸濃度の低下がトレーニング効果に及ぼす影響を検討した。DCA を投与しながらトレーニングした場合、ミトコンドリアの酵素である COXIV のタンパク質量に有意な増加はみられなかった (図 2)。このことは、運動強度が同等であっても、乳酸の蓄積を低下させたトレーニングでは、ミトコンドリアの増加が抑制されたことを示唆している。このことから、乳酸の蓄積は、トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加のシグナルになっている可能性が考えられる。

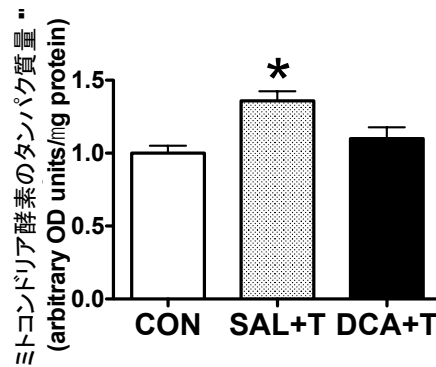


図 2 4 週間トレーニング後の腓腹筋のミトコンドリア酵素 (COXIV) のタンパク質量 (CON:生理食塩水群、SAL+T:生理食塩水+トレーニング群、DCA+T:DCA+トレーニング群、平均値±標準誤差、* $p<0.05$)

しかし、一過性の運動実験では、mRNA 量の増加には、乳酸濃度の違いが影響を与えていなかった。このことから、乳酸が DNA から RNA への転写ではなく、その他の部分 (翻訳やタンパク質分解など)に影響を与えて、トレーニングでのミトコンドリアの増加に違いを与えた可能性がある。この点は、今後明らかにするべき課題である。

(3) 体内の乳酸濃度を増加させると、運動によるミトコンドリアの増殖を増強させるのかが検討した。同強度の運動中の乳酸濃度を増加させることは非常に困難であったため、運動直後に乳酸を経口投与することによって、運動後の体内の乳酸濃度が高い状況を作り出す方法を用いた。運動直後に乳酸を摂取させる運動トレーニングを行わせた結果、トレーニングによる骨格筋ミトコンドリアの増加を増強することはできなかった。このことから、やはり運動中の乳酸の蓄積や酸化量の増大が、運動によるミトコンドリアの増殖に大きく関わっている可能性が考えられた。しかし、一方で、3 週間のトレーニング後、乳酸摂取トレーニング群の前脛骨筋の白色部位の筋グリコーゲン濃度が、生理食塩水摂取トレーニング群よりも有意に高い値を示した。このことは、筋グリコーゲン濃度のトレーニングによる増加に、運動後の乳酸摂取が効果的であることを示唆している。

(4)以上の研究結果から、運動中の乳酸蓄積は運動によるミトコンドリアの増加を促すシグナル因子になりうる可能性が示唆された。しかし、どのようなメカニズムで乳酸が運動によるミトコンドリアの増殖を引き起こしているのか明らかではない。今後、乳酸によるミトコンドリアの増加のメカニズムについて、さらに検討していく必要がある。翻訳の制御やオートファジーを中心としたタン

パク質分解系に乳酸が何らかの影響を与えているのではないかと推察される。しかし、一方で、長期の乳酸濃度の上昇が、体内に悪影響をおよぼすことも明らかにされている(Ogasawara et al. 2010)。将来的には、今後の研究により運動の効果を導き出す適切な乳酸濃度を導き出すことで、オーバートレーニングなどの予防にもつなげていくことができるように研究を進めていきたい。

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Daisuke Hoshino, Yu Kitaoka, Hiroyuki Masuda, Hideo Hatta. Adaptation of monocarboxylate transporters in skeletal muscle. Adaptive medicine. 4: 2-9, 2012.DOI: 10.4247/AM.2012.ABB011
- ② Yu Kitaoka, Daisuke Hoshino, Hideo Hatta. Monocarboxylate transporter and lactate metabolism. The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.1:247-252,2012.DOI:http://dx.doi.org/10.7600/jpfs.1.247

[学会発表] (計3件)

- ① 星野太佑. 乳酸は骨格筋のミトコンドリア新生のシグナルとなるのか?. 第8回乳酸研究会, 2013年2月16日. 東京大学.
- ② 星野太佑, 田村優樹, 増田紘之, 八田秀雄. ジクロロ酢酸摂取による運動中の乳酸濃度の低下が骨格筋のエネルギー代謝の適応に与える影響. 第67回日本体力医学会大会, 2012.9月15日. 長良川国際会議場 (岐阜).
- ③ Daisuke Hoshino, Yuki Tamura, Hiroyuki Masuda, Hideo Hatta. Effects of dichloroacetate administration on training-induced metabolic adaptation. 15th International Biochemistry of Exercise Congress. June 20, 2012. The Swedish School of Sport and Health Sciences (Sweden)

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 太佑 (HOSHINO DAISUKE)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号 : 70612117