

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K13196

研究課題名(和文) 運動が骨格筋の血糖利用を高める機序-ヘキソキナーゼとミトコンドリアに着目して-

研究課題名(英文) The mechanisms of exercise-induced glucose utilization by hexokinase and mitochondria in skeletal muscle

研究代表者

増田 紘之(Masuda, Hiroyuki)

新潟医療福祉大学・健康科学部・助教

研究者番号：10738561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血糖(グルコース)は骨格筋の重要なエネルギー源であり、運動中に活動筋がGLUT4の働きによって血糖を盛んに取り込むという分子機序はよく知られている。しかし、活発に取り込まれた血糖が余すことなく効率的に解糖系とミトコンドリアでのATP生成に利用されるのに必要な機序には不明な点が多い。糖の源流段階に位置し、取り込まれた血糖をリン酸化するヘキソキナーゼは、ミトコンドリアと協調して活動筋の血糖利用に重要な役割を果たすことから、「運動中に活動筋ではヘキソキナーゼのミトコンドリア膜への結合が増加する」との仮説を検証したが、安静状態と比べて変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでGLUT4による血糖取り込み過程に偏重していた骨格筋糖代謝研究において、ミトコンドリアでの血糖利用を調節するという新たな視点から、この研究分野を再構築することを目指した。本研究の成果は、身体活動による糖代謝機能の包括的な解明への一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence reveals that exercise stimulates glucose transport in skeletal muscle. Hexokinase phosphorylates glucose to regulate glucose metabolism. Akt is activated by exercise. In heart muscle, Akt-mediated phosphorylation of hexokinase increases mitochondrial association. This association, which include translocates to mitochondria and increases mitochondrial hexokinase binding, contributes to generate ATP. We hypothesized that Akt-mediated phosphorylation of hexokinase increases during exercise. Contrary to our hypothesis, exercise did not change mitochondrial hexokinase binding.

研究分野：分子運動生理学

キーワード：運動 骨格筋 ミトコンドリア ヘキソキナーゼ Akt

1. 研究開始当初の背景

運動中、活動筋は血糖(グルコース)を活発に取り込み、これをエネルギー源としている。その分子機序として、筋収縮由来に、普段は筋細胞内部に存在する糖輸送担体(GLUT4)が細胞膜へトランスロケーションするメカニズムが知られている。そして、運動中、活動筋に GLUT4 の働きによって活発に取り込まれた血糖は、余すことなく効率的に解糖系ならびにミトコンドリアでの ATP 生成に利用される。しかし、その調節機序については不明な点が多い。

例えば、心筋細胞は活動量が多く、血糖を活発に取り込むが、ヘキソキナーゼがミトコンドリア膜に結合している。このため、心筋細胞に取り込まれたグルコースは、ミトコンドリアで生成された ATP を用いて、ヘキソキナーゼによって直ちにリン酸化される。したがって、解糖系の代謝量が高まり、ピルビン酸を十分にミトコンドリアへ供給できるようになり、ミトコンドリアでの ATP 生成が高まる。実際に、ヘキソキナーゼのミトコンドリアへの結合を阻害すると、解糖系の代謝量が減少してミトコンドリアに十分なピルビン酸を供給することができなくなり、ATP 生成は低下することが報告されている (Viitanen et al. J Biol Chem 1984)。すなわち、心筋では、ヘキソキナーゼを源流段階とする解糖系とミトコンドリアにおける酸化的リン酸化(ATP 生成)がカップリングしている。この仕組みによって、心筋は活発に取り込んだ血糖を余すことなく効率的に解糖系とミトコンドリアでの ATP 生成に用いることができる (Roberts and Miyamoto. Cell Death Differ 2015)。そこで、運動中の活動筋でも、心筋同様に、ヘキソキナーゼがミトコンドリア膜へ結合するならば、取り込んだ血糖を効率的に利用するために有効な機序となり得るが、この可能性については不明である。

活動筋では、Akt キナーゼがインスリン非依存的に活性化されるが、我々は LT(乳酸性作業域値)強度を超えると、Akt キナーゼが活性化される(Unpublished data)。例えば、心筋細胞では、Akt キナーゼ活性化がヘキソキナーゼのミトコンドリア膜への結合を促すことが報告されている (Miyamoto et al. Cell Death Differ 2008)。そこで、我々は、「運動中の活動筋でも、Akt キナーゼ活性化を介して、ヘキソキナーゼのミトコンドリア膜への結合が増加するとの仕組みが存在する」との仮説を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、活動筋が活発に取り込んだ血糖を余すことなく効率的に利用するために必要な機序解明を目的として、ヘキソキナーゼとミトコンドリアのカップリングに着目し、以下の2つの事項を検討した。(1) 運動中の活動筋では、ヘキソキナーゼのミトコンドリア膜への結合が増加するか検討した。(2) 運動中の活動筋では、Akt キナーゼ活性化を介してヘキソキナーゼのミトコンドリア膜への結合を増加させるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 運動プロトコル

12 週齢の雄性ラットに 5 日間の予備走行トレーニング(1 日 15 分間)を行わせた。これらのラットに、分速 10m(LT 強度未満)、分速 17.5m(LT 強度下限)、分速 22.5m(LT 強度上限)、分速 27.5m(LT を超える強度)で各 30 分間のトレッドミル走行運動を行わせた。各々の運動終了直後に、下肢のヒラメ筋および足底筋を摘出して凍結保存した。対照群として、安静時の各筋を摘出した。

(2) ミトコンドリア単離

凍結保存した筋サンプルは、この一部には、氷上下でプロテアーゼならびにホスファターゼの各インヒビターを加えてホモジナイズした後、可溶化処理を施した(筋ホモジネート)。また、摘出筋の別の一部には、同様に各インヒビターを加えて、700 × g で 10 分間遠心分離して細胞片や核を取り除き、ミトコンドリア膜を傷つけないようにして慎重にホモジナイズした後、20,000 × g で 3 分間遠心分離し、この上清を細胞質画分として抽出し、沈殿をミトコンドリア画分として抽出した。

(3) ウェスタンブロッティング解析

筋ホモジネート及び細胞質画分、ミトコンドリア画分の各サンプルは、SDS ポリアクリルアミド電気泳動させて分子量に分けた後、PVDF 膜への電氣的転写を行った。そして、PVDF 膜上の Akt のリン酸化タンパク質を Akt に対する特異的抗体を用いて検出した。同様に、ヘキソキナーゼ タンパク質についても、ヘキソキナーゼ の特異的抗体を用いて検出した。ミトコンドリア画分に存在するヘキソキナーゼ タンパク質量は、ミトコンドリア膜への結合量の指標とした。

4. 研究成果

(1) LT 強度に相当する中強度運動での Akt (Thr308) リン酸化上昇の確認

LT 強度に相当する中強度運動 (22.5m/分) を 30 分間行わせた運動直後のヒラメ筋および足底筋のホモジネートにおいて、Thr308 リン酸化部位における Akt タンパク質発現量が安静時と比べて増加した(順に、図 1A, B)。また、LT 強度を超える運動では、中強度運動よりも更に上昇割合の増加が見られた。この結果は、我々のこれまでの実験結果を支持するものであった。

(2) LT 強度に相当する中強度運動は、ヘキソキナーゼ のミトコンドリア膜への結合を高め
ない

仮説に反して、中強度運動直後の筋ホモジネートでは、Akt (Thr308) リン酸化状態は安静時よりも増加したにも拘わらず、ミトコンドリア画分に存在するヒラメ筋および足底筋のヘキソキナーゼ タンパク質量は、安静時と比べて変化は見られなかった。

(3) まとめ

予想に反し、LT強度に相当する中強度運動活動筋でのヘキソキナーゼ のミトコンドリア膜への結合は、安静時と比べて高まらない可能性が示唆された。今後、様々な運動強度での検討が必要である。一つの可能性として、安静状態で既にこの結合が十分に高められているのかもしれない。

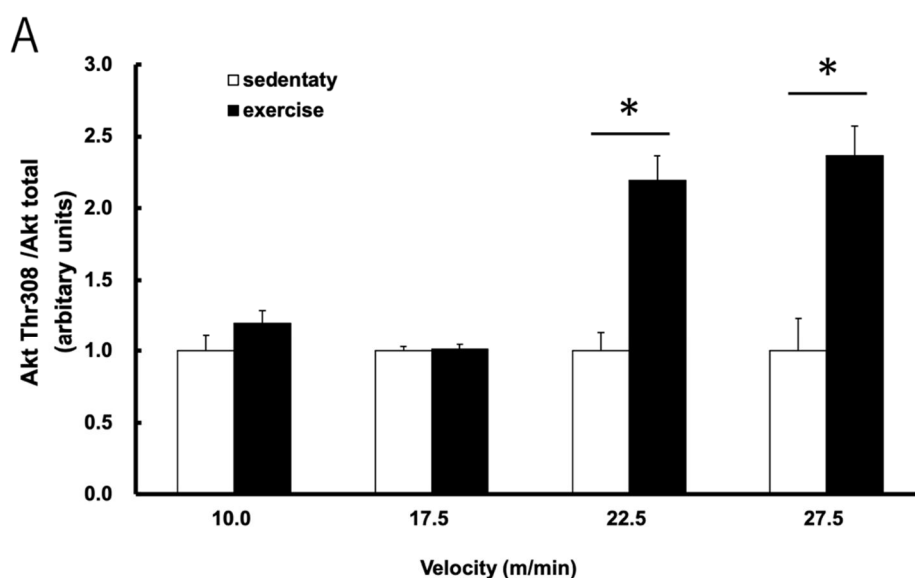


図1 30分間の運動終了直後のヒラメ筋におけるAkt Thr308のリン酸化量
Means \pm SE (n=8), *p<0.001 VS 同処置内安静群

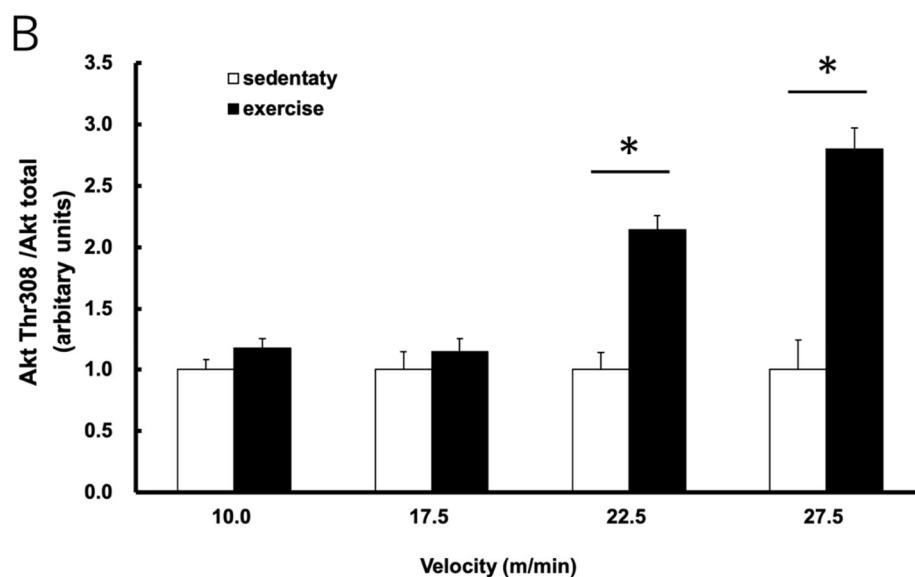


図1 30分間の運動終了直後の足底筋におけるAkt Thr308のリン酸化量
Means \pm SE (n=8), *p<0.001 VS 同処置内安静群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 増田紘之、吉村達彦、飯澤拓樹、越中敬一、川中健太郎
2. 発表標題 ラット骨格筋におけるAMPKならびにAktキナーゼはLT強度の運動から活性化される
3. 学会等名 第73回体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Masuda, Tatsuhiko Yoshimura, Keiichi Koshinaka and Kentaro Kawanaka
2. 発表標題 Exercise at the lactate threshold (LT) and above the LT increases phosphorylation of AMPK and Akt in rat skeletal muscle
3. 学会等名 The 17th International Biochemistry of Exercise Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川中 健太郎 (Kawanaka Kentaro)		
研究協力者	越中 敬一 (Koshinaka Keiichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------