

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700533
 研究課題名（和文） 乳酸の代謝活性によるミトコンドリア膜乳酸輸送タンパク質の適応変化
 研究課題名（英文） The effect of lactate production on monocarboxylate transporter protein in mitochondria.

研究代表者
 榎木 泰介（ENOKI TAISUKE）
 大阪教育大学・教育学部・講師
 研究者番号：70392701

研究成果の概要：本申請課題では、ヒトがより効率よくエネルギーをつくり、またエネルギーを使っているのかに注目した。特に乳酸をエネルギー源として捉え、乳酸の細胞間移動を司るタンパク質について研究をおこなった。結果から、このタンパク質が増えれば、ヒトはより効率良くエネルギーを利用することが可能であると示唆された。この様な知見は、健康増進の為の運動などについても、有用であると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	210,000	1,710,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 スポーツ科学

キーワード：エネルギー代謝、細胞膜タンパク質、乳酸、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

本研究課題では、「解糖系代謝によって産生した乳酸を、さらにミトコンドリアにおいて利用する能力」に注目した。国際的な高レベルのスポーツ競技では、解糖系代謝をより長い時間に渡って持続する能力が求められる。これには、解糖系代謝と酸化系代謝をよりスムーズに結ぶ能力がポイントになると着目し、研究を進めた。申請者はこれまでに、解糖系の活性や低下と、乳酸の代謝利用について研究を行ってきた。そこでは、解糖系代謝の低下が乳酸代謝の低下と関連することを報告している。さらに、筋肥大による解糖

系代謝の亢進と、乳酸代謝及び乳酸輸送タンパク質の増加を報告した。この様に申請者は、現在まで解糖系代謝と乳酸産生および酸化機構の解明に取り組んでいる。しかし特にスポーツ科学（運動）に関して、これら解糖系代謝の亢進や低下による、乳酸の酸化代謝の変化については明らかではない。そこで本研究では、薬理学的手法を用いて、乳酸の産生が増加する様な環境をつくり、その環境下で、乳酸の酸化が亢進するのかを検討した。この点において、特に細胞内のミトコンドリアに注目し、ミトコンドリアに乳酸輸送タンパク質が存在するのかについても検討を行った。

2. 研究の目的

(1)目的

本研究では、糖の中間代謝産物である乳酸に注目した。我々のもつエネルギー代謝過程には、解糖系と酸化系がある。解糖系の最終代謝産物が乳酸である。一方、酸化系のエネルギー源としては、糖と脂肪の両方が考えられる。そのうち糖は、解糖系でつくられた乳酸が、ピルビン酸に変換されるところから始まる。よって、乳酸は解糖系の最終産物であると共に、酸化系代謝のスタート地点に位置する物質とも考えることができる。よって、申請者とその共同研究グループは、これまでも、乳酸を解糖系代謝と酸化系代謝をつなぐエネルギー基質として捉えて、研究を進めている。

本研究では、より効率的なエネルギー代謝の調節機序を解明すべく、具体的な目的として、解糖系代謝と酸化系代謝の架け橋となる乳酸と乳酸輸送タンパク質 (MCT) の適応変化について検討を進めた。

(2)ミトコンドリア膜の分析

細胞内において、乳酸の酸化がおこなわれる場所についても、検討を進めた。乳酸をエネルギー源として捉えた場合、乳酸を利用する場所の解明が必要であると考えられる。申請を行った時点では、乳酸が酸化される場所として、1)ミトコンドリアの内部、2)細胞質、3)ミトコンドリア近辺 (ミトコンドリアの外であるが、密接する周辺部位) の、3つの候補が挙がっていた。申請者は特に1)のミトコンドリア内に注目し、それを示すような実験方法と評価方法を検討した (主に1年目の計画)。

よって、研究(2)の目的は、(1)の目的を補足し、仮説の検証にとって有効なものであると考えられる。

3. 研究の方法

(1)乳酸の活性化について

生体内において乳酸の産生および酸化が活性化される状態をつくるには、まず解糖系を活性化させる必要がある。それは、ヒトで例えると、急激な運動を行った際や、解糖系を亢進するような内分泌の応答が起こった場合である。しかし、運動による解糖系の活性化については、その定量化が困難である。それは内分泌への刺激についても同様である。

そこで本研究では、生体内において解糖系を刺激する方法として、薬理学的手法を用いた。実験では、AICAR という薬物を使用した。AICAR は生体内で代謝され、ADP の擬似物となる。この AICAR を溶解し、ラットに投与した (1mg/1g Body Weight)。投与期間は7日間であり、毎朝、定時に行った。

(2)乳酸輸送タンパク質の測定について

乳酸輸送タンパク質 (MCT) の分析は、申請者がこれまでの先行研究において行った手法を用いて行った (Enoki, JAP, 2003)。AICAR 投与群と Control 群で、MCT の濃度について比較を行った。ラットの骨格筋のうち、下肢、特に下腿の筋肉を、解糖系代謝が優位な筋線維群と、酸化系代謝が優位な筋線維群に分けて、AICAR 投与による MCT の適応変化を検討した。

(3)乳酸輸送能力について

AICAR 投与の影響について、MCT の適応変化を検討するが、このタンパク質の変化が、乳酸の輸送という本来の機能をも変化させるのかを検討する必要がある。そこで本研究では、骨格筋の乳酸輸送能力を測定した。方法は、放射線同位元素でラベルした乳酸を用いたもので、申請者が先行研究において実施したものである (Enoki, JP, 2006)。

(4)ミトコンドリア膜乳酸輸送タンパク質の測定について

本研究の独創的な点である、ミトコンドリア膜の乳酸輸送タンパク質であるが、本申請を行った時点では、前述した3つの部位にその局在の可能性が示唆されていた。本研究では、特にミトコンドリア内について、MCT が局在する可能性を検討した。よって、本研究では、骨格筋細胞からミトコンドリアを単離し、精製する手法の開発がポイントとなった。そこで、ミトコンドリアの単離、精製方法について、開発と改善を進めている共同研究グループから指導を受けた (Yoshida, JP, 2007)。本研究では、初年度の実験計画について、その大部分が、このミトコンドリアの単離、精製方法の習得と、精度の向上であった。

4. 研究成果

(1)図1に AICAR 投与後の血中乳酸濃度と、図2に AICAR 投与後の血中グルコース濃度の経時的な変化を示す。図のように、AICAR を投与した群では、血中乳酸濃度が有意に増加した。また、血中グルコース濃度は有意な減少を示した。これらは、AICAR 投与から約60分間において、生体内で急激な解糖系の亢進が起こったことを示すものである。

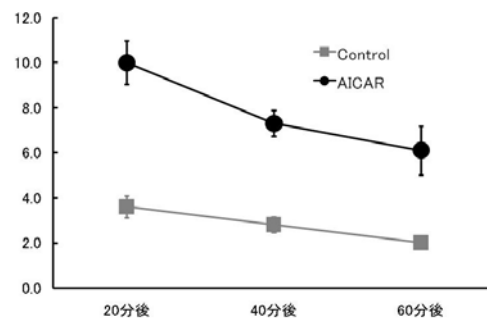


図1 AICAR 投与後の血中乳酸濃度の変化

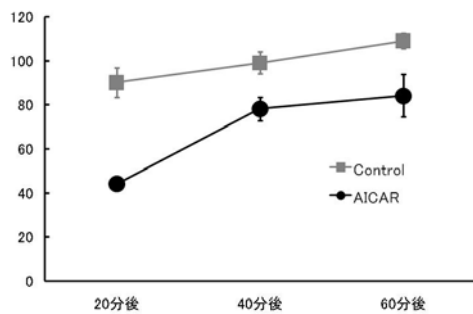


図2 AICAR投与後の血中グルコース濃度の変化

(2)MCT について、ラットの下肢骨格筋のうち、酸化系代謝が優位な筋線維群に含まれるMCT の変化(図3)と、解糖系代謝が優位な筋線維群に含まれるMCT の変化(図4)を測定した。結果から、解糖系代謝を促進したAICAR 群では、MCT1 が有意な減少を示した。これは細胞内で産生された乳酸を積極的に利用することによって、細胞全体における細胞外からの乳酸の取り込みが低下した為ではないかと考えられる。細胞が外から乳酸を取り込む必要が低下すれば、MCT1 は減少という適応変化を示すことが明らかとなった。今後の検討課題としては、MCT1 の減少が、酸化的代謝の抑制に起因するものではないことを示さなければならない。そのためには、ミトコンドリア周辺のMCT について、その適応変化を検討する必要があるといえる。

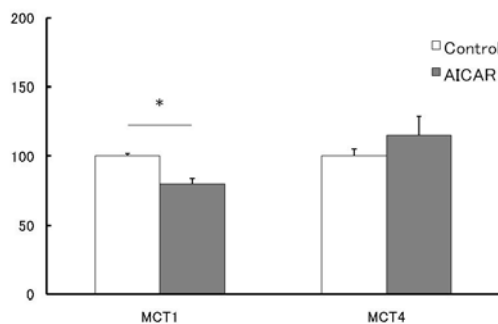


図3 酸化系筋線維群におけるAICAR投与によるMCTの適応変化

図4は解糖系代謝が優位な筋線維群についての結果であるが、AICAR は解糖系を刺激する薬物なので、AICAR 群において顕著な変化がみられた。解糖系筋線維群では、酸化系筋線維群に多いとされるMCT1 も有意な増加を示した。これは先の図3におけるMCT1 の減少を補正するものではないかと考えられる。このMCT1 の顕著な増加であるが、AICAR によって細胞内では乳酸の産生が亢進していることから、この乳酸をミトコンドリアが取り込むために、MCT1 が増加したならば、非常

に興味深い結果であるといえる。この仮説を証明するためには、やはりミトコンドリア周辺におけるMCT の役割について検討する必要がある。

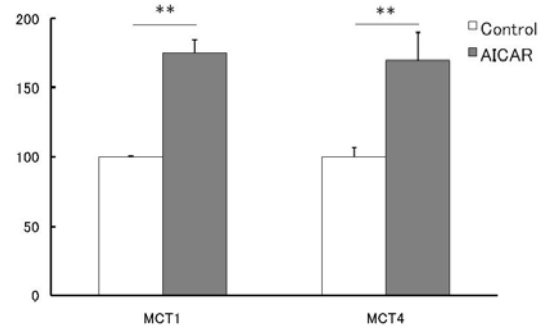


図4 解糖系筋線維群におけるAICAR投与によるMCTの適応変化

(3)AICAR による刺激が引き金となって、MCT が様々な適応変化を起こしているが、このタンパク質の増減が、機能における変化を伴っているのかについて検討を行った。その結果、解糖系筋線維群、酸化系筋線維群ともに、1週間のAICAR 投与によって、乳酸輸送能力が向上することがわかった(図5)。これは、解糖系の亢進による乳酸の産生、酸化によって、その移動を司るMCT がより積極的に動員されたことを意味し、生理学的に非常に意義のある研究結果であると考えられる。

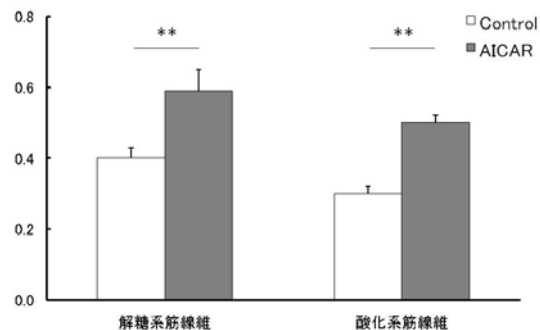


図5 AICAR投与による乳酸輸送能力の変化

(4)ミトコンドリアの単離について、共同研究を行うグループと同様に、ミトコンドリアを2種類に分類することを試みた。それらはSSミトコンドリアと、IMFミトコンドリアと呼ばれ、解剖学的に局在部位が異なることから、生理学的な機能や調整メカニズムも異なるものと考えられている。本研究では、筋線維細胞からSSとIMFを区分抽出することに主題を置き、実験研究を進めた。図6の結果は、共同研究を行うグループとほぼ同一であった。今後はIMFミトコンドリアがゼロに近づくように、さらに精度を上げて分析を進めたい。

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

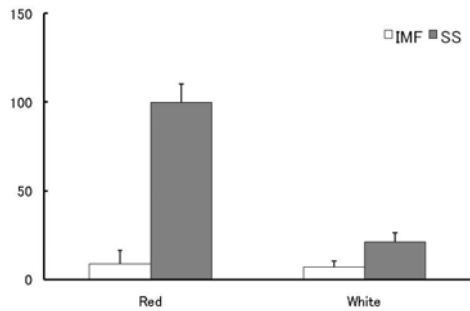


図6 単離分類したミトコンドリアに含まれる MCT1

図7は単離分類したミトコンドリアに含まれる MCT4 を示したものであるが、これは先行研究とは異なる結果となった。先行研究では、解糖系が優位な筋線維群 (White) に含まれるミトコンドリア MCT4 は、酸化系が有意な筋線維群 (Red) に含まれる MCT4 よりも多い結果となっている。今後、改善点について検討を進め、現時点で認知されているミトコンドリアの単離、分類になるように実験を進めたい。

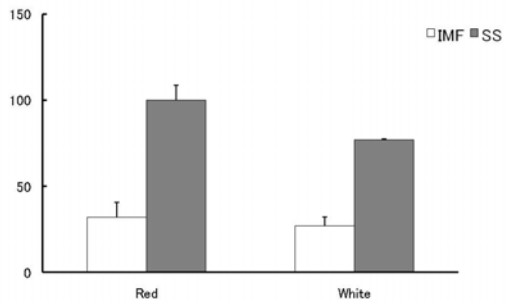


図7 単離分類したミトコンドリアに含まれる MCT4

本研究では、解糖系代謝過程の亢進によって、乳酸の産生が増加した状態では、乳酸の細胞を隔てた移動に関与するタンパク質である乳酸輸送タンパク質が増加することが明らかとなった。今後はさらに検討を進め、特に本研究で行ったミトコンドリアに注目し、この様な適応変化が、1)細胞膜かミトコンドリア膜のどちら起こるのか、2)どちらがより顕著な適応変化を起こすのか、3)タンパク質の適応変化と、機能の変化に相関があるのか、について、検討を進めたい。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎木 泰介 (ENOKI TAISUKE)