

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700717

研究課題名(和文) 運動中のセカンドウィンド促進のための骨格筋代謝産物の除去に対するアミノ酸摂取効果

研究課題名(英文) Effect of amino acid ingestion on removing metabolic waste products from skeletal muscles for enhancing second wind during exercise

研究代表者

山田 孝禎 (Yamada, Takayoshi)

福井大学・教育地域科学部・講師

研究者番号：60413770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミトコンドリア(Mit)外尿素回路構成アミノ酸(UCAA)のMit内受動的取込について明らかにするために、各組織におけるオルニチントランスポーター(ORNT1)発現量を定量化し、各組織のUCAA受動的取込量とORNT1発現量との関係を検討することを目的とした。まず、組織ごとのORNT1発現量の違いを検討した。それらに基づき、各組織のUCAA受動的取込量とORNT1発現量との関係を検討したが、関係は認められなかった。一方、同一組織内でのUCAA受動的取込量とORNT1発現量との関係も検討したが、関係は認められなかった。UCAAのMit内取込は、単純な量-反応関係にないと示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the passive uptake of urea cycle-related amino acids into the mitochondria from the cytosol in skeletal muscle cells during exercise. In particular, we examined the relationship between the passive uptake of urea cycle-related amino acids and expression levels of ornithine transporter. We also evaluated the differences in ornithine transporter expression levels in each tissue. We found no relationship between the amount of passive uptake of urea cycle-related amino acids and expression levels of ornithine transporter between tissues. Similarly, no relationship was found between the amount of passive uptake of urea cycle-related amino acids and expression levels of ornithine transporter in the same tissues. Our results suggest that passive uptake of urea cycle-related amino acids into the mitochondria is not under the simple relationship between volume and reaction.

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：栄養学

1. 研究開始当初の背景

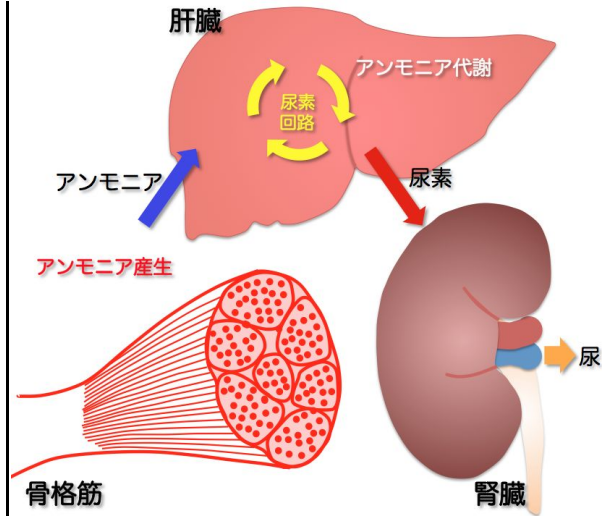
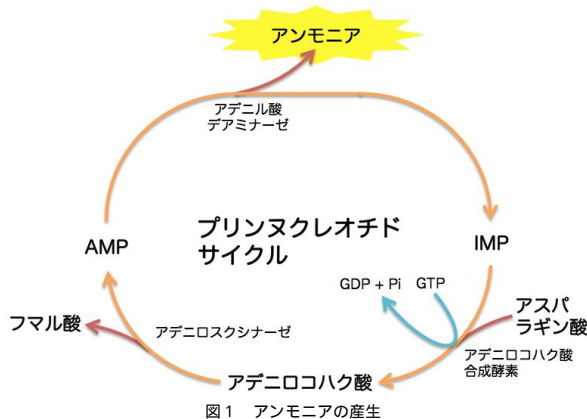
運動開始に伴い無気的なエネルギー供給系から骨格筋の収縮に必要なエネルギー供給がなされ、次第に有気的な供給系へと移行していく。前者の供給系が主に動員されている際には、自覚的な運動強度は急激に上昇していくが、後者の供給系に移行していくに連れて、それらは緩和されていく。いわゆるセカンドウインドが生じる。両者のエネルギー供給系の連結がスムーズであれば、運動時に知覚する自覚的な運動強度も和らぎ、運動に対する苦痛感も緩和し、運動のアドヒアランスの向上やドロップアウトの軽減にもつながると考えられる。

しかし、骨格筋においては、その収縮に伴うアデノシン-リン酸の脱アミノ化により、大量のアンモニアが産生される(図1)。

アンモニアは、有気的なエネルギー供給への移行を阻害する原因となる代謝産物であり、組織内の酸化代謝を阻害し、ピルビン酸の蓄積を誘発する。つまり、無気代謝およびその後の乳酸蓄積を促進する。それゆえ、嫌気的エネルギー供給の貢献度が高い運動開始時や特に高強度の運動時における骨格筋内でのアンモニアの産生および蓄積は、自覚的な運動強度の上昇や運動パフォーマンスの低下を誘発するトリガーとなり、“運動はつらいもの”と認識されてしまう原因ともなる。しかし、骨格筋において産生されたアンモニアの代謝が迅速に行われ、アンモニアの蓄積が少なくあるいは遅延されれば、有気的なエネルギー供給系の動員を促し、乳酸蓄積および自覚的な運動強度が低減され、運動開始から早い段階でセカンドウインドが生じると考えられる。

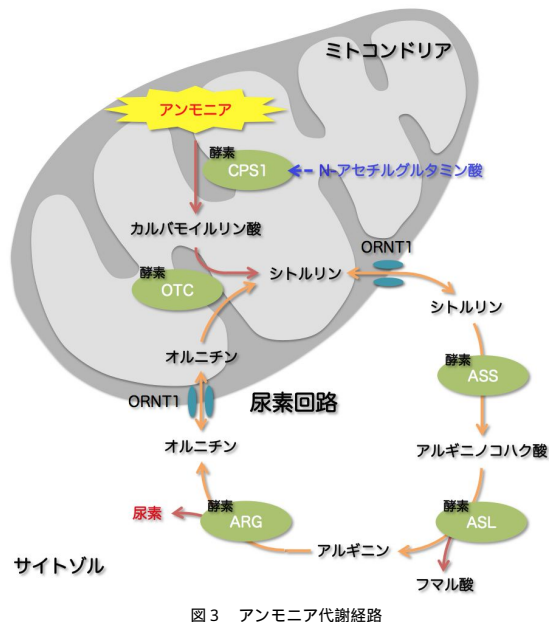
運動時に骨格筋において産生されたアンモニアは、血液を介して肝臓に運搬され、肝細胞内のミトコンドリアにおける尿素回路にて、無害な尿素に代謝された後、尿として排出される(図2)。尿素回路の反応速度が早くなれば、アンモニアの蓄積が抑制され、“運動はつらい”といった感覚も抑えられるかもしれない。

アンモニアの代謝速度は、尿素回路の反応速度に規定されるが、この反応速度はカルバ



モイルリン酸シターゼ(酵素CPS1:図3)が関係し、この濃度の上昇により、反応速度は早まる。しかし、近年、組織内の尿素回路構成アミノ酸濃度の上昇により、受動的に尿素回路の反応速度が早まるとも言われている。

オルニチントランスポーター欠損症は、オルニチントランスポーター(ORNT1:図3)の欠損により、アンモニア代謝が阻害され、高アンモニア血症を呈する疾患で、小脳失調や痙性麻痺あるいは意識障害等の症状を呈する。その症状緩和や予防に、尿素回路構成アミノ酸を投与することで高アンモニア血症が解消され、先に挙げた症状発作を防ぐことができると報告されている。これは、図3に示したようなミトコンドリア外に、高濃度の尿素回路構成アミノ酸が存在すると、受動的にミトコンドリア内にアミノ酸が取込まれ、尿素回路の反応速度が上昇するという仮説に基づくものである。しかし、アミノ酸の受動的な取込みについては、明らかにされて



いない点も多い。さらに、ミトコンドリアオルニチントランスポーター欠損症患者と同様に、運動時の骨格筋収縮に伴い産生され、血中に遊離した高濃度のアンモニアに対しても効果が認められるか否かは明らかにされていない。ミトコンドリア外の尿素回路構成アミノ酸濃度の上昇により、尿素回路の反応速度が上昇し、それに伴うアンモニア代謝の促進が確認されれば、運動開始時あるいは高強度の運動時における骨格筋内でのアンモニアの産生および蓄積の予防、およびそれに伴う自覚的運動強度の低下、運動パフォーマンスの改善の観点からも有益と考えられるが、明らかにされていない点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿素回路の構成アミノ酸を摂取し、血中のアミノ酸濃度が上昇することで、ミトコンドリア内に受動的に取り込まれるアミノ酸量が上昇し、それに伴いアンモニア代謝速度の上昇が認められるか否かを明らかにすることであった。

上記の目的を達成するために、本研究においては、以下の3つの研究課題を設定した。

- 課題1**：各組織におけるオルニチントランスポーターの定量化
課題2：異なる組織におけるオルニチントランスポーターと尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量との関係
課題3：同一組織におけるオルニチントランスポーターの変化と尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量との関係

3. 研究の方法

課題1：各組織におけるオルニチントランスポーターの定量化

(1) 被験動物

10週齢のWistar系雄性ラットを用いた。被験動物は、室温25℃、12時間の明暗周期の環境下で飼養し、飼料および飲料水(蒸留水)を自由摂取させた。

(2) オルニチントランスポーター定量化のための組織サンプル

ペントバルビタールナトリウム(50mg/kg：ネプタール注射液)を腹腔内投与し、麻酔下において、ヒラメ筋、腓腹筋表層部および腓腹筋深層部、心臓、腎臓および肝臓を摘出した。各組織サンプルは、湿重量を秤量した後、液体窒素で瞬間凍結させ、分析まで-80℃で凍結保存した。

(3) ウェスタンブロッティングによるオルニチントランスポーター定量化のためのサンプル調整

氷上で融解した各組織サンプル(～40mg)に対して、9倍量のRIPAバッファーを加え、ポリトロンホモジナイザーによって2分間ホ

モジネートした。その後、27Gの注射針およびシリンジでサンプルを10往復通した。次に4℃で30分間インキュベートし、遠心分離(10,000g、15分間、4℃)した。上清に2×SDSサンプル処理バッファーを加えた後、室温で30分間インキュベートした。

(4) 電気泳動

サンプルは、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって、分子量ごとに分離された。泳動は、20mA/ゲル、室温22-24℃で行い、通電時間は約90分間であった。

(5) セミドライブロッティング

泳動終了後、トランスファー装置を用いて、セミドライブロッティングを行った。陽極側から、ブロッティング溶液A(300mM Tris, 5% methanol)に浸したる紙を2枚、ブロッティング溶液B(25mM Tris, 5% methanol)に浸したる紙を1枚、PVDFメンブレン、泳動後のゲル、ブロッティング溶液C(25mM Tris, 40mM 6-aminohexanoic acid, 5% methanol)に浸したる紙を3枚重ねて、ブロッティングを開始した。なお、メンブレンは30秒程度メタノールで湿潤させた後、ブロッティング溶液Bに浸し、30分間振盪させた。転写条件は、2mA/cm²の定電流、転写時間は45分間とした。

メンブレンの洗浄にはTBS-T(0.1% Tween-20, 150mM NaCl, 25mM Tris-HCl, pH 7.4)を使用した。転写後のメンブレンを10分間振盪させ、5%スキムミルク(5%スキムミルク/0.1%TBS-T)でブロッキングを行った。ブロッキングは、室温で60分間とした。

(6) 化学発光検出

各組織におけるオルニチントランスポーターは、化学発光により検出された。一次抗体は、10%スキムミルク(10%スキムミルク/0.1%TBS-T)で75倍に希釈し、4オーバーナイトインキュベーションを行った。また、二次抗体は、0.1%TBS-Tで2,500倍に希釈し、室温で60分間インキュベートした。二次抗体の反応後のメンブレンをTBS-Tでよく洗浄した後、検出を行った。化学発光を化学発光撮影装置によって検出した。

課題2：異なる組織におけるオルニチントランスポーターと尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量との関係

(1) 被験動物

9-10週齢のWistar系雄性ラットを用いた。被験動物は、室温25℃、12時間の明暗周期の環境下で飼養し、飼料および飲料水(蒸留水)を自由摂取させた。

(2)～(6)は課題1同様

(7) ミトコンドリア外からミトコンドリア内への尿素回路構成アミノ酸の受動的

な取り込み

氷上で融解した各組織サンプル（～50mg）を尿素回路構成アミノ酸を溶解した生理食塩水に4で60分間インキュベートした。インキュベート前後の重量の違いを秤量し、受動的取込量として求めた。

課題3：同一組織におけるオルニチントランスポーターの変化と尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量との関係

(1) 被験動物

5週齢のWistar系雄性ラットを用いた。被験動物は、室温25、12時間の明暗周期の環境下で飼養し、飼料および飲料水(蒸留水)を自由摂取させた。被験動物には、直径40cm×深さ50cmの円筒形の水槽に、35cmの深さまで水温30の温水を満たし、週に5回、5週間の水泳運動を負荷した。

(2)～(7)は課題2同様

4. 研究成果

本研究の各検討課題において明らかにされた主な知見について以下に示した。

課題1：各組織におけるオルニチントランスポーターの定量化

本研究課題においては、異なる組織におけるオルニチントランスポーターの発現量を定量化し、各組織におけるオルニチントランスポーターの発現量の違いを検討した。その結果、肝臓におけるオルニチントランスポーター発現量が最も高かった(図4)。一方、骨格筋においては、腓腹筋深層部において最も高かった。

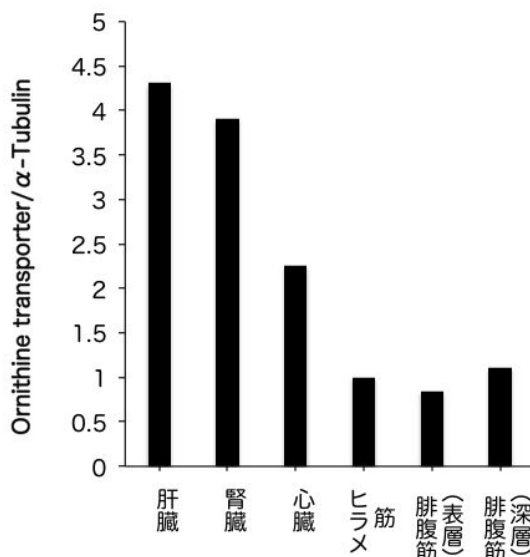
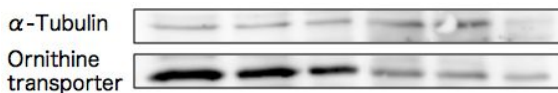


図4 各組織におけるオルニチントランスポーター

課題2：異なる組織におけるオルニチントランスポーターと尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量との関係

本研究課題においては、組織ごとに異なるオルニチントランスポーター発現量が、ミトコンドリア内への尿素回路構成アミノ酸の受動的な取り込みに影響するかを検討した。その結果、尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量と、組織間で異なるオルニチントランスポーター発現量には認められなかった。

課題3：同一組織におけるオルニチントランスポーターの変化と尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量との関係

本研究課題においては、同一組織内でのオルニチントランスポーター発現量の違いが、ミトコンドリア内への尿素回路構成アミノ酸の受動的な取り込みに影響するかを検討した。つまり、ラットに水泳運動を負荷し、オルニチントランスポーター発現量を変化させ、それらの変化量と尿素回路構成アミノ酸の受動的な取込量との関係を検討した。その結果、尿素回路構成アミノ酸の受動的取込量と、同一組織内におけるオルニチントランスポーター発現量の変化には認められなかった。

以上の3つの研究課題の成果を総合すると、ミトコンドリア外の尿素回路構成アミノ酸のミトコンドリア内への取り込みは、単純な量-反応関係にないことが示唆された。一方で、尿素回路の反応速度を規定するN-アセチルグルタミン酸の合成酵素活性を高めることで、この量-反応関係も変化する可能性が考えられる。これらについては、今後も継続して検証していく必要がある。

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 件)
該当なし

〔学会発表〕(計 件)

- 1) 山田孝禎 (2012) アミノ酸サプリメントの経口摂取が最大下持久運動中の脂質代謝に及ぼす効果. 第20回日本運動生理学会大会.
- 2) 山田孝禎 (2014) アミノ酸サプリメントの経口摂取が最大下持久運動中の脂質由来のエネルギー代謝に及ぼす効果. 第3回福井県スポーツ医科学研究大会.

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

該当なし

取得状況(計 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 孝禎 (YAMADA, Takayoshi)
福井大学・教育地域科学部・講師
研究者番号：60413770

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし