

## 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 19 日現在

機関番号：34411

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500616

研究課題名（和文） 運動によるモノカルボン酸輸送担体発現機序における AMP キナーゼ活性化効果の検証

研究課題名（英文） Effect of AMPK activation on mechanisms responsible for exercise-induced expression of monocarboxylate transporter

研究代表者

浜田 拓 (HAMADA TAKU)

大阪体育大学・体育学部・准教授

研究者番号：00466294

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は運動由来の AMP キナーゼ (AMPK) 活性化が運動の骨格筋 MCT 発現調節を媒介する重要なシグナル伝達分子であるという仮説を検証することであった。すべての実験は雄性 SD ラットを対象に行った。その結果、高強度と低強度の両水泳運動により AMPK は運動筋で活性化され、MCT1 と MCT4 の両 mRNA 量は一時的に増加した。しかし、タンパク質量の発現効果は運動強度で異なった。1 回の高強度運動により、MCT4 タンパク質量が増加したのに対して、低強度運動では MCT1 タンパク質量が急性に増加した。運動効果の分子機序を検証するために AMPK を活性化させる 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) とカフェインを用いて MCT 発現に対する AMPK 活性化効果を *in vitro* で検証した。滑車筋に対する 0.5 mM AICAR 及び 1 mM カフェイン刺激は MCT1 と MCT4 の mRNA 発現量を増加させたが、タンパク質量は変化しなかった。カフェインによる AMPK リン酸化がダントロレンによって抑制されると、MCT1 と MCT4 の mRNA 発現量の増加も抑制された。運動由来の骨格筋 AMPK 活性化は MCT1 と MCT4 の mRNA 量を増加させる有力なシグナル因子の 1 つになることが明らかとなったが、タンパク質量の発現効果には関与しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to examine the hypothesis that signaling molecules AMPK would mediate the acute exercise-induced expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in skeletal muscle. The male SD rats were subjected to a bout of high-intensity intermittent swimming (HIS) or low-intensity prolonged swimming exercise (LIS). AMPK phosphorylation was increased in response to LIS and HIS in exercised muscle. MCT1 and MCT4 mRNA were transiently upregulated by HIS and LIS. MCT1 protein was increased after LIS, but MCT4 protein was increased after HIS, while no changes in MCT1 protein were observed. Direct exposure of epitrochlearis to 0.5mM 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) or 1mM caffeine increased both MCT1 and MCT4 mRNA but not MCT1 and MCT4 protein. When 1mM caffeine-induced pAMPK was inhibited by dantrolene, neither MCT1 nor MCT4 mRNA was increased. The present findings suggest that acute exercise may upregulate MCT1 and MCT4 mRNA expression through AMPK-mediated pathway in skeletal muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ生理学

キーワード：運動・MCT・AMPK

### 1. 研究開始当初の背景

乳酸の産生量と酸化量には筋肉中から血中への放出量と血中から筋肉中への取り込み量が関係し、その放出や取り込みにおける細胞膜の通過は、モノカルボン酸輸送担体 (monocarboxylate transporter ; MCT) を介して行われる。MCT の中で運動時の乳酸の代謝に重要な役割を果たしているのが MCT1 と MCT4 である。MCT1 は主に心筋や速筋線維と遅筋線維に分布し、血中から筋肉内への乳酸の取り込みに関与している。MCT4 は主に速筋線維に多く分布し、筋肉内から血中への乳酸放出に関与している。このように、乳酸の代謝は、乳酸を産生する速筋線維で MCT4 を介して乳酸が放出され、MCT1 を介して遅筋線維や心筋に乳酸が取り込まれて酸化されると考えられている。しかしながら、運動による骨格筋の MCT 発現増加に関与するシグナル分子機序は明確にされていない。

骨格筋の AMP キナーゼ (AMPK) 活性化は、血糖降下作用の制御に関わる重要なシグナル伝達分子である。AMPK は運動による ATP 消費亢進に伴う筋内エネルギー状態の変化に応じて活性化され、糖輸送担体 4 (GLUT4) の発現量増加の鍵因子の 1 つとされている。乳酸はグリコーゲンを中心とする糖からの基質であるため、乳酸代謝は糖代謝と密接に関係している。そのため、運動による骨格筋の GLUT4 の発現量増加と類似した分子機序で MCT 発現量が増加され、乳酸代謝が改善されると考えた。このように、骨格筋の AMPK は運動による MCT 発現効果の分子機序を解明する上で重要な分子指標となる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は運動由来の AMPK 活性化が運動の骨格筋 MCT 発現調節を媒介する重要なシグナル伝達分子であるという仮説を検証することであった。

### 3. 研究の方法

すべての実験は雄性 SD ラットを用いて行った。一過性運動実験では安静群、高強度運動群、低強度運動群に分類して行った。高強度・短時間運動群はラットに体重 18% の重さの錘を付け、インターバル水泳運動を 15 セット負荷した。乳酸性閾値未満の低強度・長時間運動群は無負荷で 3 時間の水泳運動を 45 分の休息を挟んで 2 セット行わせた。両運動終了直後から運動終了 24 時間後まで経時的に滑車上筋と上腕三頭筋を摘出し、MCT1 と MCT4 の mRNA 量とタンパク質量をリアルタイム PCR とウエスタンブロット法で分析した。

また、一過性運動による MCT 発現効果に対するリン酸化酵素を検証するため、AMP キナーゼ (AMPK)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMKII)、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (p38MAPK) のリン酸化量を測定した。すべてのサンプルの分析後に、安静群と比較した。単離骨格筋を用いた実験は、ラットから滑車上筋を摘出して、AICAR やカフェインを含んだ培養液と混合ガスで長時間インキュベートする手法で行った。

### 4. 研究成果

高強度と低強度の両一過性水泳運動により上昇したリン酸化酵素は AMPK のみだった。また、高強度と低強度の両運動により MCT1 と MCT4 mRNA 量は運動終了後に増加したが、タンパク質量の増加は運動強度で異なった。MCT4 タンパク質量は高強度・短時間により増加したが、MCT1 タンパク質量は増加しなかった。対照的に、MCT1 タンパク質量は、低強度・長時間運動終了後直後に急性に増加し、その効果は長時間持続した。

運動効果の分子機序を検証するために単離インキュベーションシステムを用いて検証した。その結果、0.5 mM AICAR 及び 1 mM カフェイン刺激により MCT1 と MCT4 の両 mRNA 量は増加したが、タンパク質量は変化しなかった。カフェインによる AMPK リン酸化がダントロレンによって抑制されると、MCT1 と MCT4 の mRNA 量の増加も抑制された。

本研究の結果から、運動由来の骨格筋 AMPK 活性化は MCT1 と MCT4 の両 mRNA 量を増加させる鍵因子の 1 つになることが明らかとなったが、タンパク質量の発現効果には関与しない可能性が示唆された。

### 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 4 件)

- ① Egawa T, Hamada T, Ma X, Karaike K, Kameda N, Masuda S, Iwanaka N, Hayashi T. Caffeine activates preferentially  $\alpha 1$ -isoform of 5' AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica*, 査読有、201 巻、2011、201-238
- ② Egawa T, Tsuda S, Ma X, Hamada T, Hayashi T. Caffeine modulates phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and exacerbates insulin signal transduction in rat

skeletal muscle. J. Appl. Physiol、  
査読有、111 巻、2011、1629-1636

③Hamada T、 Takimoto M. Regulation of the acute exercise-induced expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in skeletal muscle. J. Phys. Fitness Sports Med.、 査読無、2 巻、2013、85-92

④Takimoto T, Takeyama M, Hamada T. Possible involvement of AMPK in acute exercise-induced expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 mRNA in fast-twitch skeletal muscle. Metabolism、 査読有、 In press

[学会発表] (計 8 件)

①Egawa T, Tsuda S, Oshima R, Kurogi E, Hamada T、 Hayashi T. Effects of coffee ingredients; caffeine, caffeic acid, chlorogenic acid, on glucose transport in rat skeletal muscle. The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) Annual Conference、 2011、 Sapporo

②瀧本真己、竹山巴麗、榎木泰介、浜田 拓. 高強度・短時間運動による滑車筋の MCT1 と MCT4 発現の急性効果. 第 19 回日本運動生理学会、2011、徳島大学

③瀧本真己、竹山巴麗、榎木泰介、浜田 拓. 低強度・長時間運動による滑車筋のモノカルボン酸トランスポーター(MCT)1 と MCT4 の発現効果. 第 66 回日本体力医学会、2011、下関

④Takimoto M, Takeyama M, Enoki T, Hamada T. Effect of AMPK activation on acute exercise-induced monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 mRNA expression in skeletal muscle.

Experimental Biology、 2012、 San Diego

⑤江川達郎、津田諭志、大島里詠子、浜田 拓、林達也. カフェインが骨格筋インスリン依存性糖輸送とその制御因子に及ぼす影響. 第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012、仙台

⑥江川達郎、津田諭志、大島里詠子、浜田 拓、林達也. カフェインによる IKK/NF $\kappa$ B シグナル活性化を介した骨格筋インスリンシグナル伝達抑制作用. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012、パシフィコ横浜

⑦瀧本真己、竹山巴麗、浜田 拓. 一過性の低強度・長時間運動は骨格筋の MCT と関連する CD147 膜糖タンパク発現量を増加させる. 第 20 回日本運動生理学会大会、2012、筑波大学

⑧瀧本真己、竹山巴麗、浜田 拓. 骨格筋のモノカルボン酸トランスポーター (MCT)1 と MCT4 mRNA とタンパク質発現量に対する

AMPK 活性化効果. 第 66 回日本体力医学会、2011、長良川国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜田 拓 (HAMADA TAKU)  
大阪体育大学・体育学部・准教授  
研究者番号：00466294

### (2) 研究分担者

林 達也 (HAYASHI TATSUYA)  
京都大学大学院・人間・環境学研究科・  
教授  
研究者番号：00314211

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：