

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650404

研究課題名（和文）筋収縮特異的に亢進する基質流入を調節しているトランスポーターの役割

研究課題名（英文）Role of carnitine transporter in skeletal bioenergetics during muscle contraction

研究代表者 増田 和実
(MASUDA, KAZUMI)

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：50323283

研究成果の概要（和文）： 研究成果の概要（和文）： 骨格筋のカルニチンは調査脂肪酸をミトコンドリアマトリックス内へ輸送する際、あるいはまた、それに引き続くβ酸化には必須の基質である。したがって、骨格筋におけるカルニチンの利用量を増加させることが生体（骨格筋）の脂質代謝の利便性につながるという発想は、これまで報告されたカルニチンサプリメント研究の原点となってきた。しかしながら、カルニチンサプリメントの脂質代謝への効果についてはコンセンサスのあるエビデンスはない。こうした問題の背景には、骨格筋へのカルニチン輸送機序に関する基礎研究の蓄積不足が挙げられる。本研究はこの潜在的な問題を解決すべく、骨格筋の細胞膜を隔てた基質輸送機序について検証することを目的とした。骨格筋はその細胞内で内因性にカルニチンを合成できないため、それを血液から細胞内へ取り込まなければならない。筋細胞に内在する OCTN2 に注目し、筋収縮に伴って OCTN2 の分布やそれを介したカルニチン取り込み能力がどう変化するか、さらに OCTN2 の発現に関与するシグナル調節機構について検証したところ、筋収縮によって OCTN2 のカルニチン取り込み能力が亢進し、その背景には OCTN2 の細胞膜へのトランスロケーション機構が働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： In skeletal muscle, carnitine is essential for the translocation of long-chain fatty-acids into the mitochondrial matrix for subsequent β-oxidation Based on the concept that increased carnitine availability is beneficial to skeletal muscle metabolic process, a large amount of research was directed towards investigating the effects of carnitine supplementation on exercise performance. However, it has been debated about contribution of carnitine for energy metabolism in skeletal muscle and whether carnitine supplementation can improve physical performance in healthy subjects. In order to resolve the key issues, the present study focused on the carnitine transport mechanism across the skeletal muscle plasma membrane. Due to lack of endogenous synthesis of carnitine in myocytes, skeletal muscles need to import this molecule from blood, suggesting that muscle carnitine uptake is most likely the limiting factor to muscle carnitine availability. The specific carnitine transporter, OCTN2, is expressed in skeletal muscles and is assumed to transport carnitine into myocytes. The present study obtained several scientific evidences that carnitine uptake capacity via the OCTN2 is up-regulated during muscle contraction through the mechanisms of OCTN2 translocation from cytosol toward plasma membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：運動生理学・生化学

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：骨格筋，トランスポーター，カルニチン，脂肪酸，代謝

1. 研究開始当初の背景

健康維持・増進のために運動が重要である。その理由の一つは、継続的な運動によって骨格筋の代謝機能が亢進するからである。骨格筋の脂質代謝過程において、カルニチンは長鎖脂肪酸をミトコンドリア内へ輸送する役割を担い、 β 酸化に必須の物質である。つまり、細胞内でのカルニチンの利用量は骨格筋脂質代謝の規定因子となりうる (Stephens et al. 2007)。なお、骨格筋は体全体のカルニチンの90%以上を保有しているものの、カルニチンを生合成できないため、全てを血液中からの吸収に依存しなければならない。カルニチン吸収を司るタンパク質がOCTN2 (有機カチオントランスポーター2) である (Tamai et al. 1998)。

近年、我々は骨格筋OCTN2の検出に成功し、有酸素代謝を得意とする骨格筋における高いOCTN2発現量と、それを介した高いカルニチン取り込み速度を明らかにした (Furuichi et al. 2010)。しかしながら、いくつかの骨格筋を比較した時に、細胞内のカルニチン含量はOCTN2量に相関しなかった。このことから、骨格筋のカルニチン利用能力は細胞膜に存在するOCTN2を介したカルニチン取り込み能力によって規定されている可能性があるかと推測される。この疑問に対する体系的な先行研究は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では筋細胞に内在するOCTN2に注目し、筋細胞内の発現様相を再検証するとともに、OCTN2の分布やそれを介したカルニチン取り込み能力が筋収縮に伴ってどう変化するか、さらにOCTN2の発現に関与するシグナル調節機構について、*in vivo*モデルあるいは*in vitro*の培養骨格筋細胞モデルを用いながら検証することを目的とした。

3. 研究の方法

組織画像観察のために、免疫組織分析を行った。組織切片は腹大動脈からの下肢灌流固定法 (4% PFA) によって得られた固定腓腹筋組織を用いた。それをMHC I, MHC II, COX IVの各 monoclonal 抗体、OCTN2の polyclonal 抗体を用いて検出した。筋収縮に伴うOCTN2の分布の様相変化の検証にも同様の方法を用いた。

筋収縮によるカルニチン取り込み能力を検証するにあたり、麻酔下のラットを足底屈筋力測定装置に固定し、下腿三頭筋表面に固定した表面電極を介して電気刺激を行い、筋収縮を誘発した (足底屈運動)。収縮筋は片脚のみとし、反対脚は偽手術を処置した安静時コントロールとした。放射性同位元素 (^3H)

で標識した [^3H] carnitine を頸静脈より投与し、3分後、下腿三頭筋を摘出し、溶解バッファー中でインキュベートした。バッファー中の放射活性を測定することによって筋内に取り込まれたカルニチン量、およびカルニチン取り込み速度を定量した。

培養細胞を用いたカルニチンの取り込み実験では、hOCTN2を挿入したpEYFP-c1発現ベクターを骨格筋培養細胞株 (L6) に導入した安定発現株の樹立を行った。この遺伝子導入したL6細胞に対して筋収縮によって活性化されるシグナル経路の活性化剤を用いて、一過性 (acute) でのカルニチン輸送変化を検討した。また、通常のL6培養筋芽細胞を用いて、筋収縮依存的に活性化される因子とOCTN2の発現変化をWestern Blottingによって検討した。

4. 研究成果

ラット腓腹筋の免疫組織染色画像から、細胞毎に筋線維タイプを同定しながらOCTN2とCOX IVの輝度を計測した (図1)。その結果、OCTN2とCOX IVの輝度との間に有意な相関関係が認められた (図2)。これらのことから、OCTN2の発現量は収縮特性の違いとともに、代謝特性に応じて異なっていることを示唆している。

[^3H] carnitine を用いて *in vivo* でカルニチンの取り込みクリアランスを評価したと

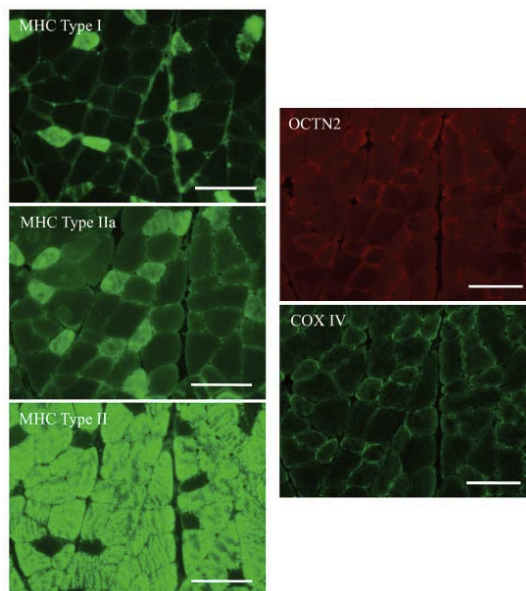


図1. 腓腹筋における免疫蛍光抗体染色画像 (Bar = 100 μm).

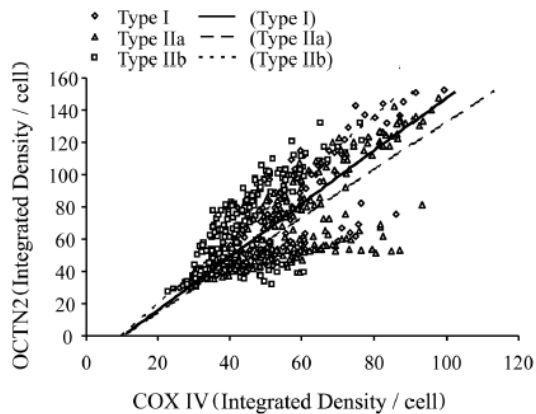


図2. 筋線維毎で観察した OCTN2 と COX IV との蛍光輝度の相関関係。

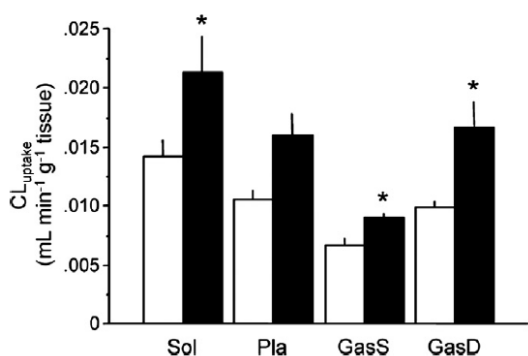


図3. $[^3\text{H}]$ carnitine を用いたカルニチンの取り込みクリアランスの比較 (□: 安静脚, ■: 筋収縮脚)。

ころ、筋収縮を行った筋のカルニチン取り込み速度は対照脚に対して約 1.5 倍高値を示した。この事実は筋収縮がカルニチン輸送を活性化することを示唆する (図 3)。また、この筋収縮によって OCTN2 の細胞内局在が細胞膜により多く増加していたことを細胞分画による Western Blotting (図 4) や免疫組織画像 (図 5) によって明らかとなった。これらの結果は、筋収縮時には OCTN2 が細胞膜にトランスロケーションすることによって血液中からのカルニチン取り込みを亢進させ、CPT1 の働きが制限されないよう働いている

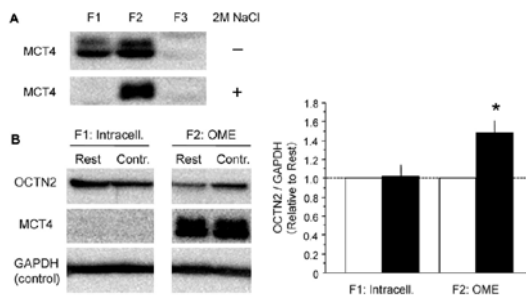


図 4. 段階遠心分離による細胞分画と細胞質画分 (intracell.) と細胞膜画分 (OME) での OCTN2 の比較 (□: 安静脚, ■: 筋収縮脚)。

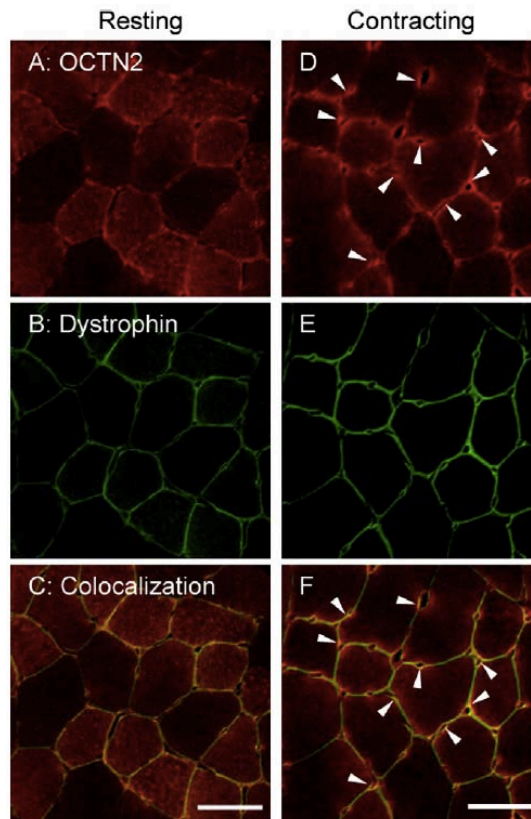


図 5. 筋収縮による OCTN2 の細胞内局在変化の様相。

可能性を示唆する。なお、この骨格筋におけるカルニチン輸送調節機序の検討のため、発現ベクターを導入した骨格筋培養細胞株 (L6) を用いて一過性 (acute) の薬理刺激実験を行ったものの、エネルギー代謝センサーやヌクレオチド受容体刺激による輸送調節は確認されなかった。OCTN2 のカルニチン輸送活性の亢進を引き起こす機序については引き続き検証する予定である。

また、OCTN2 のタンパク質発現因子を探るために 5 日間の慢性的薬理刺激を行った結果、Caffeine 刺激によって AMPK のリン酸化が有意に低下した。この時 OCTN2 タンパク質の量も有意に低下していた (図 6)。このことから、

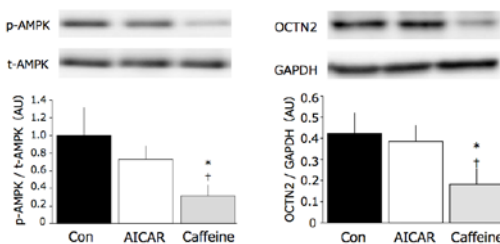


図 6. 骨格筋培養細胞に対する AICAR と Caffeine 刺激による AMPK リン酸化と OCTN2 の検出量比較。

AMPKのリン酸化レベルはOCTN2の発現量に関与していること、また、Caffeineによって惹起されるCa²⁺シグナルはOCTN2に影響を及ぼしにくいことが示唆された。今後、AMPKの活性化を引き起こす条件での再実験と共に、OCTN2の発現量に及ぼす因子の探索と、カルニチン取り込み能力や脂質代謝の変化を包括的に検証する必要がある。

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3件)

1. Furuichi Y, Sugiura T, Kato Y, Takakura H, Hanai Y, Hashimoto T and Masuda K: Muscle contraction increases carnitine uptake via translocation of OCTN2. Biochem Biophys Res Commun 418: 774-779, 2012. 査読有
2. 古市泰郎, 増田和実: 骨格筋エネルギー代謝におけるカルニチントランスポーターの役割. 体力科学 61: 289-296, 2012. 査読有
3. 山田達也, 米田真平, 古市泰郎, 岩中伸壮, 増田和実: 骨格筋の異なる筋線維タイプにおけるカルニチン輸送担体の発現比較. 北陸体育学会紀要 48: 23-32, 2012. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 町野綾香, 石澤里枝, 新田咲, 岩中伸壮, 山田達也, 増田和実: ラット骨格筋培養細胞L6におけるAMPK賦活剤がカルニチントランスポーターに及ぼす影響. 平成24年度北陸体育学会大会, 平成25年3月24日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
2. 新田咲, 石澤里枝, 山田達也, 蔭地野稔, Hamidie Ronald. D. Ray, 増田和実: 骨格筋培養細胞に対するAICAR刺激はミトコンドリアFAT/CD36を増加させる. 平成24年度北陸体育学会大会, 平成25年3月24日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
3. 石澤里枝, 山田達也, 増田和実: 中鎖脂肪酸におけるミトコンドリア調節遺伝子の解明. 第20回日本運動生理学会大会, 平成24年7月28日, 筑波大学, 茨城.
4. 蔭地野稔, 高倉久志, 古市泰郎, 山田達也, 岩中伸壮, 増田和実: L-カルニチンを用いた骨格筋ミトコンドリア呼吸活性の測定. 平成23年度北陸体育学会大会, 平成24年3月25日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
5. 奥星也, 古市泰郎, 蔭地野稔, 石澤里枝, 岩中伸壮, 増田和実: 骨格筋細胞の有酸素性代謝関連タンパク質発現に対する脂

肪酸添加の影響. 平成23年度北陸体育学会大会, 平成24年3月25日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.

6. 古市泰郎, 岩中伸壮, 高倉久志, 山田達也, 橋本健志, 増田和実: 骨格筋培養細胞を用いたカルニチン取り込み活性調節機序の検証. 第66回日本体力医学学会大会, 平成23年9月16日, 海峡メッセ下関, 山口.
7. 古市泰郎, 高倉久志, 山田達也, 増田和実: 筋収縮に伴うカルニチントランスポーター(OCTN2)の細胞内局在の変化. 第19回日本運動生理学会大会, 平成23年8月25日, 徳島大学, 徳島.
8. Furuichi Y, Sugiura T, Kato Y, Takakura H, Hanai Y and Masuda K: Muscle contraction increases carnitine uptake via the cellular redistribution of OCTN2. American College of Sports Medicine 58th Annual Meeting, Denver, CO, USA, June 3, 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ed.kanazawa-u.ac.jp/~masuda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 和実 (MASUDA, KAZUMI)
金沢大学・人間科学系・教授
研究者番号: 50323283

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

岩中 伸壮 (IWANAKA NOBUMASA)
金沢大学・人間科学系・研究員(博士研究員)
研究者番号: 80584002

加藤 将夫 (KATO YUKIO)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 30251440

杉浦 智子 (SUGIURA TOMOKO)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 70542190

橋本 健志 (HASHIMOTO TAKESHI)
立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号: 70511608

花井 淑晃 (HANAI YOSHITERU)

名古屋工業大学・工学研究科・准教授
研究者番号：50360730