

氏名(本籍)	瀧本真己(兵庫県)
学位の種類	博士(スポーツ科学)
学位記番号	甲第19号
学位授与日	平成27(2015)年3月17日
学位授与の要件	大阪体育大学大学院学位規程第4条第1項該当
研究科名	スポーツ科学研究科(博士後期課程)スポーツ科学専攻
論文題目	一過性運動による骨格筋と脳のモノカルボン酸 トランスポーター発現効果と分子機序に関する研究
審査委員	主査 教授 浜田 拓 副査 教授 岡村 浩嗣 教授 前島 悦子

論文内容の要旨

乳酸はグリコーゲン分解の過程で一時的に産生されるエネルギー酸化基質の1つである。こうした乳酸の代謝には細胞膜通過が必須となる。運動時に産生された乳酸は自由に運動筋から血中に放出されて、血中を循環して代謝されるのではなく、輸送担体を介して酸化される。1994年に乳酸の輸送担体が始めてクローニングされ、その乳酸輸送担体はモノカルボン酸トランスポーター(MCT)と名づけられた。MCTという細胞膜に存在する膜タンパク質によって、乳酸はプロトンと結合し、血液中から骨格筋へ取り込まれたり、骨格筋から血液中へ放出されたり、細胞内外の輸送が制御されている。MCTには現在まで14種類のアイソフォームがあると報告されているが、特にMCT1、MCT2、MCT4は脳と骨格筋において運動時の乳酸代謝に重要なトランスポーターとされている。運動によってMCTの遺伝子発現量が増えると、乳酸の輸送が促進され、運動時の燃料源として乳酸の酸化利用が高まることから、MCTの生理的役割は大きいと考える。このように、運動時に産生された乳酸が骨格筋と脳のミトコンドリアで酸化され、ATP合成のエネルギー基質として利用するには、MCTが重要な役割を担っている。運動が骨格筋と脳におけるMCT遺伝子発現量を高め、乳酸代謝の適応効果をより理解するには、運動の効果とその分子機構を解明することが重要な検討課題となる。

そこで、本研究では、運動による骨格筋と脳のMCT発現効果とその分子機序を検証するため、雄性SDラットを用いて3つの研究課題に取り組んだ。

【研究課題1】異なる強度の一過性運動による骨格筋のMCT遺伝子発現効果とリン酸化酵素の検証

異なる強度の一過性運動による骨格筋のMCT遺伝子発現効果とタンパク質リン酸化酵素の変化を検

討した。実験は安静群、高強度・短時間インターバル運動群、低強度・長時間運動群に分類して行った。高強度・短時間運動群には、ラットに体重18%の重さの錘を付け、20秒間の水泳運動後、20秒間の休憩を挟む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・長時間運動群には無負荷で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24時間まで経時的に滑車上筋と上腕三頭筋を摘出し、MCTの mRNA とタンパク質レベルを分析した後に安静群と比較した。両運動群ともに、滑車上筋と上腕三頭筋における AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) のリン酸化が上昇し、MCT1と MCT4の mRNA 量は一時的に増加した。しかし、タンパク質の発現効果は運動強度で異なった。乳酸放出を担う MCT4は、高強度・短時間運動終了後18時間に増加した。対照的に、乳酸の取り込みを担う MCT1とそのシャペロン CD147は、低強度・長時間運動直後に急性に増加し、その効果は18~24時間まで持続した。以上の結果より、一過性運動による骨格筋の MCT1と MCT4タンパク質発現効果は、運動強度に依存するが、mRNA 発現レベルは運動強度に影響を受けないことが明らかとなった。運動誘発性の AMPK 活性化は MCT の mRNA 量の増加に関与する可能性が示唆された。

【研究課題2】 AMPK 活性化による骨格筋の MCT 遺伝子発現効果の検証

運動誘発性の AMPK 活性化は MCT1と MCT4遺伝子発現量の増加を仲介するシグナル分子になるという仮説を検証した。この仮説の検証は、ラットから単離した筋を、試験管内で AMPK 活性化剤 (AICAR やカフェイン) と共にインキュベーションする手法を用いて行った。この手法は、生体から単離した実験環境を用いることで、血液循環や体液性因子、神経系などの影響を除外して、骨格筋に対する直接的な作用効果を検討することが可能となる。AMPK 活性化剤 AICAR やカフェインを添加した培養液で、単離した滑車上筋を16時間インキュベーションした結果、MCT1と MCT4の mRNA 発現量は増加したが、タンパク質量は増加しなかった。さらに、Ca²⁺阻害剤ダントロレンによりカフェイン誘発性の AMPK リン酸化を阻害すると、両 MCT の mRNA 量の増加も抑制されることが明らかとなった。以上の結果より、運動誘発性の AMPK 活性化は骨格筋の MCT のタンパク質量でなく、mRNA 量を高める効果に関与することが示唆された。

【研究課題3】 一過性運動による脳の基質動態、MCT、GLUT、ミトコンドリア COX 発現効果とシグナル伝達分子の検証

一過性の持久性運動による脳の基質動態、MCT、シグナル分子を検証した。実験は非運動群と運動群に分けて行った。乳酸性閾値付近で2時間のトレッドミル運動 (速度20 m/min、傾斜8%) 終了直後から24時間まで経時的に大脳皮質、海馬、視床下部、脳幹を摘出し、脳内の乳酸、ケトン体、MCT、グルコーストランスポーター1 (GLUT1)、GLUT3、ミトコンドリアタンパク質チトクローム c オキシダーゼ (COX IV)、シグナル分子を分析した後、安静群と比較した。その結果、運動時に脳の乳酸は大脳皮質、海馬、視床下部で急性に増加したが、脳幹は運動の影響を受けなかった。また、ケトン体の1つ、βヒドロキシ酪酸も大脳皮質で急性に増加した。これらの結果は、乳酸やケトン体は運動時に脳のエネルギー基質になりえることを示している。アストロサイトやニューロンで存在する MCT1、MCT2、MCT4の発現効果は、大脳皮質、海馬、視床下部において、運動終了後5~10時間に出現し、その効果は運動終了後24時間持続した。さらに、運動終了後18時間に血管内皮細胞で存在する GLUT1が大脳皮質で増加したが、ニューロン特異的な GLUT3は増加しなかった。ミトコンドリア COX IV は運動終了後10~24時間まで海馬で増加した。しかし、脳幹は運動の影響を受けなかった。さらに、ニューロ

ンへの乳酸供給を担う MCT2が増加した脳領域では、脳由来神経栄養因子 (BDNF) とその受容体 (TrkB) が増加した。また、アストロサイト特異的な MCT4が増加した視床下部では低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の増加も見られた。以上の結果より、中強度・持久性運動により脳の乳酸や MCT、GLUT1、COXIV のタンパク質発現量は急性に増加することが明らかとなった。その運動の発現効果は、脳の領域特異的に高められ、BDNF や HIF-1のシグナル分子の関与が示唆された。

審査結果の要旨

(論文審査)

本論文は、一過性運動による骨格筋と脳のモノカルボン酸トランスポーター (MCT) の発現効果とその分子機序を検証するため、正常ラットを対象にして取り組んだものである。その結果、一過性運動によって骨格筋の MCT mRNA とタンパク質の発現量は、急性に増加することを示した。そこで、運動が骨格筋の MCT 遺伝子発現量を増やす因子を検証した結果、運動誘発性の AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化が MCT mRNA の発現量を増加する有力な因子になることを明らかにした。さらに、一過性の中強度・持久性運動によって、脳の乳酸代謝、MCT、基質トランスポーター発現量は骨格筋と同様に、急性に増加し、その適応効果は脳由来神経栄養因子 (BDNF) や低酸素誘導因子 (HIF-1 α) を介して脳の領域特異的に高まることを明らかにした。

以上の研究成果から、一過性運動による骨格筋と脳における乳酸代謝及び MCT の適応効果とその効果を高めるいくつかのシグナル因子が明らかとなった。

論文審査の結果、本文中の文章表現の若干の修正と本文に挿入する図・表の位置の統一化を指摘されたが、一過性運動による骨格筋と脳の乳酸代謝及び MCT の発現とその効果を高めるシグナル因子についての研究成果は高く評価された。

(最終試験)

提出論文及び関連することがらについて口頭試験を行った結果、博士の学位授与の基準を満たしていると判断されたので、「合格」と判定した。