

乳酸輸送担体 monocarboxylate transporter の 発現調節に関する研究

学位論文内容の要旨

骨格筋は収縮速度によって速筋と遅筋に分類され、前者はミトコンドリアが少なく、乳酸を産生しやすい繊維である。一方、遅筋はミトコンドリアが多いため乳酸産生は少なく、また、乳酸を外から取り込んで利用することができる。Monocarboxylate transporters (MCTs)は低分子のモノカルボン酸を輸送する膜タンパク質として同定され、骨格筋では主に MCT1 および MCT4 が発現している。近年の研究により MCT1 は遅筋繊維を豊富に含む赤筋や心筋などに多く分布し、MCT4 は速筋繊維が豊富な白筋に多いことが明らかとなっている。したがって、速筋で産生された乳酸は MCT4 によって放出され、MCT1 によって遅筋や心筋に取り込まれ完全に酸化されると考えられている。したがって、これらのトランスポーターの調節メカニズムを明らかにすることは乳酸代謝の恒常性を理解する上で非常に重要であり、生体内で生じている物質輸送の生理的意義を明確にする上で重要な情報を与えうると考えられる。本研究では運動時に活性化される二つにシグナル分子 AMP-activated protein kinase (AMPK) および protein kinase C (PKC) に着目し、骨格筋における MCT の発現調節機構および乳酸代謝への関与を明らかにすることを目的とした。

(1) 骨格筋の MCT 発現に及ぼす AMPK 活性化の影響

骨格筋の MCT 発現に及ぼす AMPK 活性化の影響を *in vivo* および *in vitro* の両面から検討した。AMPK 活性化剤である AICAR がラット骨格筋の MCT1、MCT4 ならびに GLUT4 のタンパク質量に及ぼす影響を検討したところ、速筋繊維が有意な筋組織において MCT4 および GLUT4 のタンパク質量が増大した。一方、遅筋において GLUT4、MCT4 はほとんど変化しないことが明らかとなった。また、MCT1 は各筋組織において AICAR の影響を受けなかった。次に、*in vitro* 骨格筋モデルとしてヒト横紋筋由来 RD 細胞を用いて AMPK の活性化が MCT の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、MCT4 mRNA およびタンパク質量は AICAR の処理により顕著に増大することが示された。また、この MCT4 mRNA 量の増大は AMPK 阻害剤 compound C (CC) により抑制された。一方、MCT1 は AMPK 活性化の影響を受けなかった。これらの結果より、骨格筋、特に速筋において MCT4 は AMPK 活性化を介して発現が増大し、細胞外への乳酸排出の亢進に寄与していることが示唆された。

(2) 骨格筋の MCT 発現に及ぼす PKC 活性化の影響

AMPK は乳酸の産生が急上昇するような高い強度の運動による細胞内 ATP の減少

により活性化する一方で、PKCは比較的強度が低い運動でも活性化すると考えられている。そこで、RD細胞を用いて骨格筋のMCT発現に及ぼすPKC活性化の影響を検討した。はじめに、PKC活性化剤であるPMAがグルコース取り込みおよび細胞産生量に及ぼす影響について検討したところ、PKC活性化によりRD細胞内へのグルコース輸送が亢進し、それに伴い乳酸産生量が増加した。次に、MCT1及びMCT4の発現量に及ぼすPMAの時間依存的な影響について検討したところ、MCT4 mRNA量は乳酸産生量の増加とともに増大した。一方、MCT1 mRNA量はPMA処理後短時間内に顕著に増大し、その後は乳酸産生量の増加とともにコントロールレベルまで減少した。また、PMAによるMCT4タンパク質量の増大は乳酸産生量と同様、PKC阻害剤であるBIMにより顕著に抑制された。さらに、細胞外への乳酸排出に及ぼすMCT4ノックダウンの影響を評価したところ、MCT4ノックダウンによりPMAによる細胞外乳酸量の増大が有意に減少した。したがって、PKC活性化を介した乳酸産生の増大に伴いMCT4の発現が増大し、細胞外への乳酸排出を亢進することが示唆された。

(3) PKCを介したMCTの発現制御機構

これまでの結果より、MCT1およびMCT4の発現には異なる調節機構が存在している可能性が示された。そこで、これらの転写制御に着目し、PKC活性化を介した発現制御機構を明らかにするべく検討を進めた。RD細胞においてMCT1のプロモーター活性はPKC活性化を介して速やかに上昇した。また、阻害実験の結果から、このプロモーター活性の上昇にはPKC ζ が寄与している可能性が示唆された。一方、MCT4のプロモーター活性に及ぼすPMAの影響を検討したところ、PMAは添加後1時間から6時間ではMCT4プロモーターの活性にほとんど影響を及ぼさず、24時間から48時間という長期的曝露よりMCT4プロモーター活性を顕著に上昇させた。したがって、PMAによるMCT4の発現誘導はMCT1と異なるメカニズムを介していることが示唆された。そこで、PMAによるMCT4の誘導メカニズムについて詳細に検討した。はじめにMCT4遺伝子の5'-上流領域を段階的に欠失したレポータープラスミドを作成し、MCT4プロモーター領域におけるPMA応答配列の探索を行った。その結果、MCT4遺伝子5'-上流-505から-23の領域がPMAによるMCT4の転写活性化に重要であることが示唆された。この領域について詳細に解析したところ、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)、specificity protein 1 (SP1)結合配列およびhypoxia responsive element (HRE)が存在することが明らかとなった。したがって、PMAによるMCT4プロモーター活性の増大にこれらの候補配列が寄与している可能性が示唆された。そこで、NF- κ B結合配列およびHREに変異を導入し、PMAによるMCT4プロモーター活性に及ぼす影響を検討したところ、PMAによるMCT4プロモーター活性の上昇は2ヶ所のHREに変異を導入することにより顕著に抑制された。また、SP1阻害剤であるミスラマイシンはPMAによるプロモーター活性の上昇に影響を与えなかった。以上の結果より、PMAによるMCT4転写活性の上昇にはHRE、すなわち低酸素応答に関与する配列が重要であることが示された。Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)は低酸素時に安定化し、HREに結合することにより解糖系関連遺伝子の発現を誘導することが明らかとなっている。そこでHIF-1 α に着目し、MCT4発現誘導への関与について検討を行った。その結果、長時間のPMA処理によりHIF-1 α タンパク質量が増加することが明らかとなった。また、HIF-1 α ノックダウン条件下においてPMAによるMCT4プロモーター活性の上昇およびタンパク質量の

増大は顕著に抑制された。以上の結果より、PMAによるMCT4プロモーター活性の増大にHIF-1 α が関与していることが強く示唆された。

以上、本研究により骨格筋においてMCTの発現はAMPKやPKCの活性化を介して厳密に制御され、乳酸代謝の変化に適応していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	井関	健
副査	教授	菅原	満
副査	准教授	武隈	洋
副査	准教授	山口	浩明

学位論文題名

乳酸輸送担体 monocarboxylate transporter の 発現調節に関する研究

Monocarboxylate transporters (MCTs) は低分子のモノカルボン酸を輸送する膜タンパク質であり、骨格筋では主に MCT1 および MCT4 が発現している。骨格筋は収縮速度によって fast タイプの筋繊維 (速筋) と slow タイプの筋繊維 (遅筋) に分類され、前者には MCT4 が多く発現しており、後者には MCT1 が多いことが明らかとなっている。したがって、運動時に速筋で産生される乳酸は MCT4 によって放出され、MCT1 によって遅筋に取り込まれエネルギー源として利用されると考えられている。このように骨格筋において MCT は運動機能を維持する上で重要な役割を果たしており、乳酸代謝の一端を担っている。骨格筋では運動により MCT の発現量が増加し、乳酸の輸送能が増大することが明らかとなっているが、その制御機構に関してはほとんど情報がなく、生理的意義についても不明な点が多いのが現状である。本研究では運動時に活性化される 2 つのシグナル分子 AMP-activated protein kinase (AMPK) および protein kinase C (PKC) に着目し、骨格筋における MCT の発現調節機構および運動時の乳酸代謝への関与を明らかにすることを目的として種々検討を行った。

(1) 骨格筋の MCT 発現に及ぼす AMPK 活性化の影響

骨格筋の MCT 発現に及ぼす AMPK 活性化の影響を *in vivo* および *in vitro* の両面から検討した。AMPK 活性化剤である AICAR 投与によりラット骨格筋、特に速筋繊維が有意な筋組織において MCT4 のタンパク質量が増大した。また、*in vitro* 骨格筋モデルであるヒト横紋筋由来 RD 細胞において、AICAR による MCT4 発現量の増加は AMPK 阻害剤 compound C の併用により抑制された。一方、*in vivo* および *in vitro* において MCT1 の発現量は AMPK 活性化の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。以上の結果より、骨格筋、特に速筋において MCT4 は AMPK 活性化を介して発現が増大し、細胞外への乳酸排出の亢進に寄与していることが示された。したがって、AMPK の活性化を誘導する強度の高い運動時には MCT4 の発現が増大し、速筋で産生される過剰の乳酸を排出することで恒常性を維持していることが示唆された。

(2) 骨格筋の MCT 発現に及ぼす PKC 活性化の影響

骨格筋の MCT 発現に及ぼす PKC 活性化の影響を検討した結果、PKC 活性化剤である PMA

処理により RD 細胞の MCT1 および MCT4 mRNA 量が増大することが明らかとなった。また、各種阻害実験の結果から MCT4 は PKC 活性化を介した乳酸産生量の増加とともにその発現量が増大し、細胞外への乳酸排出に寄与していることが明らかとなった。一方、MCT1 mRNA 量の増大は乳酸産生量の増加と相関しなかった。AMPK と同様、PKC 活性化は骨格筋内の乳酸濃度を維持するために重要な応答であることが明らかとなった。

(3) PKC を介した MCT の発現制御機構

MCT1 および MCT4 の転写制御に着目し、プロモーター活性に及ぼす PKC 活性化の影響について詳細に解析した。RD 細胞において MCT1 のプロモーター活性は PKC 活性化により速やかに上昇した。一方、PMA による MCT4 のプロモーター活性の上昇は、PKC 活性化を介した速やかな応答ではなく、副次的な応答であることが示された。欠失解析および点変異解析の結果から MCT4 プロモーター活性の上昇に hypoxia responsive element が重要であることが明らかとなった。また、骨格筋において MCT4 は低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor 1 α の発現に依存してその発現が誘導されることが明らかとなった。PKC 活性化による MCT4 の応答は運動強度に応じて過剰に産生される乳酸を細胞外へ放出し、骨格筋内の乳酸濃度を維持するための代償的な機構である可能性が示唆された。

以上、本研究により骨格筋において MCT の発現は運動強度に応じて活性化される 2 つのシグナル分子 AMPK および PKC を介して厳密に制御され、骨格筋における乳酸代謝の変化に適応していることが明らかとなった。また、発現制御の観点から、骨格筋における MCT1 および MCT4 の役割を明確にした。これら知見は、運動時の乳酸代謝ひいては運動機能の恒常性を考える上で非常に有益なものになり得る。また、運動による代謝改善すなわち目的に応じた運動を提案する上で非常に有用な知見となる。以上の点で本論文「乳酸輸送担体 monocarboxylate transporter の発現調節に関する研究」に含まれる研究成果は、博士 (生命科学) の学位を受けるに十分値するものと認めた。