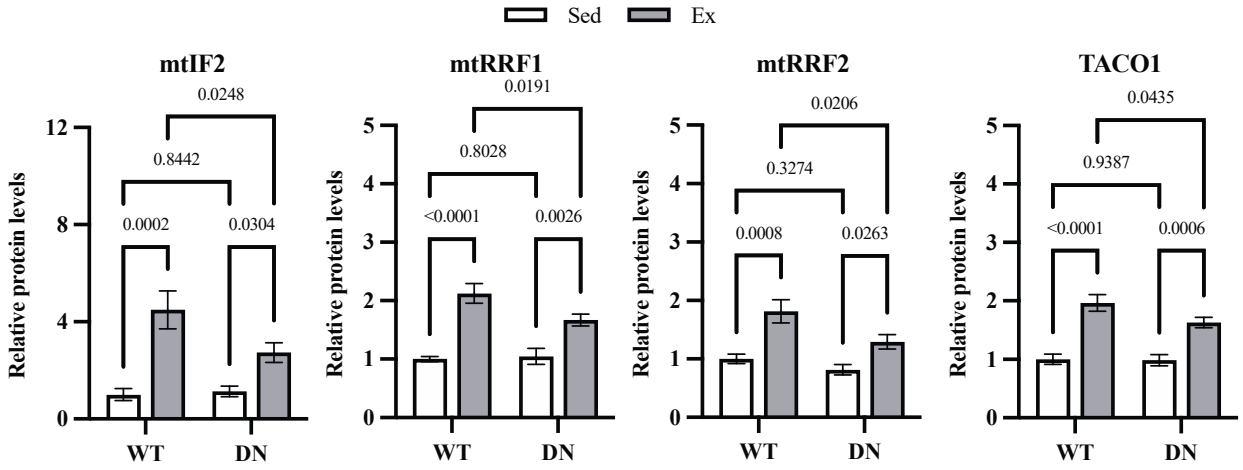
124　ミトコンドリア翻訳因子の運動適応におけるAMPKの役割	横川　拓海

【目的】ミトコンドリア機能・生合成を制御する因子として、ミトコンドリア DNA（mtDNA）に由来するタンパク質の翻訳制御分子（ミトコンドリア翻訳因子）が報告されている。骨格筋のミトコンドリア翻訳因子は運動により増加することが明らかとなっているが、その分子機序は不明である。運動により活性化する骨格筋の 5′-adenosine monophosphate-activated protein kinase（AMPK）は、ミトコンドリア生合成を制御することが示唆されている。以上より、本研究では運動による mtDNA 由来タンパク質ならびにミトコンドリア翻訳因子の発現亢進に骨格筋 AMPK が関与する可能性を検討することを目的とした。

【方法】骨格筋特異的ドミナントネガティブ変異体 AMPKα発現（AMPK-DN）マウスならびに野生型マウスに 4 週間の自発性走運動を施した後、ヒラメ筋・足底筋・腓腹筋をサンプリングした。足底筋を用いて、核ならびに mtDNA にコードされているミトコンドリアタンパク質・ミトコンドリア生合成の制御因子である peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1（PGC-1）ファミリー・ミトコンドリア翻訳因子の発現量をウェスタンブロット法により測定した。

【結果】野生型マウスでは、4 週間の自発性走運動によりミトコンドリアタンパク質・PGC-1 ファミリー・ミトコンドリア翻訳因子の包括的な増加が観察された。一方で、AMPK-DN マウスでは、核 DNA 由来のミトコンドリアタンパク質である mitochondrial NADH dehydrogenase ［ubiquinone］ 1 beta subcomplex subunit 8（NDUFB8）・ATP synthase subunit alpha（ATP5A）、mtDNA 由来の mitochondrial cytochrome c oxidase 1（MTCO1）、AMPK 依存的に制御されている PGC-1α の自発性走運動による発現増加が減弱していた。加えて、ミトコンドリア翻訳因子のうち、mitochondrial initiation factor 2（mtIF2）・mitochondrial recycling factor（mtRRF）1・mtRRF2・translational activator of cytochrome c oxidase 1（TACO1）に関しても、運動に伴う発現増加の抑制が AMPK-DN マウスにて観察された。従って、骨格筋 AMPK は運動トレーニングに伴うミトコンドリア翻訳因子の増加・ミトコンドリア生合成の亢進に関与することが示唆される。

AMPK シグナルの抑制により運動誘導性のミトコンドリア翻訳因子の増加が減弱する



124. ミトコンドリア翻訳因子の運動適応における AMPK の役割

横川　拓海

京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 食品生理機能学分野

Key words：運動，骨格筋，AMP キナーゼ，ミトコンドリア翻訳因子

緒　言

骨格筋におけるミトコンドリアの機能・量は、インスリン抵抗性・2 型糖尿病・加齢・サルコペニアとの関係性が示唆されている。運動は骨格筋ミトコンドリアの生合成を亢進させることから、その分子機序の解明は、運動効果の詳細な理解につながるだけでなく、運動模倣薬の開発へ発展する可能性がある。

ミトコンドリアの機能・生合成を制御する因子の一つとして、ミトコンドリアが独自に所持する DNA（mtDNA）に由来するタンパク質の翻訳制御分子（ミトコンドリア翻訳因子）があげられる。ヒトでのミトコンドリア翻訳因子の変異は重篤なミトコンドリア機能不全を引き起こすことから［1］、ミトコンドリア翻訳因子が健全な生命機能の維持に重要であることが示唆される。我々は、ミトコンドリア翻訳因子が運動によるミトコンドリア適応の分子機序の一端を担うとの仮説を立て研究を実施しており、これまでに自発性走運動によりマウス骨格筋のミトコンドリア翻訳因子が包括的に増加することを明らかとしている［2］。一方で、運動によるミトコンドリア翻訳因子の増加を制御する分子機序は明らかでない。

骨格筋の 5′-adenosine monophosphate-activated protein kinase（AMPK）はミトコンドリア適応の制御因子であることが示唆されている。骨格筋特異的な AMPKβ 欠損マウスは、ミトコンドリアの量ならびに機能が低下することが報告されている［3］。また、骨格筋特異的ドミナントネガティブ変異体 AMPKα 発現（AMPK-DN）マウスでは、長期的なエネルギー欠乏によるミトコンドリア量の増加が消失する［4］。従って、骨格筋 AMPK はミトコンドリア量・機能の制御因子であることが示唆されるが、これまでに運動誘導性のミトコンドリア翻訳因子の増加における AMPK の寄与を示した研究は存在しない。

本研究では、運動に伴う mtDNA 由来タンパク質・ミトコンドリア翻訳因子の発現亢進に AMPK が関与する可能性を検証することを目的とした。AMPK-DN マウスならびに野生型マウスに 4 週間の自発性走運動を施した後、足底筋における mtDNA 由来タンパク質・ミトコンドリア翻訳因子の発現量を測定した。その結果、AMPK-DN マウスにて自発性走運動に伴う上記分子の発現増加が部分的に抑制されていたことから、骨格筋 AMPK はミトコンドリア翻訳因子ならびにミトコンドリア生合成の制御因子であることが示唆される。

方　法

8～10 週齢の野生型ならびに AMPK-DN マウスを、ランダムに非運動群・自発性走運動群に分類し、4 週間飼育した。自発性走運動群には、飼育ケージ内にランニングホイールを設置することで、運動介入を実施した。4 週間後、腓腹筋・足底筋・ヒラメ筋をサンプリングし、ウェスタンブロット法によりミトコンドリアタンパク質・PGC-1 ファミリー・ミトコンドリア翻訳因子の発現量を測定した。

結　果

1.　AMPK-DN マウスでは運動誘導性のミトコンドリアタンパク質の増加が部分的に抑制された（図 1）

野生型マウスにおいて、運動介入による核 DNA・mtDNA に由来するミトコンドリアタンパク質の有意な増加が観察された。一方、AMPK-DN マウスでは、NDUFB8、UQCRC2、MTCO1、ATP5A が運動介入により有意に増加し、SDHB は増加傾向を示した。非運動群の野生型・AMPK-DN マウスの比較では、ミトコンドリアタンパク質発現量の有意な差は観察されなかったが、運動介入を施したマウスでは、野生型に比して AMPK-DN マウスにて、NDUFB8、MTCO1、ATP5A の発現量が有意に低値を示した。

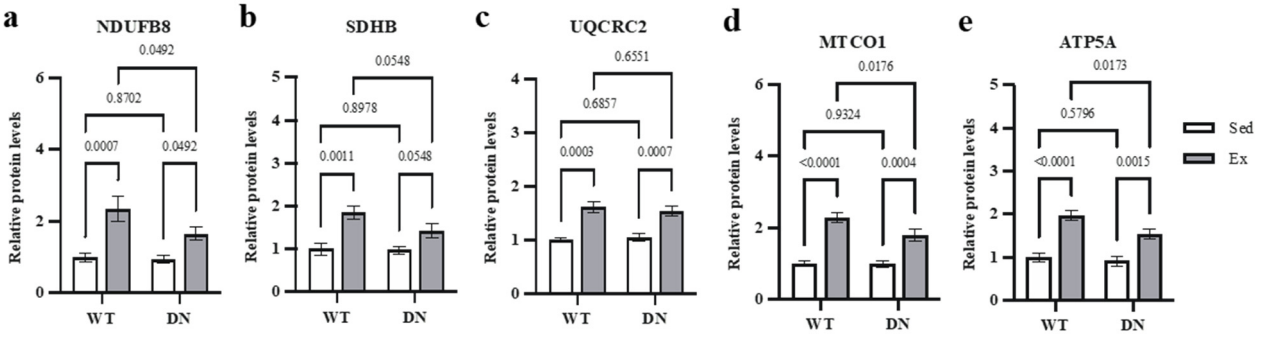


図 1.　足底筋におけるミトコンドリアタンパク質の発現量

a）NDUFB8、b）SDHB、c）UQCRC2、d）MTCO1、e）ATP5A。

Sed：非運動群、Ex：運動群、WT：野生型、DN：AMPK-DN。

統計処理は、二元配置分散分析の後、Benjamini and Hochberg 法による多重比較検定により実施した。

2.　AMPK-DN マウスでは運動誘導性の PGC-1α の増加が抑制された（図 2）

野生型マウスにおいて、運動介入による PGC-1α ならびに PGC-1β の有意な増加が観察された。AMPK-DN マウスでは、運動介入による PGC-1α の発現増加が消失した。一方で、AMPK 非依存的に制御されることが明らかとなっている PGC-1β に関しては［5］、AMPK-DN マウスにおいても運動による同程度の増加が観察された。

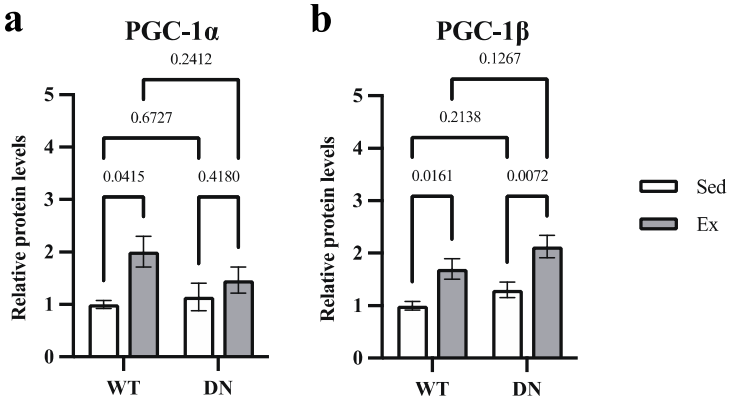


図 2.　足底筋におけるミトコンドリア生合成制御因子の発現量

a）PGC-1α、b）PGC-1β。

Sed：非運動群、Ex：運動群、WT：野生型、DN：AMPK-DN。

統計処理は、二元配置分散分析の後、Benjamini and Hochberg 法による多重比較検定により実施した。

3. AMPK-DN マウスでは運動誘導性のミトコンドリア翻訳因子の増加が部分的に抑制された（図 3）

野生型マウスにおいて、運動介入によるミトコンドリア翻訳因子の有意な増加が観察された。一方、AMPK-DN マウスでは、mtIF3 以外のミトコンドリア翻訳因子が有意に増加した。非運動群の野生型・AMPK-DN マウスを比較した際には、ミトコンドリア翻訳因子の有意な差は観察されなかったが、運動介入を施したマウスでは、野生型に比して AMPK-DN マウスにて、mtIF2、mtRRF1、mtRRF2、TACO1 の発現量が有意に低下していた。

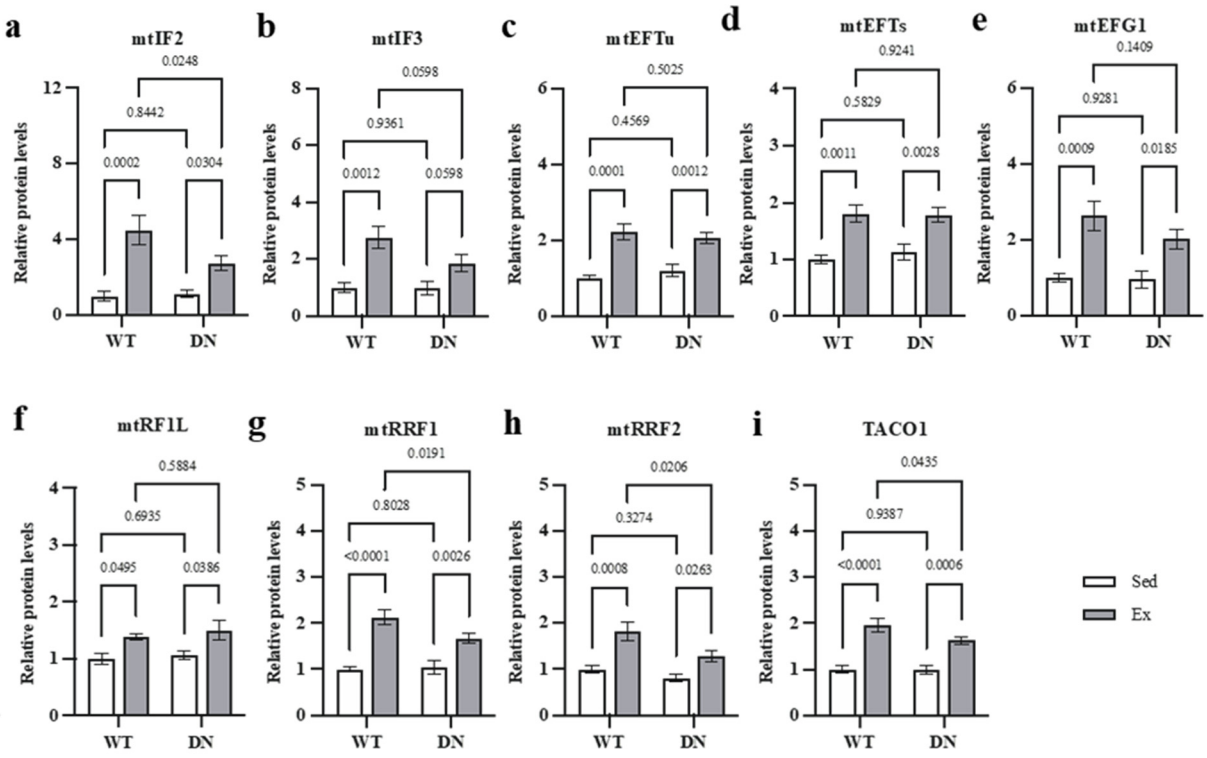


図 3. 足底筋におけるミトコンドリア翻訳因子の発現量

a）mtIF2、b）mtIF3、c）mtEFTu、d) mtEFTs、e) mtEFG1、f）mtRF1L、g）mtRRF1、h）mtRRF2、i）TACO1。

Sed：非運動群、Ex：運動群、WT：野生型、DN：AMPK-DN。

統計処理は、二元配置分散分析の後、Benjamini and Hochberg 法による多重比較検定により実施した。

考　察

非運動群の野生型・AMPK-DN マウスの比較では、ミトコンドリアタンパク質ならびにミトコンドリア翻訳因子の発現量に有意な差は見られなかった。一方で、運動介入による NDUFB8、MTCO1、ATP5A ならびに、mtIF2、mtRRF1、mtRRF2、TACO1 の増加は、AMPK-DN マウスにて抑制されていた。従って、骨格筋 AMPK は、運動に伴うミトコンドリア生合成の亢進ならびにミトコンドリア翻訳因子の増加に関与していることが示唆される。

ミトコンドリア翻訳因子のうち、mtEFTu、mtEFTs、mtEFG1、mtRF1L の運動による発現増加は、AMPK-DN マウスにおいて抑制されなかった。従って、ミトコンドリア翻訳因子の中で、AMPK 経路の寄与率が異なる可能性が示唆される。今後は、gain-of-function などによる AMPK 経路の活性化実験を実施することで、ミトコンドリア翻訳因子に対する AMPK 経路の寄与をより詳細に検討する必要がある。

本研究により、運動誘導性の骨格筋ミトコンドリア翻訳因子の増加に AMPK が関与している可能性が示唆された。

ミトコンドリア翻訳因子は、ミトコンドリアの正常な機能の維持に不可欠であることが明らかとなっていることから、AMPK に着目したミトコンドリア翻訳因子の発現制御機序の解明は、ミトコンドリア機能不全の関与が示唆されている加齢関連疾患・代謝疾患などに対する新規治療方策の確立に寄与することが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福岡大学スポーツ健康科学部の木戸康平助教、京都大学大学院人間・環境学研究科健康運動学研究室の江川達郎助教および京都大学大学院人間・環境学研究科運動医科学研究室の林達也教授である。

文　献

1) Coenen MJ, Antonicka H, Ugalde C, Sasarman F, Rossi R, Heister JG, Newbold RF, Trijbels FJ, van den Heuvel LP, Shoubridge EA, Smeitink JA. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. N Engl J Med. 2004 Nov 11;351(20):2080-6. doi: 10.1056/NEJMoa041878. PMID: 15537906.

2) Yokokawa T, Kido K, Suga T, Isaka T, Hayashi T, Fujita S. Exercise-induced mitochondrial biogenesis coincides with the expression of mitochondrial translation factors in murine skeletal muscle. Physiol Rep. 2018 Oct;6(20):e13893. doi: 10.14814/phy2.13893. PMID: 30369085; PMCID: PMC6204255.

3) O'Neill HM, Maarbjerg SJ, Crane JD, Jeppesen J, Jørgensen SB, Schertzer JD, Shyroka O, Kiens B, van Denderen BJ, Tarnopolsky MA, Kemp BE, Richter EA, Steinberg GR. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):16092-7. doi: 10.1073/pnas.1105062108. Epub 2011 Sep 6. PMID: 21896769; PMCID: PMC3179037.

4) Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 10;99(25):15983-7. doi: 10.1073/pnas.252625599. Epub 2002 Nov 20. PMID: 12444247; PMCID: PMC138551.

5) Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 17;104(29):12017-22. doi: 10.1073/pnas.0705070104. Epub 2007 Jul 3. PMID: 17609368; PMCID: PMC1924552.