

ウーロン茶抽出物による骨格筋培養細胞中の ミトコンドリアの活性化

武政 徹¹・熊谷千明¹・沼田治²

Mitochondria activation by oolong tea extract in cultured skeletal muscle cell

TAKEMASA Tohru¹, KUMAGAI Chiaki¹, NUMATA Osamu²

【研究背景と目的】

唐の時代の茶人、陸羽が記した最古の茶書「茶経」に、「茶の飲たる神農氏に発する」という一文がある。神農(しんのう)は中国古伝説に登場する帝王で、漢方医学と農業の創始者として知られている(図1)。彼は良薬を得る為に、一日百もの草木を嘗めては七十もの毒に遭い、その度に茶の葉を用いて解毒したと言われている。この逸話の真偽は定かではないが、何れにせよ茶の薬効は遥か昔から人々に認められてきたようだ。

近年の研究から、カテキン類を初めとする茶ポリフェノールには、抗酸化作用、抗癌作用、抗動脈硬化作用、抗ウイルス作用、抗肥満作用等の非常に有用な作用がある事が分かってきた。また定期的な茶の摂取は、癌、脳梗塞、心不全、糖尿病、高血圧、アルツハイマー病、筋ジストロフィー病など、非常に多岐に及ぶ疾病の予防や、症状の改善に有効であることが報告されている。巷では、メタボリックシンドロームを解消するお茶として、杜仲茶がちょっとした注目を集めている。

この様な古今相変わらぬ茶ブームの中で、特にスポーツ科学の視点から興味を持たれるのが、茶とエネルギー代謝の関連性である。その意味で2005年にMuraseらによって発表された研究成果は実に興味深い(Murase T. et al., Am J Physiol



図1. 薬祖神農 漢方医学と農業の創始者

Regul Integr Comp physiol 288: R708-R715, 2005.)。彼らは4週齢のマウスを対象に、週3回の遊泳運動を10週間に渡って行かせたところ、運動に加えて緑茶の抽出物(Green tea extracts, GTE)を定期的に摂取した群では、運動のみの群に比べて疲労困憊に陥るまでの時間が最大24%長くなることが報告された。翌年には8週間のトレッドミル走においても、GTE摂取によって運動継続時間が非摂取群に比べ30%引き延ばされる事が示され

1 筑波大学大学院人間総合科学研究科体育科学専攻
Tsukuba

2 筑波大学大学院生命環境科学研究科構造生物科学専攻
Tsukuba

Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of

た(Murase T. et al., Am J Physiol Regul Integr Comp physiol 290: R1550-R1556, 2006.)。GTE摂取群においては、骨格筋 β 酸化の亢進、筋グリコーゲンの分解の抑制、乳酸蓄積の軽減、血糖の減少も見られる事から、GTEの摂取によって運動時の脂質代謝が増し、その結果、持久力も向上したと考えられる。このことは緑茶に限らず、脂質代謝を亢進させるような茶と運動の組み合わせが、持久性トレーニングの効果をさらに高める可能性を示唆している。そして、もし茶中から持久力向上に関わる因子が見つければ、様々なサプリメントに応用する事も可能であると考えられる。

では、茶中のどのような成分がどのような作用機序で持久力を向上させるのだろうか？

今日、一般的に飲まれている茶としては、緑茶、烏龍茶、紅茶の3つが上げられる。これらは全てツバキ科の茶葉を原料として作られているが、それぞれ発酵の程度がかなり異なっている。緑茶の場合、新鮮な茶葉を直ちに蒸す事で発酵を完全に停止させるが、逆に紅茶は茶葉を完全に発酵させる。烏龍茶は、ある程度水分が無くなるまで発酵させるので、緑茶と紅茶の中間にあたる。実はこの発酵こそ茶の特性を決定する大切な要素である。というのも、カテキン類を初めとした茶ポリフェノールは発酵過程により大きく構造を変化させるからである。例えば緑茶中にはエピガロカテチンガレート(Epigallocatechin gallate, EGCG)などの低分子ポリフェノールが多く含まれているが、紅茶や烏龍茶の場合、発酵によって低分子ポリフェノールが分解又は酸化重合する為、テアフラビン(Theaflavin)などの高分子ポリフェノールを多く含んでいる。先のMuraseらは、GTEによる持久力向上の一因はGTE中に豊富に含まれているEGCGが脂質輸送タンパク質のmRNAを増加させるからだ、と主張している。

では、緑茶のようにEGCGを多く含んでいるようなお茶を飲んだ方が脂質代謝を促進するのかというと、実はそうでもない。烏龍茶は、中国では昔から「痩せるお茶」として親しまれているが、定期的に摂取する事により、エネルギー消費量の増加、脂質代謝の亢進、脂肪の消化・吸収の抑制、肥満の改善に効果がある事が報告されている。面白い事に、烏龍茶はEGCGやカフェインの量が緑茶のおよそ半分程度であるのにもかかわらず、摂取後のエネルギー消費量は緑茶の場合の2倍

近くまで増加する(Komatsu T. et al., The Journal of Medical Investigation Vol. 50: 170-175, 2003.)。前述した通り、烏龍茶には高分子ポリフェノールが緑茶の数倍豊富に含まれているので、烏龍茶によるエネルギー消費量の増加には、EGCGやカフェインではない、何らかの高分子ポリフェノールが大きく関与していることが示唆される。

烏龍茶によってエネルギー消費量が増加する事は、言い換えればミトコンドリアによる酸化的エネルギー代謝が亢進しているという事になる。筑波大学生物科学系・沼田治教授の研究室から得られた研究結果から、絨毛虫*Tetrahymena*において、烏龍茶から抽出された高分子ポリフェノール(Oolong tea polymerized polyphenols, OTPP)分画が、EGCGを初めとする低分子ポリフェノール類に比べ、ミトコンドリア内膜電位($\Delta\Psi$)を大幅に上昇させることが分かっている。また、 $\Delta\Psi$ の上昇率に相関して細胞内ATP量の増加も見られた事から、OTPP分画はミトコンドリアの酸化的エネルギー代謝を強く促進させると言える。このようなOTPP分画は、ミトコンドリア活性化因子(Mitochondria activation factors, MAF)と呼ばれている。

もし、MAFの摂取により、ミトコンドリアのTCA回路や電子伝達系の酵素が活性化したり、あるいはミトコンドリアの大きさや数が増えたりするならば、これらは正に持久的トレーニング効果の一局面を模倣するものである。更に近年、緑茶の摂取が、骨格筋でのグルコース輸送担体(Glucose transporter 4, GLUT4)による糖取り込みを促進する事が報告されている(Ashida H. et al., Biofactors 22: 135-140, 2004)。だとすれば、「脂質代謝の促進」、「ミトコンドリアの量的・質的変化」、「GLUT4による糖取り込みの促進」というように、もしかしたら複数のお茶や茶ポリフェノールの組み合わせによって、持久性トレーニング効果のかなりの局面をカバーする事が出来るかもしれない。このように、「擬似的運動効果」とも呼ぶべき作用を示すサプリメントがあるとしたら、持久力向上や肥満予防の他に、運動が困難な高齢者や患者に対しても、運動を補助サプリメントとしての処方期待できる。

そこで、本研究ではまずMAFに注目し、単純化されたモデル実験系として筋芽細胞株C2C12から分化したmyotubeを対象に、MAFが骨格筋ミトコンドリアの酸化的エネルギー代謝を促進す

るかどうかを、 $\Delta\Psi$ 及び細胞内ATP量の変化を定量することで検証した。

【実験方法】

①細胞の培養

マウス骨格筋由来筋芽細胞株C2C12を96 well マルチプルウェルプレートで培養し、10%牛胎児血清入りDMEM培地(増殖培地)で1~2日間増殖させた。その後、コンフルエントに達した時点で2%馬血清入りDMEM培地(分化培地)に切り替え、筋管(Myotube)への分化誘導を行った。

②MAFの添加

分化5~6日目の細胞に対して、DMSOで溶解させたMAFを終濃度が5、10、25、50 μ g/mlになるようにDMEM培地に添加して細胞に与え、5時間培養した。これを以下の解析に用いた。なお、本研究ではMAFとEGCGの比較を行うため、EGCGについても同様の濃度で細胞へ与えた。

③Rhodamine123による $\Delta\Psi$ の測定

MAFの $\Delta\Psi$ 上昇作用を評価するために、 $\Delta\Psi$ 依存的に蛍光強度が強くなる蛍光試薬Rhodamine123でミトコンドリアを生体染色し、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

④細胞内ATP濃度の測定

市販のATP測定試薬を用いて、発色強度をルミノメーターで測定した。

【実験結果】

MAFを添加した群では、25、50 μ g/mlの濃度

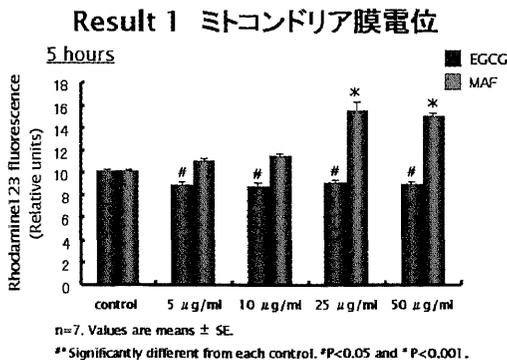


図2. MAFはミトコンドリア膜電位の上昇をもたらした

で有意に $\Delta\Psi$ の上昇が見られた(図2)。又、細胞内ATP量も同濃度で有意に増加したこと(図3)、ミトコンドリアの酸化的エネルギー代謝が促進されたと考えられる。これらは、骨格筋に対するMAFの有効性を支持するものである。

一方、EGCGについては $\Delta\Psi$ 、細胞内ATP量共にコントロール群を下回るか、有意な差が見られず、本実験では有効性が認められなかった。

【今後の課題】

現在、MAFがCytC、COXII、COXIV等のミトコンドリア呼吸鎖関連タンパク質、並びにNRF-1やTfam、PGC-1 α 等のミトコンドリア生合成に関わる転写因子を増加させるかどうか、ウエスタンブロット法、ノザンブロット法、RT-realtime PCR法を用いて検証中である。また、実際にマウスにMAFを摂取させ、脂質代謝の亢進やミトコンドリアの量的・質的变化、そして持久力の上昇が起こるかどうかを検証予定である。

将来的には、MAFやEGCGを初めとして、複数の茶又は茶ポリフェノールの組み合わせが、持久性トレーニングと同様の効果をもたらすかどうかについて研究を進めたいと考えている。

【付記】

本稿は平成17年度学内プロジェクト研究「ポリフェノール中のMAFが骨格筋培養細胞に及ぼす影響」の助成金等により遂行された実験結果の一部を公開したものである。

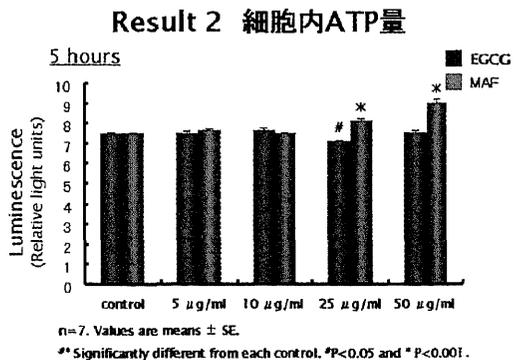


図3. MAFに細胞内ATP量を上げる効果をもつ