

運動が骨格筋ミトコンドリアの活性化を引き起こす際の p38 MAPK による調節機構

武政 徹・池田真一

Mechanism for exercise-induced mitochondrial activation through p38 MAPK

TAKEMASA Tohru, IKEDA Shin-ichi

【研究背景と目的】

持久性運動により、骨格筋ではミトコンドリア量が増加することは古くから知られているが、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。近年、ミトコンドリア増加に関わる重要な因子として、Peroxisome Proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) が着目されたのは、Lin らが 2002 年に Nature に報告した論文の存在が大きい。これは、骨格筋特異的に PGC-1 α を過剰発現するマウスに著明な赤筋化、ミトコンドリア量の増加が認められたというものである。さらに、これ以前にも多くの細胞系で同様の報告がなされたが、これら全ては人為的な方法で遺伝子を操作した結果であり、生理学的条件下で PGC-1 α と遅筋化との関係を示した報告は存在しない。

運動による骨格筋における PGC-1 α の発現に関して、いくつかのシグナル経路の関与が示唆されている。p38 MAPK は様々な生理学的刺激により活性化されるリン酸化酵素であるが、運動などのメカニカルストレスにより p38 MAPK は活性化することが知られている。この活性化が運動による骨格筋の適応に及ぼす意義は未だ不明である。p38 MAPK は myocyte enhancer factor や、activating transcription factor-2 (ATF-2)、CREB などの転写因子を直接リン酸化し、活性化する。これらの転写因子は、PGC-1 α の発現を調節する転写因子である。また、培養骨格筋細胞 C2C12 へ constitutive-active MKK3/6 (p38 MAPK の上流のリン酸化酵

素)を導入すると、PGC-1 α 、mitochondrial mRNA の発現が増加することが報告された。

そこで本研究では、運動による骨格筋におけるミトコンドリア増加のメカニズムとして、PGC-1 α の発現量増加が関与しているかどうか、また、それらの発現増加に p38 MAPK が関与するのかどうかを、*in vivo*、生理学的条件下で検証することを目的とした。

【実験方法】

①実験動物、運動プロトコル

ICR 系雌性マウスは 8 週齢から予備飼育を行い、10 週齢までに実験に用いた。本試験日の 6 日前からトレッドミルによる歩行練習 (5~10m/min、15min) を行った。Study1 として、トレッドミルによる 20m/min、90 分の一過性運動を負荷した。運動終了直後、1、3、6、12、24 時間後に麻酔下で両足から足底筋を摘出した。非運動群 (pre) からも同様に摘出を行った。Study2 では、p38 MAPK の阻害剤である SB203580 を、運動 1、16 時間前に 25mg/kg 腹腔内注射により投与し、study1 と同様の条件で一過性運動を行い、運動終了 1、12 時間後に足底筋を摘出した。対象群には、等量の生理食塩水を腹腔内に投与した。

②分析項目

PGC-1 α タンパク質の発現量の測定には、それぞれ特異的抗体を用いた Western blotting を行った。また、ミトコンドリア mRNA 発現量の測定には

Real-time PCR 法を用いた。また、p38 MAPK の活性を ATF-2 を基質とした *in vitro* kinase assay を行った。

【実験結果】

Study1：一過的トレッドミル走により、マウス足底筋において運動終了 6~12 時間後に PGC-1 α タンパク質の発現増加が認められた (Fig 1A)。次に、ミトコンドリア呼吸鎖、cytochrome c (CYTC)、cytochrome c oxidase subunit IV (COXIV)、ATP synthase β subunit (ATPsyn β) の発現量の検証を行った。驚いたことに、これらの mRNA の発現量変化は二相性の増加を示した (Fig 1B)。第二相 (運動終了 6~12 時間後) の増加は PGC-1 α タンパク質の発現増加とタイムコースが一致していたが、第一相 (運動終了 1 時間後) では PGC-1 α の増加が認められなかった。このことは、ミトコンドリアの増加は PGC-1 α の発現量増加が必須であろうという考えに反するものであった。この二相性の増加は呼吸鎖 mRNA に特異的であり、CPT-I では認められなかった。

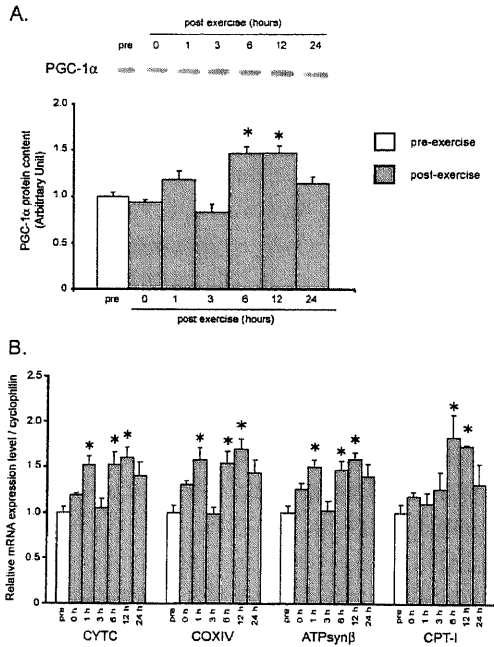


Fig. 1

Study2：一過的トレッドミル走により、運動終了直後に p38 MAPK の活性化が認められたが、これは運動前に SB203580 を投与することにより抑制された (Fig 2A)。

さらに、SB203580 の投与により、一過性運動終了 12 時間後に認められた PGC-1 α タンパク質の増加が認められなくなった (Fig 2B)。このことから、運動による骨格筋における PGC-1 α の発現増加には、p38 MAPK の活性化が必要であることが示唆された。

上述の通り、一過性運動により、骨格筋において呼吸鎖 mRNA は二相性の増加を示すことが明らかになった。SB203580 の投与により、両相の増加が抑制された (Fig 3)。このことから、一過性運動による呼吸鎖 mRNA の増加においても、p38 MAPK の活性化が必要であることが示された。また、Fig 2B と Fig 3 から、呼吸鎖 mRNA の第 2 相においては、p38 MAPK の活性化が PGC-1 α の発現量を増加させ、それにより、呼吸鎖 mRNA の発現が亢進するということが示唆され、この知見を生理学的条件下で得ることが出来た。しかしながら、第 1 相においては上記の流れが当てはまらないことも明らかになった。

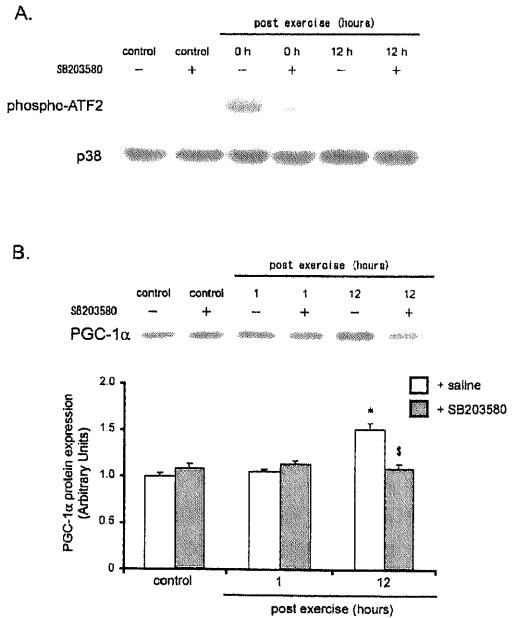


Fig. 2

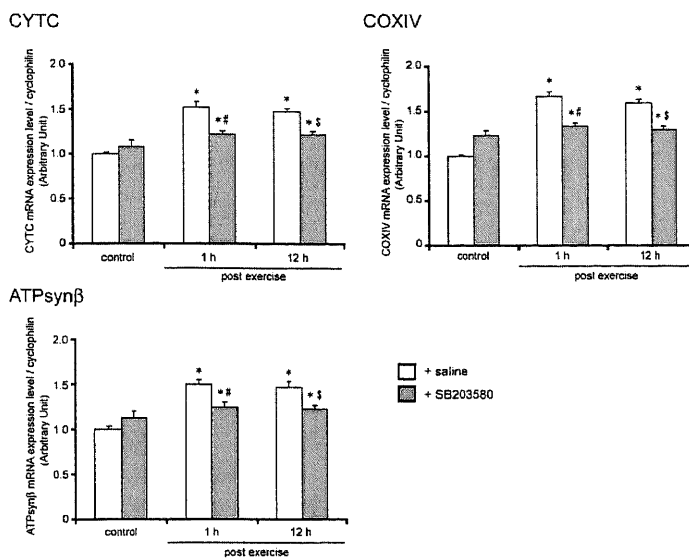


Fig. 3

【今後の課題】

遺伝子操作により「PGC-1 α の発現量増加は遅筋化という現象を引き起こし、ミトコンドリアが増加する」ことが報告されてきた。また、同様に遺伝子操作による p38 MAPK の活性化は、PGC-1 α の発現増加を引き起こすことも示されてきた。本研究において、我々は一過性運動という生理学的条件下で「運動刺激→p38 MAPK→PGC-1 α →遅筋化」というシグナルカスケードを明らかにした。さらに、PGC-1 α の発現量増加を伴わずとも、呼吸鎖 mRNA の増加が起こることを発見した（第 1 相）。しかしながら、本研究では、第 1 相における呼吸鎖 mRNA 発現増加のメカニズムに関しては、p38 MAPK が関与するという以外は明らかに

できなかった。PGC-1 α は転写共役因子であり、核に局在すると報告がある。しかし、我々は、少なくとも骨格筋細胞においては、細胞質に存在し、メカニカルストレスにより、その局在を核へと移行することを見出している。今後は、PGC-1 α の核移行と呼吸鎖 mRNA 発現の関与、また移行を制御する因子の探索を行っていく必要があり、現在研究を進めている。

【付記】

本稿は平成 18 年度学内プロジェクト研究「運動が骨格筋ミトコンドリアの活性化を引き起こす際の p38 MAPK による調節機構」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。