

氏名	武田 紘平		
学位の種類	博士（学術）		
学位記番号	博乙第	2848	号
学位授与年月	平成	29年	10月 31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	運動時のアンモニア代謝とパフォーマンスに関する研究 - 骨格筋アンモニアトランスポーターの関与 -		
主査	筑波大学 教授	理学博士、博士（医学）	武政 徹
副査	筑波大学 教授	医学博士	大森 肇
副査	筑波大学 准教授	博士（学術）	麻見 直美
副査	筑波大学 教授	博士（体育科学）	前田 清司
副査	筑波大学 名誉教授	学術博士	西平 賀昭

論文の内容の要旨

武田紘平氏の博士学位論文は、運動時の疲労物質としてアンモニアに注目し、主に動物実験を用いて、アンモニアの生成や代謝のメカニズムを精査したものである。その要旨は以下のとおりである。

運動は疲労を引き起こし、パフォーマンスの低下を招く。その要因の一つがアンモニアである。運動時、アンモニアはATP再合成の過程でAMPがIMPへと代謝される際に骨格筋で生成される。アンモニアは血中へと放出されるが、その大半は肝臓の尿素回路で無毒の尿素へと代謝されている。運動時の血中アンモニア上昇を抑制することでパフォーマンス向上につながると考えられるが、骨格筋におけるアンモニア代謝の分子メカニズムについては不明な点が多く、特に、アンモニアの輸送に関しては全く検討されていない。近年、アンモニアを特異的に輸送するトランスポータータンパク質であるRhesus B glycoprotein (Rhbg) と Rhesus C glycoprotein (Rhcg) が腎臓や肝臓などで発現していることが報告されている (Seshadri *et al.*, 2006.; Weiner *et al.*, 2003.)。これらタンパク質はアンモニアの組織からの放出ならびに組織への取り込みを担っている。運動時のアンモニア生成源である骨格筋においても、これらタンパク質が発現していることは十分考えられる。また、これらタンパク質が運動時の血中アンモニアならびにパフォーマンスに及ぼす影響については不明である。以上のことをふまえ、著者は本博士論文で、運動時のアンモニア代謝について、骨格筋のアンモニアトランスポータータンパク質 Rhbg と Rhcg に着目し

た。著者は骨格筋での Rhb_g と Rhc_g の発現動態を解析し、血中アンモニア上昇を伴う運動時のパフォーマンスにこれらタンパク質がどのように関与するのかを明らかとすることを目的として実験を行った。

【研究課題 1】 骨格筋におけるアンモニアトランスポータータンパク質の発現

研究課題 1 で著者は、骨格筋における Rhb_g と Rhc_g の発現動態について明らかとすることを目的とし、実験を行った。ICR マウス（雄、8 週齢）の骨格筋を摘出し、ウェスタンブロット法により Rhb_g、Rhc_g タンパク質量を定量した。また、免疫組織蛍光染色法を用いて、Rhb_g と Rhc_g の局在について解析を行った。ウェスタンブロットの結果、著者は Rhb_g タンパク質量は速筋線維の割合の多い足底筋、腓腹筋に比べ、遅筋線維の割合の多いヒラメ筋で発現量が有意に高値を示すことを発見した。Rhc_g タンパク質量も、足底筋、腓腹筋と比較し、ヒラメ筋で発現量が多かった。免疫組織蛍光染色の結果、Rhb_g タンパク質は細胞膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンと重なる染色パターンを示した。一方、Rhc_g はジストロフィンとは重ならずドット状の染色パターンを示した。そこで、血管内皮細胞マーカーである CD31 と共染色を行ったところ、Rhc_g 陽性な染色と重なるように CD31 陽性な染色が確認された。本研究課題において、著者は骨格筋における Rhb_g と Rhc_g の発現を初めて確認した。両タンパク質は遅筋の割合の多いヒラメ筋で発現が多かった。先行研究において、局所運動時に活動筋で生成されたアンモニアが非活動筋で取り込まれ、代謝されていることが報告されている (Bangsbo *et al.*, 1996.)。本研究課題の結果と合わせ、運動時、Rhb_g と Rhc_g は骨格筋からのアンモニア放出だけでなく、アンモニアを骨格筋に取り込む役割も担っており、骨格筋でのアンモニアの無毒化に関与していると著者は考えた。一方で、Rhb_g と Rhc_g タンパク質の局在は異なることも示した。Weiner らは肝臓の Rhb_g と Rhc_g タンパク質の局在と機能が異なることを報告している (Weiner *et al.*, 2003.)。今後は、骨格筋における Rhb_g と Rhc_g の機能についての解析も必要であると思われる。

【研究課題 2】 高強度運動に伴う疲労の抑制と骨格筋アンモニアトランスポータータンパク質の関与

[研究課題 2-1] 高強度運動時の疲労に及ぼすシトルリン摂取の影響と骨格筋におけるアンモニアトランスポータータンパク質の関与

研究課題 2-1 で著者は、運動時のアンモニア代謝を促進するサプリメントとしてシトルリンを採用し、実験を行った。シトルリンはアルギニン、オルニチンと共に肝臓での尿素回路を構成するアミノ酸として機能している。先行研究において、オルニチン、アルギニン、シトルリンの混合物をラットに摂取させ、疲労困憊までの泳運動を行わせたところ、血中アンモニアの増加を抑制し、運動時間が有意に延長したことが報告されている (Meneguello *et al.*, 2003.)。しかしながら、運動時のアンモニアとパフォーマンスに対して、これらアミノ酸単体の摂取効果については一致した見解は得られていない。そこで著者は、シトルリン摂取が運動時の血中アンモニアとパフォーマンスならびに骨格筋でのアンモニアトランスポータータンパク質の発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。ICR マウス（雄、8 週齢）をコントロール (Con) 群、運動 (Ex) 群、コントロール+シトルリン (Con+Cit) 群、運動+シトルリン (Ex+Cit) 群の 4 群に分けた。Con+Cit 群と Ex+Cit 群の 2 群には、蒸留水に 50 mg/ml の濃度に溶解したシトルリンを体重 1 kg あたり 250 mg になるようにゾンデを用いて 7 日間、毎日投与した。Con 群、Ex 群の 2 群には Con+Cit 群と Ex+Cit 群と同量の蒸留水を同様の投与方法で投与した。実験開始 7 日目に Ex 群、Ex+Cit 群の 2 群に対して、体重の 5% の負荷をマウスの尾部に付け、疲労困憊までの泳運動を実施した。著者はマウスの鼻が 5 秒以上連続して水中に沈み、呼吸ができなくなったところで、疲労困憊

と判断し、血液と骨格筋を採取した。運動時間は Ex 群と比較し、Ex+Cit 群は約 1.67 倍の有意な延長を示した。著者の解析によると、血中アンモニアについては、Ex 群は Con 群と比較し、有意な増加がみられたが、Ex+Cit 群では変化は認められなかった。骨格筋のアンモニアトランスポータータンパク質 Rhbg と Rhcg 発現量はシトルリン摂取では変化していなかった。また、骨格筋でのアンモニア生成に関わる AMPD (AMP deaminase) と無毒化に関わる GS (Glutamine synthetase) タンパク質量についてもシトルリン摂取による有意差は認められなかった。本研究課題より、著者はシトルリン摂取は一過性運動による血中アンモニア上昇を抑制し、パフォーマンス向上をもたらすことを示した。しかしながら、骨格筋でのアンモニアに関わる Rhbg、Rhcg、AMPD、GS タンパク質量には影響を与えないことも示した。

[研究課題 2-2] 高強度運動時の疲労に及ぼすトレーニングの影響と骨格筋におけるアンモニアトランスポータータンパク質の関与

研究課題 2-2 で著者は、6 週間の異なる強度のトレーニングが運動時の血中アンモニア、パフォーマンスならびに骨格筋のアンモニアトランスポータータンパク質に及ぼす影響を明らかにすることを目的に実験を行った。ICR マウス (雄、8 週齢) を通常飼育 (Con) 群、持久性トレーニング (END) 群、高強度インターバルトレーニング (HIIT) 群の 3 群に分けた。END 群は無負荷の泳運動を 30-90 分実施した。HIIT 群は体重の 10% の負荷を尾部に付け、20 秒の泳運動を 10 秒の休息を挟み、10-12 セット繰り返した。トレーニングは週 5 日、6 週間実施した。最後のトレーニングから 24 時間後に、泳運動のパフォーマンスを評価するパフォーマンステストを実施した。パフォーマンステストは体重の 9% の負荷を尾部に付け、疲労困憊までの泳運動とした。パフォーマンステスト終了後、血液と骨格筋をサンプリングした。著者の解析によると、パフォーマンステストの結果、Con 群と比べ、END 群と HIIT 群は疲労困憊までの運動時間が長く、特に HIIT 群では有意な差があった。血中アンモニアは、パフォーマンステストにより全ての群で有意に上昇した。しかしながら、Con 群はトレーニングを実施した END 群と HIIT 群よりも有意に高い値であった。骨格筋の Rhbg と Rhcg タンパク質量はトレーニングを実施した 2 群では変化しなかった。AMPD タンパク質量についてもトレーニングで変化しなかったが、GS タンパク質量はヒラメ筋と腓腹筋において END 群で有意に増加していた。著者は本研究課題より、6 週間のトレーニング実施はパフォーマンス向上ならびに疲労困憊時の血中アンモニア上昇の抑制をもたらすことを示した。しかしながら、骨格筋の Rhbg と Rhcg タンパク質量は変化しなかった。先行研究により、トレーニングを実施することで筋収縮刺激後における骨格筋でのアンモニア生成が減少することが報告されている (Dudley *et al.*, 1987.)。また、継続したトレーニングはミトコンドリア新生や酸化的代謝酵素の増加などのエネルギー代謝の適応が起こることが知られている。著者はトレーニングにより、これら適応が骨格筋で起こることで運動時の血中アンモニア低下につながったと考えた。

本博士論文で著者は、骨格筋でのアンモニアトランスポータータンパク質の発現動態を明らかにすること、血中アンモニア上昇を伴うような高強度運動時のパフォーマンスにこれらタンパク質がどのように関与するのかを明らかにすることを目的とし、研究を行った。その結果、アンモニアトランスポータータンパク質 Rhbg と Rhcg が骨格筋に発現していることを明らかにしたが、シトルリン摂取とトレーニング実施でアンモニアトランスポータータンパク質量に変化は見られなかった。このことから、生体は常に余裕を持って生成アンモニアの膜転移を準備していることを示唆していると考えられた。また、Wilkinson らは、運動時に骨格筋で生成されたアンモニアは全てが細胞外に放出されるわけではなく、細胞内にある程度蓄積されていることを報告している。その理由として、多量のアンモニアが短時間に血液中に放出されると、他の臓器や組織へとアンモニアが運ばれ、悪影響を及ぼすためだと説明している (Wilkinson *et al.*, 2010.)。このことから著者は、運動時、骨格筋は自ら GS によりアンモニアを無毒化するとともに、アンモニア放出を制限するために、骨格筋トランスポータータンパク質は変化しない可能性も考えた。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文は、長年の水泳競技生活の中で運動時の疲労の軽減とそれによるパフォーマンスの向上について興味を抱いた著者が、疲労物質としてアンモニアに注目し、主に動物実験を用いて、アンモニアの生成や代謝のメカニズムを精査したものである。著者は骨格筋でアンモニアの輸送に関わる2種類のアンモニアトランスポータータンパク質の発現を世界で初めて明らかにした。さらに、アンモニアを解毒するオルニチン回路の構成物質であるシトルリンの摂取が、運動パフォーマンスを高め、疲労困憊時の血中アンモニアの上昇を抑制することを発見した。トレーニング自体にもこのような効果があることも明らかにしたが、高い競技力が期待されるトップアスリートに対して、シトルリンはパフォーマンスを向上させるシナジー効果を持つ有効なサプリメントになり得ることを示唆した。

平成29年8月1日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。