

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10809

研究課題名(和文) 運動負荷/除負荷に適応した骨格筋ミトコンドリアの超解像度顕微鏡解析

研究課題名(英文) Effects of exercise and atrophy on skeletal muscle mitochondria

研究代表者

武田 紘平 (Kohei, Takeda)

明治大学・政治経済学部・専任講師

研究者番号：00807349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋線維内のミトコンドリア構造について光学顕微鏡システムを用いて観察した。坐骨神経切除による筋萎縮時のミトコンドリア構造は、坐骨神経切除から数日で筋線維短軸方向のミトコンドリアシグナルが消失し、ミトコンドリア構造が崩壊したことが明らかとなった。後肢懸垂による筋萎縮時と同様のミトコンドリア構造の適応が観察された。後肢懸垂後に再接地し、筋重量を回復した際のミトコンドリア構造も確認したが、筋萎縮時と同様の構造をしており、筋重量の回復とミトコンドリア構造はリンクしていないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として光学顕微鏡システムで骨格筋に存在するミトコンドリアを直接観察することが可能となった。また、筋萎縮時に起きるミトコンドリア構造の変化の一端について新たに示すことができた点に学術的意味がある。

今後はこの手法を用いることで糖尿病や加齢が骨格筋ミトコンドリア構造に及ぼす影響について明らかとすることを旨とする。また、ミトコンドリア構造に限らず筋線維内の種々のタンパク質局在についても解析することができるため更なる研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to observe the mitochondria structure in skeletal muscle using an optical microscope system. Muscle atrophy by sciatic denervation induced elimination of transverse mitochondria in muscle fiber. Similar results showed by hindlimb suspension induced muscle atrophy. Though the muscle weight recovery of atrophy by reloading, disorganized mitochondria structure was observed. These results indicate that the change of mitochondria structure do not coincide with muscle weight recovery.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋ミトコンドリアは、筋収縮に必須な ATP を作る細胞内小器官のため、運動や除負荷などの外的刺激に対する適応の解析対象としてよく研究されてきた。ミトコンドリア量やミトコンドリア形態（ミトコンドリア間の融合と分裂）を制御する分子メカニズムが明らかとなり、外的刺激はこれら分子の発現を変化させることで、骨格筋ミトコンドリアの量的・形態的な適応をもたらすことが示されている (Drake *et al.*, *FASEB*, 2016)。しかしながら、先行研究の大半は骨格筋サンプルをすりつぶす生化学的手法を用いているため、「筋線維内でミトコンドリアが立体的にどのように存在していて、外的刺激に応じてその構造がどう変化するか」は不明である。近年、光学顕微鏡が発達し、電子顕微鏡に匹敵する解像度で対象物を観察することが可能となった。そこで光学顕微鏡システムを用いることで生体に存在する状態の骨格筋ミトコンドリア形態を 3 次元的に評価することが可能ではないかと着想に至った。

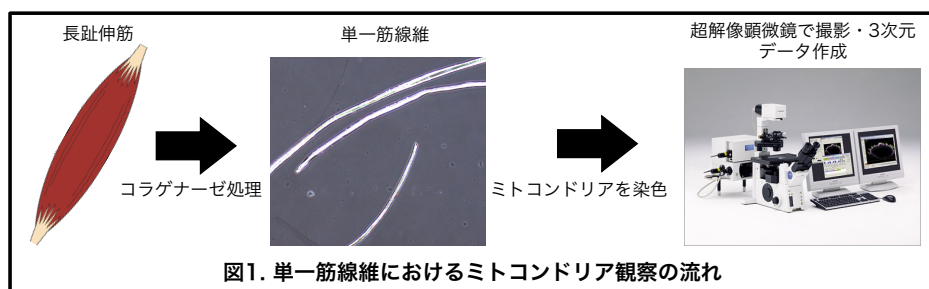
2. 研究の目的

本研究の目的は、超解像顕微鏡を用いて骨格筋のミトコンドリアを生体に存在する状態で可視化する手法を確立し、運動負荷や除負荷に伴うミトコンドリア構造の適応を明らかとすることである。骨格筋ミトコンドリアは持久性トレーニングや除負荷により量ならびに形態が変化することが示されているが、本手法を用いることでこれらの適応の 3 次元的な視覚データを可視化し、新たな観点から骨格筋ミトコンドリア適応を提示することを目指した。

3. 研究の方法

(1)マウス単一筋線維ミトコンドリア染色条件の確立

C57BL/6 マウス (オス、6 週齢) の長趾伸筋を摘出し、コラゲナーゼ処理により単一筋線維を採取した。単一筋線維を MitoTracker Red で染色し、4% パラフォルムアルデヒドで固定した。免疫蛍光染色法により、Z 板マーカーである α -アクチニン抗体で染色した。その後、超解像顕微鏡を用いて、筋線維を Z 軸方向に連続して撮影し、3 次元データを作成した (図 1)。



(2)持久性トレーニングによるミトコンドリア形態適応評価

C57BL/6 マウス (オス、8 週齢) を通常飼育する Con 群、ランニングホイール付きケージで 4 週間飼育する Ex 群に分けた。実験期間終了後、長趾伸筋とヒラメ筋を摘出し、単一筋線維を MitoTracker Red で染色した。その後、超解像顕微鏡を用いて、筋線維を Z 軸方向に連続して撮影し、3 次元データを作成した。

(3)除神経による骨格筋ミトコンドリアの形態適応評価

C57BL/6 マウス (オス、週齢) の片足に対し、座骨神経を切除する除神経手術 (Den) を実施した。また、手術を行わない足は偽手術 (Sham) とした。手術後 4、7、14 日後に長趾伸筋を摘出し、単一筋線維を採取した。MitoTracker Red でミトコンドリアを染色し、超解像顕微鏡を用いてミトコンドリア構造の 3 次元データを取得した。

(4)後肢懸垂および再接地による骨格筋ミトコンドリア形態適応評価

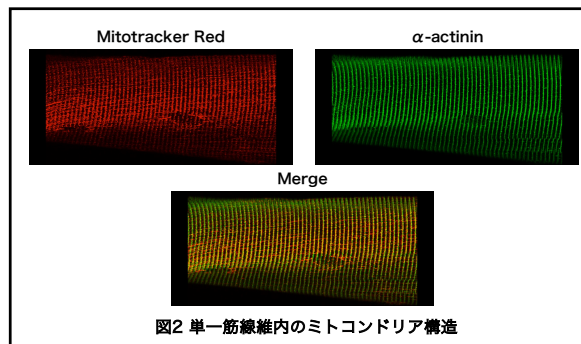
C57BL/6 マウス (オス、8 週齢) を通常飼育 (Con) 群、2 週間の後肢懸垂 (HS) 群、2 週間の後肢懸垂+1 週間の再接地 (RL) 群の 3 群に分けた。ヒラメ筋を摘出し、MitoTracker Red でミトコンドリアを染色し、超解像顕微鏡を用いてミトコンドリア構造の 3 次元データを取得した。

4. 研究成果

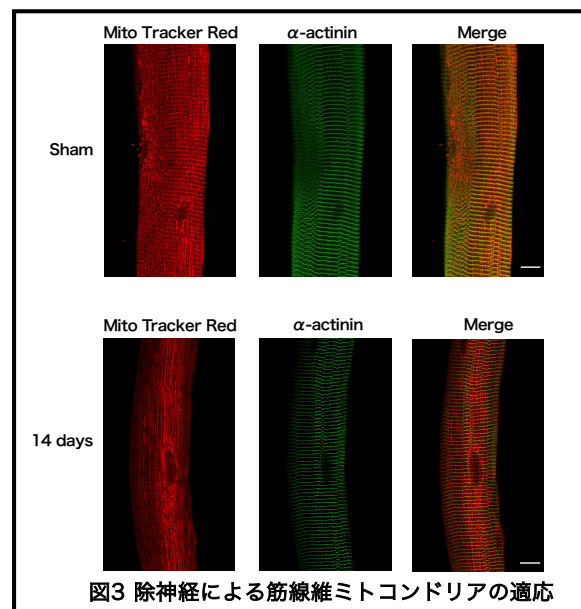
(1)マウスの単一筋線維内のミトコンドリアを染色し撮像した結果、筋線維長軸・短軸方向にミトコンドリアが局在していることが確認できた。特に、短軸方向のミトコンドリアは一定間隔に

配置していることがわかった。そこで、 α -アクチニンと共染色した結果、短軸方向のミトコンドリアは α -アクチニン近傍に局在していることが明らかとなった (図2)。

(2)Ex 群の平均走行距離は 8089m/日であった。骨格筋ミトコンドリア構造を観察したところ、Con 群と Ex 群間に明確な差は認められなかった。

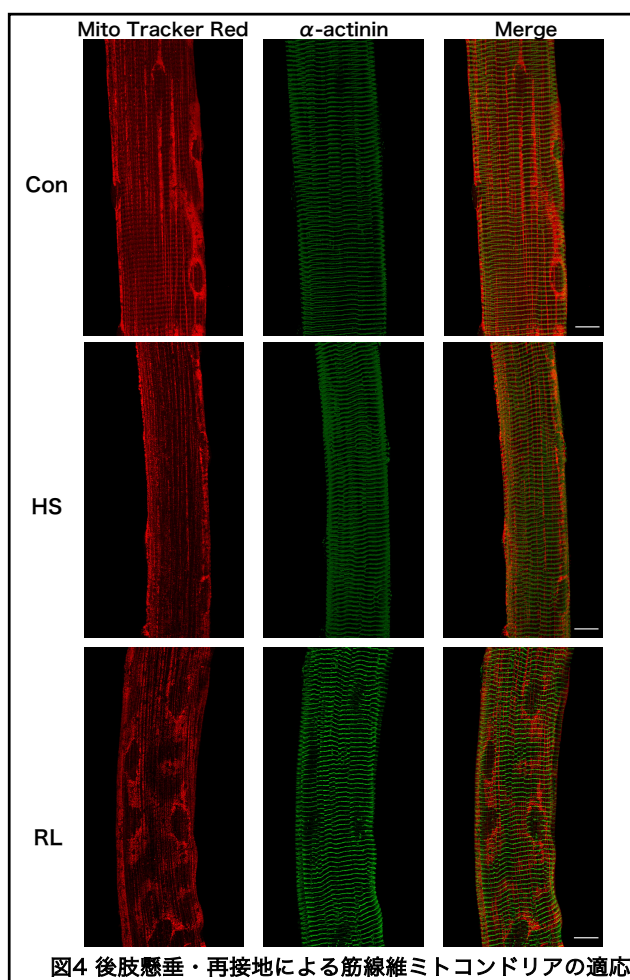


(3)長趾伸筋湿重量は Sham 群と比較し除神経 14 日後に有意に低下していた。Sham の骨格筋では(1)と同様ミトコンドリアのシグナルが筋線維短軸方向、長軸方向に確認され、核周辺ではこのシグナルが強いことを確認した。除神経手術 4 日後に Sham で観察された筋線維短軸方向のミトコンドリアのシグナルが消失したが、長軸方向のシグナルは残っていた。この筋線維長軸方向のミトコンドリアシグナルは手術 14 日後まで残存していた (図3)。



(4)遅筋有意のヒラメ筋湿重量は Con 群と比較し、HS 群で有意に低下していたが、RL 群では Con 群と同等まで回復していた。一方、速筋有意の足底筋では後肢懸垂による筋湿重量の低下は認められず、Con 群、HS 群、RL 群に有意差はなかった。

HS 群のヒラメ筋ミトコンドリア構造は Z 膜近傍で崩壊しており、(3)で示した除神経の結果と同じであった。RL 群のミトコンドリア構造は HS 群と同じく崩壊したままであった。足底筋のミトコンドリア構造は Con 群と HS 群、RL 群間に違いが認められなかった (図4)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kohei Takeda, Yu Kitaoka, Koichi Watanabe, Shumpei Miyakawa, Martin R. Lindley and Tohru Takemasa	4. 巻 7
2. 論文標題 Effects of eicosapentaenoic acid intake on denervation-induced mitochondrial adaptation in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Phys Fitness Sports Med	6. 最初と最後の頁 261-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.7.261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kohei TAKEDA, Yu KITAOKA and Tohru TAKEMASA	4. 巻 24
2. 論文標題 High-intensity Intermittent Swimming Training Increases Mitochondrial Dynamics Proteins in Mouse Skeletal Muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv. Exerc. Sports Physiol	6. 最初と最後の頁 13-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kohei Takeda, Kaoru Kato, Tohru Takemasa
2. 発表標題 Effect of Sciatic Denervation on Mitochondrial Structure in Single Muscle Fiber
3. 学会等名 European College of Sports Science Congress Prague 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田紘平、武政徹
2. 発表標題 後肢懸垂および再接地が骨格筋ミトコンドリアダイナミクスに及ぼす影響
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田紘平、加藤薫、武政徹
2. 発表標題 後肢懸垂および再接地による骨格筋ミトコンドリア構造適応の3次元解析
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田紘平
2. 発表標題 筋萎縮に伴う骨格筋ミトコンドリア構造の適応
3. 学会等名 第11回分子骨格筋代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田紘平、石山静葉、加藤薫、武政徹
2. 発表標題 除神経による筋線維ミトコンドリア構造適応の超解像顕微鏡解析
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------