

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 21日現在

機関番号：13903

研究種目：若手（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700648

研究課題名（和文） 骨格筋の酸素輸送単体の発現とミトコンドリア呼吸活性への作用機序

研究課題名（英文） Effect of oxygen carrier (myoglobin) expression on mitochondrial activity

研究代表者

花井 淑晃 (HANAI YOSHITERU)

研究者番号：50360730

研究成果の概要（和文）：

本研究では、骨格筋細胞内環境における主要な酸素輸送単体であるミオグロビンタンパクと、その主要な酸素供給先であるミトコンドリアとの関連性について検討を行うことを目的とした。酸化能や筋線維組成が異なる様々なラット骨格筋間で、ミオグロビン量とミトコンドリア関連タンパクとの発現は概ね正の比例関係にあった。培養筋芽細胞をもちいた検討では、両者の関係性を検討するモデルの構築にはいたらなかった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the present study was to investigate the relationships between muscular oxygen carrier, myoglobin, and the main target for oxygen delivery, mitochondria. Among various rat skeletal muscles, those differ with contractile property or oxidative capacity, the expression levels of myoglobin and mitochondria-related proteins showed positive relationships. In the cell culture model, we could not establish an effective experimental model for further analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1600000	480000	2080000
23年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：ミオグロビン、骨格筋、

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 筋細胞内酸素ダイナミクス研究の学術的背景

生体細胞内における有酸素性エネルギー代謝の中心的細胞内小器官であるミトコンドリアの活性を保つためには、細胞内への円滑な酸素（O<sub>2</sub>）供給機構が必要であり、この生理学的課題は欧米諸国を中心に今日で

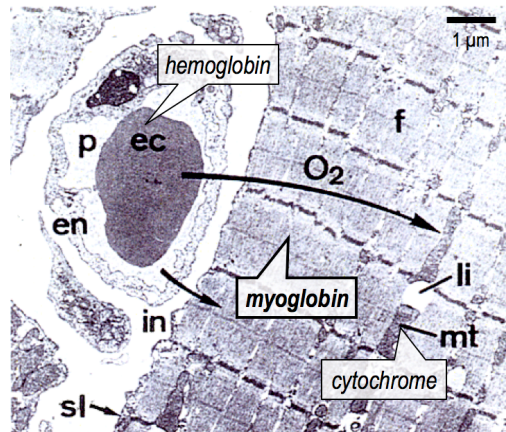
も重要視されている。ミトコンドリアの正常な活性に不可欠とされる O<sub>2</sub> 供給機構に関わる生理学的規定因子には、血流の他 (Poole et al. 2008)、細胞内の O<sub>2</sub> 拡散性が含まれているとされる (Chung et al. 2005, cf: 次ページ右図/上)。

これまで、Masuda らのグループは、細胞内の O<sub>2</sub> 拡散を規定するものとしてミオグロ

ビンタンパクに注目し、身体活動の種類や増減（トレーニング）によって骨格筋ミオグロビンタンパク量が変動することを生化学的・組織学的に明らかにした (Masuda et al. 1996, 1999)。さらに、Masudaらは、近年、このミオグロビンの増減と筋組織や細胞レベルでの酸素利用能力の関連性を明らかにするため、近赤外線分光法 (NIRS) や核磁気共鳴法 (MRS) を用いてミオグロビンの生理機能の側面を酸素化・脱酸素化の側面より検証を行ってきた。その結果、これまで考えられてきたものとは異なり、筋収縮活動の開始直後からミオグロビンが  $O_2$  を解放していること、ミオグロビンの  $O_2$  解離はミトコンドリアの  $O_2$  要求 (需要) に応じて生じること、また、このミオグロビンの  $O_2$  解離は、筋細胞が低酸素化していない状況 (細胞内の酸素分圧が低下していない状況) でも起こっていること、等の実験的証拠を得てきた (Masuda et al. 2008, Takakura et al. 2009, cf. 右図/中)。

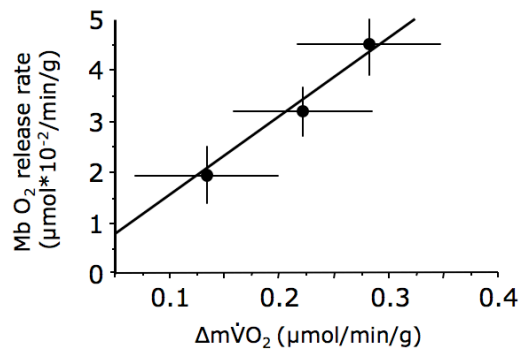
しかしながら、筋細胞内のミオグロビンタンパクの発現量と上述の生理的現象 (細胞内の酸素ダイナミクス) との関連性については不明のままであるため、細胞質におけるミオグロビンタンパクの発現意義を再検討するためにも、また、末梢組織での酸素運搬/供給システムの全容を明らかにするためにも、ミオグロビンの生理的機能をこれまでの概念とは異なる新たな切り口によって明らかにする必要がある。

筋細胞内におけるミオグロビンタンパクの存在意義についての議論を再燃したのは、ミオグロビン欠損マウスの報告である (Garry et al. 1998, cf. 右図/下)。ミオグロビン欠損マウスには、大方の予想とは異なって、生命活動上、特に問題となるような表現型は観察されなかったものの、組織化学的、生理・生化学的分析においては、毛細血管の増殖や筋線維の萎縮、血液量の上昇など、様々な代償作用が生じていたことが後に報告された (Grange et al. 2001)。これらは、ミオグロビンという酸素単体の消失を補って、細胞内の酸素環境を正常に保つための代償作用であると考えられることができる。逆に考えると、このような代償作用の惹起はミオグロビンがミトコンドリアへの酸素供給に対して生理的役割を担っていることの間接的証拠であるとも言える。また、アシカなどの海中ほ乳類の骨格筋、あるいは陸上ほ乳類の抗重力筋などの有酸素性代謝能力の高い筋には高濃度のミオグロビンが含まれる (Masuda et al. 2001) とされ、さらに、ミトコンドリアでのヘムの合成過程の報告 (Maclean 1978) や、ミトコンドリアを対象としたプロテオーム解析の研究結果からも、ミトコンドリアとミオグロビンの密接な関

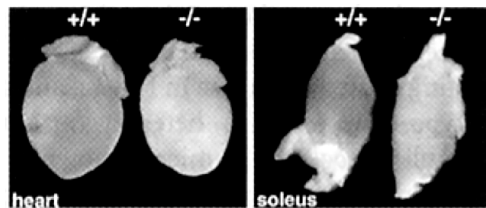


ec: erythrocyte, en: endothelium, f: myofibrils, in: internal space, li: lipid droplets, mt: mitochondria, p: plasma, sl: sarcolemma  
In Oxygen and substrate pathway V

筋細胞内への酸素供給に対する酸素結合担体  
血液中のヘモグロビンからミトコンドリアのシトク  
ロムの間立つミオグロビンの生理的意義は？



酸素摂取量とMbからの $O_2$ 解放流量  
(Takakura et al. 2009, under review)  
筋収縮時、細胞の呼吸活性の上昇に伴ってMbがより多くの $O_2$ を解放する。この時、筋細胞内 $O_2$ 分圧は急激に低下する。



Mb knock-out mice (Garry DJ, et al. Nature 1998). Mb<sup>-/-</sup>マウスは、発育発達、運動疲労耐性、生殖、等に問題無しとされていたが、Mb欠損を補うための代償作用が生じていた。

連性が示唆されている。しかしながら、ミトコンドリアとミオグロビンとの発現機序の詳細は不明のままである。つまり、古くに立体構造が明らかにされたミオグロビンではあるが、生体内での機能、とりわけ、ミトコンドリアとの機能的関連性については不透明なタンパクであり、『なぜ、筋細胞にミオグロビンが必要なのか?』『なぜ、心筋や骨格筋の遅筋タイプにミオグロビンが多い

のか?』 『なぜ、ミオグロビンが存在すると酸素運搬・酸素代謝に有利なのか?』などの根本的な疑問に対する生物学的・運動生理学的な解明は未だなされていない状況である。

そのような中で、先述の Masuda らのグループの実験結果(先図/中)は、旧来の認識(細胞質の O<sub>2</sub> 貯蔵体であり、細胞質の低酸素化にともない O<sub>2</sub> を放出する)に基づくミオグロビンの生理機能とは矛盾し、旧来考えられているよりも積極的にミオグロビンが細胞内で振る舞っている可能性を示唆し、近接領域の研究者が関心を寄せるところとなっている。さらにこの現象のメカニズムの詳細を明らかにするためには、細胞生物学的・分子生物学的手法によってタンパク間の相互連関について検証する実験系が必要であると考えられる。

## (2) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点

これまで、骨格筋を対象として、ミオグロビタンパクとミトコンドリア生合成との関連性に着目し、その生理的役割、ならびに、それに関連する細胞内 O<sub>2</sub> 供給機構の詳細について細胞生物学的、および生理・生化学的手法を用いて、検討した研究は報告されていない。

骨格筋の酸化能力の獲得、あるいは適応の上で、ミトコンドリアのバイोजェネシスとミオグロビタンパクの発現には密接な関連性がある。ヘムの合成はサイトゾルとミトコンドリアで行われることから (Maclean 1978)、筋細胞の発達過程ではミトコンドリアの発現後にミオグロビタンパクの増加が生じると予想される。一方、筋線維の酸化能力の適応機序においては、収縮時の Ca<sup>2+</sup> の増加を契機とした calcineurin-NFAT 系の関与が示唆されているが、これは Mb の発現を強く惹起する (Chin et al. 1998)。さらに、ミトコンドリアプロテオーム解析でもミオグロビンとの関連が確認できる (Taylor et al. 2003, Mootha et al. 2003)。このように、骨格筋の基質酸化能力の発達・適応の過程において、ミトコンドリアの増加とミオグロビタンパクの発現には強い関連が認められるが、その機能的・構造的関連の詳細な分子機構について解明しようとする研究は本研究が最初の試みとなり、極めて独創性の高い知見が得られるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、骨格筋細胞の細胞質における主要な酸素運搬単体である、ミオグロビタンパクの生理学的意義について明らかにすることを目的とする。特に、骨格筋細胞内のミオグロビタンパクの発現レベルと、その筋

のミトコンドリア量やミトコンドリア生合成過程との関連性を明らかにするために、ラット骨格筋、および、培養骨格筋細胞を用いてミオグロビンとミトコンドリア関連タンパクの発現の関連性について検討を行うものである。

## 3. 研究の方法

(1) 実験材料とサンプリング：実験には成熟 (15 週齢) SD 系雄性ラットを用いた。一週間の予備飼育の後に、ペントバルビタール麻酔下にて、下肢より被検筋を摘出した。対象とした骨格筋は、筋線維組成や基質酸化能の違いによってミオグロビン、およびミトコンドリア含量の著しく異なる種々の筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋表層部、腓腹筋深層部、前脛骨筋表層部、前脛骨筋深層部、長指心筋) とした。摘出筋を秤量し、洗浄後、一定重量の筋を切り分け、分析までディープフリーザー (-80°C) にて保存した。

培養筋芽細胞には市販のラット由来 L6 培養筋芽細胞を用いた。ベクター構築、遺伝子導入、および筋芽細胞培養の手法については連携研究者である金沢大学の増田和実教授の協力を得て行った。

実験に使用した一般的な生化学試薬、抗体等は Sigma、WAKO、abcam、santa cruz 等より購入した。

(2) タンパク発現量の定量：骨格筋におけるタンパク (ミオグロビン、PGC-1 $\alpha$ 、Tfam、NRF 等) の発現レベルの定量にはウエスタンブロッティング法を用いた。凍結保存しておいた筋サンプルを、ポリトロン社製ホモジナイザーを用いて、バッファー中でホモジナイズし、遠心分離により不溶成分を沈殿させて上清と分離した。上清部分の蛋白濃度をタンパク測定キット (Bio-rad 社製) により測定し、水溶性タンパクサンプルとした。このタンパクサンプルをアクリルアミドゲル電気泳動後に PVDF メンブレンにブロッティングを行い、各タンパクに特異的な抗体、および酵素結合の二次抗体と反応後に ECL 試薬 (GEヘルスケア社製) を用いて蛍光検出を行い、X線フィルムに露光した。露光したフィルムはスキャナーをによりコンピュータに取り込み、反転画像の光学的密度を画像解析ソフトにて分析し、並行して分析をおこなった内部コントロールタンパク (骨格筋  $\alpha$  アクション) のシグナルで補正して各タンパク量とした。

(3) 遺伝子発現レベルの定量：mRNA の発現解析には、Cyber Green 法による定量 RT-PCR 法を用いた。筋を凍結状態にて総 RNA 抽出試薬中 (Isogen, WAKO) でホモジナイズした。遠心により水層を回収してエタノール沈殿後、沈殿物を洗浄して滅菌水に溶解した。分光光度計を用いてサンプルの RNA 濃度を測定し、

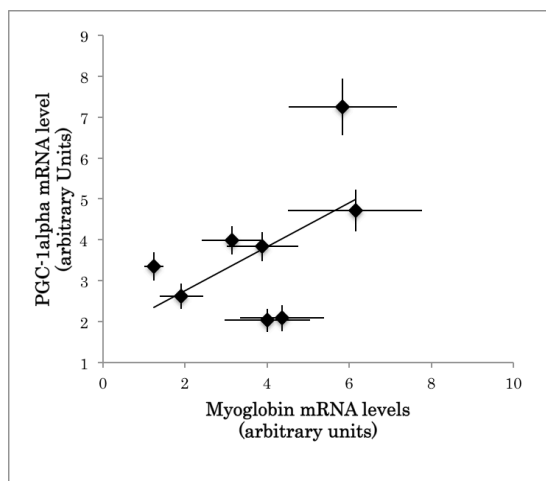
1 $\mu$ g/ $\mu$ l に濃度調整後に分析まで-80°Cで保存した。それぞれの筋より得られた総 RNA を逆転写キット (Prime Script kit, TAKARA) を用いて逆転写後、それぞれの遺伝子産物に特異的なプライマーセットを用いて PCR キット (SYBR Premix Ex Taq II, TAKARA) により PCR 反応、および蛍光検出を行った。mRNA の発現量の分析は、同時に反応を行った濃度希釈スタンダードサンプルにより数値化し、内部コントロールタンパク ( $\beta$  アクチン) の発現レベルで補正して mRNA 発現量とした。

(4) L6 筋芽細胞でのミオグロビン発現モデル：マーカータグである c-myc、およびミオグロビン遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した L6 筋芽細胞を樹立した。遺伝子導入の確認は内因性のミオグロビンとの区別のために、抗 c-myc 抗体を標的とするウエスタンブロッティングにより行った。樹立された細胞株について、細胞を溶解後に、回収し、動物組織サンプル同様の分析方法にて、各タンパクレベル、および mRNA の発現レベルを評価した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット骨格筋におけるミオグロビン発現とミトコンドリア関連タンパクとの関連性について：骨格筋はその解剖学的部位や、安静時の動員レベル等によって、筋線維組成や基質酸化能が大きく異なることが知られている (Delp. Et al, 1996)。また、腓腹筋や大腿四頭筋、前脛骨筋などの比較的大きい筋では、表層部 (皮膚に近い部分) と深層部 (骨に近い部分) で大きく筋線維組成が異なり、一般に、表層部は速筋線維のみによりなり、深層部では、遅筋線維の割合が増加する (Delp. Et al, 1996)。成熟ラットより得られた骨格筋を対象とした分析では、これまで知られているように、遅筋線維を多く含む筋 (ヒラメ筋、) で他の速筋型の筋 (足底筋、長指心筋、) と比較して、ミオグロビンタンパク、および mRNA の発現が多かった。また、同一筋内で筋線維組成の異なる腓腹筋においても、遅筋線維が多く含まれる深層部では、遅筋線維のほとんど含まれない表層部と比較して、ミオグロビンタンパクの発現量が多かった。遺伝子発現においても同様な傾向であった。これらの結果は、遅筋線維含量の違いによるものと考えられ、妥当なものであると言える (Delp. Et al, 1996)。

ミトコンドリアの関連タンパクについては、その生合成のマスターレギュレーターであるとされる PGC-1 $\alpha$ 、ミトコンドリア DNA の転写因子であり核 DNA でコードされる Tfam、および、代表的な転写因子として NRF-1 などのタンパクについて分析を行った (Ljubicic, et al, 2009)。ミオグロビン同様、これらのタンパクについて、それぞれ、異なる骨格筋



間で発現パターンが異なる傾向が見られた。上図は、骨格筋のミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターであり、カルシウムイオンや、エネルギー不足などの骨格筋の収縮活動に伴う様々な刺激に応じて種々のミトコンドリアタンパクの転写を調節するとされる (Ljubicic, et al, 2009) PGC-1 $\alpha$  の遺伝子発現レベルとミオグロビンの遺伝子発現レベルとをプロットした図である。全体的に PGC-1 $\alpha$  の遺伝子発現の高い筋において、ミオグロビン発現が高い傾向が認められたものの、筋ごとの平均値を対象とした単相関分析においては両者の相関関係は有意ではなかった ( $p > 0.1$ )。両者の発現レベルの調節は、部分的には核呼吸因子 (NRF-1) などの同一な転写因子の制御によってなされているが、その発現が筋によって様々であることは、筋ごとの特性に応じて他の経路からの入力を含めた異なる調節を受けている可能性が示唆される。骨格筋細胞において、ミオグロビンタンパクの発現レベルがミトコンドリア関連タンパクの発現レベルに直接的な調節機能を持っているのか否かを明らかにするためには、個体レベル、あるいは骨格筋局所での遺伝子導入 (or 欠損) モデルを用いた検討を行うことが必要であるものと考えられる。

(2) L6 培養筋芽細胞を用いたミオグロビン発現細胞における検討：L6 培養筋芽細胞株を用いた実験においては、c-myc タグ標識ミオグロビンベクターを導入した L6 筋芽細胞において、ミオグロビン発現レベルの増加が観察された。また、これらのミオグロビン発現が増加した導入細胞においては、分析を行ったいくつかのミトコンドリアタンパクについて、同様な発現の増加が認められた。しかしながら、相関分析においては、ミオグロビンタンパクレベルと各ミトコンドリア関連タンパクレベルとの間に有意な相関関係は認められず、全体的にはミオグロビンタンパクの発現量とミトコンドリアの標的タンパクの発現量との間には一定の傾向を見出すこ

とが出来なかった。ゆえに、本研究内で樹立することのできたモデル細胞株のみからの分析結果においては、骨格筋細胞におけるミオグロビタンパクの発現レベルと、とミトコンドリア生合成シグナル、あるいはミトコンドリア量との相互関係の有無については、結論を出すには至らなかった。

今後、使用する培養骨格筋細胞の培養条件や、対象とする培養骨格筋細胞の生物種等を再検討することにより、より確実に再現性の高い実験系を確立することが必要であると考えられる。また、ミオグロビタンパクと、ミトコンドリアタンパクとの分子レベルでの相互作用の有無についても、検討していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 増田佑貴、松原裕樹、花井淑晃、骨格筋の収縮特性と核呼吸因子-1 (NRF-1) の発現量との関係、第 67 回日本体力医学会、2012 年 9 月 14-16、岐阜
- ② 松原裕樹、増田裕樹、伊藤佑華、花井淑晃、アディポネクチン受容体の発現と筋収縮特性との関連、第 67 回日本体力医学会、岐阜、2012 年 9 月 14-16、岐阜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花井 淑晃 (HANAI YOSHITERU)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50360730

### (2) 連携研究者

増田 和実 (MASUDA KAZUMI)  
金沢大学大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：50323283

### (3) 研究協力者

松原 裕樹 (MATSUBARA YUKI)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・大学院生

増田 佑貴 (MASUDA YUKI)  
名古屋工業大学・大学院工学研究科・大学院生

伊藤 佑華 (MASUDA YUKI)  
名古屋工業大学・大学生