

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23700828

研究課題名(和文)ミトコンドリアの呼吸活性と生合成に対する酸素輸送担体発現の意義

研究課題名(英文)Significance of Expression of Oxygen Transporter for Mitochondrial Respiration Activity and Biosynthesis

研究代表者

岩中 伸壮 (IWANAKA, Nobumasa)

立命館大学・理工学研究科・研究員

研究者番号：80584002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトが活動するに当たり酸素は必要不可欠である。酸素は細胞内のミトコンドリアで消費され活動エネルギーのもととなるATPを生み出す。筋細胞内で細胞外からミトコンドリアまでの酸素運搬を補助し大量の酸素を貯蔵しているのがミオグロビンと呼ばれるタンパク質である。本研究では、ミオグロビンの発現制御機構とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。詳細な解析の結果、ミオグロビンの発現増加には細胞内cyclic AMP濃度の上昇が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Oxygen is essential for human activities. It is needed to generate ATP, which is an energy source consumed by mitochondria inside cells. Myoglobin is a type of protein which assists oxygen transport inside muscle cells, from outside to mitochondria, and stores a large amount of oxygen. The objective of this study was to reveal the regulatory mechanism for myoglobin expression and its physiological significance. According to the results of detailed analyses, it was found that elevation of cyclic AMP concentration inside the skeletal muscle cells was crucial to increase myoglobin expression.

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：ミオグロビン シグナル伝達 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎える日本において、糖尿病に代表される生活習慣病の予防は喫緊の課題である。生活習慣病予防には個々人が適切なエネルギー摂取を心がけることが重要であることは言うまでもないが、近年、エネルギー生産工場であるミトコンドリアの機能低下が生活習慣病に関わる可能性が示唆され、ミトコンドリアを中心としたエネルギー代謝メカニズム解明への期待が急速に高まっている。ミトコンドリアはエネルギー代謝の要であるが、細胞内への円滑な酸素供給が必要不可欠である。この酸素供給機構は特に重要視されており、血流や毛細血管網の他、細胞内の酸素拡散が重要因子であると考えられている。細胞内の酸素輸送タンパク質であるミオグロビン (Mb) を欠損させたマウスに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 (Grange et al. 2001)。こうした代償作用の惹起は Mb 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。また、長時間潜水可能な海中哺乳類の骨格筋、あるいは陸上哺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 Mb が含まれる (Masuda et al. 2001)。さらに、ミトコンドリアでのヘムの合成過程 (Maclean 1978) や、ミトコンドリアプロテオーム解析からもミトコンドリアと Mb の強い関連性が示唆されているが、関連性の詳細は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

Mb は 1958 年に立体構造が明らかにされた最初のタンパク質であるものの、『なぜ、Mb が存在すると酸素運搬・酸素代謝に有利なのか?』『なぜ、一生涯拍動し続ける心筋や持久性運動に適した骨格筋に Mb が多いのか?』などの Mb 発現意義に対する生物学的・運動生理学的疑問が未だ解明されていない。本研究は骨格筋細胞内の Mb 発現メカニズムを解明し、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養: ラット骨格筋細胞 L6 を 37 °C、5% CO₂、95% O₂ の環境下で培養し、5 日間の増殖期間を経て 6 日目から 10 日目までの 5 日間、分化培養を行った。10 日目までに成熟した筋管が形成された。11 日目から分化培養液に目的の刺激試薬を添加し、24 時間もしくは 72 時間の刺激培養を行い、実験・解析を行った。
タンパク質発現解析: ウェスタンブロット法によりタンパク質の発現量を定量化した。
mRNA 発現解析: TaqMan プロブ法により mRNA の発現量を定量化した。
プロモーター活性解析: コンフルエントにした L6 細胞に pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro] vector (PROMEGA, Madison, WI) をリポフェクション法により遺伝子導入し、一晚培養し

た後、5mM カフェインの 24 時間連続刺激を行った。その後、Dual-Luciferase® Reporter Assay 法 (PROMEGA) により定量化した。

4. 研究成果

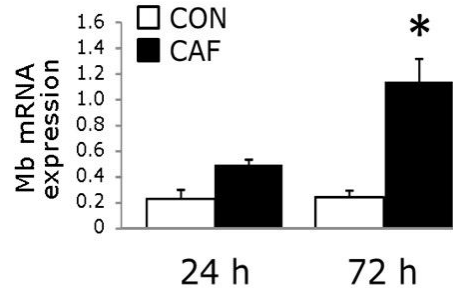


図1. カフェイン刺激による Mb の mRNA 発現 ラット骨格筋細胞 L6 に対して 5mM カフェイン (CAF) の連続刺激を 2 種 (24 時間、72 時間) 行った後、mRNA の発現量を定量化した。表示は平均値 ± 標準偏差。*はコントロール群 (CON) に対して統計的有意差有り (P < 0.05)。

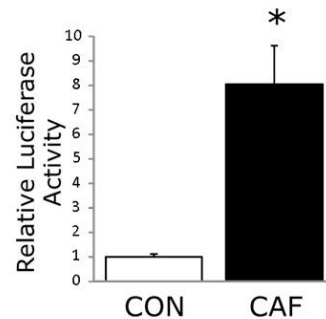


図2. カフェイン刺激による cAMP シグナル応答領域の活性化 pGL4.29 ベクターを導入したラット骨格筋細胞 L6 に対して 5mM カフェイン (CAF) の 24 時間連続刺激を行った後、cAMP シグナル応答領域の活性化を定量化した。表示は平均値 ± 標準偏差。*はコントロール群 (CON) に対して統計的有意差有り (P < 0.05)。

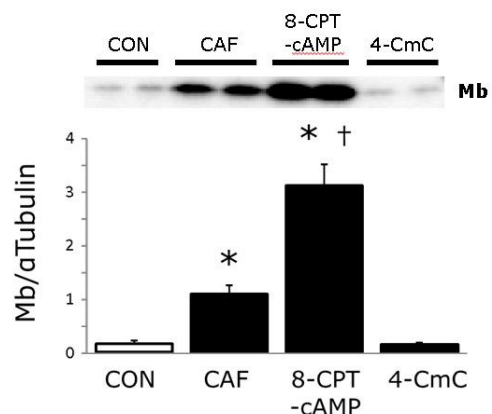


図3. cAMP シグナル活性化による Mb のタンパク質発現 ラット骨格筋細胞 L6 に対して 3 種の薬剤刺激、5 mM カフェイン (CAF)、0.1 mM 8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-CPT-cAMP)、0.5 mM

4-Chloro-3-methylphenol (4-CmC) の 72 時間連続刺激を行った後、Mb タンパク質の発現量を定量した。表示は平均値 ± 標準偏差。*はコントロール群 (CON) に対して統計的有意差有り (P < 0.01)。†はカフェイン刺激群 (CAF) に対して統計的有意差有り (P < 0.01)。

運動刺激によって哺乳類骨格筋細胞内の Mb 量が増加することは広く知られている。そこで我々は、細胞に対する運動様刺激としてカフェイン刺激を行った。カフェインの薬理作用はいくつか存在するが、本研究では、リアノジン受容体刺激作用、ホスホジエステラーゼ阻害作用、に注目した。カフェインが運動様刺激として細胞実験でよく用いられるのはその作用による。カフェインはリアノジン受容体に作用し、運動時と同様に筋小胞体からカルシウムを放出させる。

ラット骨格筋細胞 L6 に 24 時間連続のカフェイン刺激を行ったところ、細胞内の Mb mRNA 量は有意に増加した。また、72 時間でも同様に増加した (図 1)。さらに同様のサンプルに対し、細胞内のカルシウムシグナルの活性化を検証したが (カルモジュリンキナーゼ II のリン酸化を指標とした)、有意な相関性が認められなかった。次に、ホスホジエステラーゼ阻害作用を検証した。ホスホジエステラーゼは cAMP を分解し AMP を産生する酵素であるため、ホスホジエステラーゼが阻害されると筋細胞内の cAMP 濃度は上昇する。よって 24 時間のカフェイン連続刺激を行った後、骨格筋細胞 L6 の cAMP シグナル応答領域の活性化を検証したところ、有意な増加が認められた (図 2)。最後に、カフェインとは異なりホスホジエステラーゼ阻害作用を持たないリアノジン受容体刺激剤として 4-CmC を、cAMP シグナル活性化剤として cAMP アナログである 8-CPT-cAMP を用いて Mb タンパク質発現を検証したところ、4-CmC 刺激では Mb タンパク質発現量に変化は無かったが、カフェイン、8-CPT-cAMP の 72 時間連続刺激により Mb タンパク質発現量は有意に増加した (図 3)。

以上の結果より、ミオグロビンの発現増加には細胞内 cAMP 濃度の上昇が重要であることが明らかとなった。

本研究により長年謎であった Mb タンパク質発現経路の一端が明らかとなり、今後、より詳細なシグナル伝達経路の研究促進が期待される。また、効率的な持久性トレーニング方法の開発にも貢献できるものと考えられる。

現在も引き続き Mb 発現制御メカニズムの解明を行うとともに、実験動物を用いた研究も進めている。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Oishi Y, Tsukamoto H, Yokokawa T, Hirotsu K, Shimazu M, Uchida K, Tomi H, Higashida K, Iwanaka N, Hashimoto T. Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*. 118(6):742-9. 2015. (査読有)

doi:10.1152/jappphysiol.00054.2014. Hashimoto T, Yokokawa T, Endo Y, Iwanaka N, Higashida K and Taguchi S. Modest hypoxia significantly reduces triglyceride content and lipid droplet size in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 440(1): 43-49. 2013. (査読有)

doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.034

[学会発表](計 21 件)

横川拓海, 佐藤幸治, 岩中伸壮, 本田寛貴, 東田一彦, 藤田隆司, 林達也, 橋本健志. Dehydroepiandrosterone activates 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in L6 myotubes. 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 17 日. 国立京都国際会館 (京都府)).

Iwanaka N, Yokokawa T, Fujita T, Masuda K and Hashimoto T. Caffeine Treatment Stimulates Myoglobin Synthesis via cAMP Signaling in L6 Skeletal Muscle Cells. American College of Sports Medicine Conference on Integrative Physiology of Exercise (September 18, 2014. (Miami Beach, Florida, USA))

岩中伸壮, 石澤里枝, 山田達也, 高倉久志, 橋本健志, 横川拓弥, 増田和実: カフェインがミオグロビンタンパク質合成に及ぼす影響. 第 68 回日本体力医学会大会 (2013 年 9 月 21 日 日本教育会館 (東京都)).

横川拓海, 岩中伸壮, 東田一彦, 橋本健志. L6 細胞に対するカフェイン曝露が SIRT3 発現に与える影響. 第 68 回日本体力医学会大会. (2013 年 9 月 21 日 日本教育会館 (東京都)).

高倉久志, 増田慎也, 加藤久詞, 田中剛貴, 岩中伸壮, 井澤鉄也, 増田和実: 持久的トレーニングが筋細胞内酸素運搬タンパクを増加させる分子機序の解明. 第 68 回日本体力医学会大会 (2013 年 9 月 21 日 (東京都)).

[図書](計 1 件)

橋本健志, 岩中伸壮. アンチエイジングシリーズ 4 進化する運動科学の研究最前線. NTS, 116-121 (総ページ数 440), 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩中 伸壮 (Iwanaka, Nobumasa)
立命館大学・理工学研究科・研究員
研究者番号 : 80584002

(3)連携研究者

増田 和実 (Masuda, Kazumi)
金沢大学・人間科学系・教授
研究者番号 : 50323283
橋本 健志 (Hashimoto, Takeshi)
立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号 : 70511608