

機関番号：13301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20680032

研究課題名（和文） ミトコンドリアに対するミオグロビンの相互作用と筋細胞内の効果的な酸素供給システム

研究課題名（英文） Interaction of myoglobin with mitochondria as an effective oxygen transport system

研究代表者

増田 和実 (MASUDA KAZUMI)

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：50323283

研究成果の概要（和文）： 骨格筋の酸素供給機構とその規定因子については不明な点が多い。本研究では、骨格筋内の酸素貯蔵体として知られているミオグロビン（Mb）がミトコンドリアの呼吸活性に直接的に関与しているのではないかと考え、筋収縮中の筋細胞内酸素濃度（Mb の飽和度に基づく）や Mb からの酸素供給量、あるいはまた摘出骨格筋についてミトコンドリアに近傍する Mb について検証した。検証の結果、筋酸素摂取量と Mb からの酸素供給量との間には密接な関連性が存在すること、また、ミトコンドリアの近傍にはそれと相互作用する Mb が存在することによってミトコンドリアの呼吸亢進に対応している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Cellular respiration is influenced by a wide range of mechanisms including the response of the cardiovascular and metabolic systems to meet the changing energy demands in muscle. The present study focused on myoglobin (Mb) expressed in the skeletal muscle and myocardial cells and hypothesized that Mb would closely associate with mitochondrial respiration during muscle contraction. The experimental evidences using in vivo muscle perfusion technique, suggested that Mb released its binding oxygen to mitochondria at onset of contraction and the response of Mb oxygen releasing was closely related with mitochondrial respiration. Furthermore, the immunohistochemical and immunoprecipitate analysis suggested that a part of Mb directly co-localized on mitochondria within a myocyte.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：運動生理学・生化学

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：骨格筋，ミオグロビン，ミトコンドリア，共局在，相互作用

1. 研究開始当初の背景

身体機能不全やメタボリックシンドローム等が問題視される昨今、エネルギー代謝の主要なオルガネラであるミトコンドリアの機能解明やそれを活性化するための方法の

検証は重要である。このエネルギープラント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_2 ）供給機構が必要であることから、 O_2 供給機構の規定因子の探索は、今日でも重要な研究課題である。

循環によって運搬された O_2 とそれを消費するミトコンドリアまでの間を埋めるのは「拡散」であり、その拡散を規定するのがヘモグロビン (Hb) やミオグロビン (Mb) などのヘムタンパク質であると考えられてきた。しかしながら、Mb はその物性が古くから明らかにされていないながら、生体内での機能が不透明なタンパク質である。つまり、Mb の機能を究明することは、筋細胞内 O_2 供給機構の解明につながることになる。

申請者はこれまでに身体活動の種類や増減による骨格筋 Mb タンパク量の変動を生化学的・組織学的に検討してきた。さらに近年、近赤外線分光法 (NIRS) や磁気共鳴分光法 (MRS) などを用いた実験結果から、NIRS などの手法で得られるパラメータが筋の O_2 摂取量や代謝能力に関連する指標になる可能性があること、つまり、筋細胞内の O_2 代謝の動態を反映している可能性が考えられた。ただし、NIRS 等から得られる吸光変化に含まれるヘムタンパク質の貢献度の不透明さ、ヒトを対象にした非侵襲的手法の限界、等、これまでの実験からいくつかの問題点が挙げられる。つまり、骨格筋細胞内の O_2 運搬機構を明らかにするためには、Mb に結合した O_2 (Mb- O_2) の検出方法に関わる実験アプローチの工夫を含めて、Mb の生理的機能を明らかにする必要があり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

骨格筋のミトコンドリア呼吸活性に対する Mb の生理学的関与を明らかにするために、*in vivo* で細胞内酸素環境を検出できる実験モデルを構築し、骨格筋が収縮している時の筋細胞内酸素環境の変化や Mb からの O_2 流量とミトコンドリア呼吸活性 (筋酸素摂取量: mVO_2) との関係について検証した。また、ミトコンドリアの呼吸活性と Mb の生理学的関連性を明らかにするために、摘出骨格筋を用いた組織化学的・生化学的分析を通じて、ミトコンドリアと Mb の相互作用について検証した。

3. 研究の方法

9週齢のWistar系雄性ラットを用いて下肢骨格筋灌流法を行い、筋収縮中 (坐骨神経電気刺激: 1 Hz, 120 sec) の骨格筋細胞内の Mb の O_2 結合状態を NIRS によって検出した。得られた NIRS シグナルから Mb 酸素飽和度ならびに細胞内 O_2 濃度を算出した。また、Mb からの O_2 供給量や、筋発揮張力、 mVO_2 、灌流排出液から細胞質の酸化還元比を反映する乳酸-ピルビン酸比 (L/P) を測定した。さらに、運動トレーニング (持久性トレーニング) と不活動による身体活動水準の変化がミトコンドリアと Mb の関係性に及ぼす影響を検証するために、4週間の水泳トレーニング (6

日/週, 30分 × 4セット, 体重2%相当の重りを負荷) と、3週間の脚部固定を課す群を設けた。

ミトコンドリアと Mb の共局在性を検証するために、摘出した下肢筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋深層部、腓腹筋表層部) を用いて、遠心分離法によって得られたミトコンドリア画分からウェスタンブロッティング法

(WB) によって Mb の検出を試みた。同時にミトコンドリアマーカーとして VDAC-I、細胞質マーカーとして β -actin の検出を行った。また、骨格筋組織横断切片を作成し、免疫蛍光抗体法によって Mb と VDAC-I との多重染色を行った。さらに、共免疫沈降法によって Mb の免疫沈降物複合体に呼吸鎖関連タンパク質が含まれるか否かについて検討した。

4. 研究成果

下肢骨格筋灌流法による細胞内 Mb- O_2 の動態検証によって、筋収縮開始直後から Mb の O_2 解離が生じた (図1)。この点は、Mb が筋細胞内の O_2 貯蔵体としてのみではなく、ミトコンドリアへの酸素供給担体として振る舞うことを示す結果である。

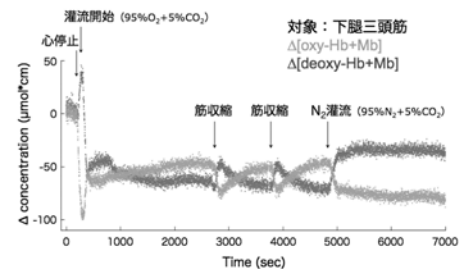


図1. 筋収縮開始直後からミオグロビン (Mb) の酸素解離が始まるのが明らかになった ($\Delta[oxy-]$ が低下し、 $\Delta[deoxy-]$ が上昇)。

さらに Mb- O_2 の動態を定量化し、筋収縮中の Mb 酸素飽和度や筋細胞内 O_2 濃度を計測したところ、 mVO_2 の上昇に伴って Mb 酸素飽和度が低下し、細胞内 O_2 濃度が低下した (図2)。Mb 酸素飽和度の最低値は約 49% であり、その際の細胞内 O_2 濃度は約 3.3 μM (約 2.4 mmHg) であった。この O_2 濃度はミトコンドリア呼吸活性を制限する水準 (約 2 mmHg 以下) ではなかった。

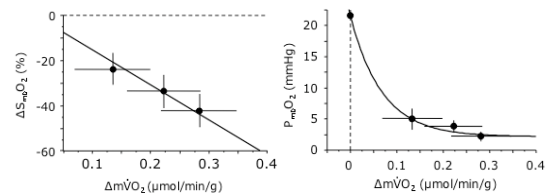


図2. 筋収縮の強度に応じて筋酸素摂取量 (mVO_2) が上昇し、それと共に筋細胞内の Mb の酸素飽和度が低下した ($r^2=0.98$, $p<0.01$)。また、Mb の酸素解離とともに、細胞内酸素濃度は急進的に低下し、 mVO_2 に応じて緩やかに低下した。

mVO₂が筋収縮直後から上昇する結果を受けて、mVO₂の上昇速度（ミトコンドリアの呼吸活性の水準）に対するMbの関与を検証した。筋収縮直後のMbからの酸素解離速度と細胞内のMb濃度を基にしてMbからのO₂供給量を算出したところ、図3のように、ミトコンドリアの呼吸活性水準と密接な関連性が認められた。この結果は、ミトコンドリアのO₂要求に対してMb-O₂が貢献していることを示唆するものである。

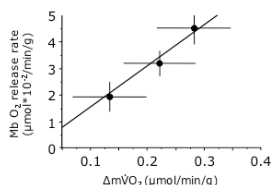


図3. 筋酸素摂取量(mVO₂)の上昇に伴って、Mbから解離する酸素流量が多くなった(r²=0.98, p<0.01)。

筋収縮時にMbが酸素解離することのもう一つの生理的意義として、細胞内O₂濃度較差（血液-筋細胞の間のO₂濃度差）を拡大することが考えられる。mVO₂は

$$mVO_2 = k \times DO_2 \times (P_{capO_2} - P_{mbO_2})$$

P_{capO₂}: 毛細血管内PO₂, P_{mbO₂}: 細胞内PO₂と表されるように細胞内外のO₂濃度差によって規定されている可能性がある。Mbの酸素解離によって細胞内O₂濃度が低下したことから、細胞内外のO₂濃度差が拡大し、筋細胞が一定のmVO₂を維持していると推察される。その点を低酸素灌流によって、細胞内外のO₂濃度差がmVO₂に及ぼす影響を検証した(図4)。細胞内外のO₂濃度差が10mMを超える範囲ではmVO₂はさほど影響を受けないものの、10mMを下回るとmVO₂は急進的に低下した。我々が用いる通常の灌流条件ではMbが脱酸素化することによってO₂濃度較差が10mM以上を保持していたので、Mbが脱酸素化することは、細胞内外のO₂濃度較差を拡大し、細胞内へのO₂拡散力を亢進させていることが考えられる。

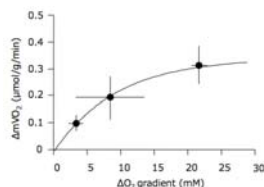


図4. 細胞内外の酸素濃度較差(O₂ gradient)が一定以上ないと、mVO₂は低下する(r²=0.98)。

以上のような生理学的な実験結果は、ミトコンドリアの呼吸活性に対するMbからのO₂供給のレスポンス(関係性)を示唆している。我々は、その生理学的エビデンスがミトコンドリアとMbとの相互作用あるいは共局在に

よって達成されているものと考え、生化学的・組織学的な検証を行った。ラットから抽出した筋組織からミトコンドリア画分を抽出しWB分析を行ったところ、いずれの骨格筋においてもミトコンドリア画分にMbが存在していた(図5)。また、ミトコンドリア画分におけるMbの検出量は速筋タイプ(腓腹筋表層部、足底筋)に比べて遅筋タイプ(ヒラメ筋、腓腹筋深層部)において高値を示した(図6)。同じ現象は組織学的検証(免疫抗体染色法)によっても確認した。共局在の程度は遅筋線維で顕著に高く、Mbがmitoの呼吸活性に機能的相互作用をもたらしている可能性を示唆している。

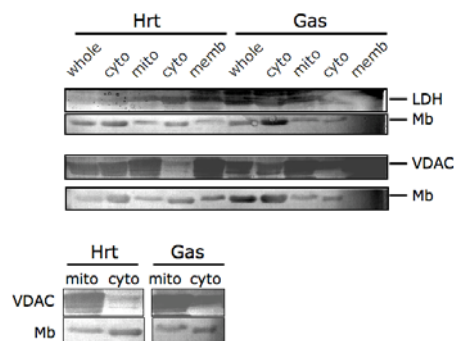


図5. 元々サイトゾル(cyto)に存在する浮游タンパク質として知られるMbが、ミトコンドリア画分(mito)にも存在していた。図は心筋(Hrt)と腓腹筋(Gas)。

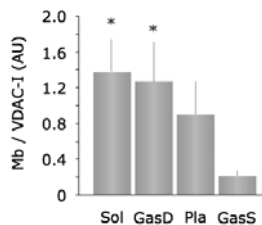


図6. ミトコンドリア画分にも存在するMb量は遅筋タイプの骨格筋により多く存在していた(*: P<0.05 vs GasS, Sol: ヒラメ筋, Pla: 足底筋, GasD: 腓腹筋深層部, GasS: 腓腹筋表層部)。

なお、持久性トレーニングあるいは不活動を施したラット骨格筋についても同様の分析を実施した。その結果、持久性トレーニングではミトコンドリア画分に含まれるMb量が上昇すること、不活動によって低下する傾向が観察された。この時、生理学的には、筋収縮時のMbからの酸素供給速度が同様に变化していた(トレーニングで亢進、不活動で抑制)。これらの結果は、ミトコンドリアの呼吸能力の亢進・低下にMbタンパク質の直接的な相互作用が関与していることを強調するものであるが、今後も慎重に分析を重ねていく予定である。

また、Mbがミトコンドリアに対して相互作用するとすれば、その標的タンパク質の特定

が課題である。我々は共免疫沈降法によって、Mb の免疫沈降物複合体に呼吸鎖複合体のタンパク質が含まれていることを予備的に確認した。O₂を最終的に利用するミトコンドリア呼吸鎖に Mb が関与することは、有酸素性代謝の面から考えても合目的であると考えられる。

この点を詳細に検証するために、ラット骨格筋由来の培養細胞にタグ付き Mb の発現用ベクターを導入し、Mb の局在性や相互作用する標的タンパク質の分析、細胞自身の呼吸活性の変化を検証しようと研究準備を行っている。現在は導入ベクターの構築が完了した。今後、こうした細胞生物学的・遺伝子工学的手法を用いてミトコンドリアの呼吸活性に影響をもたらす作用機序を検討する予定である。

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)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Takakura H, Yamada T, Furuichi Y, Iwanaka N and Masuda K: Effects of muscle temperature on muscle oxygenation kinetics during contraction (in English). 北陸体育学会紀要 47: 11-19, 2011. (査読有)
2. Masuda K, Takakura H, Furuichi Y, Iwase S and Jue T: NIRS measurement of O₂ dynamics in contracting blood and buffer perfused hindlimb muscle. Adv Exp Med Biol 662: 323-328, 2010. (査読有)
3. Takakura H, Masuda K, Hashimoto T, Iwase S and Jue T: Quantification of myoglobin deoxygenation and intracellular partial pressure of O₂ during muscle contraction under Hb-free medium perfusion. Exp Physiol 95: 630-640, 2010. (査読有)
4. Furuichi Y, Sugiura T, Kato Y, Shimada Y and Masuda K: OCTN2 is associated with carnitine transport capacity of rat skeletal muscles. Acta Physiol 200: 57-64, 2010. (査読有)
5. Furuichi Y, Masuda K, Takakura H, Hotta N, Ishida K, Katayama K, Iwase S and Akima H: Effect of intensive interval training during unloading on muscle oxygenation kinetics. Int J Sports Med 30: 563-568, 2009. (査読有)
6. Masuda K, Truscott K, Lin PC, Kreutzer U, Chung Y, Sriram R and Jue T:

Determination of myoglobin concentration in blood-perfused tissue. Eur J Appl Physiol 104: 41-48, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 39 件)

1. 蔭地野稔, 高倉久志, 山田達也, 古市泰郎, 岩中伸壮, 岩瀬敏, 増田和実: 筋収縮時の筋細胞内酸素ダイナミクスと酸素供給量との関係. 平成 22 年度北陸体育学会大会, 2011 年 3 月 19 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
2. 高倉久志, 山田達也, 古市泰郎, 蔭地野稔, 岩中伸壮, 岩瀬敏, 増田和実: 筋収縮開始時におけるミオグロビンからの酸素供給量に対する身体活動水準の影響. 平成 22 年度北陸体育学会大会, 2011 年 3 月 19 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
3. 山田達也, 古市泰郎, 花井淑晃, 橋本健志, 高倉久志, 増田和実: ミトコンドリアと酸素結合タンパクの共局在. 平成 21 年度北陸体育学会大会, 2011 年 3 月 19 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
4. 高倉久志, 古市泰郎, 山田達也, 岩中伸壮, 岩瀬敏, 増田和実: 持続的トレーニングが筋収縮中の細胞内酸素運搬メカニズムに及ぼす影響について. 第 65 回日本体力医学会大会, 2010 年 9 月 18 日, 千葉商科大学, 千葉.
5. 山田達也, 古市泰郎, 橋本健志, 花井淑晃, 高倉久志, 岩中伸壮, 増田和実: 筋細胞内におけるミトコンドリアと酸素結合タンパクの共局在. 第 65 回日本体力医学会大会, 2010 年 9 月 17 日, 千葉商科大学, 千葉.
6. 高倉久志, 増田和実: 筋収縮時の細胞内酸素環境の変化様相に対する持続的トレーニングの影響について. 第 18 回日本運動生理学会大会, 2010 年 7 月 31 日, 鹿児島大学, 鹿児島.
7. 山田達也, 古市泰郎, 高倉久志, 橋本健志, 花井淑晃, 増田和実: ミトコンドリアと酸素結合タンパクの共局在性の検討. 第 18 回日本運動生理学会大会, 2010 年 8 月 1 日, 鹿児島大学, 鹿児島.
8. 高倉久志, 増田和実, 嶋田裕哉, 古市泰郎, 岩瀬敏: 不活動が細胞内の酸素供給機構に及ぼす影響について. 第 64 回日本体力医学会大会, 2009 年 9 月 19 日, 新潟朱鷺メッセ, 新潟.
9. 増田和実, 高倉久志, 古市泰郎, 嶋田裕哉: 運動時の細胞内酸素供給機構に関する論点 - ミオグロビンの生理学的貢献度は? -. 呼吸研究会・循環研究会合同シンポジウム, 2009 年 9 月 17 日,

- 新潟朱鷺メッセ, 新潟.
10. 高倉久志, 増田和実: 筋収縮時における細胞内酸素環境の変化様相に対する不活動の影響について. 第 17 回日本運動生理学学会大会, 2009 年 7 月 25 日, 東京慈恵医科大学, 東京.
 11. Takakura H, Masuda K, Iwase S and Jue T: Change in intracellular PO₂ during muscle contraction under Hb-free medium perfusion. American College of Sports Medicine 56th Annual Meeting, May 27, 2009, Seattle, WA, USA.
 12. 高倉久志, 増田和実, 古市泰郎, 嶋田裕哉: 骨格筋細胞内の酸素分圧変化に対する不活動の影響. 平成 20 年度北陸体育学会大会, 2009 年 3 月 15 日, いしかわシテイカレッジ, 石川.
 13. 増田和実, 高倉久志: 骨格筋細胞内 PO₂ の定量化の必要性和その試み. 第 22 回呼吸研究会, 2008 年 9 月 17 日, 別府ビーコンプラザ, 大分.
 14. Masuda K, Takakura H, Furuichi Y, Iwase S and Jue T: NIRS measurement of O₂ dynamics in perfused hindlimb muscle. International Society of Oxygen Transport to Tissue 2008, August 5, 2008, Sapporo, Japan.
 15. 増田和実, 高倉久志: 筋収縮に伴う即時的な細胞内酸素の減少様相と酸素需要との関連性. 第 16 回日本運動生理学学会大会, 2008 年 8 月 2 日, 帝塚山大学, 奈良.

[図書] (計 2 件)

1. 増田和実: ミオグロビン. In 運動生理学のニューエビデンス (宮村実晴 編集), pp. 268-276, (株) 真興交易, 東京, 2010.
2. 増田和実: O₂ 運搬貯蔵色素 (Hb, Mb), 筋線維タイプと酸素利用. In からだと酸素の事典 (酸素ダイナミクス研究会 編集), 朝倉書店, 東京, pp. 216, pp. 226-227, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ed.kanazawa-u.ac.jp/~masuda/index.html>

受賞等

1. 日本体力医学会新潟大会研究奨励賞, 受賞演題: 高倉久志, 増田和実, 嶋田裕哉, 古市泰郎, 岩瀬敏: 不活動が細胞内の酸素供給機構に及ぼす影響について. 第 64 回日本体力医学会大会, 2009

年 9 月

2. American College of Sports Medicine, Noninvasive Investigations of the Neuromuscular System Interest Group Award, Takakura H, Masuda K, Iwase S and Jue T: Change in intracellular PO₂ during muscle contraction under Hb-free medium perfusion] American College of Sports Medicine 56h Annual Meeting, Seattle, WA, USA, May 2009.
3. 日本運動生理学学会若手研究者賞最優秀賞, 受賞演題: 増田和実, 高倉久志: 筋収縮に伴う即時的な細胞内酸素の減少様相と酸素需要との関連性. 第 16 回日本運動生理学学会大会, 2008 年 8 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 和実 (MASUDA KAZUMI)
金沢大学・人間科学系・教授
研究者番号: 50323283

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

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

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

狩野 豊 (KANO YUTAKA)
電気通信大学・情報理工学部・准教授
研究者番号: 90293133

岩中 伸壮 (IWANAKA NOBUMASA)
金沢大学・人間科学系・研究員 (博士研究員)
研究者番号: 80584002

加藤 将夫 (KATO YUKIO)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 30251440

杉浦 智子 (SUGIURA TOMOKO)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 70542190