

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282183

研究課題名(和文) 骨格筋のミトコンドリア呼吸活性を修飾する酸素輸送担体の新たな分子相互作用

研究課題名(英文) New interaction of oxygen binding protein mediating mitochondrial function in skeletal muscle

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋細胞に特異的に存在するミオグロビン(Mb)がミトコンドリア(Mit)に及ぼす相互作用について、生理学・細胞生物学的解析を実施した。Mb発現ベクターを導入した筋芽細胞では、Mit呼吸活性や呼吸鎖複合体IVの酵素活性が上昇した。また、siRNAによってMb発現を抑制した細胞では、過剰発現細胞で生じた表現型が消去された。また、段階遠心法によってMitの分画を行いMbの検出を行った。その結果、Mbは膜間腔に検出された。本研究の結果は、細胞質内の酸素貯蔵役と考えられてきたMbに対して、その一部がMit内部に存在し、呼吸機能に影響を与えているとする新たな可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The present study focused on physiological interaction of myoglobin (Mb) with mitochondria in myocyte. In order to identify the hypothesis, we established Mb overexpressing cultured cell model. The Mb-overexpressing myocytes consumed oxygen faster and showed higher enzymatic activity especially in activity of complex-IV. The Mb-siRNAs transfection canceled these positive effects observed in Mb-overexpressed myocytes. We further tested about Mb localization by mitochondrial fractionation assay involved serial centrifuges. The Mb was, then, observed in the mitochondrial intermembrane space. These evidences suggest that Mb would be one of the factors underlying the mechanisms to regulate muscle mitochondrial respiration through an interaction with mitochondrial complex.

研究分野：運動生理学・生化学

キーワード：筋細胞 代謝 ミトコンドリア ミオグロビン 運動

1. 研究開始当初の背景

健康の維持・増進のためには、継続的な運動による骨格筋の基質酸化能力の亢進が重要であり、それには筋細胞内への円滑な酸素と基質の供給が必要である。酸素供給能力の規定因子には、血流の他(Poole et al. 2008)、筋細胞内の酸素拡散性が含まれている(Chung et al. 2005)。筋細胞質にはミオグロビン(Mb)が存在し、血管からミトコンドリアへの酸素の拡散輸送を仲介するとともに、運動生理学的には、持久的トレーニングへの適応(=筋の有酸素代謝能力の向上)にも重要な貢献を果たすものと示唆されてきた。しかしながら、それを説明するメカニズムについては十分な検証が及んでいない。

近年、我々は独自に開発した骨格筋灌流システムを用いて筋収縮中の Mb の酸素結合・解離動態を捉えることに成功し、Mb が筋活動中のミトコンドリア呼吸活性の上昇に対して即時的に酸素を解離する(供給する)機能を持つことを見出した(Masuda et al. 2010, Takakura et al. 2010)。また、骨格筋の酸素需要が高まった際には、細胞内外の酸素濃度較差の拡大が筋細胞への酸素拡散に不可欠であることを明らかにした。さらに細胞学的な検証では、Mb がミトコンドリア内部に局在していることを発見した(Yamada et al. 2013)。これらの知見は Mb が単なる酸素貯蔵体ではなく、ミトコンドリアの酸素需要に一致するように機能調節していることを示唆している。我々はこのメカニズムを『Mb パラドックス』として称して、筋細胞内での Mb タンパク質の特別な局在性によって得られるミトコンドリアとの直接的な相互作用を介した細胞呼吸機能の調節機序の存在を仮定した(新規パラダイム)。旧来よりミトコンドリアの呼吸機能と Mb との生理学的機能の相互関係は、両者の量的な多寡でしか示されてこなかった経緯を踏まえ、我々が仮定する新たな分子レベルの相互作用の存在は科学的に全く想定されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋の基質酸化能力の獲得において、Mb を介したミトコンドリアへの酸素供給システムに着目し、Mb とミトコンドリアとの間に存在する分子レベルの相互作用とその機序を明らかにするために、個体・細胞レベルの生理学・細胞生物学的解析によって検証することである。主な検証内容は以下のような項目である。

- (1) 筋細胞内に存在する Mb の多寡がミトコンドリアの呼吸活性に影響を与えるかについて、Mb の過剰発現・欠失モデルを用いて、ミトコンドリアの酸素消費量や基質酸化能の増減を検証する。
- (2) 筋細胞全体で Mb が増加する場合には、ミトコンドリア内部に局在する Mb 量も増加し、ミトコンドリアの機能に影響を及ぼすかどうかを検証する。

- (3) ミトコンドリア内部に局在する Mb が標的とするタンパク質について、タンパク質-タンパク質の相互作用の観点から検討を行う。Mb が相互作用する標的ミトコンドリアタンパク質を同定し、Mb 量が増加した時に標的タンパク質の機能がどのように変化するのかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

培養細胞を用いた実験には、マウス骨格筋芽(Mouse Myoblast)培養細胞株 C2C12 を用いた。C2C12 細胞の培養は 10%FBS-DMEM を増殖培地、2%DBS-DMEM を分化培地として行った。

(2) 遺伝子導入

Nucleofector を用いて C2C12 に Mb-Flag 発現ベクターを導入した。安定発現株の樹立のため、G418 を用いて neomycin 耐性の細胞を選別し、増殖後に分化誘導を行った。これらの細胞を用いて共免疫沈降法によるタンパク質の相互作用解析やミトコンドリア呼吸活性の測定を行った。

一方、同様に Nucleofector を用いて一過性導入 C2C12 の作成も実施した。本研究で用いたベクターはレポーターとして GFP (緑色蛍光タンパク質)も同時に発現させた。また、Mb 遺伝子抑制のために siRNA の導入も行った。なお、我々は実験の中で C2C12 の分化誘導後に Mb が発現してくることを確認していたので、この一過性遺伝子導入細胞モデルでは、分化誘導を行わず Myoblast のままで分析に供した(図 1)。

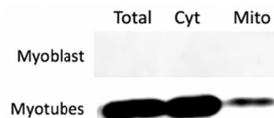


図 1. C2C12 培養細胞は筋芽細胞状態では Mb を発現しないが、分化誘導 7 日後の筋管細胞では Mb を発現する。

(3) ミトコンドリアの酸素消費測定

ミトコンドリア呼吸は酸素濃度モニタリングチャンバー内に酸素電極を挿入し、チャンバー内の酸素濃度を継続的に計測することによって酸素消費速度として算出した。

(4) 単離ミトコンドリアの段階遠心処理

Wistar-Rat () の腓腹筋から単離したミトコンドリアにおいて、ミトコンドリア内に存在する Mb の局在場所を検証するために段階遠心法によってミトコンドリアを外膜(OMM)と膜間腔(IMS)、内膜(IMM)、マトリクス(MTR)に分画し、ウエスタンブロット法(WB)で各画分の Mb の検出を行った。

4. 研究成果

遺伝子導入を図った C2C12 細胞を検鏡すると GFP の緑色蛍光が観察され、さらに生化学実験によって同細胞に Mb-Flag が発現してい

ることが確認された(図2)。また、Mb-siRNAを同時に導入した細胞では緑色蛍光が減弱し、検出されるタンパク質の量も減少したことから今回用いた遺伝子発現モデルはMbの遺伝子操作を特異的に実施できていると判断し、その後の解析を行った。

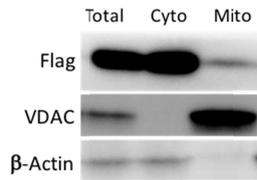


図2. Mb-Flag 発現ベクターを導入した C2C12 細胞に Mb-Flag が検出された。また、ミトコンドリア画分においても検出された。

Flag 抗体を用いて共免疫沈降を行ったところ、Mb-Flag の免疫沈降物から COX-IV が検出された(図3)。このことは、Mb の一部がミトコンドリアの呼吸鎖複合体タンパク質(COX-IV)に相互作用していることを示唆する。

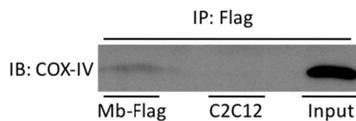


図3. Mb-Flag で共免疫沈降を行うと、その沈降物から COX-IV が検出された。

Mb-Flag::GFP 過剰発現細胞の酸素消費速度はGFPのみを過剰発現させたモデル(Mock)に比較して有意に高値を示した(図4)。酸素消費の経路には2つの経路があり、その両経路を介した酸素消費速度において有意な高値が確認された。Mb が相互作用を有すると考えられる複合体4のみを介した酸素消費速度も Mb-Flag 発現細胞はGFP 発現細胞に比べて上昇傾向にあることが観察された。

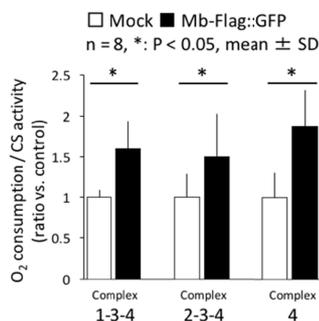


図4. Mb-Flag::GFP 安定発現株 C2C12 の呼吸活性の比較。

また、一過性導入 C2C12 細胞を用いて、呼吸鎖複合体酵素活性や呼吸機能を検証したところ、複合体4の酵素活性のみが上昇していた。この亢進は発現抑制モデルでは生じておらず、対象細胞と有意差は認められなかった。なお、この Mb が過剰発現することによる酵素活性の変化は他の複合体酵素活性に

は認められなかったことから、Mb が呼吸鎖複合体4にのみ特異的に作用していることが推察された(図5)。また、一過性の Mb 過剰発現モデルにおけるミトコンドリア呼吸活性は、安定発現株のケースと同様に、対称細胞に比較して亢進し、発現抑制モデルでは Mb 発現の作用がキャンセルされた。したがって、Mb と相互作用する複合体4の酵素活性と呼吸機能が Mb の量に依存して調節されることが示唆された。

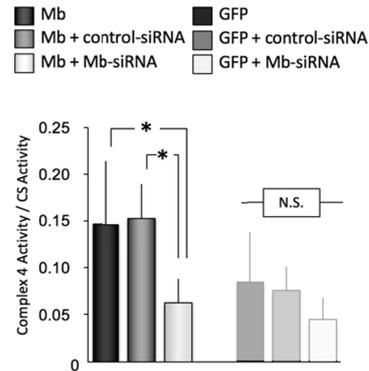


図5. 一過性の Mb-Flag::GFP 遺伝子導入によって呼吸鎖複合体4の酵素活性が上昇した。また、siRNAによって発現抑制を図った時にはその上昇がキャンセルされた。

最後に、種々の実験結果から Mb とミトコンドリアの特定タンパク質との相互作用が推測されたため、骨格筋から単離したミトコンドリアのどこに Mb が存在しているかを確認した。段階遠心法とシヨ糖勾配分離法を施したサンプルをウエスタンブロット法によってタンパク質の検出を行ったところ、Mb が膜間腔とマトリックスに検出された。マトリックスに検出されたことは仮説に反していたので、再検証の必要性はあるものの、Mb の一部がミトコンドリアの内部に取り込まれている可能性が示唆された。

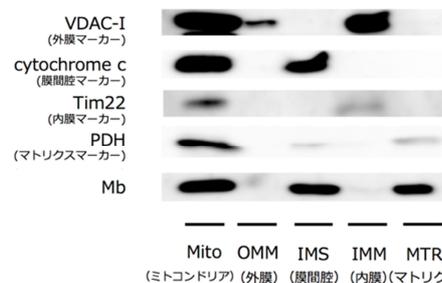


図6. 単離ミトコンドリアの段階遠心法によって分画した時の Mb の検出。

以上の検証結果を通じて、Mb の一部がミトコンドリアの中に取り込まれ、ミトコンドリアの呼吸を調節する因子の一つであることが明らかとなった。この事実は、Mb は筋細胞の細胞質に浮遊する単なる酸素貯蔵タンパク質としてだけではなく、積極的に筋細胞の代謝や呼吸調節を担う分子である可能性を示唆するものであり、骨格筋や心筋における

Mb の新たな機能を提唱するものである。

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5件)

(全て査読有)

1. 町野綾香, 石澤里枝, 芝口翼, 増田和実: 運動を模擬した薬理刺激による骨格筋培養細胞のミトコンドリア生合成とミオグロビンの発現変化. 北陸体育学会紀要 53号, 印刷中.
2. Takakura H, Ojino M, Jue T, Yamada T, Furuichi Y, Hashimoto T, Iwase S and Masuda K: Intracellular oxygen tension limits muscle contraction-induced change in muscle oxygen consumption under hypoxic conditions during Hb-free perfusion. *Physiological Reports* 5: e13112, 2017.
3. Yamada T, Takakura H, Jue T, Hashimoto T, Ishizawa R, Furuichi Y, Kato Y, Iwanaka N and Masuda K: Myoglobin and the regulation of mitochondrial respiratory chain complex IV. *J Physiol* 594: 483-495, 2016.
4. Takakura H, Furuichi Y, Yamada T, Jue T, Ojino M, Hashimoto T, Iwase S, Hojo T, Izawa T and Masuda K: Endurance training facilitates myoglobin desaturation during muscle contraction in rat skeletal muscle. *Scientific Reports* 5: 9403, 2015.
5. 石澤里枝, 山田達也, Hamidie DRR, 増田和実: 脂肪酸による骨格筋のミトコンドリア生合成機構(Review). 北陸体育学会紀要 51: 41-54, 2015.

[学会発表](計16件)

1. Masuda K: Mitochondrial biogenesis induced by exercise and nutrients: implication for performance and health benefits. The International Conference on Sport Science, Health, and Physical Education (ICSSHPE 2016) (シンポジウム講演), November 16 2016, Bandung, West Java, Indonesia.
2. 増田和実: 骨格筋のミトコンドリア呼吸機能とミオグロビン. 第24回日本運動生理学会大会(シンポジウム講演), 平成28年7月23日, 熊本大学, 熊本.
3. Masuda K, Yamada T, Takakura H, Hashimoto T, Ishizawa R, Furuichi Y, Kato Y, Iwanaka N and Jue T: Myoglobin regulates mitochondrial respiration through its interaction with complex IV. European College of Sport Science 21st Annual Congress, July 8 2016,

Vienna, Austria.

4. 増田和実, 山田達也, Hamidie DRR, 石澤里枝: ミトコンドリア呼吸におけるミオグロビン分子の役割. 第70回日本体力医学会大会, 平成27年9月19日, 和歌山県民文化会館, 和歌山.
5. Hamidie DRR, Yamada T, Ishizawa R, Saito Y and Masuda K: Curcumin decreases phosphorylation phosphodiesterase (PDE) to regulated mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. 第70回日本体力医学会大会, 平成27年9月19日, 和歌山県民文化会館, 和歌山.
6. 増田和実, 山田達也, Hamidie DRR, 石澤里枝, 齊藤陽子: ミトコンドリアに対するミオグロビンの機能的相互作用. 第19回酸素ダイナミクス研究会, 平成27年9月12日, 東京女子医科大学, 東京.
7. 石澤里枝, 山田達也, Hamidie DR Ronald, 増田和実: ケトン体による骨格筋のミトコンドリア関連タンパク質増加作用. 日本スポーツ栄養学会第2回大会, 平成27年7月4日, 立命館大学 滋賀.
8. Hamidie DRR, Ishizawa R, Yamada T and Masuda K: Endurance training with curcumin treatment regulated mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through SIRT1-mediated signaling pathway. American College of Sports Medicine 62nd Annual Meeting, May 28 2015, San Diego, CA, USA.
9. 山田達也, 石澤里枝, Hamidie RD Ronald, 増田和実: 骨格筋ミトコンドリア呼吸におけるミオグロビンの役割. 平成26年度北陸体育学会大会, 平成27年3月22日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
10. Yamada T, Thomas Jue T and Masuda K: New insights for the factor regulating muscle mitochondrial respiration. Cell Symposia System approach to Metabolic Diseases, October 2 2014, Hyatt Regency McCormick Place, Chicago, IL, USA.
11. 山田達也, 石澤里枝, Hamidie DR Ronald, 増田和実: 骨格筋ミトコンドリアの呼吸調節機序に関わる新規知見. 第69回日本体力医学会大会, 平成26年9月20日, 長崎大学, 長崎.
12. 高倉久志, 田中誠智, 田中剛貴, 加藤久詞, 柴原拓哉, 増田慎也, 岩中伸壮, 北條達也, 稗田睦子, 井澤鉄也, 増田和実: Pgc-1 の発現抑制がミオグロビン発現量に及ぼす影響について. 第69回日本体力医学会大会, 平成26年9月19日, 長崎大学, 長崎.
13. Iwanaka N, Yokokawa T, Fujita T, Masuda K and Hashimoto T: Caffeine

treatment stimulates myoglobin synthesis via cAMP signaling in L6 skeletal muscle cells. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, September 18 2014, Miami Beach, FL, USA.

14. Hamidie DRR, Ishizawa R, Yamada T, Nitta S and Masuda K: Curcumin treatment augment exercise effect on mitochondria biogenesis in skeletal muscle and myocardium. American College of Sports Medicine 61st Annual Meeting, May 28 2014, Orland, FL, USA.
15. Takakura H, Tanaka G, Tanaka S, Kato H, Shibahara T, Masuda S, Iwanaka N, Hata T, Izawa T, Jue T and Masuda K: PGC-1 expression is not essential for endurance training-induced increase in myoglobin expression in skeletal muscle. American College of Sports Medicine 61st Annual Meeting, May 29, 2014, Orland, FL, USA.
16. Masuda K, Yamada T and Jue T: Enhanced respiration with myoglobin interaction in mitochondria. American College of Sports Medicine 61st Annual Meeting, May 28 2014, Orland, FL, USA.

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学運動生理学研究室 Website

<http://exercisephysiol.com>

受賞等

1. 北陸体育学会優秀研究奨励賞，受賞演題：山田達也，石澤里枝，Hamidie RD Ronald，増田和実：骨格筋ミトコンドリア呼吸におけるミオグロビンの役割。平成 26 年度北陸体育学会大会，平成 27 年 3 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)連携研究者

高倉 久志 (TAKAKURA HISASHI)

同志社大学・スポーツ健康科学部・助教

研究者番号：20631914

岩中 伸壮 (IWANAKA NOBUMASA)

立命館大学・グローバルイノベーション研究機構・研究員 (博士研究員)

研究者番号：80584002

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

早野 俊哉 (HAYANO TOSHIYA)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：90332303

加藤 将夫 (KATO YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

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