

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02158

研究課題名(和文) 酸素輸送担体を介した筋細胞独自のミトコンドリア活性化機序

研究課題名(英文) Facilitation of mitochondrial respiration mediated by oxygen transporter in myocytes

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) 13,300,000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(Mito)に及ぼす相互作用の機序を明らかにするため、Mitoの内部にMbが存在するかどうかを検証した。ラット腓腹筋から単離したMitoをショ糖密度勾配遠心分離法やProtection Assayによって、外膜/内膜/膜間腔/マトリックスに分画し、分析を重ねた結果、Mitoに内在するMbは膜間腔と内膜に局在する可能性を示した。持久性トレーニングによって腓腹筋のMitoに内在するMb量は変化しなかったが、Mito内部へのMb輸送が能動的な機構である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生涯を健康で過ごすためには骨格筋の機能維持が重要視されており、とりわけ代謝の要であるミトコンドリア(Mito)の機能は細胞機能にも影響を与える。筋細胞のみに発現する酸素結合タンパク質：ミオグロビン(Mb)がMito内部にも存在することを明らかにした本研究の成果は、MbがMitoの機能を直接的に向上させる機能を有している可能性を示している。つまり、筋細胞特異的なMito機能亢進メカニズムの一つである可能性がある。また、Mbのような本来Mito内部に存在しないと考えられていたタンパク質がMitoに内在することは、Mitoへの輸送機序が存在する可能性があり、細胞生物学的にも萌芽的なエビデンスである。

研究成果の概要(英文)：Recently, the muscle-specific protein myoglobin (Mb) has been reported to interact with complex IV to augment mitochondrial (Mito) respiratory capacity in skeletal muscles. The present study has aimed at to clarify the localization of Mb within Mito. The isolated Mit was treated with the sucrose density-gradient centrifugation or proteinase K (PK), osmotic shock (OS), and TriX in order to digest proteins on the outer membrane and in the intramembrane. Combining treatment with PK, OS and TriX allowed immunoblotting detection of the Mito proteins localized in specific regions of Mit. Mb was detected with either PK or OS treatment, suggesting that Mb associated with the inner membrane (intramembrane side, not matrix side). The endurance training increased Mb content but did not change Mb content in the Mito. However, the observation might imply that the dynamic flux of Mb from cytosol to Mito has greater importance than just the amount found in Mito.

研究分野：運動生理学・生化学

キーワード：筋細胞 ミトコンドリア ミオグロビン 相互作用 運動

## 1. 研究開始当初の背景

健康の維持・増進のためには、運動や栄養基質による骨格筋ミトコンドリア (Mito) の酸化能力の亢進が重要である。旧来、心筋や骨格筋への  $O_2$  や基質供給は血流が主たる役割を演じていると考えられてきたが、我々は筋細胞内に特異的に存在する  $O_2$  結合タンパク質であるミオグロビン (Mb) が血管から Mito への  $O_2$  の拡散輸送を仲介するとともに、Mb の多寡が Mito の呼吸機能を変化させることを明らかにした (Yamada et al. 2016)。これまで単なる  $O_2$  貯蔵体としてしか認識されていなかった Mb が、Mito の呼吸機能・酸化能力に密接に関わっていることを示唆する我々の知見は、Mito と Mb の量的な関係からしか機能的関連性を説明してこなかった過去の知見を大きく進展させる可能性がある。我々はこのメカニズムを『Mb パラドックス』として称しているが、Mito と Mb の直接的な相互作用機序はほとんど明らかになっていない。

近年、我々の生化学的な検証では、Mb が Mito の呼吸鎖複合体のタンパク質に相互作用していることを発見した (Yamada et al. 2013)。この知見は Mb が筋細胞の細胞質に浮遊するだけでなく、Mito の内部にも局在していることを示唆する。細胞生物学的には奇異にも捉えられるこうした現象が真実ならば、その現象が Mito と Mb の機能的相互作用のメカニズムである可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨格筋細胞の Mito の基質酸化能力への Mb の関与の機序として、Mito タンパク質と Mb との間に存在する分子レベルの相互作用の存在を明らかにすることを目的とした。そのために、個体・細胞レベルの細胞生物学的解析によって検証することである。また、Mito の生合成を促進しうる基質とそれによる生合成の機序を明らかにすることである。主な検証内容は以下のような項目である。

- (1) 筋細胞内の Mb が Mito の内部のどこに位置しているのかを検証する。
- (2) 筋細胞全体の Mb が増加する場合には、Mito 内部に局在する Mb 量も増加し、Mito の機能にも影響を及ぼすかを検証する。
- (3) Mito 生合成を亢進しうる栄養基質の影響を検証し、その背景にある機序についても検証を加える。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験動物と Mito の精製

Wistar 系ラット ( , 14 週齢) から摘出した腓腹筋を分析対象とした。

腓腹筋からの Mito 単離は段階遠心分離法によって実施した。単離した Mito は続く Protease K-Protection Assay (PK-PA) 法に使用した。

### (2) マイトプラストの精製

単離した Mito に対して低張液処理 (OS) を実施して外膜を破壊し、膜間腔タンパク質を漏出させた。OS 後、遠心分離によって回収した沈殿をマイトプラスト (mitoplast) とし、PK-PA 法に使用した。

### (3) Protease K-Protection Assay

0~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の PK buffer を作成し、単離した Mito に対して PK-PA 法を施した。この処理によって Mito 外膜表層のタンパク質を消化することができる。また、ミトプラストに対して PK 処理を施すことによって外膜+内膜表層のタンパク質を消化した。PK 処理後の Mito を遠心分離によって回収後、SDS-PAGE 用サンプルバッファーに溶解したものを最終サンプルとし、ウェスタンブロッティング (WB) に使用した。

### (4) 持久性運動トレーニング

持久性運動トレーニング (eTR) の影響を検証するため、Wistar 系ラット ( , 10 週齢) を対象に、トレッドミルを用いた走運動 (25 m/分  $\times$  60 分  $\times$  週 5 日  $\times$  4 週間) を実施した。

### (5) 基質添加と Mito 生合成

Mito 生合成に対する基質添加の影響を検証するためにマウス由来骨格筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を用いた。ロイシン (Leu) を 1 mM もしくは 3 mM 添加した培地にて、分化誘導後 5 日目の C2C12 細胞を 24 時間培養した。24 時間後に C2C12 細胞を刈り取り、miRNAs (miR-494-3p, miR-

696, miR-761) の他、Mito 生合成に関する mRNA や Mito DNA copy 数 (mtDNA)、タンパク質を RT-qPCR や WB によって解析した。

#### 4. 研究成果

PK-PA 処理によって外膜表層のタンパク質を分解した Mito では、外膜のマーカータンパク質である Tom20 が PK 濃度依存的に消化されたが、Mb のシグナルは一定強度を保っていた (図 1)。この結果は、Mb が Mito の外膜表層に付着しているのではなく、Mito 内部に存在していることを表す。

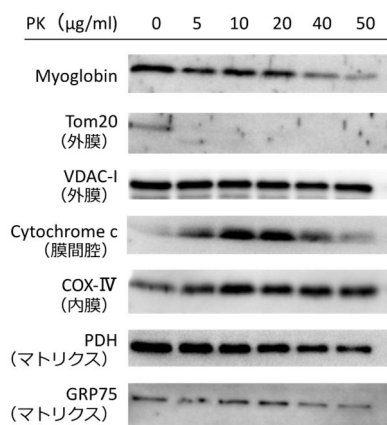


図 1. PK-PA 法を施した単離 Mito における Mb ならびに Mito タンパク質の検出。

OS 処理によって精製したマイトプラストでは、Mb のシグナルが一定強度を保っていた。その条件に PK 処理を加えて外膜および内膜表層のタンパク質を分解したマイトプラストでは、Mb のシグナルがほぼ消失した (図 2)。加えて、OS 処理後のサンプルの上清を分析すると Mb が検出できた (図 3)。これらの結果は、Mb が膜間腔側の外膜あるいは内膜に局在していること、さらに Mito に内在する Mb の一部は膜間腔に浮遊している可能性を示唆する。我々は以前に、Mb が Mito の呼吸鎖複合体 IV のサブユニットである COX-IV と相互作用している可能性を示した (Yamada et al., 2013)。本研究の結果は Mb が Mito の膜間腔側の内膜に局在していることを支持する。

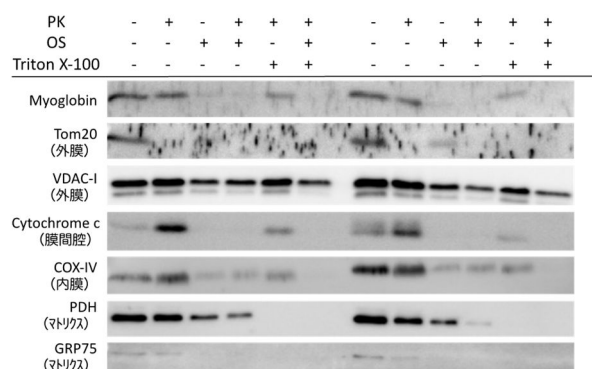


図 2. Osmotic Stress (低張液) 処理を施した単離 Mito における Mb タンパク質の検出。

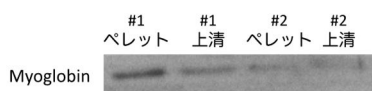


図 3. Osmotic Stress (低張液処理) を施した Mito の上清とペレットにおける Mb タンパク質の検出。

eTR 群の全分画の Mito タンパク質発現量は対照群と比べて約 90~140%高値を示したのに対して、Mb 発現量は対照群と比べて約 60%高値を示した。しかしながら、その筋細胞から単離した Mito に内在する Mb 量には両群間の有意差は認められなかった (図 4)。eTR による細胞全体レベルでの Mito 増加率は Mb のそれよりも 2 倍近く大きい。したがって、仮に Mb がタンパク質の濃度勾配に従った受動的な拡散流入によって Mito 内部へ取り込まれるのであれば、eTR 後の筋では Mito に内在する Mb 量は減少していたと推測される。それにも関わらず、Mito に内在する Mb

量が変化しなかったとする本研究の結果は、Mb が Mito 膜上の何らかの輸送体を介して Mito 内部へ能動的に輸送されている可能性を示唆する。

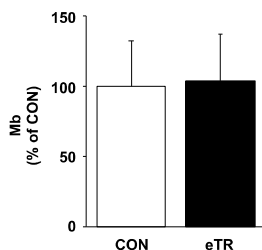


図 4. eTR による Mito 内在型 Mb のタンパク質の比較.

基質(ロイシン:Lue)による Mito 生合成への影響については、3 mM の Lue 添加によって mtDNA 数が上昇する傾向が認められた(図 5)。この条件において、miRNAs の発現量は miR-494-3p と miR-696 において発現抑制される傾向が認められた(図 6)。元々発現量の少なかった miR-761 は Lue 添加の影響を受けなかったが、変化が生じた miR-494-3p と miR-696 の間には有意な相関関係も認められ、これら 2 つの microRNA の発現量が Lue によって協動的に調節されている可能性が推察された。

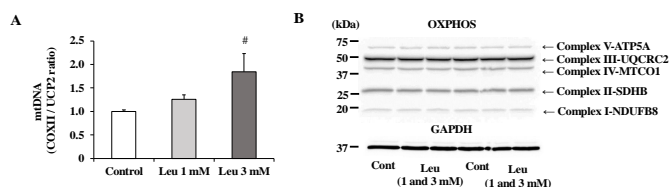


図 5. Leu 添加した C2C12 細胞の mtDNA 数 (A) と Mito 呼吸鎖複合体タンパク質の発現 (B)。

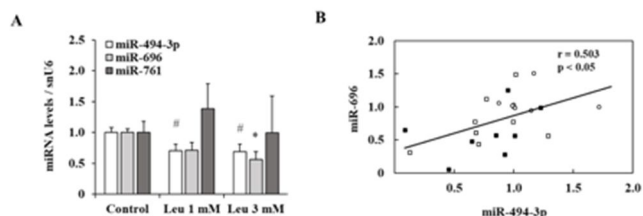


図 6. Lue 添加による miR-494-3p と miR-696、miR-761 の発現レベル (A) と miR-494-3p と miR-696 の発現量の関連性 (B)。

以上の結果から、Mb の一部が Mito の内部へ取り込まれ、膜間腔側の Mito 内膜に局在していることが示唆された。また、eTR によって腓腹筋深層部の Mito に内在する Mb 量は変化しなかったが、Mito 内部への Mb 輸送が能動的な機構である可能性が示された。本来、筋細胞の細胞質に浮遊していると理解されていた Mb が、その一部が Mito に内在して Mito 機能を修飾しているとする可能性を示唆する本研究のエビデンスは、骨格筋独自の Mito 活性化機構とも考えられる。今後、Mito 内部への Mb 輸送機序や内在型 Mb の生理機能を詳細に解明することが課題として挙げられる。さらに、(栄養)基質による Mito 生合成の亢進の背景には、複数の microRNA の干渉抑制が働いている可能性が新たに明らかとなった。Mito 生合成を誘導する他の基質(カフェインやポリフェノール: クルクミン、脂肪酸、等)の種類によって賦活される細胞内シグナル系路や関与する遺伝子が特異的であるが、それぞれの基質が持つ ergogenic な効果の基盤メカニズムを詳細に明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takakura H, Yamada T, Masuda K	4. 巻 25
2. 論文標題 Involvement of myoglobin in intracellular oxygen transport and oxidative metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exerc Sports Physiol	6. 最初と最後の頁 1-8
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada T, Takakura H, Masuda K	4. 巻 25
2. 論文標題 Mitochondrial nature adjusted to host cellular demand and environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exerc Sports Physiol	6. 最初と最後の頁 9-14
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamidie DRR and Masuda K	4. 巻 3
2. 論文標題 Potensi konsumsi kunyit dalam rangka meningkatkan performa olahraga melalui peningkatan mitokondria biogenesis otot skelet	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jurnal Pendidikan Jasmani dan Olahraga	6. 最初と最後の頁 129-135
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 該当する
1. 著者名 牧野禎央, 芝口翼, Claudia Perez Lopez, 山下こころ, 増田和実	4. 巻 55
2. 論文標題 骨格筋ミトコンドリアの単離とトポロジカルアッセイ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 北陸体育学会紀要	6. 最初と最後の頁 23-33
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 -

1. 著者名 Masuda K, Jue T and Hamidie DRR	4. 巻 2
2. 論文標題 Mitochondrial biogenesis induced by exercise and nutrients: implication for performance and health benefits	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Indonesian J Sci Tech	6. 最初と最後の頁 99-107
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 該当する

1. 著者名 Takakura H, Ojino M, Jue T, Yamada T, Furuichi Y, Hashimoto T, Iwase S and Masuda K	4. 巻 5
2. 論文標題 Intracellular oxygen tension limits muscle contraction-induced change in muscle oxygen consumption under hypoxic conditions during Hb-free perfusion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 町野綾香, 石澤里枝, 芝口翼, 増田和実	4. 巻 53
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 北陸体育学会紀要	6. 最初と最後の頁 11-22
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15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 増田和実, 芝口翼, 小間陸嗣, Claudia Perez Lopez
2. 発表標題 骨格筋ミトコンドリアに対するミオグロビンの役割と意義
3. 学会等名 第23回酸素ダイナミクス研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝口翼, 増田和実, 河合夕涼, Yhusi Karina Riskawati, 相崎展輝, Claudia Perez Lopez, 小間陸嗣, 米田隆, 辻篤史, 山崎裕也, 松井圭三
2. 発表標題 天然由来マルチ飲料はヒトの持久性運動パフォーマンスを向上させるか?
3. 学会等名 第31回日本体力医学会北陸地方会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Claudia Perez Lopez, Shibaguchi T and Masuda K
2. 発表標題 Nutrients stimulate mitochondrial biogenesis via PGC-1 $\alpha$ -targeting miRNAs in C2C12 myotubes
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 64th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibaguchi T, Claudia Perez Lopez, Sugiura T and Masuda K
2. 発表標題 Negative impact of icing treatment on qualitative recovery of injured soleus muscle in rats
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 64th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝口翼, Claudia Perez Lopez, 小間陸嗣, 米田隆, 増田和実
2. 発表標題 米醗酵飲料の継続的な摂取はヒトの持久性運動パフォーマンスを向上させる
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 Claudia Perez Lopez, 芝口翼, 小間陸嗣, 増田和実
2. 発表標題 Leucine stimulate mitochondrial biogenesis via regulation of PGC-1 $\beta$ -targeting miRNAs in C2C12 myotubes
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 小間陸嗣, 芝口翼, Claudia Perez Lopez, 増田和実
2. 発表標題 持久性トレーニングが骨格筋ミトコンドリアに内在するミオグロビンに及ぼす影響
3. 学会等名 令和元年度北陸体育学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishizawa R, Terada S, Higuchi M, Taguchi M and Masuda K
2. 発表標題 Ketone bodies induce mitochondrial biogenesis in skeletal muscle cells
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 63rd Annual Meeting (Minneapolis, MN, USA, May 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuda K, Shibaguchi T, Yamada T, Okumura K, Claudia Perez Lopez, Yamashita K, Jue T
2. 発表標題 Localization of myoglobin in mitochondria: implication on regulation of mitochondrial respiration in muscle
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 63rd Annual Meeting (Minneapolis, MN, USA, May 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Shibaguchi T, Tsuji A, Yamazaki Y, Matsui K and Masuda K
2. 発表標題 Grain fermented beverage treatment induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes
3. 学会等名 American College of Sports Medicine 63rd Annual Meeting (Minneapolis, MN, USA, May 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田和実, 芝口翼, Claudia Perez Lopez, 高倉久志
2. 発表標題 筋細胞のミトコンドリア内部におけるミオグロビンの相互作用
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会 (平成30年9月 福井)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下こころ, 芝口翼, Claudia Perez Lopez, 高倉久志, 増田和実
2. 発表標題 骨格筋ミトコンドリアに内在するMbと持久性トレーニングの影響について
3. 学会等名 平成30年度北陸体育学会大会 (平成31年1月 金沢)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Claudia Perez Lopez, Shibaguchi T and Masuda K
2. 発表標題 Leucine and Caffeine induce mitochondrial biogenesis and down-regulation of miRNAs in cultured mouse myotubes
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (Kobe, Japan, March 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野禎央, 芝口翼, 奥村和也, 増田和実
2. 発表標題 筋細胞のミトコンドリアに相互作用するミオグロビンの局在性
3. 学会等名 平成28年度北陸体育学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田和実, 奥村和也, 芝口翼
2. 発表標題 異なる筋種におけるミオグロビンのミトコンドリア内部局在性
3. 学会等名 第29回日本体力医学会北陸地方会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学運動生理学・生化学研究室 <a href="http://exercisephysiol.com">http://exercisephysiol.com</a>
---

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
連携研究者	芝口 翼  (SHIBAGUCHI TSUBASA)  (40785953)	金沢大学・国際基幹教育院・助教    (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	高倉 久志 (TAKAKURA HISASHI)  (20631914)	同志社大学・スポーツ健康科学部・助教  (34310)	
連携研究者	加藤 将夫 (KATO YUKIO)  (30251440)	金沢大学・薬学系・教授  (13301)	
連携研究者	森野 勝太郎 (MORINO KATSUTARO)  (90444447)	滋賀医科大学・糖尿病内分泌内科・准教授  (14202)	
連携研究者	橋本 健志 (HASHIMOTO TAKESHI)  (70511608)	立命館大学・スポーツ健康科学部・教授  (34315)	
連携研究者	三浦 進司 (MIURA SHINJI)  (10342932)	静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  (23803)	
連携研究者	古市 泰郎 (FURUICHI YASURO)  (40733035)	東京都立大学・人間健康科学研究科・助教  (22604)	

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
---------	---------