

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19482

研究課題名（和文）骨格筋ミトコンドリア生合成を促す栄養基質とmicroRNA干渉の解明

研究課題名（英文）Nutritional substrates and microRNA interference for promoting mitochondria biogenesis in skeletal muscle

研究代表者

芝口 翼（Shibaguchi, Tsubasa）

金沢大学・GS教育系・講師

研究者番号：40785953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、栄養素がもたらすミトコンドリア機能向上の背景にmicroRNAsを介した遺伝子発現抑制機構の関与を独自の視点と置き、miRNAsを外的に制御しながらミトコンドリア生合成をより強く上方調節すること（最大化）への可能性を検証した。我々が開発した糖-アミノ酸混合液には筋細胞のミトコンドリア生合成を誘発し、増えたミトコンドリアの活性を高く保つ働きがあることが示された。また、この混合液が含むロイシンにはmiR-494とmiR-696を協同的に発現抑制して筋細胞のミトコンドリア生合成を誘発させる働きがあるとともに、これらmiRNAs非依存的にミトコンドリア生合成を誘発させる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動や栄養素摂取によって骨格筋のミトコンドリア生合成が誘発されるが、この調節機構のうちmicroRNAを含む下方調節機序についてはその複雑さと多様さを理由にほとんど注目されていない。しかし、miRNAのいくつかは筋細胞でミトコンドリアのタンパク質合成を抑制的に制御し、運動トレーニングに対する応答性の違いにmiRNAが関与する可能性も示唆されている。つまり、これらmiRNAの制御力を弱めたり解除したりすることによってミトコンドリア生合成を調節し、運動や栄養の効果を最大化することが可能かもしれない。本研究の先には、miRNAを標的とした新たな運動・栄養処方や創薬研究等への応用発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study was to investigate 1) whether nutritional substrates enhance mitochondrial functions via genetic suppression mechanisms by microRNAs and 2) the possibility to maximize the induction of mitochondrial biogenesis through externally controlling miRNAs. We have developed a new sugar-amino acid mixture solution, and its administration induced mitochondrial biogenesis and increased mitochondrial membrane potential (a marker of mitochondrial activity) in C2C12 myotubes. In addition, leucine, a component of the sugar-amino acid mixture solution, had the ability to induce mitochondrial biogenesis via cooperatively downregulation of miR-494 and miR-696 in myotubes. Furthermore, we also suggested that leucine might stimulate mitochondrial biogenesis through independently of these miRNAs.

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 microRNA 栄養素 代謝

1. 研究開始当初の背景

1990年代後半にミトコンドリアの健全性が細胞や個体の健康にとって極めて重要であると再認識されて以降、スポーツ科学領域においてもミトコンドリア研究が国内外を問わず再燃している。例えば、ミトコンドリアの変異や機能不全が筋萎縮やミオパチーといった筋機能不全の原因となる(Chenら2010)。したがって、ミトコンドリアの機能解明とともに、それを保護し、活性化する方策の確立は、超高齢社会を迎えた我が国の喫緊の課題であるロコモティブ/メタリックシンドロームの解消には必要不可欠である。

ミトコンドリアの生合成には、AMPK系やカルシウム系のシグナル伝達経路の賦活化が重要視されている(Masudaら1999、Ljubicicら2010)。運動がこれらのシグナル伝達経路を活性化することは広く知られているが、我々はこれまでに、一部の栄養素(ポリフェノールやアミノ酸)に骨格筋のミトコンドリア生合成を誘発する働きがあり、さらに運動の効果を増幅させることを発見してきた。加えて、栄養素が運動とは異なる細胞内シグナル伝達経路を賦活化させる証拠も掴んだ(Hamidieら2015他)。その一方で、細胞内シグナル伝達経路の活性化の程度からだけではミトコンドリア生合成の亢進を十分に説明できていない。その一例として、ミトコンドリア生合成のマスター調節因子であるPGC-1 α の脱アセチル化の程度(活性化の指標)は、その上流因子や下流のミトコンドリアタンパク質の増加量とは必ずしも一致しない。この背景には、多岐にわたるタンパク質の発現機序の存在はもとより、下方調節している機構のバランスが運動や栄養などの外的な刺激によって変化している可能性がある。この下方調節因子の一つとして、タンパク質をコードしないノンコーディングRNAであるmicroRNA(miRNA)による翻訳抑制の関与が想定される。実際、一部のmiRNAs(miR-494、-696、-761)がPGC-1 α 経路のシグナル伝達因子の翻訳を阻害することが指摘されている(Yamamotoら2012、Limaら2017)。しかしながら、miRNAには多数のクラスターが存在することから、骨格筋細胞で働くmiRNAsの同定や、栄養や運動によるミトコンドリア生合成誘導へのmiRNAsの関与に関する体系的な研究が滞っている。

2. 研究の目的

本研究では、栄養素(ポリフェノールやアミノ酸、カフェイン等)がもたらすミトコンドリア機能の向上の背後にmiRNAsを介した遺伝子発現抑制機構の関与を独自の視点と置き、培養細胞モデルや実験動物モデルを用いた生化学的・分子生物学的検証を通じて、miRNAsを外的に制御しながらミトコンドリア生合成をより強く上方調節すること(最大化)への可能性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 栄養素の添加とミトコンドリア生合成・miRNAs

栄養素の添加がミトコンドリア生合成・miRNAsに及ぼす影響を検証するため、マウス由来骨格筋筋芽細胞株(C2C12細胞)を用いた。まず、我々の開発した最新型の糖-アミノ酸(SA)混合液がミトコンドリア生合成・機能に及ぼす影響を検証するため、分化誘導5日後のC2C12細胞の培地に最新型のSA混合液を0.5%量添加し、24時間培養した。24時間後にC2C12細胞を刈り取り、ミトコンドリア関連タンパク質量はWestern blot(WB)法で、ミトコンドリア膜電位はJC-1色素を用いて解析した。

次に、SA 混合液に含まれるロイシン (Leu) がミトコンドリア生合成・miRNA に及ぼす影響を検証するため、分化誘導 5 日後の C2C12 細胞の培地に Leu を 3 mM 添加し、24 時間培養した。24 時間後に C2C12 細胞を刈り取り、ミトコンドリア DNA コピー数、ミトコンドリア関連タンパク質、miRNAs (miR-494, miR-696)、ミトコンドリア生合成制御因子を qPCR 法や WB 法によって解析した。また、C2C12 細胞へ miRNAs mimic (miR-494, miR-696) を一過性に遺伝子導入し、これら miRNAs を過剰発現させた際の Leu 添加 (3 mM) がミトコンドリア生合成へ及ぼす影響についても検証を行った。

(2) 筋再生と miRNAs

筋再生過程におけるミトコンドリア生合成への miRNAs の貢献を検証するため、Wistar 系雄性ラット (10 週齢) を対象に、両後肢の足底筋に 0.5% 塩酸プピバカインを筋注し、筋損傷を惹起させた。損傷 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、14 日後、28 日後に足底筋を摘出し、miRNAs (miR-494, miR-146a)、ミトコンドリア DNA コピー数、ミトコンドリア関連タンパク質、ミトコンドリア生合成制御因子を qPCR 法や WB 法によって解析した。なお、対照群には 10 週齢の無処置のラットを用いた (Pre 群)。

4. 研究成果

我々が独自に開発した最新型のアミノ酸混合液を C2C12 筋管細胞に添加すると、添加 24 時間後にミトコンドリア関連タンパク質 (COX-IV) 発現量が増加傾向を示し、ミトコンドリア膜電位 (JC-1 Red/Green ratio) も有意に上昇した (図 1)。このことは、我々が開発した最新型の SA 混合液にミトコンドリア生合成を促し、増えたミトコンドリアの活性を高く保つ働きがあることを示唆する。

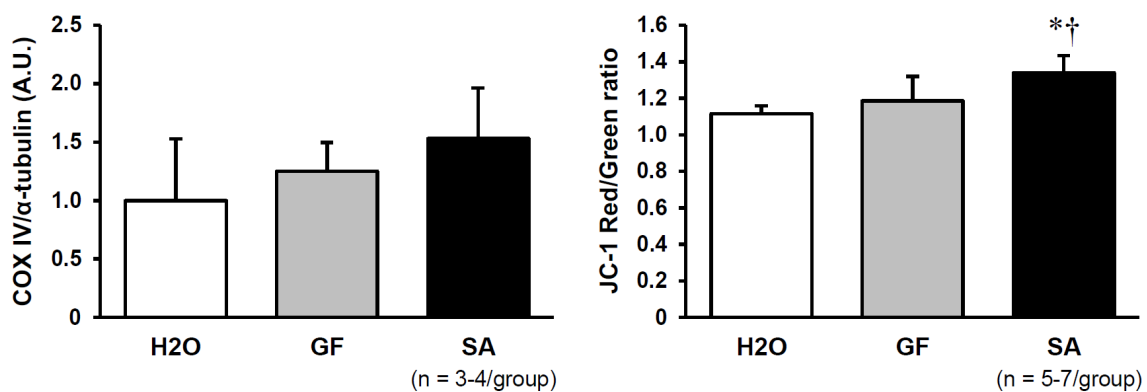


図 1. SA 添加に伴う C2C12 筋管細胞のミトコンドリア関連タンパク質発現量とミトコンドリア膜電位の変化。平均値±標準偏差。*: $P < 0.05$ vs H₂O, †: $P < 0.05$ vs GF.

次に、SA 混合液成分の内、ミトコンドリア生合成を誘発する働きがあることが報告されている Leu に着目し (D'Antona et al. 2010)、C2C12 筋管細胞への Leu 添加がミトコンドリア生合成と miRNAs 動態に及ぼす影響を検証した。その結果、Leu 添加 24 時間後にミトコンドリア DNA コピー数が高値を示す傾向が認められた (図 2)。また、miR-494 と miR-696 発現量はこの添加条件下で有意に低値を示した (図 2)。これら 2 つの miRNAs の発現量の間には有意な正の相関関係も認められたことから、Leu 添加に伴うミトコンドリア生合成誘発の背景には、miR-494 と miR-696 が Leu によって協同的に調節されている可能性が示唆された。

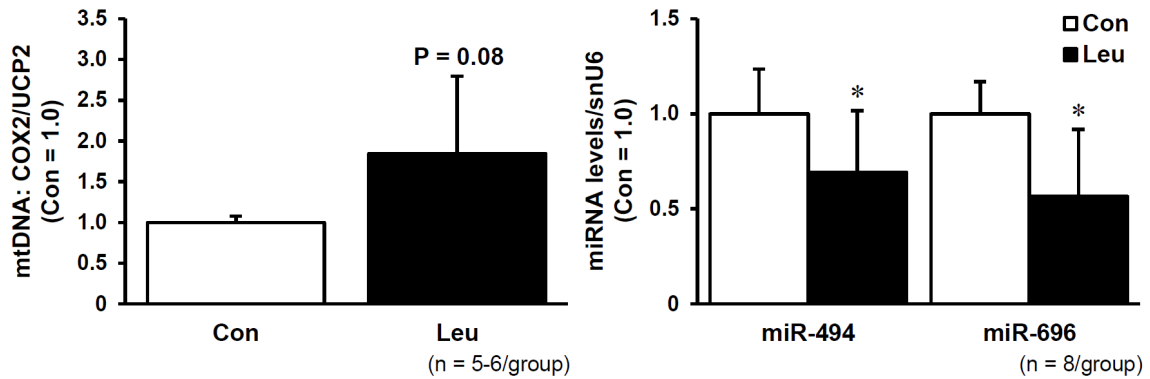


図 2. Leu 添加に伴う C2C12 筋管細胞のミトコンドリア DNA コピー数と miRNAs 発現量の変化. 平均値±標準偏差. *: P < 0.05 vs Con.

Leu によるミトコンドリア合成誘発作用が miR-494 と miR-696 の発現抑制を介して生じるか否かを明らかにするため、これら miRNAs を一過性に過剰発現させた際の Leu 添加の影響を検証した。その結果、miR-494 と miR-696 を過剰発現させた C2C12 細胞では、Leu 添加によってこれら miRNAs の発現量は変化しなかった。一方、mRNAs 過剰発現細胞ではミトコンドリア DNA コピー数や PGC-1 α mRNA 発現量が低値を示す傾向にあったが、Leu 添加によってそれらの抑制作用が減弱される傾向が認められた (図 3)。したがって、Leu 添加量が過剰発現させた miRNAs を発現抑制するのに不十分だった可能性は否定できないが、これらの結果は Leu が miR-494 や miR-696 非依存的な何らかの経路の活性化を介して、ミトコンドリア合成を誘発できる可能性を示唆する。

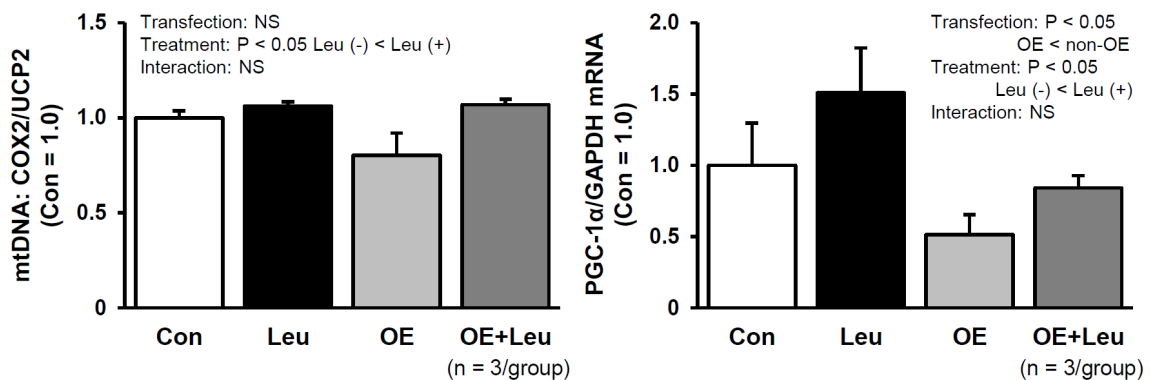


図 3. miRNAs 過剰発現細胞 (OE) への Leu 添加に伴うミトコンドリア DNA コピー数と PGC-1 α mRNA 発現量の変化. 平均値±標準偏差.

筋再生過程におけるミトコンドリア合成への miRNAs の貢献については、足底筋損傷後、ミトコンドリア DNA コピー数は損傷 3 日後をピークに有意に減少し、その後は時間経過に伴い損傷 28 日後までに非損傷筋レベルへ向けて回復した (図 4)。ミトコンドリア関連タンパク質 (PDH, COX-IV, VDAC) の発現動態もほぼミトコンドリア DNA コピー数と同様の挙動を示したが、VDAC のみ、損傷 28 日後の値が非損傷筋と比較して有意に低いままであった。足底筋損傷後、損傷 1 日後の時点で筋細胞特異的な酸素輸送担体であるミオグロビンの発現がほぼ消失し、損傷 5 日後まで再発現が認められなかった。その後、損傷 5-7 日後にかけてミオグロビンが再発現し、時間の経過とともに損傷 28 日後までに非損傷筋レベルへ向けて回復した。ミトコンドリア合成のマスターレギュレーターである PGC-1 α の発現量は、再生過程においてミトコンドリア DNA コピー数・関連タンパク質とほぼ同様の挙動を示した (図 4)。

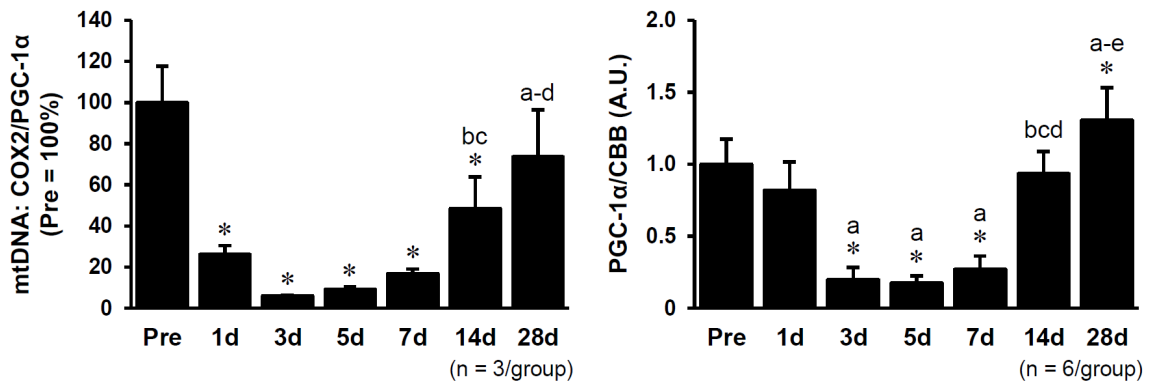


図 4. 筋再生過程におけるミトコンドリア DNA コピー数と PGC-1 α 発現量の変化. 平均値 \pm 標準偏差. *: P < 0.05 vs Pre, a-e: P < 0.05 vs 1d, 3d, 5d, 7d, and 14d, respectively.

一方、ミトコンドリア生合成や機能に関わる miRNAs (miR-494 と miR-146a) の発現量は、再生過程を通じて有意に変化しなかった (図 5) .

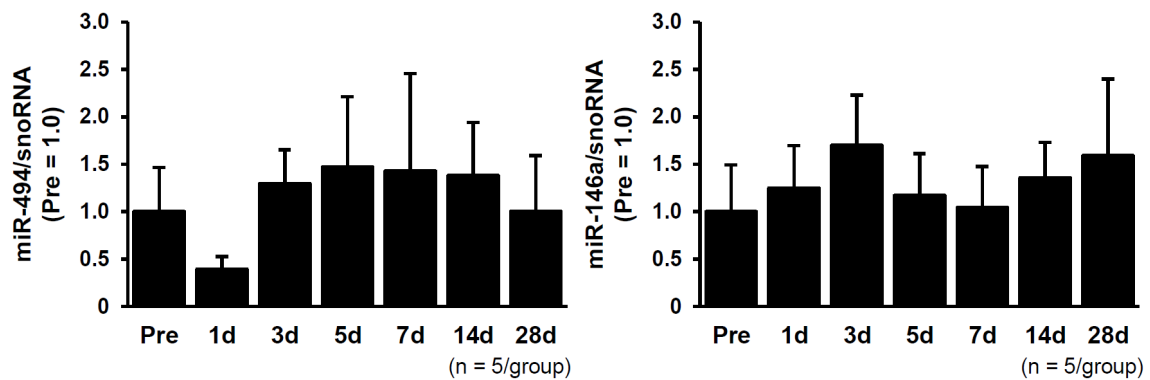


図 5. 筋再生過程におけるミトコンドリア DNA コピー数と PGC-1 α 発現量の変化. 平均値 \pm 標準偏差.

以上の結果から、筋再生過程におけるミトコンドリア生合成は損傷 3-5 日後から誘導され始め、ミオグロビンもそれに連動するがごとく発現量を増加させるが、miR-494 と miR-146a はこの間の Mito 生合成には関与しない可能性が示唆された。今後は再生過程初期における栄養基質の添加が、これら miRNAs を調節することによって Mito 生合成を亢進し得るか検証を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Perez-Lopez C, Shibaguchi T, Morino K, Koma R, and Masuda K	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of leucine on microRNAs and mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Exerc Sports Physiol	6. 最初と最後の頁 35-42
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝口翼, 小間陸嗣, 野中雄大, 杉浦崇夫, 増田和実
2. 発表標題 筋損傷後のアイシング処置が痛み関連因子とミトコンドリア生合成に及ぼす影響
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芝口翼, 小間陸嗣, 杉浦崇夫, 増田和実
2. 発表標題 骨格筋損傷後のアイシングが線維化とミトコンドリア生合成に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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