

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年6月8日現在

機関番号 : 34310
研究種目 : 研究活動スタート支援
研究期間 : 2012~2013
課題番号 : 24800074
研究課題名 (和文) 細胞内酸素運搬担体が増加する分子メカニズムの解明とその至適発現条件の検討
研究課題名 (英文) The elucidation of molecular mechanism for increase in myoglobin expression and the examination of its optimal expression condition.
研究代表者 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
交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,300,000 円、 (間接経費) 690,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、持久的運動トレーニングによって筋細胞内酸素運搬担体であるミオグロビン (Mb) の発現量が増加する分子機序として、ミトコンドリア生合成を司る PGC-1 α が関与しているのか否かについて検討した。その結果、4週間以上の eTR によって Mb が増加したものの、PGC-1 α は増加しなかった。さらに、siRNA 導入による PGC-1 α の mRNA 発現量の減少は Mb の mRNA 発現量を減少させなかった。したがって、Mb の発現調節に対して PGC-1 α の発現量は関与しないことが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Endurance exercise training (eTR) improves muscle oxidative capacity via an increase in both mitochondrial protein and myoglobin (Mb). Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) increases Mb expression in skeletal muscle. Knockout of PGC-1 α , however, does not attenuate eTR-induced increase in Mb expression. Therefore, it is controversial how PGC-1 α is involved in eTR-induced increase in Mb expression in skeletal muscle. The purpose of this study was to verify whether an increase in PGC-1 α expression in skeletal muscle is required for the eTR-induced increase in Mb expression. Timing of increase in Mb expression due to eTR was different from that of mitochondria protein (COX IV). PGC-1 α expression did not show any significant differences during the training protocol in this study. Moreover, the PGC-1 α mRNA knockdown by siRNA transfection did not attenuate Mb mRNA expression in C2C12 cells. In conclusion, PGC-1 α is not essential for the eTR-induced increase in Mb expression in skeletal muscle.

研究分野 : 総合領域

科研費の分科・細目 : 健康・スポーツ科学

キーワード : 持久的トレーニング、ミオグロビン、転写因子、筋組織、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

持久的運動トレーニング (eTR) は骨格筋の有酸素性代謝能力を亢進させ、運動パフォーマンスの向上や代謝疾患の予防・改善をもたらす (Saltin & Gollnick 1983; Kraus et al. 2001)。この際、骨格筋組織内ではミトコンドリアの酸素利用能力が亢進するとともに、その酸素需要を満たすことができる酸素供給システムが構築される (例: 毛細血管密度の上昇や筋細胞内酸素運搬担体 (ミオグロビン; Mb) の増加など)。

近年、我々は筋収縮時におけるミトコンドリア酸素需要の上昇に対して、Mb が結合酸素を解離することによって、ミトコンドリア

への酸素供給に貢献していることを報告した (Masuda et al., 2010; Takakura et al., 2010)。また、eTR 後の骨格筋では筋収縮時における Mb からの酸素供給量が増加したことから、酸素消費速度の加速化に Mb が貢献している可能性が示唆された (Takakura et al., in submitting)。運動開始時の筋酸素消費速度は筋有酸素性代謝能力を反映する指標であることから、eTR によってミトコンドリアだけでなく Mb も効率的に増加させることが筋有酸素性代謝能力の向上にとって必要不可欠であろう。

ミトコンドリア生合成には、ミトコンドリアのマスターレギュレーターと言われるペ

ルオキシソーム増殖剤活性化受容体ガンマ共活性化因子1アルファ (PGC-1 α) が重要な働きを担う。骨格筋における PGC-1 α の過剰発現はミトコンドリアタンパク質を増加させる (Miura et al., 2006; Wende et al., 2007)。さらに、Lin et al. (2002) のトランスジェニックマウスを用いた研究では、PGC-1 α の発現量増加がミトコンドリアだけでなく、Mb 発現量も増加させた。仮に、Mb 発現量も PGC-1 α 発現量によって調節されていれば、eTR に由来するミトコンドリアタンパク質と Mb の発現量増加に関しては PGC-1 α を標的タンパクとして eTR を実施すれば良いと考えられる。しかしながら、Leick et al. (2007) は PGC-1 α ノックアウトマウスに走行トレーニングを負荷した結果、Mb の増加の程度が野生型と同様であったため、eTR 由来の Mb 発現量の増加に PGC-1 α の発現量が関与するの否かについては不明である。

2. 研究の目的

本研究では、eTR 期間中の Mb 発現量の増加が PGC-1 α 発現量の増加を伴うか否かについて検討した。また、PGC-1 α の mRNA 発現量が Mb の mRNA 発現量を調節しているの否かを明らかにするために、マウス筋芽細胞 (C2C12) を用いて PGC-1 α の mRNA 発現抑制が Mb の mRNA 発現量に影響を及ぼすの否かについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 持久的トレーニング期間中の Mb 発現量の増加が PGC-1 α 発現量の増加を伴うか否かについての検討

被験動物は Wistar 系雄性ラットとし、対照 (Con) 群とトレーニング期間を 2, 4, 6 週間とする 3 群 (それぞれを 2 wk-eTR 群、4 wk-eTR 群、6 wk-eTR 群とする) に分類した。eTR はトレッドミル運動とし、5 日/週の頻度で実施した (走行速度: ~30 m/min、走行時間: ~90 min、傾斜: 5°)。eTR 開始前には、予備トレーニングを 3 日間行った。なお、各 eTR 期間の終了時点において被験動物の週齢が 10 週齢となるように各 eTR 群のトレーニング開始時期の週齢を調整した。

eTR 期間が終了した翌日に腓腹筋深層部位を摘出した。ホモジナイズを行った筋組織サンプルを用いて、細胞質画分内の Mb とミトコンドリアタンパク質である COXIV、細胞質マーカであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH)、全画分内の PGC-1 α をウェスタンブロッティング法によって検出し、トレーニング期間による適応の違いを検討した。

(2) C2C12 細胞における PGC-1 α の mRNA の発現抑制が Mb の mRNA 発現量に及

ぼす影響についての検討

分化誘導 24 時間後に PGC-1 α mRNA の siRNA をリポフェクション法によって C2C12 細胞に導入した。siRNA 含有培地で 48 時間培養した後に、さらに siRNA 不含培地で 24 時間培養し、細胞を刈り取った。刈り取った C2C12 細胞は、Mb や PGC-1 α 、s18 の mRNA 発現量を real-time PCR 法によって測定し、siRNA の導入による PGC-1 α の mRNA 発現抑制が Mb の mRNA 発現量の減少を導くか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 本研究では 4 週間以上の eTR によって腓腹筋深層部位における Mb 発現量が増加、もしくは増加傾向を示した (図 1)。各群間での比較においては、4 wk-eTR 群の Mb 発現量は Con 群のそれと比較して有意に高値を示し、6 wk-eTR 群の Mb 発現量は、Con 群と比較して高値傾向を示した (図 1)。このとき、ミトコンドリアタンパク質である COXIV は 2 週間以上の eTR によって増加することが確認されたため、Mb 発現とミトコンドリアタン

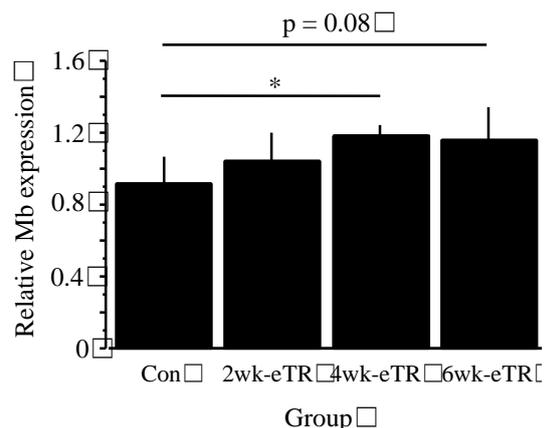


図1. トレーニング期間の違いが Mb 発現量に及ぼす影響について。値は Mean ± SD (n = 5-7 in each group), *: p < 0.05 □

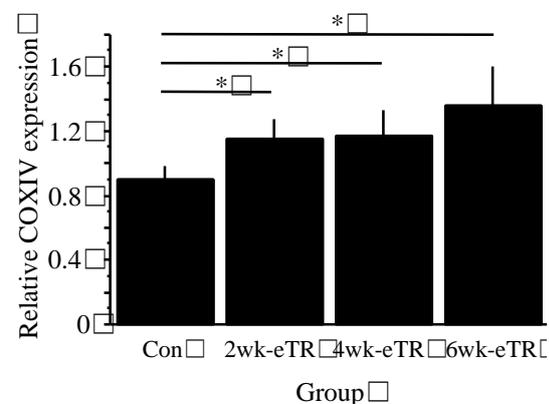


図2. トレーニング期間の違いが COXIV 発現量に及ぼす影響について。値は Mean ± SD (n = 5-7 in each group), *: p < 0.05 □

パク質発現は異なる経路で発現調節が行われていることが示唆された(図2)。なお、腓腹筋深層部位の PGC-1 α の発現量はいずれかの群間においても有意な発現量の違いは認められなかった(図3)。以上のことから、Mb 発現量は少なくとも4週間の eTR によって増加することが示された一方で、6週間の eTR によっても PGC-1 α 発現量の増加を確認できなかった。したがって、eTR による Mb 発現量の増加に対しては PGC-1 α 発現量は関与していない可能性が示唆された。

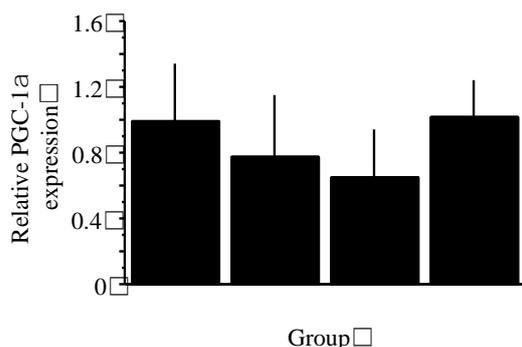


図3. トレーニング期間の違いがPGC-1 α 発現量に及ぼす影響について。値はMean \pm SD (n = 5-7 in each group), *: p < 0.05

(2) PGC-1 α mRNA の siRNA を導入することによって PGC-1 α の mRNA 発現量は抑制された一方で、Mb の mRNA 発現量は siRNA 導入による影響を受けなかった。したがって、eTR によって Mb 発現量が増加する生合成メカニズムには、PGC-1 α の発現量は関与しない可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Masuda K, Yamada T, Ishizawa R & Takakura H: Role of myoglobin in regulating respiration during muscle contraction. J Physical Fitness Sports Med 2: 9-16, 2013. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfs/2/1/2_9/_article (査読なし)
- ② Yamada T, Furuichi Y, Takakura H, Hashimoto T, Hanai Y, Jue T and Masuda K: Interaction between myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscle. J Appl Physiol, 114: 490-497, 2013. DOI: doi: 10.1152/jappphysiol.00789.2012. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Takakura H, Tanaka G, Tanaka S, Kato H, Shibahara T, Masuda S, Iwanaka N, Hata T, Izawa T, Jue T & Masuda K: PGC-1 α expression is not essential for endurance training-induced increase in myoglobin expression in skeletal muscle. American College of Sports Medicine 61st Annual Meeting (Orland, FL, USA) 2014. 5. 30.
- ② 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: 持続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(平成25年9月22日 東京) 体力科学 62: 578, 2013.
- ③ 高倉久志, 蔭地野稔, 山田達也, 増田和実: 骨格筋ミトコンドリア呼吸能力に対するミオグロビンの空間的・生理学的な関連性. 第67回日本体力医学会大会(平成24年9月14日 岐阜) 体力科学 61: 611, 2012.

[図書] (計 1 件)

- ① 高倉久志, 増田和実: I-19 ミトコンドリアとミオグロビン. In 身体運動と呼吸・循環機能(宮村実晴 編集), pp. 162-167, (株)真興交易, 東京, 2012. 8.

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
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

(2) 研究分担者
()
研究者番号：

(3) 連携研究者
()
研究者番号：