

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560336

研究課題名(和文) 酸素輸送担体に作用する骨格筋ミトコンドリアタンパク質の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for interaction of oxygen binding protein with mitochondrial proteins 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミオグロビン(Mb)とミトコンドリア(mito)との直接的な関連性を解明するため、本萌芽的研究では、mitoに局在するMbに相互作用するタンパク質を同定することを目的に細胞生物学的解析を行った。マウス由来筋芽細胞株にFlagタグ付きMbを発現させるベクターを導入し、Mb過剰発現細胞を構築した。この細胞のmito画分からFlagを沈降し、Mbに相互作用しているタンパク質群を同定した。その結果、全体の約24%がmitoタンパク質であった。WBでもMbと呼吸鎖複合体や外膜のタンパク質との相互作用が確認された。以上の結果は、Mbがmitoへ相互作用し、mitoの機能修飾している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Cellular respiration depends upon a coordinated response of the cardiovascular and metabolism. Myoglobin (Mb), expressing specifically in myocytes, has been found in mitochondria. This unique finding has led us to the hypothesis that mitochondrial Mb may have a direct role for the regulation of mitochondrial respiration. In order to test this idea, we determined protein-protein interaction between Mb and mitochondrial proteins in genetically modified C2C12 cell by proteomic analysis, IP and WB. It was confirmed that Flag-tagged Mb localized in mitochondria in the C2C12 cells that express Flag-Mb stably. Proteomic analysis identified several mitochondrial proteins, which interacted with Mb. These proteins detected in IP samples of Mb-Flag, occupied 24% of entire proteins. IP and WB detected both outer and inner membrane proteins (VDAC and COX-IV) from the mitochondrial fraction. These results suggested the potential interaction of mitochondrial proteins with Mb in skeletal myocytes.

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 相互作用 運動

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋の安静時と収縮時におけるエネルギー需要は劇的に異なっている。したがって、そのエネルギー需要に見合うだけのATPを再合成するシステムが骨格筋細胞内には存在している。骨格筋の特に遅筋線維においてミトコンドリアが豊富に存在している。ミトコンドリアと共に遅筋線維に多く発現し、組織の赤色の元となっているタンパク質がミオグロビン (Mb) である。Mb が骨格筋の酸素代謝機構において果たす役割は長年不明であった。それは、Mb ノックアウトマウスの寿命、運動、繁殖能力に大きな悪影響がなく、Mb の重要性が低く見積もられたことに起因する。それに対し、我々は Mb が筋細胞内でも重要な役割を担うことを示唆した。そのうちの 1 つのエビデンスは、ミトコンドリアの酸素需要が増加した直後に Mb が酸素を解離し、供給することである (Takakura et al. 2010)。しかしながら、どのようなメカニズムを介して Mb がミトコンドリアの酸素需要に即時的に反応することが可能なのかは疑問として残されたままであった。

近年我々は、Mb がミトコンドリアの周辺および内部にも局在することを明らかにし、即時的にミトコンドリアの酸素需要を満たす仕組みの存在を示唆した (Yamada et al. 2013)。ミトコンドリアの内側にも Mb が局在する事実は我々が独自に報告したエビデンスであるため、ミトコンドリア内に局在する Mb の機能は未だに解明されていない。そのため、この Mb の役割を明らかにすることは骨格筋ミトコンドリアを介したエネルギー代謝調節機構に新たな概念をもたらすと予想された。

### 2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリアに局在する Mb の役割を明らかにすることを目的とした。ミトコンドリア内における役割を求める手掛かりとして、Mb と相互作用するタンパク質を網羅的に同定することにした。相互作用するタンパク質を特定し、そのタンパク質が担う役割を同定出来れば、Mb が複合体の一部として何らかの生理機能に貢献していることが明らかになることが可能であると考えたためである。

### 3. 研究の方法

Mb を含む複合体を特異的に精製するために Mb 遺伝子改変モデルを作製して実験に用いることにした。まず始めにマウス骨格筋芽細胞由来の C2C12 を用いて、Mb に Flag エピトプタグを融合させたタンパク質である Mb-Flag を安定的に発現させる細胞株を構築した。遺伝子導入に用いたプラスミドベクターは IRES 配列を介して、Mb-Flag に加えて、GFP も同時に発現させることができる。Nucleofection 法によって C2C12 に遺伝子を導入し、安定的に発現するようになった細胞

を選別した。選別はネオマイシン耐性の有無と GFP の蛍光を発するか否かを目印にした。選別された細胞を増殖させ、分化誘導し Mb-Flag が過剰発現した筋管細胞を得た。得られた細胞を回収し、ホモジナイズした。そのホモジナイズサンプルから Flag 抗体によって特異的に Mb-Flag を免疫沈降した。免疫沈降したサンプルを電気泳動によって分離し、銀染色法を用いてサンプルに複数のタンパク質が含まれているかを確認した。複数のバンドが検出されたサンプルを質量分析にかけることによって Mb-Flag と相互作用すると考えられるタンパク質を網羅的に分析した。それと同時に生化学的に相互作用するタンパク質を同定するため、ウェスタンブロット法 (WB) を用いて特異的に相互作用すると予想されるタンパク質を検出した。また、*in vivo* でも Mb を免疫沈降し、相互作用するタンパク質の同定を試みた。

### 4. 研究成果

Mb-Flag 安定発現株において GFP の緑色蛍光が観察され、その蛍光が示す細胞の形態が管状になったことから、GFP を発現させる筋管細胞に分化誘導出来たことが示された。さらに、Mb-Flag の発現を WB にて確認したところ Flag 抗体に対するバンドが検出された。加えて、遠心分離法を用いて細胞成分を分離し、細胞質とミトコンドリア画分から Mb-Flag の検出を試みた結果、どちらの画分からも Mb-Flag が検出された。したがって、安定発現株には Mb-Flag が過剰発現し、発現した Mb-Flag はこれまで我々が *in vivo* モデルにて確認してきた結果と同様にミトコンドリアにも局在していることが明らかにされた。これらの結果から、分析対象として適切であるモデルを構築できたことが確認された (図 1)。

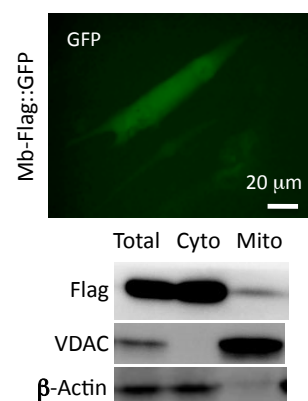


図1. 安定発現株の形態とMb-Flagの局在

このモデルを用いて、細胞内から Mb-Flag のみを免疫沈降したサンプルを銀染色し、タンパク質が複数含まれるか否かを検証した。免疫沈降は Mb-Flag 安定発現株のミトコンドリア画分と細胞全体、そして対照サンプルとして C2C12 の各画分を用いて行い、それぞれ

の免疫沈降サンプルを銀染色に用いた。その結果、複数のタンパク質がいずれのサンプルからも検出された (図 2)。この結果から分かる点として、非特異的な結合が対照サンプルにおいて多く見られること。そして、細胞全体を用いたサンプルはバンドの数が多く、1バンドあたりの染色強度が高い。つまり、より多くのタンパク質が共沈されてきていることが示唆される。したがって、その後を実施した質量分析では細胞全体のサンプルを用いて、分析を行うこととした。

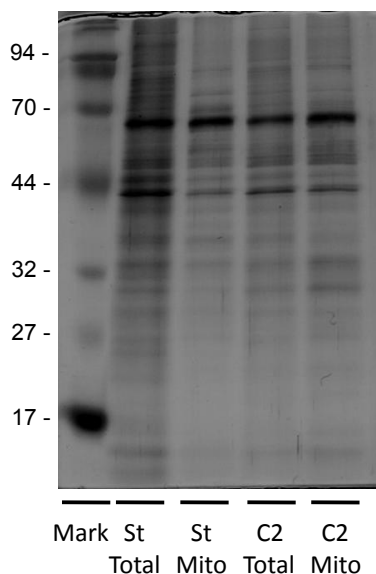


図2. 免疫沈降サンプルの銀染色画像

安定発現株の細胞全体から核を除いた画分を用いて免疫沈降を行い、Mb-Flag のみを精製したサンプルを質量分析にかけた。また C2C12 における同様の画分も質量分析にかけ、C2C12 から検出されないタンパク質を Mb-Flag と相互作用するタンパク質としてリストアップした。その結果、複数のタンパク質がサンプル内から同定された。その中でもミトコンドリアのタンパク質が 24%を占め、最も含有タンパク質の割合が多いオルガネラがミトコンドリアであった (図 3)。

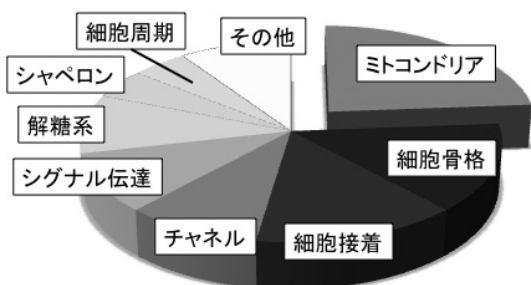


図3. Mb-Flagの免疫沈降サンプルから同定されたタンパク質群

質量分析の網羅的解析と並行して、相互作用するタンパク質を特異的にも分析した。結果としてミトコンドリア内において、酸素を

最終的に還元する呼吸鎖複合体 4 と Mb-Flag が相互作用することを示唆するデータが得られた。Mb-Flag の免疫沈降サンプルから複合体 4 を形成するサブユニットの 1 つ COX-IV が検出された (図 4)。また、安定発現株で得られた結果を基にして、哺乳類の筋組織を用いた場合においても同様の結果が得られるか否かを検証した。ラットの骨格筋からミトコンドリア画分を抽出し、ミトコンドリア画分から Mb 抗体を用いて、Mb を免疫沈降したサンプルから各種タンパク質を検出した。ラット骨格筋の Mb 免疫沈降サンプルから COX-IV および、ミトコンドリア外膜のタンパク質である VDAC-I が検出された。その一方でサイトクロム C (cyto c) と GAPDH は検出されなかった (図 5)。これらの結果は安定発現株を用いた結果と一致している。COX-IV は特異的検出によって、VDAC-I は質量分析によってサンプル内から同定された。cyto c と GAPDH は質量分析および特異的検出によって免疫沈降サンプルには含まれていないことが明らかになっていた。

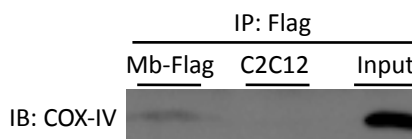


図4. Mb-Flagの免疫沈降物から COX-IVを検出

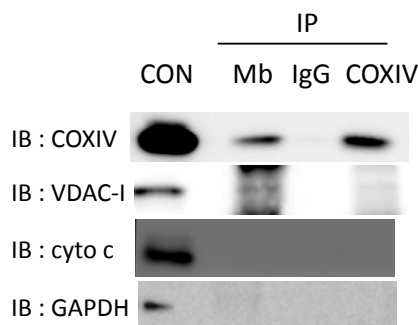


図5. ラット骨格筋組織におけるMbとミトコンドリアタンパク質の相互作用

これらの結果を総合すると、ミトコンドリアに局在する Mb は外膜の VDAC-I と相互作用することが明らかとなった。またミトコンドリア内膜の複合体 4 と相互作用することも明らかになった。ただし、呼吸鎖において複合体 4 に電子を伝達する役割を持つ cyto c とは相互作用しないことから複合体 4 と特異的に相互作用し、何らかの役割を持つことが示唆された。したがって、本研究から得られた結果から Mb がミトコンドリア内において担う役割を推測するに十分な手掛かりを得ることが出来た。今後の研究では複合体 4 や VDAC-I との相互作用から Mb の役割を解明することに焦点を合わせることにする。

## 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3件)

1. 澤本加那子, 山田達也, 蔭地野稔, 石澤里枝, Hamidie DR Ronald, 新田咲, 増田和実: 膜透過処理による骨格筋ミトコンドリア呼吸活性の定量化と異なる筋線維タイプにおける酸素消費速度の比較. 北陸体育学会紀要 50: 7-18, 2014.
2. Masuda K., Yamada T. Jue T: Reply to Pancheva, Panchev and Pancheva [Letter to Editor]. J Appl Physiol 115: 151, 2013.
3. Masuda K., Yamada T, Ishizawa R and Takakura H: Role of myoglobin in regulating respiration during muscle contraction (Review). J Physical Fitness Sports Med 2: 9-16, 2013.

[学会発表] (計8件)

1. Yamada T, Jue T and Masuda K: New insights for the factor regulating muscle mitochondrial respiration. Cell Symposia System approach to Metabolic Diseases, Chicago, IL, USA, October 1-3, 2014.
2. 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19-21日, 長崎大学, 長崎.
3. 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呼吸のミオグロビン依存的調節. 第50回北陸体育学会大会, 平成26年3月23日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
4. 岩中伸壮, 石澤里枝, 山田達也, 高倉久志, 橋本健志, 横川拓弥, 増田和実: カフェインがミオグロビタンパク質合成に及ぼす影響. 第68回日本体力医学会大会, 平成25年9月21-23日, 日本教育会館, 東京.
5. 山田達也, 蔭地野稔, 石澤里枝, 増田和実: 骨格筋ミトコンドリア呼吸のミオグロビン依存的調節. 第68回日本体力医学会大会, 平成25年9月21-23日, 日本教育会館, 東京.
6. 増田和実: 骨格筋ミトコンドリアへの酸素供給に対するミオグロビンの貢献の可能性. 第21回日本運動生理学会大会(招待), 平成25年7月27-28日, 東京国際大学, 埼玉.
7. Nitta S, Ishizawa R, Yamada T, Hamidie DRRA and Masuda K: AICAR stimulation increased mitochondrial cd36 presence in C2C12 cells. European College of Sport Science 18th Annual Congress,

Barcelona, Spain, June 26-29, 2013.

8. Yamada T, Iwanaka N, Hashimoto T, Jue T, Masuda K: Interaction of mitochondrial proteins with myoglobin in C2C12, mouse skeletal muscle cells. American College of Sports Medicine 60th Annual Meeting, Indianapolis, IN, USA, May 29-June 1, 2013.

[その他]

ホームページ等

金沢大学運動生理学・生化学研究室 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 DR Ronald, 増田和実. 骨格筋ミトコンドリア呼吸のミオグロビン依存的調節. 第50回北陸体育学会大会, 平成26年3月23日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.

## 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 HISAHI)

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)

金沢大学・人間科学系・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

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

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