

The role of myoglobin for the mitochondrial respiration in skeletal muscle

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42375

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



平成 26 年度

博士論文

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

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻動態生理学講座

1223032007

山田達也

指導教員 増田和実

2015 年 4 月 1 日 提出

目次

略号と記号	…vi
List of Figures	…ix
List of Table	…xi
I. 緒言	…1
II. 先行研究	…4
1. ミトコンドリアの構造	…4
2. エネルギー供給機構	…5
A. 複合体 I (NADH-coenzyme Q reductase: complex I)	…5
B. 複合体 II (succinate dehydrogenase: complex II)	…7
C. 複合体 III (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase: complex III)	…8
D. 複合体 IV (cytochrome c oxidase: complex IV)	…8
3. ミトコンドリアへの酸素運搬	…10
4. 新規にミトコンドリアに局在することが 示されたタンパク質	…12
A. MitoNEET	…12
B. 乳酸脱水素酵素 (LDH)	…13
C. シグナル伝達および転写活性化 3 (Stat3; signal transducer and activator of transcription 3)	…13
5. Mb の構造と物性	…14
6. Mb の機能	…17
A. 酸素貯蔵機能	…18

B. 酸素促進拡散機能	…19
C. 酸素運搬機能	…20
D. 細胞内酸素濃度の均質化	…20
E. 酸化的リン酸化の促進機能	…21
F. NO との結合能力、抗酸化機能	…21
G. Mb の存在場所	…22
7. Mb に関する対立エビデンス	…23
A. Mb の拡散速度	…23
B. ミトコンドリアへの酸素供給	…23
8. ヘムタンパク間の相互作用	…24
A. Mb とサイとクロム b ₅ (cytochrome b ₅ ; cyto b ₅) の相互作用	…24
B. cyto b ₅ と cyto c の相互作用	…25
C. cyto c と Mb の相互作用	…25
9. ミトコンドリアのタンパク取り込み装置	…26
III. 研究目的及び検討課題	…28
1. ミトコンドリアに局在する Mb の特徴 (実験 I)	…28
2. Mb を過剰発現させた筋管細胞において ミトコンドリアが示す表現型 (実験 II)	…30
3. 一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞の ミトコンドリアが示す表現型 (実験 III)	…30
IV. ミトコンドリアに局在する Mb の特徴 (実験 I)	…31
1. 目的	…31
2. 方法	…31
A. 被験動物	…32

B. 免疫蛍光抗体染色のための組織標本	…32
C. 免疫蛍光抗体染色	…33
D. 電子顕微鏡観察	…34
E. ウェスタンブロッティングのための組織標本	…35
F. ウェスタンブロッティングのためのサンプル調製	…35
G. ウェスタンブロッティング	…36
H. 免疫沈降のための組織標本およびサンプル調製	…37
I. 免疫沈降法による各タンパク質の精製	…37
J. 画像解析と定量	…38
K. 統計処理	…38
3. 結果	…39
A. 腓腹筋の免疫蛍光抗体染色画像	…39
B. 腓腹筋深層部の電子顕微鏡観察画像	…39
C. 遠心分離サンプルのタンパク質 およびミトコンドリア画分の Mb	…41
D. Mb と COXIV との相互作用の検証	…41
4. 考察	…44
A. ミトコンドリアの Mb (Mito-Mb) が 局在する場所とその量	…44
B. Mb と呼吸鎖複合体のサブユニットとが 相互作用する意義	…46
5. 要約	…46
V. Mb を過剰発現させた筋管細胞における ミトコンドリアの表現型 (実験 II)	…47
1. 目的	…47

2.	方法	…47
A.	培養細胞及び培養条件	…47
B.	Mb 安定発現培養細胞株の構築	…48
C.	生細胞における GFP の緑色蛍光観察	…49
D.	ウエスタンブロッティングのためのサンプル調製	…49
E.	免疫沈降法	…50
F.	ウエスタンブロッティング法	…50
G.	ミトコンドリア呼吸活性の測定	…51
H.	CS 活性の測定	…51
I.	Real time qPCR 法を用いた mtDNA/nDNA の算出	…52
J.	呼吸鎖複合体酵素活性の測定	…52
K.	統計処理	…54
3.	結果	…54
A.	Mb 過剰発現筋管の特徴	…54
B.	Mb 過剰発現筋管の ミトコンドリア呼吸能力とそれに関わる指標	…54
4.	考察	…56
5.	要約	…61
VI.	一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞における ミトコンドリアの表現型（実験 III）	…63
1.	目的	…63
2.	方法	…64
A.	培養細胞と培養条件	…64
B.	一過性遺伝子改変モデルの作出	…64
C.	ウエスタンブロッティングのためのサンプル調製	…65

D. ウェスタンブロッティング法	…65
E. CS 活性の測定	…65
F. ミトコンドリア呼吸活性の測定	…65
G. 呼吸鎖複合体酵素活性の測定	…65
3. 結果	…65
A. 一過性 Mb 遺伝子改変筋芽細胞の特徴	…65
B. 一過性遺伝子改変筋芽細胞の ミトコンドリア呼吸活性	…67
C. 一過性遺伝子改変筋芽細胞における 呼吸鎖複合体の酵素活性	…70
4. 考察	…70
A. Mb が complex IV の酵素活性を 上昇させるメカニズム	…74
B. Mb が complex IV と相互作用する必要性	…75
5. 要約	…75
VII. 討論	…76
1. ミトコンドリアに局在する Mb の重要性	…76
2. 筋細胞に Mb が存在する意義; 酸素代謝の観点から	…79
3. 細胞分化過程におけるミトコンドリアの可塑性	…81
VIII. 総括	…84
謝辞	…86
References	…88

略号と記号

ADP	: adenosine diphosphate, アデノシン 2 リン酸
ATP	: adenosine triphosphate, アデノシン 3 リン酸
cHsp70	: cytosolic heat shock protein 70, 細胞質熱ショックタンパク 70
CO	: carbon monoxide, 一酸化炭素
CO ₂	: carbon dioxide, 二酸化炭素
CoQ	: coenzyme Q, 補酵素 Q
COX	: cytochrome c oxidase, シトクロム c オキシダーゼ
COXIV	: complex IV subunit IV, 複合体 IV サブユニット IV
CS	: citrate synthase, クエン酸合成酵素
cyto b ₅	: cytochrome b ₅ , サイトクロム b ₅
cyto c	: cytochrome c, サイトクロム c
ΔP_{O_2}	: deita oxygen partial pressure, 酸素分圧勾配
DBS	: donor bovine serum, ウシ供与血清
deoxy-Mb	: deoxygenation myoglobin, 脱酸素化ミオグロビン
D _{Mb}	: diffusion coefficient of Mb, Mb の拡散係数
DNA	: deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸
ECL	: Enzymatic Chemiluminescence, 酵素触媒化学発光
EDTA	: Ethylenediamine Tetraacetic Acid, エチレンジアミン 4 酢酸
F ₀ F ₁ ATPase	: F ₀ F ₁ ATPsynthase, F ₀ F ₁ ATP 合成酵素
FAD	: oxidized flavin adenine dinucleotide, 酸化型フラビンジヌクレオチド

FADH ₂	: reduced flavin adenine dinucleotide, 還元型フラビンジヌクレオチド
FBS	: fetal bovine serum, ウシ胎児血清
FRAP	: fluorescence recovery after photobleaching フォトブリーチング法
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
gas	: m. gastrocnemius, 腓腹筋
GFP	: green fluorescence protein, 緑色蛍光タンパク質
H ⁺	: proton, 水素イオン
Hb	: hemoglobin, ヘモグロビン
HRP	: horseradish peroxidase, 西洋わさびペルオキシダーゼ
hrt	: heart, 心筋
IgG	: immunoglobulin G, 免疫グロブリン G
IMF	: intermyofibrillar, 筋原線維間
IRES	: internal ribosomal entry site, 内部リボソーム浸入部位
LDH	: lactate dehydrogenase, 乳酸脱水素酵素
LVDP	: left ventricular diastolic pressure, 最大左心室圧
Mb	: myoglobin, ミオグロビン
Mb-O ₂	: myoglobin O ₂ , 酸素化ミオグロビン
MCT1	: monocarbonic acids transporter 1, モノカルボン酸トランスポーター1
Mito-Mb	: mitochondrial myoglobin, ミトコンドリアに局在する Mb
MPP	: mitochondrial processing peptidase, ミトコンドリアプロセッシングペプチド分解酵素

MSF	: mitochondrial import stimulate factor, ミトコンドリア取り込み刺激因子
mtDNA	: mitochondrial DNA, ミトコンドリア DNA
mtHsp70	: matirix heat shock protein 70, ミトコンドリアマトリックスの Hsp70
NADH	: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, 還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド
nDNA	: nuclear DNA, 核 DNA
NIRS	: near infrared spectroscopy, 近赤外線分光法
NMR	: nuclear magnetic resounances, 核磁気共鳴法
NO	: nitric monoxide, 一酸化窒素
O ₂	: oxygen, 酸素
Oxy-Mb	: oxydated myoglobin, 酸化ミオグロビン
PB	: phosphatebuffer, リン酸緩衝液
qPCR	: quantitative polymerase chain rection, 定量ポリメラーゼ連鎖反応
PFA	: paraformaldehyde, パラフォルムアルデヒド
Pi	: inorganic phosphate, 無機リン
pla	: m. plantaris, 足底筋
PO ₂	: oxygen partial pressure, 酸素分圧
PVDF	: polyvinylidene difluoride, ポリフッ化ビニリデン
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS ゲル電気泳動
siRNA	: small interference RNA, 小分子干渉 RNA
sol	: m. soleus, ヒラメ筋
SS	: subsarcolemmal, 筋線維鞘直下型

Stat3	: signal transducer and activator of transcription 3, シグナル伝達および転写活性化タンパク 3
TCA	: tricarboxylic acid, トリカルボン酸
Tim	: translocase of the inner mitochondrial membrane, ミトコンドリア内膜のタンパク質トランスロカーゼ
Tom	: translocase of the outer mitochondrial membrane, ミトコンドリア外膜のタンパク質トランスロカーゼ
VDAC	: voltage dependent anion channel, 電位依存性陰イオンチャネル
$\dot{V}O_2$	: oxygen uptake, 酸素摂取量

List of Figures

- Figure II-1. Oxidative phosphorylation in the mitochondria (Mishra and Chan, 2014).
- Figure II-2. Structure of complex IV (Helling et al., 2008).
- Figure II-3. Electron and Proton flow in complex IV (Belevich et al., 2006).
- Figure II-4. 3D structure of Mb (License free picture).
- Figure II-5. Decreased rates of O₂ consumption in Stat3^{-/-} heart mitochondria. (Wegrzyn et al., 2009).
- Figure III-1 Contents of the present study.
- Figure IV-1. Histochemical images of myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscles.
- Figure IV-2. Electron microscopic imaging of Mb in mitochondria.
- Figure IV-3. Detection of myoglobin in the mitochondrial fraction and comparison of the mitochondrial myoglobin content of the 4 rat calf muscles.
- Figure IV-4. Detection of myoglobin and mitochondrial proteins in immunoprecipitates of mitochondrial myoglobin or COX-IV.
- Figure V-1. Characterization of Mb stably expressing myotubes.
- Figure V-2. Mitochondrial respiratory capacity and volume in Mb stably expressing myotubes.
- Figure V-3. Comparison of the number of mitochondrial respiratory complexes.
- Figure V-4. Expression pattern of Mb-Flag in gene modified C2C12 and expression pattern of Mb in WT-C2C12.

- Figure V-5. [Mb] in sedentary or diabetic rats.
- Figure VI-1. Characterization of transiently Mb expressing myoblasts.
- Figure VI-2. Comparison of O₂ consumption in transiently Mb gene modified myoblasts.
- Figure VI-3. RCR (respiratory control ratio) in transiently gene modified myoblasts.
- Figure VI-4. Comparison of enzymatic activity of respiratory chain complexes.
- Figure VI-5. Comparison of the number of mitochondrial respiratory complexes in transiently Mb gene modified myoblasts.
- Figure VII-1. Schematic diagram of mitochondrial respiration in myocyte.

List of Table

Table VI-1. ID for 6 gene modified groups.

本論文は以下の論文および未発表の実験結果を加筆、修正して構成されている。

参考論文

- (1) **Yamada, T.**, Furuichi, Y., Takakura, H., Hashimoto, T., Hanai, Y., Jue, T. and Masuda, K. (2013) Interaction between myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 114: 490-497
- (2) Masuda, K., **Yamada, T.**, Ishizawa, R. and Takakura, H. (2013) Role of myoglobin in regulating respiration during muscle contraction. (Review) J. Physical Fitness Sports Med. 2: 9-16

副論文

- (1) 澤本加那子, **山田達也**, 蔭地野稔, 石澤里枝, Ray, Hamidie, 新田咲, 増田和実. (2014) 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

I. 緒言

骨格筋ミトコンドリアの呼吸は他の組織のミトコンドリアに比較して極めて動的に変動する。なぜなら、骨格筋組織の安静時と収縮時における酸素需要は劇的に異なるためである。このように特徴的な有酸素代謝を行う骨格筋組織には酸素結合タンパク質であるミオグロビン (Myoglobin; Mb) が存在している。

Mb は酸素との親和性が高く、筋細胞内において高濃度に存在することによって酸素の貯蔵機能を担う (Popel, 1989)。そして、細胞内が低酸素化した場合に Mb は結合酸素を細胞内へ放出する (Braunlin et al., 1986)。この機能に加え、Mb は酸素と結合した状態で細胞内を拡散することによって、細胞外から細胞内への酸素流入を促進している (Wittenberg, 2003)。これらの酸素の貯蔵および促進拡散が Mb の主要な機能であると考えられてきた。そのため、ミトコンドリアへの酸素運搬に Mb は直接的に関与しないと考えられてきた。

筋細胞内の酸素代謝における Mb の重要性は古くから議論されてきており、その中でも Mb ノックアウト (Mb^{-/-}) マウスに関わる報告は Mb 研究に多大な影響を及ぼした。Garry et al. (1998) は Mb を生体内からノックアウトしても寿命や繁殖能力、運動能力に影響が表れないと報告した。その後続く研究によって Mb^{-/-}マウスには、毛細血管の増加、抗酸化タンパク質の増加、ミトコンドリアに関連する遺伝子発現が増加するなどの代償作用が生じると報告された (Grange et al., 2001; Meeson et al., 2001)。つまり、生体内において Mb は何らかの役割を果たすことは示唆された一方、Mb の具体的な役割が不明であったため、酸素代謝機構における Mb の重要性は低く見積もられたままであった。そして Mb^{-/-}マウスの生理学

的な表現型に大きな欠損が見られなかった事実は、具体的な Mb 機能を解明していく速度を鈍化させた。

それに対して、新たな測定技術を用いた近年の報告では、酸素代謝に関わる Mb の役割に新たな視点が提供されている。まず、筋収縮の開始と同時に亢進するミトコンドリアの酸素需要に応じて Mb は即時的に酸素を解離することが明らかとなり、ミトコンドリアの酸素需要量の増加に応じて Mb からの酸素供給量が上昇することが報告された (Takakura et al., 2010)。また、*in vivo* における Mb の拡散速度は低く、Mb による酸素の促進拡散機能は細胞内の酸素分圧が極端に低下した状態でないと細胞外からの酸素流入にほとんど貢献しないことが示された (Lin et al., 2007)。これらの知見は Mb が細胞外から細胞内への酸素の流入を促進する役目よりも、ミトコンドリアへ酸素を供給する役割に重きがあることを示唆している。実際に Mb の酸素結合機能を阻害するとミトコンドリアの呼吸活性が低下するという古くからの報告もある (Wittenberg and Wittenberg, 1987)。したがって、これらの先行研究は Mb がミトコンドリア呼吸に直接的に関与していることを示唆している。しかしながら、細胞質の浮游タンパク質である Mb はどのようなメカニズムを介してミトコンドリアの酸素需要の亢進に応じた脱酸素化を可能にしているのかは不明であった。そこで本研究では、細胞質のみに局在する Mb が、拡散速度が低いにも関わらずミトコンドリアの酸素需要に応じて即時的に酸素を解離する仕組みの 1 つとして、Mb がミトコンドリアに近接もしくは接着するという仮説を立てた。

筋細胞のミトコンドリアにはミトコンドリア以外の細胞区画に局在すると考えられてきたタンパク質も存在する。モノカルボン酸トランスポーターである MCT1 はミトコンドリア内膜に局在し、マトリックス側へエ

エネルギー基質を取り込んでいる (Hashimoto et al., 2006)。サイトカインシグナルカスケードを構成する因子の 1 つである Stat3 は複合体 I (NADH-coenzyme Q reductase: complex I) と相互作用し、その酵素活性を亢進させミトコンドリアの酸素消費速度を上昇させると報告されている (Wegrzyn et al., 2009)。また、Mb のホモログであり神経細胞やグリア細胞特異的に発現するニューログロビン (Neuroglobin; Ngb) もミトコンドリアに局在し、アポトーシスを抑制する役割を担っている (De Marinis et al., 2013)。これらの先行研究から、筋細胞内における Mb はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアが担う生理機能を修飾する役割を果たすのではないかという仮説を立てた。

本研究では Mb とミトコンドリアの関連性に着目し、Mb が筋細胞に存在する意義を再定義することを目的とした。Mb がミトコンドリアに局在しているか否かを検証し、ミトコンドリアに局在する Mb が担う役割を検証した。

II. 先行研究

1. ミトコンドリアの構造

ミトコンドリアは直径が 1 μm 程度であり、外膜、内膜という 2 層の膜構造を有する。ミトコンドリアはこれらの膜間のスペースおよびマトリックスと呼ばれるの 2 つの空間を有する。アデノシン 3 リン酸 (ATP; adenosine triphosphat) 合成の鍵をにぎる電子伝達系のタンパク質、ATP 合成酵素は全て内膜に局在するタンパク質である。呼吸基質の酸化とこれに伴った ADP の酸化的リン酸化は内膜上で行われる。また、ATP 合成の駆動力として、膜を介した水素イオン (H^+ ; proton) の電気化学的ポテンシャル差が形成されるため、溶質やイオンの透過性に対する内膜の抵抗性はきわめて高い。この内膜とは対照的に、溶質に対する外膜の透過性は高い。これは外膜で物質輸送をコントロールしている電位依存性陰イオンチャネル (VDAC; voltage dependent anion channel) によるものである。したがって、タンパク質などの巨大分子を除くと膜間腔は基本的に細胞質と同じ空間と考えられる (Pedersen, 1978)。

外膜と内膜は多重層リボソームに見られるような単調な関係ではなく、クリステと呼ばれる複雑な折りたたみ構造をなす。また、このミトコンドリア膜は状態変化に伴って構造が変化する (Pedersen, 1978)。

ミトコンドリアの主たる機能は ATP の合成であり、ミトコンドリアには ATP 合成に関わるタンパク質が多数存在する。具体的には 1) ATP 合成酵素の各サブユニット、2) 電子伝達系酵素のサブユニット、3) 呼吸基質、ヌクレオチド、リン酸などの内膜輸送担体、4) 脂肪酸の β 酸化に関連した諸酵素、5) トリカルボン酸 (TCA; tricarboxylic acid) 回路の諸酵素、6) 自己複製のマシナリー、7) 核の DNA により合成されたタンパク

質をミトコンドリア内に取り込む複合体などが存在する。また、ミトコンドリアマトリックス内のタンパク質濃度は 560 mg/ml と見積もられており、非常にタンパク質含有量の多い細胞内小器官である (Svedruzic and Spivey, 2006)。

2. エネルギー供給機構

生体が使用するエネルギーは ATP という高エネルギーリン酸結合体の分解時に放出されるエネルギーを利用している。つまり、様々な生理現象を絶やさず、また運動などのエネルギー需要が高まる場合に ATP を再合成する必要がある。また、大部分の ATP はミトコンドリアで再合成されている。そのため、ミトコンドリアは生体のエネルギー需要を満たすために不可欠な細胞小器官である。ATP の再合成経路はいくつか存在する。ミトコンドリアはクエン酸回路（トリカルボン酸回路 = TCA 回路、Krebs 回路）と電子伝達系が機能することによって ATP を再合成している。

電子伝達系はミトコンドリア内膜に存在しており、TCA 回路で生じた還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド (NADH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide) や還元型フラビンアデニンジヌクレオチド (FADH₂; reduced flavin adenine dinucleotide) から電子を受け取り、いくつかの中間産物を経て最終的に酸素分子を還元する。電子伝達系には 4 つの複合体が存在し、これに加えてユビキノンやシトクロム c (cyto c; cytochrome c) が存在する (Figure II-1)。

A. 複合体 I (NADH-coenzyme Q reductase: complex I)

complex I はミトコンドリアの電子伝達において最初のステップを触媒している (Brandt, 2006)。ウシでは 45 のサブユニットから構成され、全

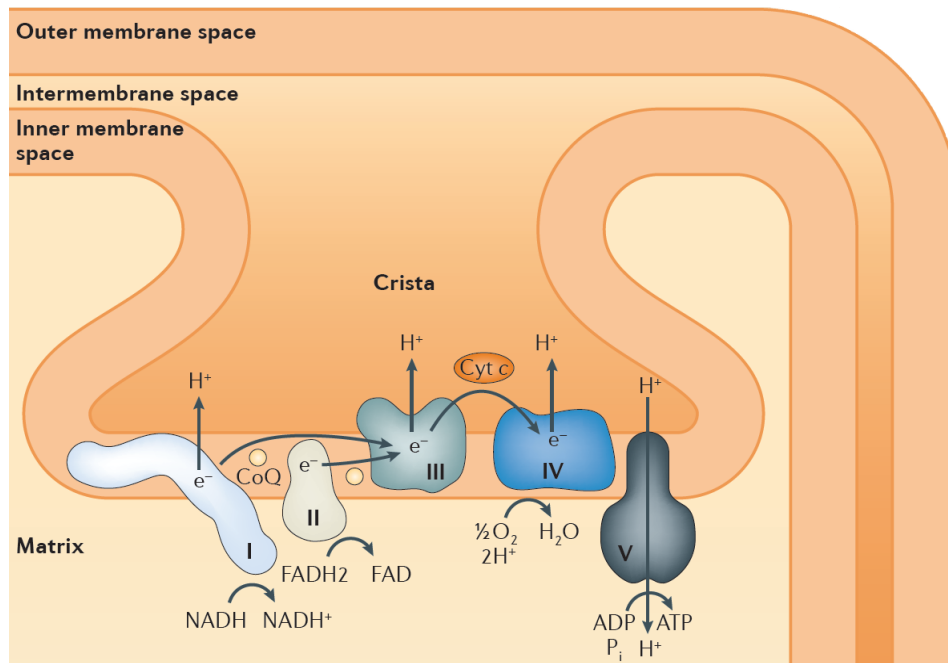
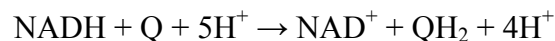


Figure II-1. Oxidative phosphorylation in the mitochondria (Mishra and Chan, 2014).

Electron transfer at mitochondrial inner membrane take two pathway, one is through complex I-III-IV, the other is II-III-IV. Eventually, electrons are transferred to complex IV and reduced O₂ to produce H₂O with pumping H⁺ to the intermembrane space. Complex V imports H⁺ in intermembrane space to produce ATP from ADP. e⁻: electron, H⁺: proton, cyt c: cytochrome c, ATP: adenine triphosphate, ADP: adenine diphosphate, NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH⁺: oxidized nicotinamide adenine dinucleotide, FADH₂: reduced flavin adenine dinucleotide, FAD: oxidized flavin adenine dinucleotide

てを合わせると 1000 kDa 近くの複合体となり電子伝達系上では最も大きい複合体を形成している。7つのサブユニットはミトコンドリア DNA (mtDNA; mitochondrial DNA) によってコードされており、疎水性部分を形成している。また、構造学的、系統発生的なことを考慮すると complex I は 3 つの異なる領域から構成されている。NADH の酸化を行う脱水素酵素ドメインと補酵素 Q (CoQ; coenzyme Q) を還元する水素化ドメインからなるユニット、マトリックスに突き出たアームユニット、そしてミトコンドリア内膜に埋め込まれており、プロトンを汲み出す働きをするトランスポーターユニットが複合体の構成ユニットである (Friedrich and Böttcher, 2004)。

complex I は以下の反応を触媒する。

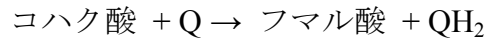


Q はユビキノンであり、反応の過程で還元される。また、反応後の 4H^+ は膜間腔へと汲み出される。

B. 複合体 II (succinate dehydrogenase: complex II)

哺乳類の complex II はヘム b を含んでおり、ユビキノンの還元を触媒しミトコンドリア内膜に埋め込まれた 2 つの疎水性ドメイン SdhC (14.2 kDa) と SdhD (12.8 kDa) がある。これらの内膜中のドメインは生物種間ではアミノ酸配列の相同性が 20%以下である。マトリックス側に突き出した親水性ドメインには酸化型フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD; oxidized flavin adenine dinucleotide) と共有結合する SdhA (64 から 79 kDa) と鉄-硫黄クラスタータンパクを含むサブユニット SdhB (27 から 31 kDa) が存在する (Cecchini, 2003)。

complex II は以下の反応を触媒する。

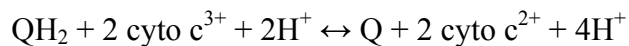


この複合体は TCA 回路と電子伝達系を直接つないでおり、コハク酸の酸化によって生まれた電子をユビキノンに伝達している。

C. 複合体 III (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase: complex III)

complex III は 3 つの酸化還元を行う補欠分子団であるサブユニットを有している。1 つが電位の高い b_H (b_{566}) ヘムと電位の低い b_L (b_{562}) の 2 つのヘムを含むサイトクロム b と、2 つ目がサイトクロム c_1 (cytochrome c_1 : cyto c_1)、そして 2Fe-2S クラスターを含む鉄-硫黄クラスタータンパク質の 3 つである (Berry et al., 2000)。この他に電子伝達やプロトンの汲み出しに直接関連しないが複合体の構造維持、酵素活性の調節、複合体を形成する際の結合領域になると考えられているサブユニットが 7 から 8 個存在する (Schafer et al., 2007)。

complex III は以下の反応を触媒する。



complex I および II から生じた、還元型ユビキノンから電子を受け取り、cyto c に伝達するのがこの複合体の主な役割である。そして、それに付随してマトリックスから膜間スペースへ H^+ を輸送している。

D. 複合体 IV (cytochrome c oxidase: complex IV)

complex IV は電子伝達系の最後に位置して酸素分子が還元されるのを触媒しており、プロトンを膜間腔に汲み出しミトコンドリア内膜を介した電気化学ポテンシャルの維持に貢献している。この複合体は 13 のサブユニットから成り 2 つの複合体が交互に重なり合うように、さらに複合体を形成している (Figure II-2)。複合体のうちサブユニット I は低スピンヘム

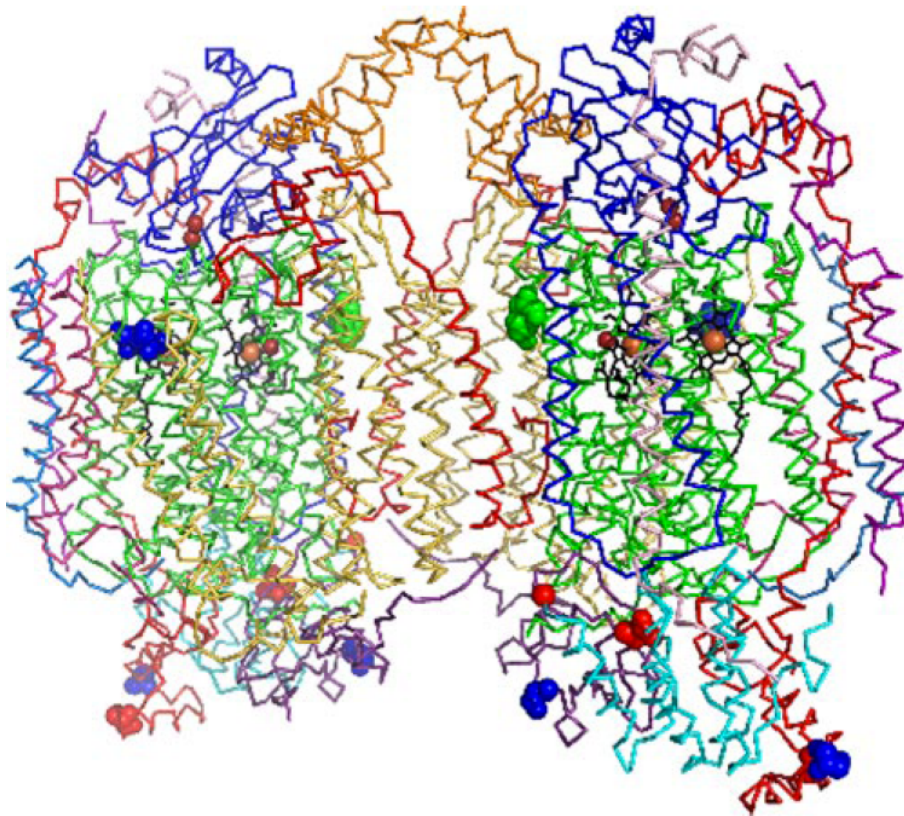
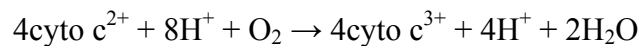


Figure II-2. Structure of complex IV (Helling et al., 2008).
Respiratory complex IV is constructed of 13 subunits. Subunit I-III (COXI-COXIII) facilitate electron transport and are encoded by the mtDNA. The Other subunits encoded by the nuclear DNA have a role to stabilize its complex and would be phosphorylated or glycosylated to help transferring electrons.

であるヘム a と Fe と Cu の 2 種類の金属を中心に保持するヘム a₃ を含んでおり、触媒反応を担う重要なサブユニットである。このサブユニットのヘム a₃ に最終的に電子が集められ、酸素分子が還元される (Lenaz and Genova, 2010)。complex IV は cyto c から伝達された電子をサブユニット II の CuA で最初に受容する。サブユニット II の CuA からヘム a の Fe、次にヘム a₃ の Fe および Cu 原子へと伝わりヘム a₃ から酸素分子へ電子が伝達される (Belevich et al., 2006) (Figure II-3)。以下の反応の触媒を行っている。



このように最終的に酸素分子に H⁺を供与し H₂O が作り出される。この過程で膜間腔へ H⁺が輸送される。

H⁺が膜間スペースに汲み出されることによって、内膜を隔て H⁺濃度勾配が形成される。この濃度勾配によって H⁺が膜間スペースからマトリックス内へ流入する時に、内膜に結合した ATP 合成酵素が ADP と無機リン酸 (Pi; inorganic phosphorus) から ATP を合成する。この ATP 合成酵素が F₀F₁ATP 合成酵素 (F₀F₁ATPase; F₀F₁ATPsynthase) という複合体である。これは、F₀と F₁の 2 つのサブユニットからできており、F₀サブユニットは内膜中でプロトンチャネルを形成している。F₀部分から H⁺が流入すると、F₁が回転し ATP を合成する。このように、H⁺の流入によって ATP が合成される過程を酸化リン酸化と言う。

3. ミトコンドリアへの酸素運搬

毛細血管まで運搬された酸素はその後、赤血球から離脱し血漿、毛細血管壁、間質液、サルコレンマを通過し、最終的に筋細胞内のミトコンドリアに到達する。この過程は酸素の分圧勾配に依存する。

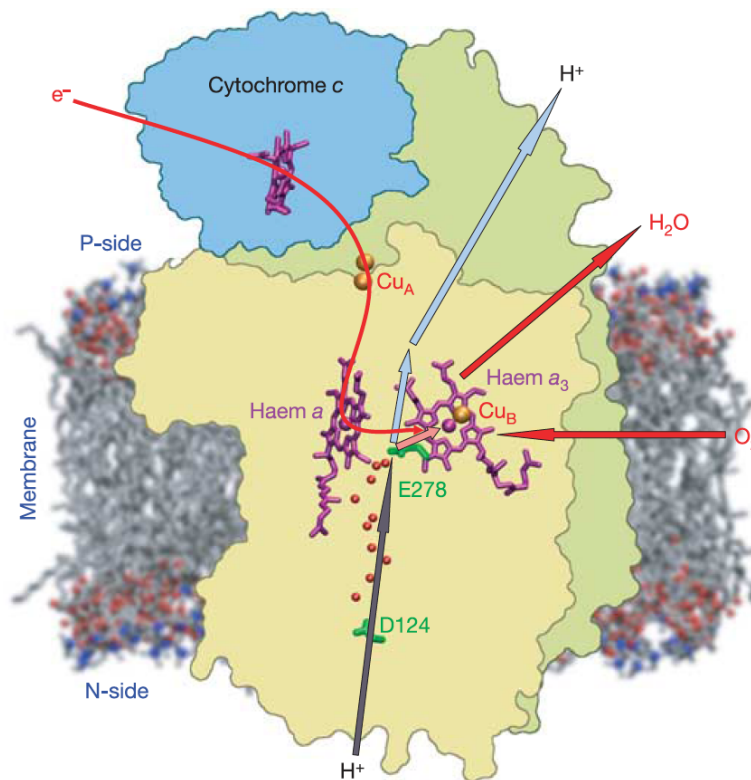


Figure II-3. Electron and Proton flow in complex IV (Belevich et al., 2006).

Subunits I (left) and II (right) are depicted in the phospholipid membrane, together with docked cytochrome c. Proton transfer from the N-side of the membrane via the D-pathway leads to E278. E278 donates protons, both to the haem a₃/Cu_B site to produce water from reduced O₂, and for pumping across the membrane. Spheres around D-pathway are crystallographically observed water molecules. E278: asparagine 278, D124: asparagine acid 124, N-side: negatively charged side, P-side: positively charged side.

Krogh の拡散概念では、血液はヘモグロビン (Hb; hemoglobin) の溶液として考えられており、Hb における化学反応と拡散との相互作用は無視されている。また、酸素拡散は Hb からミトコンドリアまでの拡散経路を通して一様 (拡散係数が一定) で、毛細血管の空間的分布も均質と仮定されている (Honig et al., 1984)。そのため、Krogh の概念では、毛細血管から筋細胞への酸素分圧勾配 (ΔPO_2 ; ΔPO_2) は緩やかである (Honig et al., 1984)。しかし、その後、赤血球から酸素が放出されるために必要な ΔPO_2 は Krogh が考えているより大きいことが示された。血液から組織の間には、酸素輸送体がないため、大きな ΔPO_2 は血液から組織への酸素運搬に重要な役割を担っている (Honig et al., 1984)。細胞に達した酸素は拡散によってミトコンドリアへ流入するが、細胞質とミトコンドリアの間の ΔPO_2 は非常に低い (1×10^{-2} torr のオーダー)。そこで、細胞質中にある Mb が酸素の貯蔵、運搬を担い、酸素拡散を促進していると考えられている。また、さらに近年では Mb がミトコンドリアに対して積極的に酸素を供給していることが示されている (Takakura et al., 2010)。

4. 新規にミトコンドリアに局在することが示されたタンパク質

A. MitoNEET

MitoNEET は 2 型糖尿病の治療薬 pioglitazone のターゲットタンパクとして見つかった (Colca et al., 2004)。MitoNEET はジンクフィンガーと呼ばれるドメインがあり、鉄を含むタンパク質である。ミトコンドリア外膜に局在しており、ミトコンドリア移行ドメインは N 末端側の 1 から 32 番目までのアミノ酸配列に含まれていることが分かっている。さらに MitoNEET ノックアウトマウスの心筋ミトコンドリア呼吸の state 3 は野生型マウスと比較して有意に低値を示した (Wiley et al., 2007)。このように

ミトコンドリア呼吸に影響を与えるタンパク質は新規に発見されてきており、どのようにしてミトコンドリア呼吸に貢献しているかの解明が待たれる。

B. 乳酸脱水素酵素 (LDH; lactate dehydrogenase)

骨格筋ミトコンドリアにおいて従来は細胞質のタンパク質であると考えられてきた LDH が局在しており、電子伝達系の **complex IV** と複合体を形成していることが示されている。ミトコンドリア内の LDH はモノカルボン酸トランスポーター1 (MCT1; monocarboxylic acids transporter 1) と相互作用している。さらに MCT1 はシャペロンタンパクである CD147 および **complex IV** と共局在することが示されている。ミトコンドリア内に乳酸シャトルは乳酸をピルビン酸に変換し、そのままマトリックス内に取り込むエネルギー基質として利用できる装置が備わっていることが示された (Hashimoto et al., 2006)。ミトコンドリアの乳酸シャトルに関する研究においては、その乳酸シャトルがミトコンドリアの呼吸機能などに与える影響を直接的に示す研究は行われていない。しかしながら、骨格筋ミトコンドリア特異的にエネルギー代謝を調節するであろう複合体が存在する可能性を示したという点で意義のある研究である。また、ミトコンドリアの乳酸シャトルは脳細胞においても存在することが明らかになっている (Hashimoto et al., 2008)。

C. シグナル伝達および転写活性化 3 (Stat3; signal transducer and activator of transcription 3)

心筋と肝臓においてではあるが、従来はサイトカインシグナルの下流因子で細胞質もしくは核に局在すると考えられていた Stat3 がミトコンドリ

アに局在することが明らかとなった (Wegrzyn et al., 2009)。Stat3 はミトコンドリア内において complex I と相互作用しており、Stat3 をノックアウトした培養細胞におけるミトコンドリア呼吸は有意に低下している (Figure II-4)。そのメカニズムとして Stat3 と相互作用している complex I の酵素活性が減少したことが挙げられており、さらに Stat3 とは相互作用していない complex II の酵素活性も Stat3^{-/-}において有意に低下している。Stat3 が複合体の酵素活性を調節するにはアミノ酸配列の 727 番目であるセリン残基がリン酸化する必要があると示されている。

これらのように従来はミトコンドリア以外の細胞区画に局在すると考えられてきたタンパク質がミトコンドリアに局在し、さらに共局在する複合体の活性を調節することによって、ミトコンドリアの呼吸活性が調節されていることが明らかになっている (Wegrzyn et al., 2009)。

5. Mb の構造と物性

Mb は骨格筋に存在する分子量約 17000 (ヒト : 17450 (Antonini, 1965), 1965)、ウマ : 18800 (Antonini, 1965)、マウス : 17800 (Nakatani, 1988)) の単量体で、1 分子あたりにプロトヘム (テトラピロール環) 1 個を含む。対して Hb はヘム環を 4 個含んでいる。これが Mb と Hb の構造上の違いである。ヘムタンパクは鉄ポルフィリン錯体を含み、ヘムという活性中心を持つ (Figure II-5)。哺乳類の Mb は 153 個のアミノ酸残基からなる 1 本のポリペプチドであり、その立体構造は X 線結晶解析によって明らかにされている (Kagen and Freedman, 1973)。

Mb は A から H の 8 つ α -ヘリクス構造を持ち、7 箇所屈曲して球状構造をしている。ヘムは E ラセン空間と F ラセン空間 (ヘムポケット) に挟まれている。ヘム鉄の配位子は 4 つがピロール環の窒素と結合している。

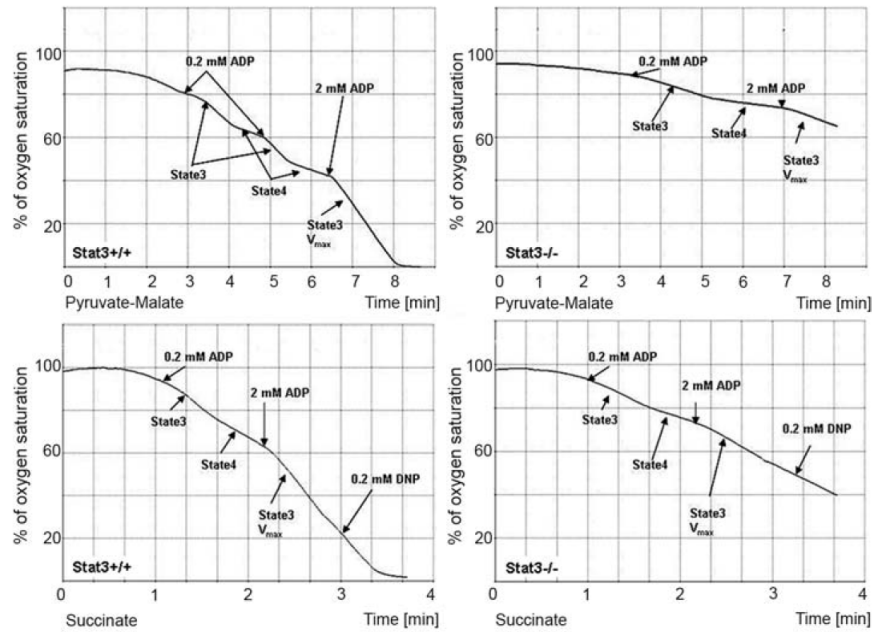


Figure II-4. Decreased rates of O₂ consumption in Stat3^{-/-} heart mitochondria (Wegrzyn et al., 2009). Mitochondria were incubated with pyruvate/malate (substrates for complex I; upper panels), and they were incubated with succinate (substrate for complex II; lower panels). Mitochondrial O₂ consumption in the Stat3^{-/-} heart was significantly compromised.

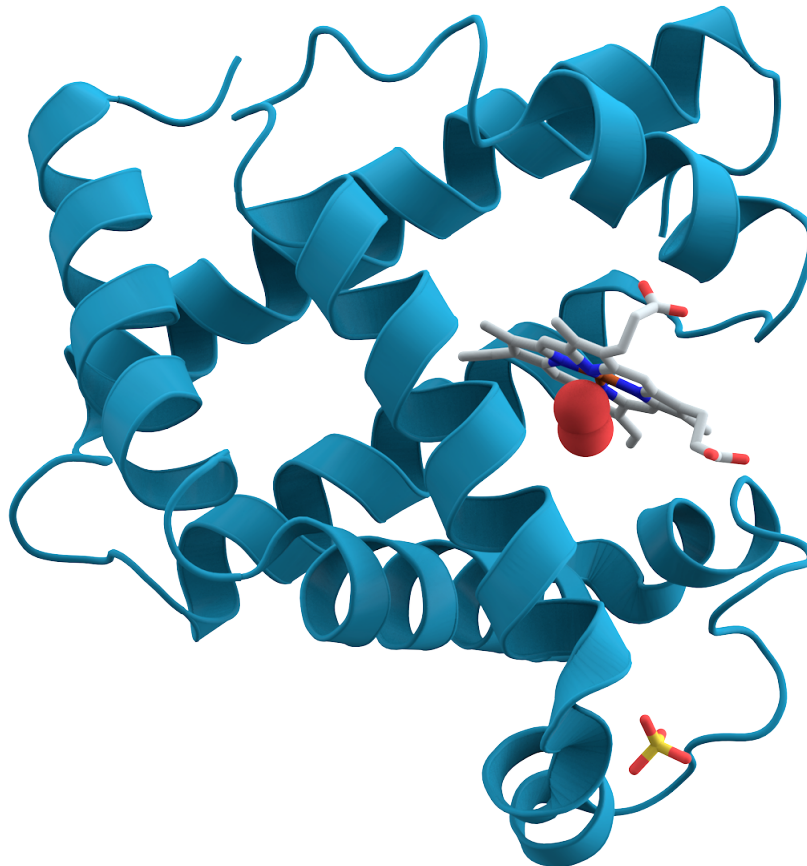


Figure II-5. 3D structure of Mb (Colors are revised).
([http://commons.wikimedia.org/wiki/
File:Myoglobin.png#mediaviewer/File:Myoglobin.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myoglobin.png#mediaviewer/File:Myoglobin.png))

残りの第 5 配位座は F8 His のイミダゾール残基と結合し、第 6 配位座は鉄が 2 価の時に酸素と結合する。脱酸素化ミオグロビン (Deoxy-Mb; deoxygenation myoglobin) は第 6 配位座が無いために鉄原子の移動が起こる。そのため、酸素化と非酸素化の状態で Mb タンパクは形状が部分的に変化する (Kagen and Freedman, 1973)。

Mb の酸素解離曲線は Hb とは異なり、直角双曲線状を示すことから酸素に対する親和性は Hb のそれより高い (Theorell, 1934)。また Mb は Hb のようにヘム間の相互作用 (Hb の 4 つのヘム鉄のうち 1 つに酸素が結合すると、他の酸素親和性が増大すること。ホモトロピック効果の典型) やボーア効果などのアロステリック効果を示さないが、その酸素平衡機能は温度の上昇に対し右偏する (Antonini, 1965)。さらに、Mb は Hb と同様に 2 価鉄 (Fe^{2+}) 状態では一酸化炭素 (carbon monoxide; CO) と結合するが、その親和性は Hb より低い。これは、Mb 分子中の遠位 His が立体的に鉄と CO との結合を阻害しているためである (Kagen, 1973)。鉄が酸化されメト Mb (met myoglobin; ヘム鉄が Fe^{3+}) に成ると、 Fe^{2+} 時の機能を失い、その代わり、 CN^- 、 F^- 、 N_3^- 、などと結合する。これらの誘導体の吸収は Hb に類似している (Kagen and Freedman, 1973)。

6. Mb の機能

これまでに考えられてきた Mb の機能には酸素貯蔵 (Theorell, 1934)、酸素の促通拡散 (Wittenberg, 1970)、酸素運搬 (Wittenberg and Wittenberg, 1975)、細胞内酸素濃度の均等化 (Gayeski et al., 1985)、酸化リン酸化への貢献 (Wu et al., 1972; Doeller and Wittenberg, 1991) などが挙げられる。また、これらに加えて Mb は一酸化窒素 (NO ; nitric monoxide) との結合能 (Ordway and Garry, 2004)、抗酸化機能 (Flogel et al., 2004) を持ってい

ることが報告されている。

A. 酸素貯蔵機能

Mb の酸素親和性は Hb のそれより約 5 倍高く、 P_{50} (飽和度 50% 時の PO_2) は 5 torr 未満と非常に低い (酸素解離曲線が直角双曲線を示す) ため、Mb は酸素貯蔵の役割を担っていると考えられてきた (Theorell, 1934)。これらは特に潜水中に無呼吸状態になる哺乳類と、鳥類に顕著である。これらの動物では運動中の活動筋において、Mb が貯蔵していた酸素を動員する (Ordway and Garry, 2004)。これらの動物種が他と比較して 10-30 倍の Mb を持つことから Mb が酸素の貯蔵機能を担うと考えられる (Noren and Williams, 2000)。

組織中に存在する酸素は主として 2 種類存在している。溶存酸素と Mb と結合した酸素 (Mb- O_2) である。Mb- O_2 量は溶存酸素量の約 30 倍以上であり (Wittenberg and Wittenberg, 1989)、特に心筋の場合には 100 倍にまで達する (Wittenberg and Wittenberg, 1987)。溶存酸素と Mb- O_2 の割合については研究者間で異なっているが、Tamura et al. (1978) は心筋の溶存酸素と Mb- O_2 の割合は 3 μ M : 100 μ M (心筋の Mb 含量を 200 μ M とし、その 50% が酸素と飽和している場合) と報告している。

以上のことから、筋細胞内の酸素のほとんどが Mb と結合しており、Mb は筋細胞内の酸素貯蔵役を担っていると考えられる。この Mb に蓄えられた酸素は、高強度の筋収縮によって毛細血管が閉塞され、酸素供給が制限されるような状況において利用されるだろうと考えられている (Popel, 1989)。

B. 酸素促通拡散機能

筋細胞内で Mb-O₂ が拡散することによって、Mb に結合している酸素の拡散につながることを Mb による酸素促通拡散 (Myoglobin facilitated oxygen diffusion) という (Wittenberg, 1970)。Mb の拡散速度は溶存酸素のその 1/10 ~ 1/20 足らずであるが (Ellsworth and Pittman, 1984; Jurgens et al., 1994; Papadopoulos et al., 1995)、Mb-O₂ の濃度は溶存酸素の 30 倍以上であるため、両者の酸素流量はほぼ同程度か (Wittenberg and Wittenberg, 1989) あるいはそれ以上だと考えられている (Kennedy and Jones, 1986)。促通拡散による酸素流量が溶存酸素の流量を越えるためには 3 つの条件が必要であると考えられている。a) Mb が十分な濃度で存在していなければならない (Federspiel, 1984)。b) Mb は完全に酸素と結合していなければならない (Gayeski and Honig, 1983)。c) Mb は筋細胞内で自由に移動し拡散しなければならない (Wittenberg and Wittenberg, 1989)。a) と b) の条件は心筋や骨格筋で確認されているが、c) の条件については Mb の rotational diffusion が報告されている (Livingston et al., 1983) ものの未だ明確な結論に至っていない。Livingston et al. (1983) は、Mb-O₂ が可動性に優れていることから、低い筋細胞内 PO₂ が Deoxy-Mb の存在を可能にし、それによって生じた Oxy-Mb の勾配と Mb-O₂ の rotational diffusion によって筋細胞内の酸素拡散が生じると示唆されている。

しかしながら、*in vitro* 実験によって Mb 存在下における酸素拡散速度が高いことが示されているものの (Johnson et al., 1996)、近年では生理条件下 (*in vivo* 実験) での Mb の拡散機能が細胞内酸素運搬に有効であるかどうかについては疑問視されている (Wang et al., 1997; Papadopoulos et al., 2001; Lin et al., 2007)。

C. 酸素運搬機能

ここで述べる Mb による酸素運搬 (Myoglobin mediated vectorial oxygen transport) とは、Mb が毛細血管から筋線維内への酸素流入を促進させる役割のことである (Wittenberg and Wittenberg, 1975)。この酸素流入量は Mb が筋内に存在することによって筋細胞内 PO_2 が下がり、筋細胞内外の PO_2 の差が大きくなることに依存する。また、これは Mb の酸素促進拡散によって成しえるものと考えるべきである (De Koning et al., 1981; Braunlin et al., 1986; Wittenberg and Wittenberg, 1989)。De Koning et al.

(1981) は鳥の砂嚢を用い、CO による Mb 機能の阻害の有無によって酸素運搬が変化するかを数学的に検討した結果、Mb が機能している場合に細胞内への酸素流入量が多かったことから Mb が酸素運搬を促進していると示唆した。また、Braunlin et al. (1986) は子猫の乳頭筋において Mb 機能を阻害した結果、筋細胞内の PO_2 が上昇したことから、Mb が筋細胞内への酸素流入に関与していることを示唆した。Wittenberg and Wittenberg (1975) は、Mb の存在は筋束の酸素摂取量を促進させるが、Mb の酸素結合能力が阻害された時、筋細胞内の酸素分圧 (PO_2 ; oxygen partial pressure) が 50 torr に上昇し、毛細血管と筋細胞の間の ΔPO_2 が小さくなるために細胞への酸素拡散が制限されることを示唆した。

D. 細胞内酸素濃度の均質化

Mb はいくつもの動物種において筋細胞内で酸素分圧を緩衝する役割を果たす。筋活動が増加した場合に ATP の濃度を緩衝する機能を持つクレアチンフォスフォキナーゼと同様に、Mb が酸素濃度を緩衝する役割がある (Meyer et al., 1984; Hochachka, 1999)。結果として毛細血管からミトコンドリアへの酸素流入の増加が引き起こされるという劇的な変化をよそ

に、細胞内の酸素濃度は比較的一定で均質に保たれる。

Gayeski and Honing (1983) は個々の筋細胞 Mb の酸素分圧 (P_{MbO_2}) を cryomicrospectroscopy によって測定した。その結果、個々の筋線維の縦断面面積および、横断面面積の P_{MbO_2} のばらつきも少なく、 ΔP_{MbO_2} (P_{MbO_2} の勾配) もわずかであったことから、Mb は組織内の酸素分布を均等にする働きをしていると彼らは示唆している。

E. 酸化リン酸化の促進機能

complex IV の代謝回転を維持するために必要な P_{MbO_2} は > 0.5 torr である (Gayeski et al., 1987)。このように低い P_{MbO_2} の条件下でミトコンドリアへの酸素流量を多くするためには、ミトコンドリア内で高いレベルの還元状態が維持されていなければならない (Wittenberg and Wittenberg, 1989)。筋細胞内の酸素はほとんど Mb と結合しており、Mb の促進拡散以外の付加的な酸素流量はほとんど得られない。摘出された心筋細胞におけるミトコンドリアの酵素の代謝回転に必要な PO_2 は高くても 1 torr である (Wittenberg and Wittenberg, 1985)。生体内では運動強度に比例して、 P_{MbO_2} は低下するが、この低い P_{MbO_2} はミトコンドリアの酵素の代謝回転に最低必要な PO_2 をほとんど上回ることはない。Wittenberg and Wittenberg (1987) は complex IV の代謝回転に必要な PO_2 の 20 ~ 200 倍に達するような条件下で、Mb の一部に CO を結合させると $\dot{V}O_2$ が 2/3 に減ることを示した。またこの呼吸の低下は CO-Mb の量の割合と直線相関の関係にあった。

F. NO との結合能力、抗酸化機能

最近の研究では、酸素との結合以上に重要な機能がある可能性が示され

ている。その一つとして、NO との結合能力がある。NO は細胞機能に対して、好影響も悪影響も与える分子である。血管拡張機能に加えて、complex IV の活性を抑制し、ミトコンドリア呼吸を阻害する機能を持っている (Poderoso et al., 1998; Brunori, 2001; Shiva et al., 2001)。Brunori (2001) は、Mb は心筋や酸化能の高い骨格筋で NO を除去するという重要な機能を担っているのではないかと示唆した。その後の Flogel et al. (2001) による研究によって、この理論が支持されている。しかしながら、Mb^{-/-}において NO 増加に伴った cGMP 増加に関しては相反する結果が得られている (Grange et al., 2001; Mammen et al., 2003)。

Mb は心筋での酸化ストレスの減少にも有意に貢献することが報告されている。Flogel et al. (2004) は、単離した Mb^{-/-}の心筋に過酸化水素とスーパーオキシドを冠動脈注入することにより酸化ストレスに暴露した。その結果、野生型の心筋に比べて Mb^{-/-}マウスの心筋が酸化ストレスにより大きい影響を受け、心筋の収縮力が抑制された (Flogel et al., 2004)。また、最大左心室圧 (LVDP; left ventricular diastolic pressure) に関しても、Mb^{-/-}マウス群においてのみ減少した。

G. Mb の存在場所

Mb は主に心筋細胞や骨格筋細胞内に存在している。筋の赤色化の程度は筋における Mb 濃度の高低に依存する。ヒトの場合、筋線維レベルでも有酸素的代謝に優れている遅筋線維は速筋線維より Mb を多く有する (Nemeth and Lowry, 1984; Kunishige et al., 1996)。さらに筋線維の縦断的组织化学切片から、Mb 分子は I 帯に多く存在していることが確認されている (Kawai et al., 1987)。

7. Mb に関する対立エビデンス

A. Mb の拡散速度

Mb の拡散係数に関する研究は *in vitro* における Mb の拡散係数を測定するところから始まった。Riveros-Moreno and Wittenberg (1972) は Mb の拡散係数 (D_{Mb} ; diffusion coefficient of Mb) を分光光度計を用いて測定し、Mb 以外のタンパク質が存在しないバッファー中において D_{Mb} は $11.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であることを示した。また、Gros (1978) は同様の方法を用いて、バッファー中の Mb 濃度を複数設定して D_{Mb} を測定した結果から D_{Mb} は $12 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であることを示した。

近年では測定手法が進化し、*in vivo* における D_{Mb} も測定が可能になった。Papadopoulos et al. (2001) はヒラメ筋と心筋において蛍光プローブを付与した Mb をマイクロインジェクションし、フォトブリーチング法 (FRAP: fluorescence recovery after photobleaching) を用いて D_{Mb} を測定した。その結果、ヒラメ筋においても心筋においても拡散の速度に関係なく、 D_{Mb} は約 $2.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であった。また、Jurgens et al. (1994) が紫外線酸化法を用いて D_{Mb} を測定した場合には、ラットの横隔膜の D_{Mb} は $1.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であるとして示された。また核磁気共鳴法 (NMR; nuclear magnetic resonances) によって灌流中の心筋の D_{Mb} を測定した場合には約 $4.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であることが示された (Lin et al., 2007)。したがって、生体内における Mb の拡散係数は以前考えられていたよりも 1/2 から 1/10 程度あることが明らかにされてきている。

B. ミトコンドリアへの酸素供給

Mb の主な機能は酸素の貯蔵機能であると言えるだろう。これは Mb と酸素との親和性が高く、細胞内が低酸素状態に陥った場合にのみ結合酸素

を解離するという考えからきている。しかしながら、近年この概念とは異なるエビデンスが示されてきている。

足底屈運動中に活動筋における Mb の脱酸素化動態は特に運動開始時において $\dot{V}O_2$ の立ち上がりと同様であることが示された (Chung et al., 2005)。つまり、運動開始時の酸素需要に対して Mb が酸素を解離しミトコンドリアへの酸素供給に貢献していることが示唆された。また下肢灌流法を用いて近赤外線分光法 (NIRS; near infrared spectroscopy) により Mb だけの脱酸素化動態を測定した場合にもミトコンドリアの酸素需要が亢進すると即時的に Mb が酸素を解離するという結果が得られている (Takakura et al., 2010)。また筋収縮の強度が高まるにつれて、ミトコンドリアの酸素需要量が高まるのに応じて、Mb からの酸素供給量が増加する (Takakura et al., 2010)。これらの知見から、Mb は細胞内の酸素濃度が著しく低下した場合のみならず筋収縮つまり、ミトコンドリアの酸素需要が亢進した場合にも酸素を供給することが示された。

8. ヘムタンパク間の相互作用

A. Mb とサイトクロム b_5 (cytochrome b_5 ; cyto b_5) の相互作用

ヘムを持つタンパク質同士が相互作用し、タンパク間の電子伝達を行っていることが明らかになっている。Mb と cyto b_5 は 1 対 1 の割合で結合し metMb に対して cyto b_5 が電子を供与する。また、pH が低い環境下で Mb と cyto b_5 の相互作用が起こりやすいことが示されている (Livingston et al., 1985)。加えて、Mb のアミノ酸配列における 47、50、98 番目のリジン残基が cyto b_5 の 43、44、60 番目の残基と接続しているのではないかと示唆されている (Livingston et al., 1985)。metMb は酸素と結合出来ないため、cyto b_5 は metMb に電子を付与して還元し酸素結合が可能な状態にすると

いう生理的な役割を持っていると考えられている。Xiong et al. (2010) は Mb のヘムに含まれる金属の種類を変えたり、タンパク質自体にミューテーションを起こした場合に cyto b₅ との間で起こる電子伝達がどのように変化するかを検証している。また、Mb と cyto b₅ が相互作用する時の位置関係も詳細に示している。

B. cyto b₅ と cyto c の相互作用

cyto b₅ は Mb のみではなく cyto c とともに相互作用すると示されている。cyto b₅ は膜組織に結合するためミクロソームやミトコンドリア外膜に局在していると言われている (Spatz and Strittmatter, 1971; Nisimoto et al., 1977)。そして、cyto c に対する電子の供与対としての役割を担っている。cyto c と cyto b₅ の相互作用は以下のような方法で生体の生理機能に貢献している。動物のミトコンドリアの膜間腔において亜硫酸塩の酸化を担っており (Johnson and Rajagopalan, 1977)、酵母菌のミトコンドリア膜間腔においては乳酸の脱水素酵素として機能している (Briquet et al., 1982)。また、cyto c がミトコンドリア外膜の cyto b₅ と complex IV の間におけるシャトルとして機能することがあるが、その生理学的意義は未だに明らかになっていない (Bernardi and Azzone, 1981)。

C. cyto c と Mb の相互作用

In vitro の系において Oxy-Mb は cyto c を還元するということが示されている (Wu et al., 1972)。また Mb と cyto c の相互作用は酸素によって阻害されることが示されており、それは酸素の量依存的に影響を受けることが示されている (Yamazaki et al., 1964)。ただし、Mb と cyto c は物理的に結合することはないことが示されており、*in vitro* においてもこれらの 2

つのタンパク質が複合体を形成しなかったと報告されている (Wu et al., 1972)。

9. ミトコンドリアのタンパク質取り込み装置

1000 以上あると考えられているミトコンドリアタンパク質のうち 99% は核 DNA にコードされており、細胞質において前駆体タンパクとして合成される (Schmidt et al., 2010)。これらの前駆体タンパクはミトコンドリア移行シグナル配列を有しており、細胞質のシャペロンである熱ショックプロテイン 70 (cHsp70; cytosolic heat shock protein 70) やミトコンドリア取り込み刺激因子 (MSF; mitochondrial import stimulate factor) がシグナル配列を認識し結合する (Mihara and Omura, 1996)。cHsp70 や MSF と結合した前駆体タンパクはミトコンドリア外膜のタンパク質トランスロカーゼ (Tom; translocase of the outer mitochondrial membrane) のレセプターである部分複合体の Tom20-Tom22 もしくは Tom70-Tom37 に受け渡される。これらのレセプターと取り込みを担う膜貫通型の Tom40 が相互作用し、膜間腔へ前駆体タンパク質が取り込まれる。複合体の動的な変化、相互作用を補助しているのが Tom6 と Tom7 である (Pfanner and Meijer, 1997)。ミトコンドリア内膜を介したマトリックスへのタンパク取り込みを行っているのがミトコンドリア内膜のタンパク質トランスロカーゼ (Tim; translocase of the inner mitochondrial membrane) である。この複合体の中でも特に欠かせないサブユニットが Tim23 と Tim17 である。ミトコンドリア内膜の膜電位は Tim23 の二量体形成を保持していると考えられている (Neupert, 1997)。Tim23-Tim44 もしくは Tim23-Tim17 の部分複合体がミトコンドリアマトリックスの Hsp70 (mtHsp70; matrix heat shock protein 70) と相互作用し、タンパク質を取り込んでいる。そして取り込まれたタンパ

ク質のシグナル配列が末端にある場合にはミトコンドリアプロセッシングペプチド分解酵素（MPP: mitochondrial processing peptidase）がシグナル配列のみを切り取る。その後、折りたたまれミトコンドリアタンパク質として機能するに至る（Pfanner and Meijer, 1997）。

III. 研究目的及び検討課題

筋細胞内の酸素輸送担体である Mb とミトコンドリアの関連性を示唆する先行研究はいくつか存在する。それらは細胞内の Mb が酸素を供給することによってミトコンドリアの酸素消費に貢献しているというものである。本研究では Mb とミトコンドリアがより直接的な関連性を有するという仮説を立てた。生体内の Mb は拡散速度が遅く、かつ細胞質のみに局在するにも関わらずミトコンドリアの酸素需要に即時的に応答し、酸素を解離することが可能である。この即時的な応答を可能にする仕組みとして Mb がミトコンドリアに近接もしくは接着しているという仮説を立てた。したがって本研究では、Mb がミトコンドリアに局在するか否かを第一に検証することとした。仮にミトコンドリアに Mb が局在しているのであれば、Mb はミトコンドリアの生理機能を維持もしくは亢進させるための役割を果たしていると考えられる。本研究ではミトコンドリアに局在する Mb の役割を解明するための検証も実施した。

本論文での検討課題の概要を以下に記すとともに、Figure III-1 に概略図として示した。

1. ミトコンドリアに局在する Mb の特徴（実験 I）

筋細胞の酸素代謝においては Mb とミトコンドリアの間に有機的な関連があると近年の研究によって示唆された。しかしながら、細胞質に局在する Mb がミトコンドリアの酸素需要の亢進に即時的に応答することが可能であるメカニズムは不明であった。そこで実験 I では、ミトコンドリアの酸素需要を Mb が即時的に感知する仕組みとして、Mb がミトコンド

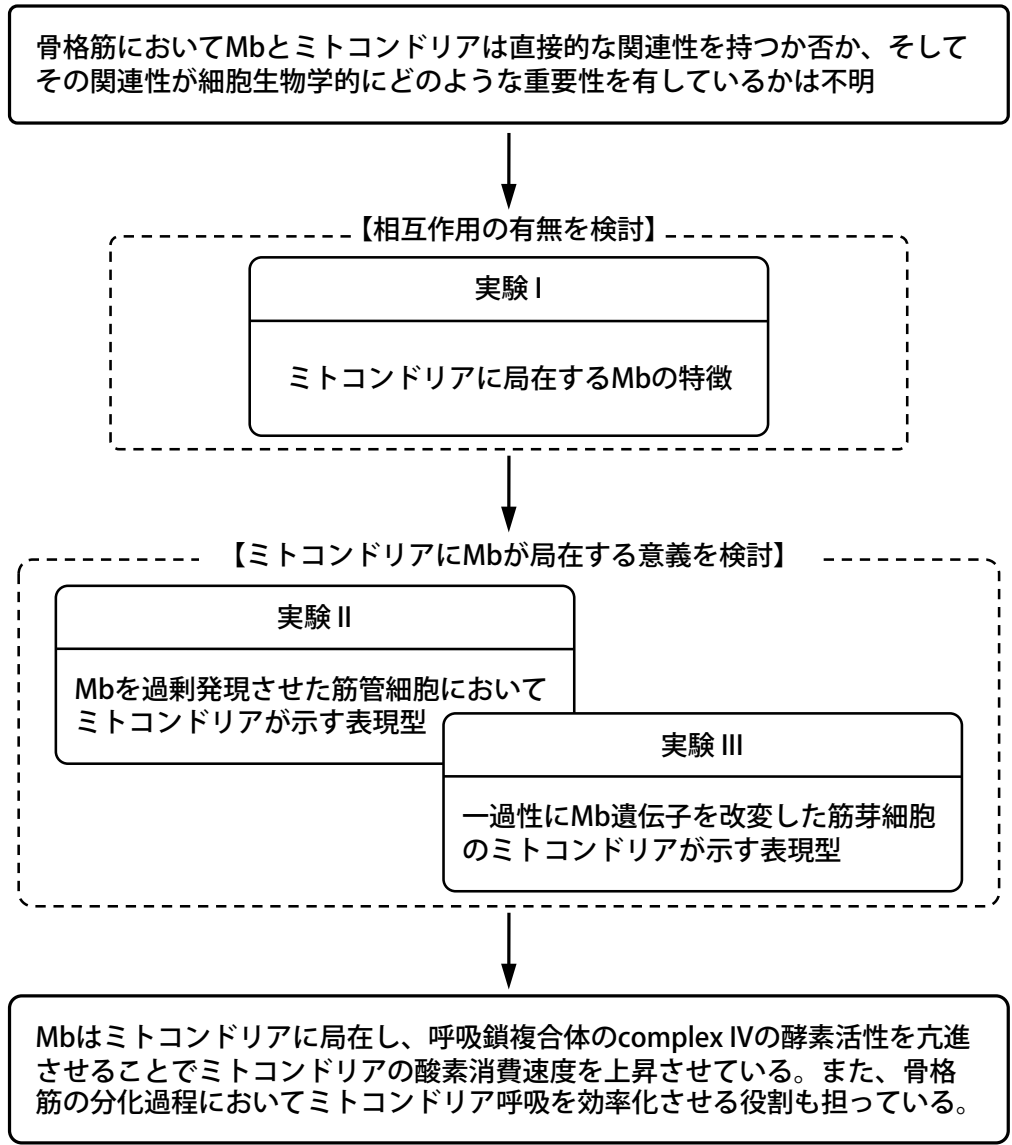


Figure III-1. Contents of the present study.

リアに近接もしくは接着しているのではないかという仮説を立てた。この仮説を組織学と生化学の手法を用いて検証した。

2. Mb を過剰発現させた筋管細胞においてミトコンドリアが示す表現型 (実験 II)

実験 I では Mb とミトコンドリアの直接的な相互作用の有無を検証し、Mb はミトコンドリア内にも局在することが示された。次なる検証としてミトコンドリアに局在する Mb (Mito-Mb) が担う機能を明らかにする必要がある。したがって、実験 II では Mb を安定的に過剰発現させる培養細胞株を構築し、この細胞株を筋管まで分化誘導した後にミトコンドリアの呼吸機能 (酸素消費速度、呼吸鎖複合体の酵素活性) を分析した。なお、実験 I において Mb は呼吸鎖複合体の complex IV と相互作用していることが示されたため、ミトコンドリア呼吸に関わる指標を分析した。

3. 一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞のミトコンドリアが示す表現型 (実験 III)

実験 II では、筋細胞が分化する過程に起こるミトコンドリア呼吸能力の亢進を Mb が促進する可能性が示唆された。しかしながら、実験 II で用いたモデルはミトコンドリアの呼吸調節機構において、Mb が単一分子レベルで果たす機能を具体的に解明できていない。したがって、実験 III では一過性に Mb の遺伝子発現を操作した筋芽細胞におけるミトコンドリアの呼吸機能 (酸素消費速度、呼吸鎖複合体の酵素活性) を分析した。Mb の一過性遺伝子改変モデルには過剰発現モデルと発現抑制モデルを用い、Mb の発現量の増減がミトコンドリアの呼吸機能を亢進もしくは抑制するか否かを検証した。

IV. ミトコンドリアに局在する Mb の特徴 (実験 I)

1. 目的

骨格筋において Mb はミトコンドリアの急激な酸素需要の高まりに応じ、即時的に酸素を供給する役割がある (Chung et al., 2005; Takakura et al., 2010)。しかしながら *in vivo* での Mb の拡散速度は *in vitro* の研究で見積もられていた速度よりも遅いと報告された (Lin et al., 2007)。細胞質に局在する拡散速度の遅い Mb がミトコンドリアの酸素需要の亢進に即時的に応答して脱酸素化する仕組みは不明であった。

Mb とミトコンドリアの機能的な関連性は古くから研究されてきている。Mb の酸素結合機能を阻害するとミトコンドリア呼吸活性が低下したり (Wittenberg and Wittenberg, 1987)、*in vitro* において肝臓から抽出したミトコンドリアに Mb-O₂ を加えると酸素消費が亢進したりする (Postnikova et al., 2009) という報告がある。

実験 I ではミトコンドリアと Mb の関連性をこれまでとは違う観点から分析することとした。細胞内における移動速度が遅い Mb がミトコンドリアと近接もしくは接着し、物理的に相互作用していることによってミトコンドリアの酸素需要の急進的な増加に対して酸素を供給することが可能であるという仮説を立てた。本研究の目的は Mb がミトコンドリアに局在するか否かを検証し、局在しているのであればミトコンドリアの Mb はどのような特徴を有するかを分析することである。

2. 方法

本実験は金沢大学動物実験規約に則って計画され、倫理委員会の承認を得た (承認番号 AP-101817)。

A. 被験動物

被験動物には、11 から 12 週齢（体重: 282–375 g）の Wistar 系雄性ラット（三共ラボサービス, 日本）を用いた。ラットは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12 時間の明暗周期（7:30-19:30）の環境下で飼育し、標準飼料（オリエンタル酵母, 日本）と飲料水を自由摂取させた。

B. 免疫蛍光抗体染色のための組織標本

本研究では、免疫組織分析のための組織固定に腹大動脈からの下肢灌流固定を行った。麻酔下のラットの腹壁を恥骨結合部位から剣状突起まで切開し、腹大動静脈を分離した。胸腔を切開して、塩化カリウム（1M KCl）を 2 ml 心臓に注射し、安楽死処置を行った。この時点をエンドポイントとした。その直後、腹大動脈の右腸腰血管との分岐点より上流の位置を切開し、送液用のポリエチレン製のカテーテル（PE90, Clay Adams, USA, 内径: 0.86 mm, 外径: 1.27 mm）を切開部位に挿入し、縫合糸で固定した。また、直ちに腹大静脈を切開した。灌流液には Krebs-Henseleit buffer (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 20 mM NaHCO_3 , 15 mM dextrose) を用い、Flow-through 方式で灌流することによって脱血を行った。灌流液は 37°C に保温し、常時 $95\%\text{O}_2 + 5\%\text{CO}_2$ ガスによってバブリングを行った。さらに、血液の凝固を防ぐために、灌流液にはヘパリン (1000 U/l) を添加した。送液流量は 15 ml/min に設定した。20 分間脱血し、排出液から血液が混ざっていないことを確認してから、灌流液を固定液に切り換えた。固定液は 4%PFA 固定液（4% パラフォルムアルデヒド（paraformaldehyde; PFA）in 0.1 M リン酸バッファー（phosphatebuffer; PB, pH 7.2）を使用した。10 分間固定液を送液し、下肢が硬直したことを確認後、被験筋を摘出した。さらに 4%PFA 固定液中で浸漬固定（一晚, 4°C ）

を行った。その後、10%スクロース/0.1 M PBS と 20%スクロース/0.1 M PBS、30%スクロース/0.1 M PBS に、それぞれ 4 °C 一晚浸漬した。

得られた組織サンプルは筋長に対して 3 等分になるように横断し、筋腹部を分析に使用した。組織サンプルを試料台に乗せ、OCT コンパウンドで包埋した後、すぐに液体窒素であらかじめ冷却させたイソペンタンの中で急速凍結させた。得られた試料はその後の分析まで -80 °C 下で保存した。

C. 免疫蛍光抗体染色

OCT コンパウンドしたサンプルをミクロトーム (CM1510S, Leica, Germany) によって厚さ 6 μm に薄切りし、スライドガラスに付着させた。組織切片の付いたスライドガラスを抗原賦活化剤 (Retrieve-All Antigen Unmasking System, SIGNET, USA) に浸し、92 °C で 10 分間反応させることによって抗原賦活化処理を行った。処理終了後、リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4) で洗浄した。洗浄後、さらに 30 分間 0.3% Tween-20/PBS に浸し、30 分間膜浸透処理を行った。その後、メタノールに 1 分間浸し、PBS で十分洗浄した。ブロッキング試薬 (1% BSA/0.1% Tween-20/PBS) をスライドの切片に滴下し、30 分間反応させた。一次抗体は Mouse monoclonal [MG-1] to Mb (ab66024, Abcam, UK) と Rabbit polyclonal antibody to VDAC-I/Porin (ab15895, Abcam, UK) を使用した。二次抗体には Alexa Flour 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11001, Molecular Probes, USA) と Alexa Flour 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11011, Molecular Probes, USA) を用いた。一次抗体はそれぞれ 100 倍、300 倍に希釈して使用し、一晚反応させた。二次抗体はどちらも 200 倍に希釈し、室温で 60 分間、反応させた。反応後、PBS で洗浄し核染色封入剤 (Dapi-Fluoromount-G, Southern Biotech, USA)

を滴下し、カバーガラスで切片を覆った。これを蛍光顕微鏡（CKX41, Olympus, Japan）で観察し、顕微鏡デジタルカメラ（DP71, Olympus, Japan）で撮影しデータとして取り込んだ。

D. 電子顕微鏡観察

摘出した腓腹筋を固定液（4% PFA、0.05% グルタルアルデヒド（glutaraldehyde; GA）、0.1 M PB、pH 7.4）に室温で 90 分間浸した。筋を 0.1 M PB で 15 分間インキュベーションし、これを 3 回繰り返した。筋腹部をブロック状に切り取り、50%と 70%のエタノール内において、それぞれ 4°C で 20 分間インキュベーションして脱水処理した。エタノールと樹脂（LR White: London Resin, Berkshire, UK）を 50:50 に混合した溶液に 4°C で 1 時間浸潤させた。混合液は 20 分ごとに交換した。次に、LR White に 4°C で 3 時間浸潤させ、LR White は 1 時間ごとに交換した。浸潤後に樹脂を新しくし、50°C で一晩インキュベーションした。ブロックは 80 nm にスライスし、ニッケルグリッド上に設置した。Rabbit polyclonal antibody to Mb（sc-25607, Santa Cruz, USA）を 1% BSA-PBS で 1000 倍希釈した溶液に切片を反応させた（90 分、室温）。その後 1% BSA-PBS 溶液で 3 回リンスした後に 10 nm の金コロイド粒子と結合した二次抗体（Anti Rabbit IgG; British BioCell International）と室温で 1 時間インキュベーションした。PBS にてリンスを行った後 2% GA-0.1M PB 溶液に移した。移したグリッドを 2% uranyl acetate で 15 分間インキュベーションすることで乾燥させ、染色した。蒸留水でリンスしてから Lead stain solution（Sigma-Aldrich, USA）に室温で 3 分間インキュベーションすることで二次染色を実施した。透過型電子顕微鏡（JEM-1200EX; JEOL, Japan）を用いて、80 kV の加速電圧下でグリッドの観察を行った。観察画像は CCD カメラ（VELETA,

Olympus soft Imaging Solutions) で撮影し、デジタル画像として取り込まれた。

E. ウエスタンブロッティングのための組織標本

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg; ネンブタール注射液、大日本製薬、日本) を腹腔内投与し、麻酔下において、ヒラメ筋 (sol; m. soleus) と足底筋 (pla; m. plantaris)、腓腹筋 (gas; m. gastrocnemius)、心筋 (hrt; myocardium) を摘出した。心筋を摘出した時点をエンドポイントとした。タンパク質の検出および生化学的分析のためのサンプルについては血液や結合組織を取り除いた後、湿重量を秤量し、液体窒素で瞬間凍結した。分析まで -80 °C で凍結保存した。

F. ウエスタンブロッティングのためのサンプル調製

サンプル調製法については、Hashimoto et al. (2006) のサンプル調製法を参考にし、一部改変して次のように実施した。

氷上で融解させた組織サンプル (300~1400 mg) に対して、19 倍量の Solution A (250 mM Sucrose, 5 mM NaN₃, 2 mM HEPES-Na, 1 μM Pepstatin A, 10 μM Leupeptin, 20 mM HEPES-Na, pH 7.4) を加え、テフロンホモジナイザーによってホモジナイズを行った。得られたサンプルを遠心分離装置 (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany) を用いて遠心分離 (600g, 10 分, 4°C) を行った。そこで得られた上澄みを一部取り分け細胞全体の画分 (Total) とした。残りの上澄みを更に遠心分離 (10000g, 30 分, 4°C) した。そこで得られた上澄みを分注した。沈殿は Solution A で 3 回洗浄してから再懸濁した。両者を再び遠心分離 (10000g, 30 分, 4°C) した。遠心した上澄みには 0.75 倍量の Solution B (1.167 M KCl, 58.3 mM Na₄P₂O₇·10H₂O,

pH7.4) を加えた。その後、超遠心分離 (230000g, 120 分, 4°C) した上澄みを細胞質分画 (Cyt) とした。再懸濁してから遠心したサンプルの沈殿を Solution C (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4) で 3 回洗浄し、1% NP-40 Solution C で再懸濁した。それを、遠心分離 (1100g, 20 分, 23°C) し、その上澄みをミトコンドリア画分 (Mito) とした。

G. ウェスタンブロッティング

サンプルは 15% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) によって分子量ごとに分離された。泳動終了後、トランスファー装置 (HorizBlot At6677, ATTO, Japan) を用いてセミドライブロッティングを行い、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜 (polyvinylidene difluoride Membranes; PVDF 膜, ATTO, Japan) に転写した。転写後のメンブレンを 10 分間振とうさせ、5% スキムミルク (5% スキムミルク/0.1%TBS-T) でブロッッキングを行った。ブロッッキングは室温で 60 分間とした。Mb の検出には Rabbit polyclonal antibody to Mb (sc-25607, Santa Cruz, USA) を、VDAC の検出には Rabbit polyclonal antibody to VDAC-I/Porin (ab15895, Abcam, UK) を、二次抗体には Anti-rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (Peroxidase-Linked Secondary Antibodies, GE healthcare, England) を使用した。β-Actin の検出には Mouse monoclonal antibody to β-Actin (ab8226, Abcam, UK) を一次抗体として用い、二次抗体には Anti-mouse IgG, HRP-linked Whole Ab Sheep (Peroxidase-Linked Secondary Antibodies, GE healthcare, USA) を使用した。一次抗体は 0.1%TBS-T で 1000 倍に希釈し、4°C で一晩インキュベートした。また、二次抗体は 0.1%TBS-T を用いて 2500 倍に希釈し、室温で 60 分間インキュベートした。二次抗体の反応後のメンブレンを TBS-T でよ

く洗浄し、検出を行った。シグナルの検出にはECL plus 試薬 (GE healthcare, USA) を使用した。ECL plus による化学発光を化学発光検出装置 (MicroChemi, Berthold, Germany) の検出ソフト (Gel Capture, Berthold, Germany) を用いて検出し、画像の取り込みを行った。

H. 免疫沈降のための組織標本およびサンプル調製

免疫沈降のための組織標本はウエスタンブロッティングと同様の方法で採取、保存された。またサンプル調製もウエスタンブロッティングと同様の方法でミトコンドリア画分の分画を行った。ただし、サンプル調製には Solution D (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 250 mM sucrose, 50 mM NaF, 5 mM Sodium pyrophosphate, 1 mM DTT, 4 mg/l leupeptin, 50 mg/l trypsin inhibitor, 0.1 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, pH7.4) を Solution A および Solution C の代替として用いた。そして、最後に 1% NP-40 Solution C を用いて再懸濁するところを、1% Triton-X 100 Solution D を用いて再懸濁した。

I. 免疫沈降法による各タンパク質の精製

上記の方法で得られたミトコンドリア画分のタンパク質 100 μ g を 1000 μ l の PBS に加えた。そこに免疫沈降用のビーズであるダイナビーズプロテイン G (Invitrogen, USA) を 20 μ l 加えインキュベーションした (4°C, 60 分)。専用のマグネット、ダイナマグ (Invitrogen, USA) を用いてビーズを除去し、2 μ g の Normal mouse IgG (sc-2343, Santa Cruz, USA) をサンプルに加えインキュベーションした (一晩, 4°C)。サンプルとは別にもう一つマイクロチューブを用意し、1000 μ l の PBS にダイナビーズを 40 μ l と Rabbit polyclonal to Mb を 2 μ g もしくは Mouse monoclonal antibody to COXIV を 2 μ g を加えインキュベーションし (一晩, 4°C)、各抗体-ビーズ

複合体を調整した。調製した抗体-ビーズ複合体をダイナマグで回収し、1000 μ l の PBS で一度洗浄した。遠心分離 (7000g, 30 秒, 4°C) によって Normal mouse IgG を除去したサンプルを抗体-ビーズ複合体に加えインキュベーションした (一晩, 4°C)。また、非特異的に結合するタンパク質を除去したサンプルに、再度 Normal mouse IgG を加えたチューブも用意し、同様の条件でインキュベーションした。反応終了後、ダイナマグを用いて抗原-抗体-ビーズ複合体もしくは Normal mouse IgG-タンパク質複合体を回収し、1000 μ l の PBS で一度洗浄した。それを 25 μ l の SDS サンプルバッファによって溶出した。溶出したサンプルをボイルし (5 分, 96°C)、その後のウエスタンブロッティングに用いた。ウエスタンブロッティングは上記に記した方法と同様の手順で行った。また、cyto c の検出には Mouse monoclonal antibody to cytochrome c (sc-13156, Santa Cruz, USA)、GAPDH の検出には Mouse monoclonal antibody to GAPDH (ab8245, Abcam, UK) の抗体を用いた。

J. 画像解析と定量

取り込んだデジタル画像は、Image J (NIH, USA) を用いて定量解析した。グレースケール画像はソフトが有する濃度階調特性中にある濃度で画素を形成する。定量数値として用いた値は選択した範囲におけるグレー値の濃度の合計であった。本研究において検出したバンドは、選択した範囲のバックグラウンドを差し引いた値とした。

K. 統計処理

全ての統計量は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。異なる骨格筋の間におけるミトコンドリア画分のタンパク検出量を検定するにあたり、対応のある一

元配置の分散分析をおこなった。分散分析の結果、平均値に有意差が認められた場合には Tukey-Kramer の post-hoc を行った。なお、有意水準は 5% 未満とした。

3. 結果

A. 腓腹筋の免疫蛍光抗体染色画像

Mb の緑色、ミトコンドリアマーカートンパクである VDAC の赤色蛍光を GasD の縦断切片で確認した。GasD では Mb の緑色蛍光が充分に確認できる筋線維とほとんど確認できない筋線維が存在した。(Figure IV-1A, B, C)。Merge 画像において黄色部分が確認された。GasD の画像において四角に囲まれた部分を拡大した画像を示した。拡大画像において Mb も VDAC も縞模様のように分布していることが観察された。また、黄色部分も同様に筋状に観察された (Figure IV-1D, E, F)。

Mb の緑色、ミトコンドリアマーカートンパクである VDAC の赤色蛍光を各筋の横断切片で確認した。GasD では Mb の蛍光がほとんど確認できない筋線維も存在した。GasS では、Mb の蛍光が確認できる筋線維が極めて少なかった (Figure IV-1G, J)。VDAC の蛍光はどの筋においても筋線維全体で確認された。VDAC の蛍光強度は GasD で強く、GasS では弱い傾向が見られた (Figure IV-1H, K)。Merge 画像における黄色部分はいずれの筋においても確認された。黄色部分は Mb の蛍光が確認された筋線維には確認できたが、蛍光が弱い筋線維ではほとんど確認できなかった (Figure IV-1I, L)。

B. 腓腹筋深層部の電子顕微鏡観察画像

GasD の筋線維鞘直下型 (subsarcolemmal: SS) ミトコンドリアと筋原

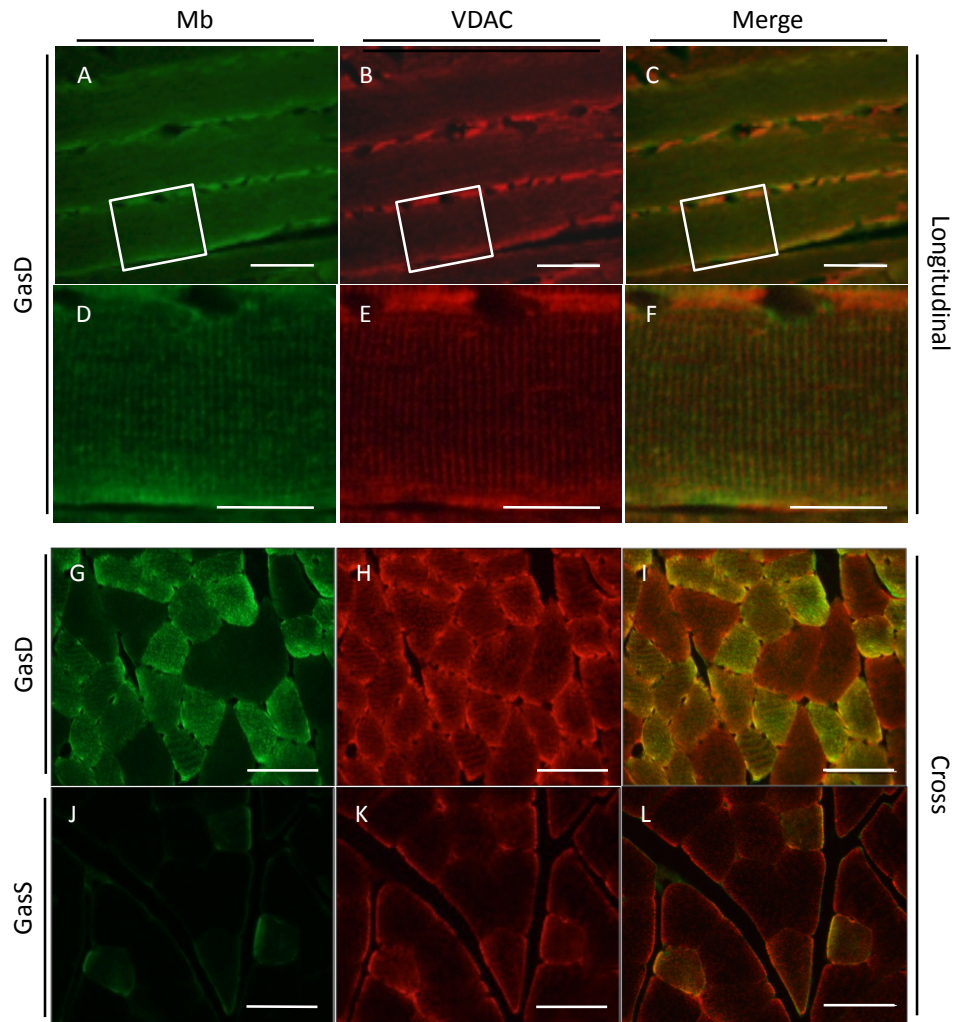


Figure IV-1. Histochemical images of myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscles.

A-F: Immunofluorescent imaging of Mb and VDAC-I in the longitudinal sections of GasD. Mb is green (A, D), VDAC (mitochondrial marker) is red (B, E), co-localization of Mb with mitochondria is yellow in the merged images (C, F). Magnified images of GasD (D-F) are the squared areas in images A-C.

G-L: Immunofluorescent imaging of Mb and VDAC in the cross-sections from GasD and GasS. Mb (G, J), VDAC (H, K), co-localization of Mb with mitochondria (I, L) are represented as with longitudinal sections images. Scale bars are 50 μm and 25 μm in the magnified images of longitudinal section of GasD.

線維間 (intermyofibrillar: IMF) ミトコンドリアを電子顕微鏡にて観察した。大部分の Mb は細胞質に局在していることが確認された (Figure IV-2A, D-F)。また、SS, IMF のどちらのミトコンドリアにおいても Mb が局在していることが確認された。その局在はミトコンドリア内部にも確認された (Figure IV-2B-C, E-F)。

C. 遠心分離サンプルのタンパク質およびミトコンドリア画分の Mb

各筋サンプルを遠心分離によって核以外の細胞全体 (Total)、細胞質 (Cyt)、ミトコンドリア (Mito) 画分に分画した。Mb、VDAC、 β -Actin の各タンパク質を検出した。どの筋においても全ての画分から Mb が検出された。ミトコンドリアマーカータンパク質である VDAC は細胞質画分から検出されなかった。その一方で、細胞質のマーカータンパク質である β -Actin はいずれの筋においてもミトコンドリア画分から検出されなかった (Figure IV-3A-D)。下腿三頭筋の各筋のミトコンドリア画分から検出される Mb の量を比較した。Sol と GasD は GasS に比べて検出量が有意に高値を示した (Figure IV-3E)。

D. Mb と COXIV との相互作用の検証

GasD のミトコンドリア画分から Mb と COXIV を免疫沈降したサンプルと抗原を持たない nIgG を用いて免疫沈降を行ったサンプルから COXIV, Mb, GAPDH, cyto c の検出を行った。その結果 Mb の免疫沈降サンプルから COXIV が検出された。また、COXIV の免疫沈降サンプルから Mb が検出された。しかしながら、nIgG の免疫沈降サンプルからは COXIV 及び Mb が検出されなかった。また、いずれの免疫沈降サンプルからも GAPDH と cyto c は検出されなかった。これらの結果は Mb と

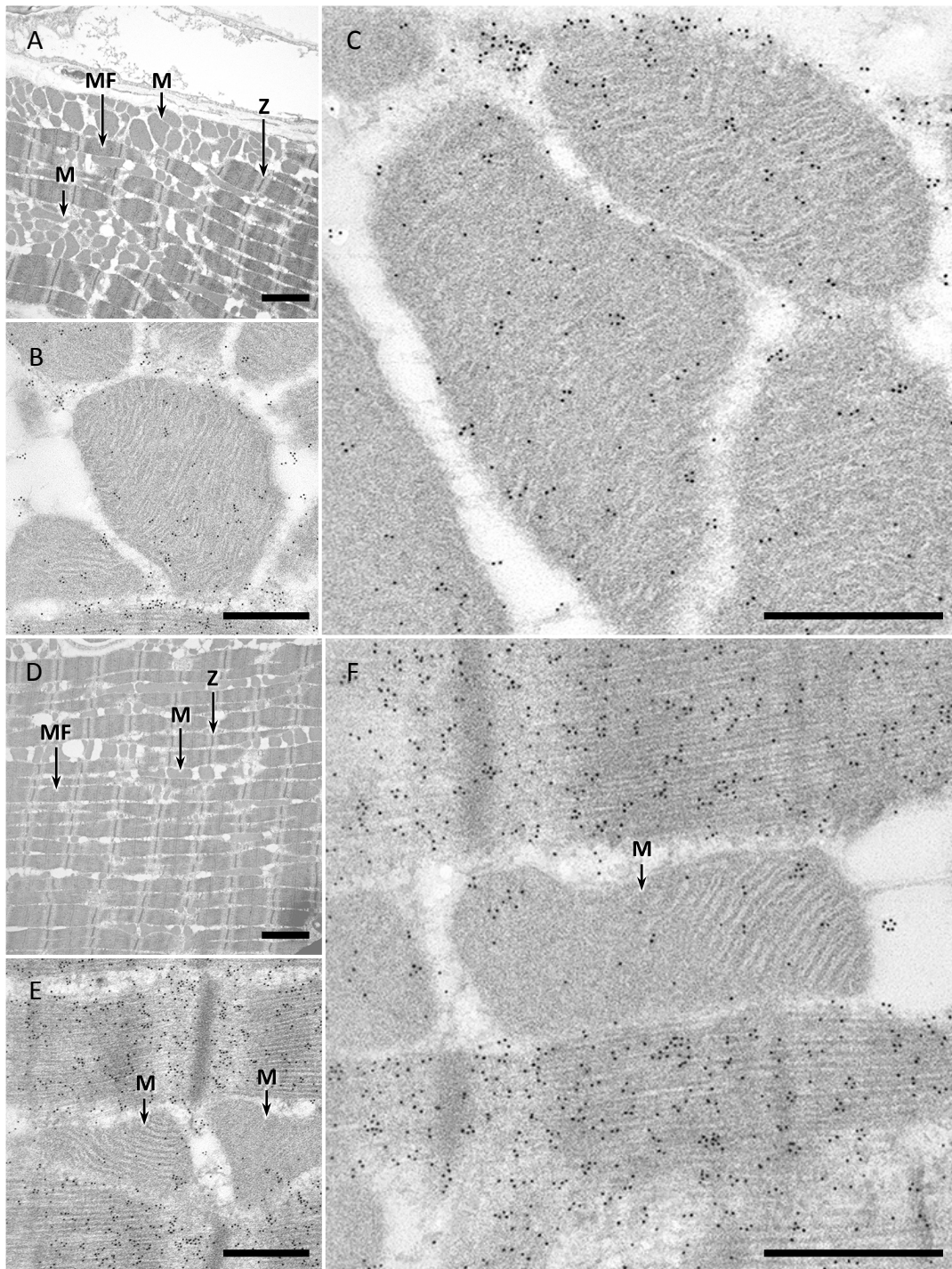


Figure IV-2. Electron microscopic imaging of Mb in mitochondria. Mb immunogold labeling in GasD tissue shows mitochondrial localization of Mb. M; mitochondrion, MF; myofibril, Z; z-disc. A: The wide view around sarcolemma (bar = 2 μ m). B-C: Magnified views of subsarcolemmal mitochondria (bar = 500 nm). D: The wide view of myofibril (bar = 2 μ m). E-F: Magnified view of intermyofibrillar mitochondria (bar = 500 nm). Sections are 80 nm-thin.

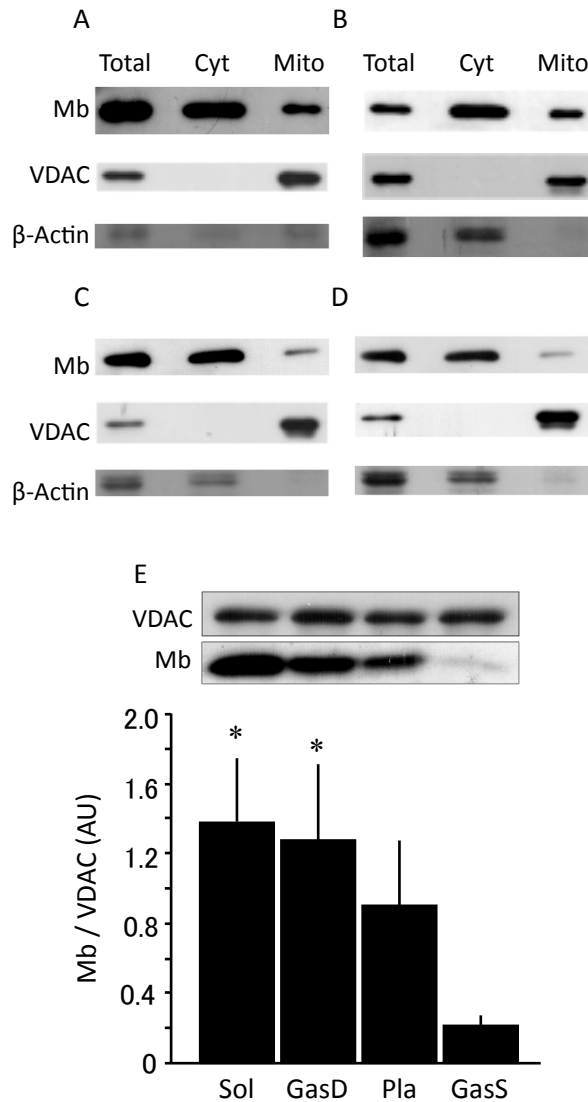


Figure IV-3. Detection of myoglobin in the mitochondrial fraction and comparison of the mitochondrial myoglobin content of the 4 rat calf muscles.

A-D: Mitochondrial marker protein (VDAC), cytosolic marker protein (β -Actin), and Mb in the entire tissue (Total), cytosolic fractions (Cyt), and mitochondrial fractions (Mito) from each muscle (Sol [A], GasD [B], Pla [C], and GasS [D]) were determined by immunoblots.

E: The amounts of Mb and VDAC were determined. Mb/VDAC were calculated based on bands intensity. The data from the 4 rats are presented as mean $\pm$ SD. n = 4. *P < 0.05 vs. GasS.

COXIV が相互作用しており、さらにその相互作用が非特異的ではない可能性が高いことを示唆している (Figure IV-4)。

4. 考察

本実験では Mb がミトコンドリアと直接的な相互作用を持つか否かを検証した。Mb は骨格筋細胞内においてミトコンドリアに局在し、さらに呼吸鎖複合体で最終的に酸素の還元を担う complex IV と相互作用することが示唆された。これらの結果から、Mb はミトコンドリアに直接的に影響を与える因子の一つである可能性が示唆された。

A. ミトコンドリアの Mb (Mito-Mb) が局在する場所とその量

本実験では、組織学的手法と生化学的手法を用いた分析によって、Mb が細胞質だけではなくミトコンドリアにも局在することが明らかとなった。縦断切片の免疫染色画像において Mb と VDAC が共局在を示す黄色部は縞模様状に観察された。この縞状の部分は I 帯だと推察される。先行研究でも心筋の I 帯には Mb とミトコンドリアの局在が多いことが示されている (Kawai et al., 1987)。このことは本実験が提供した電子顕微鏡画像からも裏付けることができる。Figure IV-2E では I 帯付近にミトコンドリアが局在し、さらにミトコンドリアの I 帯側に Mb が多く局在していることが分かる。したがって、IMF ミトコンドリアと Mb の相互作用は I 帯付近に豊富であり、このことは ATP の再合成と何らかの関係があると推察される。

IMF ミトコンドリアだけでなく、SS ミトコンドリアにも Mb の局在は確認された (Figure IV-2B, C)。つまり、骨格筋ミトコンドリアは細胞に Mb が発現していれば細胞内のどの区画に局在しているかに関わらず Mb

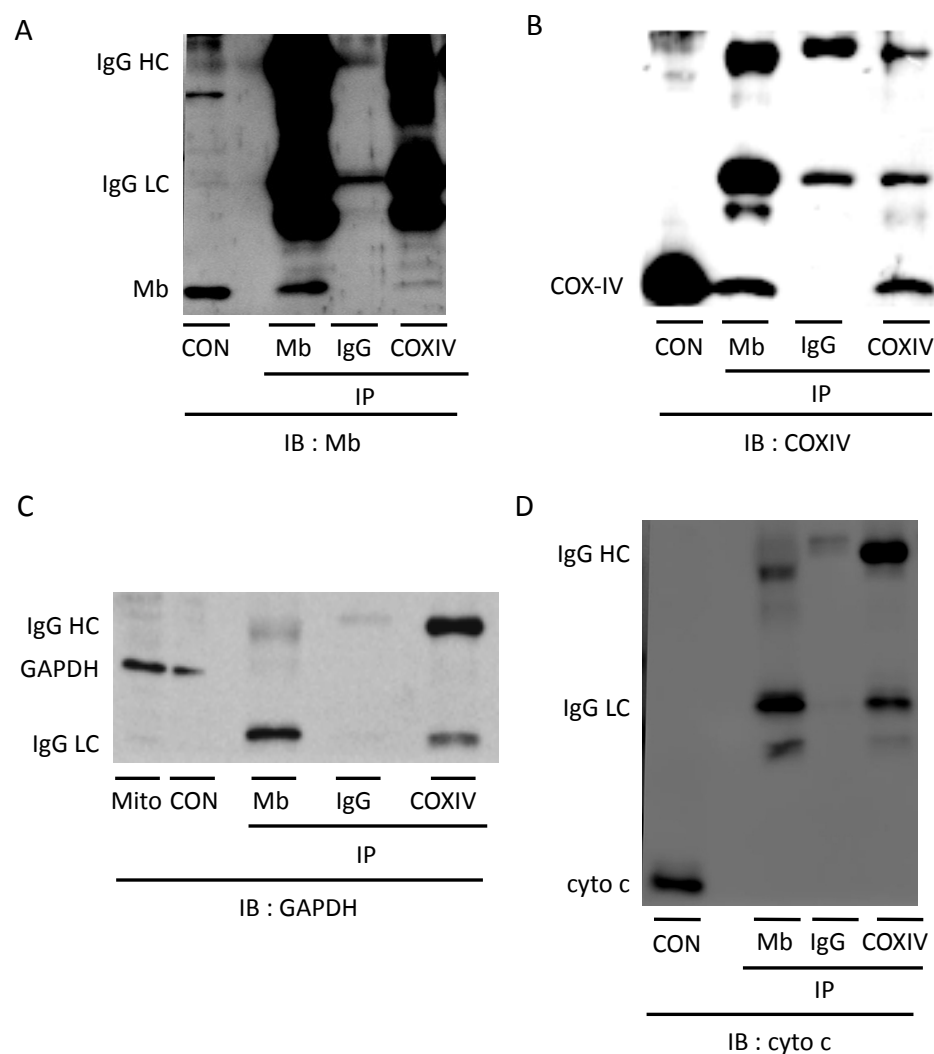


Figure IV-4. Detection of myoglobin and mitochondrial proteins in immunoprecipitates of mitochondrial myoglobin or COXIV. Mb and COXIV were immunoprecipitated from detergent-solubilized mitochondrial fractions. CON; control sample (entire heart tissue sample). A: Mb was detected in the immunoprecipitates of Mb and COXIV, but not in those from nIgG. B: COXIV was detected in the immunoprecipitates of COXIV and Mb, but not in those from nIgG. C-D: GAPDH and cytochrome c (cyto c) were not detected in immunoprecipitates.

を取り込むと推察される。ウエスタンブロッティング法では、速筋と遅筋のどちらのタイプの筋においてもミトコンドリア画分から Mb を検出した。したがって、Mito-Mb はどの筋組織においても広く存在していると推察される。

ミトコンドリアあたりの Mb 量は遅筋タイプの筋ほど豊富である傾向が確認された (Figure IV-3E)。つまり、筋組織の有酸素代謝能力と Mito-Mb の量は正の相関関係にあることが考えられる。

B. Mb と呼吸鎖複合体のサブユニットとが相互作用する意義

遅筋タイプの筋には Mito-Mb が豊富であることが示され、さらに Mito-Mb は呼吸鎖複合体の 1 つであり、最終的に酸素の還元を担う complex IV のサブユニット COXIV と相互作用することが示唆された。この結果は Mito-Mb がミトコンドリアの呼吸機能に直接的に関与していることを示唆している。Mb は補欠分子団であるヘムを含んだタンパク質であり、酸素結合タンパク質として古くから知られてきた。ヘムは鉄イオンを含んでいることから電子伝達に貢献しているのではないかとということが考えられる。また、Mb の酸素結合能は呼吸機能と関連性を持つのではないかという 2 点を想起させる。つまり、Mito-Mb はミトコンドリア呼吸を調節する因子の 1 つとして機能すると推察される。

5. 要約

実験 I では Mb が骨格筋ミトコンドリアと直接的な相互作用を有するか否かを検証した。Mb は細胞質だけではなくミトコンドリア内にも局在し、呼吸鎖複合体の complex IV と相互作用していることが示された。この結果から、Mb がミトコンドリアの呼吸調節に関わる可能性が示唆された。

V. Mb を過剰発現させた筋管細胞におけるミトコンドリアの表現型 (実験 II)

1. 目的

実験 I において、Mb はミトコンドリアの呼吸調節に関与する可能性が示唆された。従来の研究では、Mb はミトコンドリアへ酸素を供給することで間接的にミトコンドリアの酸素消費に貢献すると示唆されてきた。実験 II では、Mb が酸素の還元酵素である complex IV と相互作用するという実験 I で得られた成果に着目し、Mb がミトコンドリアの酸素消費を直接規定する因子の 1 つであるという仮説を立て、検証を行う。Mb が骨格筋ミトコンドリアにもたらす影響を検証するため、筋細胞由来の培養細胞に遺伝子操作を施して Mb の過剰発現モデルを構築する。実験 II において使用する培養細胞 C2C12 は筋芽細胞、もしくはそれを分化誘導した筋管細胞として培養することが可能である。実験 II では生体の筋組織に近い筋管細胞を用いる。本実験の目的は筋細胞において Mb 発現が増加するとミトコンドリアの呼吸機能が亢進するか否かを分析し、ミトコンドリアに局在する Mb が呼吸調節に寄与するかを明らかにすることである。

2. 方法

A. 培養細胞及び培養条件

マウスの筋細胞由来である C2C12 細胞を、遺伝子導入の宿主細胞とした。C2C12 は 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) と 50 µg/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma, USA) を加えた高グルコース含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を培地 (Med I) として培

養した。培養細胞を保存するインキュベータ内は常に 5% CO₂、37°C に維持した。

培養ディッシュの面積の 70%を細胞が占めるまで増殖してから、培養中の細胞をトリプシン-EDTA（和光純薬、日本）を用いてディッシュから剥がし、新たなディッシュに撒き直しながら継代培養し、筋芽細胞

（myoblasts）を増殖させた。ディッシュに播種した細胞が 100%コンフルエントまで増殖した時点で上記培地の 10% FBS を 2%ウシ胎児血清（donor bovine serum: DBS）に変更した培地（Med II）を用いて培養し、筋管

（myotubes）へと分化誘導した。分化誘導期間は 1 週間とし、培養 4 日目に培地を新鮮なものに交換した。培養終了後、生化学分析用の細胞は液体窒素にディッシュを付けることによって凍結し、実験に使用するまで -80°C にて保存した。ミトコンドリア呼吸の測定は生細胞を用いて行った。

B. Mb 安定発現培養細胞株の構築

マウス Mb cDNA の C 末端に Flag タグ配列が追加された遺伝子と、内部リボソーム侵入部位（internal ribosomal entry site: IRES）を介して緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein: GFP）の cDNA の遺伝子をコードするプラスミドベクターである pReceiver-M46 を購入した

（EX-Mm03786-M46, GeneCopoeia, USA）。プラスミドはヌクレオフェクション法を用いて C2C12 に導入された。培養した myoblast を 100 万個/100 μ l Ingenio Electroporation Solution（Mirus, USA）になるよう再懸濁し、プラスミドを 10 μ g 加えた。ヌクレオフェクション用キュベット（NEPA キュベット, ネッパジーン, 日本）に 100 μ l のプラスミド入り細胞懸濁液を注入した。キュベットを Amaxa Nucleofector System（Lonza, Switzerland）にセットし、C2C12 用の遺伝子導入プロトコールによって遺伝子導入を実

施した。その後、遺伝子導入した細胞を 10 cm ディッシュに播種して培養した。導入した遺伝子を安定的に発現させる細胞をネオマイシン耐性、および GFP の緑色蛍光の有無を元に選別して増殖させた。最終的に Mb-Flag の発現をウエスタンブロッティングにて確認し、発現が確認された細胞株を Mb 安定発現株とした。この細胞株を分化誘導し、筋管にした細胞を Mb 過剰発現筋管として本実験に使用した。また、薬剤耐性を示すものの Mb-Flag の発現が確認されない細胞株を Mock 細胞とし、対照群として用いた。

C. 生細胞における GFP の緑色蛍光観察

IRES 配列を介して発現する GFP の緑色蛍光を蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus, Japan) で観察し、顕微鏡デジタルカメラ (DP71, Olympus, Japan) で撮影しデータとして取り込んだ。

D. ウエスタンブロッティングのためのサンプル調製

遠心分離法によって分画サンプルを調製する場合には、凍結した細胞を実験 I において使用した Solution D に馴染ませてからセルスクレーパー (BD Falcon, USA) を用いて回収した。また、細胞全体のサンプルを調製する場合には RIPA バッファー (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, pH 7.6) を細胞に馴染ませてからセルスクレーパーで回収した。回収した細胞はバイオマッシャー (ニッピ, 日本) を用いて、ペッスルホモジナイザーによりホモジナイズされた。その後、27G の注射針内を 10 往復させて細胞を破碎した。分画サンプルを調製する遠心分離プロトコールの大部分は実験 I と同様であった。変更点としては以下の 1 点である。実験 II における細胞質画分 (Cyt) は実験 I において超遠

心を実施する前段階の画分とした。RIPA バッファーを用いてホモジナイズされたサンプルは 600g, 10 分, 4°C で遠心分離を行い、回収した上清を細胞全体のサンプルとして用いた。

E. 免疫沈降法

ウエスタンブロッティング用のサンプルを得る方法と同様の方法で免疫沈降用のホモジナイズサンプルを得た後に、実験 I と同様の方法で免疫沈降を行った。免疫沈降に用いるタンパク質の量は 1000 µg とした。タンパク質の精製には Anti-DYKDDDDK 抗体 (#2368, Cell Signaling Technology, USA) を 10 µg 使用した。免疫沈降によって調製されたビーズ-抗体-抗原複合体は 500 mg/ml の Flag ペプチド (和光純薬, 日本) 溶液 50 µl によって再懸濁され室温で 1 時間、ボルテックス装置を用いて振盪培養し、Mb-Flag タンパク質の溶出を行った。このサンプルをウエスタンブロッティング用に調製し、標的タンパク質の検出を行った。

F. ウエスタンブロッティング法

ウエスタンブロッティングは実験 I と同様の方法で実施した。ただし、ブロッキングは 4%ブロックエース溶液 (4%ブロックエース/0.1%TBS-T) で行った。Mb-Flag の検出には Anti-DYKDDDDK antibody (#2368, Cell Signaling Technology, USA)、COXIV の検出には Mouse monoclonal antibody to COX IV (ab14744, Abcam, UK)、各呼吸鎖複合体のサブユニットの検出には Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (ab110413, Abcam, UK) を使用した。シグナルの検出には ECL prime 試薬 (GE healthcare, USA) を使用した。

G. ミトコンドリア呼吸活性の測定

ミトコンドリア呼吸活性の測定は Kuznetsov et al. (2009) を参考にして行った。測定にはポーラログラフ型酸素センサーを搭載した Oxygraph-2k (Oroboros, Austria) を用いて測定した。測定は全て 37°C で常時攪拌しながら実施した。測定チャンバー内を Respiration Buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 1 g/L BSA, 60 mM potassium-lactobionate, 110 mM mannitol, 0.3 mM dithiothreitol, pH 7.1, adjusted with 5N KOH) で満たし、電極が安定してからチャンバー内にサンプルを入れ測定を開始した。まずジギトニンを 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えて細胞の膜透過処理を行った。次に 1 M glutamate、1.2 M malate を加えて complex I-III-IV の電子伝達経路を介した state 4 呼吸を測定した。そこに、0.5 M ADP を加えることによって同様の経路を介した state 3 呼吸を測定した。その後 0.5 mM rotenone を加えて complex I を阻害してから、complex II を介した呼吸を惹起するために 1 M succinate を加えた。さらに、complex III を阻害するために 1 mM Antimycin A を加えた。最後に cyto c の還元剤である TMPD (20mM) を 200 mM ascorbate と同時に加えることで complex IV のみを介した酸素消費を測定した。

H. CS 活性の測定

ミトコンドリア呼吸活性を測定したサンプルをホモジナイズバッファ (20 mM Tris, 40 mM KCl, 2 mM EGTA, 250 mM sucrose, pH 7.4) によって再懸濁し、ウェスタンブロッティングサンプルを得る方法と同様の手順でホモジナイズした。CS 活性の測定は Spinazzi et al. (2012) の方法に従った。1.5 ml のディスポセルに H_2O を 310 μl 、200 mM Tris (pH 8.0) を 500 μl 、10 mM acetyl CoA を 30 μl 、1 mM DTNB を 100 μl 、希釈サンプル

を 10 μ l の組成となるように注入した。セルを 37°C に保たれた分光光度計 (Lamda25, Perkin Elmer, USA) に移し、412 nm における吸光度を 3 分間測定し、これをサンプルのベースラインとした。測定終了後、10 mM のオキザロ酢酸溶液を 50 μ l 加え、412 nm の吸光度を 3 分間測定した。CS 活性は DTNB のモル吸光係数 $13.6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いて算出した。

I. Real time qPCR 法を用いた mtDNA/nDNA の算出

細胞のトータル DNA は DNeasy blood and Tissue kit (Qiagen, Netherland) を用いて抽出した。リアルタイム PCR は Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Takara Bio, Japan) を用いて行った。

mtDNA 特異的なプライマーの配列は次の通りである。

Forward: 5'-TTCGCAGTCATAGCCACAG-3'

Reverse: 5'-AGATGAAGTGGAAAGCGAAG-3'

nDNA 特異的なプライマーの配列は次の通りである。

Forward: 5'-TGCCATCCCATCACAACAAG-3'

Reverse: 5'-GCCAATACACAGGTCACAGAG-3'

それぞれの DNA の相対量は CT 法によって定量した。

J. 呼吸鎖複合体酵素活性の測定

呼吸鎖複合体活性の測定は Spinazzi et al. (2012) の方法に従った。ホモジナイズサンプルは CS 活性の測定と同様の方法で得られた。

complex I の測定方法は次の通りである。1.5 ml のディスポセルに H₂O を 774 μ l、0.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) を 100 μ l、50 mg/ml fatty acid-free BSA を 60 μ l、10 mM KCN を 30 μ l、10 mM NADH を 10 μ l、希釈サンプルを 20 μ l の組成となるように注入した。セルを 37°C に保たれた

分光光度計に移し、340 nm における吸光度を 2 分間測定し、これをサンプルのベースラインとした。測定終了後、10 mM decylubiquinone を 6 μ l 加え、340 nm の吸光度を 2 分間測定した。complex I の活性は decylubiquinone のモル吸光係数 $6.2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いて算出した。

complex II の測定方法は次の通りである。1.5 ml のディスポセルに H₂O を 681 μ l、0.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) を 50 μ l、50 mg/ml fatty acid-free BSA を 20 μ l、10 mM KCN を 30 μ l、400 mM succinate を 50 μ l、0.015% DCPIP を 145 μ l、希釈サンプルを 20 μ l の組成となるように注入した。セルを 37°C に保たれた分光光度計に移し、600 nm における吸光度を 10 分間測定し、終わりの 2 分間をサンプルのベースラインとした。測定終了後、10 mM decylubiquinone を 4 μ l 加え、600 nm の吸光度を 3 分間測定した。complex II の活性は decylubiquinone のモル吸光係数 $19.1 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いて算出した。

complex III の測定方法は次の通りである。1.5 ml のディスポセルに H₂O を 765 μ l、0.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) を 50 μ l、1 mM oxidized cytochrome c を 75 μ l、10 mM KCN を 50 μ l、5 mM EDTA を 20 μ l、2.5% (vol/vol) Tween-20 を 10 μ l、希釈サンプルを 20 μ l 入れた。セルを 37°C に保たれた分光光度計に移し、550 nm における吸光度を 2 分間測定し、これをサンプルのベースラインとした。測定終了後、10 mM decylubiquinol を 10 μ l 加え、340 nm の吸光度を 2 分間測定した。complex III の活性は cytochrome c のモル吸光係数 $18.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いて算出した。

complex IV の測定方法は次の通りである。1.5 ml のディスポセルに H₂O を 650 μ l、100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) を 250 μ l、1 mM reduced cytochrome c を 50 μ l 入れた。セルを 37°C に保たれた分光光度計に移し、550 nm における吸光度を 3 分間測定し、これをサンプルのベー

スラインとした。測定終了後、希釈サンプルを 20 μ l 加え、550 nm の吸光度を 3 分間測定した。complex IV の活性は cytochrome c のモル吸光係数 $18.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を用いて算出した。

K. 統計処理

全ての統計量は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。安定発現株と Mock の各群間の差の検定には対応のない t 検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

3. 結果

A. Mb 過剰発現筋管の特徴

Mb 安定発現株の特徴を生細胞イメージングと生化学的手法によって分析した。Mb 安定発現株を分化誘導して得られた筋管から Mb のレポーター遺伝子である GFP の緑色蛍光が観察された (Figure V-1A)。Mb-Flag は遠心分離によって得られたミトコンドリア画分から検出された (Figure V-1B)。このことは、Mb-Flag がミトコンドリアにも局在していることを示している。さらに、ミトコンドリア画分の Mb-Flag を免疫沈降によって抽出したサンプルから COXIV が検出された。野生型の C2C12 から得られたミトコンドリア画分を Flag 抗体を用いて免疫沈降したサンプルからは COXIV は検出されなかった (Figure V-1C)。したがって、Mb-Flag は安定発現株の筋管においてミトコンドリアに局在し、さらに complex IV のサブユニット COXIV と相互作用しているという特徴を持つ。

B. Mb 過剰発現筋管のミトコンドリア呼吸能力とそれに関わる指標

Mb を過剰発現させた筋管細胞のミトコンドリアの表現型を分析した。ミトコンドリアの酸素消費速度は Glutamate と Malate を基質とする complex

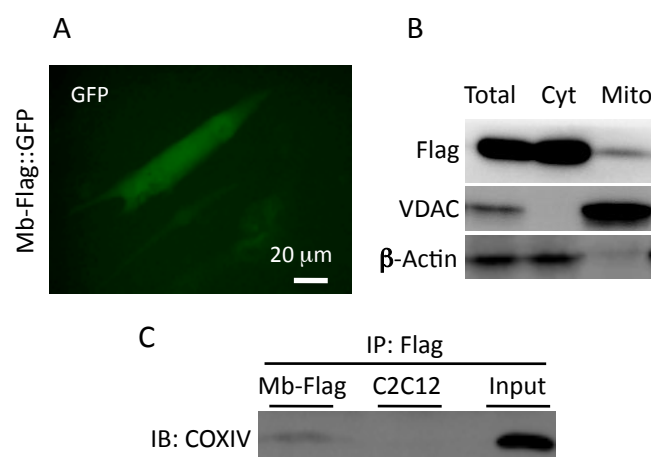


Figure V-1. Characterization of Mb stably expressing myotubes.
 A: Fluorescent image of living stable cell line showed tube like morphology of Mb overexpressing myotubes and fluorescence of reporter GFP were confirmed in differentiated stable cells.
 B: Mb-Flag expression was probed by immunoblots and Mb-Flag were detected in any fraction. These fractions were also probed for cytosol-specific β -Actin and mitochondria-specific VDAC expression to estimate subcellular fraction purity.
 C: Mb-Flag was immunoprecipitated from Mb stably expressing myotubes. COXIV was detected in the immunoprecipitates but not in that of C2C12, indicating that Mb-Flag binds complex IV.

I-III-IV の電子伝達経路を介した呼吸、Succinate を基質とする complex II-III-IV の電子伝達経路を介した呼吸、Ascorbate と TMPD を基質とする complex IV 依存的な呼吸いずれにおいても酸素消費速度を上昇させた (Figure V-2A)。Mb 過剰発現筋管の CS 活性は Mock に比較して有意に低値を示した (Figure V-2B)。mtDNA のコピー数は Mb 過剰発現筋管と Mock の間に有意な差は認められなかった (Figure V-2C)。Mb 過剰発現筋管における酸素消費速度の亢進には、CS 活性の上昇による呼吸基質の増加やミトコンドリア量の増加は直接的な原因ではないことが明らかになったため、呼吸鎖複合体を構成する各酵素の活性を測定した。その結果、Mb 過剰発現筋管の呼吸鎖複合体の酵素活性はいずれの複合体においても有意に亢進していることが認められた (Figure V-2D)。さらにその呼吸鎖複合体酵素活性の亢進は複合体 1 つあたりの機能の亢進によるものであり、酵素の量が増加したことによるものではない。なぜなら、各呼吸鎖複合体を構成するサブユニットの量には Mb 過剰発現細胞と Mock の間に有意な差が認められなかったためである (Figure V-3)。

4. 考察

本実験では Mb が安定的に発現した筋管を用いて、Mb の発現量が増加した筋細胞におけるミトコンドリアの表現型を分析した。Mb の発現が増加した筋管ではミトコンドリアによる酸素消費速度が上昇し、呼吸鎖複合体を構成する 4 つの複合体の酵素活性が亢進した。また、呼吸基質を供給する TCA サイクルの律速酵素である CS の酵素活性は減少した。

Mb を過剰発現させた筋管においてミトコンドリアの酸素消費効率が向上した原因を考察する。Mb の過剰発現筋管のミトコンドリアによる酸素

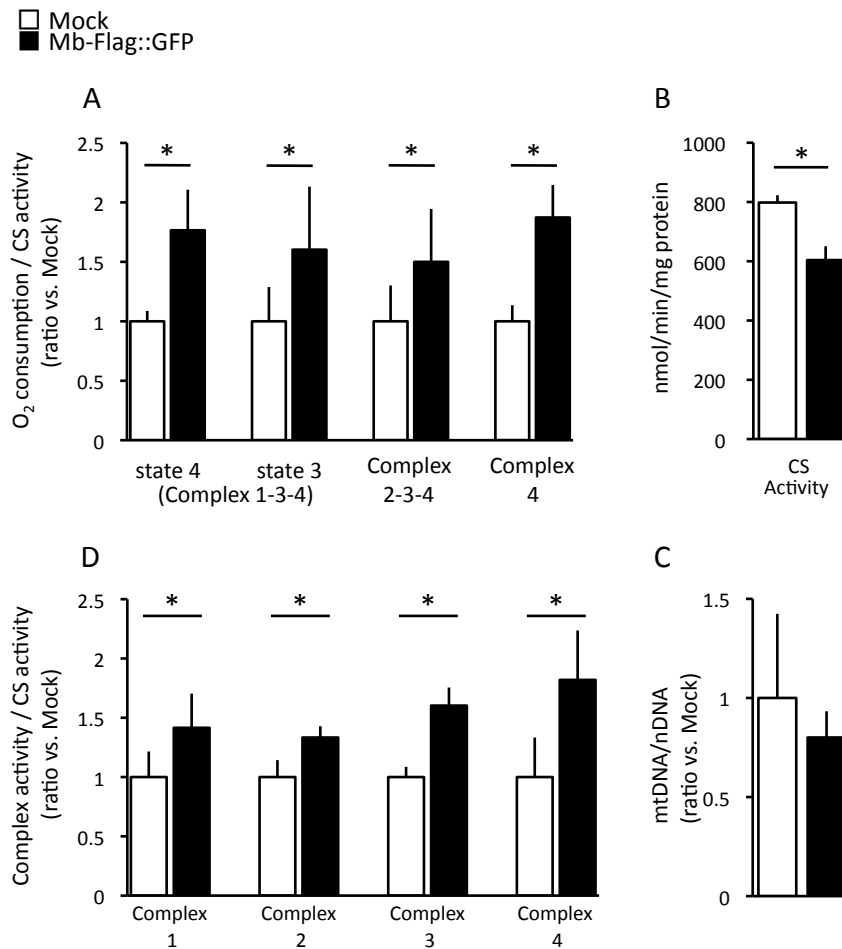


Figure V-2. Mitochondrial respiratory capacity and volume in Mb stably expressing myotubes.

A: Mitochondrial O₂ consumption in Mb stably expressing myotubes consume O₂ faster than mock cells in each 3 pathways of electron transfer. n = 8, *: p < 0.05.

B: Citrate synthase (CS) activity in Mb overexpressing cells was suppressed compared with mock. n = 8, *: p < 0.05.

C: mtDNA copy number was not altered by Mb overexpression. n = 4 and 6.

D: Enzymatic activity of each respiratory complex was ameliorated in Mb stably expressing myotubes. n = 7 and 8, *: p < 0.05, mean ± SD.

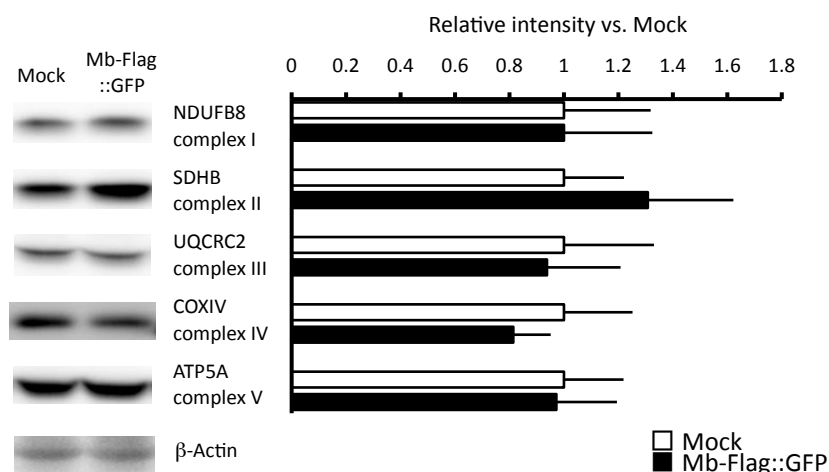


Figure V-3. Comparison of the number of mitochondrial respiratory complexes. Amount of each mitochondrial respiratory complex was determined by immunoblots. NDUF8 (complex I), SDHB (complex II), UQCRC2 (complex III), COXIV (complex IV), ATP5A (complex V; ATP synthase) and β -Actin for the loading control were detected in whole cell lysate of Mock or Mb overexpressing myotubes. No significant difference was observed in this analysis vs. Mock (n = 5, mean $\pm$ SD.).

消費速度は CS 活性で除した場合に上昇した (Figure V-2A)。呼吸基質の生成を触媒する TCA 回路の律速酵素である CS 活性が減少したことは、細胞内で生成される呼吸基質が減少したことを意味する。その一方、呼吸鎖複合体を構成する 4 つの複合体は 1 つあたりの機能が向上していた。Mb は complex IV と相互作用している (Figure V-1C) と考えられるので、complex IV の活性のみが上昇すると仮説を立てたが、実験結果はその仮説を一部支持していなかった。

今回用いたモデルは Mb の発現量が恒常的に増加した細胞であった。この細胞に増殖/分化期間を含めて約 10 日以上 of 長期間培養を施した後に分析を実施し、ミトコンドリアの呼吸機能が対照細胞に比べて向上することが明らかになった。この知見は、骨格筋細胞が増殖/分化を経る過程においてミトコンドリアが効率的な呼吸調節機構を獲得していくことに Mb が貢献し、酸素消費速度を亢進させることに寄与することを示唆している。

生体組織に近い条件において Mb を過剰発現させると骨格筋ミトコンドリアにどのような影響が及ぶかを分析するために Mb 過剰発現筋管モデルを用いた。しかしながら、本研究で用いた Mb 安定発現株は生体と大きく異なる点がある。それは C2C12 が筋管へと分化する前の筋芽細胞の段階から Mb が発現している点である (Figure V-4A)。Mb は筋細胞が分化を開始してから発現し始めることが示されており (Singh et al., 2014)、この現象を我々も確認した (Figure V-4B)。したがって、通常の骨格筋細胞内における Mb 発現様相と Mb 安定発現株の Mb は発現開始の時期が異なっていることを前提にデータを解釈する必要がある。つまり、より生体に近い状態で Mb 過剰発現の影響を分析するためには、筋細胞の分化誘導開始期において Mb の過剰発現が誘導されるようなモデルを用いることが最適であると考えられる。

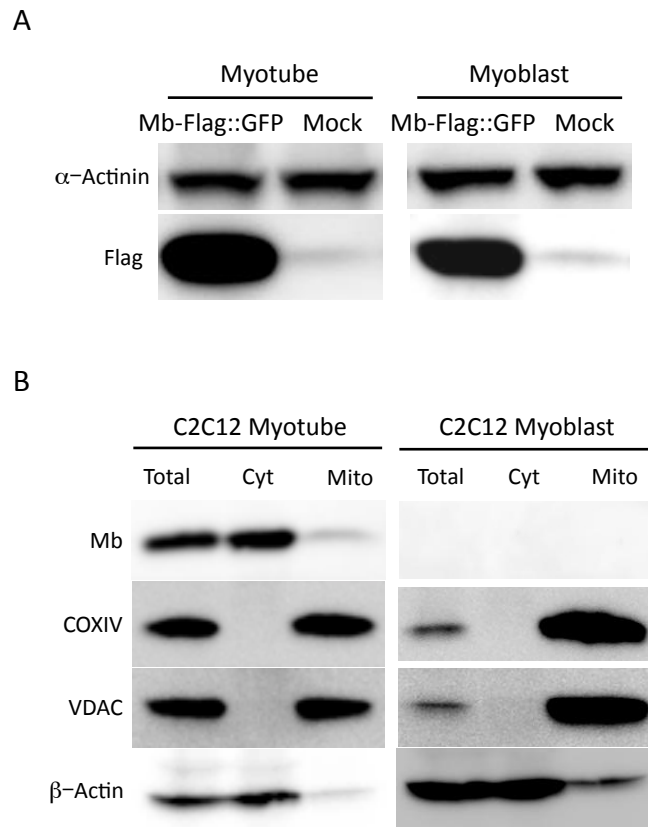


Figure V-4. Expression pattern of Mb-Flag in gene modified C2C12 and expression pattern of Mb in WT-C2C12.
A: Mb-Flag expressed either in Mb overexpressing myotubes or myoblasts confirmed by immunoblots.
B: Mb were detected only in C2C12 myotubes, not in that of myoblasts.

これらの知見に加えて、Mb は脂肪酸と結合することが可能であることが示されており、生体内において脂肪酸輸送を担いミトコンドリアへの脂肪酸供給に寄与していると推察されている (Shih et al., 2014)。我々は糖尿病ラットモデルの筋細胞内では Mb 濃度が減少するという結果を得ている (Figure V-5)。したがって Mb 濃度が減少し、ミトコンドリアへの脂肪酸供給が低下することによって、糖尿病の病態の 1 つである筋細胞内での過剰な脂質の蓄積 (van Herpen and Schrauwen-Hinderling, 2008) が起こる可能性がある。そこで、Mb 過剰発現筋管において CS 活性が減少したことは興味深い。Mb の安定発現株の培養初期 (増殖期および分化初期) では、ミトコンドリアの呼吸亢進とそこへのエネルギー基質供給が同時に亢進したために糖質や特に脂質の酸化が相乗的に増加したと考えられる。それによって起こる細胞内のエネルギー基質の枯渇を避けるための適応として、培養期間の中期から後期 (分化中期から後期) にかけて CS 活性が低下し、呼吸鎖複合体活性への基質供給の低下が生じたと推察される。

5. 要約

実験 II では Mb が過剰発現した筋管におけるミトコンドリアの呼吸機能を分析することを目的とした。Mb 過剰発現筋管の酸素消費速度は亢進し、この表現型は呼吸鎖複合体を構成する複合体の 1 つあたりの機能が向上したことに由来すると考えられる。これらの知見から、通常の骨格筋細胞でも細胞が分化していく過程において、ミトコンドリアが呼吸機能を獲得することに Mb が寄与していると推察される。

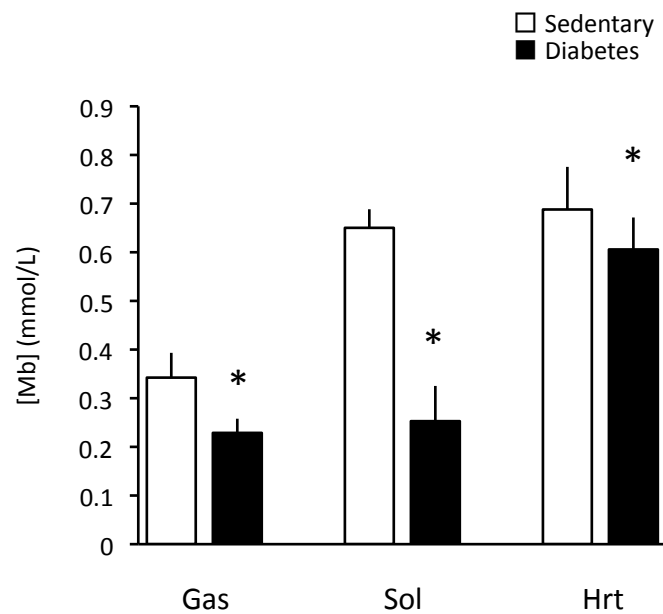


Figure V-5. [Mb] in sedentary or type 2 diabetic rats. [Mb] in whole cell lysate was assessed by spectrophotometer. [Mb] in diabetic rats have shown that significantly lower concentration than that in sedentary (n = 4 (sedentary) and 11 (diabetes), mean $\pm$ SD. *: P < 0.05 vs. sedentary). (unpublished observation)

VI. 一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞におけるミトコンドリアの表現系（実験 III）

1. 目的

実験 II では、筋細胞が分化する過程においてミトコンドリアが効率的な呼吸調節機構を獲得するのに Mb が寄与する可能性が示唆された。しかしながら、ミトコンドリアの呼吸調節における Mb の分子レベルでの役割を詳細に検証するためには異なるモデルが必要であった。

実験 II で得られた結果の解釈を規定する要因の 1 つとして培養細胞の増殖/分化期間に適応が生じた可能性がある。また、C2C12 は分化の前後でミトコンドリアの特徴が大きく変化する (Franko et al., 2008)。そのため、本来は発現しないはずの Mb を強制発現させた筋芽細胞を基に分化誘導した筋管細胞は *in vivo* における生命現象とは異なる影響を受けた可能性もある。したがって、実験 III では一過性の Mb 遺伝子改変モデルを用いて、Mb がミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす影響を分析する。一過性の Mb 遺伝子改変モデルではプラスミドベクターの導入による Mb の過剰発現の誘導に加えて、siRNA を同時に導入することによって Mb の過剰発現を相殺することも可能である。C2C12 の筋芽細胞において Mb 遺伝子の発現を一過性かつ特異的に増減させることによって、Mb が単一分子レベルで調節する細胞機能を観察することが可能となる。

本実験では、一過性に Mb の遺伝子操作を実施し、Mb の発現量に依存して表出する C2C12 内のミトコンドリアの表現型を分析する。仮説としては Mb が相互作用する complex IV に関わる機能に変化が起きると考えられる。

2. 方法

A. 培養細胞と培養条件

実験 II と同様の方法で細胞培養を行った。実験 III で用いた細胞は全て myoblasts だったので、分化誘導は行わなかった。培養した細胞は 100% コンフルエントになった状態でディッシュごと凍結させて、各生化学分析に用いるまで -80°C で保存した。ミトコンドリア呼吸の測定には生細胞を用いた。

B. 一過性遺伝子改変モデルの作出

実験 II で用いた Mb-Flag と GFP を同時発現させるプラスミドを一過性の遺伝子改変モデルの作出にも用いた。Mb の遺伝子改変の対照モデルとして GFP のみを発現させる筋芽細胞を GFP 発現ベクター (pmaxGFP, Amara, Switzerland) を用いて作出した。Mb siRNA は siRNA 自動設計ツールサイト siDirect (<http://sidirect2.rnai.jp/>) のアルゴリズムを利用して構築した。設計した siRNA は Mb の open reading frame (ORF) 領域内の配列である GATAAGTTTGACAAGTTCA に由来している。設計した siRNA の合成は Nippon Gene (日本) に委託した。また、特定の遺伝子を干渉することのないコントロール siRNA (control-siRNA) も Nippon Gene から購入した。遺伝子導入のプロトコールは実験 II と同様であった。細胞 100 万個あたりに Mb-Flag 発現ベクターは 5 µg、GFP 発現ベクターは 2 µg、各種 siRNA は 40 pmol 導入した。一過性の遺伝子改変モデルを全てで 6 グループ構築した。Mb-Flag ベクターのみ (Mb+, -)、Mb-Flag ベクターと control-siRNA の同時導入 (Mb+, si-Con+)、Mb-Flag ベクターと Mb-siRNA の同時導入 (Mb+, si-Mb+)、GFP ベクターのみ (GFP+, -) GFP ベクターと control-siRNA の同時導入 (GFP+, si-Con+)、GFP ベクターと Mb-siRNA

の同時導入 (GFP+, si-Mb+)。以上の 6 グループを解析の対象とした (Table VI-1)。

C. ウェスタンブロッティングのためのサンプル調製

細胞の回収方法、ホモジナイズ方法および遠心分離のプロトコールは実験 II と同様であった。

D. ウェスタンブロッティング法

実験 II と同様の方法を用いて、標的タンパク質を検出した。

E. CS 活性の測定

実験 II と同様の方法を用いて測定した。

F. ミトコンドリア呼吸活性の測定

実験 II と同様の方法を用いて測定した。ただし、ジギトニンは myoblasts にとって毒性が強かったため、添加する試薬から除外した。

G. 呼吸鎖複合体酵素活性の測定

実験 II と同様の方法を用いて測定した。

3. 結果

A. 一過性 Mb 遺伝子改変筋芽細胞の特徴

各種プラスミドと siRNA を導入した細胞の特徴を生化学的手法を用いて分析した。(Mb+, -) と (Mb+, si-Con+) から Mb-Flag タンパク質が検出された。それに対して (Mb+, si-Mb+) では Mb-Flag の発現が著しく抑制

Table VI-1. ID for 6 gene modified groups.

siRNA	Plasmid	Mb-Flag	GFP
-		(Mb+, -)	(GFP+, -)
control siRNA		(Mb+, si-Con+)	(GFP+, si-Con+)
Mb siRNA		(Mb+, si-Mb+)	(GFP+, si-Mb+)

された。GFP 発現ベクターと各 siRNA を同時に導入したいずれの細胞からも Mb-Flag は検出されなかった (Figure VI-1A)。遠心分離法を用いて (Mb+, -) からミトコンドリア画分 (Mito) と細胞質画分 (Cyt) を分画した。Mb-Flag はいずれの画分からも検出され、このことは一過性 Mb 過剰発現モデルにおいても Mb-Flag がミトコンドリアに局在することを示している。一過性 GFP 発現モデルにおいてはどの画分からも Mb-Flag は検出されなかった (Figure VI-1B)。CS 活性は 6 つの遺伝子改変グループにおいて有意な差は認められなかった (Figure VI-1C)。

B. 一過性遺伝子改変筋芽細胞のミトコンドリア呼吸活性

Mb の発現量に応じて、ミトコンドリアの酸素消費速度が直接的に影響を受けるか否かを分析するために、6 つの遺伝子型を持つ筋芽細胞を同じ siRNA を導入した群ごとに 3 つのグループに分類した。各グループ内において Mb-Flag と GFP のベクターを導入した群の酸素消費速度を比較した。(Mb+, -) と (GFP+, -) の complex I-III-IV を介した state 4 における酸素消費速度は、(Mb+, -) が (GFP+, -) に比較して有意に高値を示した。また、state 3 も (Mb+, -) が (GFP+, -) に比較して高い傾向を示した ($p = 0.075$) (Figure VI-2A)。(Mb+, si-Con+) が (GFP+, si-Con+) に比べて complex I-III-IV を介した state 4、state 3 呼吸および complex IV のみを介した呼吸の酸素消費速度が有意に高値を示した (Figure VI-2B)。(Mb+, si-Mb+) と (GFP+, si-Mb+) のいずれの酸素消費経路においても有意な差は認められなかった (Figure VI-2C)。これらの結果をまとめると、筋芽細胞において Mb が増加するとミトコンドリアの呼吸は亢進し、Mb の発現を抑制すると Mb 量の減少に依存して呼吸の亢進も相殺されてしまうということである。

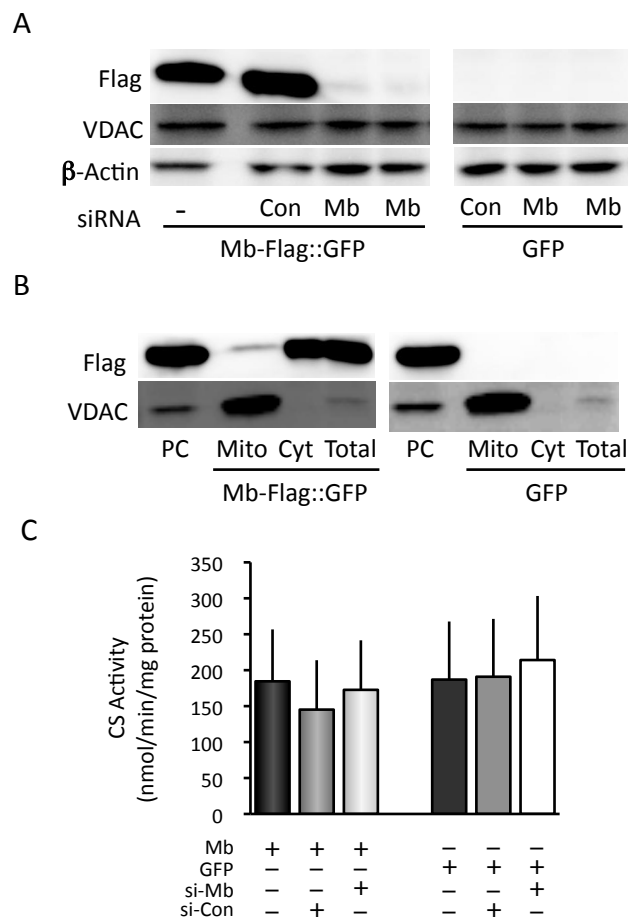


Figure VI-1. Characterization of transiently Mb expressing myoblasts.

A: Mb-Flag expression was probed by immunoblots. Mb-Flag expression was confirmed in Mb vector transfected myoblasts, whereas it was significantly decreased in Mb vector and Mb-siRNA double transfected myoblast. VDAC and β -Actin were detected as loading control and these proteins expression was not altered by any gene modification even in GFP vector transfected myoblasts.

B: Mb-Flag was detected in any fraction, indicating that transiently expressed Mb also localized in mitochondria. GFP transfected myoblasts have shown no blot in any fraction.

C: CS activity did not show any significant differences in each subject. $n = 6$, mean $\pm$ SD.

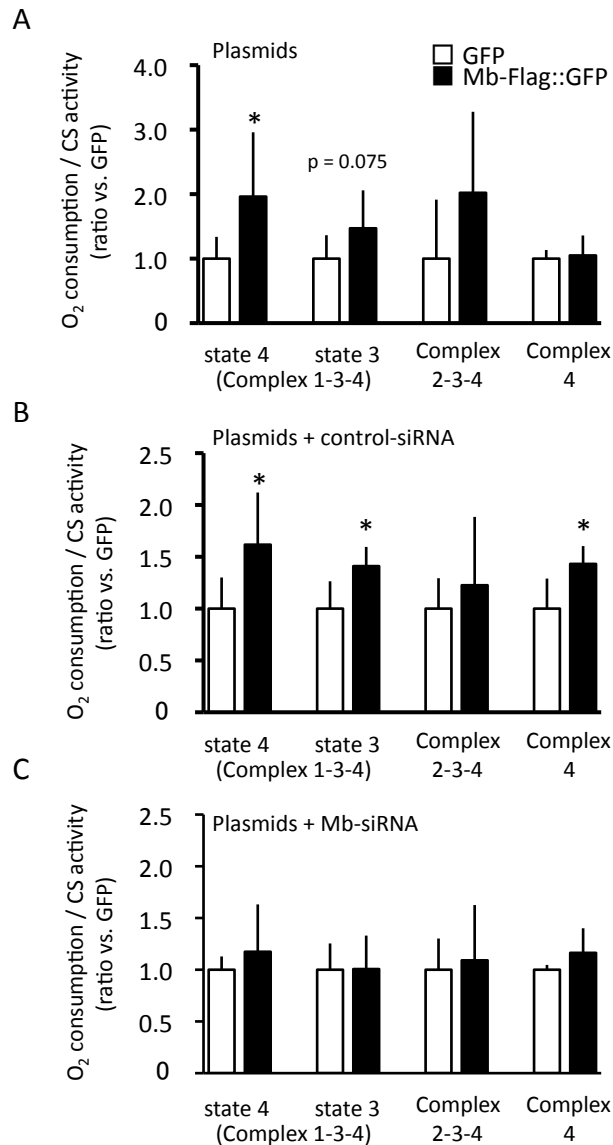


Figure VI-2. Comparison of O₂ consumption in transiently gene modified myoblasts. A: Transient Mb expression by Mb vector transfection (Mb+, -) ameliorated O₂ consumption of myoblasts. State 4 respiration via complex I-III-IV was ameliorated and state 3 respiration also inclined to be enhanced (p = 0.075). B: Mb overexpression by Mb vector and control-siRNA transfection (Mb+, si-Con+) also ameliorated O₂ consumption of myoblasts. State 4, state 3 and complex IV dependent respiration were significantly promoted. C: Mitochondrial O₂ consumption in Mb suppressed model by Mb vector and Mb-siRNA transfection (Mb+, si-Mb+) have shown no significant difference compared with GFP vector and Mb-siRNA transfected myoblasts (GFP+, si-Mb+). n = 5-8, mean ± SD. *: p < 0.05 vs. GFP at same respiratory state.

state3 と state4 を基に計算する (state3 / state4) ミトコンドリアの呼吸交換比 (respiratory control ratio; RCR) を同様の群間で比較したところ、いずれの群間においても有意な差は認められなかった (Figure VI-3)。Mb-Flag のベクターを導入したグループは RCR が低い傾向にあった。

C. 一過性遺伝子改変筋芽細胞における呼吸鎖複合体の酵素活性

一過性 Mb 過剰発現筋芽細胞において呼吸が亢進した仕組みを同定するために呼吸鎖複合体の酵素活性を 6 つの遺伝子型で比較した。complex I、II、III の酵素活性はいずれのグループ間にも有意な差は認められなかった (Figure VI-4A-C)。complex IV の酵素活性において、(Mb+, -) と (Mb+, si-Con+) は (Mb+, si-Mb+) に対して有意に高値を示した。また、(Mb+, si-Con+) は (GFP+, si-Con+) と比較して有意に高値を示した (Figure VI-4D)。したがって、complex IV の酵素活性は Mb 量依存的に調節されることが示され、この酵素活性の変化がミトコンドリアの呼吸機能の亢進に影響を与えていると考えられる。

また、酵素活性の変化は複合体の量が変化したことによるものではないと考えられる。各呼吸鎖複合体のサブユニットのタンパク質をウェスタンブロッティングで検出したところ、いずれの遺伝子型の間にも有意な差は認められなかった (Figure VI-5)。そのため、Figure VI-3D で確認された酵素活性の変化は酵素一つあたりの機能が亢進したことによる変化であると考えられる。

4. 考察

本実験ではプラスミドベクターと siRNA の導入によって一過性の Mb 遺伝子操作を行い、Mb の過剰発現および発現抑制モデルにおけるミトコ

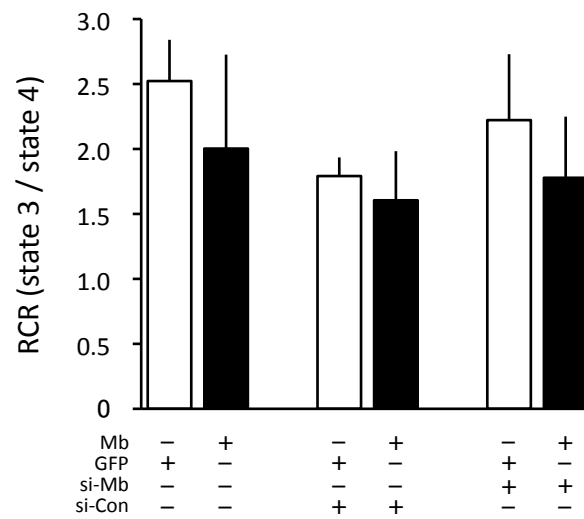


Figure VI-3. RCR (respiratory control ratio) in transiently gene modified myoblasts. RCR was calculated based on state 3 and 4 respiration. No significant difference was observed in each analysis, however, RCR in Mb gene transfected myoblast (with any siRNA) tend to be lower than that of GFP (assessed by T-test, n = 5-8, mean $\pm$ SD.).

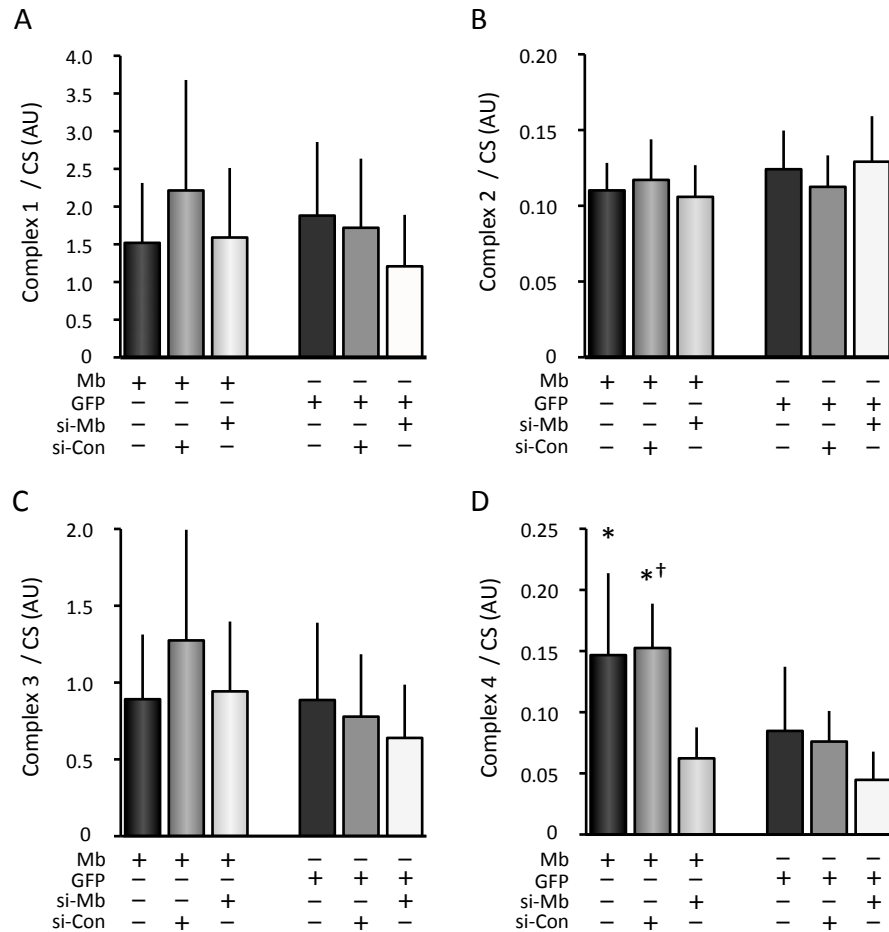


Figure VI-4. Comparison of enzymatic activity of respiratory chain complexes. A-C: Transient gene modification have not altered enzymatic activities of complex I (A), II (B) and III (C). D: The complex IV activity in Mb expressing myoblasts (Mb+, si-Con+) is higher than that of GFP expressed (GFP+, si-Con+). In addition, the complex IV activity in Mb overexpressing myoblasts (Mb+ and Mb+, si-Con+) was significantly higher than that of Mb suppressed (Mb+, si-Mb+). n = 5 and 6, *: $p < 0.05$ vs. “Mb+, si-Mb+”, †: $p < 0.05$ vs. “GFP+, si-Con+”, mean $\pm$ SD.

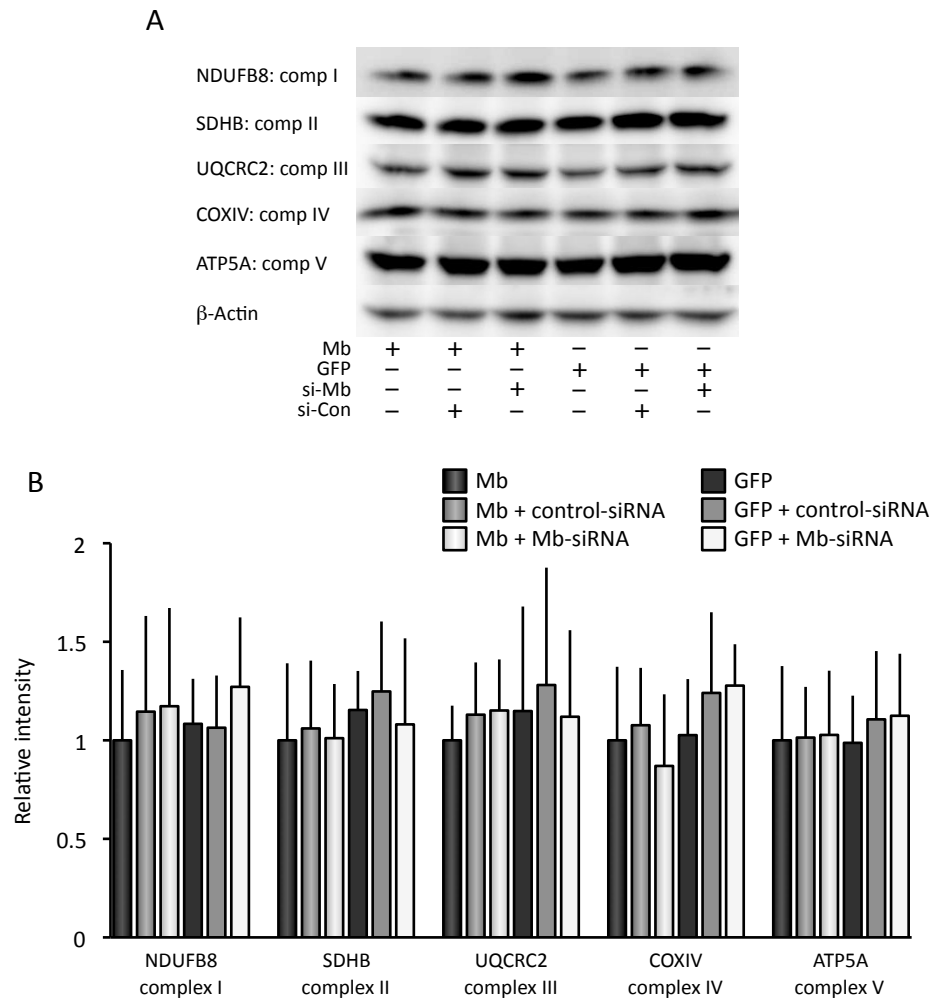


Figure VI-5. Comparison of the number of mitochondrial respiratory complexes in transiently Mb gene modified myoblasts. Amounts of each respiratory complex was not altered by any gene modification.

A: Representative images of each subunit of respiratory complexes in gene modified myoblasts.

B: Amount of each mitochondrial respiratory complex was determined by immunoblots. NDUF8 (complex I), SDHB (complex II), UQCRC2 (complex III), COXIV (complex IV), ATP5A (complex V; ATP synthase) and β-Actin for the loading control were detected in whole cell lysate of each gene modified myoblasts. No significant difference was observed in this analysis (assessed by ANOVA, $n = 5$ and 6 , mean $\pm$ SD.).

ンドリア呼吸機能の表現型を評価した。その結果 Mb の発現量が増加するとミトコンドリアによる酸素消費速度と呼吸鎖複合体の complex IV の酵素活性が亢進し、発現の増加を抑制するとミトコンドリアの酸素消費および complex IV の酵素活性の亢進が相殺された。したがって、Mb は骨格筋ミトコンドリアの complex IV の酵素活性を上昇させることで、ミトコンドリアの酸素消費を亢進させる役割を果たすことが明らかとなった。

A. Mb が complex IV の酵素活性を上昇させるメカニズム

Mb は COXIV と相互作用することが本研究で示されている (Figure IV-4A, B, Figure V-1C)。そのため、Mb が他の複合体ではなく complex IV の酵素活性を亢進させるのは合理的である。この現象がどのようなメカニズムを介して起こるのかを考察する。

Mb は *in vitro* において ferricytochrome c を還元する機能を持つことが示されている (Wu et al., 1972)。しかしながら本実験において、Mb が cyto c を還元したとは考えにくい。なぜなら本実験における complex IV の酵素活性の測定方法は、cyto c が酸化される速度を算出している。Mb の過剰発現筋芽細胞においてはその速度が増加した。したがって細胞内において Mb は cyto c を還元することではなく、恐らく complex IV が cyto c を還元する機能を強化していると推察される。Mb は金属イオンを有する cyto b₅ と電子伝達を行うことが可能であることから (Livingston et al., 1985; Xiong et al., 2010)、同じく金属イオンを含む complex IV への電子伝達を担っているのではないかと推察する。しかしながら、これらを示すデータや先行研究は存在しないため、今後の更なる研究が必要である。

B. Mb が complex IV と相互作用する必要性

もし Mito-Mb が complex IV への電子伝達を担うのであれば、complex IV と相互作用することは合理的である。Mb と cyto c 間の電子伝達は酸素の濃度が高いと減少してしまうというデータが示されている (Yamazaki et al., 1964; Wu et al., 1972)。これは、deoxy-Mbの方が Mb-O₂に比べて cyto c を還元する機能に優れるためだと考えられている。complex IV は Mb に比べて酸素の親和性が高いため、complex IV と近接した Mb は酸素と結合出来ないと考えられる。したがって Mito-Mb が complex IV と相互作用することは、Mito-Mb が酸素と結合するのを防ぎ Mb の電子伝達機能を亢進させているのではないかと考えられる。

5. 要約

実験 III では、Mito-Mb が分子レベルでどのような役割を果たしているかを解明することを目的とした。Mb の発現量を増加させると complex IV の酵素活性とミトコンドリアの酸素消費速度が亢進した。Mb の増加によってミトコンドリアが得た呼吸機能の亢進は、Mb の発現を抑制すると相殺された。これらのことからミトコンドリアの complex IV は Mb 依存的に調節されており、この相互作用はミトコンドリアによる酸素消費を調節する仕組みの 1 つであると考えられる。

VII. 討論

筋細胞に発現する Mb は、細胞内での酸素貯蔵や細胞内への酸素流入を促進する役割を果たすと考えられてきた。しかしながら、Mb^{-/-}マウスは生理機能に深刻な障害をきたさないという報告により、Mb が細胞内に存在する意義が問われることとなった。その後、研究手法が進歩したことから、複数の研究によって生体内ではミトコンドリアの酸素需要に応じて Mb が酸素を供給し、Mb の脱酸素化はミトコンドリアの酸素需要と共役していることが示唆された。本研究では、ミトコンドリアと Mb の関連性は先行研究によって示唆されてきたよりも密接であると仮定し、Mb がミトコンドリアの呼吸調節に直接的に関わる因子の 1 つであるという仮説を立て、それを検証した。

1. ミトコンドリアに局在する Mb の重要性

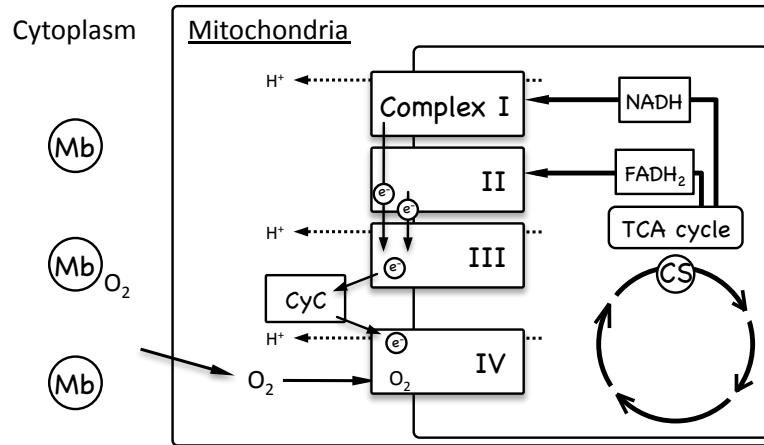
本研究では Mb がミトコンドリアに局在し、さらにミトコンドリアの呼吸機能に直接関与していることを示した。Mb 発現ベクターのみの遺伝子導入および Mb 発現ベクターと control siRNA を同時に遺伝子導入した一過性の Mb 過剰発現モデルは、対照細胞に比べて state 4 の有意な上昇が認められた (Figure VI-2A, B)。このことは Mb の過剰発現によってミトコンドリアによる酸素消費のベースラインが上昇したことを示している。それを支持するデータとして、RCR は Mb 遺伝子操作群と対照群に有意な差は認められなかったものの、Mb 過剰発現細胞において低い傾向にある (Figure VI-3)。呼吸のベースラインが上昇するのは、Mb 量の増加が生ずると complex IV の酵素活性が定常的に高い水準を維持することに由来すると推察される。Mb の増加がもたらした基底状態におけるミトコンドリ

ア呼吸の亢進は、糖質や脂質の酸化を促進し、生命活動を維持するためにより多くのエネルギー基質が必要となる表現型の獲得に寄与したと推察される。この表現型を恒常的に維持したモデルが実験 II において用いた筋管である。筋管モデルにおいて CS 活性が減少した (Figure V1-B) 原因の 1 つとして、ミトコンドリアによる過剰なエネルギー基質の消費を抑制するために基質酸化の律速酵素の 1 つである CS を減少させる適応が誘発されたと推察される。まとめると、Mb は complex IV を修飾することによってミトコンドリアの呼吸機能を根本から改善し、ATP の再合成とそれに伴うエネルギー基質の酸化を促進していると考えられる。これは Mb が筋細胞におけるエネルギー代謝調節において基幹的な役割を担うこと示唆している (Figure VII-1)。

Mb と同様に、従来はミトコンドリア以外の細胞区画に局在すると見なされてきたタンパク質が筋細胞において呼吸調節機能を担っていることが報告されている。Stat 3 は炎症の誘発に関わる転写因子であるものの、心筋においては complex I と相互作用することで酵素活性を上昇させ酸素消費も亢進させる (Wegrzyn et al., 2009)。この先行研究と本研究の成果を考慮するとエネルギー需要が高く、その変動が激しい筋組織のミトコンドリアは呼吸を調節するために特徴的な機構を獲得したと推察される。

Rossignol et al. (1999) は心筋と骨格筋のミトコンドリア呼吸は他の組織に比べて、complex IV の酵素活性に依存的であることを示している。実験 III によって、Mb は complex IV の酵素活性を特異的に修飾していることが示された。したがって、骨格筋細胞内において Mb が complex IV の酵素活性を調節することは、骨格筋ミトコンドリアが complex IV 依存的な呼吸を示すメカニズムの 1 つなのではないかと推察される。

A: Existing concept



B: Novel concept

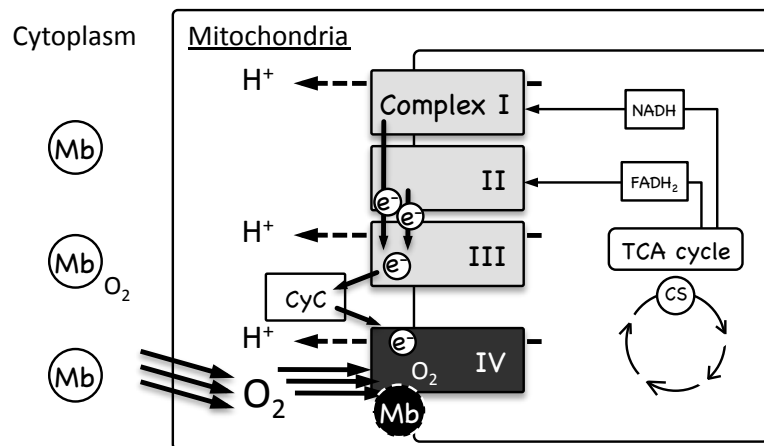


Figure VII-1. Schematic diagram of mitochondrial respiration in myocyte.

A: It has been assumed that Mb localized in cytoplasm and bind oxygen to store. Recent studies suggested that cytoplasmic Mb could release oxygen in response to the increase of oxygen demand of mitochondria at the onset of muscle contraction. However, any reports provide data which reveal direct interaction of Mb with mitochondria. B: The present study indicated that Mb localized also in mitochondria and interacted with complex IV. Due to the interaction, mitochondrial oxygen consumption rate and enzymatic activity of complex IV were ameliorated. Then, other respiratory complexes obtained augmented enzymatic capacity in Mb overexpressing myotubes, although CS activity was compromised, suggesting that Mb expression could contribute to the acquisition of efficient respiratory capacity.

ミトコンドリアに局在するタンパク質の多くはミトコンドリアに移行するためのアミノ酸配列を有しており、その配列を介してミトコンドリアに取り込まれる (Schmidt et al., 2010; Becker et al., 2012)。Stat 3 も Mb もそのアミノ酸配列を含んでいない。そのため Mb は細胞質にも局在し、Mb 全体に占めるミトコンドリアに局在する割合は低い (Figure IV-3A-D)。進化の過程においてミトコンドリア特異的に発現するための配列を失ったか、もしくは初めからその配列を保持せずに後天的にミトコンドリアに取り込まれる仕組みを獲得したのかは不明である。本研究では Mb がミトコンドリアに取り込まれる仕組みの解明には取り組めなかった。ミトコンドリアによる Mb の取り込みが分子レベルで精密に調節されていることを示すことができれば、ミトコンドリアに局在する Mb が細胞システムの 1 つとして重要であると示すことが可能であろう。

また本研究の解釈を制限する点として、今回用いた過剰発現モデルでは細胞質とミトコンドリアの両方の細胞区画において Mb が増加している点が挙げられる。ミトコンドリアに局在する Mb の影響をより特異的に検証するためには、ミトコンドリアに局在するアミノ酸配列と Mb の配列を持つ合成タンパク質をコードする遺伝子を導入した上でミトコンドリアの表現型を検証する必要があるかもしれないと考えられる。

2. 筋細胞に Mb が存在する意義; 酸素代謝の観点から

ミトコンドリアに局在する Mb はどのような機能を担うかを検証した実験 II, III によって、ミトコンドリアに局在する Mb は complex IV の酵素活性を修飾する機能を担っており、分化の過程ではミトコンドリアが呼吸調節機構を効率化することに貢献していると推察される。従来の先行研究と本研究から得られた知見を総合して、Mb が細胞質とミトコンドリアの

どちらにも局在する意義を考える場合に酸素の運搬機能ではなくミトコンドリア呼吸の調節機構に着目することで、新しい視点から論じることができる。

ミトコンドリアの **complex IV** は NO と結合すると、酸素の還元機能が阻害されてしまう (Brunori, 2001)。その一方で Mb も NO と結合することが可能であり (Flogel et al., 2001)、NO の細胞内での活動を制限することでミトコンドリア呼吸が阻害されるのを防いでいると考えられていた

(Brunori, 2001)。しかしながら、Mb は NO を除去するだけが NO 代謝における唯一の機能ではないことが示された。脱酸素化した Mb は NO₂ を還元することで NO を産生することが可能である (Rassaf et al., 2007)。つまり、Mb は NO を除去する機能と産生する機能の両方を有していると報告されている。細胞内の酸素濃度を考慮したとしても、生体内において Mb は NO の除去と産生の両方を担うと考えられている (Kamga et al., 2012)。そして、Mb による NO 産生は虚血状態に陥った心臓組織においてミトコンドリア呼吸を阻害し、活性酸素種の発生を抑制することによって、細胞死を防ぐことが明らかになった (Hendgen-Cotta et al., 2008)。したがってこれらの先行研究と本研究で得られた知見を総合すると、細胞が正常な状態では Mb は **complex IV** と相互作用することにより酵素活性を亢進させ、酸素消費を促進している。その一方で、細胞が低酸素状況に陥った場合に細胞質の Mb は脱酸素化しつつ、NO₂ から NO を産生し、その NO が **complex IV** と結合することで細胞内の酸素不足による活性酸素の発生を抑制している。つまり、Mb はミトコンドリア呼吸のアクセルとブレーキの両方を調節することが可能なタンパク質であり、ミトコンドリアの内側及び細胞質からミトコンドリア呼吸を調節する機能を担っている。

Mbが筋細胞内に存在する意義はミトコンドリア呼吸の亢進と抑制を複数のメカニズムを介して調節することであると推察する。

3. 細胞分化過程におけるミトコンドリアの可塑性

Mb過剰発現筋管においてはミトコンドリアによる酸素消費速度が亢進しており、さらに4つの呼吸鎖複合体の酵素活性が上昇していることが示された (Figure V-2A, D)。その一方で Mb 過剰発現筋管における CS 活性は減少し、mtDNA のコピー数も減少傾向であった。この CS 活性の減少は、Mb の過剰発現がもたらした基底状態の酸素消費の亢進によってエネルギー基質である糖質、脂質が過剰に分解されることを防ぐための適応であると考えられる。では、呼吸鎖複合体の酵素活性が complex IV のみならず complex I から III も上昇したのはなぜか。この表現型をもたらした原因として機能不全に陥ったミトコンドリアを分解する機構の1つであるマイトファジーが関与していると考えた。ミトコンドリアによる呼吸が正常である細胞においてマイトファジーは抑制される (Okamoto, 2014)。これはマイトファジーを誘発させる仕組みの1つである PINK1-Parkin を介した経路に着目することで理解できる。PINK1 はミトコンドリアの膜電位が高いとミトコンドリアのマトリックスに取り込まれて分解される (Yamano and Youle, 2013)。この時に Parkin は細胞質に拡散し、ミトコンドリアに凝集することはないため E3-ubiquitin Ligase である Parkin が誘発するミトコンドリアタンパク質のユビキチン化は起こらず、マイトファジーも起こらない (Matsuda et al., 2010)。しかしながら、ミトコンドリア膜電位が減少すると PINK1 がミトコンドリア外膜のタンパク質トランスロカーゼである Tom に引っかかったような状態となる。その結果 Parkin をミトコンドリアに凝集させ、最終的にマイトファジーを誘発する

(Okatsu et al., 2013)。つまり、ミトコンドリアの膜電位が正常に保たれていればマイトファジーの対象とはならず、逆に膜電位に異常をきたすとそのミトコンドリアを分解するための機構が働くのである。ミトコンドリア膜電位は4つの呼吸鎖複合体がプロトン (H^+) をマトリックスから膜間腔へ汲み出す機能と ATP 合成酵素が H^+ をマトリックス側へ流入させる機能に概ね依存している。したがって、Mb の過剰発現によって Mb 量が増加したミトコンドリアでは complex IV による H^+ の汲み出しが増加し、膜電位が消失しにくい特性を得たと考えられる。つまり、機能不全として見なされるミトコンドリアの割合が減少したと考えられる。そのため、マイトファジー機構がより迅速に機能不全ミトコンドリアに動員されたのではないかと推察される。したがって、Mb の過剰発現によって機能不全の度合いが深刻なミトコンドリアが優先的に分解され、機能不全に陥っていないミトコンドリアが相対的に増加し、Mb が酵素活性を修飾しない呼吸鎖複合体の活性も上昇したのではないかと推察する。これが complex IV 以外の呼吸鎖複合体活性が上昇している原因の1つであり、mtDNA のコピー数も減少傾向であるという結果が得られた原因でないかと考えられる。

以上のように、本研究では酸素結合タンパク質である Mb が骨格筋ミトコンドリア呼吸を調節する因子の1つであることを示し、Mb が呼吸を調節する仕組みの一部を明らかにした。Mb はミトコンドリアの complex IV と相互作用し、酵素活性を上昇させることで酸素消費を亢進させていることが示された。さらに、Mb 発現が恒常的に増加することで complex IV 以外の呼吸鎖複合体活性も亢進し、CS 活性の抑制に由来して呼吸基質の供給が少ないにも関わらず酸素消費速度を亢進させることが明らかとなっ

た。したがって Mb はミトコンドリア呼吸の調節を担い、骨格筋の代謝特性を規定する重要な因子であることが示唆された。

VIII. 総括

本研究では Mb の細胞内における存在意義を再定義するために、ミトコンドリアと Mb が直接的な関連性を有しているか否かを検証し、さらに Mb 遺伝子改変モデルを用い、ミトコンドリアの呼吸調節機構における Mb の役割を検証した。

各実験から得られた主な知見は以下の通りである。

1. ミトコンドリアに局在する Mb の特徴（実験 I）

Mb が骨格筋ミトコンドリアに局在するか否かを組織学と生化学の手法を用いて検証した。その結果、Mb は細胞質だけでなくミトコンドリア内にも局在し、呼吸鎖複合体の complex IV と相互作用することが示された。また、有酸素代謝能力が優れている筋ほどミトコンドリアに局在する Mb が多いことが示された。したがって、ミトコンドリアに局在する Mb はミトコンドリアの呼吸調節に影響を及ぼすことが示唆された。

2. Mb を過剰発現させた筋管細胞においてミトコンドリアが示す表現型（実験 II）

ミトコンドリアに局在する Mb がミトコンドリアの呼吸調節機構に及ぼす影響を検証するために、Mb 安定発現細胞株を構築し、それを分化誘導して筋管状になった細胞のミトコンドリアを分析した。その結果、Mb が過剰発現した筋管では CS 活性が低下したために呼吸基質の供給が減少すると考えられるものの、酸素の消費速度は亢進した。また complex I から IV の酵素活性が亢進したものの、それぞれの複合体の量は変化してい

なかった。したがって、Mb の過剰発現は各呼吸鎖複合体の 1 つあたりの酵素活性を亢進させると考えられる。これらの結果から、筋細胞が分化する過程に起こるミトコンドリア呼吸機能の亢進は Mb 量が増加することによって促進されることが示唆された。

3. 一過性に Mb 遺伝子を改変した筋芽細胞のミトコンドリアが示す表現型 (実験 III)

ミトコンドリアに局在する Mb が分子レベルでどのような役割を果たしているかを明らかにするために、筋芽細胞を用いて一過性の Mb 遺伝子改変モデルを構築し、ミトコンドリアの呼吸機能を分析した。ミトコンドリアによる酸素消費速度は Mb 過剰発現モデルにおいて亢進した。また、Mb の発現を抑制すると酸素消費速度の亢進が相殺された。加えて、complex IV の酵素活性は Mb 過剰発現で亢進し、発現抑制によって減少した。筋管の場合と同様に各複合体の量は変化しなかったため、complex IV 1 つあたりの機能が亢進または減少したと考えられる。したがって、complex IV の酵素活性を修飾することがミトコンドリアにおける Mb 分子の役割であり、酵素活性を亢進させた結果として、ミトコンドリアの酸素消費速度の上昇をもたらすと考えられる。

以上の検証結果から、Mb は complex IV の酵素活性を亢進させ、ミトコンドリア呼吸活性を亢進させること、さらに分化過程においては complex IV 以外の酵素活性の上昇にも寄与し、ミトコンドリアの呼吸調節機構の効率化に貢献していることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会・科学研究費補助金・特別研究員奨励費（24・6321）によって遂行された。

本論文の執筆にあたり、ご指導いただきました主任指導教員の金沢大学人間科学系 増田和実 教授に心より感謝申し上げます。研究者としての礎を築く上で多大なるご指導いただきましたことに感謝致します。こちらで築いた素地を基に研究者として更に飛躍することを誓います。

同志社大学スポーツ健康科学部 高倉久志 助教、首都大学東京人間健康科学研究科 古市泰郎 助教の厚いご支援に深く感謝申し上げます。お二人の先達が有ってこそ、ここまでの成果を挙げる事が出来ました。私のロールモデルがお二人であったことが幸せでした。

立命館大学スポーツ健康科学部 橋本健志 准教授には研究の初期から様々なご助言を頂き、研究の推進に多大な貢献をして頂いたことに感謝申し上げます。また審査員として論文査読、並びに審査会において深い議論をして頂きましたことに感謝申し上げます。

名古屋工業大学大学院 花井淑晃 准教授には様々なご助言を頂きました。厳しい御指導のおかげで成長できました。立命館大学 岩中伸壮 博士とは共に実験手法の確立を実施しました。岩中博士の御協力無しに本研究の成果を得ることは出来ませんでした。博士研究員として私をご指導頂きましたお二人に厚く御礼申し上げます。

University of California, Davis Thomas Jue 教授には多くの議論を通じて、研究にご協力いただきました。多大なご指導、ご支援いただきましたことに深く感謝申し上げます。

学位論文審査員であります金沢大学人間科学系 寺沢なお子 教授、金沢

大学保健体育センター 北浦孝 准教授、電気通信大学大学院 狩野豊 教授
には、論文査読および最終審査会において貴重なご意見賜りましたことに
謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり金沢大学運動生理学研究室のメンバーから
様々なご協力をいただきました。皆様の熱心かつ忍耐強いご協力のもと、
思い切り研究に打ち込むことが出来ました。謹んで御礼申し上げます。

これまでに研究の遂行にご協力頂きながらも、こちらにお名前を記すこ
とが出来なかった多くの方々にも深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本稿の作成および大学院生活を送る中で、多くを
語らず、静かに暖かく見守って頂きました両親の山田真喜雄、山田伸子に
心から感謝を述べると共に本論文を捧げます。

References

- Antonini, E. (1965) Interrelationship between Structure and Function in Hemoglobin and Myoglobin. *Physiol. Rev.* 45: 123-170.
- Becker, T., Bottinger, L. and Pfanner, N. (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem. Sci* 37: 85-91.
- Belevich, I., Bloch, D. A., Belevich, N., Wikstrom, M. and Verkhovsky, M. I. (2007) Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 2685-2690.
- Belevich, I., Verkhovsky, M. I. and Wikstrom, M. (2006) Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase. *Nature* 440: 829-832.
- Bernardi, P. and Azzone, G. F. (1981) Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 256: 7187-7192.
- Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S. and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem* 69: 1005-1075.
- Brandt, U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem* 75: 69-92.
- Braunlin, E. A., Wahler, G. M., Swayze, C. R., Lucas, R. V. and Fox, I. J. (1986) Myoglobin facilitated oxygen diffusion maintains mechanical function of mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* 20: 627-636.
- Briquet, M., Purnelle, B., Beattie, D. S. and Goffeau, A. (1982) Reduction of respiratory-chain cytochrome b by lactate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 127: 339-342.
- Brunori, M. (2001) Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin. *Trends Biochem. Sci* 26: 21-23.
- Cecchini, G. (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem* 72: 77-109.
- Chung, Y., Mole, P. A., Sailasuta, N., Tran, T. K., Hurd, R. and Jue, T. (2005) Control of respiration and bioenergetics during muscle contraction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: C730-738.
- Colca, J. R., McDonald, W. G., Waldon, D. J., Leone, J. W., Lull, J. M., Bannow, C. A., Lund, E. T. and Mathews, W. R. (2004) Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 286: E252-260.

- De Koning, J., Hoofd, L. J. and Kreuzer, F. (1981) Oxygen transport and the function of myoglobin. Theoretical model and experiments in chicken gizzard smooth muscle. *Pflugers Arch.* 389: 211-217.
- De Marinis, E., Fiocchetti, M., Acconcia, F., Ascenzi, P. and Marino, M. (2013) Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Cell Death Dis.* 4: e508.
- Doeller, J. E. and Wittenberg, B. A. (1991) Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocytes: effect of sodium nitrite. *Am. J. Physiol.* 261: H53-62.
- Ellsworth, M. L. and Pittman, R. N. (1984) Heterogeneity of oxygen diffusion through hamster striated muscles. *Am. J. Physiol.* 246: H161-167.
- Federspiel, W. J. (1984) The effect of myoglobin concentration on muscle cell PO₂ gradients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 180: 539-543.
- Flogel, U., Godecke, A., Klotz, L. O. and Schrader, J. (2004) Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J.* 18: 1156-1158.
- Flogel, U., Merx, M. W., Godecke, A., Decking, U. K. M. and Schrader, J. (2001) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 735-740.
- Franko, A., Mayer, S., Thiel, G., Mercy, L., Arnould, T., Hornig-Do, H. T., Wiesner, R. J. and Goffart, S. (2008) CREB-1 α is recruited to and mediates upregulation of the cytochrome c promoter during enhanced mitochondrial biogenesis accompanying skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 28: 2446-2459.
- Friedrich, T. and Böttcher, B. (2004) The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1608: 1-9.
- Garry, D. J., Ordway, G. A., Lorenz, L. N., Radford, N. B., Chin, E. R., Grange, R. W., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S. (1998) Mice without myoglobin. *Nature* 395: 905-908.
- Gayeski, T. E., Connett, R. J. and Honig, C. R. (1985) Oxygen transport in rest-work transition illustrates new functions for myoglobin. *Am. J. Physiol.* 248: H914-921.
- Gayeski, T. E., Connett, R. J. and Honig, C. R. (1987) Minimum intracellular PO₂ for maximum cytochrome turnover in red muscle in situ. *Am. J. Physiol.* 252: H906-915.
- Gayeski, T. E. and Honig, C. R. (1983) Direct measurement of intracellular O₂ gradients; role of convection and myoglobin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 159: 613-621.

- Grange, R. W., Meeson, A., Chin, E., Lau, K. S., Stull, J. T., Shelton, J. M., Williams, R. S. and Garry, D. J. (2001) Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: C1487-C1494.
- Gros, G. (1978) Concentration dependence of the self-diffusion of human and *Lumbricus terrestris* hemoglobin. *Biophys. J.* 22: 453-468.
- Hashimoto, T., Hussien, R. and Brooks, G. A. (2006) Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 290: E1237-1244.
- Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H. S., Kaufer, D. and Brooks, G. A. (2008) Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS ONE* 3: e2915.
- Helling, S., Vogt, S., Rhiel, A., Ramzan, R., Wen, L., Marcus, K. and Kadenbach, B. (2008) Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Mol. Cell. Proteomics* 7: 1714-1724.
- Hendgen-Cotta, U. B., Merx, M. W., Shiva, S., Schmitz, J., Becher, S., Klare, J. P., Steinhoff, H. J., Goedecke, A., Schrader, J., Gladwin, M. T., Kelm, M. and Rassaf, T. (2008) Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 10256-10261.
- Hochachka, P. W. (1999) The metabolic implications of intracellular circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 12233-12239.
- Honig, C. R., Gayeski, T. E., Federspiel, W., Clark, A., Jr. and Clark, P. (1984) Muscle O₂ gradients from hemoglobin to cytochrome: new concepts, new complexities. *Adv. Exp. Med. Biol.* 169: 23-38.
- Johnson, E. M., Berk, D. A., Jain, R. K. and Deen, W. M. (1996) Hindered diffusion in agarose gels: test of effective medium model. *Biophys. J.* 70: 1017-1023.
- Johnson, J. L. and Rajagopalan, K. V. (1977) Tryptic cleavage of rat liver sulfite oxidase. Isolation and characterization of molybdenum and heme domains. *J. Biol. Chem.* 252: 2017-2025.
- Jurgens, K. D., Peters, T. and Gros, G. (1994) Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 3829-3833.
- Kagen, L. and Freedman, A. (1973) Embryonic synthesis of myoglobin *in vivo* estimated by radioimmunoassay. *Dev. Biol.* 31: 295-300.
- Kamga, C., Krishnamurthy, S. and Shiva, S. (2012) Myoglobin and mitochondria: a relationship bound by oxygen and nitric oxide. *Nitric Oxide* 26: 251-258.

- Kawai, H., Nishino, H., Nishida, Y., Masuda, K. and Saito, S. (1987) Localization of myoglobin in human muscle cells by immunoelectron microscopy. *Muscle Nerve* 10: 144-149.
- Kennedy, F. G. and Jones, D. P. (1986) Oxygen dependence of mitochondrial function in isolated rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 250: C374-383.
- Kunishige, M., Mitsui, T., Akaike, M., Shono, M., Kawai, H. and Saito, S. (1996) Localization and amount of myoglobin and myoglobin mRNA in ragged-red fiber of patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Muscle Nerve* 19: 175-182.
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P. and Margreiter, R. (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 1928-1939.
- Lin, P. C., Kreutzer, U. and Jue, T. (2007) Myoglobin translational diffusion in rat myocardium and its implication on intracellular oxygen transport. *J. Physiol. (Lond)*. 578: 595-603.
- Livingston, D. J., La Mar, G. N. and Brown, W. D. (1983) Myoglobin diffusion in bovine heart muscle. *Science* 220: 71-73.
- Livingston, D. J., McLachlan, S. J., La Mar, G. N. and Brown, W. D. (1985) Myoglobin: cytochrome b5 interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase. *J. Biol. Chem.* 260: 15699-15707.
- Mammen, P. P., Kanatous, S. B., Yuhanna, I. S., Shaul, P. W., Garry, M. G., Balaban, R. S. and Garry, D. J. (2003) Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H2132-2141.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y. S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N. and Tanaka, K. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189: 211-221.
- Meeson, A. P., Radford, N., Shelton, J. M., Mammen, P. P. A., DiMaio, J. M., Hutcheson, K., Kong, Y., Elterman, J., Williams, R. S. and Garry, D. J. (2001) Adaptive Mechanisms That Preserve Cardiac Function in Mice Without Myoglobin. *Circ. Res.* 88: 713-720.
- Meyer, R. A., Sweeney, H. L. and Kushmerick, M. J. (1984) A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am. J. Physiol.* 246: C365-377.
- Mihara, K. and Omura, T. (1996) Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70. *Trends Cell Biol.* 6: 104-108.
- Mishra, P. and Chan, D. C. (2014) Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15: 634-646.

- Nakatani, A. (1988) Isolation and properties of myoglobin from murine skeletal muscle. *Nihon seirigaku zasshi* 50: 112-126.
- Nemeth, P. M. and Lowry, O. H. (1984) Myoglobin levels in individual human skeletal muscle fibers of different types. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 1211-1216.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem* 66: 863-917.
- Nisimoto, Y., Takeuchi, F. and Shibata, Y. (1977) Purification and properties of a cytochrome b5-like heme protein from mitochondrial outer membranes of rat liver. *J. Biochem.* 82: 1257-1266.
- Noren, S. R. and Williams, T. M. (2000) Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 126: 181-191.
- Okamoto, K. (2014) Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J. Cell Biol.* 205: 435-445.
- Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2013) A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J. Biol. Chem.* 288: 36372-36384.
- Ordway, G. A. and Garry, D. J. (2004) Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.* 207: 3441-3446.
- Papadopoulos, S., Endeward, V., Revesz-Walker, B., Jurgens, K. D. and Gros, G. (2001) Radial and longitudinal diffusion of myoglobin in single living heart and skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 5904-5909.
- Papadopoulos, S., Jurgens, K. D. and Gros, G. (1995) Diffusion of myoglobin in skeletal muscle cells--dependence on fibre type, contraction and temperature. *Pflugers Arch.* 430: 519-525.
- Pedersen, P. L. (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Res.* 22: 190-274.
- Pfanner, N. and Meijer, M. (1997) The Tom and Tim machine. *Curr. Biol.* 7: R100-103.
- Poderoso, J. J., Peralta, J. G., Lisdero, C. L., Carreras, M. C., Radisic, M., Schopfer, F., Cadenas, E. and Boveris, A. (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am. J. Physiol.* 274: C112-119.
- Popel, A. S. (1989) Theory of oxygen transport to tissue. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17: 257-321.
- Postnikova, G. B., Tselikova, S. V. and Shekhovtsova, E. A. (2009) Myoglobin

- and mitochondria: Oxymyoglobin interacts with mitochondrial membrane during deoxygenation. *Biochemistry (Moscow)* 74: 1211-1218.
- Rassaf, T., Fogel, U., Drexhage, C., Hendgen-Cotta, U., Kelm, M. and Schrader, J. (2007) Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ. Res.* 100: 1749-1754.
- Riveros-Moreno, V. and Wittenberg, J. B. (1972) The self-diffusion coefficients of myoglobin and hemoglobin in concentrated solutions. *J. Biol. Chem.* 247: 895-901.
- Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J. P. and Letellier, T. (1999) Threshold effect and tissue specificity - Implication for mitochondrial cytopathies. *J. Biol. Chem.* 274: 33426-33432.
- Schafer, E., Dencher, N. A., Vonck, J. and Parcej, D. N. (2007) Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc).* 46: 12579-12585.
- Schmidt, O., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 655-667.
- Shih, L., Chung, Y., Sriram, R. and Jue, T. (2014) Palmitate interaction with physiological states of myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 656-666.
- Shiva, S., Brookes, P. S., Patel, R. P., Anderson, P. G. and Darley-Usmar, V. M. (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 7212-7217.
- Singh, S., Canseco, D. C., Manda, S. M., Shelton, J. M., Chirumamilla, R. R., Goetsch, S. C., Ye, Q., Gerard, R. D., Schneider, J. W., Richardson, J. A., Rothmel, B. A. and Mammen, P. P. (2014) Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: E129-138.
- Spatz, L. and Strittmatter, P. (1971) A form of cytochrome b5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68: 1042-1046.
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L. and Angelini, C. (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* 7: 1235-1246.
- Svedruzic, Z. M. and Spivey, H. O. (2006) Interaction between mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase from heart and muscle. *Proteins* 63: 501-511.
- Takakura, H., Masuda, K., Hashimoto, T., Iwase, S. and Jue, T. (2010) Quantification of myoglobin deoxygenation and intracellular partial

- pressure of O₂ during muscle contraction during haemoglobin-free medium perfusion. *Exp. Physiol.* 95: 630-640.
- Tamura, M., Oshino, N., Chance, B. and Silver, I. A. (1978) Optical measurements of intracellular oxygen concentration of rat heart *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 8-22.
- Theorell, H. (1934) Kristallinisches myoglobin. *Biochem. Z.* 268: 73-82.
- van Herpen, N. A. and Schrauwen-Hinderling, V. B. (2008) Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol. Behav.* 94: 231-241.
- Wang, D., Kreutzer, U., Chung, Y. and Jue, T. (1997) Myoglobin and hemoglobin rotational diffusion in the cell. *Biophys. J.* 73: 2764-2770.
- Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y. J., Sepuri, N. B., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., Moh, A., Moghaddas, S., Chen, Q., Bobbili, S., Cichy, J., Dulak, J., Baker, D. P., Wolfman, A., Stuehr, D., Hassan, M. O., Fu, X. Y., Avadhani, N., Drake, J. I., Fawcett, P., Lesnefsky, E. J. and Lerner, A. C. (2009) Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 323: 793-797.
- Wiley, S. E., Murphy, A. N., Ross, S. A., van der Geer, P. and Dixon, J. E. (2007) MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 5318-5323.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1985) Oxygen pressure gradients in isolated cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 6548-6554.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1987) Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 7503-7507.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1989) Transport of oxygen in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 857-878.
- Wittenberg, J. B. (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol. Rev.* 50: 559-636.
- Wittenberg, J. B. (2003) Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* 206: 2011-2020.
- Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A. (1975) A hemeprotein implicated in oxygen transport into the eye of fish. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 51: 425-429.
- Wu, C. S., Duffy, P. and Brown, W. D. (1972) Interaction of myoglobin and cytochrome C. *J. Biol. Chem.* 247: 1899-1903.
- Xiong, P., Nocek, J. M., Vura-Weis, J., Lockard, J. V., Wasielewski, M. R. and Hoffman, B. M. (2010) Faster interprotein electron transfer in a

[myoglobin, b] complex with a redesigned interface. Science 330: 1075-1078.

Yamano, K. and Youle, R. J. (2013) PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. Autophagy 9: 1758-1769.

Yamazaki, I., Yokota, K. N. and Shikama, K. (1964) Preparation of Crystalline Oxymyoglobin from Horse Heart. J. Biol. Chem. 239: 4151-4153.

学術雑誌以外の情報源

siDirect: <http://sidirect2.rnai.jp/>

TargetP 1.1 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

Myoglobin 3D picture:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myoglobin.png#mediaviewer/File:Myoglobin.png>