

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300237

研究課題名(和文) 筋収縮時のミトコンドリア活性化に対する酸素輸送担体の分子相互作用の解明

研究課題名(英文) Interaction of oxygen carrier protein with mitochondria activity during muscle contraction

研究代表者

増田 和実 (Masuda, Kazumi)

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：50323283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨格筋内の酸素貯蔵体として知られているミオグロビン(Mb)とミトコンドリアとの直接的相互作用について、個体・細胞レベルの生理学・細胞生物学的解析によってその機序を明らかにしようとした。実験の結果、Mbがミトコンドリア近傍、およびミトコンドリア内にも存在していた。さらに、ミトコンドリア内のMbが呼吸鎖複合体に相互作用している可能性や、Mbの多寡がミトコンドリアの酸素消費率が上昇する可能性を示唆した。本研究の結果は筋細胞内のMbがミトコンドリアの呼吸機能に直接的に影響することを示唆すると共に、Mbの生理機能についての新たな展開を生む契機となった。

研究成果の概要(英文)：Cellular respiration is influenced by a wide range of mechanisms including the response of the cardiovascular and metabolic systems to meet the changing energy demands in muscle. The present focused on myoglobin (Mb), an important cellular O₂ binding protein that is expressed in skeletal and cardiac muscle cells, and set a hypothesis that Mb will have a direct interaction with the mitochondrial respiration. The present study using rodent hindlimb muscles and cultured myoblast (L6), obtained evidences that Mb directly co-localized on mitochondria within a myocytes. Unexpectedly, Mb presences in mitochondria. The mitochondrial Mb can interact with complex IV to facilitated O₂ consumption in mitochondria. Further investigation must be necessary to clarify the target proteins of Mb within mitochondria to obtain the new physiological functions of the mitochondrial Mb in myocytes.

研究分野：スポーツ生理学・生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，スポーツ科学

キーワード：筋細胞 運動 代謝 ミトコンドリア ミオグロビン 相互作用

1. 研究開始当初の背景

健康の維持・増進のためには、継続的な運動による骨格筋の基質酸化能力の亢進が重要であり、それには筋細胞内への円滑な酸素 (O_2) 供給が必要である。その O_2 供給能力の規定因子には、血流の他 (Poole et al. 2008)、筋細胞内の O_2 拡散性が含まれている (Chung et al. 2005)。筋形質には O_2 結合タンパク質であるミオグロビン (Mb) が存在し、血管からミトコンドリアへの O_2 の輸送を仲介するとともに、持久的トレーニングへの適応 (筋の有酸素代謝能力の向上) にも重要な貢献を果たすものと考えられてきたが、そのメカニズムの詳細は不明なままである。

最近、我々は独自に開発したラット下肢骨格筋の組織灌流システムを用いて筋収縮中の Mb の O_2 結合・解離動態を捉えることに成功し、筋形質の酸素結合タンパク質である Mb が、筋活動中のミトコンドリア呼吸活性の上昇に対して即時的に酸素を供給する機能を持つこと、また、トレーニング後の筋でそれがさらに顕著となることを示唆する知見を得た (Masuda et al. 2010, Takakura et al. 2010)。これらの知見から『Mb は単なる O_2 貯蔵体ではない』こと、ならびに『Mb からの O_2 解離は、旧来から指摘されていた組織の低酸素化ではなく、ミトコンドリアの O_2 需要に一致するように機能調節されている』ことが示唆された。我々はこのメカニズムを Mb パラドックスとして称して、筋細胞内での Mb タンパク質の不均衡分布を通じた効率的な O_2 供給機構やミトコンドリアとの直接的な相互作用による細胞呼吸機能の調節機序の存在を仮定した (新規パラダイム)。過去の知見を踏まえれば、ミトコンドリアの基質酸化とそれに対する Mb との機能上の相互関係は、両者間の分子レベルでの何らかの相互作用の存在を示唆するものであるが、これまで全く想定されておらず、検証がなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋の基質酸化能力の獲得において、Mb を介したミトコンドリアへの酸素供給システムに着目し、Mb とミトコンドリアとの間に存在する分子レベルの相互作用とその機序を明らかにするために、個体・細胞レベルの生理学・細胞生物学的解析によって検証することである。主な検証内容は以下のような項目である。

骨格筋細胞において、Mb の細胞内局在を検証し、ミトコンドリアへの共局在の有無を明らかにする。

Mb タンパク質とミトコンドリアの共局在に見られる分子レベルの相互作用メカニズムについて、得に、タンパク質-タンパク質の相互作用の観点から検討を行い、Mb の標的となるタンパク質を同定する。

Mb の過剰発現モデルを用いて、筋の基質酸化能の増減と、Mb やミトコンドリアの発現調節、およびそれらの調節因子につい

て検証する。

3. 研究の方法

ミトコンドリアと Mb の共局在性を検証するために、摘出した下肢筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋深層部、腓腹筋表層部) を用いて、遠心分離法によって得られたミトコンドリア画分からウェスタンブロッティング法 (WB) によって Mb の検出を試みた。同時にミトコンドリアマーカーとして VDAC-I、細胞質マーカーとして α -actin の検出を行った。また、骨格筋組織横断切片を作成し、免疫蛍光抗体法によって Mb と VDAC-I との多重染色を行った。加えて、共免疫沈降法によって Mb の免疫沈降物複合体に呼吸鎖関連タンパク質が含まれるか否かについて検討した。さらに、Mb の発現量の多寡がミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす影響を検証するために、myc-Mb を挿入した pcDNA3 発現ベクターを骨格筋培養細胞株 (L6) に導入した安定発現株の樹立を図った。この遺伝子導入した L6 細胞からミトコンドリアを単離し、Mb やミトコンドリアタンパク質の検出を行い、ミトコンドリアの酸素消費率を検証した。さらに、myc 抗体で myc-Mb を精製し、その中に含まれるタンパク質を質量分析によって検証した。

4. 研究成果

ラットの下肢骨格筋 (筋線維組成の異なる骨格筋) を用いて免疫組織画像の観察を行った。Mb と VDAC-I (ミトコンドリア外膜のタンパク質) の Marge 画像からは Mb と VDAC-I が筋細胞内で共局在していることを示唆するように、Mb が発現している筋線維では黄色を呈した (図 1)。また、縦断面における観察では、ミトコンドリアが多い I-band 付近に

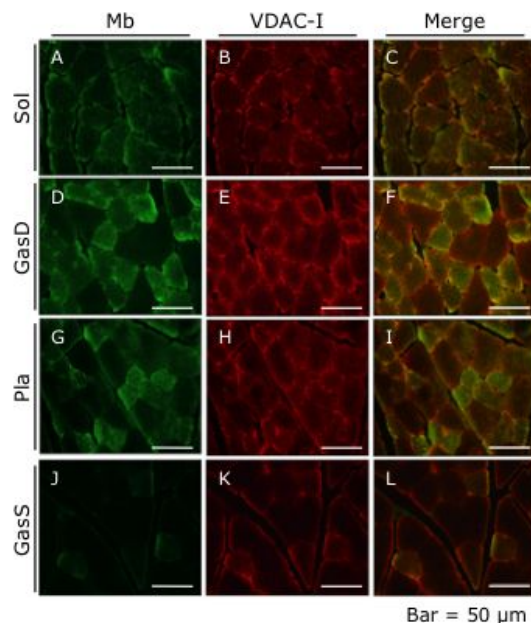


図 1. 筋線維における Mb と VDAC-I の共局在性 (横断像, Sol: ヒラメ筋, GasD: 腓腹筋深層部, GasS: 腓腹筋表層部, Pla: 足底筋)

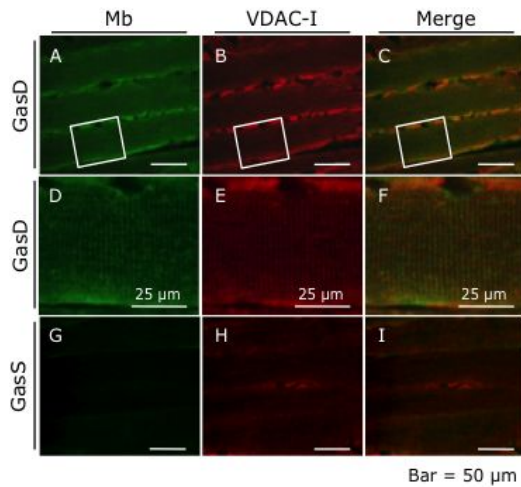


図2. 筋線維におけるMbとVDAC-Iの共局在性(縦断像, Sol: ヒラメ筋, GasD: 腓腹筋深層部, GasS: 腓腹筋表層部, Pla: 足底筋)

Mbの蛍光シグナルが観察され、Mbがミトコンドリアの近傍に存在していることを示唆した。

さらにMbがミトコンドリアのどの付近に分布しているのかを検証するために電子顕微鏡観察を実施したところ、Mbがミトコンドリアの内部にも存在していることが観察された(図3)。この発見は本研究が最初である。

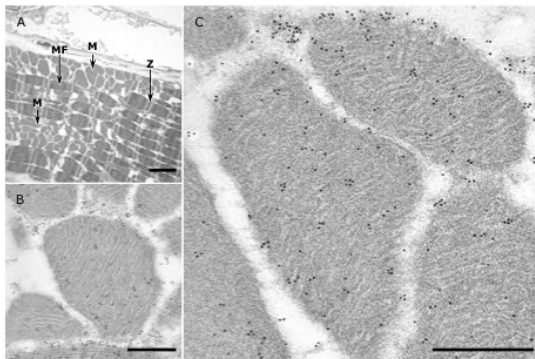


図3. 電子顕微鏡観察におけるミトコンドリアの拡大画像。ミトコンドリアに重なる黒ドットはMb抗体に対する金コロイドのシグナル。

こうした組織学的観察によって確認したMbとミトコンドリアの共局在をWestern Blotting(図4)や共免疫沈降法(Co-IP)によってさらに検証した(図5)。筋組織のHomogenateからミトコンドリアを抽出した画分からMbが検出されたことは組織学的観察の事実を支持した。また、ミトコンドリア画分におけるCo-IPからはMbとミトコンドリアの呼吸鎖複合体のサブユニットであるCOX-IVが検出された。このことはミトコンドリアに内在しているMbの相互作用候補として呼吸鎖タンパク質(COX-IV)が含まれることが示唆された。

次に、Mbとミトコンドリアの相互作用によるミトコンドリアの呼吸機能の変化を検証

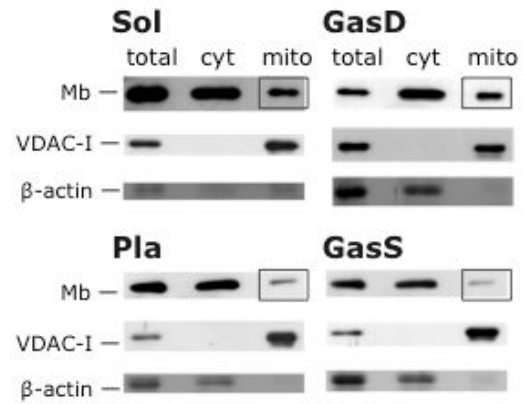


図4. 骨格筋のHomogenateから得られた細胞質画分とミトコンドリア画分からMbを検出(Sol: ヒラメ筋, GasD: 腓腹筋深層部, GasS: 腓腹筋表層部, Pla: 足底筋)。

しようとした。それに先立ち、ミトコンドリアの呼吸機能評価方法(酸素消費率)の確立を図った。条件検討を進める中で、反応溶液の中に基質にカルニチンが添加されるとstate 3の酸素消費率が上昇することを確認した(図6)。このことはミトコンドリア単離の際のhomogenateや段階遠心の際に脂肪酸による悪影響をカルニチンが緩和している可能性が推察された。さらに、ミトコンドリアの網状構造(細胞内での構造)を維持させながら酸素消費率を測定する技術として、筋細胞の膜透過処理を施した筋サンプルの酸素消費率の測定方法についても確立を図った。最終的に設定した条件では、ミトコンドリアの多寡(mtDNAによって代表)を反映した酸素消費率の測定値が得られた。

このような酸素消費率の測定技術を用いてMbの多寡によるミトコンドリア呼吸機能への影響を検証した。mycタグで標識されたMbを発現させる発現ベクターを導入したL6細胞における酸素消費率を比較した(図8)。

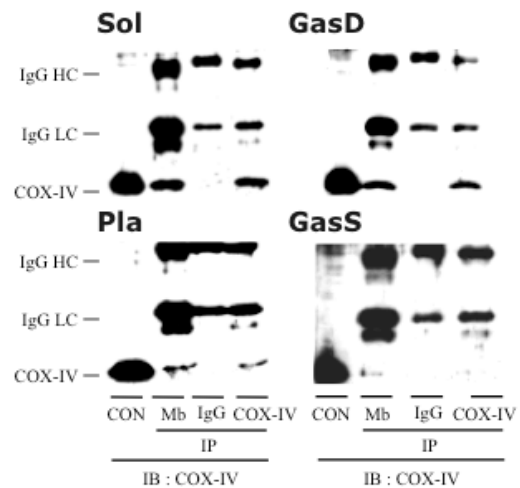


図5. 骨格筋のHomogenateから得られたミトコンドリア画分を用いてCo-IPによるMb検出(Sol: ヒラメ筋, GasD: 腓腹筋深層部, GasS: 腓腹筋表層部, Pla: 足底筋)。

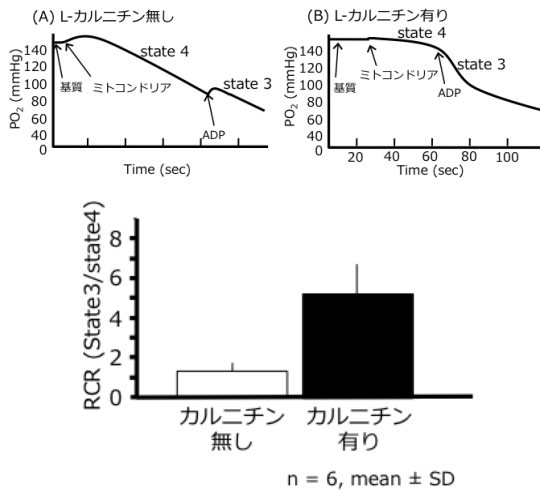


図 6. 腓腹筋深層部から単離したミトコンドリアの酸素消費速度に対するカルニチン添加の影響。

Mb の過剰発現細胞株の酸素消費率は、myc-Mb の発現量に依存的に高値を示す傾向が認められた（とりわけ TMPD 条件にて）。このような結果はラット骨格筋を用いた分析によっても同様の結果を得た。つまり、Mb の多寡によってミトコンドリアの呼吸活性が亢進することが示唆された。

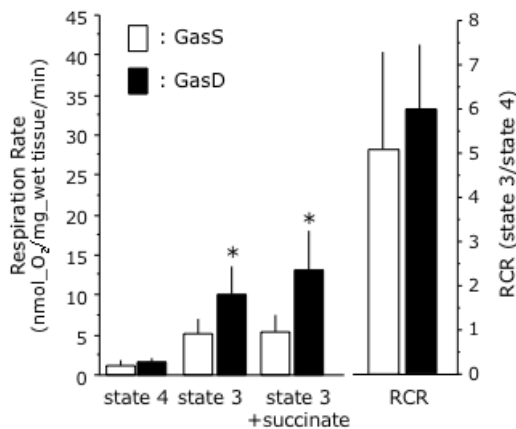


図 7. 膜透過処理した筋線維におけるミトコンドリア酸素消費率の比較 (GasD: 腓腹筋深層部, GasS: 腓腹筋表層部)。

本研究では Mb の相互作用するタンパク質を検証するために、myc-Mb の導入細胞にてプロテオーム解析を実施した。Myc 抗体によって免疫沈降したサンプルの質量解析からは、ミトコンドリアタンパク質や細胞骨格タンパク質、シャペロンタンパク質などが検出された。しかしながら、バイトタンパク質の回収量や解析結果の再現性に問題が残ったため、細胞株やタグの変更を含めた再検証が必要である。

以上の結果から、Mb は筋細胞内の浮遊タンパク質であるとともに、特異的にミトコンドリアの近傍や内部に局在していることが明らかとなった。また、筋細胞内の Mb 量の多寡はミトコンドリアの呼吸機能を亢進させ

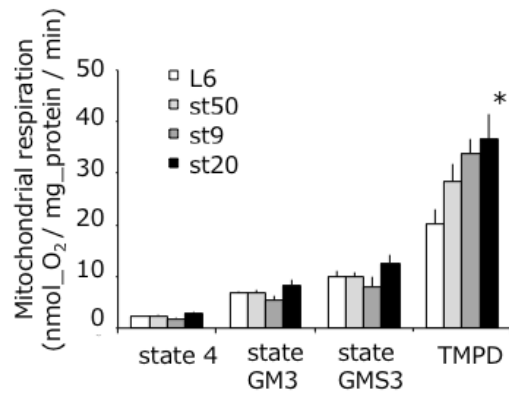


図 8. Myc-Mb の発現ベクターを導入し、安定発現株として樹立した L6 細胞株におけるミトコンドリア酸素消費率の比較。

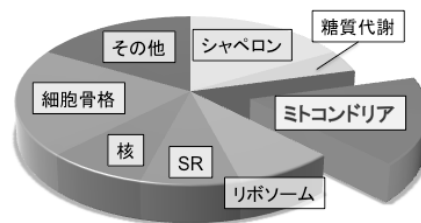


図 9. Myc-Mb の安定発現株 (L6) の質量分析結果 (1 例)。

る可能性が示唆された。なお、Mb が相互作用の標的とするタンパク質の同定については更なる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 6 件)

1. 澤本加那子, 山田達也, 蔭地野稔, 石澤里枝, Hamidie DR Ronald, 新田咲, 増田和実: 膜透過処理による骨格筋ミトコンドリア呼吸活性の定量化と異なる筋線維タイプにおける酸素消費速度の比較. 北陸体育学会紀要 50: 7-18, 2014.
2. Masuda K, Yamada T and Jue T: Reply to Pancheva, Panchev, and Pancheva [Letter to the editor]. J Appl Physiol 115: 151, 2013.
3. Masuda K, Yamada T, Ishizawa R and Takakura H: Role of myoglobin in regulating respiration during muscle contraction (Review). J Physical Fitness Sports Med 2: 9-16, 2013.
4. Yamada T, Furuichi Y, Takakura H, Hashimoto T, Hanai Y, Jue T and Masuda K: Interaction between myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscle. J Appl Physiol 114: 490-497, 2013.
5. 増田和実: 末梢循環と筋細胞(Review).

体育の科学 62: 273-278, 2012.

6. Takakura H, Yamada T, Furuichi Y, Iwanaka N and Masuda K: Effects of muscle temperature on muscle oxygenation kinetics during contraction (in English). 北陸体育学会紀要 47: 11-19, 2011.

[学会発表](計 24 件)

1. 番場 瞳, 山田達也, 石澤里枝, Hamidie DR Ronald, 増田和実: 持久性トレーニング期間中のミトコンドリアの融合/分裂関連タンパク質の量的変化. 平成 25 年度北陸体育学会大会, 平成 26 年 3 月 23 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
2. 石澤里枝, 山田達也, Hamidie DR Ronald, 新田 咲, 増田和実: 中鎖脂肪酸によるミトコンドリア生合成の分子機構. 第 68 回日本体力医学会大会, 平成 25 年 9 月 21 日, 日本教育会館, 東京.
3. 高倉久志, 増田 慎也, 加藤久詞, 田中剛貴, 岩中伸壮, 井澤鉄也, 増田和実: 持久的トレーニングが筋細胞内酸素運搬タンパクを増加させる分子機序の解明. 第 68 回日本体力医学会大会, 平成 25 年 9 月 21 日, 日本教育会館, 東京.
4. 増田和実: 骨格筋ミトコンドリアへの酸素供給に対するミオグロビンの貢献の可能性. 第 21 回日本運動生理学会大会, 平成 25 年 7 月 27 日, 東京国際大学, 埼玉.
5. Ishizawa R, Yamada T, Nitta S, Masuda K: Effects of medium-chain fatty acids on PGC-1 and PPAR protein in L6 muscle cells. American College of Sports Medicine 60th Annual Meeting, Indianapolis, IN, USA, May 30 2013.
6. Yamada T, Iwanaka N, Hashimoto T, Jue T, Masuda K: Interaction of mitochondrial proteins with myoglobin in C2C12, mouse skeletal muscle cells. American College of Sports Medicine 60th Annual Meeting, Indianapolis, IN, USA, May 30 2013.
7. 蔭地野稔, 山田達也, 石澤里枝, 新田 咲, 増田和実: 発育期における骨格筋ミオグロビンの生合成とミトコンドリアへの相互作用. 平成 24 年度北陸体育学会大会(平成 25 年 3 月 24 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川).
8. 澤本加那子, 蔭地野稔, 新田 咲, 石澤里枝, 山田達也, 増田和実: 骨格筋におけるミオグロビンがミトコンドリア呼吸活性に及ぼす影響. 平成 24 年度北陸体育学会大会(平成 25 年 3 月 24 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川).
9. 高倉久志, 蔭地野稔, 山田達也, 増田和実: 骨格筋ミトコンドリア呼吸能力に対するミオグロビンの空間的・生理学的な関連性. 第 67 回日本体力医学会大会(平成 24 年 9 月 14 日, 長良川国際会議場, 岐阜).
10. 山田達也, 岩中伸壮, 橋本健志, 早野俊哉, 増田和実: 筋細胞内におけるミトコンドリアと酸素結合タンパクの共局在. 第 67 回日本体力医学会大会(平成 24 年 9 月 14 日, 長良川国際会議場, 岐阜).
11. Takakura H, Yamada T, Furuichi Y, Ojino M, Iwanaka N, Jue T, Masuda K: Effects of endurance training and immobilization on the localization of myoglobin in skeletal muscle. American College of Sports Medicine 59th Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, May 29 2012.
12. Yamada T, Iwanaka N, Furuichi Y, Kato Y, Hashimoto T, Jue T, Masuda K: Interaction of mitochondria and oxygen binding protein in L6, rat skeletal muscle cell line. American College of Sports Medicine 59th Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, May 29 2012.
13. 奥星也, 古市泰郎, 蔭地野稔, 石澤里枝, 岩中伸壮, 増田和実: 骨格筋細胞の有酸素性代謝関連タンパク質発現に対する脂肪酸添加の影響. 平成 23 年度北陸体育学会大会, 平成 24 年 3 月 25 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
14. 山田達也, 岩中伸壮, 古市泰郎, 高倉久志, 蔭地野稔, 石澤里枝, 増田和実: 骨格筋ミトコンドリアと筋特異的タンパク質の相互作用. 平成 23 年度北陸体育学会大会, 平成 24 年 3 月 25 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
15. 蔭地野稔, 高倉久志, 山田達也, 岩中伸壮, 岩瀬敏, 増田和実: 低酸素時における筋酸素摂取量と細胞内外酸素濃度較差との関連性について. 第 18 回医用近赤外線分光法研究会, 平成 23 年 10 月 22 日, 長良川国際会議場, 岐阜.
16. 増田和実: NIRS を用いた筋細胞内酸素ダイナミクスの評価. (Workshop: 体力医学分野での近赤外分光装置の応用, オーガナイザー: 三浦哉, 増田和実) 第 66 回日本体力医学会大会, 平成 23 年 9 月 16 日, 海峡メッセ下関, 山口.
17. 高倉久志, 古市泰郎, 山田達也, 蔭地野稔, 岩中伸壮, 岩瀬敏, 増田和実: 身体活動水準の変化がミオグロビンとミトコンドリアの共局在性に及ぼす影響について. 第 66 回日本体力医学会大会, 平成 23 年 9 月 16 日, 海峡メッセ下関, 山口.
18. 蔭地野稔, 高倉久志, 増田和実: 低酸素環境下の筋酸素摂取応答に対するミオグロビン結合酸素の貢献. 第 19 回日

本運動生理学会大会, 2011年8月25日, 徳島大学, 徳島.

19. 山田達也, 古市泰郎, 高倉久志, 蔭地野稔, 増田和実: Mb 機能阻害がミトコンドリアとの相互作用に及ぼす影響. 第19回日本運動生理学会大会, 2011年8月25日, 徳島大学, 徳島.
20. Masuda K, Yamada T, Furuichi Y, Takakura H, Hashimoto T, Hanai Y, Jue T: Interaction of myoglobin with mitochondria in skeletal muscles. European College of Sport Science 16th Annual Congress, Liverpool, UK, July 6 2011.
21. Takakura H, Yamada T, Furuichi Y, Ojino M, Iwase S, Jue T, Masuda K: Effects of endurance training and immobilization on intracellular oxygen dynamics during muscle contraction. European College of Sport Science 16th Annual Congress, Liverpool, UK, July 6 2011.
22. Ojino M, Takakura H, Jue T, Iwase S and Masuda K: Muscle oxygen consumption is regulated by oxygen gradient during contraction with hypoxic perfusion. American College of Sports Medicine 58th Annual Meeting, Denver, CO, USA, June 1 2011.
23. Takakura H, Yamada T, Furuichi Y, Ojino M, Iwanaka N, Iwase S, Jue T and Masuda K: Effect of endurance training on the O₂ release rate and localization of myoglobin. American College of Sports Medicine 58th Annual Meeting, Denver, CO, USA, June 1 2011.
24. Yamada T, Furuichi Y, Takakura H, Hashimoto T, Hanai Y, Jue T and Masuda K: Interaction of mitochondria and oxygen binding protein in skeletal muscles. American College of Sports Medicine 58th Annual Meeting, Denver, CO, USA, June 1 2011.

〔図書〕(計3件)

1. Masuda K: Intracellular oxygen dynamics observed by NIRS during skeletal muscle contraction. In Application of Near Infrared Spectroscopy in Biomedicine, (Series: Handbook of Modern Biophysics, Vol. 4, Jue T & Masuda K Eds), Springer, New York, 2013.
2. 増田和実: エネルギーを決める要素. In スポーツ・運動生理学概論(山地啓司, 大築立志, 田中宏暁 編著), pp. 106-119, (株)明和出版, 東京, 2011.
3. 高倉久志, 増田和実: ミトコンドリアとミオグロビン. In 身体運動と呼吸・循環機能(宮村実晴 編集), pp. 162-167,

(株)真興交易, 東京, 2012.

〔その他〕

ホームページ等
金沢大学運動生理学研究室 Website
<http://www.ed.kanazawa-u.ac.jp/~masuda/index.html>

受賞等

1. 北陸体育学会優秀研究奨励賞, 受賞演題: 澤本加那子, 蔭地野稔, 新田咲, 石澤里枝, 山田達也, 増田和実: 骨格筋におけるミオグロビンがミトコンドリア呼吸活性に及ぼす影響. 平成24年度北陸体育学会大会, 平成25年3月
2. 北陸体育学会優秀研究奨励賞, 受賞演題: 蔭地野稔, 高倉久志, 古市泰郎, 山田達也, 岩中伸壮, 増田和実: L-カルニチンを用いた骨格筋ミトコンドリア呼吸活性の測定. 平成23年度北陸体育学会大会, 平成24年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 和実 (MASUDA KAZUMI)
金沢大学・人間科学系・教授
研究者番号: 50323283

(2) 連携研究者

高倉 久志 (TAKAKURA HISASHI)
同志社大学・スポーツ健康科学部・助教
研究者番号: 20631914

岩中 伸壮 (IWANAKA NOBUMASA)
立命館大学・グローバルイノベーション研究機構・研究員(博士研究員)
研究者番号: 80584002

橋本 健志 (HASHIMOTO TAKESHI)
立命館大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号: 70511608

早野 俊哉 (HAYANO TOSHIYA)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号: 90332303

花井 淑晃 (HANAI YOSHITERU)
名古屋工業大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 50360730

加藤 将夫 (KATO YUKIO)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 30251440