

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12666

研究課題名(和文) 基質による骨格筋ミトコンドリア生合成の新たな分子機序の解明と呼吸機能評価の確立

研究課題名(英文) New mechanism of mitochondrial biogenesis mediated by nutritional substrate in skeletal muscle

研究代表者

増田 和実 (Masuda, Kazumi)

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：50323283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は基質(ポリフェノール)によってミトコンドリアの生合成が誘発されること、とりわけ、運動が引き起こす効果を増幅させることを発見した。この事象はポリフェノール依存的に活性化するシグナル経路の存在を推測させるものの、体系的な研究が進んでいない。本研究では、運動トレーニングやクルクミン投与によって生じる骨格筋のミトコンドリア生合成の分子機序とミトコンドリアの呼吸機能を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、継続的な運動トレーニングはそれ自体がミトコンドリア生合成を促進する刺激ではあるが、クルクミン投与によっても運動とは別にミトコンドリア生合成を上昇させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial biogenesis in response to exercise is reliant on adaptive changes through potentially key signal for activating mitochondrial biogenesis (eg. activation of SIRT1, AMPK and PGC-1a). Polyphenol curcumin is a natural antioxidant exhibiting a variety of pharmacological activities and therapeutic properties. However, it remains unknown the effect of curcumin and underlying mechanism on skeletal muscle for regulation of mitochondrial biogenesis. The purpose of the present study was to examine the effects of endurance training (eTR) and curcumin treatment on mitochondrial biogenesis and to identify some of key cascade along the cell signaling. The experimental results suggested that that curcumin treatment with eTR regulated mitochondria biogenesis in skeletal muscle through SIRT1 and AMPK-mediated signaling pathway.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：筋細胞 代謝 ミトコンドリア 基質 シグナル

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酸化能力の亢進が重要である。その中で、ミトコンドリアは酸化リン酸化によって生体に必要な ATP を産生し、エネルギー代謝の要として機能する。我々はこれまでにミトコンドリアの生合成に関わる因子(薬剤や基質)とシグナル経路について検証し、基質(ポリフェノール)によってミトコンドリアの生合成が誘発されること、とりわけ、運動が引き起こす効果を増幅させることを発見した。つまり、この事象はポリフェノールの量依存的に活性化するシグナルカスケードの存在を推測させるものの、そのシグナルカスケードの全容解明や増えたミトコンドリアの機能評価を含めた体系的な研究が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動トレーニングやポリフェノール添加によって生じる骨格筋のミトコンドリア生合成の分子機序とミトコンドリアの呼吸機能を明らかにすることである。なお、本研究で対象にしたポリフェノールは高い抗酸化作用を持つとされるクルクミン(CurL)である。

3. 研究の方法

(1) 被験動物

8週齢の雄性ラット(Wistar系)を対象にした。CurLはDMSOに溶解し、腹腔内へ注入した(50-100 mg/kg-BW/day)。CurL投与期間を4週間とし、最終投与から2時間後に骨格筋や心筋、肝臓の各組織を摘出した。

運動トレーニング(eTR)はCurL投与と同期間の4週間とした。1回のトレーニング量は体重の2%相当の重りを尾部に付け、30分の水泳運動を5分の休息を挟みながら4回繰り返した(2時間/日)。さらにCurLとeTRの併用条件では、日々のeTRの2時間前に腹腔内へCurLを注入してeTRを実施した。

(2) ミトコンドリア DNA (mtDNA)

mtDNAのコピー数はRT-PCRシステム(7300 RT PCR system, Applied Biosystems)を用いて定量した。CT法に基づき、核DNA(nDNA)に対するmtDNAとして表現した。

(3) タンパク質の検出

組織中のタンパク質はWestern Blot法によって検出し、得られたバンドのシグナル強度を算出した。

(4) ミトコンドリアの酸素消費測定

ミトコンドリア呼吸は酸素濃度モニタリングチャンバー内に酸素電極を挿入し、チャンバー内の酸素濃度を継続的に計測することによって酸素消費速度として算出した。

(5) その他の生化学的分析

ミトコンドリアの量や活性の指標として、Sreer(1969)の方法に基づいてクエン酸合成酵素活性(CS活性)を測定した。細胞内cAMP濃度の測定にはcAMP Direct Immunoassay Kit (Abcam, ab65355)を用い、NAD⁺/NADHの算出には、NAD⁺/NADH assay kit (Biovision, CA, USA)を用いた。

4. 研究成果

mtDNAコピー数はCurL投与量の多寡に応じて増加した(図1)。また、mtDNAに対するeTRの効果も顕著な増加を示した。ただし、eTRとCurLの交互作用は認められなかった。つまり、eTRとCurLの効果は独立的であり、これら2つの条件ではそれぞれの効果が付加的に現れることが推察された。

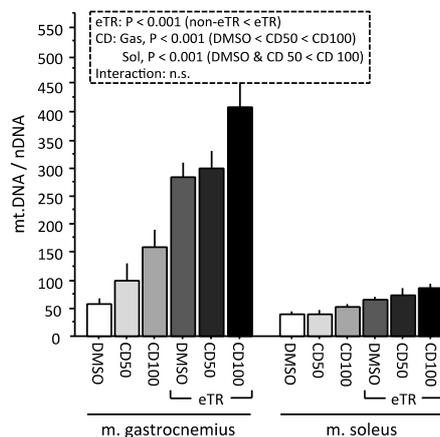


図1. CurLとeTRがミトコンドリアDNAのコピー数に及ぼす影響. CD50: Curcumin 50 mg/kg-BW/day, CD100: Curcumin 100 mg/kg-BW/day, mean ± SD (n = 6)

細胞内の代謝性酸化還元比を表す指標であるNDA⁺/NADHはCurL投与とeTRのそれぞれによって上昇した。2つの同時処方では相加的な上昇が得られた。また、NDA⁺/NADHの上昇がトリガーになるSirt1の(核内)量も、NDA⁺/NADHの変化と同様の傾向を示した(図2)。これらの結果はCurLがSirt1経路の活性化に関わることを強く示唆している。

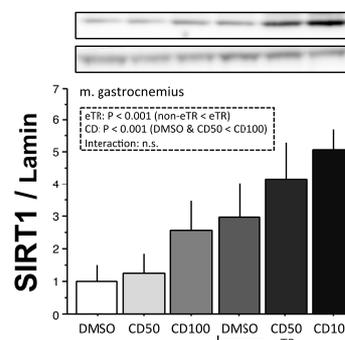


図2. CurLとeTRが核内SIRT1発現量に及ぼす影響。

さらに、CurL投与によってSirt1の下流にあるPGC-1αの脱アセチル化も生じていた(図3)。PGC-1αの脱アセチル化はPGC-1αが細胞質

から核内移行に必要な反応とされており、SIRT1 がそれを仲介することも示唆されていることから、本研究の CurL による PGC-1 α 脱アセチル化は合理的であると考えられる。

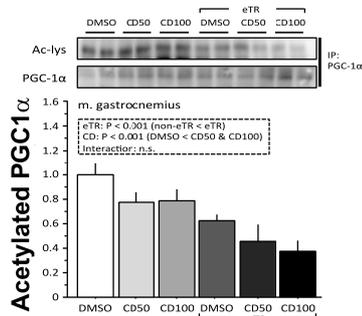


図 3. CurL と eTR が PGC-1 α の脱アセチル化に及ぼす影響。

CurL が細胞内シグナルのどこに作用しているのかについて、上流因子について検証した。CurL 投与によって細胞内 cAMP 濃度が上昇することが明らかになった (図 4)。この上昇が PDE (phosphodiesterases) の阻害薬である Rolipram を投与した時と同様の動態を示したことから、CurL が PDE に作用して細胞内 cAMP を上昇させ、その下流のシグナルタンパク質を動かしている可能性が推察された。

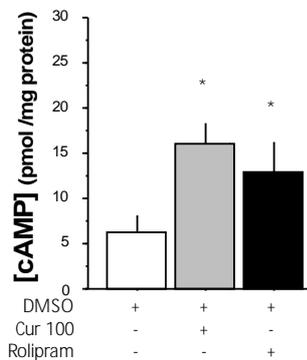


図 4. CurL と eTR が細胞内 cAMP 濃度に及ぼす影響。

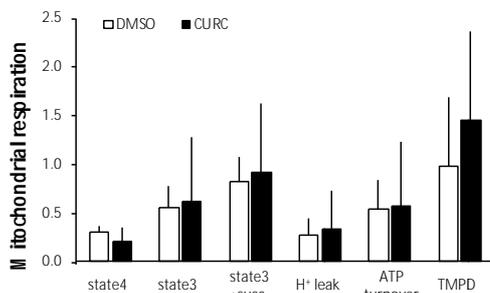


図 5. CurL がミトコンドリア呼吸機能に及ぼす影響。

なお、筋組織から単離した筋線維を膜透過処理して呼吸機能評価を行ったところ、CurL 投与による変化は認められなかった (図 5)。したがって、CurL によって増加したミトコンドリアの呼吸機能は intact な状態である可能性がある。

以上の検証結果を総括すると、CurL の投与

は AMPK や SIRT1 に関わる経路に働きかけながら核内のミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現を誘導すること、また、こうした CurL による積極的なミトコンドリア合成の機序は、運動トレーニングの効果に付加的に生じるものであることが示唆された。本研究の成果は CurL を例にしたエルゴジェニックな分子基盤を提唱するものである。

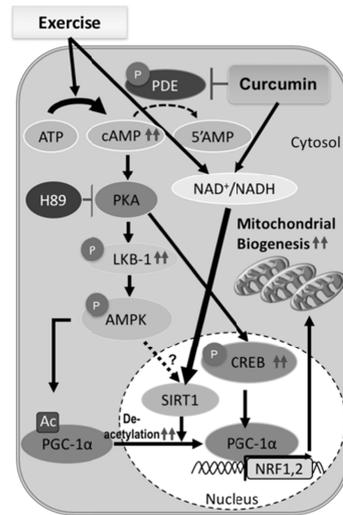


図 6. クルクミン (CurL) が筋細胞のミトコンドリア合成を引き起こす機序の概要。運動の効果は CurL が加わることで相対的に増強される可能性がある。

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 5 件)

(全て査読有)

- Masuda K, Jue T and Hamidie DRR: Mitochondrial biogenesis induced by exercise and nutrients: implication for performance and health benefits. Indonesian J Sci Tech 2: 99-107, 2017.
- 町野綾香, 石澤里枝, 芝口翼, 増田和実: 運動を模擬した薬理刺激による骨格筋培養細胞のミトコンドリア合成とミオグロビンの発現変化. 北陸体育学会紀要 53: 11-22, 2017.
- Hamidie DRR, Yamada T, Ishizawa R, Saito Y and Masuda K: Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels. Metabolism 64: 1334-1347, 2015.

[学会発表](計 16 件)

- Masuda K: Mitochondrial biogenesis induced by exercise and nutrients: implication for performance and health benefits. The International

- Conference on Sport Science, Health, and Physical Education (ICSSHPE 2016) (シンポジウム講演), November 16 2016, Bandung, West Java, Indonesia.
2. Hamidie DRR and Masuda K: Curcumin potentially to increase athletic performance through regulated mitochondrial biogenesis. The International Conference on Sport Science, Health, and Physical Education (ICSSHPE 2016) in conjunction with The Annual Applied Science and Engineering Conference (AASEC 2016), November 16-17, 2016, Bandung, West Java, Indonesia.
 3. Hamidie DRR and Masuda K: Inhibition of cAMP synthesis abolish the impact of curcumin administration in rodent skeletal muscle. The 4th Bandung International Biomolecular Medicine Conference in conjunction with The 2nd Asian Congress Medical Biotechnology and Molecular Biosciences, October 4-6, 2016, Bandung, Indonesia.
 4. 細井達記, Hamidie DRR, 石澤里枝, 山田達也, 斉藤陽子, 増田和実: クルクミン投与が骨格筋ミトコンドリア呼吸機能に及ぼす影響. 平成 27 年度北陸体育学会大会, 平成 28 年 3 月 19 日, 石川県政記念しいのき迎賓館, 石川.
 5. Hamidie DRR, Yamada T, Ishizawa R, Saito Y and Masuda K: Curcumin decreases phosphorylation phosphodiesterase (PDE) to regulated mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. 第 70 回日本体力医学会大会, 平成 27 年 9 月 19 日, 和歌山県民文化会館, 和歌山.
 6. Hamidie DRR, Ishizawa R, Yamada T and Masuda K: Endurance training with curcumin treatment regulated mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through SIRT1-mediated signaling pathway. American College of Sports Medicine 62nd Annual Meeting, May 28 2015, San Diego, CA, USA.

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学運動生理学研究室 Website

<http://exercisephysiol.com>

受賞等

1. The 3rd Place in The Best Poster Presenter, 受賞演題: Hamidie DRR and Masuda K: Inhibition of cAMP synthesis abolish the impact of curcumin administration in rodent skeletal muscle. The 4th Bandung International

Biomolecular Medicine Conference in conjunction with The 2nd Asian Congress Medical Biotechnology and Molecular Biosciences, October 4-6, 2016, Bandung, Indonesia.

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

橋本 健志 (HASHIMOTO TAKESHI)

立命館大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号 : 70511608

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

研究者番号 : 80584002