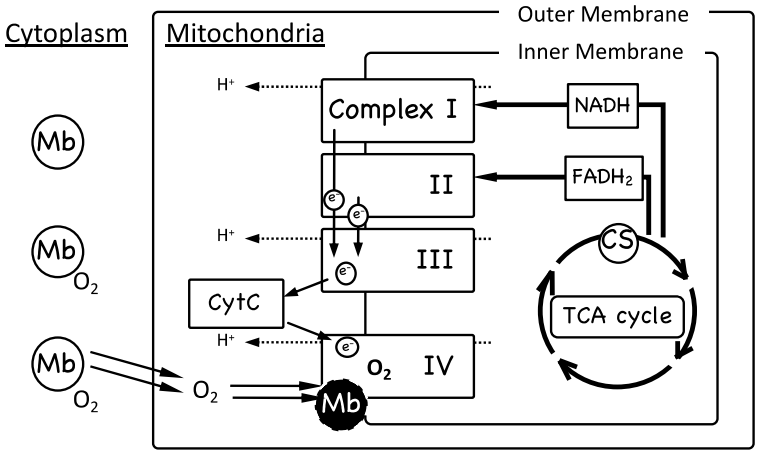
16　筋細胞に備わるミトコンドリア機能を支える補助装置	増田　和実

【目的】運動を通じた健康の維持・増進のためにはエネルギー代謝の要である筋細胞内のミトコンドリアの呼吸活性を高く保つことが重要である。ミトコンドリアは運動トレーニングの継続によって増加し、筋持久力の向上に寄与することはよく知られている。こうしたコンセンサスの一方、近年、我々は筋細胞内にて酸素貯蔵機能を担っていると従来から考えられてきたミオグロビン（Mb）がミトコンドリア内部にも局在し、ミトコンドリアの呼吸機能を上方調節していることを見出した。これらの新たな知見は、Mb がミトコンドリアの基質酸化力の亢進に寄与する可能性を強く示唆するものであるが、ミトコンドリアと Mb との機能的相互作用についてはこれまでに検証がなされていない。本研究では、Mb がミトコンドリアの中に内在するとすればどこに存在しているのかという点や、ミトコンドリアと Mb の発現量を増加させる因子の探索や、運動トレーニングによる影響を明らかにするために個体から細胞までの生理学的・細胞生物学的解析によって検証することを目的とした。

【方法】Wistar 雄性ラットの腓腹筋から単離したミトコンドリアに対して、タンパク質分解処理や低張液処理などによってミトコンドリア膜構造を段階的に破壊しながら Mb の有無を Western Blotting によって検証した。

【結果】分析の結果、Mb が膜間腔や内膜に存在している可能性が示された。過去の我々の検討結果を踏まえると、呼吸鎖複合体 4 に相互作用している可能性がある。また、運動トレーニングを実施した骨格筋では、ミトコンドリアに相互作用している Mb が増える傾向にあることも明らかになった。さらにミトコンドリア生合成が促進する因子の中で、カルシウムシグナル系が Mb 発現を上昇させることやアミノ酸混合液などによっても発現が促進されることが明らかとなった。こうした検討結果から、骨格筋や心筋のミトコンドリアには Mb の一部が内在し、呼吸鎖タンパク質と相互作用することによってミトコンドリアの呼吸機能を亢進させている可能性があることが示唆された。

ミトコンドリアの呼吸機能に対するミオグロビンの作用機序



16. 筋細胞に備わるミトコンドリア機能を支える補助装置

増田　和実

金沢大学 人間社会研究域 人間科学系 運動生理学・生化学研究室

Key words：骨格筋細胞，相互作用，ミトコンドリア，ミオグロビン，呼吸機能

緒　言

運動を通じた健康の維持・増進のためにはエネルギー代謝の要である筋細胞内のミトコンドリアの呼吸活性を高く保つことが重要である。ミトコンドリアは運動トレーニングの継続によって増加し、筋持久力の向上に寄与することはよく知られている。こうしたコンセンサスの一方、我々は筋細胞内にて酸素貯蔵機能を担っていると従来から考えられてきたミオグロビン（Mb）が、筋活動中のミトコンドリア呼吸活性の上昇に応じて酸素を供給する等の新たな知見を得た［1］。さらに、Mb がミトコンドリア内部にも局在し、ミトコンドリアの呼吸機能を上方調節していることを見出した［2］。これらの新たな知見は、Mb がミトコンドリアの基質酸化力の亢進に寄与する可能性を強く示唆するものであるが、ミトコンドリアと Mb との機能的相互作用についてはこれまでに検証がなされていない。

そこで本研究では、ミトコンドリアと Mb の相互作用の存在を明らかにするために、Mb がミトコンドリアに内在している局在場所や、ミトコンドリアと Mb の発現量を増加させる因子の探索、そして運動トレーニングによる影響を明らかにするために個体から細胞までの生理学的・細胞生物学的解析によって検証することを目的とした。

方　法

1. ミトコンドリアの単離とその膜と腔間画分の分離

Wistar 系雄性ラット（14 週齢）の腓腹筋を単離し、緩衝液内でのホモジネートを遠心分離した後、pellet を isolation buffer に移して 16,000 g の遠心分離処理を繰り返してミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリア外膜のないミトコンドリアの作製は、得られたミトコンドリア画分を低張液処理し（その後、高張液内に戻す）、10,000 g の遠心分離によって回収した[3]。さらに、ミトコンドリアの各画分を分離するための方法は Chen and Lesnefsky の方法［4］を参考にしながら超遠心分離処理と超音波破砕を行い、内膜画分（IMM）、膜間腔画分（IMS）、マトリックス画分（MTR）を得た。最終的に外膜画分（OMM）はショ糖勾配遠心分離法によって得た。得られたサンプルから Western Blotting によってミトコンドリアの OMM と IMM、IMS、MTR の各マーカータンパク質および Mb を検出した。

2. ミトコンドリアタンパク質の消化（Topology assay）

骨格筋から単離したミトコンドリアに対して Proteinase K（PK）処理を施すことでミトコンドリア OMM の細胞質側表面上に緩く結合するタンパク質を消化した（［PK］＝0～50 μg/ml）。また、ミトコンドリア内部における Mb の局在場所を特定するため、PK 処理、氷上での低張液処理（OS）、さらには界面活性剤処理（SDS）と、これら処理を組み合わせの後、10,000 g の遠心分離にて回収した。得られたサンプルから Western Blotting によってミトコンドリアの OMM と IMM、IMS、MTR の各マーカータンパク質および Mb を検出した。

3. ミトコンドリア生合成と Mb 発現の連動性

骨格筋芽細胞（L6 or C2C12）を使用し、筋細胞への栄養基質添加実験を行った。骨格筋芽細胞は増殖培地（10% FBS を含む DMEM）で 80～90%コンフルエントに達するまで培養し、その後は分化培地（2% DBS または 2% CS を含む DMEM）に切り替えて分化誘導を行った。分化誘導 5 日後、細胞内のエネルギー状態を変える AICAR と Ca^{2+}シグナルを賦活する Caffeine、さらには mTOR シグナルを活性化する Leucine を含む糖-アミノ酸混合液を分化培地へ添加し、さらに 3 日間培養した後、細胞を刈り取った。得られた細胞から RIPA buffer で全分画を抽出し、Western Blotting によってミトコンドリアタンパク質と Mb を検出した。

結果および考察

1. ミトコンドリア内にあるMｂの局在場所の同定

段階遠心法を利用したミトコンドリア分画をそのままWestern Blottingを行うと、Mbが検出された（図1-A)。さらにミトコンドリアOMM、IMS、IMM、MTRの各画分で検証すると、膜間腔画分とMTRからMbが検出された（図1-A)。我々の過去の研究では、Mbがミトコンドリア内膜のCOX-IVと相互作用する可能性を示唆した［2]。MbがTOM複合体を通過してミトコンドリア内に流入し、COX-IVと相互作用しているのならば、MbがIMSとIMMから検出されると予想していた。結果はMTRからも検出されるという驚く結果が得られた。MTR行きの前駆体タンパク質はミトコンドリア内膜上のTIM23複合体のサブユニットであるTim50によって認識され、MTRに局在するmtHsp70によって引き込まれる［5]。MbはN末端にプレ配列を持たないので、Mbがどのようにして MTRに輸送されるのかは現段階では全く明らかでない。なお、MTRへの輸送機序を考えることと同時に、4つの各画分に分離する際にコンタミした可能性を排除する必要がある。

そこで本研究では、ミトコンドリアにPK処理を行うことによってMbが膜表面に緩く付着している可能性や、そこから遊離したMbが先の4分画に分けた際のバイアスになっていないか検証した。細胞質側のミトコンドリア外膜に局在するTom20がPK処理によって分解された（図1-B)。Tom20の分解は細胞質側のミトコンドリア外膜上に局在するタンパク質が分解されたことを反映する。また、ミトコンドリアOMM、IMS、IMMおよびMTRのそれぞれのマーカーはPKの濃度を段階的に増加させても、その影響を受けなかった（図1-B)。この結果は、PK処理がミトコンドリアの内部構造に変化を生じさせることなく、外膜表面のタンパク質を分解したことを表す。したがって、PK処理後においてもMbが検出されたことはMbがミトコンドリアOMMに緩やかに相互作用しているタンパク質ではなく、内部に存在していることを示唆する。

この結果を基に、PK処理に低張液処理（OS）や界面活性剤処理（SDS）を組み合わせた。PK処理したミトコンドリアおよびOS処理を施したミトコンドリアにおいてもMbが検出されたのに対してPK処理とOS処理を併用した際にはMbが分解を受けていた（図1-C)。これはMbがミトコンドリアのIMMに局在していることを示唆する。また、こうしたミトコンドリアへのMbの相互作用は、運動トレーニング（4週間の）によって増強されることが示された（図1-D)。ミトコンドリアへのタンパク質の輸送機序には、ミトコンドリアOMM上に存在するTOM複合体が細胞質シャペロンからミトコンドリアタンパク質を受け取る受容体としての機能を果たす。TOM複合体はTom20、Tom22、Tom70などのサブユニットから構成されており、その中でもTom20とTom70がミトコンドリアへの入り口で受容体として機能する。Tom20はプレ配列をもつタンパク質を認識し、Tom70はプレ配列を持たないミトコンドリアタンパク質を認識する［6]。先述のようにMbはプレ配列を持たないタンパク質であるので、Mbがミトコンドリア内に取り込まれるのならばTom70に認識され、TOM複合体を通過していると推察される。本研究はMbの輸送機構の解明には至らなかったが、本研究で取り組んだTopologicalエビデンスはMbの一部がミトコンドリア内部に存在することを強く示唆する。

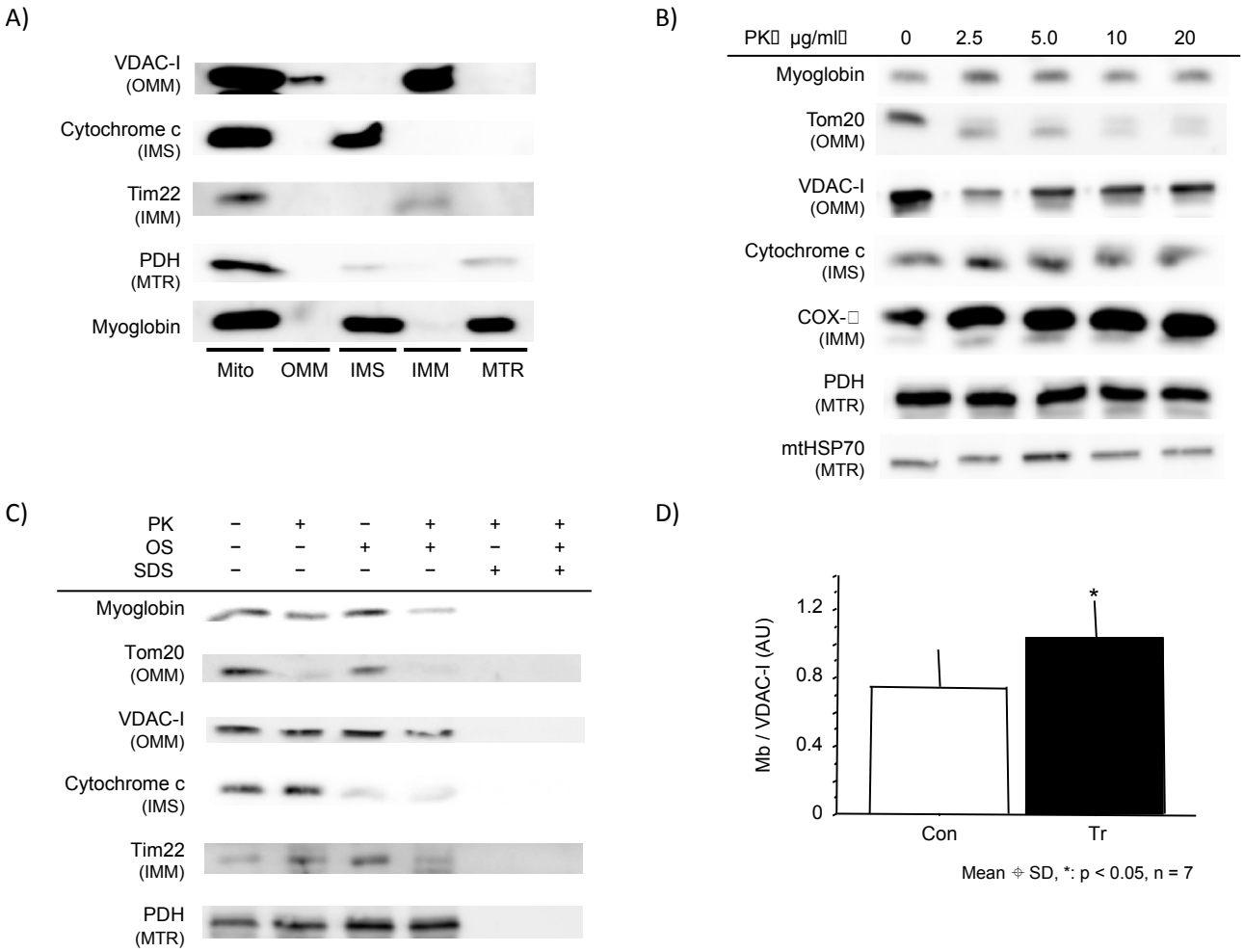
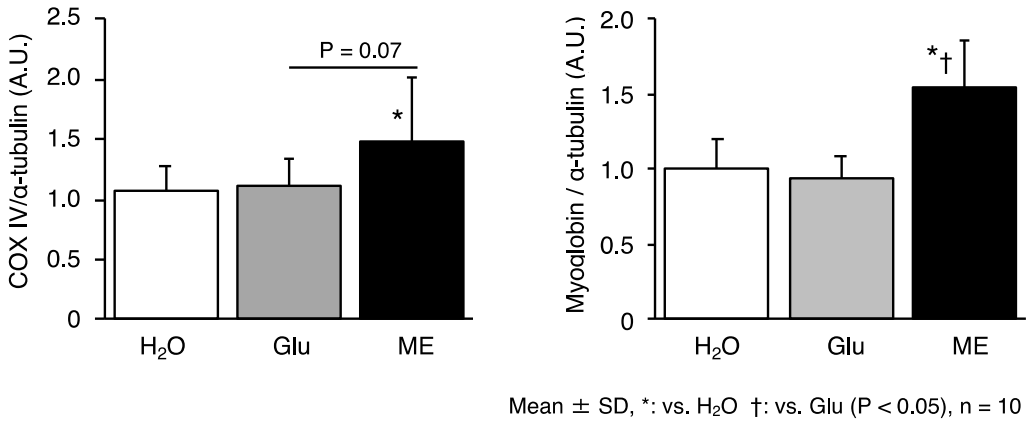


図 1. ミトコンドリアの各画分におけるミオグロビンの検出

A）骨格筋からミトコンドリアを単離し、段階遠心分離法とショ糖勾配遠心分離法を併用してミトコンドリアの外膜（OMM）、内膜（IMM）、膜間腔（IMS）、マトリックス（MTR）の 4 画分に分離してミトコンドリア内に存在する Mb の検出を試みたところ、IMS と MTR に Mb が検出された。B）単離ミトコンドリアの外膜表面のタンパク質を PK によって消化しても Mb のシグナルは検出されたことから、Mb はミトコンドリア内部に存在している。C）低張液処理（OS）によるミトコンドリア OMM の崩壊と PK 処理や界面活性剤（SDS）を組み合わせながら Mb の存在を検証したところ、内膜に近接している可能性が推測された。D）持久性トレーニングを行った骨格筋では、そのミトコンドリアに相互作用する Mb の量が増えることが明らかとなった。

2. ミトコンドリア生合成と Mb 発現の連動性

筋管細胞に Caffeine を添加すると、ミトコンドリアタンパク質(VDAC)と Mb の発現量が有意に上昇した($P<0.05$)［7］。この結果は、Caffeine が細胞内［Ca^{2+}］を上昇させてミトコンドリア生合成を亢進させること［8］、さらに Mb の発現は Ca^{2+} 経路によって調整されていると示唆されていることからも、合理的である［9］。また、糖-アミノ酸混合液を添加した場合においてもミトコンドリアタンパク質（COX-IV）と Mb 発現量が有意に増加した（$P<0.05$, 図 3）。近年、アミノ酸混合液が mTOR 経路を介してミトコンドリア生合成を亢進させることが示唆されていることから［10］、これに付随した Mb 調節機構が存在するのかもしれない。以上の結果から、筋細胞でミトコンドリア生合成が亢進する際には Mb の量も連動して増えることが示唆された。



Mean ± SD, *: vs. H_2O †: vs. Glu ($P < 0.05$), n = 10

図 2. 栄養基質による筋細胞ミトコンドリア生合成・ミオグロビン発現の変化

筋細胞（筋管細胞）への糖-アミノ酸混合液（ME）添加がミトコンドリアタンパク質（COX-IV）と Mb 発現に及ぼす影響を一元配置分散分析（Post Hoc: Tukey-Kramer test, $P < 0.05$）比較検証したところ、グルコース（Glu）のみの添加は COX-IV と Mb 発現に影響しないが、ME を添加すると COX-IV と Mb 発現の両方がベースライン（H_2O）から有意に増加することが明らかとなった。このことは、筋細胞にはミトコンドリア生合成が亢進する際に Mb 発現を連動的に増やす機構が備わっている可能性を示唆する。今後、その機序の解明を含めさらに検証を進める必要がある。

以上のような研究結果から、旧来単なる細胞質の浮遊タンパク質であると考えられてきた心筋および骨格筋に特異的に発現している Mb がミトコンドリアの内部にも局在するという新たなパラダイムを示した。ミトコンドリアタンパク質の取り込み機構は緻密に制御されているにも関わらず、単なる細胞質の浮遊タンパク質であると考えられてきた Mb がミトコンドリアの内部に存在していることは生物学的にも重要な意味を持っていると考えられる。また、筋細胞におけるミトコンドリア生合成と Mb の発現機序や発現因子を明らかにすることも筋細胞のミトコンドリア機能促進には必要である。

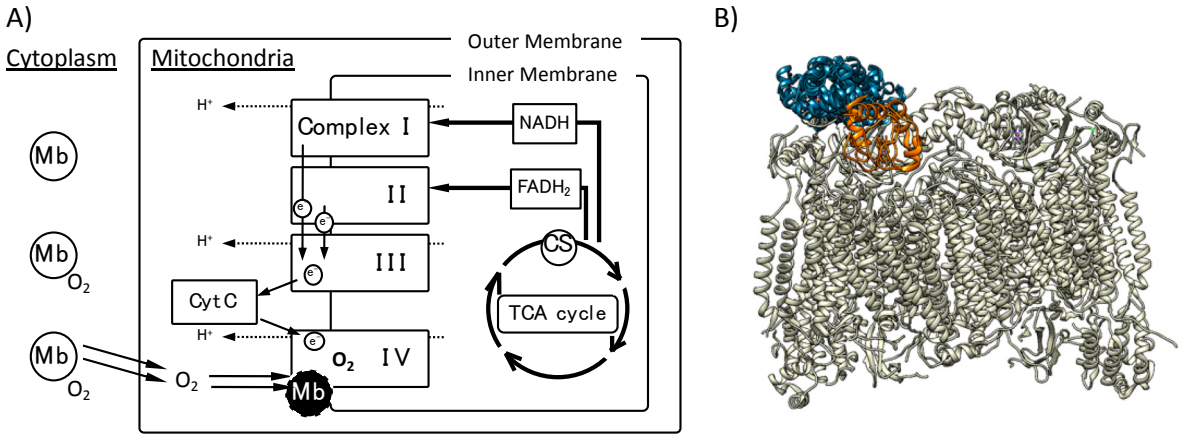


図 3. ミトコンドリアに相互作用するミオグロビン

筋細胞の細胞質に存在している Mb の一部がミトコンドリアの内膜付近にも存在し、とりわけ複合体 4 と相互作用しながら呼吸活性を上方修飾している可能性がある（A）。持久性トレーニングを行うとミトコンドリアの生合成や Mb の発現量が高まるとともに、このミトコンドリアに内包される Mb による機能相関が促進される可能性がある。試験的な分子シミュレーションでは、Mb に複合体 4（COX-IV）と結合する領域があることが示唆された（B）。青は Mb、橙は Cyt C を表している。Cyt C は Mb のような結合領域を持たず、親和性が弱い（B）。Mb は筋細胞に特異的に発現するタンパク質であることから、本研究で示されたミトコンドリア内の Mb の機能や分子相互作用は筋細胞独自の機能とも考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である、金沢大学国際基幹教育院の芝口翼助教、Johns Hopkins University 医学部の山田達也博士研究員、カリフォルニア大学医学部の Thomas Jue 教授、同志社大学健康スポーツ科学部の高倉久志助教、立命館大学スポーツ健康科学部の橋本健志教授に深甚たる感謝の意を表します。

文　献

1) Takakura H, Masuda K, Hashimoto T, Iwase S, Jue T. Quantification of myoglobin deoxygenation and intracellular partial pressure of O_2 during muscle contraction during haemoglobin-free medium perfusion. Exp Physiol. 2010 May;95(5):630-40. doi: 10.1113/expphysiol.2009.050344. Epub 2010 Jan 15. PMID: 20080866

2) Yamada T, Takakura H, Jue T, Hashimoto T, Ishizawa R, Furuichi Y, Kato Y, Iwanaka N, Masuda K. Myoglobin and the regulation of mitochondrial respiratory chain complex IV. J Physiol. 2016 Jan 15;594(2):483-95. doi: 10.1113/JP270824. Epub 2015 Dec 20. PMID: 26584944

3) Bondarenko AI, Parichatikanond W, Madreiter CT, Rost R, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. UCP2 modulates single-channel properties of a MCU-dependent Ca^{2+} inward current in mitochondria. Pflügers Arch. 2015 Dec;467(12):2509-18. doi: 10.1007/s00424-015-1727-z. Epub 2015 Aug 16. PMID: 26275882

4) Chen Q, Lesnefsky EJ. Heart mitochondria and calpain 1: Location, function, and targets. Biochim Biophys Acta. 2015 Nov;1852(11):2372-8. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.08.004. Epub 2015 Aug 7. Review. PMID: 26259540

5) Neupert W, Brunner M. The protein import motor of mitochondria. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Aug;3(8):555-65. Review. PMID: 12154367

6) Endo T, Kohda D. Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. Biochim Biophys Acta. 2002 Sep 2;1592(1):3-14. Review. PMID: 12191763

7) 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生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.

8) Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Holloszy JO. Raising Ca^{2+} in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. FASEB J. 2003 Apr;17(6):675-81. PMID: 12665481

9) Kanatous SB, Mammen PP, Rosenberg PB, Martin CM, White MD, Dimaio JM, Huang G, Muallem S, Garry DJ. Hypoxia reprograms calcium signaling and regulates myoglobin expression. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Mar;296(3):C393-402. doi: 10.1152/ajpcell.00428.2008. Epub 2008 Nov 12. PMID: 1900516

10) D'Antona G, Ragni M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, Bruttini F, Caliaro F, Corsetti G, Bottinelli R, Carruba MO, Valerio A, Nisoli E. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. Cell Metab. 2010 Oct 6;12(4):362-72. doi: 10.1016/j.cmet.2010.08.016. PMID: 20889128