

原著論文

発育期における骨格筋ミトコンドリアの生合成とミオグロビン発現量の連関

蔭地野 稔¹⁾, 山田 達也^{1), 2)}, 小間 陸嗣¹⁾, 芝口 翼³⁾, 高倉 久志⁴⁾, 増田 和実¹⁾

Mitochondrial biogenesis and respiration during rat development

Minoru OJINO¹⁾, Tatusya YAMADA^{1), 2)}, Rikuhide KOMA¹⁾, Tsubasa SHIBAGUCHI³⁾,
Hisashi TAKAKURA⁴⁾, Kazumi MASUDA¹⁾

Abstract

The purpose of the present study was to examine changes in mitochondrial (Mito) biogenesis and myoglobin (Mb) content, oxygen binding protein, in rodent skeletal muscle during their development phase. The soleus muscle was taken from Wistar male rats aged 0~8-week. Mito protein (COX IV) and Mb expression and enzymatic activity (CS activity) were analyzed. The Mito respiratory property was also analyzed using Clark-type oxygen electrode in isolated Mito from tissue. The COX IV expression and CS activity increased significantly at age 2-week as compared to age 0-week whereas Mb expression was significant at age 4-week. The calcineurin (CaN) activity that represented by an expression of calcipressin, also increased significantly at 4-week, implying that Mb was induced through CaN cascade. The potential of Mito respiration tended to increase with age, especially its in state 3 and in complex IV respiration (TMPD state). The respiration under TMPD correlated with Mb expression among all samples were scattered. The additional experiment using stably overexpressed Mb protein rat myocytes (stable-L6), was carried out to investigate if Mb expression will affect Mito respiration. The stable-L6 with different level of Mb expression showed a positive correlation between Mb content and Mito respiration (TMPD state), supporting the evidence in the rodent muscle tissue. Those results suggested that the Mito proteins and Mb were upregulated after birth, but Mb responds more with CaN signal. Furthermore, the Mito respiration especially under TMPD state suggested Mb-specific interaction with Mito protein to regulate Mito function in muscle tissue.

Key words : growth and development, interaction, mitochondrial respiration, rodent muscle

Abbreviations

ADP: adenosin diphosphate, AMPK: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, ATP: adenosin triphosphate, CaMK: calmodulin kinase, CaN: calcineurin, CO: carbon monoxide, CO₂: carbon dioxide, CS: citrate synthase, COX I: cytochrome c oxidase subunit I, COX II: cytochrome c oxidase subunit II, COX IV: cytochrome c oxidase subunit IV, PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, Mb: myoglobin, MEF2: myocyte enhancer factor 2, Mito: mitochondria, NFAT: nuclear factor activated T cell, O₂: oxygen, $\dot{V}O_2$: oxygen uptake

1) 金沢大学人間社会研究域人間科学系

2) ジョンズホプキンス大学医学部

3) 金沢大学国際基幹教育院

4) 同志社大学スポーツ健康科学部

連絡先 増田和実

金沢大学人間社会研究域人間科学系

〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: masudak@staff.kanazawa-u.ac.jp

電話: 076-264-5568, Fax: 076-264-5574

1) Faculty of Human Sciences, Kanazawa University, Ishikawa, Japan

2) School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, USA

3) Institute of Liberal Arts and Science, Kanazawa University, Ishikawa, Japan

4) Faculty of Health and Sports Science, Doshisha University, Kyotanabe, Japan

Kazumi MASUDA, Ph.D., Professor

Faculty of Human Sciences, Kanazawa University

Kakuma-machi, Kanazawa-city, Ishikawa, 920-1192, Japan

E-mail: masudak@staff.kanazawa-u.ac.jp

Phone: [+81] 76-264-5568, Fax: [+81] 76-264-5574

Introduction

運動時の筋細胞内への酸素 (O_2) 運搬と筋細胞内での O_2 消費は、肺、心臓血管、および筋細胞内の代謝反応のそれぞれが協調的に機能を果たすことによって調節されている (Poole et al., 2007)。肺から筋細胞内への O_2 運搬機構、ならびにその規定因子の解明は、スポーツ選手の運動パフォーマンス向上に寄与するばかりでなく、運動に伴う代謝機能の変化の解明などにおいても重要な課題である。特に ATP を合成するミトコンドリア (Mito) へ直接的に O_2 を運搬する機構は重要であるが、不明な点が多い。その理由として、筋細胞内において主に O_2 の貯蔵・運搬を担うミオグロビン (Mb) の生体内機能が明らかになっていないことが挙げられる。Mb は骨格筋や心筋に存在する分子量約 17,000 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) を 1 個含む。その機能には、 O_2 貯蔵 (Theorell, 1934)、 O_2 の促通拡散 (Wittenberg, 1970)、 O_2 運搬 (Wittenberg and Wittenberg, 1975)、細胞内 O_2 濃度の均質化 (Gayeski et al., 1985)、酸化的リン酸化への貢献 (Wu et al., 1972; Doeller and Wittenberg, 1991) などが挙げられる。

Mb の発現は Mito 生合成にも関与するカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMK) やカルシニューリン (CaN) を介したカルシウムシグナリングによって調節されている (Kanatous et al., 2009)。しかしながら、興味深いことに、同じカルシウムシグナリングによって発現が調節されているはずの Mito 生合成と Mb 生合成の間には、時間差が存在することが示唆されている。例えばマウスの発育過程において、骨格筋の Mito 酵素活性は出生後 10 日で成体と同程度の値を示す一方、Mb 発現量は出生後 20 日で成体と同程度の値に達することが示唆されている (Garry et al., 1996)。また、マウス由来骨格筋培養細胞 C2C12 を用いた実験において、Mb 発現量は CaMK のみを過剰発現させた細胞では約 5 倍、CaN のみを過剰発現させた細胞では約 13 倍、CaMK と CaN を共に過剰発現させた細胞では約 35 倍増加した (Wu et al., 2000)。これらの

ことから、Mb の発現には CaMK と CaN が共に重要であると考えられるが、発育過程の生体内で CaMK と CaN の発現増加が同じタイミングで起こるのか、それとも時間差が生じるのかについては明らかになっていない。

ところで Mb の生理機能に関して、我々はこれまでに筋収縮開始時において Mb が即時的に脱酸素化していることを明らかにした (Takakura et al., 2010)。また、筋収縮時における O_2 摂取量 ($\dot{V}O_2$) の上昇は ADP 濃度ではなく Mb からの O_2 供給に依存する可能性があることが示唆されている (Chung et al., 2005)。さらに、Mb の O_2 結合機能を阻害すると Mito 呼吸活性が低下するという報告も存在する (Wittenberg and Wittenberg, 1987)。加えて、Mito 量が多く酸化能力も高い遅筋線維を多く含む骨格筋 (例: ヒラメ筋や腓腹筋深層部) では Mb の発現量が高いことから (Yamada et al., 2013)、Mb 量の増加は Mito 呼吸活性を上方調節する一因となり得るかもしれない。しかしながら、Mb 量の増加が Mito 呼吸活性を亢進するかどうかは明らかになっていない。もし Mb が O_2 供与体として Mito 呼吸機能に関与するならば、Mb 量の増加は Mito 呼吸活性を亢進すると推測される。

そこで本研究では、Mb の発現と Mito 生合成との関連性と機能的関係性を明らかにするため、1) ラットの発育過程におけるヒラメ筋の Mito 関連タンパク質と Mb の発現動態及び両者の発現に関わる因子の発現動態の検証、及び 2) ラット由来骨格筋培養細胞 L6 の Mb 安定過剰発現株を構築し、Mito 呼吸活性が亢進するかどうかの検証を行った。

Materials and Methods

被験動物及び飼育環境

本実験は金沢大学動物実験規約に則って計画し、動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号: AP-122592)。被験動物には 0-8 週齢の Wistar 系雄性ラット (三協ラボサービス, Japan) を用いた。飼育環境は室温を 25°C、12 時間の明暗サイクルとし、所定の週齢までの飼育期間中の

固形飼料 (MF; オリエンタル酵母, Japan) と水はともに自由摂取とした。所定の週齢に達したラットの両脚のヒラメ筋を麻酔下で摘出した (三種混合麻酔薬: ドミツール: 0.375 mg/kg BW, ミダゾラム: 2 mg/kg BW, ベトルフェール: 2.5 mg/kg BW)。摘出直後のヒラメ筋サンプルの一部を Mito 呼吸測定用に取り分け、残った筋サンプルは液体窒素で速やかに凍結した後、その他の分析に供するまで -80°C 下で保存した。

培養細胞及び培養条件

培養細胞にはラット由来の骨格筋細胞 L6 (DSファーマメディカル株式会社, Japan) を用いた。L6 筋芽細胞は 10 cm ディッシュに播種し、10% Fetal bovine serum (Hyclone, USA) と 50 µg/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, USA) を加えた High-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium の中で 5% CO₂、37°C の環境下で培養した。増殖した細胞は 70% コンフルエントに達する前に Trypsin-EDTA (Wako, Japan) を用いて継代した。液体培地は 2 日おきに交換した。新しいディッシュに播種した細胞は 100% コンフルエントになった時点で、2% donor bovine serum を含む液体培地に交換し、分化誘導を行った。分化誘導 7 日後、一部のディッシュから Mito 呼吸測定用に L6 細胞を刈り取り、残りのディッシュは D-PBS (-) (Wako) で洗浄後、その他の分析に供するまでディッシュごと -80°C 下で保存した。

Mb 過剰発現細胞の構築

Rattus norvegicus 由来 Myoglobin p-Express ベクター (MRN4770-99610276; Open Bio Systems, USA) に対して制限酵素 (タカラ制限酵素 BOX-II, タカラバイオ, Japan) を用いて、*Xho* I と *Eco* RI の部位で Mb を切り出した。その Mb を pcDNA3 に Myc-tag と共に導入した。その後、ラット由来の L6 筋芽細胞にリポフェクション法 (lipofectamine, Invitrogen, USA) で遺伝子導入を行った。さらに、ネオマイシン処理を行い、薬剤耐性細胞の選択及び増殖を行った。前述

の培養条件で遺伝子導入 L6 細胞を培養し、Myc-myoglobin の発現はウェスタンブロッティング法によって確認した。本実験では 3 つの Mb 安定過剰発現株 (ID: st9, st20, st50) を用いて検討を行った。

ウェスタンブロット法に用いるサンプル調整法

凍結保存したディッシュから刈り取った L6 細胞に対して 150 µl の RIPA buffer (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 µM PMSF, 1 µM Pepstatin A, 10 µM Leupeptin and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) を加え、氷上にてペッスルで 150 秒間ホモジナイズした。その後、ホモジネートをさらに 27G の注射針付きシリンジに 20 回通して粉碎処理した。また、凍結保存したヒラメ筋の場合は、切り出した筋サンプルに対して 9 倍量の RIPA buffer を加え、ポリトロンホモジナイザー (PT 1200 CL, Polytron, Switzerland) を用いて氷上でホモジナイズを行った (1 分間)。その後、L6 細胞・筋サンプルの最終的なホモジネートを遠心分離 (600 g, 4°C, 10 min) し、得られた上清を回収した。回収した上清のタンパク質濃度は Bradford 法を用いて分光光度計 (Lambda 25, Perkin Elmer, USA) で定量した。回収した上清サンプルをタンパク質量が等しくなるように RIPA buffer で希釈し、さらに等量の 2 × SDS サンプル処理バッファー (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) で希釈した。その後、サンプル溶液を 95°C で 5 分間インキュベートした。

単離ミトコンドリアサンプル調整法

摘出直後のヒラメ筋を氷冷したアイスバス内の Isolation Buffer (215 mM Mannitol, 100 mM KCl, 75 mM Sucrose, 20 mM HEPES sodium salt, 1mM EDTA, 5 mM L-carnitine, 0.2% BSA; pH 7.2) に浸し、マイクロチューブに移して Isolation Buffer 内でミンスした。ミンスした筋を Isolation Buffer に 0.25 mg/ml の bacteria を加えた溶液に移し、ポッター型ガラスホモジナイザーでホモジナイズした。このホモジネート

を遠心分離し (700 g, 4°C, 10 min)、その上清を回収した後、さらに遠心分離を行った (10,000 g, 4°C, 10 min)。遠心分離後、得られた沈澱を Isolation Buffer で再懸濁し、再度遠心分離を行った (7,000 g, 4°C, 10 min)。遠心分離後、得られた沈澱を Resuspension Buffer (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 20 mM HEPES sodium salt, 1mM EDTA, 5 mM L-carnitine, 0.2% BSA; pH 7.2) で再懸濁し、後述の測定に用いた。

Mito 呼吸活性の測定法

Mito 呼吸活性の測定は Saks ら (1998) のプロトコルを参考に行った。測定にはクラーク酸素型電極 (5300A, YSI Inc, Japan) を用いた。測定は全て 37°C で常時攪拌の状況下で行った。加熱及び保温は恒温槽 (Thermo Unit C-650, Taiyo, Japan) を用いた。チャンバー内を 600 μ l の Respiration Solution (110 mM Mannitol, 20 mM HEPES, 20 mM Taurin, 10 mM KH_2PO_4 , 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM EGTA, 0.3 mM DTT, 60 mM Pottasium Lactbionate, 1% BSA; pH 7.2) で満たし、 O_2 電極を安定させた後にヒラメ筋の単離 Mito サンプルを添加した。その後、基質を添加し、state 4 (グルタミン酸 + リンゴ酸 (10 mM + 2 mM)), state GM3 (ADP (2.5 mM)), state GMS3 (コハク酸 (10 mM)) TMPD (アスコルビン酸 + N,N,N',N' テトラメチル -p- フェニルジアミン (TMPD; N,N,N',N', tetramethyl-p-phenyldiamine) (2 mM + 0.5 mM)) を測定した。L6 細胞を測定に用いた場合は、培養細胞をチャンバーに添加した後にジギトニンを 50 μ g/ml 加えて膜透過処理 (5 分間) を行った。

測定中に得られるデータは AD 変換器 (PowerLab/8SP, AD Instruments, Australia) を用いて取得し、専用ソフトウェア (Chart version 5.5.6, AD Instruments, Australia) を介してパーソナルコンピュータに取り込んだ。

Mb 濃度の測定法

Mb 濃度の測定には、Reynafarje (1963) の生化学的手法を用いた。あらかじめ CO でバブリン

グを行った 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 内で約 10~80 mg のヒラメ筋サンプルをホモジナイズした後、遠心分離 (12,000 g, 4°C, 30 min) を行った。遠心分離終了後、得られた上清をマイクロチューブに回収し、再び CO で噴霧した。その後、分光光度計を用い、上清液を適宜希釈しながら吸光度 (538 nm と 568 nm) を測定した。筋内の Mb 濃度は 2 波長の吸光度とモル吸光係数を基に算出した (538 nm 及び 568 nm のモル吸光係数: $\epsilon_{538\text{MbCO}} = 14.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $\epsilon_{568\text{MbCO}} = 11.8 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)

CS 活性の測定法

Mb 濃度測定で遠心分離を行ったサンプルの一部を別途回収し、3 回の凍結 - 融解を繰り返して Mito 膜を破壊した後、100 mM Tris buffer (pH 8.0) で 50 倍に希釈した。この希釈均等液を用いて、CS 活性の測定を Srere (1969) の生化学的手法に従って行った。1.5 ml ディスポセルに 100 mM Tris buffer (pH 8.0) を 0.6 ml、3.0 mM acetyl CoA を 0.1 ml、0.1 mM DTNB を 0.1 ml、希釈均等液を 0.1 ml を入れた。その後、ディスポセルを 30°C に設定した分光光度計内に移し、吸光度 (412 nm) を 5 分後から 30 秒毎に 4 分間測定した。測定終了後、ディスポセルに 5 mM oxaloacetate を 0.1 ml 加え、さらに吸光度 (412 nm) を 1 分後から 4 分間測定した。CS 活性は DTNB のモル吸光係数 $13.6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ を基に算出した。

ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット用に調整したサンプルのタンパク質は、10% SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分子量ごとに分離した (20 mA/ゲル, 室温)。泳動終了後、転写装置 (Criterion; Bio-Rad, USA) を用いて、氷上で 100 V の定電圧、60 分間の通電を行い、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF 膜, ATTO, Japan) にタンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜を TBS-T (0.1% Tween-20, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) で 10 分間洗浄し、4% ブロックエース溶液 (KAC, Japan) を用いて室温で 60 分間ブロッ

キングを行った。

ブロッキング処理後、PVDF膜をTBS-Tで洗浄した後、0.4%ブロッカー溶液で希釈した一次抗体で一晩インキュベートした(4°C)。用いた一次抗体は次の通りである: COX IV (1:1,000; ab14744, abcam, USA)、Mb (1:1,000; sc-25607, Santa Cruz, USA)、phospho-CaMKII (1:1,000; 3361, Cell Signaling, USA)、CaMKII (1:1,000; 3362, Cell Signaling)、Calcipressin (1:100; ab80982, abcam)、GAPDH (1:2,500; ab8245, abcam)。また、二次抗体反応は、0.4%ブロッカー溶液で希釈したanti-rabbit IgG-HRP (1:2,500; GE Healthcare, UK) または anti-mouse IgG-HRP (1:2,500; GE Healthcare) を用いて室温で60分間行った。二次抗体反応後のPVDF膜をTBS-Tで洗浄した後、ECL Plus 試薬 (GE healthcare) を用いて目的のタンパク質を発光させた。発光シグナルを冷却 CCD カメラ (MicroChem; Berthold Technologies, Germany)

でパーソナルコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (Image J; NIH, USA) を用いて各タンパク質発現量を定量した。

統計処理

全ての統計量は平均値 ± 標準誤差で表した。それぞれの条件の差の検定には繰り返しのない一元配置の分散分析を行った。平均値に有意差が認められた場合には、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。また発育期における TMPD 添加後の O₂ 消費量と Mb 濃度との検定及び、培養細胞における TMPD 添加後の O₂ 消費量と Mb 発現量との検定にはそれぞれ回帰分析を行い、2つのパラメータの関連性の検討にはピアソンの相関係数を算出した。有意水準は5%未満とした。

Results

発育期における Mito 生合成及び Mb 生合成の変化

Figure 1 には発育期の各週齢における CS 活性

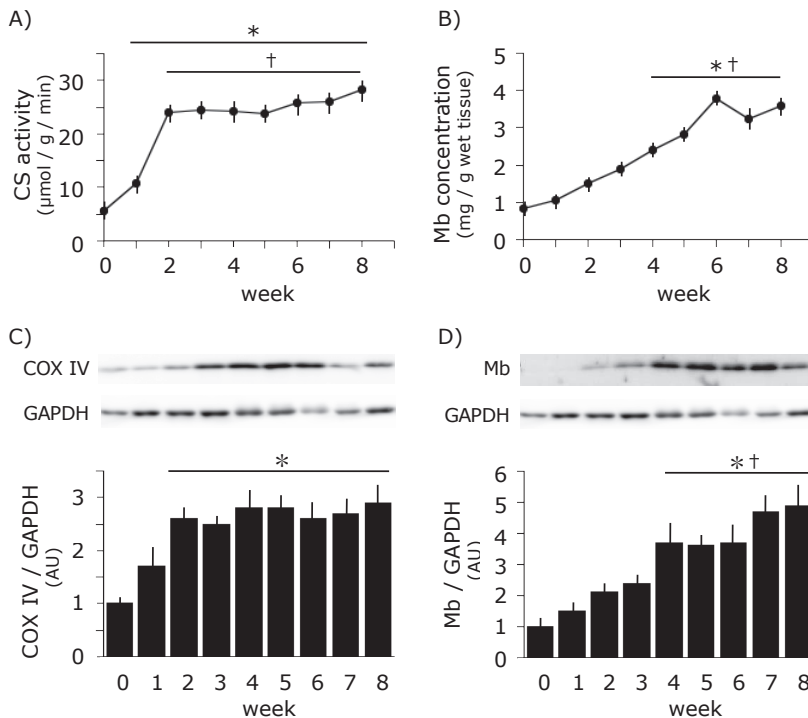


Figure 1. ラットヒラメ筋における CS 活性 (A)、Mb 濃度 (B)、COX IV (C) 及び Mb タンパク質発現量 (D) の発育変化。Means ± SEM (n = 6 / each). *: p < 0.05 vs. 0 週齢, †: p < 0.05 vs. 1 週齢. 各グラフの上には定量に要したウェスタンブロットティングのメンブレン画像 (典型例) を示した。

(Mito 生合成マーカー) と Mb 濃度、及び COX IV (Mito マーカー) と Mb のタンパク質発現量の変化を示した。CS 活性は 0 週齢と比較して 1~8 週齢で、1 週齢と比較して 2~8 週齢で有意に高い値を示した (Figure 1A, $p < 0.05$)。その後の発育に伴う CS 活性の有意な変化は認められなかった。一方、Mb 濃度も生後から発育に伴い徐々に増加したが、0 週齢及び 1 週齢と比較して有意な増加が認められたのは 4 週齢以降からであった (Figure 1B, $p < 0.05$)。また、4 週齢以降は週齢間における発育による有意な変化は認められなかった。

ウェスタンブロットング法によって検討した COX IV 及び Mb のタンパク質発現量も、CS 活

性及び Mb 濃度とほぼ同様の発育変化を示した (Figure 1C, 1D)。

発育期におけるカルシウムシグナリングの変化

Figure 2 には発育期の各週齢における CaMK リン酸化率と Calcipressin 発現量の変化を示した。Calcipressin は CaN によって発現調節を受けていることから (Banzet et al., 2012)、本研究では Calcipressin 発現量を CaN の活性マーカーとして用いた。生後 ~8 週間の発育期間において、CaMK リン酸化率に有意な変化は認められなかった。一方、Calcipressin 発現量は 0 週齢及び 1 週齢と比較して、4~8 週齢で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

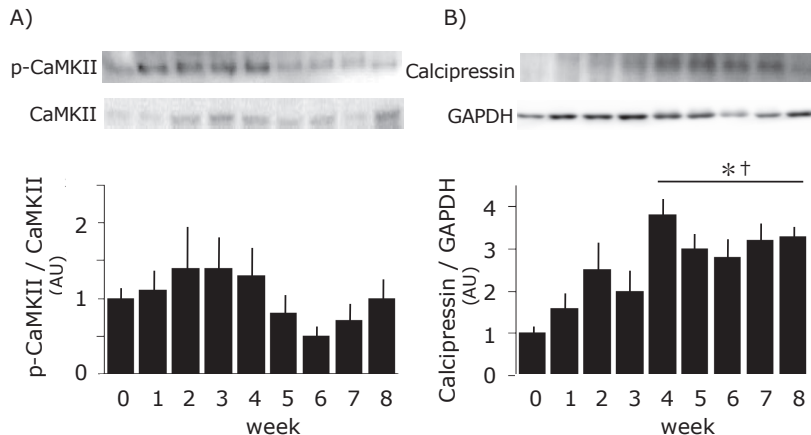


Figure 2. ラットヒラメ筋における CaMKII リン酸化率 (A) と CaN 活性 (Calcipressin 発現量, B) の発育変化。

Means \pm SEM ($n = 6 / \text{each}$). *: $p < 0.05$ vs. 0 週齢, †: $p < 0.05$ vs. 1 週齢. 各グラフの上部には定量に要したウェスタンブロットングのメンブレン画像 (典型例) を示した。

発育期における Mito 呼吸活性の変化

Figure 3 には発育期の各週齢における Mito 呼吸活性の変化を示した。生後 ~8 週齢までの発育期間において、complex I に対する基質であるグルタミン酸とリンゴ酸を添加した state 4 の値に有意な変化は認められなかった。一方、state 4 の条件に ADP を添加した state GM3 の値は、0 週齢と比較して 6~8 週齢で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。また、state GM3 の条件に complex II に対する基質であるコハク酸を添加した state GMS3 の値は、0 週齢と比較して 4~8 週齢で、1

週齢と比較して 7、8 週齢で有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。さらに state GMS3 条件に Cyto c に直接電子を与える TMPD を添加する state TMPD では、0 週齢と比較して 4~8 週齢の値が、1 週齢と比較して 8 週齢の値が有意に高い値であった ($p < 0.05$)。

Figure 3C にはヒラメ筋の Mb 濃度と TMPD 条件における Mito 呼吸活性との関係を示した。ヒラメ筋における Mb 濃度と Mito 呼吸活性 (TMPD 条件) の間には、有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.92$, $p < 0.05$)。

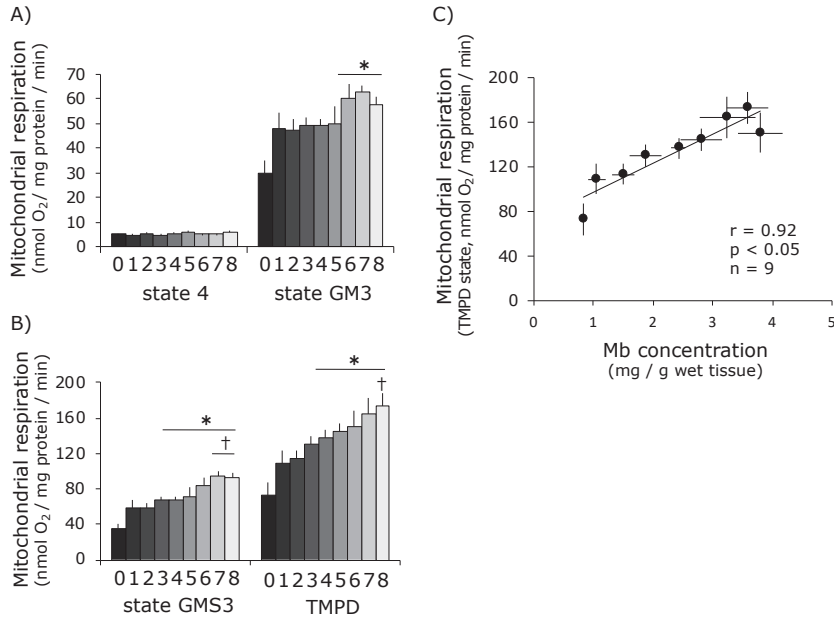


Figure 3. ラットヒラメ筋における Mito 呼吸の発育変化と Mb 濃度との関連性.

Means \pm SEM (n = 6 / each). *: p < 0.05 vs. 0週齢, †: p < 0.05 vs. 1週齢. (A) state 4及びstate GM3条件, (B) state GMS3及びTMPD条件, (C) Mito呼吸活性 (TMPD条件) とMb濃度との関連性 (n = 6 / each plots, r = 0.92, p < 0.05, n=9).

Mb 過剰発現細胞における Mb と COX IV のタンパク質発現量

Figure 4にはラット由来の骨格筋培養細胞L6とMb過剰発現株におけるMbとCOX IV (Mitoマーカー) タンパク質発現量を示した。全てのMb過剰発現株のMbタンパク質発現量は、通常のL6細胞よりも高値を示し (st50で約1.5倍、

st9で約2倍、st20で約3倍)、特にst9及びst20の値は通常のL6の値と比較して有意に高い値であった (p < 0.05)。また、st20のMb発現量は、sa50及びst9と比較しても有意に高い値を示した (p < 0.05)。一方、いずれのMb過剰発現細胞においても、COX IVタンパク質発現量に有意な変化は認められなかった。

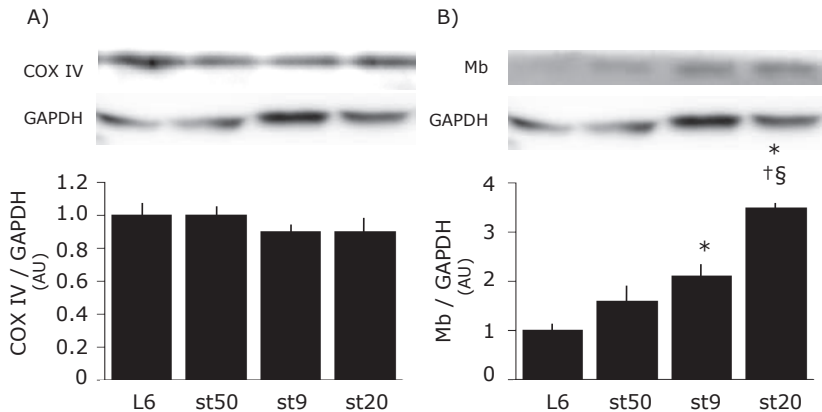


Figure 4. Mb 過剰発現筋細胞 (L6) における COX IV (A) 及び Mb タンパク質発現量 (B) の変化.

Means \pm SEM (n = 6 / each). *: p < 0.05 vs. L6, †: p < 0.05 vs. st50, §: p < 0.05 vs. st9. 各グラフの上には定量に要したウェスタンブロットティングのメンブレン画像 (典型例) を示した.

Mb 過剰発現時の Mito 呼吸活性の変化

Figure 5A にはラット由来の骨格筋培養細胞 L6 と Mb 過剰発現株における Mito 呼吸活性を示した。state 4、state GM3、及び state GMS3 では、いずれの呼吸活性においても各細胞間の値に有意差は認められなかった。一方、state TMPD では、st20 の値が L6 の値よりも有意に高値を示

した ($p < 0.05$)。Figure 5B には筋細胞 (通常の L6 及び Mb 過剰発現株) の Mb 発現量と TMPD での Mito 呼吸活性との関係性を示した。筋細胞における Mb 発現量と Mito 呼吸活性 (TMPD 条件) の間には、有意な正の相関関係が認められた ($r = 0.90$, $p < 0.05$)。

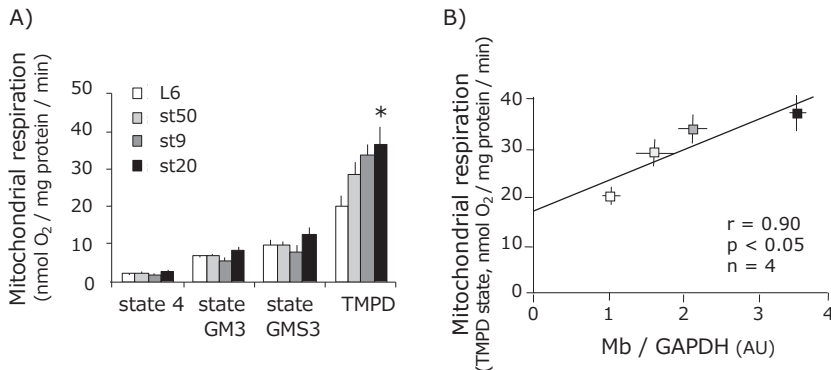


Figure 5. Mb の過剰発現が L6 細胞の Mito 呼吸に及ぼす影響。

Means \pm SEM ($n = 6$ / each). *: $p < 0.05$ vs. L6. (A) 各細胞における state 4, state GM3, state GMS3 及び TMPD 条件の Mito 呼吸活性. (B) 筋細胞の Mito 呼吸活性と Mb 発現量との関連性 ($n = 6$ / each plots, $r = 0.90$, $p < 0.05$, $n = 4$), L6 (●), St9 (▲), st20 (◆), st50 (■).

Discussion

発育期における Mito 生合成と Mb 生合成の差異

マウスの発育過程において、後肢骨格筋の Mito 酵素活性は出生後 10 日目で成体と同程度の値を示す一方、Mb 発現量は出生後 20 日目で成体と同程度の値に達することが示唆されている (Garry et al., 1996)。このことから、発育期の骨格筋において Mito 生合成と Mb 生合成の間には時間差が存在するのではないかと予想された。そこで本研究では、発育期のラットヒラメ筋における Mito 生合成と Mb 生合成を検討した。その結果、Mito の量的指標である CS 活性、ならびに Mito 関連タンパク質である COX IV 発現量は生後 2 週間後までにいずれも有意に増加し ($p < 0.05$; Figure 1A and 1C)、2 週齢のそれらの値は 8 週齢とほぼ同程度の値であった。つまり、ラットの発育期において、骨格筋の Mito 量は 2 週齢ではほぼ成体と同程度の水準に達していると考えられる。一方、ラットヒラメ筋の Mb 量は、生化的

的手法及びウエスタンブロッティング法いずれの検証結果においても生後から発育に伴い徐々に増加し、生後 4 週後以降で有意な増加が認められた ($p < 0.05$; Figure 1B and 1D)。また、生後 4 週後以降においても有意な変化ではないものの、生後 8 週齢まで Mb 量は微増した。以上のことから、ラット骨格筋においても発育期の Mito 生合成と Mb 生合成の間には時間差が存在し、Mito 生合成の方が Mb 生合成よりも約 2 週間程度先行することが示唆された。

発育期におけるカルシウムシグナリングと Mb 生合成との関連性

Ca²⁺ 経路の賦活化によって活性化される転写因子 MEF2、NFAT は Mb 遺伝子のプロモーターに結合し、転写を促す (Kanatous et al., 2009)。また、マウス由来骨格筋培養細胞 C2C12 を用いた実験において、Mb 発現量はコントロール細胞と比較して CaMK のみを過剰発現させた細胞で

は約5倍、CaNのみを過剰発現させた細胞では約13倍、CaMKとCaNを共に過剰発現させた細胞では約35倍増加することが報告されている(Wu et al., 2000)。CaMK経路はMito生合成にも関与することから(Lin et al., 2002)、CaNの活性がMb生合成の調節により影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では、発育期のラット骨格筋においてMito生合成とMb生合成の間に時間差が生じる要因として、Mb生合成を調節するカルシウムシグナリングの発育変化がその経路によって異なることを予想した。本研究においてCaMKのリン酸化率は、生後から生後8週後までの間に有意な発現変化を示さなかった(Figure 2A)。このことは、生後から少なくとも8週齢までの間に起こる骨格筋でのMito生合成やMb生合成にCaMKは関与しないこと、また、発育期のMito生合成はAMPK経路など他の経路の賦活化によって誘導される可能性を示唆する。これらの点については、今後検討していく必要がある。

一方、本研究において、CaNの活性を反映すると考えられるCalcipressin発現量は(Banzet et al., 2012)、ラットヒラメ筋において生後4週後で有意に増加し、その後も8週齢まで高値を保ち続けた($p < 0.05$; Figure 2B)。つまり、CaNの活性は特に3週齢から4週齢の間にかけて上昇したと考えられる。本研究ではヒラメ筋のMb量が生後有意に増加する時期とCaN活性の上昇した時期(4週齢付近)の傾向が一致しており、かつ4週齢以降のCaN活性が高く保たれている時期においてもMb量が微増していることから、発育に伴う骨格筋のCaN活性化が発育期におけるMb発現を調節していることが示唆された。また、このCaN活性の発育変化がMito生合成とMb生合成との間に時間差を生む原因であると考えられる。

発育期におけるMito呼吸活性の変化

本研究において、発育期のラットヒラメ筋におけるMito呼吸活性はstate GM3、state GMS3、state TMPDにおいて生後4~6週齢までの間に有意に増加した($p < 0.05$; Figure 3A,3B)。一方、

核にコードされたMitoタンパク質であるCSの活性及びCOX IVのタンパク質発現量は、2週齢の時点でほぼ8週齢と同程度であった。つまり、骨格筋のMito量の増加が生後2週で頭打ちになったにもかかわらず、その後発育に伴いMito呼吸機能が亢進したと言える。この原因として、Mito呼吸鎖複合体を構成するタンパク質が核DNAだけでなくMito-DNA(mtDNA)にもコードされていることが関与しているかもしれない(Lin et al., 2002)。mtDNAはComplex IVにおいて実際に電子伝達を行うCOX I、COX II、などのサブユニットをコードしている(Park and Larsson, 2011)。したがって、本研究で認められた、発育に伴うMitoのO₂消費量の亢進は、mtDNAにコードされたタンパク質の発育変化によって引き起こされた可能性がある。この点については今後さらに検討していく必要がある。

また、本研究において、Mb濃度が高い(成熟した)ヒラメ筋ほどMito呼吸活性(TMPD添加条件)も高い関係性があることが示された(Figure 3C)。TMPDはCyto cに直接電子を与えるため、complex IVの最大活性を示す。本研究のMito呼吸活性の測定ではヒラメ筋から単離したMitoを用いたため、細胞質中に存在するMbがMitoの呼吸活性に影響を及ぼす可能性は低いと考えざるを得ない。しかしながら、我々はこれまでにMbが骨格筋のMito内に存在し、COX IVと相互作用している可能性を示唆している(Yamada et al., 2013)。また、後述のように、Mbを過剰発現させたL6細胞では、筋細胞内のMitoタンパク質発現量は変化しなかったにもかかわらずMito呼吸活性(TMPD添加時)が亢進した(Figure 5B)。以上のことから、骨格筋のMitoに近接するMbがTMPD添加時のMitoのO₂消費を亢進させた可能性は否定できない。そこで、本実験ではMb過剰発現培養筋細胞において、Mito呼吸活性のさらなる検討を行った。

Mb過剰発現が筋細胞のMito呼吸活性に及ぼす影響

Mbは酸化能力の高い遅筋線維を多く含む骨格

筋において発現量が高いことや (Yamada et al., 2013)、Mb 量の増加は Mito 呼吸活性を上方調節する可能性が示唆されている (Yamada et al. 2016)。そこで本研究では Mb 過剰発現培養筋細胞を作成し、Mito 呼吸活性を検証した。Mb のタンパク質発現量は通常の L6 細胞に対して st50 株で約 1.5 倍、st9 株で約 2 倍、st20 株で約 3 倍増加した ($p < 0.05$; Figure 4B)。また、Mito マーカーである COX IV タンパク質発現量はいずれの細胞株においても通常の L6 細胞とほぼ同レベルであったにもかかわらず (Figure 4A)、TMPD での Mito 呼吸活性は通常の L6 細胞よりも st20 株で有意に高値を示した ($p < 0.05$; Figure 5A)。さらに、Mb 発現量が高い筋細胞ほど Mito 呼吸活性 (TMPD 添加条件) も高い関係性にあることが認められた (Figure 5B)。これらのことから、筋細胞における Mb 量の増加は Mito 呼吸活性 (TMPD 添加時) を亢進することが明らかとなった。この理由として、Mb が電子の供与体となった、あるいは O_2 運搬を亢進した可能性のどちらかが挙げられる。

metMb が deoxy-Mb になる際に ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$)、電子が放出される。TMPD は Cyto c に電子を与え、complex IV の最大活性を誘発することから、Mb から放出される電子がこの反応に利用された可能性が考えられる。Mito 呼吸活性測定時における溶液中の O_2 分圧は 100~150 mmHg の範囲で行われており、この範囲内では 95% 以上の Mb が O_2 と結合している (Theorell, 1934)。つまり、測定時の溶液中に含まれる metMb はせいぜい全体の 5% 以下と推定され、それらの metMb が turnover していると推察される。細胞株間における Mb のタンパク質発現量は約 3 倍の差であったことから、電子供与体として働ける metMb の差は最大で 15% と推定される。一方、各 L6 細胞に対して TMPD 添加を行った際、細胞株間において最大約 2 倍の差があった。以上のことから、仮に Mb が電子供与体として Mito 呼吸活性の亢進に貢献していたとしても、その働きだけでは本実験の Mito 呼吸上昇の結果を十分に説明できない。

一方、Mb による O_2 運搬亢進の可能性について、

まず、細胞質に存在する Mb によって細胞内の O_2 濃度が上昇し、Mito 内の O_2 濃度との間の O_2 濃度較差が拡大 (Driving Force の上昇) した結果として Mito の O_2 消費が亢進されたかもしれない。あるいは、Mb が筋細胞の Mito 内に存在し、complex IV に共局在していることが示唆されていることから (Yamada et al., 2013)、Mito 呼吸活性の亢進は Mito に近接する Mb からの O_2 供給によって引き起こされた可能性がある。ただし、本実験では筋細胞の細胞質内と Mito 内に存在する Mb を分離できなかったため、Mb が実際に Mito 呼吸を調節するか否かは Mito 単離法を含めて慎重に再検討する必要がある。

結論

本研究の目的は、ラットの発育期における Mb 発現過程、及び Mb 量の多寡が Mito 呼吸に及ぼす影響を明らかにすることであった。本研究の結果、発育期におけるヒラメ筋での Mb 生合成は Mito 生合成よりも約 2 週間遅れて生じることが明らかとなった。また、発育期における CaN の活性動態は Mb の発現動態とほぼ一致した変化を示した。さらに、Mb 過剰発現筋細胞では、特に Mb 発現量が高い細胞株で TMPD 添加時の Mito 呼吸活性が亢進した。以上のことから、発育期における Mito 生合成と Mb 生合成との間にある時間差は発育に伴う CaN 活性の変化によって引き起こされていることが示唆された。また、Mb の多寡が筋細胞の Mito 呼吸活性を調節する重要な因子であることが示唆された。

Acknowledgements

本研究は科学研究費補助金 (#: 15K12666, #17H02158 KM) と (財) 澁谷学術文化スポーツ振興財団・スポーツ科学助成金の助成を受けて実施された。また、本研究に対して様々な学識的・技術的協力を賜りました金沢大学薬学系・教授加藤将夫氏、川崎医療福祉大学医療技術学部・教授矢野博己氏、講師小柳えり氏、東京都健康長寿医療センター研究所大澤郁朗氏、名古屋

大学環境医学研究所 高橋真由美 氏、ならびに順天堂大学スポーツ健康科学部・先任准教授 福典之 氏に対して深く感謝申し上げます。

Conflict of interest

該当なし

References

- Banzet, S., Sanchez, H., Chapot, R., Peinnequin, A., Bigard, X. and Koulmann, N. (2012) Basal peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α expression is independent of calcineurin in skeletal muscle. *Metabolism* 61: 389-394.
- Chung, Y., Molé, 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.
- Doeller, J. E. and Wittenberg, B. A. (1991) Myoglobin function and energy metabolism of isolated cardiac myocyte: effect of sodium nitrite. *Am. J. Physiol.* 261: H53-H62.
- Garry, D. J., Bassel-Duby, R. S., Richardson, J. A., Grayson, J., Neuffer, P. D. and Williams, R. S. (1996) Postnatal development and plasticity of specialized muscle fiber characteristics in the hindlimb. *Developmental genetics* 19: 146-156.
- Gayeski, T. E. J., Connett, R. J. and Hoing, C. R. (1985) Oxygen transport in rest-work transition illustrates new functions for myoglobin. *Am. J. Physiol.* 248: H914-H921.
- Kanatous, S. B., Mammen, P. P., Rosenberg, P. B., Martin, C. M., White, M. D., Dimaio, J. M., Huang, G., Muallem, S. and Garry, D. J. (2009) Hypoxia reprograms calcium signaling and regulates myoglobin expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296: C393-C402.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R. and Spiegelman, B. M. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797-801.
- Park, C. B. and Larsson, N. G. (2011) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* 193: 809-818.
- Poole, D. C., Ferreira, L. F., Behnke, B. J., Barstow, T. J. and Jones, A. M. (2007) The final frontier: oxygen flux into muscle at exercise onset. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 35: 166-173.
- Reynafarje, B. (1963) Simplified method for the determination of myoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 138-145.
- Saks, V. A., Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olivares, J., Winkler, K., Wiedemann, F. and Kunz, W. S. (1998) Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol. Cell Biochem.* 184: 81-100.
- Srere, P. A. (1969) Citrate Synthase. *Methods in Enzymology* 13: 3-11.
- 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.
- Theorell, H. (1934) Kristallinisches myoglobin. *Biochem. Z.* 268: 73-82.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B. (1975) Role of myoglobin in the oxygen supply to red skeletal muscle. *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, J. B. (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen

- entry into muscle. *Physiol. Rev.* 50: 559-636.
- Wu, C. S. C., Duffy, P. and Brown, W. D. (1972) Interaction of myoglobin and cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 247: 1899-1903.
- Wu, H., Naya, F. J., Mckinsey, T. A., Mercer, B., Shelton, J. M., Chin, E. R., Simard, A. R., Michel, R. N., Bassel-Duby, R., Olson, E. N. and Williams, R. S. (2000) MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J.* 19: 1963-1973.
- 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.
- Yamada, T., Takakura, H., Jue, T., Hashimoto, T., Ishizawa, R., Furuichi, Y., Kato, Y., Iwanaka, N. and Masuda, K. (2016) Myoglobin and the Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complex IV. *J. Physiol.* 594: 483-495.

2020年10月8日受付

2020年11月5日受理