

平成 28 年度

順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科 修士論文

持久的トレーニングがラット骨格筋に
おけるミトコンドリアダイナミクスの
制御機構に及ぼす影響

学籍番号 4115027

氏名 中野 大輝

論文指導教員 町田 修一

合格年月日 平成 29 年 2 月 20 日

論文審査員 主査 内 藤 久 士

副査 和 気 香 文

副査 町 田 修 一

目次

第1章 諸言.....	3
第2章 関連文献の考証.....	5
第1節 細胞におけるミトコンドリアの役割.....	5
(1) ATP 生産.....	5
(2) Ca^{2+} とアポトーシス.....	6
第2節 ミトコンドリアの品質管理.....	6
(1) ミトコンドリア自身の品質管理と形態変化.....	6
(2) 筋小胞体によるミトコンドリアの品質管理.....	7
(3) 新たな因子である MARCH5 の役割.....	7
第3節 運動と骨格筋ミトコンドリアの品質管理.....	8
(1) タンパク質および遺伝子発現.....	8
(2) ミトコンドリアの形態変化.....	8
第4節 解決すべき点.....	9
第3章 目的.....	10
第4章 実験方法.....	11
第1節 実験動物および飼育条件.....	11
第2節 実験条件(群分け).....	11
第3節 持久的トレーニングプロトコール.....	11
第4節 骨格筋の摘出.....	12
第5節 電子顕微鏡によるミトコンドリア形態評価.....	12
(1) プロトコール.....	12
(2) 解析方法.....	12
第6節 生化学的分析.....	13
(1) サンプル処理.....	13
(2) ウェスタンブロッティング.....	13
第7節 統計処理.....	14

第5章 結果.....	15
第1節 PGC-1 α のタンパク質発現量.....	15
第2節 ミトコンドリアの形態変化.....	15
第3節 ミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質の発現.....	15
第6章 考察.....	16
第1節 ミトコンドリアへの形態的な影響.....	16
第2節 ミトコンドリアダイナミクスを制御する因子への影響.....	17
第7章 結論.....	19
要約.....	20
謝辞.....	21
引用文献.....	22
英文要約.....	27
略語表.....	29
図.....	30

第1章 諸言

エネルギーを産生するミトコンドリアは、独自のゲノム(mtDNA ; ミトコンドリア DNA)を持つ細胞小器官であり、分裂と融合を繰り返すことで形態を変化させる(ミトコンドリアダイナミクス)。これにはミトコンドリアの品質を管理することで呼吸機能を調節する役割があり、活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)による mtDNA の損傷や、膜電位が低下した部分などの除去に働く。また、酸化リン酸化能の向上にもミトコンドリアの形態が重要であるという可能性が示唆されている。このことから、生理学的な影響に対して、適切に融合と分裂のバランスを調整することが重要である。

これまで、ミトコンドリアダイナミクスに関わるタンパク質が数多く報告されており、融合には Mitofusin1 および 2(Mfn1, Mfn2)と Optic atrophy 1(Opa1)が、分裂には dynamin related protein 1(Drp1)および fission protein 1(Fis1)が関わっていることが知られている⁽¹⁾。これまでに、融合促進性タンパク質である Opa1 の発現減少または Mfn1, Mfn2 の抑制により、ミトコンドリアは断片化し呼吸機能は低下することが報告されている⁽²¹⁾⁽²²⁾。また、Mfn2 の過剰発現によってミトコンドリアは複雑化し、膜電位が向上することも知られている⁽²³⁾⁽²⁴⁾。

運動が健康の維持・増進に貢献することは周知の事実であるが、これには骨格筋におけるミトコンドリアダイナミクスが関与している可能性が示唆されている。Iqbal らは、持続的な筋収縮により融合促進タンパク質(Mfn1/2, Opa1)が増加し、分裂促進タンパク質(Drp1)が減少することを観察し、ミトコンドリアの融合が促進され機能的なミトコンドリアへと変化したことを示唆した⁽¹⁾。しかしながら、ミトコンドリアの形態的特徴については分析しておらず、持続的な筋収縮が、実際にミトコンドリアの形態変化を生じさせているか否かは不明なままである。

一方、持続的運動後には Drp1 の mRNA が増加することが報告されているから⁽²⁾、Drp1 のタンパク質分解が持続的トレーニングにより亢進される可能性が考えられる。最近、Drp1 を分解するユビキチンリガーゼが同定され、そのメカニズムが培養細胞レベルで明らかとなりつつある⁽³⁾。ミトコンドリア外膜局在の E3 ユビキチンリガーゼである membrane-associated RING-CH (MARCH)-5 のノックダウンによってミトコンドリア分裂が誘発される⁽³⁾。また、MARCH5 の機能として、Drp1 をユビキチン化することで、Drp1 をプロテアソームへ移行させて分解し、その結果ミトコンドリア分裂が抑制されることが報告されている⁽³⁾⁽⁴⁾。このことを踏まえると、持続的トレーニングに

よる Drp1 の減少には MARCH5 の増加が寄与している可能性がある。

以上のことから本研究の目的は、全身性の持久的トレーニングがラット骨格筋ミトコンドリアの形態およびその調節因子に与える影響を明らかにすることとした。

第2章 関連文献の考証

近年、高齢化が進み、本邦において平成26年度には医療費が年間40兆円に到達し⁽⁵⁾、医療費の拡大が問題となっており、自立した生活を送ることのできる年数である健康寿命の延伸が求められる。また、運動器の障害のために移動機能の低下をきたした状態(ロコモティブシンドローム:運動器症候群)に陥ることで、介護が必要となるリスクが高まる。運動器を形成する骨格筋は可塑性が高く、長期間のベットのレスト、ギプス固定などによる不使用や加齢によって萎縮する一方で、負荷をかけることで肥大する。また、骨格筋のミトコンドリアの量および機能も、不使用および加齢によって低下し、負荷をかけることによって向上する。しかしながら、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。近年、ミトコンドリアが融合と分裂を繰り返すこと(ミトコンドリアダイナミクス)によって自身の品質管理を行うことで、ミトコンドリア機能を維持していることが明らかとなった。またいくつかの研究において、筋収縮によってこれらの制御機能が変動することが示唆されている。修士論文では、ミトコンドリア機能が向上する持続的トレーニングが、ミトコンドリアダイナミクスに与える影響を明らかにすることを目的として行うものである。そこで本章では、まず初めにミトコンドリアの細胞内での役割に関する考証を行い、次に、ミトコンドリアダイナミクスを制御するメカニズムについての考証を行う。さらに、運動がミトコンドリアの品質管理に与える影響についてこれまでに明らかとなっている点について考証を行い、最後に解決すべき点をまとめる。

第1節 細胞におけるミトコンドリアの役割

(1) ATP 生産

ミトコンドリアは、細胞の生存に必要な不可欠なアデノシン三リン酸(adenosine triphosphate: ATP)の生産や、アポトーシスの調節、カルシウムイオン(Ca^{2+})の代謝調節などを行なう細胞小器官である⁽⁶⁾。外膜および内膜の二重膜構造をしており、外膜と内膜の間のスペースを膜間腔、内膜に囲まれたスペースをマトリクスと呼び、内膜は複雑に陥入しクリステを形成している⁽⁷⁾。そのミトコンドリアの主な役割はATP生産である。ATP生産は、ATP-CP系、解糖系およびミトコンドリアにおける有酸素系のエネルギー供給系により生産される。脂肪酸は β 酸化によってアセチルCoAに、また、グルコースを利用する解糖系の生産物であるピルビン酸は、マトリクス局在のピルビン酸脱水素酵素によって、アセチルCoAに変換され、ミトコンドリア内のTCA回路へ流される。最終的には内膜に局在するATP合成酵素および電子伝達系によって、酸化的リン酸化さ

れATPが合成される。

(2) Ca²⁺とアポトーシス

筋小胞体に貯蔵されているCa²⁺が細胞質内へ放出され、最終的に筋の収縮が発生する。そのCa²⁺が筋小胞体に局在している筋小胞体カルシウムATPアーゼ(sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase : SERCA)を介して、細胞内に放出されたCa²⁺を能動的に筋小胞体内へ取り込むことで筋が弛緩する⁽¹⁴⁾。さらに最近、Ca²⁺の取り込みにミトコンドリアが関連していると考えられている。ミトコンドリアは細胞質のCa²⁺を取り込み蓄積することで、エネルギー生産速度の調節やPTP開口による細胞死(アポトーシス)を引き起こす⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。アポトーシスの調節は、マトリックス内のCa²⁺の過剰な蓄積、膜電位の喪失、および活性酸素⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾によってミトコンドリア膜透過性遷移孔(permeability transition pore : PTP)が開口することによって、アポトーシス促進因子がPTPより細胞質へと放出される⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。放出されたアポトーシス促進因子は小胞体に局在するIP3受容体と相互作用し、小胞体からCa²⁺の放出が促進される⁽¹³⁾。これらの相乗効果により小胞体から放出されるCa²⁺の量が異常に上昇し、アポトーシスが引き起こされる。このように、筋収縮やアポトーシスなどにミトコンドリアが関与している。

第2節 ミトコンドリアの品質管理

(1) ミトコンドリア自身の品質管理と形態変化

ミトコンドリアは独自の遺伝子(mtDNA)を持ち、その変異やATP生産に必要な膜電位の低下などのような機能不全を示す刺激に応答し、融合と分裂を行うことで自身の品質管理を行っている。ミトコンドリア呼吸機能の低下によりROSが過剰に生産され、様々な基質が損傷を受ける。中でもミトコンドリア由来のROSによりmtDNAの損傷が生じ、mtDNAにコードされている呼吸鎖関連遺伝子の発現機能が低下する。その対抗策として、mtDNAの損傷に応答してミトコンドリア同士が融合し、蓄積された変異mtDNAを集合させその集合部分を分裂させる⁽³⁾⁽¹⁵⁾。また、膜電位の低下によっても分裂が誘発される⁽¹⁶⁾。

このミトコンドリアダイナミクスは、いくつかのタンパク質によって能動的に制御されている。融合を制御しているタンパク質は、外膜の融合に必要なmitofusin1と2(Mfn1, Mfn2)、および内膜の融合やクリステの形成に必要なoptic atrophy 1(Opal)である⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾。一方、分裂を制御しているタンパク質は、ミトコンドリア外膜局在のfission protein 1(Fis1)、および細胞質局在のdynamin-related protein 1(Drp1)である⁽¹⁸⁾。また、Drp1には活性型と不活性型があ

り、それぞれ Ser616 と Ser637 がリン酸化されることで制御されている⁽¹⁹⁾。ミトコンドリアダイナミクスを制御するタンパク質のバランスが変化することによって、ミトコンドリアの形態が変わることが培養細胞レベルで明らかとなっている⁽²⁰⁾。融合促進性タンパク質である Opa1 の発現減少または Mfn1, Mfn2 の抑制により、ミトコンドリアは断片化し呼吸機能も低下する⁽²¹⁾⁽²²⁾。一方で、Mfn2 の過剰発現によってミトコンドリアは複雑化し、膜電位が向上する⁽²³⁾⁽²⁴⁾。

(2) 筋小胞体によるミトコンドリアの品質管理

Mfn2 は小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) にも局在し、ミトコンドリア-ミトコンドリアの融合だけでなく、ミトコンドリア-ER の接着にも働く⁽²⁵⁾。ミトコンドリア-ER の接着点 (mitochondria-associated ER membrane : MAM) には様々な生理学的な意味があることが近年明らかとなりつつある。例えば、Drp1 が MAM に集積し、ミトコンドリアの分裂を引き起こす⁽²⁶⁾。さらに、MAM はミトコンドリアと小胞体の Ca^{2+} や脂質の受け渡し⁽¹³⁾、オートファジー⁽²⁷⁾ などの様々な機構に関与することが明らかとなりつつある。

(3) 新たな因子である MARCH5 の役割

ミトコンドリア形態変化のメカニズムが培養細胞において明らかとなりつつある。近年、membrane - associated RING - CH - 5 (MARCH5) がミトコンドリアダイナミクスに関与していることが培養細胞で示された⁽³⁾。MARCH5 は、分裂促進性タンパク質である Drp1 をユビキチン化させることで分解し、その結果ミトコンドリア分裂が抑制される⁽³⁾⁽⁴⁾。また、ミトコンドリア局在の Mfn2 もユビキチン化させることで小胞体局在の Mfn2 と結合させ⁽²⁶⁾⁽²⁸⁾、その結果 MAM が形成される。またその他にも、細胞質に局在するスーパーオキシドディスムターゼである SOD1 が変異した時にユビキチン化し、分解を促進させる⁽²⁹⁾。さらに MAP1B-LC1 には、ミトコンドリアの動きを抑制する役割があり、MARCH5 が MAP1B-LC1 に作用して分解を促進すること、MARCH5 をノックダウンすると MAP1B-LC1 がミトコンドリアに蓄積して、ミトコンドリア機能障害を引き起こすことが示されている⁽³⁰⁾。継続的な運動がミトコンドリアダイナミクスに影響を与えること、および細胞の抗酸化能力やミトコンドリア機能の維持に重要であることから、MARCH5 が持久的トレーニングによって変化すると考えられる。しかしながら、ヒト⁽³⁾およびラット⁽²⁶⁾の組織で遺伝子およびタンパク質発現していることは確認されているが、筋収縮や不活動、加齢などの生理学的変化が MARCH5 に与える影響をみた研究はない。

第3節 運動と骨格筋ミトコンドリアの品質管理

定期的な運動によって骨格筋のミトコンドリアが増加することは古くから知られており、ミトコンドリアの量、密度、呼吸機能⁽³¹⁾⁽³²⁾が向上する。また、近年ミトコンドリアの呼吸機能の維持に形態変化による品質の管理が関与していることが明らかとなったが⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾、定期的な運動、筋収縮によってもミトコンドリアの品質管理が活性化することが明らかとなりつつある。そこで、タンパク質および遺伝子発現レベル、またそれによる形態変化をみたこれまでの研究を以下にまとめる。

(1) タンパク質および遺伝子発現

一過性の低強度持久的運動によって、運動直後において融合および分裂の遺伝子発現レベルは変化しない⁽³³⁾⁽³⁴⁾が、24時間後において融合の遺伝子発現が上昇する⁽³³⁾。またトレーニング効果に着目してみると、ヒトにおいて高強度インターバルトレーニングの効果を検討した研究では、融合促進性タンパク質の Mfn2 は変化することなく、分裂促進性タンパク質の Drp1 と Fis1 が有意に増加する⁽³⁵⁾。また、遺伝子発現レベルでは、12週間の持久的トレーニングによって、Opa1 および Drp1 が増加する一方で、Mfn1 および Mfn2 は変化しない⁽²⁾。モデル動物を用いた研究では、ラットを用いた電気刺激による7日間の継続的な低強度の筋収縮によって、融合(Mfn2 と Opa1)が増加し、分裂(Drp1)が減少する⁽¹⁾。一方、筋肥大の効果が確認されている電気刺激による、ラットを用いたレジスタンストレーニングにおいては、4週間後に Mfn1、Mfn2 および Opa1 が増加し、Drp1、Fis1 は変化しなかった⁽³⁶⁾。以上のことから、運動の様式や強度、筋摘出のタイミングによって結果は異なるが、総じて骨格筋のミトコンドリアダイナミクスを制御する仕組みは運動や筋収縮により影響され、ミトコンドリアの品質管理が活発化すると考えられる。

(2) ミトコンドリアの形態変化

電子顕微鏡を用いた骨格筋細胞のミトコンドリアの超微細構造の変化に着目して運動が与える影響について検討した研究は、マウスを用いた自発走式モデルのみであり、回転ケージでの持久的運動では、ミトコンドリアの形態が変化しない⁽³⁷⁾。しかしながらこの研究は自発走モデルを採用しており、走速度や走行距離が一律でないことや、走行終了から解剖までの時間が一定ではない。

第4節 解決すべき点

運動がミトコンドリアダイナミクスに与える影響を検討してきたこれまでの研究のほとんどが、タンパク質もしくは遺伝子発現レベルでのものであり、それらの結果生じるミトコンドリアの形態変化に着目した論文は Picard らの先行研究のみである。しかしながら、その研究で採用されていた運動様式は自発走であり、ミトコンドリア分裂が誘発されるような運動モデルではなかった。そこで本研究では、先行研究で酸化系酵素活性の増加がトレーニング効果として認められ、我々の予備実験においても運動直後にミトコンドリアが断片化されることが確認されている運動強度および時間のプロトコールを用いたランニングを採用し、トレーニングを課した。また、ミトコンドリアダイナミクスを制御する新たな因子である MARCH5 の役割が培養細胞レベルで明らかとなったが、全身性の持久的トレーニングによって MARCH5 がどのように変動するのかを検討した研究はない。

以上のことから本研究の目的は、全身性の持久的トレーニングがラット骨格筋ミトコンドリアの形態およびその調節因子に与える影響を明らかにすることとした。

第3章 目的

本研究の目的は、全身性の持久的トレーニングがラット骨格筋ミトコンドリアの形態およびその調節因子に与える影響を明らかにすることとした。

第4章 実験方法

第1節 実験動物および飼育条件

本実験は平成27年度順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科修士論文(高木香奈)のサンプルを用いて実施した。本研究の被検動物は、雌性 Sprague-Dawley (SD) ラット 32 匹とし、3 週齢時に日本 SLC 株式会社(日本)から配給された。なお、持久的トレーニングによる骨格筋内脂肪蓄積モデルの作成を目的としたため雌性ラットを用いた。室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルに調節された順天堂大学さくらキャンパス内の生物環境調整装置室で飼育された。ラットは動物実験用のケージ($17 \times 26 \times 37 \text{ cm}$)内にて、2 匹ずつ飼育され、餌および水は自由摂取できるように与えた。また、週 1 日持久的トレーニング未実施日の定時に体重を測定した。本研究は順天堂大学実験動物委員会によって承認された(No. H27-03)。

第2節 実験条件(群分け)

5 日間の予備飼育期間の内の 2 日間に、全ラットを対象に小動物用トレッドミル(KN-73、夏目製作所、日本)に馴化させるために 1 日 10-20 分の馴化トレーニングを行った。その後、4 週齢時にラットを無作為に対照群(Control ; CON, $n=16$)群、持久的トレーニング(Training ; TR, $n=16$)群の 2 つの群にグループ分けした。また、各群の半数(CON 群 ; $n=8$ 、TR 群 ; $n=8$)は持久的トレーニングの効果を検証するために最大酸素摂取量($\text{VO}_{2\text{max}}$)の測定を行うグループに分類した。高木の修士論文では、介入から 7 週間後において、 $\text{VO}_{2\text{max}}$ が CON 群で $101.5 \pm 3.2 \text{ ml/kg/min}$ 、TR 群では $121.3 \pm 5.1 \text{ ml/kg/min}$ と測定され、TR 群が有意に高値を示したことから、トレーニング効果が認められた。

第3節 持久的トレーニングプロトコール

TR 群を対象に、8 週間の持久的トレーニングを小動物用トレッドミルにて、週 5 日の頻度で実施した。トレーニングプロトコールは、ヒラメ筋における CS 活性が 91.3%向上することが確認されている Dyck ら方法に基づいて行った⁽³⁸⁾。トレーニング開始時(1 週目)の運動強度は 21 m/min で行い、5 週目に 31 m/min になるように速度を漸増させ、5 週目から 8 週目の終わりまでは 31 m/min で行った。また運動時間は 1 週目で 30 分を行い、3 週目には 120 分になるように徐々に時間を長くしていき、3 週目から 8 週目の終わりまでは 120 分で行った。小動物用トレッドミルの傾斜角度は 8.5° とした。

第4節 骨格筋の摘出

8週間の介入終了から48時間後、ラットをイソフルラン麻酔下で屠殺後、ヒラメ筋を摘出した。摘出後速やかに重量を測定し、筋腹中央部の一部を電子顕微鏡観察用固定液内へ入れ組織を固定し、その後の処理まで4°Cで保存した。残りの筋は、生化学的分析用に液体窒素で瞬間凍結させ、分析まで-80°Cで凍結保存した。なお、屠殺3時間前から絶食を施した。

第5節 電子顕微鏡によるミトコンドリア形態評価

(1) プロトコール

ヒラメ筋を、摘出直後に電子顕微鏡用固定液[2.5%グルタルアルデヒド(TAAB, 303-1, UK) in 0.1M リン酸バッファー)で後固定まで固定し、その後 1%四酸化オスミウムで後固定した。固定された標本はエタノールで脱水処理され、Epok812 (応研商事, 日本)で包埋された。超薄切片が作成され、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で二重染色された。

(2) 解析方法

筋の横断面において、透過型電子顕微鏡(HT7700, 日立ハイテクノロジーズ, 日本)を用いて 8,000 倍の倍率で筋原線維間(intermyofibrillar ; IMF)ミトコンドリアを撮影した。分析対象とした筋線維(Fig. 1A)、および分析に用いた CON 群(Fig1B)と TR 群(Fig1C)の例を Fig1 に示した。両群 2~3 匹、1 匹あたり 3 本の筋線維から計 898 個のミトコンドリアを形態指標の分析対象として採用した。筋超薄切片作成時の切り出す角度によるミトコンドリア形態への影響を最小限にするため、2つの Z 膜間隔が 10 μ m から 15 μ m 離れた箇所を分析対象区域とした。撮影された画像は ImageJ ソフトウェア(version 1.49v, National Institutes of Health, Bethesda, MD)へ取り込み、手動でミトコンドリア外膜をトレースした。形態指標は以下に示す項目とした。

面積(μm^2)

周囲長(μm)

Feret の直径(μm) : 2 点の一番長い距離

円形度; $[4\pi \times (\text{表面積}/\text{周径}^2)]$: 1 に近いほど円形(0-1)

真球度; $[4 \times (\text{表面積}) / (\pi \times \text{長い軸}^2)]$: 1 に近いほど真球体(0-1)

縦横比; [長い軸/短い軸] : 長さ-幅比

形態因子; $[(\text{周径}^2) / (4\pi \times \text{表面積})]$: ミトコンドリアの複雑性

第6節 生化学的分析

(1) サンプル処理

ラットのヒラメ筋を、10倍量のホモジナイゼーションバッファー[RIPA Buffer(Thermo, USA), PhosSTOP EASY pack(Roche), および Halt Protease Inhibitor Cocktail(Thermo, USA)]中でホモジナイズし遠心分離(14,000×g, 10分, 4°C)し、分離後上清を回収した。得られたタンパク質の濃度は、BCA™ Protein Assay Kit(Thermo, USA)を用いて測定し、濃度が1.5mg/mlになるように Laemmli Sample Buffer [Laemmli Sample Buffer(BIO RAD, USA) および 2-Mercaptoethanol(sigma-aldrich, USA)]を用いて調整した。その後、すべてのサンプルをドライブロックバス(AS ONE, EB-603)を用いて 100°Cで5分間加熱し、分析まで-80°Cで保存した。

(2) ウェスタンブロッティング

タンパク質の分析には、SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)法を用いた。サンプルは各レーンあたり10µlを負荷し、分子量マーカー(Precision Plus Protein™ WesternC™, BIO RAD)とともに50mAで45分泳動した。泳動後、HorizeBLOT 2M-R(ATTO, 日本)を用いて306mAで30分通電し、Polyvinylidene difluoride membrane(PVDF膜: Amersham Biosciences)に転写した。その後、5%(w/v) Skim milk/TTBS [EzTBS(ATTO, 日本) および0.05%Tween20]または5%BSA/TTBSを用いて1時間のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、5%(w/v) Skim milk/TTBS または5%BSA/TTBSで希釈した一次抗体と、2時間(室温)もしくは18時間(4°C)反応させた。用いた抗体は、ミトコンドリア関連タンパク質の主要転写因子であるPGC-1α(1:5000, santa cruz biotechnology, USA)、ミトコンドリア融合に関わるMfn2(1:5000, Abcam, UK)、ミトコンドリア分裂に関わるDrp1(1:1000, abcam, UK)、Drp1の活性化型であるphosphorylated^{Ser616}-Drp1(1:1000, Cell Signaling, USA)、Drp1の不活性化型であるphosphorylated^{Ser637}-Drp1(1:1000, Cell Signaling, USA)、新たなミトコンドリア分裂制御タンパク質であるMARCH5(1:500 東京工業大学 中村信大准教授より分与⁽²⁶⁾)であった。一次抗体反応後、TTBSで10分×3回洗浄し、室温で1時間の二次抗体反応を行った。二次抗体は、5%(w/v) Skim milk/TTBSで希釈したAnti-Rabbit IgG H&L(Abcam, UK)またはAnti-mouse IgG Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody(GE Healthcare, UK)を用いた。また、分子量マーカーを発光させるために、precision protein strep tactin-HRP conjugate(1:20000, BIO RAD, USA)を用いた。二次抗体反応終了後、TTBSで10分×3回洗浄しEzWestLumi plus(ATTO, 日本)を用いて発光させた。

第7節 統計処理

本研究で得られたデータはすべて平均±標準誤差で示した。2群間比較においては、対応のないt検定を用いた。いずれも有意水準は $p < 0.05$ とした。

第5章 結果

第1節 PGC-1 α のタンパク質発現量

Fig. 2は持久的トレーニングがヒラメ筋における、PGC-1 α のタンパク質発現量に与える影響を示したものである。CON群に比べTR群で135%の増加が観察された。

第2節 ミトコンドリアの形態変化

持久的トレーニングによるヒラメ筋のミトコンドリアの形態変化を評価するため、電子顕微鏡法を用いて定量化した。CON群に比べTR群で、円形度(Fig. 3D)および真球度(Fig. 3E)が有意に増加し、形態因子(Fig. 3G)が有意に低下した結果、ミトコンドリアの形態が断片化、単純化した。その他の形態指標においては有意な差は観察されなかった。

第3節 ミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質の発現

Fig. 4は持久的トレーニングがヒラメ筋におけるミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質の発現量に与える影響を示したものである。融合を制御するMfn2に持久的トレーニングによる影響はみられなかった(Fig. 4A)。分裂を制御するDrp1(Fig. 4B)、活性化型のphosphorylated Ser⁶¹⁶-Drp1(Fig. 4C)、不活性化型のphosphorylated Ser⁶³⁷-Drp1(Fig. 4D)、およびMARCH5(Fig. 4E)の発現量も変化しなかった。

第6章 考察

本研究の目的は、全身性の持久的トレーニングがラット骨格筋ミトコンドリアの形態およびその調節因子に与える影響を明らかにすることであった。持久的トレーニングによって、CON 群と比較して VO_{2max} が19.5%向上し、ヒラメ筋におけるPGC-1 α に135%の増加がみられた。同一プロトコルでの実験を行ったDyckらの研究ではヒラメ筋におけるCS活性が91.3%向上した⁽³⁸⁾。このことから本研究で用いた持久的トレーニングモデルは、全身持久力の向上および骨格筋ミトコンドリア機能の向上に対して、適切な持久的トレーニングであったと考えられる。

第1節 ミトコンドリアへの形態的な影響

ミトコンドリアダイナミクスの表現型であるミトコンドリアの形態を、電子顕微鏡を用いて定量的に解析を行った。本研究では、呼吸機能の向上が確認されている8週間の持久的トレーニングによって、ラットヒラメ筋ミトコンドリアは円形度および真球度が有意に増加し、形態因子が有意に低下した結果、ミトコンドリアの形態が断片化、単純化した。これらの結果はミトコンドリア形態が複雑化せず、生体内ではミトコンドリアの呼吸機能と形態が一致しない条件がある可能性を示唆している。運動がミトコンドリアの形態変化に与える影響について検討した研究は、マウスを用いた自発走式モデルのみであり⁽³⁷⁾、それによると、本研究で用いたいずれの形態指標（面積、周囲長、Feret径、円形度、真球度、縦横比、形態因子）においても変化がなく、本研究で得られた結果とは異なる。しかしながら、我々の予備実験において、トレーニングを行っていないラットに持久的運動を課すと、面積、周囲径および形態因子が低下し、円形度が増加する結果となり、ミトコンドリアが断片化される可能性が示唆されている（Nakanoら、APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exercise. Phoenix, USA, 2016.にて発表）。また、予備実験での持久的運動直後にみられたミトコンドリアの断片化に比較して、持久的トレーニング後のミトコンドリアの断片化は軽度であった（Nakano D., Takagi K. and Machida S. APS Intersociety Meeting: The Integrative Biology of Exerciseにて発表, 2016）。ミトコンドリアの形態変化はミトコンドリア由来のROSに応答するが⁽⁴⁰⁾、ROSの除去に働くSOD2（ミトコンドリア局在のスーパーオキシドディスムターゼ）の増加率は、レジスタンストレーニングおよび持久的トレーニングでそれぞれ11%および50%であり⁽³⁶⁾⁽⁴¹⁾、レジスタンストレーニングに比較して持久的トレーニングにおいて抗酸化能力が高まる。このことから、SOD2の増加によってミトコン

ドリア形態変化のトリガーとなる ROS を除去する能力が高まり、ミトコンドリアの断片化が軽減された可能性が考えられる。

本研究において採用した筋はラットヒラメ筋であり、酸化筋線維は 100%(type1:80.19%、type2a:19.81%)である⁽⁴²⁾。安静時におけるヒラメ筋(遅筋線維優位)のミトコンドリア形態は、外側広筋(速筋線維優位)のそれに比べて複雑性を有している⁽⁴³⁾。よって、ラットヒラメ筋のミトコンドリアはすでに複雑で機能的な形態であり、トレーニング効果が大きく現れなかったと考えられる。また、メカニカルベンチレーションによる不活動によって、横隔膜のミトコンドリアが断片化しミトコンドリア呼吸機能は低下する⁽³⁹⁾ことを考慮に入れると、酸化筋線維に局在するミトコンドリアも形態変化をする能力を有しており、筋細胞内の環境が大きく変化した時にミトコンドリア形態が変化するかもしれない。

第2節 ミトコンドリアダイナミクスを制御する因子への影響

本研究において、ミトコンドリアの形態を制御しているタンパク質の変化に着目し分析を行ったが、変化はみられなかった。Kitaoka らによると、筋肥大を目的とした電気刺激終了 48 時間後において融合促進タンパク質(Mfn1、Mfn2、Opa1)が高いまま維持される⁽³⁶⁾。しかしながら、Kitaoka らは速筋線維優位の腓腹筋を被検筋とし、本研究で採用したヒラメ筋とは大きく異なる筋線維組成となっている。遅筋線維優位な筋(ヒラメ筋、腓腹筋および大腿四頭筋の赤色部)が、速筋線維優位な筋(腓腹筋および大腿四頭筋の白色部)に比べて、ミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質を豊富に有しているため⁽⁴¹⁾、ヒラメ筋におけるトレーニング効果がみられなかった可能性がある。

また、採用した運動刺激モデルの違いによる影響も考えられる。実際に、電気刺激を用いない運動によるミトコンドリアダイナミクスは、電気刺激を用いた運動によるそれと異なる動態を示す。Iqbal らによると持続的トレーニングモデルである低強度の電気刺激によって、融合促進タンパク質(Mfn2、Opa1)が増加するが⁽⁴¹⁾、ヒトにおいて自転車エルゴメーターを用いた高強度インターバルトレーニングの効果を検討した研究では、融合促進性タンパク質は変化しない⁽³⁵⁾。さらに、Fealy らは、12 週間の持続的トレーニングによって Mfn1 および Mfn2 の遺伝子発現が変化しないことを示した⁽²⁾。このことから、本研究で用いた動物用トレッドミルによる持続的トレー

ニングは、Mfn2 を増加させるには適さない運動様式であった可能性がある。一方、分裂促進性タンパク質は融合促進性タンパク質と異なる動態を示す。筋肥大モデル(電気刺激)では分裂促進タンパク質は変化せず⁽³⁶⁾、持久的トレーニングモデル(電気刺激)では分裂タンパク質は減少する⁽¹⁾。しかしながら、持久的トレーニング(自転車エルゴメーター+ウォーキング)、および高強度インターバルトレーニング(自転車エルゴメーター)によって、遺伝子発現およびタンパク質発現が、分裂促進へと傾くことを示唆している⁽²⁾⁽³⁵⁾。このことから、本研究で得られた分裂促進性タンパク質が変化しないという結果は、融合促進タンパク質にみられるような運動様式による影響以外の要因の存在を示唆するものである。また、卵巣摘出モデルにおいてエストラジオールがミトコンドリアダイナミクスに影響を与える可能性が示唆されている⁽⁴⁴⁾。本研究において雌性ラットを使用したが、解剖のタイミングやトレーニングを月経周期のフェーズを考慮して行うことは実験デザインの関係上できなかったため、この点においては本研究の限界点である。正常月経周期を有するラットの血漿エストラジオール濃度の違いが、ミトコンドリアダイナミクスに与える影響を明らかにするためには、さらなる研究が求められる。

MARCH5 は様々な役割を担う E3 ユビキチンリガーゼであるが、その一つに Drp1 をユビキチン化し分解する役割があり、その結果分裂が抑制されミトコンドリアが複雑な形態を示す。しかしながら、この役割は培養細胞のみで確認されており、運動、不活動、加齢などの要因でどのような変化を示すのかを検討した研究はない。本研究の持久的トレーニングによって、MARCH5 に変化がなく、Drp1 も同様に変化しなかった。MARCH5 が Drp1 をユビキチン化させプロテアソームへ移行させることから⁽³⁾⁽⁴⁾、Drp1 の減少がみられなかったのは MARCH5 が増加しなかったためと考えられる。しかしながら、持久的トレーニングによって Drp1 の遺伝子発現の増加が生じる⁽²⁾ことを考慮に入れると、適切にタンパク質へ翻訳されていない可能性がある。だが、Drp1 の遺伝子発現、および Drp1 のユビキチン化の分析を行っていないことから推察の域を出ない。また、MARCH5 には Mfn2、MAP1B-LC1 および変異した SOD1 もユビキチン化する能力があることが示されている。今後は、これらのタンパク質も含めたユビキチン化分析が行われることが求められる。

第7章 結論

全身性の持久的トレーニングは、ラットのヒラメ筋ミトコンドリアの形態を断片化させる一方で、ミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質の変化を生じさせない可能性が示唆された。

要約

【背景】

エネルギーを産生するミトコンドリアは、独自のゲノム (mtDNA; ミトコンドリア DNA) を持つ細胞小器官であり、分裂と融合を繰り返すことで形態を変化させる (ミトコンドリアダイナミクス)。これにはミトコンドリアの品質を管理する役割があり、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) による mtDNA の損傷や、膜電位が低下した部分などの除去に働く。最近、Drp1 を分解するユビキチンリガーゼが同定され、そのメカニズムが培養細胞レベルで明らかとなりつつある。ミトコンドリア外膜局在の E3 ユビキチンリガーゼである MARCH5 のノックダウンによってミトコンドリア分裂が誘発される。また、Drp1 をユビキチン化することで、Drp1 をプロテアソームへ移行させ分解し、その結果ミトコンドリア分裂が抑制されることが報告されている。本研究の目的は、全身性の持久的トレーニングがラット骨格筋ミトコンドリアの形態およびその調節因子に与える影響を明らかにすることとした。

【方法】

4 週齢の雌性 SD ラットを、8 週間の持久的トレーニング ($80\% \text{VO}_{2\text{max}}$, $120 \text{ min} \cdot \text{day}^{-1}$, and $5 \text{ days} \cdot \text{week}^{-1}$) を行う群 (TR 群) と対照群 (CON 群) に群分けした。持久的トレーニング 8 週目に、両群において最大酸素摂取量を測定した。ミトコンドリア形態の変化を評価するため、定量的電子顕微鏡法を用いて筋原線維間ミトコンドリアを撮影し形態指標を求めた。またその分子メカニズムを解明するため、ウェスタンブロット法を用いて、ミトコンドリア融合および分裂を制御するタンパク質量 (それぞれ Mfn2 および Drp1)、および Drp1 の活性化状態を定量化した。また新たなミトコンドリアダイナミクス制御因子である MARCH5 の分析も行った。

【結果】

TR 群において、PGC-1 α が CON 群に比べて有意な増加を示した。TR 群のヒラメ筋におけるミトコンドリアの形態は、CON 群と比較して円形度および真球度が高値を示し、形態因子が低値を示した。またそれらを制御する融合および分裂促進性のタンパク質量に、有意な変化はみられなかった。同様に MARCH5 も変化しなかった。

【結論】

全身性の持久的トレーニングは、ラットのヒラメ筋ミトコンドリアの形態を断片化させる一方で、ミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質の変化を生じさせない可能性が示唆された。

謝辞

本稿の執筆にあたり、多くの先生、博士研究員の方々にご指導、ご協力そしてご支援をいただきました。順天堂大学医学部形態解析イメージング研究室助教の角田宗一郎先生、ならびに技術員の守谷香織先生には電子顕微鏡観察用試料作成に関して、多大なるご尽力を頂きました。また、東京工業大学准教授の中村信大先生には MARCH5 の一次抗体を分与していただきました。皆様のご協力に心から感謝を申し上げます。最後になりましたが、実験の実施や論文の執筆にご協力いただきました運動生理学研究室の皆様にも厚く感謝いたします。

引用文献

- (1) Iqbal S., Ostojic O., Singh K., Joseph A.M., PhD, and Hood D.A. Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve* 48:963-970, 2013.
- (2) Fealy C.E., Mulya A., Lai N. and Kirwan J.P. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 117: 239–245, 2014.
- (3) Yonashiro R., Ishido S., Kyo S., Fukuda T., Goto E., Matsuki Y., Ohmura-Hoshino M., Sada K., Hotta H., Yamamura H., Inatome R., and Yanagi S. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *The EMBO J.* 25:3618–3626, 2006.
- (4) Nagashima S., Tokuyama T., Yonashiro R., Inatome R., and Yanagi S. Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J. Biochem.* 155:273-279, 2014.
- (5) 平成 26 年度 医療費の動向～概算医療費の年度集計結果～, 厚生労働省, 2015.
- (6) Duchen M.R. and Szabadkai G. Roles of mitochondria in human disease. *Essays Biochem* 47:115–137, 2010.
- (7) 楚中征哉. ミトコンドリア病の形態学. ミトコンドリア病, 3-26, 医学書院, 1997.
- (8) Bernardi P., Veronese P. and Petronilli V. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me2 binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem* 268:1005–1010, 1993.
- (9) Blattner J.R., He L. and Lemasters J.J. Screening assays for the mitochondrial permeability transition using a fluorescence multiwell plate reader. *Anal Biochem* 295:220–226, 2001.
- (10) Gunter T.E. and Pfeiffer D.R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol Cell Physiol* 258:C755–C786, 1990.
- (11) Shoshan-Barmatz V., De Pinto V., Zweckstetter M., Raviv Z., Keinan N. and Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* 31:227–285, 2010.

- (12) Wang C and Youle R.J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* 43:95–118, 2009.
- (13) Eisner V., Csordás G. and Hajnóczky G. Interactions between sarco - endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle – pivotal roles in Ca²⁺ and reactive oxygen species signaling. *J. Cell Sci.* 126:2965–2978, 2013.
- (14) MacLennan D.H., Rice W.J. and Green N.M. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J. Biol Chem* 272:28815–28818, 1997.
- (15) Chen H., Vermulst M., Wang Y.E., Chomyn A., Prolla T.A., McCaffery J.M. and Chan D.C. Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations. *Cell* 141:280–289, 2010.
- (16) Twig G., Hyde B. and Shirihai O.S. Mitochondrial Fusion, Fission and Autophagy as a Quality Control Axis: The Bioenergetic View. *Biochim Biophys Acta* 1777:1092–1097, 2008.
- (17) Meeusen S., DeVay R., Block J., Cassidy-Stone A., Wayson S., McCaffery J.M. and Nunnari J. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*, 127:383–395, 2006.
- (18) Romanello V., Guadagnin E., Gomes L., Roder I., Sandri C., Petersen Y., Milan G., Masiero E., Del Piccolo P., Foretz M., Scorrano L., Rudolf R. and Sandri M. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J.* 29:1774–1785, 2010.
- (19) Taguchi N., Ishihara N., Jofuku A., Oka T. and Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282:11521–11529, 2007.
- (20) Youle R.J. and Blik A.M.V.D. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337:1062–1065, 2012.
- (21) Chen H., Chomyn A., Chan D.C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280:26185– 26192, 2005.
- (22) Vielhaber S., Debska-Vielhaber G., Peeva V., Schoeler S., Kudin A.P., Minin I.,

- Schreiber S., Dengler R., Kollewe K., Zuschratter W., Kornblum C., Zsurka G. and Kunz W.S. Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion. *Acta Neuropathol* 125:245–256, 2013.
- (23) Santel A. and Fuller M.T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114(Pt 5):867–74, 2001.
- (24) Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14: 1405–1415, 2005.
- (25) Olga Martins de Brito and Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456, 605–610, 2008.
- (26) Nakamura N., Kimura Y., Tokuda M., Honda S. and Hirose S. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO reports.* 7, 10:1019-1022, 2006.
- (27) Hamasaki M., Furuta N., Matsuda A., Nezu A., Yamamoto A., Fujita N., Oomori H., Noda T., Haraguchi T., Hiraoka Y., Amano A. and Yoshimori T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 495:389-393, 2013.
- (28) Sugiura A., Nagashima S., Tokuyama T., Amo T., Matsuki Y., Ishido S., Kudo Y., McBride H.M., Fukuda T., Matsushita N., Inatome R. and Yanagi S. MITOL Regulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts via Mitofusin2. *Mol. Cell* 51:20–34, 2013.
- (29) Yonashiro R., Sugiura A., Miyachi M., Fukuda T., Matsushita N., Inatome R., Ogata Y., Suzuki T., Dohmae N., Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol Biol Cell.* 20(21):4524-4530, 2009.
- (30) Yonashiro R., Kimijima Y., Shimura T., Kawaguchi K., Fukuda T., Inatome R., and Yanagi S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:2382-2387, 2012.

- (31) Holloszy J.O. Biochemical adaptations in muscle: Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 10 242(9):2278-2282, 1967.
- (32) Bishop D.J., Granata C. and Eynon N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? *Biochim Biophys Acta* 1840, 1266-1275, 2014.
- (33) Cartoni R., Léger B., Hock M.B., Praz M., Crettenand A., Pich S., Ziltener J.R., Luthi F., Dériaz O., Zorzano A., Gobelet C., Kralli A. and Russell A.P. Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J. Physiol* 567.1:349–358, 2005.
- (34) Jamart C., Naslain D., Gilson H. and Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: 964–974, 2013.
- (35) Perry C.G.R., Lally J., Holloway G.P., Heigenhauser G.J.F., Bonen A. and Spriet L.L. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J. Physiol* 588.23:4795–4810, 2010.
- (36) Kitaoka Y., Ogasawara R., Tamura Y., Fujita S. and Hatta H. Effect of electrical stimulation-induced resistance exercise on mitochondrial fission and fusion proteins in rat skeletal muscle. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 40:1137–1142, 2015.
- (37) Picard M., Gentil B.J., McManus M.J., White K., Louis K.S., Gartside S.E., Wallace D.C. and Turnbull D.M. Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *J. Appl Physiol* 115:1562–1571, 2013.
- (38) Dyck D.J., Miskovic D., Code L., Luiken J.J.F.P., and Bonen A. Endurance training increases FFA oxidation and reduces triacylglycerol utilization in contracting rat soleus. *Am. J. Physiol.* 278:778–785, 2000.
- (39) Picard M., Azuelos I., Jung B., Giordano C., Matecki S., Hussain S., White K., Li T., Liang F., Benedetti A., Gentil B.J., Burelle Y. and Petrof B.J. Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the

- diaphragm. *J. Appl Physiol* 118:1161–1171, 2015.
- (40) Richard J. Y. and Alexander M. van der Blik. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337:1062-1065, 2012.
- (41) Bo H., Wang Y.H., Li H.Y., Zhao J., Zhang H.Y. and Tong C.Q. Endurance training attenuates the bioenergetics alterations of rat skeletal muscle mitochondria submitted to acute hypoxia: role of ROS and UCP3. *Acta Physiologica Sinica*. 60 (6):767-776, 2008.
- (42) Carolyn M.E., Laura H. S., Maria P.R., Michele L., Samuel R.W. and Richard L. L. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *J. Exp. Biol.* 211:2336-2345, 2008.
- (43) Nakano D., Takagi K. and Machida S. Endurance training cause distinct changes in mitochondrial morphology in different skeletal muscle types. *J. Phys Fitness Sports Med.* 5(6):505, 2016.
- (44) Amer G.C., Roig M.S., Pascual B.M.G., Proenza A.M., Lladó I., Gianotti M. and Palmer F.J.G. Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 221:391–403, 2014.

英文要約

Effect of endurance training on mitochondrial morphology and fission and fusion proteins in rat skeletal muscle cells

Daiki Nakano

Abstract

BACKGROUND and PURPOSE:

In mammalian cells, mitochondria remodel their structural shapes via dynamic fusion (maintaining functional mitochondria) and fission (removing dysfunctional mitochondria) events to adapt to external exercise-associated stimuli and functional needs. Therefore, we postulated that the dynamic events occurring in the mitochondria in response to acute exercise differ in trained and sedentary skeletal muscle cells (i.e., those with and without prior mitochondrial adaptations, respectively). MARCH5, a new mitochondrial dynamics-related protein, degrades Drp1 via ubiquitination. The aim of this master's thesis was to determine the effect of endurance training on the mitochondrial morphology and the amount of mitochondrial dynamics-related proteins, including MARCH5.

METHODS:

Female Sprague–Dawley rats (4 weeks old) were assigned to either endurance training (80% $\dot{V}O_2$ max, 120 min/day, and 5 days/week) or a sedentary control environment for 8 weeks. Approximately 900 intermyofibrillar mitochondria in the soleus muscle were analyzed by transmission electron microscopy. The shapes and sizes of sampled mitochondria using the ImageJ software based on the measurements of surface area, perimeter, aspect ratio, form factor, circularity, and roundness were estimated.

RESULT:

After 8 weeks of endurance training, the protein level of PGC-1 α was greater for the trained rats than for the sedentary rats. Although endurance training did not

change the amount of mitochondrial dynamics-related proteins, including MARCH5, the mitochondrial morphology became fragmented.

CONCLUSION:

Endurance training enhanced the mitochondrial fragmentation. No changes were observed with respect to the amount of mitochondrial dynamics-related proteins, including MARCH5.

略語表

mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
Mfn1	Mitofusin1
Mfn2	Mitofusin2
Opal	Optic atrophy 1
Drp1	dynamamin related protein 1
Fis1	fission protein 1
MARCH5	membrane-associated RING-CH-V
ATP	adenosine triphosphate
PTP	permeability transition pore
SERCA	sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
ER	endoplasmic reticulum
MAM	mitochondria-associated ER membrane
MAP1B-LC1	Microtubule-associated protein 1B-light chain 1
SD	Sprague-Dawley
VO _{2max}	maximal oxygen consumption
IMF	intermyofibrillar
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

図

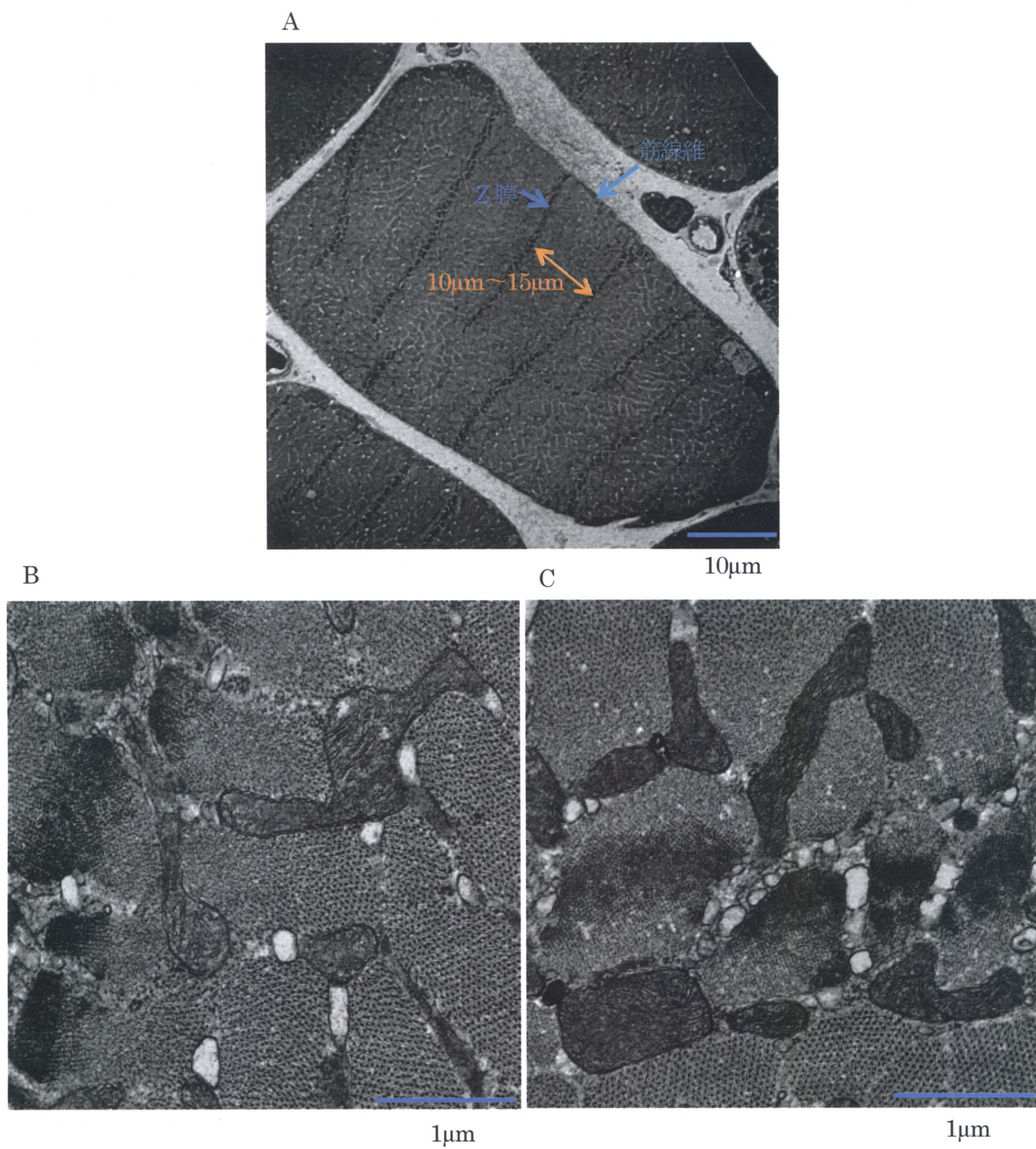


Fig.1 分析に用いた電子顕微鏡画像。(A) 分析対象とした筋線維の例。(B) 分析に用いた CON 群の画像 (8,000 倍)。(C) 分析に用いた TR 群の画像 (8,000 倍)

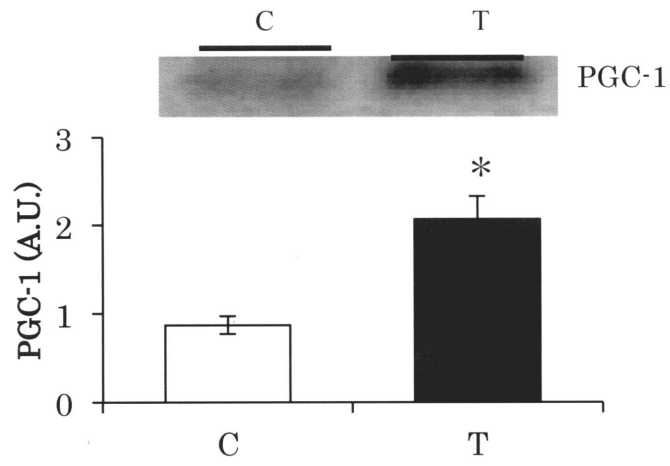
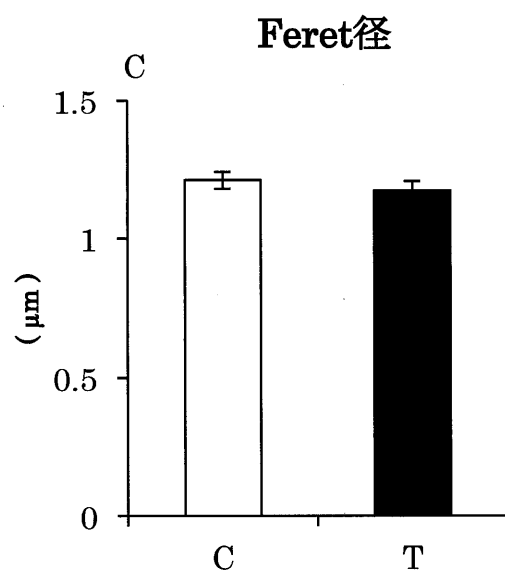
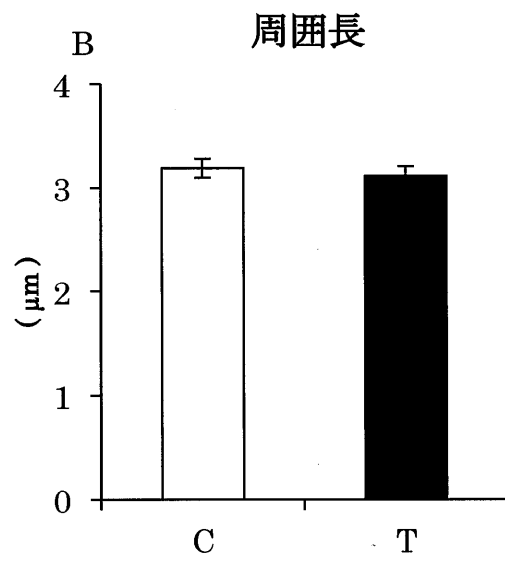
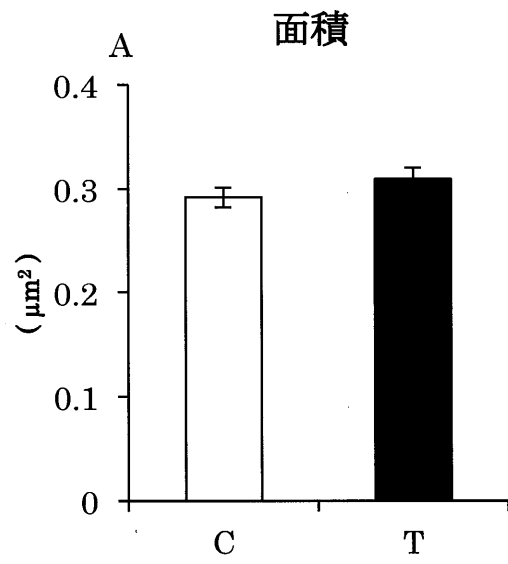


Fig.2 持久的トレーニングによる PGC-1 のタンパク質発現量への影響。

n = 8 / 群。 mean ± SE。 * : P < 0.05 vs. C。 C = CON 群。 T = TR 群。 A.U. = arbitrary unit



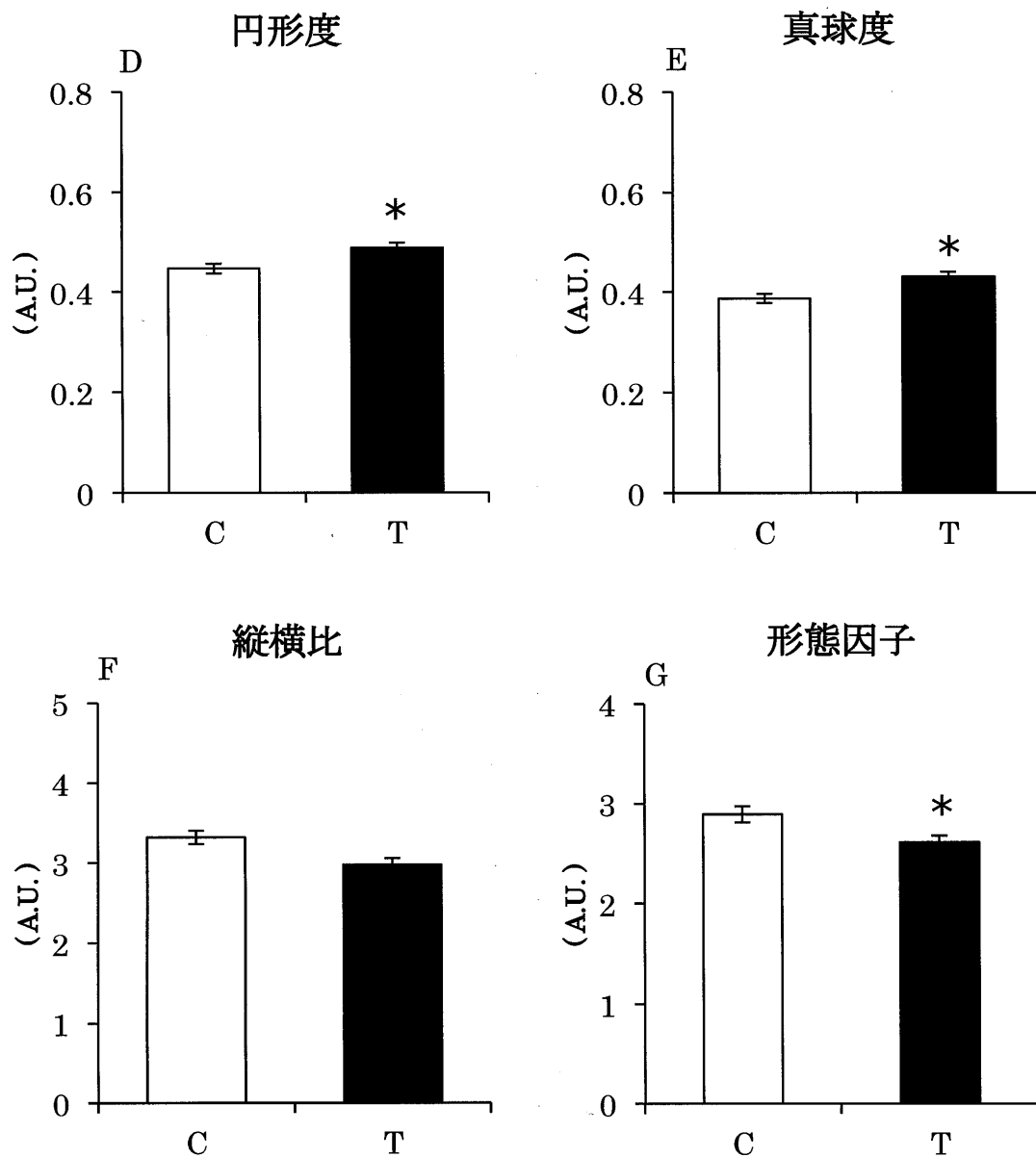
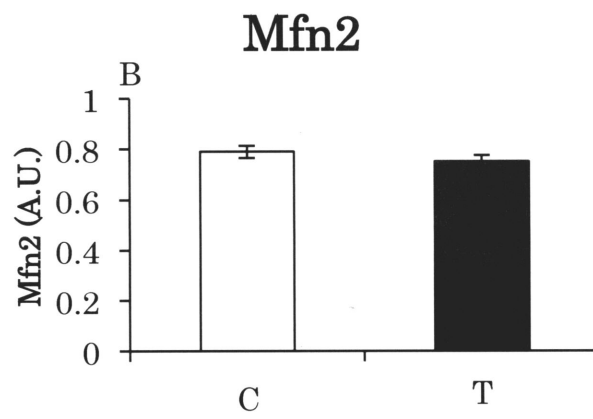
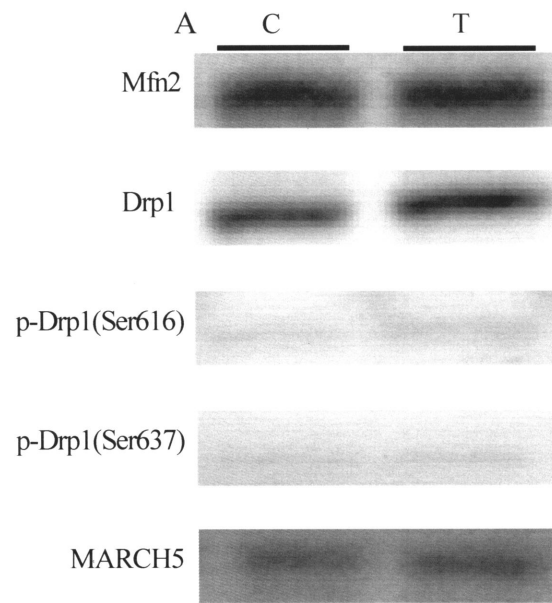


Fig.3 電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の組織学的評価。(A) 面積。(B) 周囲長。(C) Feret 径。(D) 円形度。(E) 真球度。(F) 縦横比。(G) 形態因子。

C = CON 群。T = TR 群。n = 8 / 群。mean ± SE。*: P < 0.05 vs. C。A.U. = arbitrary unit



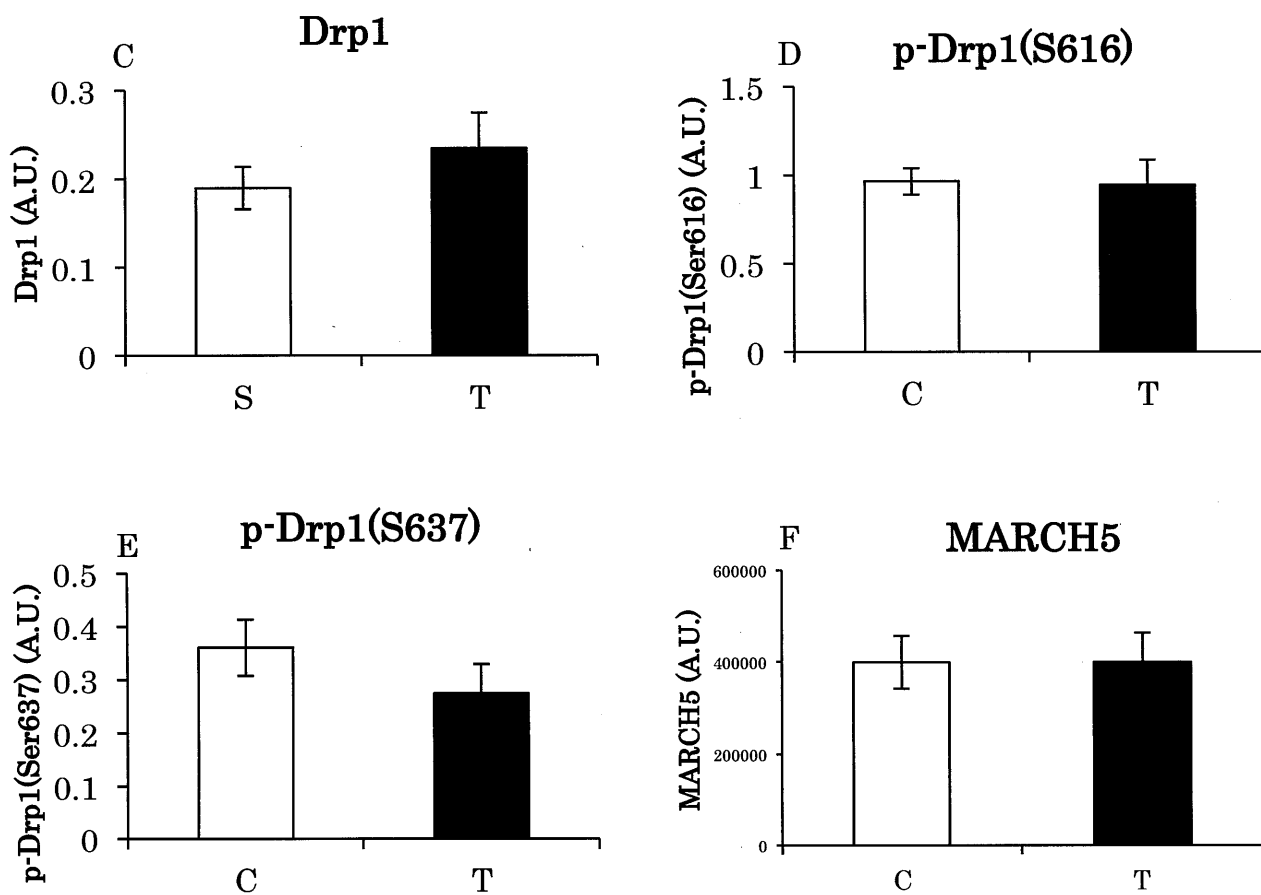


Fig.4 ミトコンドリアダイナミクス関連タンパク質の発現量。(A)ウェスタンブロット法による各タンパク質の検出バンド。(B) Mfn2。(C) Drp1。(D) phosphorylated^{Ser616}-Drp1。(E) phosphorylated^{Ser637}-Drp1。(F) MARCH5。

C = CON 群。 T = TR 群。 n = 8 / 群。 mean ± SE。 A.U. = arbitrary unit