

令和元年6月21日現在

機関番号：82645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18994

研究課題名(和文)筋細胞内カルシウムハンドリングに着目した骨格筋萎縮誘導メカニズムの検討

研究課題名(英文)Changes in calcium handling in denervated skeletal muscles.

研究代表者

大平 宇志(Ohira, Takashi)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・研究開発員

研究者番号：40633532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：坐骨神経切除後のマウスのヒラメ筋において、筋小胞体カルシウムATPase (SERCA)の機能を抑制するサルコリピンおよびホスホランバンが顕著に増加することを確認した。一方、長趾伸筋ではホスホランバンの増加は確認できたものの、その程度はヒラメ筋に比べて軽微であり、サルコリピンの増加は確認できなかった。また、ヒラメ筋ではSERCA2が軽微に増加したのに対し、長趾伸筋ではSERCA1が減少した。さらに、上記の変化は筋湿重量の減少と並行して確認された。これらの結果から、両筋におけるSERCAを介した細胞質から筋小胞体へのカルシウムイオンの取り込み能は筋萎縮の進行とともに低下したことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスのヒラメ筋および長趾伸筋において坐骨神経切除後の筋湿重量の減少と並行してSERCAの機能抑制タンパク質が増加することを確認した。この結果から、両筋におけるSERCAを介した細胞質から筋小胞体へのカルシウムイオンの取り込み能は筋萎縮の進行とともに低下したことが考えられる。したがって、SERCAの機能抑制タンパク質の増加は、筋萎縮開始時に筋細胞質内のカルシウムイオン濃度を上昇させる要因ではなく、筋萎縮進行中に筋細胞質内のカルシウムイオン濃度を高いまま維持する、またはさらに上昇させる要因となっていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Sarcoplipin (SLN) and Phospholamban (PLN) inhibit the activity of sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA). SLN and PLN proteins markedly increased in mouse soleus (Sol) muscle following denervation. The increase in PLN, but not SLN, protein was also observed in denervated extensor digitorum longus (EDL) muscle. However, the denervation-induced PLN level in EDL muscle was lower than Sol muscle. At the same time, increase in SERCA2 and decrease in SERCA1 were observed in denervated Sol and EDL muscles, respectively. These changes were become prominent according to decrease in the muscle wet weights. Increases in SLN and/or PLN were likely to be contributed to enhance the cytosolic calcium concentration in atrophying muscle fibers further, rather than trigger the elevation of the cytosolic calcium concentration.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：骨格筋 坐骨神経切除 カルシウムハンドリング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先行研究の結果からは、不活動や各種疾患に伴う筋細胞質内カルシウムイオン濃度の上昇がタンパク質分解酵素であるカルパインを活性化させ筋萎縮誘発の引き金となっている可能性が示唆されている。筋細胞内では、カルシウムイオンは通常、筋小胞体内に貯蔵されており、筋小胞体からリアノジン受容体を通じて細胞質に放出されたカルシウムイオンは筋収縮を誘導する。その後、細胞質内のカルシウムイオンは筋小胞体膜に存在する筋小胞体カルシウム ATPase (SERCA) の働きによって、再び筋小胞体内に取り込まれる。不活動や筋疾患に起因して筋細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇する分子メカニズムとして、リアノジン受容体のニトロシル化に伴いカルシウムイオンの筋小胞体からの流出が活性化される現象が先行研究により確認されている。これに加えて、SERCA の機能低下も筋細胞質内のカルシウムイオン濃度を上昇させる一因となっている可能性が考えられるが、この仮説に関する十分な研究結果は報告されていない。

### 2. 研究の目的

筋萎縮過程に筋細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇する分子メカニズムを明らかにするため、SERCA の機能を抑制することが知られているサルコリピンおよびホスホランパンに着目し、坐骨神経切除手術を施したマウスの萎縮過程にあるヒラメ筋と長趾伸筋における両タンパク質の役割を追究する。

### 3. 研究の方法

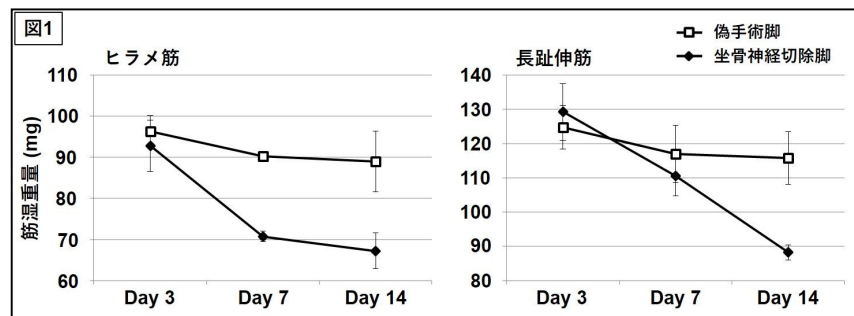
野生型マウス (C57BL/6J 系統、10 週齢、オス) の右の坐骨神経を切除し、3、7、14 日後にヒラメ筋および長趾伸筋を摘出した。また、同マウスの左後肢には、右後肢の坐骨神経切除手術と同じタイミングで、偽手術を施しコントロールサンプルを得た。摘出した骨格筋は湿重量を測定した後、速やかに液体窒素中で凍結し、解析に用いるまで -80 °C のディープフリーザー内で保管した。

骨格筋内タンパク質は、各骨格筋を Lysis Buffer (8 M urea, 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 4% sodium deoxycholate, protease inhibitor) 中でホモジナイズすることにより抽出した。骨格筋のホモジナイズには、BioMasher II および PowerMasher II (ニッピ (株)) を使用した。その後、各骨格筋より抽出された等量のタンパク質を用いて、ウェスタンブロットティング法により各種タンパク質の筋萎縮に伴う経時的発現変動を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 坐骨神経切除後のヒラメ筋と長趾伸筋の湿重量変化

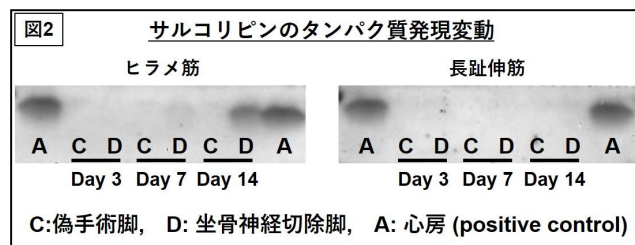
図 1 に示す通り、坐骨神経切除後の筋湿重量の減少 (筋萎縮) は、ヒラメ筋および長趾伸筋で確認された。しかし、その萎縮の進行は両筋肉で異なり、ヒラメ筋では萎縮が急激に進行し、坐骨神経切除後 14 日程度でプラ



トーに達するのに対し、長趾伸筋では徐々に萎縮が進行することが明らかになった。また、偽手術脚より摘出したヒラメ筋および長趾伸筋では筋湿重量の顕著な変化は確認されなかった。

#### (2) カルシウムハンドリングに係わるタンパク質の経時的発現変動

マウスのヒラメ筋において、坐骨神経切除後にサルコリピン (図 2) およびホスホランパン (図 3) の発現量が顕著に増加することを確認した。一方、長趾伸筋ではホスホランパンの発現量の増加は確認できたものの、その程度はヒラメ筋に比べて軽微であり、サルコリピンの発現量の増加は確認できなかった (図 2, 3)。ホスホランパンは 5 量体を形成することが知られているが、坐骨神経切除後のヒラメ筋および長趾伸筋においては単量体の発現量が増加した (図 3)。また、坐骨神経切除脚のヒラメ筋では遅筋に多く発現する SERCA2 の軽微な増加が確認されたのに対し、長趾伸筋では速筋に多く発現する SERCA1 の減少が確認された。さらに、これらのタンパク質発現の変動は筋湿重量の減少と並行して確認され、偽手術脚より摘出したヒラメ筋および長趾伸筋では確認されなかった。上記の結果は、両筋肉における SERCA を介した細胞質から筋小胞体へのカルシウムイオンの取り込み機能が、



C: 偽手術脚, D: 坐骨神経切除脚, A: 心房 (positive control)

坐骨神経切除により誘発された筋萎縮の進行とともに低下することを示唆している。したがって、坐骨神経切除後の SERCA の機能抑制タンパク質の増加は、筋萎縮のきっかけとなる筋細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇を開始させる要因ではなく、筋萎縮進行中に筋細胞質内のカルシウムイオン濃度を高いまま維持する、またはさらに上昇させる要因となっていることが考えられる。

(3) 筋萎縮進行中に筋細胞質内カルシウムイオン濃度が高く維持させることの影響

(2)に示した SERCA およびサルコリピン、ホスホランパンに加えて、筋細胞質内のカルシウムイオン濃度を低下させる機能を有する以下のタンパク質についても坐骨神経切除後の発現量の変動を確認した。しかし、いずれのタンパク質についても顕著な発現量の変動は確認されなかった。したがって、坐骨神経切除に伴い上昇した筋細胞質内のカルシウムイオン濃度は、萎縮が進行する間も高いまま維持された、またはさらに上昇した可能性が高い。

- $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase : 細胞膜に発現し、細胞質内のカルシウムイオンを細胞外に排出する機能を有する。
- Mitochondrial calcium uniporter : ミトコンドリアに発現し、細胞質内のカルシウムイオンをミトコンドリア内に取り込む機能を有する。
- Parvalbumin : 細胞質内に発現し、カルシウムイオンと結合して錯体を形成する。筋弛緩や細胞内カルシウムシグナルに関与することが知られる。

筋細胞質内のカルシウムイオン濃度の慢性的な上昇は、タンパク質分解酵素であるカルパインを活性化し筋萎縮誘発の引き金となることに加え、筋線維タイプの遅筋化にも寄与することが報告されている。そこで、筋線維タイプの遅筋化に関与する転写因子であり、脱リン酸化されることによりその機能が活性化されることが知られている Nuclear factor of activated T cells (NFAT)について、坐骨神経切除後のヒラメ筋および長趾伸筋におけるリン酸化状態を調べた。その結果、両筋肉においてリン酸化 NFAT の発現量が低下していることが確認された。また、両筋肉において、ミトコンドリアの生合成にかかわる Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC-1) の発現量が増加していることも確認された。実際に遅筋型ミオシン重鎖アイソフォームの発現量やミトコンドリアの量および機能が増加しているか等については今後の研究において確認する必要があるが、以上の結果は坐骨神経切除後のヒラメ筋および長趾伸筋において筋線維タイプの遅筋化を促す機構が活性化されていることを示唆している。坐骨神経切除後のヒラメ筋で確認された SERCA2 の発現量増加は、この影響に起因する変化である可能性があると考えられる。

さらに、筋細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇は骨格筋の収縮機能においても重要である。カルシウム存在下で結合したミオシンとアクチンの相互作用により筋肉が収縮し、ATP とミオシンが結合することにより結合したミオシンとアクチンが離れる。したがって、筋細胞質内のカルシウムイオン濃度の変化に加えエネルギー状態を調べることにより、坐骨神経切除後のヒラメ筋と長趾伸筋の筋機能の変化を推察することができるのではないかと考えた。そこで、細胞内のエネルギーセンサーとして機能し、AMP/ATP 比が上がることによりリン酸化される AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化状態を調べたところ、坐骨神経切除後のヒラメ筋および長趾伸筋においてリン酸化 AMPK の発現量が高まっていることを確認した。この結果は、筋線維内の AMP の増加または ATP の減少またはその両方によってもたらされたと考えられる。以上の結果から、坐骨神経切除後の骨格筋を構成する筋線維は細胞質内のカルシウム濃度が高まると同時にミオシンと結合できる ATP が少ない状態にあるため、収縮した筋肉が弛緩しにくくなっていることが推察される。したがって、SERCA の機能抑制タンパク質の増加が寄与する筋萎縮進行中の高い筋細胞質内カルシウムイオン濃度は、筋肉の拘縮にも関与している可能性があると考えられる。

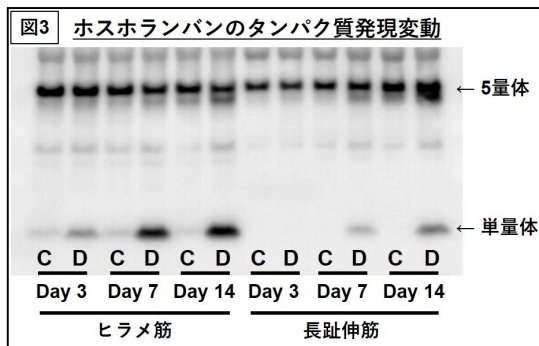
## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Katsuya Kami\*, Takashi Ohira\*, Yasuharu Oishi\*, Takayuki Nakajima, Katsumasa Goto, Yoshinobu Ohira. \*: Equally contributed authors, presented in alphabetical order. Role of 72-kDa heat shock protein in heat-stimulated regeneration of injured muscle in rat. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, accepted June 3, 2019.

〔学会発表〕(計 4 件)

大平宇志、井野洋子、中居佑介、森田啓之、河野史倫、後藤勝正、大平充宣、木村弥生、



平野久、マウスのヒラメ筋と長趾伸筋の重力変化に対する異なる応答メカニズムの検討、第 64 回日本宇宙航空環境医学会大会、2018 年  
井野洋子、大平宇志、森山佳谷乃、中居佑介、木村鮎子、熊谷研、齋藤知行、森田啓之、木村弥生、平野久、骨格筋タンパク質の比較定量解析手法の確立、第 66 回質量分析総合討論会・日本プロテオーム学会 2018 年大会・9th Asia-Oceania Human Proteome Organization (AOHUP0) Conference 合同大会、2018 年  
中居佑介、木村鮎子、森山佳谷乃、香川裕之、井野洋子、大平宇志、木村弥生、平野久、DIA 法を利用した後肢懸垂マウス血清の定量プロテオーム解析、第 66 回質量分析総合討論会・日本プロテオーム学会 2018 年大会・9th Asia-Oceania Human Proteome Organization (AOHUP0) Conference 合同大会、2018 年  
大平宇志、神山慶人、金子祐樹、宇宙飛行に伴う骨格筋の特性変化とその予防策の検討、第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会・日本宇宙生物科学会第 30 回大会 合同大会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。