

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700521

研究課題名（和文） 骨格筋線維の肥大時における筋核小体増加のメカニズム追及

研究課題名（英文） Mechanisms responsible for nucleolar accretion during fiber hypertrophy in skeletal muscle

研究代表者

河野 史倫（KAWANO FUMINORI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90346156

研究成果の概要：

筋核小体増加中に発現が増大する因子として、骨格筋肥大時における 27kDa heat shock protein (HSP27) のリン酸化動態変化を追究した。ウィスターハノーバー雄ラットをコントロール群と後肢懸垂群に分け、後肢懸垂群には 7 日間の尾部懸垂を実施した。懸垂群のうち半分のラットは、懸垂終了後に懸垂を解除し 5 日間床上で回復させた。実験前または懸垂終了時、回復 5 日後にそれぞれの群からヒラメ筋のサンプリングを行った。これらの摘出筋をホモジナイズし、可溶分画および不溶分画に分け採取した。ウェスタンブロット解析の結果、Ser15 または Ser85 がリン酸化された 1 リン酸化 HSP27 が通常時にもヒラメ筋の可溶分画に多く発現しており、筋原線維分画にはほとんど発現は認められなかった。後肢懸垂による筋萎縮時にはこれらのリン酸化 HSP27 発現は減少する傾向にあったが、回復中の筋肥大時には特に Ser15 がリン酸化された HSP27 の発現が増大し、筋原線維分画への顕著な移行が認められた。同時に 2 リン酸化 HSP27 発現も増加した。更に、可溶分画においてリン酸化 HSP27 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、筋肥大時にはミオシン軽鎖タンパク質との共沈量が減少することも分かった。さらに、HSP27 キナーゼ遺伝子に対するアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドまたはどの遺伝子とも相補性のないアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドをヒラメ筋中に注入した状態で、上述と同様の実験を実施し、キナーゼ遺伝子発現抑制が筋線維サイズ変化に及ぼす影響を組織化学的に評価した。アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドが残存している筋線維では、7 日間の後肢懸垂による筋線維萎縮の程度にはコントロールアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドとの差が見られなかったが、5 日間の回復後には有意な肥大抑制が認められた。以上の結果から、HSP27 は筋原線維構成タンパク質と分子複合体を形成し、筋肥大時にはリン酸化を受け筋原線維部へ移行し筋原線維の構築に関与していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：筋生理学

科研費の分科・細目：(分科)健康・スポーツ科学、(細目)スポーツ科学

キーワード：運動とトレーニングの分子機構

1. 研究開始当初の背景

老化等による骨格筋の萎縮は、Quality of Lifeの低下を招くだけでなく、身体活動の減少により諸生活習慣病の原因ともなり得る。高齢化した現代社会においては、このような筋の弱さを回避する処方策の解明が強く求められている。骨格筋線維の肥大は発育やトレーニングなどによって引き起こされるが、筋への負荷が除去された場合筋線維では発育抑制や萎縮が引き起こされることが分かっており、骨格筋が外部環境に対して柔軟に適応する能力を保持していることが明らかである。しかしながら、どのような生理的刺激がどのような機構を介して筋線維サイズを調節しているのかは未だ不明な点が多い。

現在のところ、筋線維内におけるAkt/mTORシグナルの活性化が、骨格筋のサイズ調節機構における主たるメカニズムであることが知られている。活性化されたmTORはリボソームタンパク質S6のリン酸化を促進させ、リボソーム形成およびタンパク質合成を増大させる。一方、後肢懸垂等のモデルにより筋への負荷を除去した場合、ヒラメ筋のような抗重力筋では、顕著な廃用性筋萎縮が引き起こされると同時にタンパク質合成も抑制されることが報告されている。これまでの我々の研究結果からも、床上安静状態では足関節の背屈によりラットのヒラメ筋はストレッチされ、持続的な筋活動を示すが、後肢懸垂中は足関節の伸展に伴う筋長の受動的な短縮によってヒラメ筋では張力発揮が抑制され、筋活動もほぼ消失するということが分かっている。逆に、後肢懸垂中足関節を背屈固定した場合、ヒラメ筋萎縮が起こらないという報告もあり、重力に抗した姿勢制御に伴う筋への機械的刺激および神経活動が、ヒラメ筋量の維持に不可欠であることが明らかである。

これまでに、筋の張力発揮による機械的刺激または神経活動がそれぞれ筋サイズ調節に対してどのような役割を果たすのかを追及してきた。その結果、協働筋腱の切除によりヒラメ筋へ過負荷を課した場合、筋線維肥大が誘発され、リボソームタンパク質S6のリン酸化も促進した。逆に、後肢懸垂によるヒラメ筋萎縮に伴い、リボソームタンパク質S6のリン酸化レベルの顕著な減少が認めら

れた。更に、ヒラメ筋を支配すると考えられる脊髄第4および第5腰椎における後根(感覚)神経を切除した場合、筋活動レベルの低下に伴いリボソームタンパク質S6のリン酸化が抑制されヒラメ筋では筋線維萎縮が誘発された。感覚神経切除に加えヒラメ筋に過負荷を課すと、リボソームタンパク質S6のリン酸化は正常レベルを保ち、筋線維サイズも変化しなかった。以上の結果は、張力発揮による筋線維への機械的刺激そのものがタンパク質合成に関わるシグナル伝達系の引き金となることを強く示唆するものである。更に、過負荷を課した筋線維では、筋活動レベルに関わらず、筋核中の核小体数が増加することを発見した。核小体は、核内におけるリボソームRNAの転写部位として知られており、上述のような過負荷によるタンパク質合成の促進に対して重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、骨格筋線維における核小体数の変化に関する研究は他になく、どのようなメカニズムで筋核小体が増殖するのかは全く不明である。

2. 研究の目的

「細胞周期の停止している筋核でどのように核小体数の変化が起こるのか?」、「核小体数の変化が、骨格筋においてどのような生理的刺激によって、また、どのようなシグナル伝達系を介して引き起こされるのか?」追求することを主たる目的として一連の研究を実施している。本実験においては、筋肥大中(筋核小体増加中)において発現増大が認められた因子として、ストレス応答タンパク質HSP27に着目し、筋線維肥大中にHSP27のリン酸化がどのように引き起こされ、どのような役割を果たしているのかを検討した。

3. 研究の方法

リン酸化HSP27 発現変化および共沈タンパク質の特定

ウィスターハノーバー雄ラット(14週齢、n=25)をコントロール群(n=15、うち実験前群n=5)と後肢懸垂群(n=10)に分け、後肢懸垂群には7日間の尾部懸垂を実施した。懸垂群のうち半分(n=5)のラットは、懸垂終了後に懸垂を解除し5日間床上で回復させた。

実験前または懸垂終了時、回復5日後にそれぞれの群からヒラメ筋のサンプリングを行った(各時点 n=5)。これらの摘出筋をホモジナイズし、可溶分画および不溶分画に分け採取した。これらの分画を用いてウエスタンブロットおよび免疫沈降を行った。

モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドの生体導入

成熟ウイスターハノーバー雄ラット(12週齢、n=30)を実験群とコントロール群に分け(各 n=15)、実験群には HSP27 キナーゼ遺伝子の翻訳を阻害するようにデザインされたモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド(50 µg)を、コントロール群にはどの遺伝子とも相補性がないようにデザインされたモルフォリノオリゴヌクレオチド(50 µg)を片側ヒラメ筋に注入した。注入するモルフォリノオリゴヌクレオチドにはフルオレセインで蛍光標識を付加した。2週間後、実験前群として各群 n=5 ずつからヒラメ筋のサンプリングを行った。ヒラメ筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し、-80で保存した。残りのラット(各群 n=10)には、後肢懸垂を実施した。7日後、懸垂直後群として各群 n=5 からヒラメ筋のサンプリングを行った。残りのラット(各群 n=5)は、懸垂を解除して床上に戻し、さらに5日間飼育し、サンプリングを実施した。

凍結保存したヒラメ筋から連続横断切片を作成し、これらの切片に対して組織化学染色を行い、HSP27 のリン酸化レベルおよび筋線維サイズを組織化学的に評価する。また、フルオレセインで蛍光標識されている筋線維をモルフォリノオリゴヌクレオチドが導入された筋線維とし、実験群とコントロール群それぞれのモルフォリノオリゴヌクレオチド陽性筋線維において以上の項目を比較した。

4. 研究成果

ウエスタンブロット解析の結果、Ser15 または Ser85 がリン酸化された 1 リン酸化 HSP27 が通常時にもヒラメ筋の可溶分画に多く発現しており、筋原線維分画にはほとんど発現は認められなかった。後肢懸垂による筋萎縮時にはこれらのリン酸化 HSP27 発現は減少する傾向にあったが、回復中の筋肥大時には特に Ser15 がリン酸化された HSP27 の発現が増大し、筋原線維分画への顕著な移行が認められた。同時に 2 リン酸化 HSP27 発現も増加した。更に、可溶分画を用いて HSP27 またはリン酸化 HSP27 特異的抗体による免疫沈降

を行った。沈降産物を 2 次元電気泳動し、出現したスポットは切り出し、質量分析した。その結果、HSP27 は通常大きなオリゴマーで存在していると考えられるが、リン酸化された場合分子複合体の大きさは小さくなり不溶分画へ移行することが明らかになった。また、HSP27 の共沈タンパク質としてミオシン軽鎖が同定され、肥大中の筋において共沈が増大していた。以上の結果は、リン酸化 HSP27 が筋原線維構築に関与するという示唆を与えるものであった。

さらに、HSP27 キナーゼ遺伝子に対するアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドまたはどの遺伝子とも相補性のないアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドをヒラメ筋中に注入した状態で、上述と同様の実験を実施し、キナーゼ遺伝子発現抑制が筋線維サイズ変化に及ぼす影響を組織化学的に評価した。アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドが残存している筋線維では、7 日間の後肢懸垂による筋線維萎縮の程度にはコントロールアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチドとの差が見られなかったが、5 日間の回復後には有意な肥大抑制が認められた。以上の結果から、HSP27 は筋原線維構成タンパク質と分子複合体を形成し、筋肥大時にはリン酸化を受け筋原線維部へ移行し筋原線維の構築に関与していることが示唆された。

本研究の結果、リン酸化 HSP27 と筋核小体の増加には直接の関係は見られなかったものの、筋肥大に対して重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、リン酸化 HSP27 は、細胞ストレス時には核に局在することも知られており、筋肥大中における HSP27 のリン酸化増大に伴い、核局在の増大も引き起こされる可能性も示唆される。核内においては mRNA のプロセッシングに関わる部位に局在しており、核小体形成との関わりも考えられる。筋肥大中において、HSP27 がリン酸化シグナルを受け筋原線維分画へ移行したように、同時に核移行も起こり、核小体数増加へ寄与しているか可能性も十分に考えられる。

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 2 件)

Kawano F., Takeno Y., Nakai N., Higo Y., Terada M., Ohira T., Nonaka I., and Ohira Y. Essential role of satellite cells in

the growth of rat soleus muscle fibers.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 295:
C458-C467, 2008.

Nakai N., Kawano F., Terada M., Oke Y.,
Ohira T., and Ohira Y. Effects of
peroxisome proliferator-activated
receptor alpha (PPARalpha) agonists on
leucine-induced phosphorylation of
translational targets in C2C12 cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1780: 1101-1105,
2008.

〔学会発表〕(計 1件)

Kawano F., Wang X.D., Nakai N., Higo Y.,
Terada M., Ohira Y., Nonaka I., and Ohira
Y. Gravitational loading stimulates
adhesion of satellite cells and myonuclear
accretion during fiber growth in rat
soleus muscle. 29th Annual International
Gravitational Physiology Meeting (22-27
Jun, 2008 in Angers, France).

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 史倫 (KAWANO FUMINORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90346156

(2)研究分担者

(3)連携研究者