

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21500629

研究課題名（和文）

運動の見える新規レポーター動物を用いた、運動・姿勢制御と骨格筋機能の解析

研究課題名（英文）

Analysis of muscle functions in exercise by producing exercise-reporter animals.

研究代表者

人見 嘉哲 (HITOMI YOSHIAKI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70231545

研究成果の概要（和文）：短半減期レポーター遺伝子を導入して作出した運動レポーター動物（TG 動物）について骨格筋におけるレポーター遺伝子発現レベルの検討を行い、加えて、骨格筋活動の生化学マーカーの検討を行った。作出した動物では、レポーター発現量が低く必ずしも運動を可視的に検出する当初の目的に合致しなかった。しかし、高輝度レポーター遺伝子とプロモーター活性を工夫することで、有用な運動レポーター動物作出に向けた基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the usability of transgenic animals, harboring a reporter gene encoding a short half-life reporter protein driven by the exercise-inducible promoter, on exercise and skeletal muscle study. The expression levels of reporter proteins were not necessarily enough to monitor the effect of exercise on individual muscle activity. However, these animals provide important insights in designing an exercise-reporter transgene to create an exercise-reporter transgenic animal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：スポーツ生化学

1. 研究開始当初の背景

我々の活動は、日常生活から高強度のスポーツまで 400 余りの骨格筋に支えられている。骨格筋は、動作の主体になる主動筋と協働筋、拮抗筋が協調して複雑な運動を可能にしている。しかし、主動筋に比較して、協働筋として作用する比較的小さな骨格筋がどのように機能するのかよく分かっていない。姿勢

制御や運動に関与する主動筋、協働筋、拮抗筋の機能分担を明らかにすることは、スポーツ科学やリハビリテーション科学の発展に非常に重要である。

骨格筋は、収縮速度や代謝能力の異なる遅筋線維(Type I)と速筋線維(Type II)で構成される。そこで、マウス、ラット、ラビットの全骨格筋における筋線維タイプの構成比率

を検索したところ、疲労に対する抵抗性が高い遅筋線維の分布は、7つの下肢骨格筋で非常に高く、50~95%を占めた(人見ら, 2005)。これらの骨格筋は、近接する主動筋に比較して非常に小さく、従来その役割は不明であった。解剖学的部位の検討から、安静時の姿勢保持に重要な役割を担うことが推察された。しかし、これらの比較的小さな骨格筋の役割を明らかにするためには、骨格筋の活動状態を視覚的に直接観察する必要があると考えられた。

そこで、運動により発現誘導される運動感受性プロモーター配列を用いて骨格筋内でレポータータンパク質を発現する遺伝子改変マウスの作成に取り組んできた。骨格筋活動を「見る」ことのできる運動レポーター動物は、比較的研究し易い運動の主動筋だけでなく、補助的な役割を果たす小さな骨格筋群の役割を明らかにすることが期待された。

2. 研究の目的

運動レポーター動物の作出には、骨格筋の維持、特に遅筋線維の発達に関与する Ca^{2+} /カルシニューリン情報伝達系の制御因子 **Regulator of calcineurin 1 (Rcan-1)** 遺伝子のプロモーター配列、レポーター遺伝子には、レポーター発現量を可視化できる緑蛍光タンパク質 (EGFP)、または、レポーター発現量の定量性に優れる firefly luciferase (Luc) 遺伝子を用いてきた。

運動レポーター動物では、骨格筋で適切な半減期を持つレポーター遺伝子が発現させる必要がある。これまでに、我々は EGFP、または、Luc 遺伝子に PEST 配列を挿入した短半減期レポータータンパク質遺伝子を作成し、遺伝子改変動物の作成を行った。

本研究では、作出されたファウンダー動物を基にレポーター遺伝子の発現量の確認、系統維持の容易なレポーター遺伝子ホモ動物の作成、及び、姿勢制御や運動強度に応じて動員される主動筋や協働筋、拮抗筋の相互関係と機能分担を明らかにすること、また、レポーター発現量の変動を評価するために、運動応答性の高い骨格筋活動量の生化学的マーカーの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物系統の選別と繁殖

これまでに作出した2種類の運動レポーター動物について、複数のファウンダー動物 (C57BL/6N 由来) でのレポーター遺伝子発現量を検討し、骨格筋活動を可視的にモニターできる系統を選択する。導入遺伝子の保持を目的とした交配を続ける一方で、レポーター遺伝子(TG)の保持とコピー数の維持を確認する。短半減期 GFP (mEGFP) 遺伝子を導

入した TG 動物 (以下 mEGFP-TG 動物) には、青色フラッシュライト下に緑蛍光を観察し GFP の発現を確認する。また、短半減期ルシフェラーゼ (mLuc) 遺伝子を導入した動物 (以下 mLuc-TG 動物) では、骨格筋抽出液を調製し、抽出液の Luc 発現量を化学発光法を用いて比較定量する。遺伝型が安定、且つ、TG 動作が確認できた系統について、受精卵の凍結保存、実験用動物の繁殖を進める。

(2) 安静時の骨格筋活動の観察

レポーター発現量の高い系統の mEGFP-TG 動物を繁殖させて実験に用いる。安静時の動物をペントバルビタール (IP, 50 mg/kg) 投与による深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド/PBS を用いて全身の灌流固定を行い、全身の骨格筋を体表に近い浅層から深層へ剖出し、適宜青色フラッシュライト下に GFP 蛍光シグナルを観察した。

(3) 運動負荷後のレポーター活性の検索

トレッドミルを用いて mEGFP-TG に急性運動を負荷する。先ず、比較的高強度の運動 (20 m/分で 1 時間) を施行し、経時的に青色ライト下に全身の GFP 蛍光強度の変化を観察した。

(4) 骨格筋活動量とレポーター発現量の解析

骨格筋におけるレポーター発現量の定量には、mLuc-TG 動物を用いた。

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下に氷冷した PBS を用いて全身灌流後、目的部位の骨格筋を同定し採取した。得られたサンプルは、骨格筋重量の3倍量のルシフェラーゼ抽出液 (氷冷) を加え、破碎後の上清を骨格筋抽出液とした。抽出液のルシフェラーゼ活性は、Promega 社の定量キットを用いて測定した。測定値をタンパク濃度で補正して各骨格筋で安静時に発現する単位タンパク量当たりのルシフェラーゼ活性とし、骨格筋間で比較検討した。

(5) 骨格筋活動量の生化学的マーカーの開発

組織抽出液中の AsA 濃度は、HPLC-ECD 法を用いて測定した。DHA 濃度は、Tris [2-carboxyethyl] phosphine Hydrochloride (TCEP) 処理により DHA を AsA に還元し HPLC-ECD 法にて測定した。HPLC-ECD による AsA 定量法は、移動相に 1.5 mM tetrabutylammonium hydroxide を添加した 40 mM sodium acetate buffer pH5.1、0.54 mM EDTA 溶液を流速 1.0ml/min で用いた。検出には、+500 mV の印荷電圧で電気化学検出器を用いた。

4. 研究成果

(1) レポーター発現量

研究開始時までに作出したファウンダー動物 (TG 動物) から導入遺伝子をホモで保持する動物を選別し、骨格筋における導入遺伝子 mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法を用いて検出した。

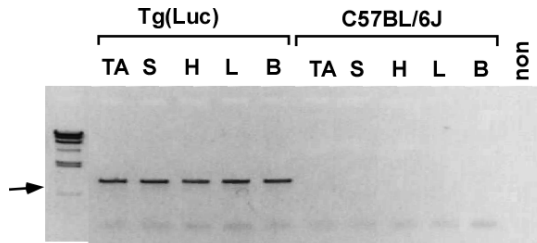


Fig. 1. Expression of transgene mRNA in skeletal muscles of a Tg(Luc) strain

図に短半減期 Luc 遺伝子を導入した 1 系統の結果を示す (Fig.1)。安静時、骨格筋組織の mRNA 量は、非常に低い発現レベルであることが確認できた。同様に短半減期 GFP (mEGFP) 遺伝子の導入に成功した 1 系統を分析したところ、安静時に低レベルの mRNA 発現を認めた。

青色フラッシュライト下に mEGFP-TG 動物における緑蛍光を観察したところ、肉眼的に動物組織の発する自家蛍光を超える緑蛍光を確認することはできなかった。そこで、トレッドミルによる運動負荷前後で緑蛍光の有無を経時的に観察した。しかし、Rcan1 遺伝子発現が 10 倍以上誘導される高強度運動負荷後でも可視的に緑蛍光の増強を確認することができなかった。また、骨格筋の凍結薄切切片を蛍光顕微鏡下に観察したが、安静時の標本上で自家蛍光と明らかに区別ができる蛍光発現を確認できなかった。

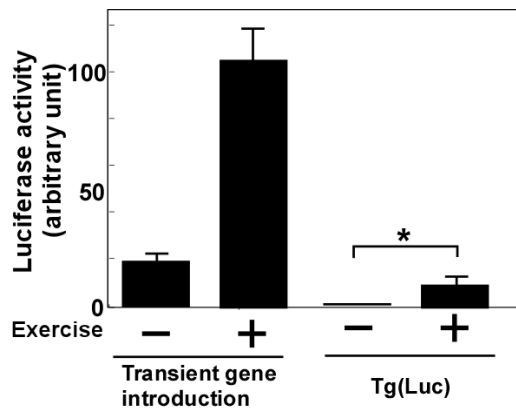


Fig. 2. Expression of luciferase activity in the Tg(Luc) skeletal muscle in comparison with transient transgene introduction.

mLuc-TG 動物を用いて導入遺伝子の発現と運動による発現誘導を生化学的に検討した。その結果、安静時でのルシフェラーゼ活性は骨格筋に TG 動物作出に用いたプラスミ

ドを一過性に導入した場合に比較して 5% 以下であった。TG 動物で急性運動負荷後のルシフェラーゼ活性は、運動後 2 時間で安静時の 9~10 倍に増加した。しかし、その活性は一過性に遺伝子導入をした場合、安静時ルシフェラーゼ活性の 50% 以下に留まった (Fig.2)。

(2) 生化学的な骨格筋活動マーカー

骨格筋活動を可視化する TG 動物におけるレポーター活性の評価には、全身的な運動強度を表すランニング速度・時間に加えて、この骨格筋レベルでの活動指標が必要である。骨格筋活動時には、酸素消費量の増加に伴い、酸化ストレス応答分子が非常に早い動態で変動すると考えられる。運動応答性の高い酸化ストレスマーカーとして、骨格筋組織中のデヒドロアスコルビン酸 (DHA) 定量法を確立した。DHA は、生理的半減期が 20 分程度と非常に短いアスコルビン酸 (AsA) 代謝産物で比較的軽度の運動直後から増加することを見いだした (Fig.3)。

さらに、骨格筋中の AsA、DHA 量は、個々の骨格筋で異なるという結果を得ており、骨格筋を構成するタイプ I、タイプ II 筋線維の割合や安静時の骨格筋活動量を反映する可能性が示唆された。

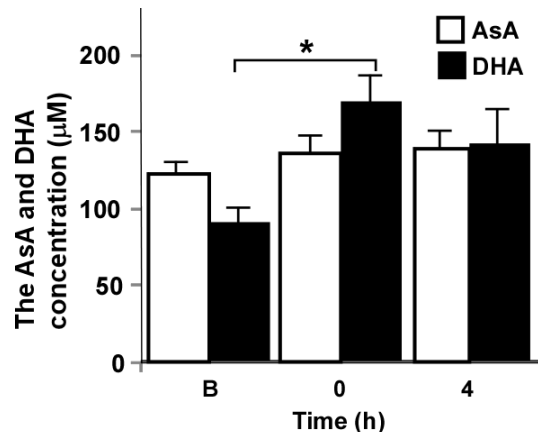


Fig. 3. The DHA concentration in skeletal muscle was increased immediately after acute exercise.

本研究では、樹立した TG 動物において安静時の運動レポーター分子、短半減期ルシフェラーゼ、または、GFP の発現が非常に低く、現在までに安静時の骨格筋活動量について信頼性の得られる結果を得ることはできなかった。これは、高い運動応答性を期待して短半減期レポーター遺伝子産物を用いたために、安静時のレポーター発現量、運動負荷時の発現誘導量が一過性の骨格筋内発現確認実験よりも低かったためと考えられる。

一方で、安静時の骨格筋活動量を検討する指標として AsA、DHA 量、AsA/DHA 比が有用である可能性を見いだした。運動を可視化する、特に個々の骨格筋活動を見ることのできる TG 動物を開発する上で、客観的な生

学的マーカーを用いた評価ができる利点は大きいと考える。

骨格筋活動をマクロレベルで検索可能な動物の作出は、運動科学分野で非常に有用な研究ツールを提供することが期待できることから、骨格筋活動を可視的に観察可能とするためには、1) 時間分解能を多少犠牲にして半減期の長い蛍光タンパクを用いる、2) 検出にマウス組織の自家蛍光の影響を受けない赤色蛍光タンパクを用いる、または、3) 量子効率の高い高輝度蛍光タンパクを用いる、必要があることを明らかにすることができた。

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7件)

- ① Sugimoto N, Miwa S, Ohno Shosaku T, Tsuchiya H, Hitomi Y, Nakamura H, Tomita K, Yachie A, Koizumi S: Activation of tumor suppressor protein PTEN and induction of apoptosis are involved in cAMP-mediated inhibition of cell number in B92 glial cells. *Neurosci Lett*, 査読有, Vol.497, 2011, pp.55-59.
- ② Tanaka T, Hitomi Y, Kabayashi Y, Hibino Y, Fukutomi Y, Shibata A, Sugimoto N, Hatta K, Eboshida A, Konoshita T, Nakamura H: The Differences in the Involvements of Loci of Promoter Region and Ile50Val in Interleukin-4 Receptor alpha Chain Gene between Atopic Dermatitis and Japanese Cedar Pollinosis. *Allergol Int*. 査読有, Vol.61, 2011, pp.57-63.
- ③ Sauriasari R, Sakano N, Wang DH, Takaki J, Takemoto K, Wang B, Sugiyama H, Sato Y, Takigawa T, Takahashi N, Kanbara S, Hitomi Y, Nakamura H, Ogino K: C-reactive protein is associated with cigarette smoking-induced hyperfiltration and proteinuria in an apparently healthy population. *Hypertens Res*, 査読有, Vol.33, 2010, pp.1129-1136.
- ④ Higuchi M, Hatta K, Honma T, Hitomi YH, Kabayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Nakamura H: Association between altered systemic inflammatory interleukin-1beta and natural killer cell activity and subsequently agitation in patients with Alzheimer disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 査読有, Vol.25, 2010, pp.604-611.
- ⑤ Sagara T, Hitomi Y, Kabayashi Y, Hibino Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Ogino K, Hatta K, Nakamura H: Common risk factors for changes in body weight and psychological well-being in Japanese male middle-aged workers. *Environ Health Prev Med*, 査読有, Vol.14, 2009, pp.319-327.
- ⑥ Kabayashi Y, Ogino K, Takemoto K, Imagama T, Takigawa T, Kimura S, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H: Preparation and Characterization of a Polyclonal Antibody against Brominated Protein. *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, Vol.44, 2009, pp.95-103.
- ⑦ Kabayashi Y, Binh NT, W Asakura H, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H, Ogino K: Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, Vol.44, 2009, pp.46-51.

[学会発表] (計3件)

- ① 人見嘉哲、神林康弘、中村裕之 (他7名)、マウスビタミンC代謝に対する急性運動の影響、第81回日本衛生学会学術総会、2011年3月、震災により日本衛生学雑誌、第66巻、誌上開催
- ② 人見嘉哲、辻本藤太郎、神林康弘、中村裕之 (他5名)、ストレスによるマウス血漿総抗酸化能、抗酸化物質濃度の変化、第9回分子予防環境医学研究会、2010年1月23日、東京大学医学部1号館、東京
- ③ 辻本藤太郎、人見嘉哲、神林康弘、中村裕之 (他3名)、Lipopolysaccharide (LPS) 投与マウス敗血症モデルにおける血漿中

抗酸化物質濃度と総抗酸化能の変化、第7
回日本予防医学会学術総会、2009年12
月12日、千葉大学西千葉キャンパス け
やき会館、千葉

[図書] (計1件)

- ① 人見嘉哲、日本予防医学会編、
特定健康診査 in 予防医学指導士テキス
ト、2009、pp197 - 206

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 嘉哲 (HITOMI YOSHIAKI)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：70231545

(2) 研究分担者

中村 裕之 (NAKAMURA HIROYUKI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：30231476

神林 康弘 (KAMBAYASHI YASUHIRO)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：20345630

(3) 連携研究者

日比野 由利 (HIBINO YURI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：40362008