

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700722

研究課題名(和文) サラブレッドの競走能力を制御する体内環境シンクロナイズ因子の網羅的解明

研究課題名(英文) Exhaustive analysis of synchronized factors regulating racing ability in thoroughbred horse

研究代表者

山野 聖子 (YAMANO, Seiko)

山口大学・大学研究推進機構・技術職員

研究者番号：00448276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：サラブレッドの体力要素に関する科学的知見は、競走馬の世界のみならず、ヒトを含む哺乳類の運動生理学や健康科学の分野に大きく貢献することが期待される。そこで、MyoD遺伝子の転写活性を骨格筋新生因子の指標として骨格筋新生因子の同定を試みた。細胞外に分泌されたタンパク質を大量に回収・分離し、活性を測定したが、酸化ストレス時の細胞外分泌因子は、いずれも転写活性を有していなかった。そこで、分泌タンパクを網羅的にプロテオーム解析し、100以上の新たな分泌因子を同定した。同定された因子から最も誘導が大きい4因子をクローニングし、培養細胞に導入した。今後、これらの因子について転写活性を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：To identify the differentiation factors released in an ischemia cell model using the myoblast-derived cell line, H9c2 cells to the skeletal muscle cells through MyoD, the cell supernatant was separated by ion exchange column, and was examined by MyoD transcriptional activity. The transcriptional activity was undetected in the supernatant. We have carried out proteomic analysis of proteins released from cells during ischemic hypoxia and reoxygenation using H9c2 cells. The cultured supernatant was concentrated more than 10,000-fold by column chromatographies, and the proteins were separated by SDS-PAGE. Proteomic data using nano-LC-Q-ToF-MS/MS showed more than 100 proteins specifically released from cells during hypoxic stress compared with control cells. The identified 4 factors were cloned, and introduced in H<sub>2</sub>O-tag. The cDNAs were transfected in HeLa cells, and partially purified by affinity column. In near future, the factors would be examined in MyoD transcriptional activity.

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：サラブレッド 骨格筋 体内環境シンクロナイズ因子

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は非常に適応能力に富んだ組織である。例えば、持久的トレーニングやレジスタンストレーニングによって、筋持久力の増強や筋肥大が生じる。一方で、長期間の不活動や休養は、筋萎縮や筋力の低下を引き起こす。また、筋の形態や量の変化に伴い、代謝酵素活性や毛細血管数も変化する。このように、筋細胞では、細胞同士は互いに情報を交換し、同調しながら、細胞外からの刺激に応じて形態や機能を常に変化させている。これらの適応変化を上手くとらえてトレーニングを行うことで、より大きなトレーニング効果を得ることができる。そのためには、どのような経路で刺激が伝達され、反応が生じるのかを知ることが不可欠である。

サラブレッドは走能力に優れた個体のみが300年以上も選別淘汰されてきた特異な品種である。そのことは、他の品種では骨格筋の総量が体重の45%程度であるのに対し、サラブレッドでは約53%を占めることでも明らかである。また、収縮速度の速い筋線維(速筋線維: type II 線維)が他の品種では70~80%であるのに対し、サラブレッドでは90%にも達する。type II 線維の中でも、競走能力に大きく関わるのは、最も収縮速度が速く、大きな発揮張力を有している type IIX 線維である。我々のこれまでの研究によって、サラブレッドのトレーニングでは、効果的に type IIX 線維を鍛えること、すなわち、type IIX 線維を十分に動員する運動を課すことが重要であることも証明されている。無酸素状態と有酸素状態を繰り返すインターバルトレーニングの重要性は、低酸素刺激によって運動能力を向上させる因子が何らかの組織から分泌されていることを示している。

## 2. 研究の目的

今回の研究の主な目的は、骨格筋新生のマスター遺伝子であり、単一遺伝子で繊維芽細胞から骨格筋を新生できる MyoD 遺伝子の転写活性を骨格筋新生因子の指標として、細胞外に分泌された体内環境シクロナイズ因子の中でも分泌型骨格筋新生因子の解明を行う。同定された因子をサラブレッドのバイオプシーから分離した繊維芽細胞に加え、骨格筋への筋新生を確認する。さらに、同定した分泌型骨格筋新生因子の分泌量をサラブレッドの血液から測定し、この因子の分泌量

と運動能力との相関関係を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) 心筋低酸素刺激に反応して分泌する骨格筋新生因子の解明

(心筋細胞の培養) 心筋由来株化細胞 H9c2 細胞をこれまでに研究室で確立した方法で行う。

(大量培養システム) これまでの培養条件をそのままスケールアップするため、最も培養面積が大きいセルトレイを用いる。10リットルの培養上清から分泌細胞を濃縮する。

(低酸素モデル) 実験モデルには、研究室で独自に確立した細胞レベルでの虚血モデルを使用する。

(細胞培養上清の調製) 培養上清を回収し80%硫酸アンモニウムを加え、蛋白質を沈殿させ、回収する。その後、透析を行い、硫酸アンモニウムを除いた後、限外濾過濃縮装置で溶液を濃縮し、活性測定に用いる。

(2) MyoD の DNA 結合ドメイン活性による骨格筋新生因子の精製

(MyoD DNA 結合ドメインのクローニング) MyoD DNA 結合ドメインを、pGL4 ルシフェラーゼ発現ベクターにサブクローニングした。

(luciferase assay) NIH3T3 細胞に pGL4-MyoD-promo-Luc ベクターとコントロールベクターを同時に挿入し、dual luciferase assay に用いた。

(イオン交換による蛋白質の単離) カラム溶液の pH 8.0 を用いることでできるだけ多くのタンパク質を陰イオン交換カラムに吸着させ、高塩濃度のグラジエントによってカラムに結合した蛋白質を徐々に分離溶出させた。その後、各フラクションを脱塩した後、ルシフェラーゼ発現ベクターを挿入した NIH3T3 細胞に添加し、12時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定する。活性フラクションを電気泳動し、銀染色し、バンドを確認した。

(ゲルからの蛋白質フラグメントの抽出) 電気泳動後、CBB 染色でバンドを確認し、脱色した後、トリプシンでゲル内消化を行う。その後、S-メチル化を行い、ペプ

チドフラグメントを水・アセトニトリルで抽出し、C18 チップカラムで精製した。( nano-LC-Q-TOF-MSMS 質量分析計による蛋白質の de novo シークエンス ) これまでに確立した方法を用いた現有している nano-LC-QToF-TOF-MSMS (Q-ToF micro;Waters) で de novo sequencing によって精製した蛋白質の配列を決定した。

( 3 ) サラブレッド中殿筋サンプルの採取 ( トレーニング ) 2 年 齢 時 に、16 ~ 24 週 間、週 に 5 日 の 割 合 で、低 速 で の 有 酸 素 運 動 と 高 速 で の 無 酸 素 運 動 を 併 用 し た 走 行 トレーニングを行う。運動内容と mRNA 発現量の相関を調べるため、ウマを 2 群に分け、強度の異なるトレーニングを課す。

( 漸 増 負 荷 運 動 試 験 ) トレーニング開始前後と、期間中の 4 週ごとに漸増負荷運動試験を行う。心拍数、最大酸素摂取量、血中乳酸値の測定を行い、トレーニングに対する全身の適応の状態の指標として用いる。試験終了後、筋サンプルの採取を行う。

( 筋 サンプルの採取 ) ニードルバイオプシー法を用いて、中殿筋サンプルを採取する。筋サンプルは、寛結節と尾根部を結ぶ線上の上 1/3 の部位の、深さ 5cm の位置から採取する。採取時期は、6, 12, 18, 24 か月齢と、トレーニングの開始前後、各漸増運動負荷試験後とする。

#### 4 . 研究 成 果

心筋由来の株化細胞を 1 リットル培養し、細胞を低酸素ストレス( 1 % 酸素濃度 ) 下で 2 時間刺激した。その後、通常の培養条件( 20% 酸素濃度 ) に戻し、24 時間培養した。その培養上清を全量陰イオン交換カラムにアプライし、塩濃度を徐々に増加させ、蛋白質を分離溶出させた。溶出したフラクションを 2ml ずつ試験管に分取し、その一部を活性測定用に取り分けた。このフラクションをそれぞれスピンカラムに詰めたゲルろ過カラムで精製し、混入した塩を除去した。同時に MyoD プロモーターの下

流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを骨格筋細胞に導入しておき、この遺伝子導入細胞に脱塩したフラクションを添加し活性を測定した。活性測定は、デュアルルシフェラーゼ測定を行い、コントロールベクターでデータを補正した。今回の実験では、有意な活性は認められなかった。分離したタンパク量が少なく、活性の検出限界以下ではなかったかと思われる。そこで、酸化ストレスにさらされた筋肉細胞の細胞培養上清から分泌しているタンパク質を回収濃縮し、プロテオーム解析を行った結果、100 以上の因子が同定され、最も分泌が顕著であった 8 因子のクローニングを行い、遺伝子配列を確認した。それぞれの遺伝子に検出するための V5 タグと分泌シグナルを付加した後、HEK293T 細胞に遺伝子導入した。このシステムでタンパクの分泌を確認しようと試みたが、いずれも細胞内に残存したままで分泌シグナルによる細胞外への放出は観察されなかった。また、タンパク質の分子量も予想外に低下しており、タンパクの分解が進行していることを示唆している。そこで、4 因子について、Halo タグを挿入した発現ベクターを骨格筋と心筋の性質を有している H9c2 細胞に遺伝子を導入し、タンパクの発現を TMR リガンドで染色しゲルで分離した後、DNA アレイスキャナーを用いて TMR の赤色蛍光を観察した。タンパク質はそれぞれ想定される分子量のタンパク質を発現していた。そこで大量に培養し Halo タグビーズを用いて精製を行った。それぞれほぼ単一のタンパク質に精製されており、このタンパク質を用いて筋芽細胞の分化を検証する方法に変更した。今後、これらの精製タンパク質を C2C12 細胞に添加し細胞の分化増殖能力を検証する。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山野 聖子(YAMANO, Seiko)  
山口大学・大学研究推進機構・技術職員  
研究者番号：00448276

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし