

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500791

研究課題名(和文)再生筋線維タイプの分化に対するマップキナーゼの役割と熱ストレスの影響

研究課題名(英文)The roles of MAPKinase to the differentiation of regenerating fiber phenotype and the effects of heat stress

研究代表者

大石 康晴(Oishi, Yasuharu)

熊本大学・教育学部・教授

研究者番号：10203704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK)と筋線維タイプの発現型との関連についてラット下肢骨格筋間で比較した結果、遅筋線維の割合の高いヒラメ筋でMAPKタンパク質発現量は最も低く、速筋線維の割合が高い腓腹筋表層部で発現量が最も高い結果であった。また、ラットヒラメ筋は発育～成熟期にかけて遅筋線維の割合が増加し、速筋線維の割合は減少する。その際、MAPKタンパク質の発現量は減少する傾向が認められた。

これらの結果から、MAPKタンパク質はラット下肢骨格筋の速筋線維タイプ発現に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： The relation between the skeletal muscle fiber phenotype and mitogen-activated protein kinase (MAPK) was investigated. Adult rat soleus muscle which contains the highest of slow fibers expressed lowest MAPK protein, while the highest level of MAPK protein was observed at the superficial portion of the gastrocnemius muscle which contains the highest of fast type fibers. In addition, the percentage of slow type fibers increase in an anti-gravity rat soleus muscle with growing and maturation, at those period MAPK protein gradually decreased.

These results may suggest that MAPK protein is relating to the expression of fast phenotype of rat skeletal muscle fibers.

研究分野：運動生理学(骨格筋生理学・生化学)

キーワード：マップキナーゼ ヒラメ筋 筋線維組成 速筋線維 遅筋線維 ミオシン重鎖 ラット 再生筋線維

1. 研究開始当初の背景

ラットヒラメ筋への塩酸プピバカイン投与により、筋線維は完全に破壊された後、投与3~4日目に新たな筋線維の再生が確認される。再生3~14日目の筋線維はサイズの漸増とともに、筋線維タイプが速筋型から遅筋型へとシフトする。さらに、我々は、ヒラメ筋への「熱ストレス」がこのシフトを促進する知見を得ている (Oishi et al, J Appl Physiol, 2009)。

Ciciliot and Schiaffino の論文 (2010) では、Ras/MAPK経路が筋線維のタイプ変化に対して重要な役割を担っており、遅筋線維の発現に関与することを報告している。しかし、再生筋線維や萎縮筋線維とRas/MAPK経路の関連は不明である。

2. 研究の目的

平成24~26年の本研究では、ラット下肢骨格筋間のMAPKタンパク質発現量の違い、ならびに筋線維組成変化とMAPKタンパク質発現量の関連について検討すること。さらに、再生筋線維や筋萎縮後の回復過程の筋線維タイプの変化や分化にRas/MAPK経路がどのように機能し、それに対し熱ストレスがどのように影響するかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1. 成熟ラット下肢のヒラメ筋、足底筋、腓腹筋 (表層部と深層部) の筋線維組成とMAPKタンパク質発現量の違いを検討。実験には生後10週齢のWistar系雄ラット8匹を用い、下肢骨格筋のヒラメ筋、足底筋および腓腹筋を摘出し、免疫組織化学的分析と生化学的分析を行った。

免疫組織化学的分析：摘出した筋をクリオスタットにより厚さ10 μ mの連続凍結切片を作成し、抗ミオシン重鎖Fast抗体、抗ミオシン重鎖Slow抗体と反応させ、筋線維を遅筋線維、速筋線維、遅筋+速筋混在型線維の3タイプに分類後、各筋線維タイプの占有率

(筋線維組成)を求めた。また、腓腹筋では深層部と表層部でまったく筋線維組成が異なることから、部位ごとの筋線維組成を算出した。

生化学的分析：ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋深層部と腓腹筋表層部をLysis bufferにより均質化し、電気泳動法により筋タンパク質を分離し、ゲル内のタンパク質をニトロセルロースペーパーにトランスファーした。次に、ウェスタンブロットティング法により、抗MAPK抗体、抗リン酸化MAPK抗体、抗HSP72抗体、抗HSP60抗体と反応させ、それぞれのタンパク質の発現量を定量化し、比較・検討した。

実験2. 生後3, 10, 20, 46, 65週のWistar系雄ラットヒラメ筋の筋線維組成変化とMAPKタンパク質発現量の変化を検討。上記週齢のラットヒラメ筋を摘出し、実験1と同様に免疫組織化学的分析および生化学的分析を行った。

実験3. プピバカイン注入により成熟ラットヒラメ筋線維を破壊し、その後の再生筋線維のタイプ発現の経時的変化とMAPKタンパク質発現変化を検討。生後7週齢のWistarラット16匹を用い、左脚ヒラメ筋にプピバカインを注入し筋線維を破壊した。ラットを対照群(n=8)とサイクロスポリンA投与群(n=8)に分け、サイクロスポリンA投与群には、毎日25mg/body weightのサイクロスポリンAを投与した。プピバカイン注入2週間後に、両群のラットヒラメ筋を摘出し、実験1と同様に免疫組織化学的分析および生化学的分析を行い、熱ストレスの影響を検討した。

実験4. プピバカイン注入により老化ラット骨格筋線維を破壊し、熱ストレスが破壊後の再生筋線維の発育に及ぼす影響の検討。実験には生後65週のWistar系雄ラット10匹を用い、対照群と熱ストレス群の2群にグルーピング

した。両群の左脚ヒラメ筋にブピバカインを注入し筋線維を破壊した。さらに、熱ストレス群にはその下肢を2日に1回42 °Cのお湯に30分間浸し熱ストレスを加えた。ブピバカイン注入2週間後に、両群のラットヒラメ筋を摘出し免疫組織化学的染色により筋線維組成と筋線維横断面積を算出し、熱ストレスの影響を検討した。

4. 研究成果

実験1. ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋（表層部と深層部）の速筋線維の割合はヒラメ筋<腓腹筋深層部<足底筋<腓腹筋表層部であり、MAPK タンパク質発現量もまた、ヒラメ筋<腓腹筋深層部<足底筋<腓腹筋表層部の順であった。したがって、速筋線維の割合が最も低いヒラメ筋で MAPK タンパク質発現量が最も低く、速筋線維の割合が最も高い腓腹筋表層部において MAPK 発現量が最も高い結果であった。このことから、MAPK タンパク質は速筋線維の発現に関連する可能性が示唆された。

実験2. 生後3週齢ヒラメ筋の遅筋線維の割合は51%であり、発育・成熟に伴いその割合が増加し65週齢では98%を示した。逆に速筋線維の割合は徐々に減少した。一方、MAPK タンパク質発現量は、3週齢ラットヒラメ筋が最も高く、発育・成熟とともに徐々に減少する傾向が認められた。したがって、MAPK タンパク質は速筋線維の発現に関連する可能性が示唆された。

実験3. ブピバカイン注入群に比べブピバカイン注入+サイクロスポリンA投与群では、速筋線維の割合が高い結果であった。筋線維横断面積には差はみられなかった。

実験4. 老化ラットヒラメ筋において、筋線維破壊2週間後の再生筋線維の筋線維組成は、

対照群と熱ストレス群では差は見られなかったものの、筋線維横断面積では熱ストレス群が有意に高い結果が得られた。

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 2件)

1. Yasuharu Oishi, Roland R. Roy, Tomonori Ogata, and Yoshinobu Ohira. 査読有, Heat stress effects on the myosin heavy chain phenotype of rat soleus fibers during the early stages of regeneration. Muscle & Nerve, in press, 2015.
2. Yasuharu Oishi. 査読無, Effects of heat stress on regenerating fibers of aged rat soleus muscle. Bull Fac Educ Kumamoto Univ, 62: 209-212, 2013.

〔学会発表〕(計 1件)

1. Yasuharu Oishi. Heat stress affects to the size and phenotype of the rat soleus regenerating fibers. 15th International Biochemistry of Exercise Congress (IBEC), The Swedish School of Sport and Health Sciences. Stockholm, Sweden. June 17-21, 2012. Poster session on June 18, 2012.

〔図書〕(計 1件)

1. 大石康晴, 「運動生理学 20 講 第3版」勝田 茂, 征矢英昭 編著, 分担執筆, 第1講担当, P1-7, 2015年、朝倉書店

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件）

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

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 康晴 (OISHI Yasuharu)
熊本大学・教育学部・教授

研究者番号：10203704

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：