

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：31104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560402

研究課題名(和文) 骨格筋における α -アクチンの新規機能の解明研究課題名(英文) Elucidation of new functions of α actin in skeletal muscle

研究代表者

宇田 宗弘 (Uda, Munehiro)

弘前学院大学・看護学部・講師

研究者番号：80549262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋収縮タンパク質であるアクチンに着目し、主に遅筋線維で構成されるヒラメ筋と速筋線維で構成される足底筋において、通常のアクチンよりも分子量が大きいアクチンの発現量、分子量が大きくなっている理由と細胞内での局在、さらに尾部懸垂による過重負荷の軽減による変化について検討した。実験の結果、分子量が大きいアクチンは足底筋よりもヒラメ筋に多く、SUMOタンパク質による修飾を受けている可能性が明らかとなった。また分子量が大きいアクチンは細胞核や細胞質に局在している可能性が示唆された。さらに過重負荷の軽減は各筋における分子量が大きいアクチンの発現を変化させなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the differences in the protein expression profiles between the soleus and plantaris muscles, and we identified large amount of protein spots at approximately 60 kDa of the soleus muscle compared with the plantaris muscle. These spots were identified as α -skeletal muscle actin by liquid chromatography-nanoelectrospray ionization-tandem mass spectrometry and western blot analyses. In addition, we found that the 60 kDa α -skeletal muscle actin might be modified by small ubiquitin-like modifier (SUMO)-1 protein. Furthermore, we found that α -skeletal muscle actin with larger molecular weight might be localized in the nuclear and cytosol of the skeletal muscle. Finally, we examined the effects of hindlimb unloading on the 60 kDa α -skeletal muscle actin expression in both muscles. We found that hindlimb unloading did not change the expression of 60 kDa α -skeletal muscle actin in both muscles.

研究分野：健康・スポーツ科学

キーワード：骨格筋 翻訳後修飾 アクチン

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は大きく分けて遅筋線維と速筋線維という異なる筋線維タイプで構成されており、生活習慣病や加齢は特定の筋線維タイプに変化が生じることで発症したり、筋機能の低下が生じたりすることが明らかにされている。この背景には異なる筋線維タイプ間のタンパク質発現やその翻訳後修飾の違いが関係していることが予想される。したがって、生活習慣病や加齢が特定の筋線維タイプに影響を及ぼすメカニズムを明らかにするためには各筋線維タイプのタンパク質発現や翻訳後修飾の違いを明らかにすることが重要となる。我々はこれまでに遅筋であるヒラメ筋において筋収縮タンパク質である α -アクチンとは生化学的特性が異なる β -アクチンを発見し、この新たに発見した β -アクチン (新規 β -アクチン) の発現量が速筋である足底筋よりもヒラメ筋において多いことを見出した。しかしながら、なぜ通常の β -アクチンと生化学的特性が異なるのか、どのような機能を持っているのかは不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究では新規 β -アクチンの機能及び筋機能へのかかわりを解明することを目的として、ラットのヒラメ筋を用いて新規 β -アクチンの生化学的特性に影響する種々の翻訳後修飾と細胞内の局在と、筋機能に影響を及ぼす刺激が新規 β -アクチンの発現量を変化させるのか否かを検討した。

3. 研究の方法

実験動物には6か月齢と15週齢のオスのF344ラットを使用した。6か月齢のラットは新規 β -アクチンの生化学的特性とその細胞内の局在を検討するために用いた。また15週齢のラットは筋機能に影響を及ぼす刺激である尾部懸垂の実験のために使用した。ラットの尾部懸垂による後肢の過重負荷の軽減は、ラット後肢筋の筋活動量を減少させ筋萎縮を生じさせる。また尾部懸垂によりラットの後肢筋であるヒラメ筋の筋線維タイプも変化することが示されている。15週齢のラットを尾部懸垂群と対照群に分け、尾部懸垂群は16週齢より2週間の尾部懸垂による過重負荷の軽減を行った。6か月齢と15週齢の

ラットから後肢筋であるヒラメ筋と足底筋を採取して、タンパク質抽出を行い、2次元電気泳動を行ったのち、Sypro Rubyでゲルのタンパク質を染色した。そして画像解析によりヒラメ筋と足底筋における新規 β -アクチンの含有量の違いを分析した。また6か月齢のラットにおけるヒラメ筋の新規 β -アクチンのスポットを切り出し、そのスポットのタンパク質をトリプシンでゲル内消化したのち、液体クロマトグラフィー/質量分析装置を用いてタンパク質の同定を行うとともに、抗骨格筋型 β -アクチン抗体を用いたウエスタンブロット分析でも、その陽性反応の有無を確認した。さらに新規 β -アクチンの翻訳後修飾を液体クロマトグラフィー/質量分析装置と、抗 small ubiquitin-like modifier (SUMO)-1 抗体及び SUMO-2/3 抗体を用いたウエスタンブロット分析で検討した。新規 β -アクチンの細胞内での局在は、6か月齢のラットのヒラメ筋を用いて細胞分画を行い、核画分、可溶性 (細胞質) 画分、筋原線維画分に分けて分析した。そして各画分のマーカータンパク質に対する抗体を用いて、各画分においてそれぞれの画分のマーカータンパク質の強い反応が認められることを確認した。これらの画分を用いて、抗骨格筋型 β -アクチン抗体を用いたウエスタンブロット分析で新規 β -アクチンの局在を検討した。

4. 研究成果

ヒラメ筋と足底筋のタンパク質発現を比較した結果、ヒラメ筋において約60kDa付近に濃いスポットが観察された (図1)。次に図1において円で囲んだスポットの相対的な含有量を画像解析した結果、このスポットの含有量は足底筋に比べ、ヒラメ筋において有意に多いことが明らかとなった (図2)。

次に図1のヒラメ筋において円で囲んだスポットを切り出してトリプシンで消化し、液体クロマトグラフィー/質量分析装置で解析した結果、このスポットのタンパク質は骨格筋型の α -アクチンであることが判明した。また2次元電気泳動後のゲルから通常の骨格筋型 α -アクチンのスポット (40kDa) と約60kDaの骨格筋型 α -アクチンのスポットを切り出して、そのゲル片を用いてさらに電気泳動を行い、抗骨格筋型 α -アクチン抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。その結

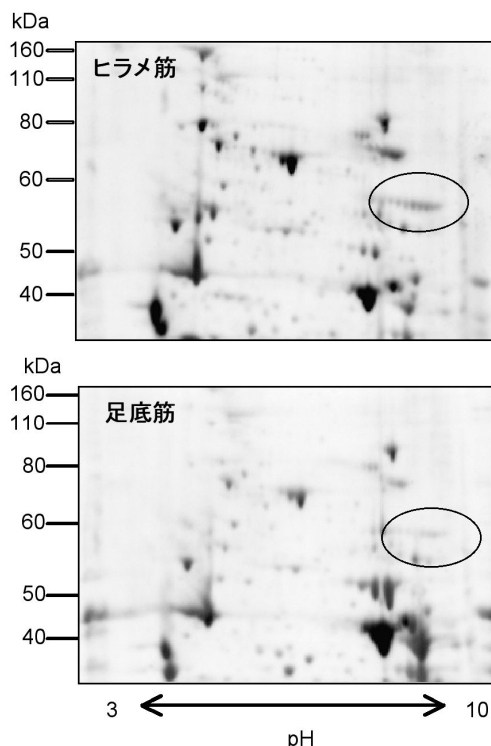


図1. ヒラメ筋と足底筋におけるタンパク質発現の違い。円で囲んだスポットのタンパク質発現が異なる。

果、40kDa と約 60kDa の位置に抗骨格筋型 α -アクチン抗体の陽性反応が認められた(図3)。したがって、約 60kDa のスポットのタンパク質は骨格筋型 α -アクチンであることが明らかとなった。

通常の骨格筋型 α -アクチンの分子量は40kDaである。したがって、約 60kDa の骨格筋型 α -アクチンにはその分子量に影響を及ぼす何らかの翻訳後修飾があるものと考えられた。そこで次に骨格筋型 α -アクチンの分子量に影響を及ぼす翻訳後修飾について検討した。アクチンタンパク質はこれまで多くの翻訳後修飾が生じることが明らかにされている。その中でも分子量に影響を及ぼす可能性が高いタンパク質による翻訳後修飾に着目して分析を行った。これまでショウジョウバエの骨格筋においてユビキチンタンパク質がアクチンに結合することが明らかにされている。そこで、まずアクチンへのユビキチンの結合(修飾)について液体クロマトグラフィー/質量分析装置で解析した。その結果、ユビキチンによる修飾は検出されなかった。次に small ubiquitin-like modifier (SUMO) タンパク質による翻訳後修飾を検討した。この SUMO タンパク質による翻訳後修飾もアクチンに生じることが明らかにされている。ヒラメ筋のサンプルを使用して2次

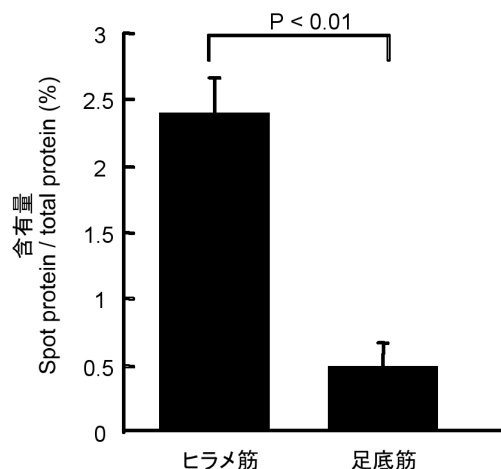


図2. 各筋における図1の円で囲んだスポットの相対的な含有量の違い

元電気泳動を行ったのち、抗 SUMO-1 抗体と抗 SUMO-2/3 抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、約 60kDa の骨格筋型 α -アクチンのスポットには抗 SUMO-1 抗体の陽性反応が検出されたが、抗 SUMO-2/3 抗体の反応は検出できなかった(図4)。これらの結果から、約 60kDa の骨格筋型 α -アクチンは SUMO-1 により修飾されている可能性が高いことが明らかになった。

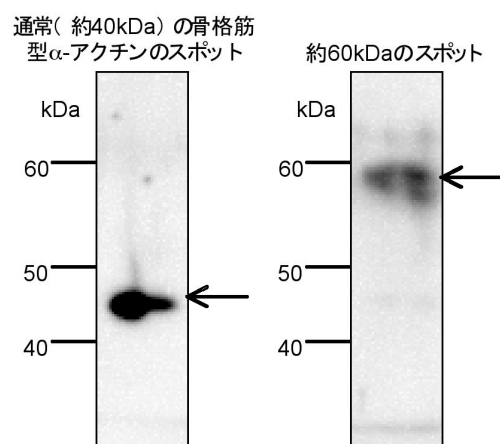


図3. 約60kDaのスポットのタンパク質に対する抗骨格筋型 α -アクチン抗体を用いたウェスタンブロット分析

これまで SUMO タンパク質の翻訳後修飾が生じたアクチンは細胞の核に局在することが明らかにされている。そこで通常の骨格筋型 α -アクチンよりも分子量が大きい β -アクチンは核画分に局在するの否かを検討した。その結果、抗骨格筋型 α -アクチン抗体の反応は核画分と可溶性画分の約 60kDa と 55kDa の位置に検出されたが、筋原線維画分の約 60kDa と 55kDa の位置には検出されなかった(図5)。これらの結果から、SUMO タンパク質に修飾されている可能性のある通常

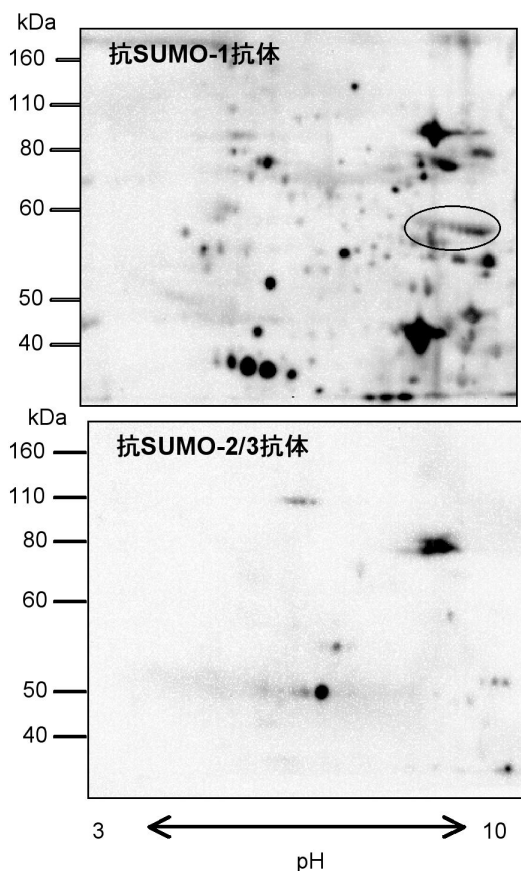


図4.ヒラメ筋における抗SUMO-1抗体と抗SUMO-2/3抗体の陽性反応の検討
円で囲んだ約60kDaの骨格筋型 α -アクチンのスポットには抗SUMO-1抗体の反応が検出された。

の骨格筋型 α -アクチンよりも分子量が大きい β -アクチンは、細胞核と細胞質に局在している可能性のあることが明らかとなった。

次に筋機能に影響を及ぼす刺激が新規 β -アクチンの発現量を変化させるのか否かを検討した。本研究ではラットの尾部懸垂により後肢の過重負荷を軽減し、ラット後肢筋の筋活動量を減少させ筋萎縮を生じさせるモデルを用いて検討した。2週間の尾部懸垂後にはヒラメ筋と足底筋の重量が対照群に比

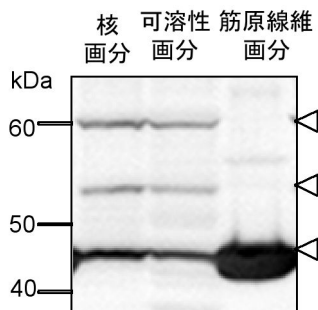


図5.核画分、可溶性画分、筋原線維画分における抗骨格筋型 α -アクチン抗体の陽性反応

べ有意に減少した。この筋サンプルを使用して、2次元電気泳動を行い、各筋における約60kDaの骨格筋型 α -アクチンのスポットの荷重負荷の軽減による変化を検討した。その結果、各筋における約60kDaの骨格筋型 α -アクチンのスポットの発現量には変化が認められなかった(図6)。尾部懸垂モデルは筋線維タイプの変化が認められているが、劇的に筋線維タイプが変化するわけではい。したがって、劇的に筋線維タイプが変化する実験モデルを用いてさらに約60kDaの骨格筋型 α -アクチンのスポットの発現量を検討することが今後必要となる。

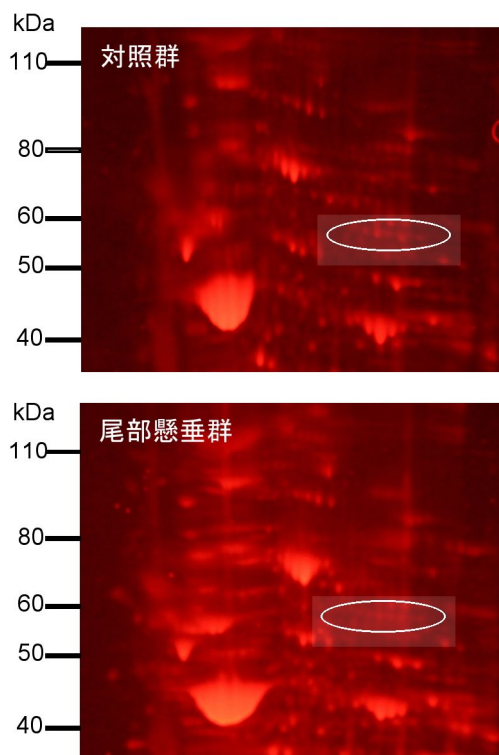


図6.対照群と尾部懸垂群のヒラメ筋におけるタンパク質発現の比較
円で囲んだスポットが約60kDaの骨格筋型 α -アクチンである。

本研究では分子量が大きくなっている骨格筋型 α -アクチンが主に速筋線維で構成される足底筋よりも主に遅筋線維で構成されるヒラメ筋に多く含まれ、SUMOタンパク質により修飾されている可能性が高く、それらは細胞核や細胞質に局在している可能性が明らかとなった。これらの結果から、分子量が大きい骨格筋型 α -アクチンは筋線維組成の違いに関係している可能性が考えられた。我々はさらに尾部懸垂により荷重負荷の軽減した筋における分子量が大きい骨格筋型 α -アクチンを分析したが、大きな変化を認め

なかった。したがって、筋機能との関わりについてはさらなる検討が必要である。

技術員

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Munehiro Uda, Hiroaki Kawasaki, Kyoichi Iizumi, Ayako Shigenaga, Takeshi Baba, Hisashi Naito, Toshitada Yoshioka, Fumiyuki Yamakura. Sumoylated α -skeletal muscle actin in the skeletal muscle of adult rats, 査読有, Molecular and Cellular Biochemistry, 409(1-2), 2015, 59-66.

〔学会発表〕(計 2 件)

宇田 宗弘、川崎 広明、飯泉 恭一、重永 綾子、馬場 猛、内藤 久土、吉岡 利忠、山倉 文幸、骨格筋で新たに見出された分子量の異なる α -アクチンの細胞内局在の検討、第 70 回日本体力医学会大会、2015 年 9 月 18 日、和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国(和歌山県和歌山市)

宇田 宗弘、川崎 広明、飯泉 恭一、重永 綾子、馬場 猛、内藤 久土、山倉 文幸、骨格筋 α -アクチンの新規翻訳後修飾、第 69 回日本体力医学会大会、2014 年 9 月 20 日、長崎大学文京キャンパス(長崎県長崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇田 宗弘(UDA Munehiro)
弘前学院大学・看護学部・講師
研究者番号：80549262

(2)連携研究者

山倉 文幸(YAMAKURA Fumiyuki)
順天堂大学・国際教養学部・特任教授
研究者番号：20053358

馬場 猛(BABA Takeshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：80366450

(3)研究協力者

松本綾子(MATSUMOTO Ayako)
順天堂大学・スポーツ健康医科学研究所・