

平成30年6月16日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01620

研究課題名(和文) 骨格筋線維サイズおよびタイプ変化に対するマップキナーゼの関連

研究課題名(英文) Relationship of the mitogen-activated protein kinase with skeletal muscle fiber size and the changes of fiber type composition

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、分子量42/44 kDaのマップキナーゼERK1/2の筋線維タイプ特異性について検討した。10週齢のラット骨格筋におけるリン酸化ERK1/2発現量は、腓腹筋表層部で最も高く、足底筋、腓腹筋深層部、ヒラメ筋の順で少なかった。この順序は各筋の速筋線維の割合と同じであった。また、ヒラメ筋の速筋線維の割合とリン酸化ERK1/2の発現量は生後3週齢で最も高く、発育から老化にかけて共に徐々に減少した。徐神経ヒラメ筋では速筋型の筋線維の割合とリン酸化ERK1/2の発現量が共に増加した。以上の結果から、リン酸化ERK1/2の発現はラット骨格筋の速筋線維の発現と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to clarify the muscle fiber phenotype specificity of 42/44 kDa MAPK (ERK1/2) protein. Expression level of phosphorylated ERK 1/2 was analyzed for the 10-wk-old Wistar rat and the level was highest in the superficial portion of the gastrocnemius muscle, lower in the plantaris and deep gastrocnemius, and lowest in the soleus muscle. This order is the same with the ratio of fast type fiber containing in each muscle. Rat soleus muscle contained the fast type fiber highest in the 3-wk-old, and gradually decrease during growing and aging stages. Similar change was observed in the expression level of phosphorylated ERK1/2. In addition, the increase in the fast-phenotype fiber and the phosphorylated ERK1/2 was observed in the denervated rat soleus muscle. These results strongly suggest that the expression of phosphorylated ERK1/2 is closely related to that of the fast phenotype fiber in rat skeletal muscles.

研究分野：運動生理学、骨格筋生化学

キーワード：ラット骨格筋 MAPK ERK1/2 徐神経 ヒラメ筋 足底筋 腓腹筋 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は酵母からほ乳類まで高度に保存されており、細胞の増殖や分化、細胞死、ストレス応答など、細胞の機能制御に重要な役割を果たす細胞内シグナル伝達経路である。MAPK は MAPK キナーゼ (MAPKK) によりリン酸化され、それにより活性化され機能発揮が可能となる。そのため細胞内では、非活性化型 (非リン酸化) と活性化型 (リン酸化) の MAPK のタンパク質発現が認められる。

骨格筋における MAPK シグナル経路は、ほ乳類骨格筋の重量 (Shi et al. Am J Physiol 2009; Wang et al. Sci Rep 2016) や筋線維の分化 (Chen et al. Sci Rep 2017; Liu et al. Cell Physiol Biochem 2017; Zou et al. J Biol Chem 2016) に関連することが報告されている。

MAPK には extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38, および ERK5 の 4 種類のサブファミリーが確認されており、その中でも分子量 42/44kDa の ERK1/2 は slow-type fiber の発現型と密接に関連する報告 (Dupont et al. AJP 2011; Higginson et al. Pflugers Arch 2002; Meissner et al. J Cell Physiol 2007; Meissner et al. Nuc Acid Res 2011; Murgia et al. Nat Cell Biol 2000) と、逆に fast-type fiber と関連する (Shi et al. FASEB J 2008; Shi et al. Am J Physiol 2007) という相反する研究結果が報告されている。

2. 研究の目的

これまでの研究報告から、MAPK シグナリングは骨格筋線維の分化や適応変化と密接に関連し、重要な働きを行っていることが推察される。

本研究は、MAPK ファミリーの ERK1/2 について筋線維タイプ発現型との関連を検

討することを目的に実験を行った。実験にはウイスター系雄ラットの下肢骨格筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋) を用いた。これらの筋は収縮機能や筋線維組成が全く異なっていることが知られている。

3. 研究の方法

実験 1. ラット下肢骨格筋では、筋によって遅筋線維と速筋線維の割合である筋線維組成が極端に異なっている。例えば抗重力筋のヒラメ筋では遅筋線維の割合が 80~90% を占めるのに対し、足底筋では全く逆に速筋線維が ~90% 近く認められる、また腓腹筋ではその表層部と深層部で筋線維組成が異なっており、深層部では遅筋線維が 20% 程度みられるのに対し、表層部は 100% 速筋線維で占められている。実験 1 では、このような筋、筋部位における ERK1/2 タンパク質の発現の違いについて検討した。

生後 10 週齢の Wistar 系雄ラットのヒラメ筋、足底筋、腓腹筋 (表層部と深層部) の筋線維組成と ERK1/2 タンパク質発現量の関連について検討した。麻酔下で摘出したそれぞれの筋について、免疫組織化学的分析と生化学的分析を行った。

免疫組織化学分析は、クリオスタットを用いて摘出した筋から厚さ 10 μ m の連続凍結切片を作成し、抗ミオシン重鎖 Fast 抗体および抗ミオシン重鎖 Slow 抗体と反応させた。その染色反応から筋線維を遅筋 slow 線維、速筋 fast 線維、遅筋 + 速筋混在型 hybrid 線維の 3 タイプに分類後、各筋線維タイプの占有率を算出した。

生化学的分析として、それぞれの筋・筋部位を lysis buffer により均質化し、SDS-PAGE により筋タンパク質を分離し、それをニトロセルロースペーパーに転写した。次に、ウェスタンブロッティング法により、抗 ERK1/2 抗体、抗 phosphorylated ERK1/2

抗体と反応させ、それぞれのタンパク質の発現量を分析した。同時に、slow type 発現型と密接に関連する熱ストレスタンパク質 (Heat shock protein, HSP) 72, HSP60、ミトコンドリア生合成と関連する PGC-1 発現量についても生化学的に分析・検討した。

実験2.ラット下肢のヒラメ筋は抗重力筋として機能しており、発育から老化に至る過程で筋線維組成が変化することが知られている。具体的には、発育から老化までの間に遅筋線維の割合が徐々に増加してくる。実験2では、生後3,10,20,46,65週齢の Wistar 系雄ラットヒラメ筋の筋線維組成の変化とERK1/2タンパク質発現量の変化の関連性について検討した。上記の各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および生化学的分析により分析を行った。

実験 3 . 骨格筋線維を支配する運動神経を除去することにより、筋線維は著しい萎縮を示すとともに、筋線維組成にも変化がみられる。実験 3 では、そのような変化と ERK1/2 タンパク質発現の変化を検討し、関連性について考察した。生後 9 週齢の Wistar 系雄ラット下肢の坐骨神経を切断し、1 週間後に下肢よりヒラメ筋と足底筋を摘出し、免疫組織化学的分析と生化学的分析を行い、筋線維組成の変化と ERK1/2 タンパク質発現変化の関連について分析・検討した。

4 . 研究成果

実験 1 の成果：生後 10 週齢のラット下肢骨格筋における速筋線維の割合は、腓腹筋表層部(100%) > 足底筋(83.2%) > 腓腹筋深層部(71.2%) > ヒラメ筋(13.8%)の順序であった。

非リン酸化 ERK1/2 タンパク質発現量は、筋間での違いはみられなかった一方で、リン酸化 ERK1/2 タンパク質発現量は 腓腹筋表層部 (301.3%) > 足底筋 (276.5%) > 腓腹筋

深層部 (151.0%) > ヒラメ筋 (100%) の順となっており、この順序は速筋線維の割合と同じであった。さらに、熱ストレスタンパク質 HSP72、HSP60、および PGC-1 の発現量は、ヒラメ筋 > 腓腹筋深層部 > 足底筋 > 腓腹筋表層部の順となっており、これはリン酸化 ERK1/2 タンパク質発現量とは全く逆であった。これらの結果から、HSP72、HSP60、および PGC-1 タンパク質は slow 発現型と関連し、逆にリン酸化 ERK1/2 タンパク質は、速筋線維や fast fiber 発現型と関連する可能性が示唆された。

実験 2 の成果：生後 3 週齢ヒラメ筋では遅筋線維は 51%認められ、発育・成熟に伴いその割合が徐々に増加し、65 週齢では 98%に達した。一方、速筋線維の割合は3週齢では40%認められたが、成長に伴い徐々に減少し、65 週齢では 1.5%であった。同様に、遅筋+速筋混在型 hybrid 線維の割合は生後 3 週齢で約 8 %認められ、発育・老化に伴い徐々に減少した。

発育・老化に伴う HSP72、HSP60、および PGC-1 タンパク質発現量は、有意な増加あるいは増加傾向を示した。また、総 ERK1/2 タンパク質発現量は、発育・老化の影響はほとんど見られず、ほぼ一定の発現量を示した。

これに対して、リン酸化 ERK1/2 タンパク質発現量は、3 週齢ラットヒラメ筋が最も高く、10 週齢ではその 50%程度に減少し、更に発育・成熟にともない徐々に減少傾向を示し、65 週齢ではほとんど発現はみられなかった。

これらの結果から、HSP72、HSP60、および PGC-1 タンパク質発現は、発育～老化に至る遅筋線維の増加と関連しており、リン酸化 ERK1/2 タンパク質発現は速筋線維の減少と平行であることから、ERK1/2 タンパク質は速筋線維の発現促進、あるいは遅筋線維の発現抑制に関連する可能性が示唆された。

実験3の成果：徐神経によりヒラメ筋重量は60%以上の有意な低下がみられ、足底筋でも50%程度の有意な低下がみられた。コントロール群ヒラメ筋では遅筋線維の割合は88%であったが、徐神経によりその割合は75.7%に減少した。それに伴い、遅筋+速筋混在型 hybrid 線維の割合が、3.1%から17.5%に増加したものの、速筋線維の割合には有意な変化はなかった。一方、コントロール群足底筋では速筋線維の割合が88.1%認められ、徐神経による有意な変化はみられなかった。

徐神経ヒラメ筋では、HSP72, HSP60, PGC-1 タンパク質発現量が20~40%有意に減少した。一方、足底筋では全く変化はなかった。

ヒラメ筋のリン酸化 ERK1/2 タンパク質発現量は、コントロール群に対して徐神経群で約1.8倍の増加が認められた。一方、足底筋では減少傾向（コントロール群の~80%程度）がみられた。足底筋の HSP72, HSP60, PGC-1, および ERK1/2 タンパク質発現に顕著な変化がなかったことは、徐神経による筋線維組成の変化がみられないことと関連しているのかもしれない。一方、徐神経ヒラメ筋では、リン酸化 ERK1/2 が増加したことは速筋タイプを含む混在型筋線維の増加と関連する可能性が示唆された。

以上の実験結果から、リン酸化 ERK1/2 タンパク質は速筋線維あるいは fast phenotype の発現を促進する、または遅筋線維あるいは slow phenotype の発現を抑制している可能性が示唆され、これらの結果は、リン酸化 ERK1/2 タンパク質が fast-type fiber と関連するとした Shi et al. の先行研究 (FASEB J 2008: Am J Physiol 2007) を支持する結果となった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Oishi Y, Ogata T, Ohira Y, Roy R.R : The level of 44/42 kDa MAPK protein is closely related to the fiber type composition in hindlimb skeletal muscles of sedentary adult rats and in the soleus muscle during development.

21th Annual congress of the European College of Sports Science, Oral session, held on 6th-9th, July, 2016, at Vienna, Austria.

〔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

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：

(4)研究協力者
Roland R. Roy (Department of
Integrative Biology and Physiology and
Brain Research Institute, University of
California Los Angeles, CA 90095-7239,
USA).