

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 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659066

研究課題名（和文） 筋老化に関する遺伝子群の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification of muscular senescence-related genes

研究代表者

竹島 浩 (TAKESHIMA HIROSHI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70212024

研究成果の概要（和文）：加齢に伴う筋萎縮や減弱を特徴とする病態はサルコペニア (sarcopenia) とよばれ、 Ca^{2+} ハンドリング異常が原因であると想定されているものの、その発症メカニズムは不明である。本研究では、マウス老齢筋にて顕著な発現低下する遺伝子群を検索し、その中から小胞体膜タンパク質や Ca^{2+} ハンドリング関連タンパク質を同定することを立案した。遂行された実験では、小胞体内腔 Ca^{2+} 結合タンパク質であるサルカルメニンと小胞体膜 Ca^{2+} ポンプである SERCA (SR/ER Ca^{2+} -ATPase) が加齢マウス骨格筋にて発現量低下が示された。両タンパク質は心筋小胞体でも同様に発現していることが知られており、両者の発現量低下の関連が注目された。我々が以前作製したサルカルメニン欠損マウスは特に重篤な心臓機能の異常は観察されていないが、サルカルメニン欠損心筋における SERCA のタンパク発現量は約半減しており、加齢によりその発現量はさらに低下していた。従って、詳細なメカニズムは不明であるものの、サルカルメニンは小胞体内腔側から SERCA のタンパク安定性に寄与していることが示唆される。この遺伝子欠損マウスでの結果からは、加齢によりサルカルメニンの発現量が低下して、その二次的結果として SERCA 発現量も続落し、小胞体 Ca^{2+} ハンドリングの機能低下に寄与するものと推定された。また一方では、筋小胞体タンパク質であるジャンクトフィリンと JP45 に注目した加齢関連検討も企画されたが、両タンパク質のサルコペニアへの寄与は確認されなかった。

研究成果の概要（英文）：Sarcopenia is the loss of muscle mass and strength with age. The direct cause of sarcopenia remains to be exhaustively investigated, although several researchers have reported impaired Ca^{2+} handling of the sarcoplasmic reticulum (SR) in aged muscle preparations. We designed to search sarcopenia-related SR proteins by comparing gene expression between young-adult and aged mouse muscle preparations. Our gene chip and biochemical analyses found that both sarcalumenin (Sar) and sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) contents are significantly reduced in aged mice. Sar is a major SR Ca^{2+} -binding protein and SERCA is responsible for SR Ca^{2+} uptake. Based on the previous observations that Sar and SERCA are localized at the longitudinal region of the SR in both cardiac and skeletal muscle cells, we reasonably predicted that Sar may have functional relation with SERCA. Although we have previously established Sar-knockout mouse lines, the mutant mice exhibit no severe cardiac and muscular defects. In the Sar-knockout heart, SERCA content is reduced, and further decreased during mouse aging. Our observations suggest the possibility that reduced Sar content during aging may unstabilize SERCA to impair Ca^{2+} -handling performance in the SR. On the other hand, the SR membrane proteins junctophilin and JP45 were also examined in aged mice. Unfortunately, no relation between the SR proteins and sarcopenia was detected in our analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：サルコペニア、筋老化、筋萎縮、筋小胞体、Ca²⁺ハンドリング

1. 研究開始当初の背景

老人の筋力低下に伴う転倒や骨折は要介護状態に至る主要原因として、高齢化した我が国では社会問題となっている。この加齢に伴い発生する筋萎縮や張力減弱を特徴とする病態はサルコペニア (sarcopenia) とよばれ、その発生メカニズムは不明である。従って、サルコペニアでは発症機構の解明、病態マーカーや治療法の開発が先進高齢化諸国では切望されている。一方、骨折時のギブス固定等により骨格筋が短期間に萎縮することも知られているが、この際の筋萎縮の詳細なメカニズムも不明であり、診断マーカーもない現状である。また、筋萎縮とサルコペニアとの病態類似性についても注目されているが、メカニズム面での類似性は明らかにされていない。

2. 研究の目的

社会問題視されるサルコペニアに関する病態生理学または病態生化学的研究は、近年になり先進国の研究者により着手され始めた。その発症メカニズムに関しては諸説提唱されているものの、最近では筋小胞体における Ca²⁺の取り込み、貯蔵や細胞質への放出の機能低下がサルコペニアの原因と推論する論文も複数報告された。しかしながら、筋小胞体 Ca²⁺ハンドリングの機能低下が、どのような筋小胞体構成因子の機能や発現量の変化に起因するものかについては不明である。筋興奮収縮連関における小胞体 Ca²⁺ハンドリングタンパク質の分子同定や機能解析を手掛けてきた研究代表者が「筋老化に関する遺伝子群の同定と機能解析」と題して企画した本研究では、サルコペニアに関連して発現低下する筋小胞体タンパク質を同定するとともに、その機能を解析することを申請書作製当初の目標に設定した。

3. 研究の方法

H22年度の研究計画としては、若成人と老齢マウスより骨格筋 RNA を調製し、逆転写による遺伝子チップ解析にて発現変動の顕

著な mRNA を検索することを主に立案した。この網羅的解析の中で顕著な発現低下が観察されるものが多数観察されており、発現上昇を示すものも数種散見された。アミノ酸配列から小胞体膜タンパク質や Ca²⁺ハンドリング関連タンパク質をコードすると推定される mRNA から順次、発現増減の RT-PCR による確認作業を遂行した。この検索実験において、小胞体内腔 Ca²⁺結合タンパク質であるサルカルメニンと小胞体膜 Ca²⁺ポンプである SERCA は、加齢マウス骨格筋にて mRNA とタンパク質の発現量が顕著に低下していることが明らかになった。一方、microRNA や snRNA の発現変動は、幅広いスペクトラムの mRNA における翻訳効率やスプライスパターンを制御することも知られている。既知の microRNA や snRNA を標的とした遺伝子チップ解析も実施したが、明確な発現量変動を示す標的の同定には至らなかった。

上記の検索実験の成果に基づいて、サルカルメニンと SERCA の発現量低下が筋老化に伴う Ca²⁺ハンドリング機能の減弱へ関与する可能性も考察される。両タンパク質は心筋細胞の小胞体でも同様に発現していることが知られており、骨格筋における上記の推論は心筋においても検討する意義が高いと考えられた。我々が以前作製したサルカルメニン欠損マウスは特に重篤な心臓機能の異常は観察されていない。そこで、サルカルメニン欠損マウスおよび加齢マウスの心臓における SERCA 機能に注目した生理学的または生化学的検討を実施した。

4. 研究成果

サルカルメニン欠損心筋における SERCA のタンパク発現量は約半減しており、加齢によりその発現量はさらに低下していた。サルカルメニンによる SERCA 活性調節や両者の直接相互作用などは報告されていないため、詳細なメカニズムは不明であるものの、サルカルメニンは小胞体内腔側から SERCA のタンパク安定性に寄与していることが示唆される。一方、加齢マウス心筋においては、サルカルメ

ニンと SERCA の発現量が並行して低下していた。我々の遺伝子欠損マウスでの結果を考慮すると、加齢によりサルカルメニンの発現量が低下して、その二次的結果として SERCA 発現量も続落したものと推定される。心不全心筋と同様に、加齢心筋では小胞体 Ca^{2+} ポンプ活性の低下が細胞内 Ca^{2+} ハンドリング機構の減弱の主原因の1つと考えられている。上述の実験結果は加齢によるサルカルメニン減衰が SERCA 機能低下の要因であることを示唆するものであり、極めて興味深い成果である(発表論文2)。このサルカルメニン欠損心筋で観察された成果が、現在遂行中の実験にて、サルカルメニン欠損骨格筋においても再現されることが示されつつある。サルカルメニンと SERCA の同時発現低下と骨格筋老化との関連は極めて重要であると考えられるため、今後ヒト試料においても検討する必要があると思われる。また、サルカルメニンの過剰発現により、骨格筋にて SERCA 発現が上昇するのか?、さらには、筋小胞体 Ca^{2+} ハンドリング機能が向上するのか?というサルコペニア治療戦略を睨んだ実験検討も今後の重要課題として残されている。

本研究の実施期間において、本研究内容と密接に関連した国際共同研究も企画立案された。ジャンクトフィリン(JP)は筋小胞体と細胞膜を架橋するタンパク質であり、筋興奮収縮連関の原動力となるジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体の機能共役のプラットフォーム形成を担う因子である。我々が以前樹立した骨格筋型 JP 欠損マウスは、ミルク授乳を示さずに、新生直後に死亡することが明らかにされている。この JP 欠損骨格筋の Ca^{2+} ハンドリング異常を検討するために、変異マウスより培養骨格筋細胞を *in vitro*系で調製して、蛍光 Ca^{2+} イメージング解析を行う実験を米国グループとともに企画した。様々な薬理的検討の結果、JP 欠損骨格筋では Orail チャンネルが仲介する定常時の Ca^{2+} 流入が減衰しており、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下するとともに、小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量も低下していることが示された(発表論文1)。この観察結果に基づくと、加齢に伴い骨格筋型 JP 発現が低下した場合に、筋小胞体 Ca^{2+} ハンドリング能と発生収縮力の低下が推察される。上述の加齢骨格筋試料におけるタンパク質発現検討にて、骨格筋型 JP に注目したものの、顕著な mRNA またはタンパク質の発現量低下は確認されなかった。従って、骨格筋型 JP のサルコペニア発症への関与の可能性は否定された。

JP45 は筋組織で高発現、他の組織で低発現しており、骨格筋においては筋小胞体終末部に局在する膜貫通タンパク質である。我々が以前作製した JP45 欠損マウスは重篤な異常を示さないため、JP45 の生理機能は現在でも

不明である。JP45 欠損マウスの加齢に伴う骨格筋機能の変化に関連したスイスグループとの国際共同研究も遂行した(発表論文3)。12 および 18 月齢マウスを用いた個体走行試験や *in vitro* 骨格筋収縮試験において、JP45 欠損マウスにおいて顕著な異常を確認できなかった。しかしながら、上記の長期間の飼育中に JP45 欠損マウスでは肥満個体の割合が低いことが確認された。高脂肪食を付与する詳細な観察において、JP45 欠損マウスでは食餌摂取量が明確に低下していることにより、抗肥満傾向が観察されることが再確認された。食餌摂取に寄与する脳内ペプチドの発現検討により、ニューロペプチド Y の発現低下が JP45 欠損マウスにて示された。従って、詳細機序は不明であるものの、ニューロペプチド Y 発現低下が食餌摂取中枢を抑制することが、JP45 欠損マウスで想定された。しかしながら、JP45 のサルコペニア発症への関与の可能性は確認出来なかった。

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 3 件)

①Delbono, O., Messi, M. L., Wang, Z-M., Treves, S., Mosca, B., Bergamelli, L., Nishi, M., Takehima, H., Shi, H., Bingzhong, X., & Zorzato, F. Endogenously determined restriction of food intake overcomes excitation-contraction uncoupling in JP45KO mice with aging. *Exp. Gerontol.* **47**, 304-316, 2012. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.exger.2012.01.004

②Jiao, Q., Takehima, H., Ishikawa, Y. & Minamisawa, S. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* **51**, 31-39, 2012. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ceca.2011.10.003

③Li, H., Ding, X., Lopez, J. R., Takehima, H., Ma, J., Allen, P. D. & Eltit, J. M. Impaired Orail-mediated resting Ca^{2+} entry reduces the cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ and SR Ca^{2+} loading in quiescent junctophilin1 knockout myotubes. *J. Biol. Chem.* **285**, 39171-39179, 2010. (査読有り)
DOI: 10.1074/jbc.M110.149690

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹島 浩 (TAKESHIMA HIROSHI)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70212024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし