

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700656

研究課題名 (和文) 筋形成時におけるリン酸化 HSP27 の発現および機能の解析

研究課題名 (英文) Role of phosphorylated HSP27 for regeneration of skeletal muscle fibers

研究代表者

河野 史倫 (KAWANO FUMINORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90346156

研究成果の概要 (和文)：成熟ラットのヒラメ筋に0.03%カルジオトキシンを100 μ L注入し、14日後にサンプリングを行った。摘出筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結した後、-20 $^{\circ}$ Cのコールドトーム内で凍結横断切片を作成し、各種筋分化マーカーとSer15がリン酸化されたHSP27 (p-Ser15) との2重免疫組織化学染色を行った。その結果、筋再生中に出現する筋線維を含む全細胞中約20%がp-Ser15強発現細胞であることが明らかになった。さらに、それら強発現細胞の約80%が横断面積400 μ m²以下の小型細胞であった。このような小型細胞にはジストロフィンの周辺局在が認められなかったため、筋管または未熟な筋線維であると考えられる。また、proximity ligation assay法によりp-Ser15とデスミンとのインタラクションの有無を確認したところ、p-Ser15強発現細胞において強いインタラクションが認められた。しかし一方で、p-Ser15強発現細胞が多く認められる低サイズ帯の細胞にはp-Ser15の強発現およびデスミンとのインタラクションが認められないものも多く観察された。以上の結果から、筋再生中に出現するp-Ser15強発現細胞は筋活動等によりダメージまたはストレスを受けた細胞である可能性が高く、筋再生過程においては未熟な細胞がより細胞ストレスを受けやすいことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Muscular necrosis was produced in the soleus muscle of adult rats by intramuscular injection of cardiotoxin and subsequent regeneration was induced. The sampling of soleus muscle was performed on 14th day after the injection. Immunohistochemical staining of phosphorylated HSP27 at serine 15 (p-Ser15) and some myogenic marker proteins was performed in the cross section of the soleus muscle. As the results, strong expression of p-Ser15 was noted in 20% of all fibers observed in the regenerated muscle. Further, most of these p-Ser15-positive fibers were myotubes or small immature muscle fibers with the cross-sectional area of less than 400 μ m². On the other hands, the fibers without expression of p-Ser15 were also seen in the regenerated muscle. These results suggested that p-Ser15-positive cells which was present during muscular regeneration were susceptible to the cellular stress due to the muscle activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：筋生理学

科研費の分科・細目：(分科) 健康・スポーツ科学、(細目) スポーツ科学

キーワード：運動とトレーニング

1. 研究開始当初の背景

運動を取り入れた生活習慣の改善が、生活習慣病の予防や Quality of Life の向上に効果的であることは周知の事実である。運動がもたらす効果のひとつとして骨格筋量の維持・増進が挙げられるが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。我々は、筋活動によるメカニカルストレスや神経活動が骨格筋のサイズ調節に対してどのような役割を果たすのか追求することを主たる目的として、一連の研究を実施してきた。

ラットにおいてヒラメ筋の協働筋である腓腹筋と足底筋の抹消部腱を切除した場合、ヒラメ筋における筋電図レベルには影響が認められなかったものの、発揮張力レベルやヒラメ筋を支配している脊髄第5腰椎由来の感覚神経活動レベル(筋長などの固有感覚フィードバックレベルを反映する)は顕著に増大し、筋線維肥大が誘発された。つまり、筋にかかるメカニカルストレスそのものが筋線維サイズを変化させる生理的刺激になり得たということである。メカニカルストレスによって筋線維内でどのようなシグナル伝達系が活性化されるのか、まだ全貌は明らかにはされていないが、我々はプロテオミクス手法を用いて、過負荷によって肥大したヒラメ筋において発現量が増大する分子のひとつとしてリン酸化された 27kDa heat shock protein (HSP27) を同定した。

2. 研究の目的

HSP27は small HSP family のひとつであり、他の HSP 分子と同様に分子シャペロンとしての役割が一般的には知られている一方、他の HSP 分子とは異なり細胞ストレス等の刺激を受けリン酸化されることも報告されている。しかしながら、リン酸化の機序やリン酸化 HSP27 の機能に関しては未だ不明な点が多い。

ラットの HSP27 には、Ser15 と Ser85 の 2 か所のリン酸化部位が知られている。昨年までの我々の実験結果から、ラットヒラメ筋では Ser85 が恒常的にリン酸化を受けており、筋ホモジネートの細胞質分画に豊富に存在

し、筋原線維分画には存在しないことが分かっている。成熟ラットに7日間の後肢懸垂を行った場合、ヒラメ筋の萎縮に伴い Ser15 および Ser85 のリン酸化が減少した。その後5日間床上に戻し回復させると、筋サイズの増大に伴い、細胞質分画において Ser15 がリン酸化された HSP27 の発現量増大が特に顕著に認められた。同時に、筋原線維分画にも顕著な HSP27 の発現が認められるようになった。以上の結果は、筋肥大時に HSP27 の Ser15 が選択的にリン酸化を受け筋原線維分画へ移行することで筋原線維の保護や構築に対して何らかの役割を果たしていることを示唆するものである。

また、骨格筋の横断切片においてリン酸化 HSP27 (p-Ser15) に対する免疫組織染色を行った場合、肥大中の筋ではリン酸化 HSP27 を強発現する筋線維が正常に比べ顕著に増加したが、中には強発現を示さない筋線維もあった。このような事実は、筋形成・肥大のある特定の時期にリン酸化 HSP27 が強発現することを示唆するものであると考えられる。そこで、リン酸化 HSP27 が「細胞内で何が起きている時期に強発現するのか?」、「どのような役割を果たしてしているのか?」を追求することを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

成熟ウイスターハノーバー雄ラット(14週齢、35匹)を実験前正常群(5匹)と損傷群(30匹)に分け、損傷群のラットはペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔(5mg/100g体重)下において下肢を切開し、31Gの注射針を用いて0.03%カルジオトキシンを左側ヒラメ筋に100 μ L注入した。この注入量および濃度は、カルジオトキシンが成熟ラットのヒラメ筋全体に行きわたり、筋線維ほぼ全てを損傷させるのに十分な量および濃度であることは確認済みである。カルジオトキシン注入後は通常通りの飼育を行い、1、3、7、14、21、28日後にそれぞれ5匹ずつから両側ヒラメ筋のサンプリングを行った。実験前正常群のサンプリングはカルジオトキシン注

入と同じ日に実施した。摘出したヒラメ筋のは生体内長に伸ばした状態で液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結した。

イソペンタン中で凍結した筋の一部（筋腹付近）をコルクに立て、 -20°C のコールドーム内で $10\mu\text{m}$ 厚の凍結連続切片を作成する。これらの切片に筋分化マーカー（Pax7、myogenin、ジストロフィン、デスミン、アクチニン）のいずれかとリン酸化HSP27

(p-Ser15)の抗体染色およびDAPIによる核染色の3重染色を行った。染色後の切片から顕微鏡写真を撮影し、p-Ser15陽性細胞の筋分化状態を評価した。各筋分化マーカーによって識別できる筋分化特性は以下の通りである。

Pax7: 造血幹細胞から筋系前駆細胞へ分化レベルをコミットする転写因子であり、筋系前駆細胞や筋衛星細胞の核に発現することが知られている。

Myogenin: 筋系細胞の最終分化因子として知られており、筋管や分化誘導のかかった筋芽細胞の核に発現が認められる。

ジストロフィン: 筋線維上に局在する膜タンパク質であり、成熟した筋線維では細胞体を縁取るように局在が認められるが、未熟な筋線維では細胞体全体に発現が認められる。また、Dystrophinの内側は筋線維内部であるという指標にも利用できる。

デスミン: 筋特異的な中間線維構成タンパク質であり、筋管に強く発現する。

アクチニン: Z-discの主要構成タンパク質であり、筋特異的に発現する。

また、p-Ser15とdesminのインタラクションについても、proximity ligation assay法による組織化学的解析を実施した。

4. 研究成果

損傷後7日目以降のヒラメ筋においてp-Ser15陽性細胞が観察された。7日目においては出現するp-Ser15陽性細胞は小型の細胞のみであり、21日目および28日目では筋再生がかなり進んでおり、p-Ser15陽性細胞は成熟筋線維にのみ認められた。したがって、様々な種の細胞におけるp-Ser15発現が同時に観察できる14日目のヒラメ筋において、筋分化マーカーとの2重染色パターンを比較した。

筋損傷から14日目の再生筋において出現する筋線維を含む全細胞中約20%がp-Ser15強発現細胞であった。さらに、それら強発現細胞の約80%が横断面積 $400\mu\text{m}^2$ 以下の小型細胞であった。このような小型細胞にはジストロフィンの周辺局在が認められなかったものの、Pax7陰性、myogenin陽性、デスミン陽性、アクチニン陽性であったため、筋管または未熟な筋線維であると考えられる。また、proximity ligation assay法によりp-Ser15とデスミンとのインタラクションの有無を確認したところ、p-Ser15強発現細胞において強いインタラクションが認められた。しかし一方で、p-Ser15強発現細胞が多く認められる低サイズ帯の細胞にはp-Ser15の強発現およびデスミンとのインタラクションが認められないものも多く観察された。以上の結果から、筋再生中に出現するp-Ser15強発現細胞は筋活動等によりダメージまたはストレスを受けた細胞である可能性が高く、筋再生過程においては未熟な細胞がより細胞ストレスを受けやすいことが示唆された。

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0件)

[学会発表] (計3件)

① Kawano F, Oke Y, Nakai N, Ohira T, Nomura S, Fujita R, and Ohira Y. Effects of chronic iron deficiency anemia on the protein expression of rat thalamus. *Experimental Biology* 2010, Anaheim, CA, USA, April 28, 2010.

② 河野史倫、中井直也、尾家慶彦、大平充宣。微小重力環境下における筋・神経系の応答および適応。第64回日本体力医学会・シンポジウム(朱鷺メッセ、新潟県), 2009年9月19日。

③ 河野史倫、中井直也、尾家慶彦、大平充宣。プロテオミクス手法を応用した骨格筋サイズ調節機構の追究。第64回日本体力医学会・ワークショップ(朱鷺メッセ、新潟県), 2009年9月18日。

[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〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 史倫 (KAWANO FUMINORI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90346156

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし