

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 4 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22700656

研究課題名（和文） 遅筋線維におけるオートファジーの役割とその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Roles of autophagy in slow-twitch skeletal muscle

研究代表者

古屋 徳彦（FURUYA NORIHIKO）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50401188

研究成果の概要（和文）：廃用性筋萎縮へのオートファジーの寄与に関して、骨格筋特異的オートファジー不能（Atg7 KO）マウスの除神経モデルにより検討したところ、ヒラメ筋（遅筋）では萎縮が寛解することを見出した。除神経した Atg7 KO マウスのヒラメ筋ではミトコンドリア活性低下し、酸化ストレス状態にあること、ミトコンドリアに Parkin が蓄積することを見出した。除神経した Parkin 欠損マウスヒラメ筋においても Atg7 KO マウス同様、萎縮の寛解が認められることから、Parkin 介在性マイトファジーによるミトコンドリア品質管理が遅筋萎縮と密接に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the role of autophagy in skeletal muscle atrophy, we subjected skeletal muscle specific Atg7 deficient (Atg7 KO) mice to denervation, a model of skeletal muscle atrophy. Soleus muscle, a slow-twitch skeletal muscle, from Atg7 KO mice maintained muscle mass, while Soleus muscle from control mice, and first-twitch muscles from both wild type and Atg7 KO mice were atrophied. In the denervated Soleus muscles from Atg7 KO mice, the reduction of mitochondrial activity, the accumulation of oxidative stress and the accumulation of Parkin in mitochondria were observed. Parkin participates for mitochondrial quality control (Parkin mediated mitophagy). To confirm whether Parkin mediated mitophagy is involved in the restoration of denervation atrophy in Atg7 KO Soleus muscle, we subjected Parkin deficient (Parkin KO) mice to denervation. Like Atg7 KO Soleus, denervated Soleus muscles from Parkin KO mice maintained muscle mass. These results indicate that Parkin mediated mitophagy is involved in denervation atrophy in slow-twitch skeletal muscles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康、スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：スポーツ性科学、廃用性筋萎縮、オートファジー、Parkin、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

| 骨格筋は負荷がかかりにくい状態におかれ

ると、廃用性筋萎縮を起こす。骨格筋はタンパク質の同化と異化の平衡により維持されているが、廃用性筋萎縮の状態ではタンパク質合成が低下し、分解が亢進する。廃用性筋萎縮状態の筋肉では、筋肉特異的ユビキチン転移酵素 (E3) である Atrogin-1/MAFbx、MuRF1 の発現が亢進する。またこれらの E3 のノックアウトマウスは廃用性筋萎縮に対して完全ではないが、部分的に耐性を示す。また骨格筋特異的オートファジー不能マウスでは、特に目立った異常はみられないが、4~6ヶ月齢のマウスにおいて速筋の小型化が認められ、遅筋においては野生型と差が認められないと報告されている。また、転写因子 FoxO3 は上に挙げた atrogin-1/MAFbx、MuRF1 ならびにオートファジー関連遺伝子の転写を亢進させ、筋萎縮に密接に関わっていることが報告されている。

申請者は、座骨神経切除手術を施したマウスを廃用性筋萎縮のモデルとして、廃用性筋萎縮へのオートファジーの寄与を数種の筋肉において解析している。その解析の過程で、対照群のヒラメ筋で有意に筋萎縮が認められる除神経後 7 日目において、筋肉特異的オートファジー不能マウスのヒラメ筋では萎縮が認められないことを見出した。ヒラメ筋はミトコンドリアに富んだタイプ 1 線維の多い筋肉 (遅筋) であり、タイプ 2 線維の多い速筋では同様の現象は認められなかった。これらのことから申請者は、オートファジーが遅筋の廃用性筋萎縮過程に深く関与していると考え、その分子機構の解明を目指している。

2. 研究の目的

申請者は、オートファジー関連分子の発現が遅筋では高く、速筋では低いことを見出している。遅筋はミトコンドリアを多く含んでおり、有酸素運動に利用される筋肉である。オートファジーはダメージを受けたミトコンドリアの除去を行う (マイトファジー) ことが知られており、ミトコンドリアの量とオートファジーの間に何らかの関連が予想される。また申請者は DNA マイクロアレイ解析によって、筋肉特異的オートファジー不能マウスのヒラメ筋において、若年性パーキンソン病の原因遺伝子 parkin の発現が亢進していることを見出している。Parkin はサイトゾルに局在するタンパク質だが、ミトコンドリアがダメージを受けるとミトコンドリア膜に局在し、Parkin の局在しているミトコンドリアは、マイトファジーを受けて分解される。以上のことから申請者は、「筋線維の性質の違い (ミトコンドリア量?) によって、萎縮の際に寄与するタンパク質分解経路が異なっているのではないか?」、すなわち、遅筋ではよりオートファジーの寄与が大きく、速

筋ではよりユビキチン-プロテアソーム系の寄与が大きいのではないかと考えている。この仮説が正しいかどうか、遅筋と速筋を比較しながら分子レベルで廃用性筋萎縮にどのようにオートファジーが関わっているかを明らかにしていく。特に筋肉中のミトコンドリアの量および質に注目し、生化学的および形態学的手法を用いて解析する。また Parkin の萎縮筋における機能について詳しく解析する。最終的には、廃用性筋萎縮におけるオートファジーの役割を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) マウス

条件付き Atg7 欠損 (Atg7Flox/Flox) マウスと Tamoxifen 誘導型骨格筋特異的 Cre (HSA-Cre-ERT2) トランスジェニックマウスをかけ合わせ、骨格筋特異的オートファジー不能 (Atg7Flox/Flox: HAS-Cre-ERT2) マウスを作成した。このマウスは Tamoxifen を注射することで、骨格筋特異的にオートファジー経路に必須な遺伝子 Atg7 を欠損させることが出来る。Parkin 欠損マウスは順天堂大学医学部神経学講座、服部信孝先生よりご供与いただいた。これらのマウスおよび野生型マウスの左下肢の座骨神経切除手術を行い、脛脛の筋肉 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋) の萎縮を解析した。

(2) 形態学的、組織化学的解析

除神経したマウスより脛脛の筋肉をサンプリングし、凍結切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色、チトクローム c 酸化酵素 (Cox) 染色、および各種免疫染色に供した。

また、ヒラメ筋の電子顕微鏡写真撮影は花市電子顕微鏡技術研究所に依頼した。

(3) 生化学的解析

各筋肉をホモジナイズし、SDS-PAGE および各種抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。また、ミトコンドリア画分を調整し、同様にウェスタンブロッティングを行った。

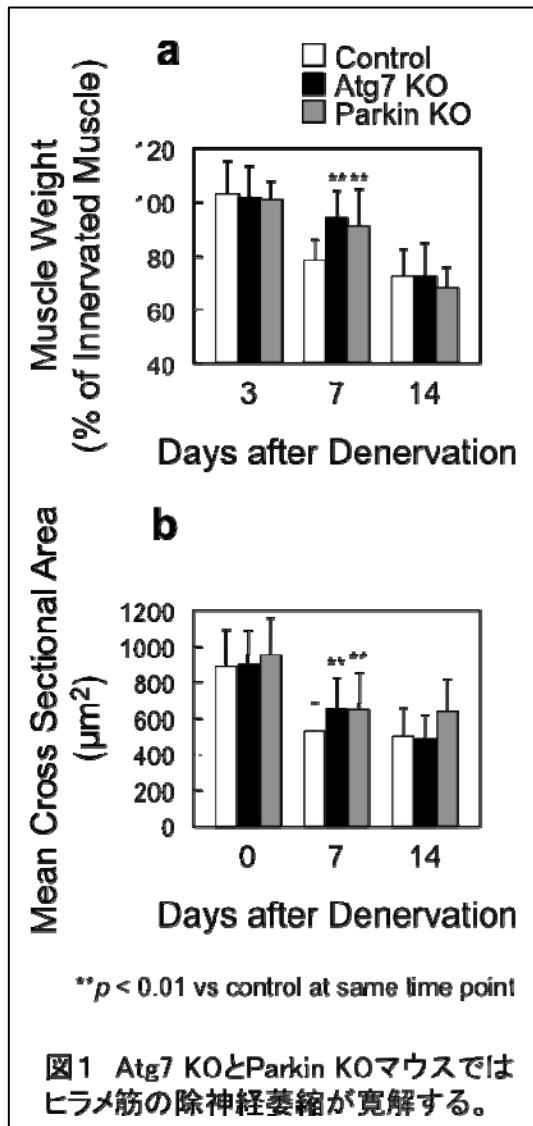
(4) リアルタイム PCR

ヒラメ筋から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を調整した。各種遺伝子に特異的なプライマーを用いて、定量的リアルタイム PCR に供し、それらの発現レベルを測定した。また、ヒラメ筋から DNA を調整し、ミトコンドリア DNA に特異的なプライマーを用いて、ミトコンドリア DNA のコピー数を測定した。

4. 研究成果

廃用性筋萎縮へのオートファジーの寄与を明らかにする目的で、骨格筋特異的オートファジー不能 (Atg7F/F: HSA-ERT2-Cre; Atg7KO) マウスに筋萎縮モデルとして座骨神経切

除手術を施し検討した。その結果、速筋である足底筋および腓腹筋は野生型同様の萎縮を呈するのに対し、ヒラメ筋（遅筋）では除神経後7日目においてオートファジー不能により萎縮が寛解することを見出した（図1）。さらに除神経したオートファジー不能



マウスのヒラメ筋では、その遺伝子の変異が若年性パーキンソン病の原因となることが報告されている Parkin がミトコンドリアに蓄積することが分かった（図2）。Parkin は膜電位を失ったミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの選択的オートファジーによる分解を誘導する。したがって、この Parkin 介在性マイトファジーはミトコンドリアの品質管理に重要な働きを担っていると考えられている。Parkin 欠損マウスを同様に除神経に供したところ、Parkin 欠損マウスのヒラメ筋においても Atg7 KO マウス同様、萎縮の寛解が認められることを見出した（図1）。

除神経したオートファジー不能マウスおよび Parkin 欠損マウスのヒラメ筋についてさらに詳細な解析を行ったところ、呼吸鎖複

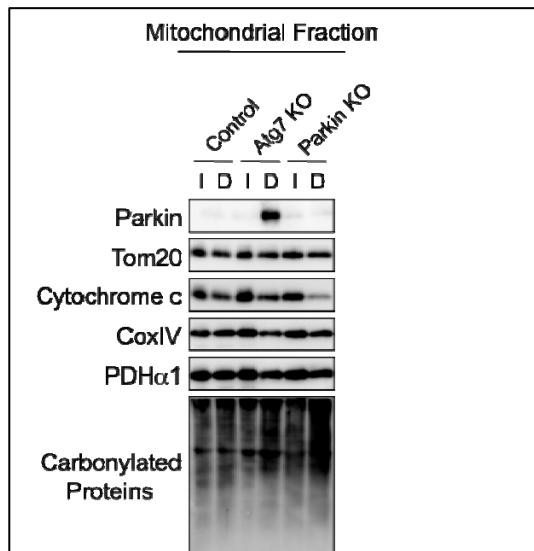


図2 除神経したAtg7 KOヒラメ筋のミトコンドリアにはParkinが蓄積する。

合体 II、IV の活性が、対照群よりも除神経後早期に低下すること、オートファジー不能マウスおよび Parkin 欠損マウスのヒラメ筋のミトコンドリアが酸化ストレス状態にあることが明らかになった（図2、3）。し

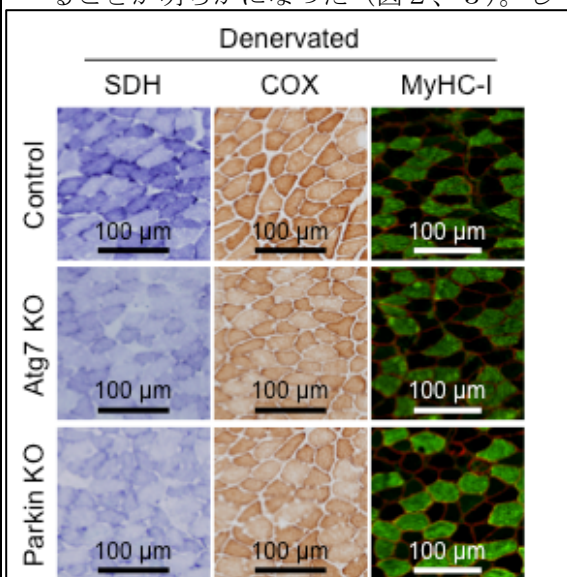
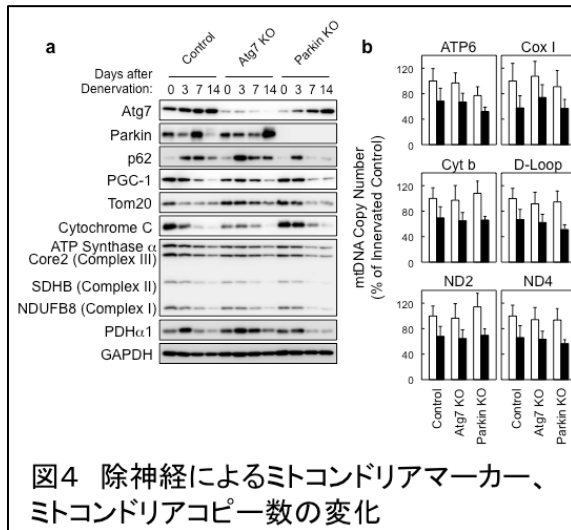


図3 除神経したAtg7 KOおよびParkin KOヒラメ筋のミトコンドリアは活性低下する。

のマーカータンパク質の発現量やミトコンドリア DNA のコピー数は除神経によって野生型同様に減少しており、変化に差は認められなかった（図4）。したがって、これらのノックアウトマウスのヒラメ筋のミトコンドリアは量的ではなく「質的」に機能低下していることが示唆された。オートファジーおよび Parkin 介在性マイトファジーはヒラメ筋の除神経萎縮過程においてミトコンドリア品質管理に重要であり、これらの機構の破綻により筋萎縮寛解という表現形が引き起

こされることが考えられる。

本研究は、高等動物の生理条件における Parkin 介在性ミトファジーの役割を明らかにしたおそらく世界で初めての研究であ



るとともに、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子の一つである Parkin が骨格筋でも重要な働きをしていることを示した研究である。したがって、近日中に投稿予定の本研究成果は、国内外で高い評価を得ることが出来ると研究代表者は確信している。今後は、「何故ミトコンドリア品質管理機構が破綻すると遅筋の萎縮が寛解するのか？」という問題を解明することに主眼をおいて研究を続ける。

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1件)

- ① Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., Iwata, J., Tanida, I., Furuya, N., Zheng, D. M., Tada, N., Tanaka, K., Kominami, E., Ueno, T. Autophagy. 2011 Jul;7(7):727-36. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 古屋徳彦、第 62 回日本細胞生物学会大会、Autophagy is involved in slow skeletal muscle atrophy、2010 年 5 月 21 日、大阪国際会議場 (大阪)
- ② 古屋徳彦、平成 22 年度特定領域「タンパク質分解」班会議、骨格筋萎縮過程におけるオートファジーの役割、2010 年 11 月 17 日、シャトレゼガトーキングダムサッポロ (札幌)

③ 古屋徳彦、第 11 回日本抗加齢医学会総会、骨格筋の萎縮と Autophagy、2011 年 5 月 27 日、国立京都国際会館 (京都)

④ 古屋徳彦、独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 精神・神経疾患研究開発費

23-5 「筋シストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」、筋萎縮におけるオートファジーの役割、2011 年 12 月 6 日、JA 共済ビルカンファレンスホール (東京)

⑤ Norihiko Furuya、Gordon Research Conference “Autophagy in Stress, Development & Disease”、Parkin mediated mitophagy is involved in slow-twitch skeletal muscle atrophy.、2012 年 3 月、Four Points Sheraton / Holiday Inn Express in Ventura CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 徳彦 (FURUYA NORIHIKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50401188