

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：82645

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890301

研究課題名(和文) 新たな重力負荷依存的な骨格筋の特性制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism responsible for the modulation of myosin heavy chain expression in muscle fibers.

研究代表者

大平 宇志(Ohira, Takashi)

独立行政法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙ミッション本部・宇宙航空プロジェクト研究員

研究者番号：40633532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の特性は、体積や発現する速筋型/遅筋型ミオシン重鎖の割合等によって大きく異なる。また、特に遅筋線維を多く含む骨格筋(抗重力筋)には、長期間の宇宙飛行や臥床等に伴い萎縮や速筋化が生じ、発揮張力の減少や易疲労性の亢進を引き起こすことが知られている。本研究では、抗重力筋の廃用に伴う特性変化のメカニズムを追究し、ミオシン重鎖の各アイソフォームの遺伝子およびタンパク質発現は筋線維ごとに制御されており、神経細胞や筋活動パターンに加え筋線維内の遺伝子のエピジェネティックな修飾等も重要な制御因子となっていることを示唆する結果を得た。本成果は、廃用性筋萎縮等に対する新たな予防策を確立するうえで有用である。

研究成果の概要(英文)：Gravitational unloading causes a shift of fiber phenotype toward fast-twitch type in soleus muscle. However some fibers are remain slow-twitch type. It has not known why the transformation of myosin heavy chain (MHC) phenotype is induced only in specific fibers expressing type I MHC originally. The current study was performed to investigate the effects of mechanical and/or neural factors on the fiber phenotype. Responses of MHC expression in soleus muscles to 2-week inhibition of mechanical activity or neural activity by hindlimb suspension or ablation of sciatic nerve respectively, were studied in rats. As a result, both experimental model was induced the increase of the type II MHC mRNA and protein expression. And the % distribution of fibers co-expressing type I and II MHC was increased. But fibers expressing pure type I MHC were still noted. It was suggested that the cause for de novo expression of type II MHC might be regulated by mechanical and neural activity and other factors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理学

キーワード：骨格筋 タンパク質発現調節

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の特性は、それを構成する筋線維の体積や発現するミオシン重鎖(速筋型または遅筋型)の割合等によって大きく異なる。また、特に抗重力筋と呼ばれる、遅筋線維を多く含む骨格筋には、長期間の宇宙飛行や臥床等に伴う廃用によって萎縮や速筋化が誘発される。そして、この形態および機能的な特性変化が起こる結果、骨格筋が発揮できる張力の減少や易疲労性の亢進が誘発されることが知られている。しかしこの時、抗重力筋を構成する筋線維には、萎縮は同等に誘発されるが、速筋化を伴うものと伴わないものが混在している。

先行研究では、各ミオシン重鎖の発現制御には、筋線維が支配される神経細胞の特性や筋線維の電気的活動パターンが深く関与していることが示されている。しかし、同一の骨格筋を構成する筋線維に、上記のような違いが生じるメカニズムは明らかになっていない。

このメカニズムに関する知見は、今後、骨格筋の特性変化に対する予防策を検討するうえで非常に重要である。

2. 研究の目的

ラットを実験対象とし、後肢の抗重力筋を構成する筋線維の廃用に伴う特性変化について観察し、速筋化が誘発される筋線維と誘発されない筋線維におけるミオシン重鎖発現の異なる調節メカニズムについて追究する。

(1)筋線維に発現するミオシン重鎖について mRNA への転写およびタンパク質への翻訳段階における発現制御について詳細に観察する。

(2) 神経細胞(運動神経および感覚神経)の作用および筋線維の電気的活動パターンの変化が、ミオシン重鎖の発現制御に及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1)10 週齢のウイスターハノーバーラットを後肢懸垂飼育することにより、後肢の抗重力筋にかかる重力負荷を抑制した。ラットを 14 日間この状態で飼育した後、左右の後肢から抗重力筋の一つとして知られるヒラメ筋を摘出した。右脚より摘出した筋は、凍結横断切片作成用およびタンパク質発現解析用にそのまま液体窒素で冷やしたイソペンタン中で瞬間冷凍した。左脚より摘出した筋からは単一筋線維を単離し、mRNA の分解を防ぐため、それぞれの筋線維を RNAlater 中で保存した(4 で一晩置いた後に、-80 に移動)。

凍結横断切片は速筋型または遅筋型のミオシン重鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、それぞれが発現する割合を評価した。また、

その残りの筋サンプルからタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 法も用いてミオシン重鎖発現について解析を行った。

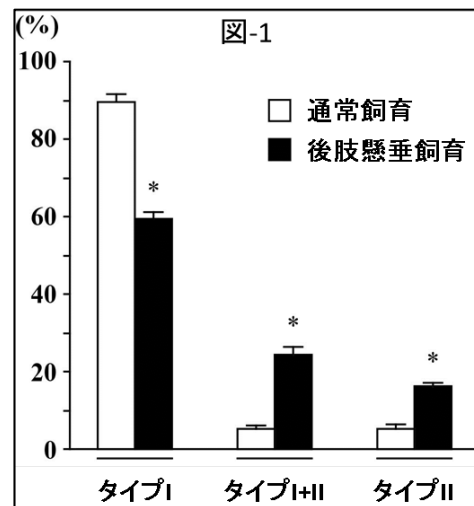
単一筋線維からは RNA 抽出用試薬(ISOGEN)を用いて RNA を抽出し、速筋型および遅筋型のミオシン重鎖の mRNA レベルの発現量について、リアルタイム PCR 法を用いた解析を行った。

(2) 10 週齢のウイスターハノーバーラットの坐骨神経を切除した後、14 日間飼育し、(1)と同様の方法でヒラメ筋におけるミオシン重鎖発現について評価を行った。

後肢懸垂飼育により、抗重力活動に伴う持続的な筋活動を抑制したとき(筋線維の電気的活動パターンを変化させたとき)と、坐骨神経切除により、筋線維の神経細胞(運動神経および感覚神経)との相互作用を除去したときに誘発されるヒラメ筋のミオシン重鎖発現の変化を比較することにより、神経細胞(運動神経および感覚神経)の作用および筋線維の電気的活動パターンの変化が、ミオシン重鎖の発現制御に及ぼす影響についての検討を行った。

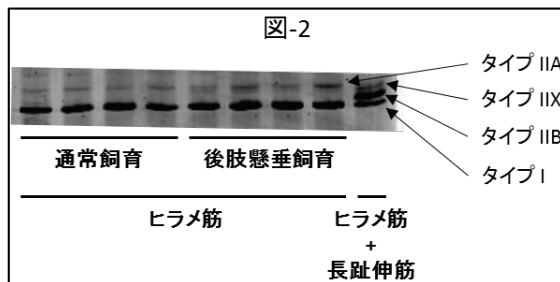
4. 研究成果

(1)通常、ラットのヒラメ筋を構成する筋線維は、ほぼ(約 90%程度)遅筋型のミオシン重鎖のみを発現する筋線維である。しかし、14 日間の後肢懸垂飼育したラットのヒラメ筋の横断切片を作成し、免疫組織化学染色を行った結果、後肢にかかる重力負荷の抑制は遅筋型ミオシン重鎖のみを発現する筋線維数を減少させ、速筋型ミオシン重鎖を発現する筋線維(速筋型のみ、または速筋型+遅筋型)の数を増加させることを確認した。しかしこの時、全ての筋線維において速筋型ミオシン重鎖の発現が誘導されるわけではなく、約 60%の筋線維では速筋型ミオシン重鎖の発現が誘導されず、遅筋型ミオシン重鎖のみの発現が維持されていた(図-1)。



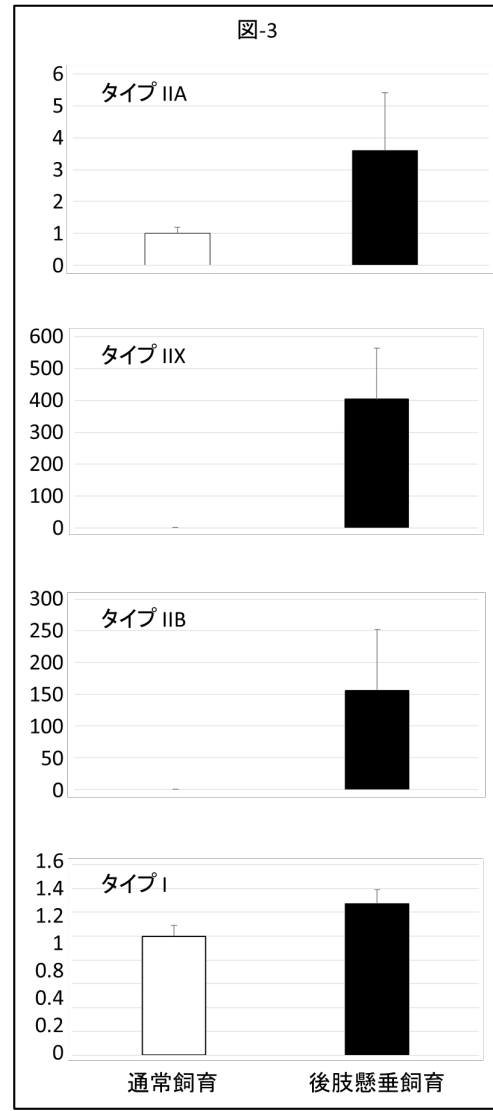
ミオシン重鎖は分子量の違いから4つのアイソフォーム(遅筋型(タイプI)、速筋型(タ

タイプ IIA、IIX、IIB))に分けられる。横断切片作成後の残りの筋サンプルからタンパク質を抽出し、SDS-PAGEにより、各ミオシン重鎖アイソフォームの発現について解析を行った結果、通常ほとんどの個体のヒラメ筋では大量のタイプ I と微量のタイプ IIA が発現していることを確認した(一部の個体ではタイプ IIB の発現も確認された)。そして、14 日間の後肢懸垂飼育により、速筋型の中でもタイプ IIA および IIX の発現が増加するが、タイプ IIB の発現は低いまま維持されていた。また、このときタイプ I の発現量は、14 日間の後肢懸垂飼育に影響を受けないことも確認した(図-2)。



単離した単一筋線維内の各ミオシン重鎖アイソフォームの mRNA の発現量について解析した結果、通常ほとんどの筋線維では、タイプ I の mRNA が多く発現しており、他の 3 つの速筋型アイソフォームの mRNA 発現は、低く抑えられていることを確認した。しかし、14 日間の後肢懸垂飼育により、速筋型ミオシン重鎖の mRNA 発現は増加した。特に、タイプ IIX および IIB の mRNA 発現の変化が顕著であり、それぞれ平均して 403 倍、155 倍にまで増加した。また、タンパク質発現と同様、タイプ I の mRNA 発現量に目立った変化は見られなかった(図-3)。さらに、単一筋線維ごとに観察すると、通常のヒラメ筋では、筋線維間の各ミオシン重鎖アイソフォームの mRNA の発現量はほぼ安定しているが、後肢懸垂飼育を行ったラットのヒラメ筋の筋線維では激しく変動し、「通常筋線維の発現パターンを維持したもの」と「速筋型アイソフォームすべての発現が上昇するもの」、「速筋型アイソフォームの中でもタイプ IIX と IIB のみ発現が上昇するもの」の少なくとも 3 パターンに分類できることが明らかになった。このとき、タイプ IIX と IIB の発現上昇の程度を比較すると、速筋型アイソフォームすべての発現が上昇していた筋線維の方が大きかった。

以上の結果から、後肢懸垂飼育したラットヒラメ筋内のミオシン重鎖の mRNA およびタンパク質、それぞれの発現量の変化に、共通点も相違点も確認されたため、各ミオシン重鎖アイソフォームのタンパク質発現は、各々 DNA から mRNA への転写の段階および mRNA からタンパク質への翻訳段階で制御されていることが示唆される。



(2)「後肢懸垂飼育モデル」と「坐骨神経切除モデル」、それぞれがヒラメ筋のミオシン重鎖発現(mRNA およびタンパク質)に及ぼす影響の比較を行ったが、目立った違いは確認されず、「坐骨神経切除モデル」を用いた実験においても(1)と同様の結果を得た。

以上、本研究により得られた結果は、先行研究により、筋線維内の各ミオシン重鎖アイソフォームの発現は、神経細胞(運動神経および感覚神経)の作用や筋線維の電気的活動パターンの変化(持続的パターンから断続的パターンへ)によって調節されている可能性が報告されているが、これら以外にも重要な因子が関与していることを示している。例えば、各々の筋線維は本来、遺伝子のエピジェネティックな修飾等により様々なパターンでミオシン重鎖アイソフォームを発現することが決定されており、神経細胞や電気的活動パターンは、異なる性質を持つ筋線維が集合し1つの骨格筋として効率よく機能することができるように、ミオシン重鎖アイソフォームの発現パターンを合わせる役割があるのかもしれない。そして、それらの因子の影響がなくなると筋線維は本来の性質に戻つ

ていくということも考えられる。

上記の仮説を検証するため、今後は、まず骨格筋の廃用に伴い、その筋を構成する筋線維の不均質性が増すメカニズムおよび神経細胞の作用や筋線維の電氣的活動パターンが筋線維のミオシン重鎖発現を変化させるメカニズムの解明を目指した研究を行う必要がある。

骨格筋の機能に大きな影響を及ぼすミオシン重鎖タンパク質の発現制御メカニズムを解明することができれば、廃用に伴う骨格筋機能低下に対する新たな予防策の確立につながるるとともに、リハビリテーションの現場等において、骨格筋への処方の効果や患者の回復の程度を客観的に評価する際に用いることができる指標の発見にもつながる可能性があると考える。

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 0 件)

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 宇志 (OHIRA, Takashi)

宇宙航空研究開発機構・有人宇宙ミッション本部・宇宙航空研究員

研究者番号：40633532