

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350809

研究課題名(和文)遅筋特異的に高発現している新規遺伝子の機能解明

研究課題名(英文)Function of a novel gene which highly expresses specifically in slow twitch muscle fibers

研究代表者

久保田 俊一郎 (KUBOTA, Shunichiro)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00260480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋に高発現している新規遺伝子のタンパク質について、機能や局在に関してはほとんど解明されていない。遅筋および速筋についてさらに解析したところ、マウス遅筋において速筋に比べ発現量が高いことを見出している。本研究では新規遺伝子の遅筋における機能を明らかにすることを目的とした。持久的運動において老齢トランスジェニックマウスは全く走行せず、病理所見でも異常を認めた。新規遺伝子の分布は筋線維ごとであり、分布している筋線維の数が遅筋では顕著に多かった。筋線維の種類による機能に新規遺伝子が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Function and localization of a novel gene which expresses in skeletal muscle is unknown.

We first clarified that the proteins of novel gene are expressed higher in slow twitch muscle fibers than in fast twitch muscle fibers. Therefore, we tried to clarify the function of the protein in slow twitch muscle fibers in endurance exercise. In endurance exercise old (two year- and two year and a half-old) transgenic mice did not run at all. Using transgenic mice we performed pathological analysis and revealed vacuolar degeneration in slow twitch muscle fibers. Immunohistological analysis revealed that the protein of a novel gene was detected as dot-like immunostaining in each muscle fiber. The results suggest that the protein of a novel gene play a pivotal role in endurance exercise.

研究分野：生化学

キーワード：遅筋 運動 トランスジェニックマウス K0マウス オートファジー 速筋

1. 研究開始当初の背景

骨格筋には2種類の筋肉が存在し、遅筋線維優位の筋肉(遅筋)と速筋線維優位の筋肉(速筋)がある。遅筋線維はミトコンドリアを多量に含み酸素を利用しエネルギーを産生する。研究代表者が焦点を当てた新規遺伝子の機能についてはほとんど明らかになっていない。遅筋、速筋における新規遺伝子の発現量についても解析されていない。そこで、研究代表者は遅筋と速筋における発現量に焦点をあてて解析した結果、遅筋でタンパク質の発現量が高いことを明らかにした。どの組織にも発現している遺伝子であれば、基本的な機能に関わっていると考えられるが、特定の組織に限定されるとその組織の機能に特化した役割に関与していると思われる。さらにこの遺伝子は細胞内での局在や細胞内で結合する因子を解析した結果、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つであるオートファジーに関連していることが示唆されていた。しかし、この遺伝子については細胞内での機能はまだ十分解明されているとは言えず、さらに生体組織内に関してはほとんど情報がない。

2. 研究の目的

新規遺伝子の発現が骨格筋の遅筋に高いという特徴を踏まえ、個体レベルで組織の機能に特異的に関わっている研究は未だ全くなされていない。研究代表者は、すでにノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作成しており、これらを用いて解析することにより、遅筋における新規遺伝子の生理機能が判明すれば、遅筋の発達促進メカニズムについての重要な知見が得られる。

3. 研究の方法

(1) 新規遺伝子の持続的運動に及ぼす影響

新規遺伝子のトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを用いて、トレッ

ドミル走行を実施し走行距離を比較した。本実験を行う前に2日間、ならし走行を行った。マウスの週齢は9週齢および2年~2年半齢の2グループについて解析した。9週齢グループは最初20m/minからスタートし、その後一定のスピードで速度を増加させて限界走行の時間を測定し、同時に走行距離を算出した。2年~2年半齢グループは最初5m/minからスタートした。走行後のマウスから遅筋および速筋を摘出し、H.Eで染色を行い、筋組織の解析を行った。

(2) 新規遺伝子の骨格筋での局在

遅筋および速筋のそれぞれの筋肉について、野生型マウスおよびトランスジェニックマウスを用いて筋肉での新規遺伝子の局在を検討した。マウスからヒラメ筋(遅筋)および長趾伸筋(速筋)を摘出し、即座にコンパウンド内で凍結した。その後、凍結組織切片を作成し新規遺伝子を認識する抗体を用いて免疫組織染色を行った。解析は共焦点蛍光顕微鏡および標準的な蛍光顕微鏡を用いて行った。

(3) 新規遺伝子の筋線維ごとの分布

遅筋および速筋はそれぞれタイプの異なる筋線維から構成されている。これらの筋線維タイプと新規遺伝子の分布に関連があるか検討するため、野生型マウスのヒラメ筋についてATPase染色(pH 4.4)を行い免疫染色の結果とともに解析した。

(4) 新規遺伝子の運動刺激による発現量の変化

運動刺激により様々な生理的变化が引き起こされることから、野生型マウスを用いて解析を行った。トレッドミルを用いて30分間の走行を2週間行った。最後の走行後、ヒラメ筋および長趾伸筋を摘出し、免疫組織法およびウェスタンブロット法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規遺伝子の持久的運動における機能

新規遺伝子は遅筋にタンパク質発現量が顕著に高いことから、持久的運動において機能しているのではないかと考えた。そこで、新規遺伝子のトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを用いてトレッドミル走行実験を行った。9週齢のマウスを用いて走行距離を比べた結果、トランスジェニックマウスは野生型より低い値を示したが、有意差は見られなかった。また、ノックアウトマウスの走行実験においても野生型よりも低い値を示したが、有意差は見られなかった。一方、老齢マウス(2年~2年半齢)を用いた場合は、トランスジェニックマウスはすべて全く走行しなかった。またノックアウトマウスは野生型よりも走行距離は低い値であったが、有意な差は見られなかった。

老齢マウスの走行実験でみられた異常な現象を解明するため、走行実験を行った老齢マウスの遅筋および速筋の組織切片の解析を行った。その結果、トランスジェニックマウスにおいて異常な所見がみられた。遅筋組織において空胞変性などが見られた。また速筋組織においては、わずかな異常が観察された。一方、ノックアウトマウスの組織においては野生型と比べ異常は観察されなかった。

(2) 新規遺伝子の骨格筋内での局在および筋線維タイプの関連性

新規遺伝子の筋線維内部での局在を解析するため、既知の構造タンパク質との局在を比較することにより、1帯に局在していることを見出した。筋線維の縦方向での分布は縞模様を示し、トランスジェニックマウスではさらにドット状に分布していることが明らかとなった。野生型と異なり、このドット状に分布していることは、筋肉内での環境変化により局在が変化する可能性を示唆する。さらに横断面を解析した。筋線維ごとに線維内部で全体的にドット状に分布しており、遅筋

では筋全体が染色されていた。一方速筋では一部の筋線維が染色されていた。この染色像の結果は、これまでウェスタンブロット法にて見出した結果と同様で、遅筋での発現量が高いことと一致した。

また、新規遺伝子の筋線維分布と筋線維のタイプが一致するかを解析した。遅筋に多いタイプI型の線維の検出を試みた。ATPase染色法の結果と免疫染色で得られた染色像を比較したが、同じ分布ではなかった。さらにノックアウトマウスではタイプI型の分布は野生型と同程度であった。このことから新規遺伝子の分布は筋線維タイプとは異なる分布の可能性が示唆された。

(3) 新規遺伝子の運動刺激による発現量の変化

遅筋および速筋についてウェスタンブロット法および免疫組織染色法にて解析を行った。その結果、新規遺伝子は遅筋では運動刺激により顕著に発現量の増加が見られた。また局在も運動により蛍光強度が強くなっていた。ミトコンドリアも発現量が増加するとともに新規遺伝子の局在と類似したものとなった。この結果は、新規遺伝子は運動刺激により発現量が増加することを示唆している。

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

久保田 俊一郎 (KUBOTA, Shunichiro)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00260480

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし