

論文の内容の要旨

論文題目 「身体運動に伴う筋タンパク質の変動に関する研究」

Changes of muscle protein levels induced by physical exercise

氏 名 高橋 慎博

1. 研究の目的

近年、組織や胚で発現しているあらゆる全長 cDNA を獲得しようとする試みがなされ、機能未知の数々の遺伝子がクローニングされ[4,8,9,10]、それらの推定アミノ酸配列がデータベースに掲載された。これにより、プロテオーム解析法を活用して機能未知の仮想タンパク質 (Hypothetical protein) の変動を調べることが可能となった。

そこで、本研究では運動に伴い骨格筋内で変動する新規なタンパク質を見出すことを目的とし、Zhou M. らによるマウス水泳運動モデル[11]を用いて、腓腹筋由来の総タンパク質についてプロテオーム解析法により探索を行った。

2. 研究の結果と考察

2-1 運動に伴って変動するC2H2型zinc finger転写因子AI854635

プロテオーム解析の結果、2次元電気泳動ゲル上で、水泳運動(150分間)後に顕著な量的減少がみられたスポットの1つが expressed sequence AI854635 タンパク質と同定された(別紙 1/2 図 1 を参照)。さらに、mRNA レベルでの変動を半定量的 RT-PCR によって調べた。水泳運動前後のマウスから個体別に腓腹筋を採取し、個々について Total RNA を抽出して AI854635 mRNA の変動を調べた。その結果、水泳運動(150分間)後に AI854635 mRNA が 23%減少することが確認された(別紙 1/2 図 2 を参照)。

2-2 AI854635の機能の推定

AI854635 は推定アミノ酸配列から、497 アミノ酸から成る分子量 56 kDa の C2H2 型 zinc finger 転写因子と考えられた。しかし、その細胞内機能はこれまで明らかでなかった。そこで、AI854635 の細胞内機能を推定するために、AI854635 の推定アミノ酸配列を NCBI ドメイン検索プログラムに供したところ、AI854635 は 12 個の C2H2 型 zinc finger ドメインのほかに、LIM ドメイン、SIP 1 (Smad-interacting protein 1) ホメオボックス、リプレッサー型転写因子 SALM ドメイン等が高度に保存されていた(別紙 2/2 図 3 を参照)。これらを有する既知タンパク質に共通する細胞内機能として、発生と分化への関与が示唆された。

2-3 *in vitro* における AI854635 の機能の検証

そこで、次にマウス筋原細胞 C2C12 を用い、*in vitro* で AI854635 と細胞分化との関連について調べた。C2C12 に細胞分化を誘導し、時間を追って位相差顕微鏡で観察しつつ、細胞内 mRNA 変動を半定量的 RT-PCR によって調べた。形態観察の結果、本実験条件では分化誘導 20 時間後から C2C12 は筋管を形成し始めた。筋原細胞分化の指標となる myogenin mRNA もそれに伴い顕著に増加した。また、AI854635 mRNA は myogenin mRNA に先立ち、分化誘導 6 時間後から徐々に増加した(別紙 2/2 図 4 を参照)。このことから、AI854635 は筋原細胞分化に関与していることが示唆された。AI854635 の推定アミノ酸配列全長としては既知タンパク質と相同性がないことから、AI854635 は筋原細胞分化に関与する新しい転写因子であると考えられた。

2-4 AI854635 は成体内で特定の臓器で発現量が多く認められるが、 ユビキタスな発現であり、embryogenesis に関与することが推測される

運動を実施していないマウス成体を用いて各臓器における AI854635 mRNA の発現量を半定量的 RT-PCR で調べたところ、骨格筋(腓腹筋およびヒラメ筋)、全脳、胸腺、腎臓における mRNA 発現量は多かったが、他の臓器でも発現しており、ユビキタスに発現している遺伝子と考えられた。また、AI854635 mRNA はデータベース情報から胚でも発現していることが明白なので、Smad-interacting protein 1 (SIP1) の研究報告[2]と同様に考えると、AI854635 は単に細胞分化に関与するだけでなく、embryogenesis に関与する可能性がある。

2-5 マウス水泳運動と筋分化

運動に伴い激しい負荷が与えられた骨格筋は筋分化が誘導されると報告されている[3,7]。本研究では Zhou M. らによるマウス水泳運動モデル[11]を用いたが、マウスやラットなどの実験用小動物を用いた水泳運動モデルによって筋内で筋分化の指標となる myogenin mRNA が誘導されたという報告は PubMed による検索で見い出されなかった。そこで、本研究ではさらに水泳運動と筋分化制御因子の mRNA 変動を

調べた。その結果、水泳運動に伴い、筋分化の指標となる myogenin mRNA が顕著に増加することを確認した。しかしながら、筋原細胞分化に関与することが示唆された AI854635 は水泳運動実験では逆に減少した。AI854635 が筋分化に関与するならば、細胞分化実験と水泳運動実験において AI854635 の挙動は一致する可能性が高いはずである。この一見、相反するように見える結果はタンパク質の翻訳後修飾を仮定すると説明がつく。AI854635 は筋原細胞分化に関与するので、筋分化誘導が示唆された本研究の水泳運動においても AI854635 タンパク質は活性化されるはずである。AI854635 は骨格筋内ではおもに翻訳後修飾によってタンパク質レベルで活性化されると仮定すれば、AI854635 mRNA が水泳運動で顕著に増加する必要はない。むしろ 150 分間の水泳運動で AI854635 mRNA が減少する傾向が見られたことは、細胞分化とは別の要因が AI854635 に作用し、その結果を見ている可能性も考えられる。翻訳後修飾には糖鎖による修飾[5]、リン酸化による修飾[1]、アセチル化による修飾[1]、プロテアーゼによる分解(プロテオリシス)[6]等が知られているが、AI854635 が実際に翻訳後修飾を受けるか、また、どのような修飾を受けるのかは今後さらに研究が必要である。

また、AI854635 が翻訳後修飾を受けないと仮定した場合には、上記の相反する結果の原因として下記1~5の可能性を考える。

1. 水泳運動時間が 150 分間では短く、AI854635 mRNA が増大する結果をとらえられなかった
2. 運動後の回復時間が十分でなく、AI854635 mRNA が増大することを確認できなかった
3. *in vitro* と *in vivo* の実験の差異に基づく
 - (1) *in vivo* では筋分化以外の経路が影響を及ぼしている
 - (2) *in vitro* と *in vivo* で筋分化の誘導経路が異なる
4. AI854635 が他のタンパク質と相互作用しており、細胞分化時と運動時は異なる挙動を示す
5. AI854635 は筋原細胞分化と関係はあるが、分化を誘導する役割を担うのではなく、例えば筋管形成時に起こる細胞融合等に関与する

上記可能性のいずれが正しいか、今後、各々についてさらに調べる必要がある。

References

1. Bode AM, Dong Z. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**:793-805.
2. Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kaariainen H, et al. *Hum Mol Genet* 2001; **10**:1503-1510.
3. Cameron-Smith D. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; **29**:209-213.

4. Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, et al. *Genome Res* 2000; **10**:1617-1630.
5. Comer FI, Hart GW. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1473**:161-171.
6. Diez E, Alvaro J, Espeso EA, et al. *EMBO J* 2002; **21**:1350-1359.
7. Hill M, Wernig A, Goldspink G. *J Anat* 2003; **203**:89-99.
8. Kawai J, Shinagawa A, Shibata K, et al. *Nature* 2001; **409**:685-690.
9. Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. *Nature* 2002; **420**:563-573.
10. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. *Nat Genet* 2004; **36**:40-45.
11. Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, et al. *Am J Physiol* 2000; **279**:E622-E629.

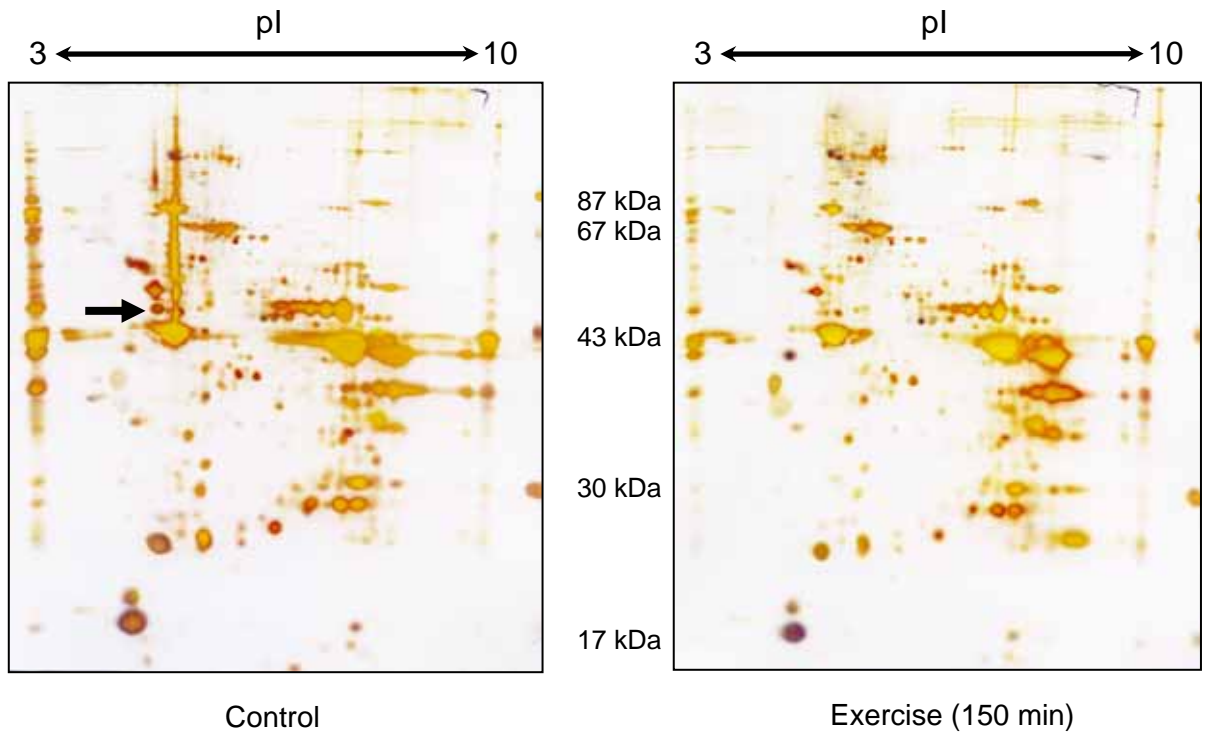


図1 水泳運動群と非運動群のマウスの腓腹筋 総タンパク質の2次元ゲル電気泳動像(銀染色)

矢印で示したスポットは水泳運動によって顕著に減少した。このスポットはexpressed sequence AI854635であった。

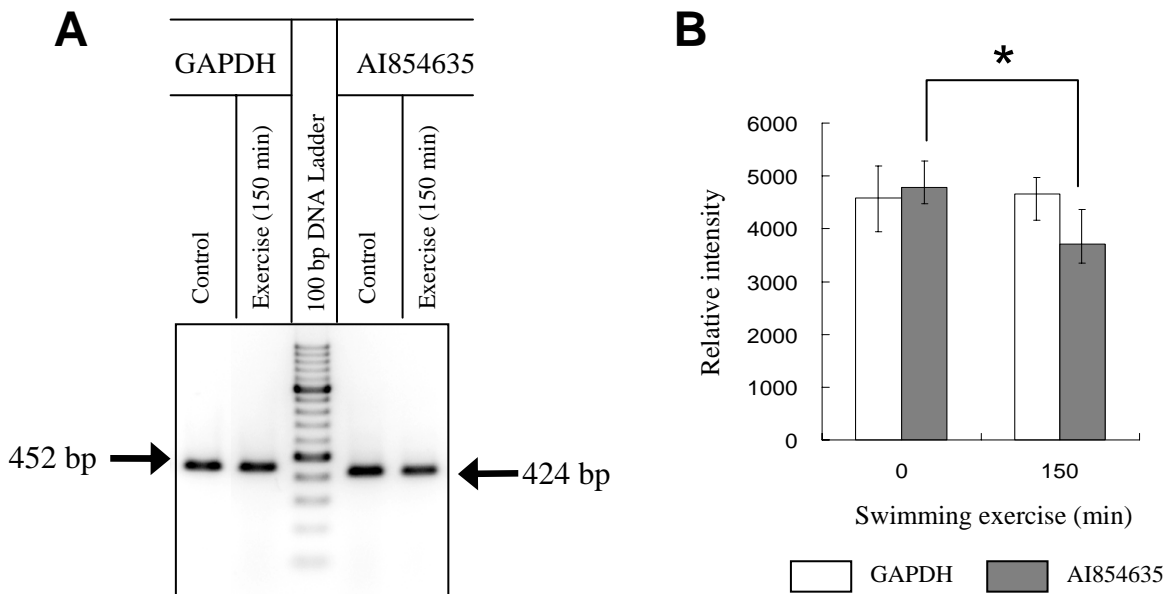


図2 水泳運動に伴うAI 854635 mRNAの減少

水泳運動(150分間)実施前後の腓腹筋内のAI854635 mRNAの発現量を半定量的RT-PCRで調べた。対照としてGAPDHを用いた。RT-PCR産物をアガロースゲル(2%)電気泳動し(図2-A)、DNAバンドをイメージアナライザー(ChemiDoc, Bio-Rad)で定量してグラフに示した(n=3)(図2-B)。また、水泳運動前後の値を比較して統計処理を行った(*t*-検定)。水泳運動時間150分で、AI854635 mRNAの発現量減少が認められた。 $*P < 0.05$

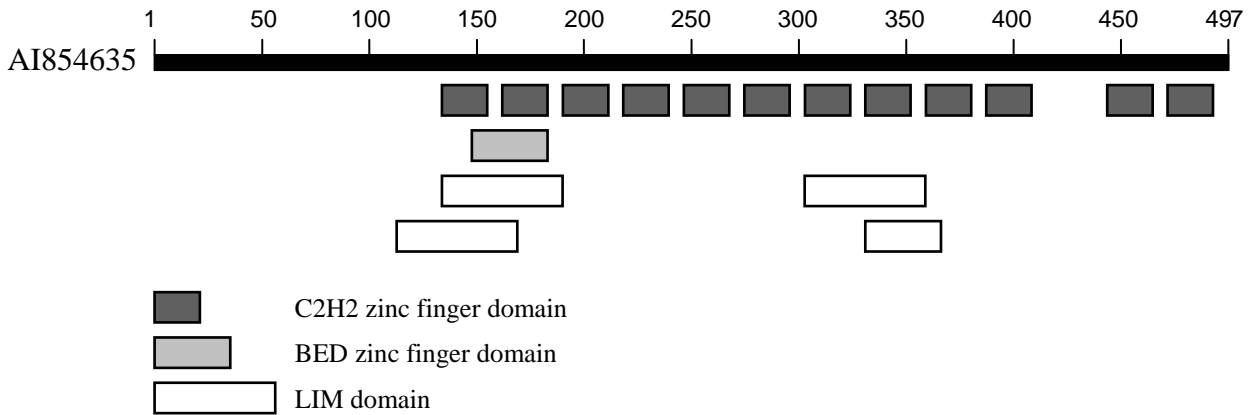


図3 AI854635の推定アミノ酸配列のドメイン検索結果

NCBI Conserved Domain Search Programを利用して、AI854635タンパク質の推定アミノ酸配列(497アミノ酸)のドメイン検索を行った。この図はoasis_smart v.2.02データベースによる検索結果である。

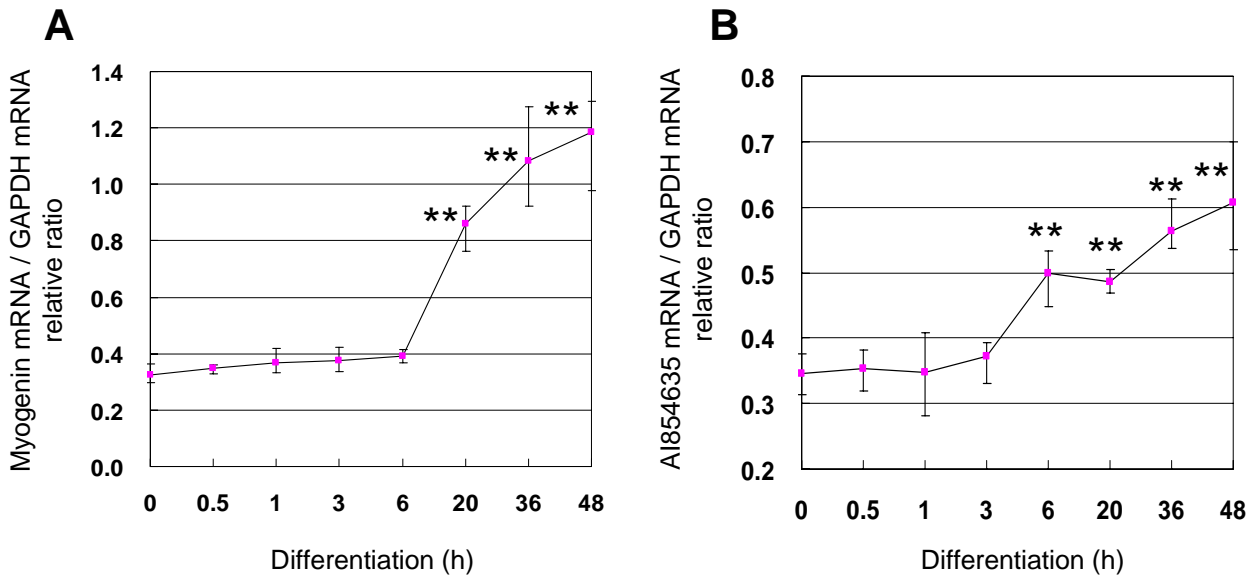


図4 C2C12細胞分化誘導に伴うmRNA発現レベルの経時的推移

C2C12細胞に細胞形態分化を誘導し、細胞内で発現しているmRNA量の経時変化を半定量的RT-PCRで調べた。なお、顕微鏡観察の結果、分化誘導後20時間から筋管が形成されていることが確認された。RT-PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動を行い、DNAバンドをイメージアナライザー (ChemiDoc, Bio-Rad) で定量した。コントロールとしてGAPDH mRNAのRT-PCRを行い、各測定値をGAPDHの個々の測定値に対する比としてグラフに表した(n=3)。さらに、分化誘導後の各時間の値を、0時間の値と比較して統計処理を行った(*t*-検定)。図4-Aはmyogenin mRNA量の推移を表す。分化誘導後20時間で顕著な増大が見られた。図4-BはAI854635 mRNA量の推移を表す。分化誘導後、徐々に発現量の増大が見られた。myogenin mRNAに先行して発現量が増えた。***P* < 0.01