

論文内容の要旨

論文題目 骨格筋の機械的刺激応答機構に関する研究
A study on mechanism of response to mechanical stimuli of skeletal muscle

氏名 桜井隆史

<背景及び目的>

地球上に生きる生物は常に重力を受け、動物は重力に抗して移動するために骨格筋組織を発達させている。骨格筋組織は機械的刺激に顕著に反応する組織であり、活動量増加や活動時の負荷増大により肥大、活動量減少や負荷減少により萎縮がそれぞれ引き起こされる。収縮様式の異なる収縮刺激、ストレッチによる受動的伸張刺激、神経刺激、ホルモン刺激などにより骨格筋の大きさや筋組成が変化し、変化した性質は一定期間保たれる。この適応現象は骨格筋の可塑性と呼ばれ、骨格筋は非常に適応性の高い器官であるということが言える。

研究対象としての骨格筋の歴史は古く、収縮機構及び張力発揮機構についての研究が生理学、生化学の手法を用いて多くなされてきている。最近の培養細胞技術の発達により、発生及び分化過程については培養細胞系を用いて細胞学的研究及び分子遺伝学的研究が行われるようになってきている。この時の筋細胞としての分化マーカーは筋芽細胞の融合、すなわち筋管形成である。筋組織の肥大及び萎縮といった可塑性についての研究を行うためには、分化後に成熟し横紋形成した筋管を対象に実験を行うことが必須であるが、培養細胞系で成熟した筋管は自発的収縮により基質から剥離するため維持が難しく、収縮構造を有する完全分化後の骨格筋モデルを対象とした研究は未だ非常に少ないのが現状である。姿勢の維持に關与する抗重力筋では遅筋線維が発達し、重力に抗して持続的に張力発揮を行っている。微小重力環境や手術後

のベッドレスト及びギプス固定等による非荷重といった骨格筋への機械的刺激の減少により、骨格筋の萎縮が認められる。これら宇宙科学や医療の分野において筋萎縮防止が望まれている。

*In vivo*の骨格筋萎縮のモデルとして用いられるラットの後肢懸垂モデルでは、ラットの後肢への機械的刺激減少により、抗重力筋である soleus muscle の顕著な萎縮が確認され、ストレッチにより筋長を維持することで萎縮を抑制することができることが知られている。当研究室ではラットの後肢懸垂モデルを用いて、後肢懸垂による萎縮 soleus muscle において small heat shock protein (sHSP) の一つである α B-crystallin タンパク質量が早期にかつ顕著に減少し、ストレッチにより短縮を抑制した筋組織では萎縮が抑制されるとともに α B-crystallin タンパク質量の減少が抑えられることを明らかにした。免疫組織化学的手法により、 α B-crystallin は培養細胞のアクチンストレスファイバーや中間径フィラメントと共局在することが示されているが、当研究室では、骨格筋由来の培養細胞 (L6E9 myoblast cell) 抽出物の抗 α B-crystallin 抗体に対する免疫沈降により、細胞骨格成分の一つであり細胞構造の維持に重要であると考えられる tubulin が α B-crystallin と共沈し、免疫組織化学的手法により L6E9 myoblast cell において α B-crystallin と微小管が共局在し、精製 α B-crystallin が MAPs を含む精製微小管に結合することを電子顕微鏡で示した。

骨格筋を研究対象とした研究は、張力発揮機構を明らかにするための収縮構造についての研究や、分化の機構についての研究は多くなされているが、骨格筋の生理的状態の生化学的側面からの研究は非常に少ない。さらに、機械的刺激や、力学的力を伝達するための細胞内器官と考えられる細胞骨格に注目した研究はさらに少ないのが現状である。骨格筋は自身の張力を外部に伝達することが出来、外部からの機械的刺激に反応して細胞を肥大・萎縮の方向へ再構成する。骨格筋の機械的刺激への応答機構を明らかにすることで、骨格筋萎縮機構解明への示唆が得られると考えられる。本研究では、骨格筋組織の特に遅筋線維に多く発現し、筋肉萎縮時に顕著に減少するタンパク質である α B-crystallin と、その基質である tubulin/微小管について注目し、骨格筋組織の機械的刺激に対する応答機構について明らかにすることを目的とした。

<結果>

様々な筋肉組織に含まれる α B-crystallin と tubulin の量を western blotting 法で検出したところ、 α B-crystallin と tubulin の発現量には相関があることが認められた。

ラット後肢懸垂モデルを用いた萎縮 soleus muscle 組織においては、 α B-crystallin と tubulin の存在量の顕著な減少が認められた。さらに、Hsp27、p20、Hsp70、Hsp90 についても同様に減少することが明らかとなった。一方、Hsc70 は萎縮時にも存在量の変化が認められないことが明らかとなった。

半定量的 RT-PCR 法によりラットの後肢懸垂モデル実施時の α B-crystallin と β I-tubulin の

mRNA 量を測定した。 α B-crystallin の mRNA 量は 2 日目には有意に、その後も萎縮に伴い減少した。HS からの回復 1 日目には対象群の 1.8 倍であった。一方、 β I-tubulin の mRNA 量は HS による筋萎縮時でもほぼ一定に保たれ、対象群との有意な差は認められなかった。筋萎縮時には一定に保たれた β I-tubulin の mRNA 量だが、HS からの回復 1 日目には対象群の 2.1 倍に増加した。萎縮時の soleus muscle では、tubulin タンパク質は萎縮に伴い減少するが、tubulin の mRNA は変化しないことが明らかとなった。

分子シャペロンである α B-crystallin と tubulin の多くは soleus muscle 抽出物の細胞質画分に得られる。soleus muscle 抽出物を用いて、免疫沈降法、taxol を用いた MT sedimentation assay 法、blue native-PAGE 法により、 α B-crystallin と tubulin/微小管とのタンパク質相互作用を明らかとした。

細胞内での α B-crystallin の役割をより明らかにするために、mouse 筋芽細胞由来の C2C12 細胞を用いた実験を行った。 α B-crystallin cDNA の sense 鎖、antisense 鎖を導入して α B-crystallin の発現を減少させた C2C12AS 細胞を用いて、実験を行った。 α B-crystallin 発現量の低い細胞は全く筋管形成を起こさなかった。また、免疫組織化学的手法により、各細胞内の微小管を染色したところ、 α B-crystallin の発現量に対応した MT network の蛍光染色像が得られた。

in vitro 組織培養時に摘出した筋肉組織に張力を与える条件 (stretch, ST) と与えない条件 (non-stretch, non-ST) で培養を行う事で、in vitro で筋肉組織に対する機械的刺激の影響について判定を行う実験系を考案し、in vitro stretch 組織培養モデルと名づけた。in vitro stretch 組織培養モデルでは、non-ST 条件では培養開始 4 時間後には多くのタンパク質が SDS-PAGE 像で減少することが明らかとなった。

in vitro stretch 組織培養モデルでの培養後の骨格筋抽出液中では、20S プロテアソーム系のペプチダーゼ活性が亢進している可能性が示された。

< 考察 >

本研究においては、soleus muscle 抽出液において、tubulin と分子シャペロンである α B-crystallin が相互作用することを免疫沈降法、MT sedimentation assay 法、blue native-PAGE 法の 3 種類の生化学的方法により示した。免疫沈降法と MT sedimentation assay 法により tubulin/微小管と α B-crystallin が共沈したが、Hsp70 と Hsp90 は共沈が確認されなかったため、tubulin/微小管に対する sHsp の機能と、良く知られた Hsp (Hsp90, Hsp70) の機能は異なる可能性がある。 α B-crystallin は tubulin/微小管に対して、通常の分子シャペロンとしての働きとは違う、特別な役割を有しているのかもしれない。また、抗 tubulin 抗体に対する免疫沈降法からは tubulin と α B-crystallin が相互作用することが示され、MT sedimentation

assay 法からは tubulin の重合体である微小管と α B-crystallin が相互作用することが示された。 α B-crystallin は脱重合した形態の tubulin と重合した形態の微小管とも相互作用し、細胞骨格の tubulin/微小管と深い関係を持っていると考えられる。

tubulin/MT は極性を動的に生成する性質を有し、培養骨格筋細胞の分化時の細長い筋管形成に必須である。しかし、分化後の培養骨格筋細胞における tubulin/微小管の役割の詳細ははっきりしていない。 α B-crystallin は筋萎縮時に顕著に減少することが知られていたが、本研究において、筋萎縮時には tubulin も同様に減少することを明らかにした。さらに、培養細胞系を用いた実験で、 α B-crystallin の発現を抑えた細胞では筋管形成が困難であり、MT の量が少ないことを示した。 α B-crystallin と tubulin/微小管は筋細胞内で相互作用しつつ、筋細胞の正常なはたらきや筋管形成に必要であることが示唆された。

また、受動的ストレッチによる機械的刺激が後肢懸垂モデルでの soleus muscle の萎縮を抑制し、in vitro stretch 組織培養モデルでの伸張刺激非存在条件ではタンパク質が速やかに減少することから、機械的刺激が骨格筋の生理的状态維持に重要な働きをしていると考えられる。in vitro stretch 組織培養モデルでの培養後には 20S プロテアソーム系のペプチダーゼ活性が高まっていたことから、機械的刺激とタンパク質分解系が関連している可能性が示された。

筋細胞は張力発揮・維持・伝達と筋収縮の制御のための多くの特別なタンパク質を発現していると考えられるが、動的に極性をもった突出力や前進力を生み出すように制御されている tubulin/微小管やアクチンといった細胞骨格系は、細胞内の構造の再構成を含んだ筋細胞の適応において必須な役割を担っていると考えられる。分子シャペロンである α B-crystallin を含む sHSP は、それらの細胞骨格に相互作用し、動的な安定的持続に寄与することで、特に大きな張力などの力がかかり続ける組織や器官内の細胞内で重要なはたらきをしていると考えられる。骨格筋への機械的刺激が減少すると、 α B-crystallin が減少することにより、細胞骨格系の動的維持安定化能力が低下すると考えられる。また、もともと α B-crystallin の発現が高い細胞では動的状態にあり常に変性タンパク質が生成され続けていると考えられ、変性タンパク質の分解が亢進していると考えられる。本研究では張力がかからない状態では筋タンパク質の見た目の合成量は減少し、タンパク質分解は亢進することが明らかになった。tubulin のタンパク質の分解制御がプロテアソーム系で制御されているかどうかは明らかにすることはできなかったが、形態や張力維持システムを形成している tubulin/微小管が自動制御的に機能の減退を反映させる制御系を構築して、筋の可塑的制御系と関連していることは興味深い。

本研究では、世界ではじめて機械的刺激や運動が、骨格筋細胞の基幹システムであるタンパク質合成や分解活性化維持に関わっていること、さらにはその張力維持に必須な分子シャペロンのより素早い変化が、ダイナミックな変化の前兆となって適応的に働いていることを示すことができた。