

## 総合討論

本研究で行った分子レベルでの解析により、MuRF1 がいくつかの分子に対し Ub-E3 として作用すること、また、個体レベルでの解析では、MuRF1 が血中アミノ酸量の維持と筋タンパク質合成系に関与していることが明らかとなった。ここで、まず、これらの結果を総合的に捉え MuRF1 がどのような生理機能を有するのかを考察し、続いて今後の研究課題についてまとめてみたい。

## 1. MuRF1 の持つ生理機能

本研究で示したように、MuRF1 は複数の分子に対し Ub-E3 として機能することが明らかとなった。これら基質分子の機能は多岐に渡っているが、統合して考えると、MuRF1 は骨格筋でのアミノ酸、エネルギー消費を抑え、骨格筋から他の臓器にアミノ酸やエネルギー源を供給する方向に働いていると考えられる。これを、MuRF1 による代謝恒常性維持のモデルとして図 3 にまとめた。まず、アミノ酸の供給という点では、MuRF1 はいくつかの基質タンパク質を分解に導くことでアミノ酸の産生を行っている。また、HIBADH の分解制御については、単にアミノ酸の産生という以上に、アミノ酸代謝の制御によりアミノ酸供給量を増加させている可能性がある。更に、筋細胞内のタンパク質合成の抑制を介しても、MuRF1 はアミノ酸供給量の増加に寄与していると考えられる。筋タンパク質合成制御のメカニズムについては不明であるが、一部は GMEB1 を介した転写制御であると思われる。一方で、筋細胞内でのエネルギー源消費を抑え、他の臓器にエネルギー源を供給するという点では、まず、筋細胞内での ATP 産生に大きく寄与する M-CK の分解制御が挙げられる。HIBADH の分解も、糖新生の原料を筋細胞内で代謝することを防いで肝臓へと供給することでエネルギー制御に関与している可能性が考えられる。

このように、MuRF1 が M-CK や HIBADH という代謝に関わる酵素に対し Ub-E3 として機能することは、MuRF1 が積極的に代謝制御を行っていることを意味している。MuRF1 が筋細胞内の代謝制御に関わるとの考えは、最近他のグループからも示されている(39,135)。異化シグナルに対する筋タンパク質分解の研究は古くから行われているが、それらの多くが筋細胞内のタンパク質量の多くを占める筋原線維タンパク質の分解に注目したものであった。しかし、骨格筋は肝臓と並ぶ代謝調節器官であり、筋タンパク質分解は代謝適応の一つの形であるから、今後は、筋萎縮の筋タンパク質分解を、大規模な筋原線維タンパク質分解による量的な面に加え、代謝酵素制御による質的な面からも解析する必要があると思われる。

## 2. MuRF1 の機能制御

本研究ではMuRF1がいくつかの基質に対しUb-E3として機能することを示した。また、酵母 Two-Hybrid 法を用いた解析で MuRF1 の結合分子が数多く同定されていること、MuRF1 遺伝子の単独の破壊で筋萎縮耐性になるということを考えると、MuRF1 は多くの基質に対しUb-E3として機能している可能性が高い(28,39,132)。その場合、このような多くの基質をどのように認識しているのかが問題となる。本研究では M-CK に対する結合部位として MuRF1 の B-box ドメインを同定した。他の報告では、例えば筋原線維タンパク質 Troponin I やコネクチンとの結合は MFC 領域、Coiled-Coil ドメインおよび C 末端領域という幅広い領域で、また、eEF1 $\gamma$ や転写調節因子 MARP1 とは B-box および Coiled-Coil ドメインを介して結合していることが示されている(39,132)。MuRF1 も属する RBCC/Trim タンパク質の多くは Ub-E3 として機能しているが、その基質認識メカニズムのモデルとして、B-box、Coiled-Coil ドメインを介した多量体化による基質認識ポケットの形成というものが提唱されている(31)。MuRF1 も Coiled-Coil ドメインと B-box ドメインを介して二量体、多量体を形成しており、他の RBCC/Trim タンパク質同様、多量体形成により B-box ドメイン、Coiled-Coil ドメインを中心に MFC 領域から C 末端領域に及ぶ幅広い基質結合ポケットを作り多くの基質を認識しているのかもしれない(23,32)。

一方、MuRF1 に認識される基質側には、酵母 Two-Hybrid 法のスクリーニングで Coiled-Coil ドメインを有するタンパク質が複数含まれていたと報告はされているものの、それ以外の分子についての配列、構造上の共通性は見出されていない(33,34,38,39,132,136)。MuRF1 の相互作用分子には多くの筋原線維構成タンパク質が含まれているが、複合体を形成している筋原線維には Ub-プロテアソーム系が作用出来ないことを考えると(75)、一つの可能性として、MuRF1 は筋原線維タンパク質については構造体から遊離した分子の非構造領域を認識している可能性が考えられる。また、このことは、MuRF1 が結合できる酸化型 M-CK は還元型 M-CK に比べ疎水性領域の露出が多く、trypsin や proteinase K に対する感受性も高い構造的に緩んだ状態であることから(103)、筋原線維タンパク質のみに留まらず他のタンパク質にも適用できることかもしれない。もともと Ub-プロテアソーム系は変性タンパク質の除去系として同定、解析されてきた経緯があり(137,138)、その意味でも MuRF1 は極めて正当的な Ub-E3 であると考えられる。

MuRF1 の機能を考える上で、MuRF1 の機能の発現時期の制御も非常に重要な問題であると思われる。MuRF1 は代謝制御に重要な役割を担っていると考えられるが、MuRF1 の過度の発現誘導が筋萎縮を招くことから明らかなように、その無秩序な活性化は生体にとり諸刃の剣となり得る。生体は、異化シグナルに応じて MuRF1 の発現量を増加させ普段はその発現量を抑えておくことで発現量のレベルで MuRF1 の機能を制御していると考えられる(図VII参照)。一方、タンパク質レベルでの活性制御システムが存在する可能性も否定できない。例えば、MuRF1 の翻訳後修飾による機能制御として、その相互作用分子から、MuRF1 の SUMO 化やリン酸化が候補に挙げられる。培養細胞を用いた系で MuRF1 の SUMO 化は見出すことが出来なかったが、ttk による MuRF1 のリン酸化修飾については

まだ十分な解析を行えておらず、今後の課題の一つであると言える。

### 3. MuRFs 間の機能分担

本研究では、MuRF1に加え、MuRF2、MuRF3もM-CKに対するUb-E3として機能することを明らかにした。MuRFファミリーの中でMuRF2、MuRF3もUb-E3として機能していることを示唆するデータは以前から報告されていたが、それを明確に示したのはこの研究が初めてである(なお、MuRF3については、同時期に他のグループもUb-E3活性を示している(139))。ここで、MuRFファミリー間の機能の差異について考察してみたい。

MuRFファミリーは分子全体に渡り高い相同性を有し、いずれも骨格筋と心筋に特異的に発現することから、これらは互いに重複した機能を持っていると予想されている。実際、各MuRFファミリーのKOマウスの解析からも、これを支持する結果が得られている。まず、MuRF1、MuRF2の単独KOマウスは通常飼育時には目立った表現型を示さない。MuRF3 KOマウスも、WTマウスに比べサルコメア長が長いものの、その他の違いは見出されていない(28,38,140)。なお、MuRF3 KOマウスではMuRF1、MuRF2の発現量に変化はなく、MuRF2 KOマウスでMuRF1の、MuRF1 KOマウスでMuRF2の発現量に変化していないことも示されている。また、本研究での絶食条件下におけるDNAマイクロアレイ解析においても、MuRF1 KOマウスでMuRF3の発現量は変化していない(表2-1参照。MuRF2については使用したアレイにプローブが含まれていなかった)。これらKOマウスの結果に対し、MuRF1、MuRF2のダブルKO(DKO)マウスは一つ一つの筋細胞が肥大しており、出生直後には心臓がWTマウスに比べ3~4倍の大きさにもなっている。そしてその4分の3程度が、恐らく心機能の不全のため、生後16日目までに死んでしまう(39)。この期間を生き延びたDKOマウスはその後WTマウスと同様に生育出来るが、骨格筋および心筋はやはり肥大したままである。また、MuRF1、MuRF3のDKOマウスも筋細胞中にミオシン重鎖が蓄積し、骨格筋、心筋が肥大する。そして、心機能の低下や歩行困難、筋力低下などの症状を呈するようになる(139)。

以上の内容は通常飼育時におけるKOマウスの表現型についてであったが、各MuRFファミリーの単独KOマウスに対してストレス刺激を与える解析もなされている。例えば、本研究で行ったようなMuRF1 KOマウスに対する筋萎縮誘導以外にも、各MuRFファミリーの単独KOマウスに対して心筋梗塞処理がなされている(38,139)。これらのうち、MuRF3 KOマウスに対する解析とMuRF1 KO、MuRF2 KOマウスに対する解析は別グループによりなされており、単純比較が出来ないという面はあるものの、次のように非常に興味深い結果が得られている。まず、MuRF1 KOマウスはWTマウスに比べ顕著に心筋が肥大するが、MuRF2 KOマウスはWTと変わらない。それに対し、MuRF3 KOマウスは心筋の拡張が顕著で損傷具合もWTマウスに比べ悪化しており、5日以内に50%のマウ

スが突然死してしまう(WT マウスは 16%)。

これらのことから、まず、通常飼育時には MuRF1 と MuRF2、MuRF1 と MuRF3 はそれぞれ重複した機能を有していることがわかる。また、DKO マウスで症状が出るということから、MuRF1、2 間もしくは MuRF1、3 間で重複している各機能は、MuRF3、MuRF2 単独では代替出来ないということもわかる。これが、MuRF2、MuRF3 の機能が質的に異なるためなのか、あるいは MuRF ファミリーの 1 つだけでは他の 2 つの分を量的に補えないためだからなのか、という点については現時点では分からない。また、MuRF1、MuRF2 の DKO マウスが出生後の早い段階に心機能の不全で死んでしまい、その後も筋肥大等の改善がなされないことから、MuRF1 と MuRF2 の重複する機能の一部は心臓の形成・成熟の早い段階で特に重要であるが、成長してからも一定の機能を有するということがわかり、これは MuRF2 の発現パターンとも一致する(23)。一方、単独 KO マウスへのストレス刺激による実験結果から、少なくとも心筋においては刺激の種類によって MuRF1 と MuRF3 は独自の機能を有するが、MuRF2 はこの条件下においては独自の機能がないことがわかる。

以上の結果をまとめると、MuRF1 は MuRF2、MuRF3 と多くの機能的重複があるものの、MuRF3 との間には明確に異なる機能もあること、MuRF2 と MuRF3 の間にも機能の差異があることが推察される。これは、酵母 Two-Hybrid を用いたスクリーニングで MuRF1、MuRF2 の相互作用分子の多くは共通だが MuRF3 は異なる傾向にあるという報告にも合致する(39)。MuRF ファミリーの構造を比較すると、N 末端側から 1 つ目の Coiled-Coil ドメインまでの相同性は極めて高いが、それ以降 C 末端にかけては相同性が若干低くなり、特に MuRF3 でその傾向が強い(図 1-4、1-5 参照)。C 末端の多様性は RBCC/Trim タンパク質の特徴であり、N 末端側の RING-Finger – B-box – Coiled-Coil ドメインという広く共通した構造に対し、C 末端側の多様性に富んだ構造がこの種のタンパク質の個々の機能を規定していると考えられている(31)。これらのことを考えると、MuRF ファミリー間の基質特異性、機能の差異のどの程度までを説明出来るのかは不明であるが、少なくともそのような差異の一部には C 末端側の構造の差が寄与していると考えられる。

MuRF ファミリー間の機能の差という点では、本研究でも、MuRF1、2、3 がいずれも M-CK を Ub 化したものの、MuRF3 により Ub 化された M-CK のプロテアソームによる分解の感受性に他との違いが観察された。現時点では、これが実際の生体内でも起こりうることなのかどうかは不明であり、この違いをもたらしている原因の解明についても手掛かりは得られていない。しかし、*in vitro* で MuRF1 が複数の E2 と組んで機能し、なおかつ形成される Ub 鎖の種類が E2 依存的に異なることが示されていることから、MuRF ファミリーが異なる E2 を生体内で使い分け、異なる Ub 鎖修飾を基質に対して施して何らかの制御を行っている可能性も考えられ、今後の検討が必要であると思われる(141)。

#### 4. M-線におけるシグナル伝達複合体

本研究では、M線におけるシグナル伝達複合体として、MuRF1とp94、ttkに着目し、まずはMuRF1についての機能解析を行った。一方、シグナル伝達複合体という観点からの解析としては、MuRF1とp94の共発現実験などを行ったものの、2者間での相互作用(両者の結合やMuRF1のp94による切断、あるいはp94のMuRF1によるUb化)を示唆するようなデータは現在のところ得られていない。このことが、両者は筋細胞内で近接してはいるものの実際に相互作用をしないということの意味しているのか、あるいは培養細胞での共発現系では他に必要な因子が欠けているためなのかは現時点では判断できない(既述したように、MuRF1とp94はコネクチン上の結合部位ではアミノ酸約6,000残基分も離れているが、*in vivo*では2分子のコネクチン分子が逆方向に配向されるため、その2つの結合部位がほぼ同一部位にくることが予想されている(図III参照))。例えば、他に必要な因子の候補としては、M線領域のコネクチンが挙げられる。最近、カルパインがゴルジ膜やエンドソーム膜など何らかの巨大構造体を足場として機能することが示唆されている(142,143)。また、筋細胞内ではN2A領域においてコネクチンが足場として機能し、コネクチンの局所構造依存的に転写調節因子MARF2がp94に切断されることが示されている(20)。これらのことから、MuRF1とp94が相互作用する場合でもコネクチンが足場として必要である可能性は高く、今後の検証が必要である。例えばMuRF1がp94の基質となる場合、MuRF1の機能がその切断により何らかの制御を受けていることになる。GFPタグのついたMuRF1を筋細胞に発現させた解析では、用いたMuRF1の断片によりその局在が大きく異なる例も示されており、MuRF1の局在がp94による切断を通じて調節されている可能性なども考えられる(34)。

また、p94の基質候補分子としていくつかの解糖系酵素や翻訳に関与する因子が同定されているが、このこととMuRF1のエネルギー代謝やタンパク質合成の制御との関係は興味深い(144)。カルパインによる基質の切断は限定的であり基質の機能制御を目的としたものであるから、切断により基質がどのような点で非常に重要である。p94が筋細胞内でUb-プロテアソームシステムの上流で機能することを考えると、M線領域ではMuRF1とp94の直接的相互作用はなくても、p94が基質に対し作用した後にMuRF1がUb-E3活性を介しその分解除去を行うような、一つの機能的複合体を形成しているのかもしれない。この点も、今後の研究課題の一つである。

## 5. おわりに

このように、本研究ではMuRF1のUb-E3活性に対する基質をいくつか同定し、MuRF1 KOマウスを用いた解析結果とも合わせることで、MuRF1が筋細胞内の代謝制御を積極的に行っている可能性を示した。その一方で、p94やttkとの相互作用をはじめ、まだ多くの課題も残されている。MuRF1の過剰な活性により引き起こされると考えられる筋

萎縮は種々の病気や怪我の際に観られる病態であり、患者の **quality-of-life** を低下させ、時として病気を悪化させる。そのため、**MuRF1** を中心とした筋萎縮誘導の分子メカニズムを明らかにすることは、筋萎縮に対する予防法、治療法の開発のためにも非常に重要である。今後、更に **MuRF1** の機能が明らかになるとともに、**MuRF1** を阻害するような新規薬剤の開発等も望まれる。本研究がその一助となれば幸いである。

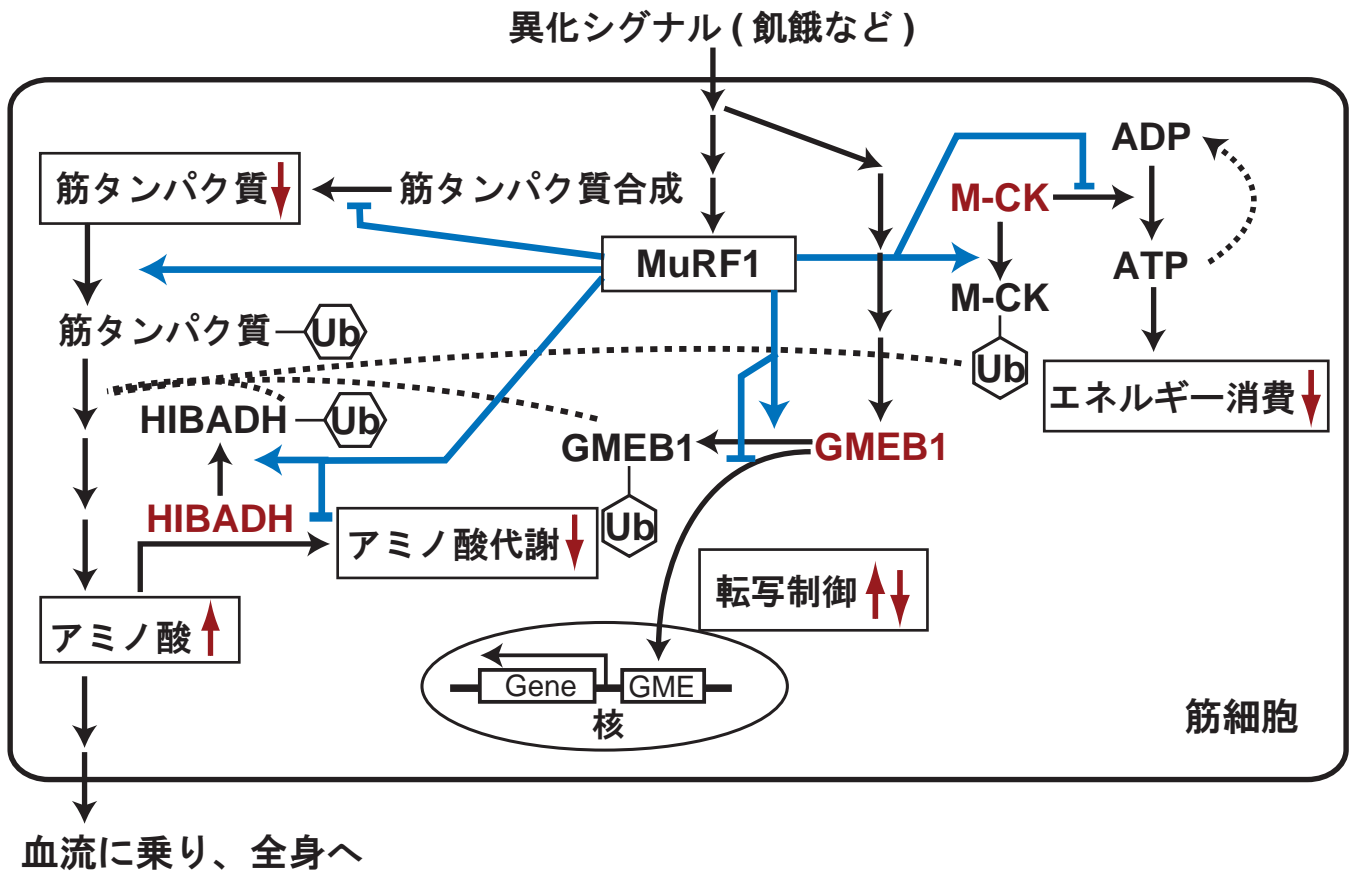


図3 異化的条件下における MuRF1 の役割

飢餓や細菌感染などの異化的シグナルにより、MuRF1の発現が誘導される。MuRF1はM-CKやGMEB1、HIBADH、さらにはTroponin Iを含む多くの筋原線維タンパク質をUb化し分解へと導く。このようにMuRF1は筋タンパク質の分解量を増加させる一方で、筋タンパク質合成の抑制も行い、血中アミノ酸量の維持に働いている。HIBADHやGMEB1の分解はそれぞれValの代謝や転写調節に関与すると考えられ、これらの分解制御を介してもMuRF1は血中アミノ酸量の維持に働いていると考えられる。また、MuRF1によるM-CKの分解は、筋細胞中のATP産生を抑制する方向に働くと考えられる。これらの結果として、MuRF1は異化的条件という危機に際し、生体が恒常性を維持できるように機能していると考えられる。

(なお、MuRF1によるTroponin IのUb化は、本文中の文献33による。)



## 参考文献

1. Engel, A., and Franzini-Armstrong, C. (2004) *Myology: basic and clinical*, 3rd Ed., McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York
2. Wing, S. S., and Goldberg, A. L. (1993) *Am J Physiol* **264**(4 Pt 1), E668-676
3. Mitch, W. E., and Goldberg, A. L. (1996) *N Engl J Med* **335**(25), 1897-1905
4. Labeit, S., and Kolmerer, B. (1995) *Science* **270**(5234), 293-296
5. Trinick, J., and Tskhovrebova, L. (1999) *Trends Cell Biol* **9**(10), 377-380
6. Trombitas, K., Greaser, M., Labeit, S., Jin, J. P., Kellermayer, M., Helmes, M., and Granzier, H. (1998) *J Cell Biol* **140**(4), 853-859
7. Puchner, E. M., Alexandrovich, A., Kho, A. L., Hensen, U., Schafer, L. V., Brandmeier, B., Grater, F., Grubmuller, H., Gaub, H. E., and Gautel, M. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(36), 13385-13390
8. Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2005) *J Muscle Res Cell Motil* **26**(6-8), 409-417
9. Lange, S., Ehler, E., and Gautel, M. (2006) *Trends Cell Biol* **16**(1), 11-18
10. Miller, M. K., Granzier, H., Ehler, E., and Gregorio, C. C. (2004) *Trends Cell Biol* **14**(3), 119-126
11. Sorimachi, H., Freiburg, A., Kolmerer, B., Ishiura, S., Stier, G., Gregorio, C. C., Labeit, D., Linke, W. A., Suzuki, K., and Labeit, S. (1997) *J Mol Biol* **270**(5), 688-695
12. Ohtsuka, H., Yajima, H., Maruyama, K., and Kimura, S. (1997) *FEBS Lett* **401**(1), 65-67
13. Gregorio, C. C., Trombitas, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H., and Labeit, S. (1998) *J Cell Biol* **143**(4), 1013-1027
14. Valle, G., Faulkner, G., De Antoni, A., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Tiso, N., Toppo, S., Trevisan, S., and Lanfranchi, G. (1997) *FEBS Lett* **415**(2), 163-168
15. Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2007) *J Biol Chem* **282**(19), 14493-14504
16. Knoll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., McCulloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P., and Chien, K. R. (2002) *Cell* **111**(7), 943-955
17. Furukawa, T., Ono, Y., Tsuchiya, H., Katayama, Y., Bang, M. L., Labeit, D., Labeit,

- S., Inagaki, N., and Gregorio, C. C. (2001) *J Mol Biol* **313**(4), 775-784
18. Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K., and et al. (1995) *J Biol Chem* **270**(52), 31158-31162
  19. Miller, M. K., Bang, M. L., Witt, C. C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A. S., Gregorio, C. C., and Labeit, S. (2003) *J Mol Biol* **333**(5), 951-964
  20. Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2008) *J Biol Chem* **283**(21), 14801-14814
  21. Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edstrom, L., Ehler, E., Udd, B., and Gautel, M. (2005) *Science* **308**(5728), 1599-1603
  22. Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) *Arch Biochem Biophys* **342**(1), 99-107
  23. Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M. L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., and Labeit, S. (2001) *J Mol Biol* **306**(4), 717-726
  24. Moreira, E. S., Wiltshire, T. J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O. T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M. R., and Jenne, D. E. (2000) *Nat Genet* **24**(2), 163-166
  25. Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., and et al. (1995) *Cell* **81**(1), 27-40
  26. Garvey, S. M., Rajan, C., Lerner, A. P., Frankel, W. N., and Cox, G. A. (2002) *Genomics* **79**(2), 146-149
  27. Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., De Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I., and Udd, B. (2002) *Am J Hum Genet* **71**(3), 492-500
  28. Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., Poueymirou, W. T., Panaro, F. J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z. Q., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2001) *Science* **294**(5547), 1704-1708
  29. Mayans, O., van der Ven, P. F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Furst, D. O., Wilmanns, M., and Gautel, M. (1998) *Nature* **395**(6705), 863-869

30. Short, K. M., and Cox, T. C. (2006) *J Biol Chem* **281**(13), 8970-8980
31. Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005) *Bioessays* **27**(11), 1147-1157
32. Mrosek, M., Meier, S., Ucurum-Fotiadis, Z., von Castelmur, E., Hedbom, E., Lustig, A., Grzesiek, S., Labeit, D., Labeit, S., and Mayans, O. (2008) *Biochemistry* **47**(40), 10722-10730
33. Kedar, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H. H., Rockman, H. A., and Patterson, C. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(52), 18135-18140
34. McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., and Gregorio, C. C. (2002) *J Cell Biol* **157**(1), 125-136
35. Dai, K. S., and Liew, C. C. (2001) *J Biol Chem* **276**(26), 23992-23999
36. McElhinny, A. S., Perry, C. N., Witt, C. C., Labeit, S., and Gregorio, C. C. (2004) *J Cell Sci* **117**(Pt 15), 3175-3188
37. Pizon, V., Iakovenko, A., Van Der Ven, P. F., Kelly, R., Fatu, C., Furst, D. O., Karsenti, E., and Gautel, M. (2002) *J Cell Sci* **115**(Pt 23), 4469-4482
38. Willis, M. S., Ike, C., Li, L., Wang, D. Z., Glass, D. J., and Patterson, C. (2007) *Circ Res* **100**(4), 456-459
39. Witt, C. C., Witt, S. H., Lerche, S., Labeit, D., Back, W., and Labeit, S. (2008) *Embo J* **27**(2), 350-360
40. Spencer, J. A., Eliazar, S., Ilaria, R. L., Jr., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2000) *J Cell Biol* **150**(4), 771-784
41. Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2004) *Mol Cell* **14**(3), 395-403
42. Adams, V., Mangner, N., Gasch, A., Krohne, C., Gielen, S., Hirner, S., Thierse, H. J., Witt, C. C., Linke, A., Schuler, G., and Labeit, S. (2008) *J Mol Biol* **384**(1), 48-59
43. Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002) *Physiol Rev* **82**(2), 373-428
44. Zwickl, P., Voges, D., and Baumeister, W. (1999) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1389), 1501-1511
45. Mizushima, N. (2007) *Genes Dev* **21**(22), 2861-2873
46. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998) *Nature* **395**(6700), 395-398
47. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000) *Nature* **408**(6811), 488-492
48. Munz, C. (2006) *Cell Microbiol* **8**(6), 891-898
49. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) *Nature* **441**(7095), 880-884

50. Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., and Yoshimori, T. (2004) *Science* **306**(5698), 1037-1040
51. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992) *J Cell Biol* **119**(2), 301-311
52. Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993) *FEBS Lett* **333**(1-2), 169-174
53. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004) *Nature* **432**(7020), 1032-1036
54. Mizushima, N., and Klionsky, D. J. (2007) *Annu Rev Nutr* **27**, 19-40
55. Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H. (2004) *Diabetes* **53 Suppl 1**, S12-18
56. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003) *Physiol Rev* **83**(3), 731-801
57. Dutt, P., Croall, D. E., Arthur, J. S., Veyra, T. D., Williams, K., Elce, J. S., and Greer, P. A. (2006) *BMC Dev Biol* **6**, 3
58. Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K., and Greer, P. A. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(12), 4474-4481
59. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2001) *J Biochem* **129**(5), 653-664
60. Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., and Bode, W. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2), 588-592
61. Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L., and Jia, Z. (1999) *Embo J* **18**(24), 6880-6889
62. Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1993) *J Biol Chem* **268**(26), 19476-19482
63. Lee, H. J., Sorimachi, H., Jeong, S. Y., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) *Biol Chem* **379**(2), 175-183
64. Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1989) *J Biol Chem* **264**(33), 20106-20111
65. Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T. C., Kawasaki, H., Sugita, H., Miyasaka, M., Arahata, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1993) *J Biol Chem* **268**(14), 10593-10605
66. Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) *J Biol Chem* **281**(27), 18519-18531
67. Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckmann, J. S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) *J Biol Chem* **273**(27), 17073-17078
68. Tagawa, K., Taya, C., Hayashi, Y., Nakagawa, M., Ono, Y., Fukuda, R., Karasuyama,

- H., Toyama-Sorimachi, N., Katsui, Y., Hata, S., Ishiura, S., Nonaka, I., Seyama, Y., Arahata, K., Yonekawa, H., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2000) *Hum Mol Genet* **9**(9), 1393-1402
69. Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J. G., and Spencer, M. J. (2004) *Hum Mol Genet* **13**(13), 1373-1388
70. Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille, A., and Beckmann, J. S. (2000) *J Cell Biol* **151**(7), 1583-1590
71. Fang, C. H., Wang, J. J., Hobler, S., Li, B. G., Fischer, J. E., and Hasselgren, P. O. (1998) *Clin Sci (Lond)* **95**(2), 225-233
72. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004) *Mol Biol Cell* **15**(3), 1101-1111
73. Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S. J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A. L., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2007) *Cell Metab* **6**(6), 458-471
74. Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H., and Goldberg, A. L. (2007) *Cell Metab* **6**(6), 472-483
75. Solomon, V., and Goldberg, A. L. (1996) *J Biol Chem* **271**(43), 26690-26697
76. van der Westhuyzen, D. R., Matsumoto, K., and Etlinger, J. D. (1981) *J Biol Chem* **256**(22), 11791-11797
77. Williams, A. B., Decourten-Myers, G. M., Fischer, J. E., Luo, G., Sun, X., and Hasselgren, P. O. (1999) *Faseb J* **13**(11), 1435-1443
78. Bartoli, M., and Richard, I. (2005) *Int J Biochem Cell Biol* **37**(10), 2115-2133
79. Hasselgren, P. O., Menconi, M. J., Fareed, M. U., Yang, H., Wei, W., and Evenson, A. (2005) *Int J Biochem Cell Biol* **37**(10), 2156-2168
80. Huang, J., and Forsberg, N. E. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21), 12100-12105
81. Tidball, J. G., and Spencer, M. J. (2002) *J Physiol* **545**(Pt 3), 819-828
82. Kramerova, I., Kudryashova, E., Venkatraman, G., and Spencer, M. J. (2005) *Hum Mol Genet* **14**(15), 2125-2134
83. Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J. L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S. R., and Mitch, W. E. (2004) *J Clin Invest* **113**(1), 115-123
84. Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S. R., Mitch, W. E., and Goldberg, A. L. (2004) *Faseb J* **18**(1), 39-51
85. Jagoe, R. T., Lecker, S. H., Gomes, M., and Goldberg, A. L. (2002) *Faseb J* **16**(13), 1697-1712
86. Li, H. H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D. Z., and Patterson,

- C. (2004) *J Clin Invest* **114**(8), 1058-1071
87. Tintignac, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P., and Leibovitch, S. A. (2005) *J Biol Chem* **280**(4), 2847-2856
  88. Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H., and Goldberg, A. L. (2004) *Cell* **117**(3), 399-412
  89. Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2001) *Nat Cell Biol* **3**(11), 1009-1013
  90. Li, Y. P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D. L., and Reid, M. B. (2005) *Faseb J* **19**(3), 362-370
  91. Cai, D., Frantz, J. D., Tawa, N. E., Jr., Melendez, P. A., Oh, B. C., Lidov, H. G., Hasselgren, P. O., Frontera, W. R., Lee, J., Glass, D. J., and Shoelson, S. E. (2004) *Cell* **119**(2), 285-298
  92. Watchko, J. F., Daood, M. J., and LaBella, J. J. (1996) *Pediatr Res* **40**(1), 53-58
  93. Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) *Annu Rev Biochem* **73**, 269-292
  94. Pan, Y., Zvaritch, E., Tupling, A. R., Rice, W. J., de Leon, S., Rudnicki, M., McKerlie, C., Banwell, B. L., and MacLennan, D. H. (2003) *J Biol Chem* **278**(15), 13367-13375
  95. Roman, B. B., Foley, J. M., Meyer, R. A., and Koretsky, A. P. (1996) *Am J Physiol* **270**(4 Pt 1), C1236-1245
  96. Rao, J. K., Bujacz, G., and Wlodawer, A. (1998) *FEBS Lett* **439**(1-2), 133-137
  97. Ventura-Clapier, R., Kaasik, A., and Veksler, V. (2004) *Mol Cell Biochem* **256-257**(1-2), 29-41
  98. Hornemann, T., Stolz, M., and Wallimann, T. (2000) *J Cell Biol* **149**(6), 1225-1234
  99. de Groof, A. J., Franssen, J. A., Errington, R. J., Willems, P. H., Wieringa, B., and Koopman, W. J. (2002) *J Biol Chem* **277**(7), 5275-5284
  100. Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., and Inoue, S. (2002) *Nature* **417**(6891), 871-875
  101. Shoham, N. G., Centola, M., Mansfield, E., Hull, K. M., Wood, G., Wise, C. A., and Kastner, D. L. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23), 13501-13506
  102. Beenders, B., Jones, P. L., and Bellini, M. (2007) *Mol Cell Biol* **27**(7), 2615-2624
  103. Zhao, T. J., Yan, Y. B., Liu, Y., and Zhou, H. M. (2007) *J Biol Chem* **282**(16), 12022-12029
  104. Oshima, H., and Simons, S. S., Jr. (1992) *Mol Endocrinol* **6**(3), 416-428
  105. Zeng, H., Plisov, S. Y., and Simons, S. S., Jr. (2000) *Mol Cell Endocrinol* **162**(1-2), 221-234
  106. Chen, J., Kaul, S., and Simons, S. S., Jr. (2002) *J Biol Chem* **277**(24), 22053-22062
  107. Surdo, P. L., Bottomley, M. J., Sattler, M., and Scheffzek, K. (2003) *Mol Endocrinol*

- 17(7), 1283-1295
108. Tsuruma, K., Nakagawa, T., Shirakura, H., Hayashi, N., Uehara, T., and Nomura, Y. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **325**(4), 1246-1251
  109. Kaul, S., Blackford, J. A., Jr., Chen, J., Ogryzko, V. V., and Simons, S. S., Jr. (2000) *Mol Endocrinol* **14**(7), 1010-1027
  110. Lokanath, N. K., Ohshima, N., Takio, K., Shiromizu, I., Kuroishi, C., Okazaki, N., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Miyano, M., and Kunishima, N. (2005) *J Mol Biol* **352**(4), 905-917
  111. Letto, J., Brosnan, M. E., and Brosnan, J. T. (1986) *Biochem J* **240**(3), 909-912
  112. Goldberg, A. L., and Odessey, R. (1972) *Am J Physiol* **223**(6), 1384-1391
  113. Wray, C. J., Mammen, J. M., Hershko, D. D., and Hasselgren, P. O. (2003) *Int J Biochem Cell Biol* **35**(5), 698-705
  114. Dehoux, M. J., van Beneden, R. P., Fernandez-Celemin, L., Lause, P. L., and Thissen, J. P. (2003) *FEBS Lett* **544**(1-3), 214-217
  115. Sacheck, J. M., Ohtsuka, A., McLary, S. C., and Goldberg, A. L. (2004) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**(4), E591-601
  116. Hurne, A. M., Chai, C. L., and Waring, P. (2000) *J Biol Chem* **275**(33), 25202-25206
  117. Roman, B. B., Wieringa, B., and Koretsky, A. P. (1997) *J Biol Chem* **272**(28), 17790-17794
  118. van Deursen, J., Heerschap, A., Oerlemans, F., Ruitenbeek, W., Jap, P., ter Laak, H., and Wieringa, B. (1993) *Cell* **74**(4), 621-631
  119. Steeghs, K., Benders, A., Oerlemans, F., de Haan, A., Heerschap, A., Ruitenbeek, W., Jost, C., van Deursen, J., Perryman, B., Pette, D., Bruckwilder, M., Koudijs, J., Jap, P., Veerkamp, J., and Wieringa, B. (1997) *Cell* **89**(1), 93-103
  120. Kaul, S., Blackford, J. A., Jr., Cho, S., and Simons, S. S., Jr. (2002) *J Biol Chem* **277**(15), 12541-12549
  121. Tsuruma, K., Nakagawa, T., Morimoto, N., Minami, M., Hara, H., Uehara, T., and Nomura, Y. (2006) *J Biol Chem* **281**(16), 11397-11404
  122. Nakagawa, T., Tsuruma, K., Uehara, T., and Nomura, Y. (2008) *Neurosci Lett* **438**(1), 34-37
  123. Platell, C., Kong, S. E., McCauley, R., and Hall, J. C. (2000) *J Gastroenterol Hepatol* **15**(7), 706-717
  124. Chang, T. W., and Goldberg, A. L. (1978) *J Biol Chem* **253**(10), 3685-3693
  125. Spydevold, O. (1979) *Eur J Biochem* **97**(2), 389-394
  126. Price, S. R., Wang, X., and Bailey, J. L. (1998) *J Am Soc Nephrol* **9**(10), 1892-1898
  127. Holecek, M. (2002) *Nutrition* **18**(2), 130-133

128. Nakada, C., Tsukamoto, Y., Oka, A., Nonaka, I., Takeda, S., Sato, K., Mori, S., Ito, H., and Moriyama, M. (2003) *Lab Invest* **83**(5), 711-719
129. Witt, C. C., Ono, Y., Puschmann, E., McNabb, M., Wu, Y., Gotthardt, M., Witt, S. H., Haak, M., Labeit, D., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., Granzier, H., and Labeit, S. (2004) *J Mol Biol* **336**(1), 145-154
130. Gotthardt, M., Hammer, R. E., Hubner, N., Monti, J., Witt, C. C., McNabb, M., Richardson, J. A., Granzier, H., Labeit, S., and Herz, J. (2003) *J Biol Chem* **278**(8), 6059-6065
131. Chang, T. W., and Goldberg, A. L. (1978) *J Biol Chem* **253**(10), 3677-3684
132. Witt, S. H., Granzier, H., Witt, C. C., and Labeit, S. (2005) *J Mol Biol* **350**(4), 713-722
133. Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J., and Yancopoulos, G. D. (2001) *Nat Cell Biol* **3**(11), 1014-1019
134. Skurk, C., Izumiya, Y., Maatz, H., Razeghi, P., Shiojima, I., Sandri, M., Sato, K., Zeng, L., Schiekofe, S., Pimentel, D., Lecker, S., Taegtmeyer, H., Goldberg, A. L., and Walsh, K. (2005) *J Biol Chem* **280**(21), 20814-20823
135. Hirner, S., Krohne, C., Schuster, A., Hoffmann, S., Witt, S., Erber, R., Sticht, C., Gasch, A., Labeit, S., and Labeit, D. (2008) *J Mol Biol* **379**(4), 666-677
136. Arya, R., Kedar, V., Hwang, J. R., McDonough, H., Li, H. H., Taylor, J., and Patterson, C. (2004) *J Cell Biol* **167**(6), 1147-1159
137. Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A., and Haas, A. L. (1982) *J Biol Chem* **257**(23), 13964-13970
138. Chin, D. T., Kuehl, L., and Rechsteiner, M. (1982) *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(19), 5857-5861
139. Fielitz, J., Kim, M. S., Shelton, J. M., Latif, S., Spencer, J. A., Glass, D. J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2007) *J Clin Invest* **117**(9), 2486-2495
140. Fielitz, J., van Rooij, E., Spencer, J. A., Shelton, J. M., Latif, S., van der Nagel, R., Bezprozvannaya, S., de Windt, L., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11), 4377-4382
141. Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowyra, D., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2007) *J Biol Chem* **282**(24), 17375-17386
142. Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2006) *J Biol Chem* **281**(16), 11214-11224
143. Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(21), 9478-9490



144. Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Kitamura, F., Shindo, M., Kudo, K., Tsubata, T., Yanagida, M., and Sorimachi, H. (2007) *Biotechnol J* **2**(5), 565-576

## 謝辞

この研究テーマは、私が学部 4 年生の秋から始めたものであり、修士課程以降は主に東京都臨床医学総合研究所のカルパインプロジェクトにて行われたものです。まず、このような機会を与えて下さった東京大学農学生命科学研究科の阿部啓子教授ならびに東京都臨床医学総合研究所、カルパインプロジェクトの反町洋之博士に厚く御礼申し上げます。阿部先生は、なかなか研究の進展しない私に対しいつも温かいお言葉を掛け、常に励まして下さいました。反町博士には、このような非常に興味深い研究テーマを与えて頂くと共に、何も分からない私に対し、一から丁寧にご指導頂きました。学会にも積極的に参加させて頂くなど、刺激的で充実した日々を送ることが出来ました。科学に対する姿勢をはじめ、ここで学んだ様々なことを今後活かしていきたいと思えます。

また、日常の大部分を過ごしたカルパインプロジェクトの方々には本当にお世話になりました。特に、秦勝志博士には、実験に関する様々なことを一から手取り足取りご指導頂きました。丁寧にご指導して頂き、実験を面白いと感じるようになりました。有難うございました。小野弥子博士、尾嶋孝一博士には、実験に関する事、骨格筋に関する事など、多くのご指導を頂きました。楠畑かおり博士、林智佳子博士にも様々なアドバイスを頂きました。また、北村ふじ子氏、土井菜穂子氏、上野美香氏、上岡寿子氏をはじめ全ての方々に実験を手助けして頂き、日頃から話を聞いて頂くことで精神的にも支えて頂きました。本当に有難うございました。

生物機能開発科学研究室、機能性食品ゲノミクス、ならびに味覚サイエンスの方々にも大変お世話になりました。松本一朗博士、三坂巧博士、朝倉富子博士、石丸喜朗博士、岡田晋治博士、應本真博士をはじめ、多くの方々に様々なアドバイスを頂きました。また、普段お会いできる機会は限られていたものの、皆さんがいつも気にかけて下さり、皆さんと接するたびに気持ちを新たにし、やる気を得ることが出来ました。

最後になりましたが、ここまで勉学の機会を与えて下さり、常に体調に気をかけ支えて下さった家族に感謝致します。

2009 年 1 月

小山 傑