

論文題目

筋特異的 RING-Finger タンパク質

MuRF1 による筋細胞代謝恒常性維持機構の解析

農学生命科学研究科応用生命化学専攻

平成 18 年度博士課程進学

氏名 小山 傑

指導教員名 阿部啓子

# 目次

	頁
略語	2
序論	6
実験材料	28
実験方法	41
第 1 章 MuRF1 の分子レベルでの解析	
結果	61
考察	66
第 2 章 MuRF1 の個体レベルでの解析	
結果	81
考察	87
第 3 章 総合討論	103
参考文献	111
謝辞	120

## 略語

4E-BP	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E - Binding Protein
A <sub>340</sub>	Absorbance at 340 nm
A <sub>600</sub>	Absorbance at 600 nm
AcCN	Acetonitrile
ADP	Adenosine 5'-diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium Peroxodisulfate
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
bp	base pair
BPB	Bromophenol Blue
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CHCA	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CK	Creatine Kinase
CoA	Coenzyme A
COS ドメイン	Carboxy terminus subgroup One Signature ドメイン
D5-F	重水素ラベルフェニルアラニン
dATP	2'-Deoxyadenosine-5'-triphosphate
dCTP	2'-Deoxycytidine-5'-triphosphate
dGTP	2'-Deoxyguanosine-5'-triphosphate
dNTP	dATP、dCTP、dGTP、もしくはdTTP
dTTP	Thymidine-5'-triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHPR	Dihydropyridine Receptor
DKO	Double Knock Out
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
E1	ubiquitin activating enzyme

E2	ubiquitin conjugating enzyme
E3	ubiquitin ligase
E-64c	[L-3-trans-Carboxyoxirane-2-Carbonyl]-L-Leucine - (3-Methylbutyl) amide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FBS	Fetal Bovine Serum
FoxO	Forkhead Box Other
GC	gastrocnemius (腓腹筋)
GCOS	GeneChip OperatingSoftware
GME	Glucocorticoid modulatory element
GMEB1	Glucocorticoid modulatory element binding protein 1
GR	Glucocorticoid receptor
GRE	Glucocorticoid response element
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathione <i>S</i> -Transferase
HE	hematoxylin-eosin
HECT	Homologus to the E6AP Carboxyl Terminus
HIBA	3-Hydroxyisobutyric acid
HIBADH	3-Hydroxyisobutyric acid dehydrogenase
IG	Immunoglobulin
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
I.P	immunoprecipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside
ISOT-3	Isopeptidase T-3
IVT	<i>in vitro</i> transcription
K <sup>+</sup>	potassium ion
kDa	kilo dalton
KO	Knock Out
LGMD2A	Limb Girdle Muscular Dystrophy
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MARPs	Muscle Ankyrin Repeat Protein
M-CK	Creatine Kinase muscle-type
mCL	m-calpain large subunit
MFC	MuRF Family Conserved Region

MG132	Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
MHC	major histocompatibility antigen complex
MLP	Muscle-specific LIM Protein
MMS	Methylmalonate semialdehyde
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MuRF	Muscle RING-Finger Protein
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NADPH	還元型 NADP
nCL-2	Novel Calpain Large Subunit-2
nCL-4	Novel Calpain Large Subunit-4
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Perchloric Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEF	Penta-EF hand
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIPES	Piperazine – N,N' – bis (2-ethane sulfonic acid)
PKB	Protein Kinase B
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonyl Fluoride
PVDF	Immobilon-P Transfer Membrane
Q	quadriceps femoris (大腿四頭筋)
RBCC	RING-Finger – B-box – Coiled-Coil
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	reverse transcriptase-PCR
RyR	Ryanodine Receptor
SAND	Sp100、AIRE1、NucP41/75、DEAF1 に由来するドメイン名
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOL	soleus (ヒラメ筋)
SRF	Serum Response Factor
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
TA	tibialis anterior (前脛骨筋)
TAT	Tyrosine Aminotransferase

TCA	Tricarboxylic Acid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic Acid
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TOF	Time of Flight
Trim	Tripartite Motif
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylaminopropane-1,3-diol
ttk	titin kinase
Ub	Ubiquitin
UBC9	Ubiquitin-conjugating enzyme 9
WT	Wild Type
Zn	zinc
$\mu$ CL	$\mu$ -calpain large subunit

#### Amino Acids

A	Ala	L-Alanine	M	Met	L-Methionine
C	Cys	L-Cysteine	N	Asp	L-Asparagine
D	Asp	L-Aspartic acid	P	Pro	L-Proline
E	Glu	L-Glutamic acid	Q	Gln	L-Glutamine
F	Phe	L-Phenylalanine	R	Arg	L-Arginine
G	Gly	Glycine	S	Ser	L-Serine
H	His	L-Histidine	T	Thr	L-Threonine
I	Ile	L-Isoleucine	V	Val	L-Valine
K	Lys	L-Lysine	W	Trp	L-Tryptophan
L	Leu	L-Leucine	Y	Tyr	L-Tyrosine

#### Nucleotides

A	Adenosine
C	Cytidine
G	Guanosine
T	Ribosylthymine

# 序 論

## 1. 代謝調節器官としての骨格筋と筋萎縮

脊椎動物にとって最大の器官である骨格筋は、形態維持や運動などの極めて重要な機能を担っている。このような物理的機能に加え、骨格筋は代謝調節器官としての機能も有する。つまり、骨格筋は大量の糖の消費やグリコーゲンの合成・分解により血糖値の制御に関わると同時に、膨大な量のアミノ酸およびエネルギー源の貯蔵庫としても機能している。例えば、飢餓時には骨格筋はエネルギー源を脂肪酸へと切り替え、これと並行してタンパク質分解量を昂進させ、生じたアミノ酸を血流を介して全身へと供給している。このアミノ酸は新たな筋タンパク質合成源として利用され、また、一部はアラニンへと姿を変え肝臓で糖新生の原料として使われている(1)。

このように、飢餓をはじめとする多くの異化的な条件下において、骨格筋は筋タンパク質分解量を増やし自身の代謝を変化させることで生体の代謝恒常性維持に寄与している。一方で、長期にわたる飢餓では筋タンパク質の分解が過剰になり、筋萎縮と呼ばれる病態を招いてしまう(2)。筋萎縮は筋細胞の径の減少と筋力低下を主症状としており、怪我をした際のギブス固定や寝たきりの生活など筋肉への負荷の減少が発症の引き金となる。また、ガンや尿毒症、エイズ、糖尿病をはじめとする様々な病気も原因となる(3)。筋萎縮に伴う筋力低下は日常生活を送るのに大きな障壁となるだけでなく、このことによる行動量の減少、代謝の低下が更に病態を悪化させてしまうという悪循環を招くこともある。それ故、筋萎縮をもたらす分子メカニズムを解明することは、治療や予防法の開発といった観点からも非常に重要である。

そこで、本研究では、筋細胞の恒常性維持に関わるとされている超巨大弾性タンパク質コネクチンを足場にしたシグナル伝達複合体の中で、筋萎縮過程において中心的役割を果たしていると考えられる MuRF1 (Muscle RING-Finger Protein 1)に焦点を当てて解析を行った。

ここで、まずは骨格筋の構造およびコネクチンを足場にしたシグナル伝達系、そのシグナル伝達因子として想定されている MuRF1 について概説し、次いで筋萎縮に関わる筋細胞内のタンパク質分解系や、MuRF1 の発現を制御する上流の調節機構について説明したい。

## 2. 骨格筋の構造

骨格筋は、多数の筋細胞(筋線維)が束状に寄り集まって構成されている、脊椎動物で最大の器官である。骨格筋を構成する筋細胞は体細胞中最大(直径 10 ~ 100  $\mu\text{m}$ 、長さ数 mm ~ 数 cm)かつ多核の細胞である。また、核が細胞周辺部に押しやられ、細胞質の大部分は収縮成分である筋原線維で占められているという特徴を有する。筋原線維は電子顕微鏡を用いた観察像において特徴的な横紋像を表し、このことが、骨格筋が心筋とともに横紋筋と呼ば

れる所以となっている。この横紋像のうち、電子密度の高い明瞭な線である Z 線に挟まれている長さ 2 ~ 3  $\mu\text{m}$  の繰り返し単位はサルコメアと呼ばれており、分子構造においても筋原線維の基本構造となっている(図 I)。サルコメアは電子顕微鏡写真による電子密度の違いからいくつかの部位に分けられている。まず、中央部に高電子密度部位の M 線が存在し、M 線から Z 線に向かって電子密度の低い H 帯、高い A 帯、再び低電子密度の I 帯に分けられている。サルコメアには 3 つのフィラメント構造が存在している。1 つはアクチンを主成分とする細いフィラメント(thin filament)で、Z 線を起点に M 線に向かって A 帯と H 帯の境目まで伸びている。逆に、M 線からは、2 つ目のフィラメントであるミオシンを主成分とする太いフィラメント(thick filament)が A 帯の終わりまで伸びている。アクチンとミオシンは筋細胞内において  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に相互作用しており、ミオシンの ATP アーゼ活性に伴う両者の間の滑り運動が筋収縮の駆動力となっている(1)。もう 1 つのフィラメントは、コネクチン(タイチンとも呼ばれる)という超巨大タンパク質 1 分子により構成されているフィラメントである(図 I)。近年、このコネクチンが様々な機能を有することが明らかとなってきている。そこで、次に、コネクチンについて解説する。

### 3. コネクチン

コネクチンは、1 分子でサルコメアの半分、Z 線から M 線までを結ぶ現在知られている中で最大のポリペプチド鎖(分子量 3 MDa、長さ 1  $\mu\text{m}$  以上)である。その大部分が免疫グロブリン様(IG)ドメインとフィブロネクチン様ドメインの繰り返し構造からなり、その他にプロリン(P)、グルタミン酸(E)、バリン(V)、リジン(K)を豊富に含む PEVK ドメインや、C 末端付近の Ser/Thr 様のキナーゼドメイン(ttk と表記される。titin kinase の略)などのいくつかの特徴的な構造を含む(図 II)(4)。

コネクチンは、このような構造上の特徴から、主に 2 つの機能を有すると考えられてきた(5)。1 つ目は、Z 線と M 線を結び付け、ミオシンなどの他の筋タンパク質を正しい位置関係に配置させる機能である。2 つ目は、サルコメアの伸縮に対する「ばね」としての機能である。これは、コネクチンが 1 分子で Z 線と M 線を結びつけていることに加え、I 帯に位置する IG ドメインの繰り返し部位と PEVK ドメインがサルコメアの引き伸ばしに応じて構造変化することに由来する(4,6)。また、このようなサルコメア長に応じた構造変化は ttk にも観られ、これが ttk の活性制御機構の一つになっている(7)。

最近、このような構造タンパク質としての 2 つ機能に加え、コネクチンの持つ 3 つ目の機能、筋細胞内のシグナル伝達系の足場としての機能が注目されてきている(8-10)。

コネクチンには、サルコメアの Z 線、N2A 領域(コネクチンの N 末端領域から 1/3 程度、

PEVK 領域の N 末端側近傍に位置する部位)\*1、M 線を中心に多くの筋タンパク質が部位特異的に結合していることが知られている(図III)。例えば、Z 線においてはコネクチンの N 末端に $\alpha$ -actinin や T-cap (telethonin と呼ばれる)が結合し、コネクチンを架橋しサルコメアの構造維持に機能している(11-14)。更に、これらの分子は骨格筋特異的カルパイン p94 や転写調節因子 MLP (Muscle-specific LIM Protein)、K<sup>+</sup>チャネルのサブユニット minK など多数の分子と複合体を形成しており、サルコメアと細胞膜、核を結び付ける分子ネットワークを構成していると考えられている(15-17)。実際、T-cap と MLP の結合がサルコメアの張力センサーとして機能することも示されている(16)。一方、N2A 領域では p94 や転写調節因子 MARPs (Muscle Ankyrin Repeat Protein の総称)がコネクチンに結合している(18,19)。そして、p94 がコネクチンの局所構造依存的にコネクチンや MARP2 を切断することで、収縮刺激などが核へと伝達されている可能性が示されている(20)。また、M 線においては、サルコメアの伸縮による ttk の構造変化に応じて Zn-Finger タンパク質 Nbr1 が ttk に結合する。この結合は、その後、Zn-Finger タンパク質 p62、MuRF2 (Muscle RING-Finger protein 2)、転写調節因子 SRF (Serum Response Factor) という経路を介して遺伝子発現制御を行うということが報告されている(21)。更に、M 線ではこれらの分子に加え、p94 がコネクチンの C 末端領域に、MuRF1 が ttk の N 末端側に近接する部位に結合している(18,22,23)。コネクチンは M 線において逆方向に重なり合いながら配向しているため、この p94 と MuRF1 はコネクチンへの結合を介し空間的に近接し、ttk を含めた 3 者の複合体を形成していると予想されている(図III、図IV) (8)。

このように、コネクチンには多くの筋タンパク質が結合しシグナル伝達複合体を形成していると考えられている。特に、このようなコネクチンへの結合タンパク質の多くや、あるいはコネクチンの結合領域自身の変異が筋ジストロフィーや筋萎縮に関わることから(24-28)、これらシグナル伝達複合体が様々なストレス刺激に応じて適切に情報を核内へ伝達することで筋細胞の恒常性が維持されていると想定されている (図IV)(8-10)。

続いて、これらのシグナル伝達複合体の構成因子の一つで、本研究で焦点を当てている MuRF1 について、その相同分子も含めて簡単に解説を行う。

#### **4. MuRF**

上述したように、コネクチンの C 末端領域にはキナーゼ領域(ttk)が存在している。この ttk の機能は、活性制御能を消失し常に活性化型になる変異体を過剰発現させた C2C12 細

---

\*1 N2A 領域は、Z 線や M 線とは異なり、電子顕微鏡像で明確な構造体としては観察されていない。しかし、多くの筋タンパク質がコネクチンのこの領域に結合することから、概念上、Z 線や M 線と同じような構造体として捉えられている。図中にも、Z 線、M 線と同様の構造体として表記した。

胞が筋原線維形成に異常をきたすことから、筋原線維形成に非常に重要であると考えられている(29)。しかし、その分子メカニズムについては不明な点が多い。そこで、この領域を bait にした酵母 Two-Hybrid 法によるスクリーニングにより、ttk の基質、もしくは活性制御因子の同定が試みられた。その結果、ttk の N 末端側に隣接する IG モチーフに結合する分子として MuRF1 が同定され、さらに、MuRF1 を bait にしたスクリーニングにより、相同分子 MuRF2、MuRF3 が同定された(23)。これらは心筋および骨格筋に特異的な発現を示す RING-Finger タンパク質で、一つのファミリーを形成している。また、いずれも N 末端側から RING-Finger ドメイン、B-box ドメイン、Coiled-Coil ドメインという構造をとり、RING-Finger ドメインと B-box ドメインの間には MuRF ファミリー間でよく保存された領域 MFC (MuRF Family Conserved Region)が、C 末端領域には、微小管結合ドメインと言われている COS (Carboxy terminus subgroup One Signature)ドメインおよび酸性領域が存在する(図 V) (23,30)。

RING-Finger ドメインおよび B-box ドメインはどちらも亜鉛結合ドメインであり、この両者および Coiled-Coil ドメインを有するタンパク質は RBCC (RING-Finger – B-box – Coiled-Coil)タンパク質もしくは Trim (Tripartite Motif)タンパク質と呼ばれている(31)。RBCC/Trim タンパク質は現在約 70 種知られており、その多くが B-box ドメインと Coiled-Coil ドメインを介することで多量体を形成して機能していると考えられている(31)。MuRF ファミリーも Coiled-Coil ドメインを介して全ての組み合わせでホモ、ヘテロダイマーを形成する(23)。また、MuRF1 については B-box を介して多量体となり機能することも示唆されている(32)。RBCC タンパク質の機能は多岐に渡っているが、その多くはユビキチン(Ub)リガーゼ(E3)活性を有している(Ub については後述する) (31)。このことから、構造的に MuRF ファミリーも Ub-E3 活性を有することが予想され、実際に MuRF1 については Ub-E3 として機能することが報告されている(28,33)。ここで、各 MuRF について明らかになっていることを簡単にまとめてみたい。

#### **4-1. MuRF1**

MuRF1 は ttk の N 末端側に隣接する部位に直接結合する分子として同定された分子で、MuRF ファミリーの中で唯一、成長段階で一定の発現量を示すと考えられている(図 V) (23)。また、M 線や Z 線、細胞質全体などの多様な局在パターンが観察されている。M 線への局在はコネクチンへの結合を介していると考えられるが、その他の部位への局在メカニズムについては不明である。M 線での MuRF1 とコネクチンとの適切な相互作用は筋原線維の形成、維持に非常に重要で、初代培養細胞に MuRF1 のコネクチン結合部位、あるいはコネクチンの MuRF1 結合部位を過剰発現させると thick filament や M 線の形態異常を招く(34)。また、MuRF1 は核に局在することも観察されており、転写調節因子

GMEB1 (Glucocorticoid modulatory element binding protein 1)とも相互作用することから、サルコメアから核内への情報伝達因子としての機能も有していると考えられる(34)。更に MuRF1 は Ub 修飾に関わる ISOT-3 (Isopeptidase T-3)や、Ub 様分子である SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier)の転移酵素 UBC9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9)、SUMO3 など、Ub や SUMO 修飾系関連分子とも相互作用する(34,35)。MuRF1 には SUMO1 化のコンセンサス配列も存在しており、これらのことから、MuRF1 が Ub 修飾系や SUMO 修飾系で機能し、更にその機能自身が SUMO 化により制御される可能性が考えられる(図V)。また、先述したように、MuRF1 は M 線において p94 と空間的に近接している(図III)。そのため、MuRF1 は M 線領域で p94 や ttk と、Z 線でも何らかの分子とシグナル伝達複合体を形成し、転写調節因子や Ub、SUMO 修飾系など多様な分子との相互作用を介してサルコメアからの情報を核へと伝えていることが予想されている。

#### 4-2. MuRF2

MuRF2 の発現量は胎児の心筋と骨格筋で多く、成長に伴いその量が減少すると考えられている。また、スプライスバリエントが複数種存在し、現在までに 4 種が報告されているが、これらの発現時期、部位の差についてはほとんど明らかになっていない(図V)(23,36,37)。MuRF2 は微小管(特に、微小管でも安定な状態を示す C 末端が Glu 修飾されているもの)やミオシン、コネクチンの A 帯領域、M 線領域との結合能を有している。培養細胞を用いた解析では、細胞の分化、成熟過程において MuRF2 がこの順にこれらのタンパク質と一過的に共局在を示すことから、MuRF2 は微小管に結合しミオシンやコネクチンを正しく配向させることで、筋原線維の形成に機能していると考えられている(37)。このことは、初代培養細胞の系で MuRF2 をノックダウンすると筋原線維形成が遅れ、M 線領域の構造が異常をきたすことから裏付けられている(36)。一方、MuRF2 は多様な局在も示す。例えば、培養細胞の系では血清除去により MuRF2 が核内に局在しているのが観察されている(37)。また、先述したように、MuRF2 は ttk、Nbr1、p62 とともにサルコメアの収縮に応じたシグナル伝達系を構成し、核内へと移行する。核内へと移行した MuRF2 はその後、RING-Finger ドメイン依存的に SRF の核内量を減少させ、転写調節に関与しているとされている(21)。これらのことから、MuRF2 は筋収縮においてサルコメアから核内への情報伝達因子としても機能していると考えられている。MuRF2 の核内移行とそれに伴う SRF の核内量の減少のメカニズムは不明であり、MuRF2 遺伝子のノックアウト(KO)マウスが何も表現型を示さないなど多くの疑問も残っているが(38,39)、コネクチンを足場にしたシグナル伝達系の好例として、他の MuRF ファミリーの関与も含め更なる解析が待たれる。

### 4-3. MuRF3

MuRF3 は、コネクチンのキナーゼ領域を bait にしたスクリーニング過程で 3 番目に同定された MuRF ファミリーであるために MuRF3 と呼ばれているが、元々 SRF の相互作用分子として MuRF ファミリーの中で最初に同定された分子である(40)。MuRF3 は筋細胞の分化、成熟に伴いその発現量が増加し、また、微小管との結合能を有する(図 V)。この MuRF3 の微小管への結合を阻害すると Glu 修飾型の微小管が形成されないことから、MuRF3 には微小管を安定化させる機能があるとされている(40)。一方、MuRF3 をノックダウンした細胞では筋分化に関わる MyoD や myogenin といった転写因子の発現量が減少し、分化、成熟が阻害される。このメカニズムについては不明であるが、MuRF3 も SRF と結合することから、何らかの転写制御に関与している可能性が考えられる(40)。また、MuRF3 についても MuRF1、MuRF2 と同様に Z 線や M 線へも局在することが見出されている。現在までのところ MuRF3 とコネクチンの直接の結合は見出されていないが、MuRF ファミリーは全ての組み合わせでヘテロダイマーを形成しうるため、MuRF3 も MuRF1、MuRF2 との結合を介してコネクチン上で機能しているのかもしれない。

### 4-4. MuRF1 の Ub-E3 活性と筋萎縮

このように、MuRF ファミリーは微小管やコネクチンへの結合を介しサルコメアの構造形成・維持に重要な役割を果たすとともに、サルコメアから核へのシグナル伝達系にも関与していると予想されている(図 V)。一方で、最近では別の視点から MuRF1 の機能解析が進められている。まず、MuRF1 の発現が様々なタイプの筋萎縮誘導条件下で誘導され、MuRF1 KO マウスは除神経による筋萎縮誘導に対し 2 週間で 36% 程度の抵抗性を示すこと、MuRF1 が *in vitro* では自己 Ub 化能を有することが報告されている(28)。このことから、「MuRF1 の Ub-E3 活性を介した筋タンパク質分解量の増加が筋萎縮を招く」と考えられており、MuRF1 の基質の同定や発現制御メカニズムの解析が広く行われている。実際、現在までに、MuRF1 が心筋においてアクチンとミオシンの相互作用を制御する筋原線維構成タンパク質 troponin I を Ub 化し分解に導くこと、あるいは MuRF1 の発現が FoxO (Forkhead box Other)や NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B)、p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)の制御を受けることなどが明らかになっている(これらについては後に詳述する)(33,41,42)。

ここで、「MuRF1 の Ub-E3 活性を介した筋タンパク質分解量の増加が筋萎縮を招く」と述べた。筋萎縮は筋タンパク質分解量の増加により引き起こされるが、筋細胞内のタンパク質分解系には一般の細胞内のタンパク質分解系とは多少異なる側面がある。そこで、それについて述べた後、MuRF1 を含めた筋萎縮誘導に関わる分子や上流の経路について簡単

にまとめて、序論を終わりにしたい。

## 5. 筋萎縮と筋細胞内のタンパク質分解系

通常、我々の身体では、タンパク質の合成量と分解量がバランス良く保たれている。一方、様々な筋萎縮誘導条件において筋タンパク質分解量が増加していることから、筋萎縮は筋タンパク質分解量の増加が大きな原因であると考えられている。一般に、細胞質内には量的にみて主要なタンパク質分解系が 3 つ存在しており、骨格筋でも同様である。それらは Ub-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系、そしてカルパイン系である。そこで、まずはこの 3 つの系について概説を行う。

### 5-1. Ub-プロテアソーム系

この系は、Ub と呼ばれる 76 アミノ酸からなる小さなタンパク質の基質タンパク質への結合を目印とし、26 S プロテアソームによりその基質タンパク質を分解、消去する系である。ATP 依存的に基質を選択的に消去するという点に大きな特徴がある。Ub の基質への結合は、活性化酵素(E1)、結合/転移酵素(E2)、連結酵素/リガーゼ(E3)と呼ばれる 3 段階の複合酵素系により行われている(図VI) (43)。E1 は 1 種類、E2 が十数種類であるのに対し、E3 の種類は約千種にも及ぶと考えられており、この E3 の多様性こそが、Ub-プロテアソーム系が高い選択性を持って基質を消去する源となっている。

Ub 分子はまず ATP 依存的に E1 により活性化され、E2 の活性中心である Cys 残基にチオエステル結合する。その後、Ub 分子は E3 の働きにより基質の Lys 残基とイソペプチド結合を形成する。E3 は、大別すると 3 つの種類に分けられる。HECT (Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus)型 E3、単量体 RING 型 E3 および多量体 RING 型 E3 である。HECT 型 E3 は E2 から HECT ドメイン内の活性中心である Cys 残基に Ub 分子を受け取り、それを基質へと転移させている。単量体 RING 型 E3 では、E3 が RING-Finger ドメイン(一部の E3 については、U-box ドメインと呼ばれる類似のドメイン)と呼ばれる Zn 結合ドメインを介して E2 と結合する。単量体 RING 型 E3 は自身が直接 Ub を受け取ることはしないが、基質認識領域において基質と結合し、E2 と基質を近接させることで、E2 から基質への Ub 分子の転移を促進させていると考えられている(図VI)。多量体 RING 型 E3 は複数のタンパク質により構成される複合体が E3 として機能している。これらの構成因子中には RING-Finger 型タンパク質が含まれており、これが単量体 RING 型 E3 と同様に E2 の結合部位として機能している。MuRF1 を含む RBCC タンパク質の多くは単量体 RING 型 E3 として機能することが知られており、単量体 RING 型 E3 のサブグループの一つとする

ことが提唱されている(31)。

E1 から E3 の反応系が繰り返されると、基質タンパク質に共有結合した Ub 分子に更に Ub 分子が付加したポリ Ub 鎖が形成される。基質タンパク質の分解はこのポリ Ub 鎖をシグナルとして 26 S プロテアソームにより行われる(43)。この系における Ub 化タンパク質の分解装置として機能している 26 S プロテアソームは、触媒ユニット(20 S プロテアソーム)と活性化因子(19 S)からなる、巨大で複雑な複合体プロテアーゼである(43,44)。20 S プロテアソームは 14 種類、計 28 個のサブユニットから構成されており、3 種類(計 6 個)のサブユニットがそれぞれトリプシン様、キモトリプシン様、カスパーゼ様活性(順に、塩基性、中性疎水性、酸性アミノ酸の C 末端側のペプチド結合を加水分解)を有する活性中心として機能している。この 3 種類のプロテアーゼ活性により Ub 化タンパク質は細かいペプチド断片へと分解される。また、この加水分解プロセスには、ATP は必要とされない。

Ub-プロテアソーム系により生じたペプチド断片は MHC クラス I 分子との結合により抗原提示に利用され、また、あるものは細胞内のエンドプロテアーゼの作用により更に細かくアミノ酸へと分解され、新たなタンパク質合成源として利用されている(43)。

## 5-2. オートファジー-リソソーム系

先述した Ub-プロテアソーム系が選択的な分解系であったのに対比して、オートファジー-リソソーム系は基本的に非選択的でバルクな分解系と考えられている(45)。この系では、まず、隔離膜という膜画分が細胞質中に出現し、これが湾曲・伸長しながら細胞質の一部を時にはオルガネラごと取り込んでいく。やがて隔離膜の末端同士が融合し、オートファゴソームと呼ばれる閉じた脂質二重膜構造体が形成される。次いでオートファゴソームがリソソームと融合し、リソソーム中の酸性プロテアーゼの作用により、オートファゴソーム中に取り込まれていた基質がアミノ酸へと分解される(図 VI) (45)。オートファゴソームの形成には 2 つの Ub 修飾様システムが必要であり(46,47)、それ故オートファジー-リソソーム系も ATP 依存的な分解系である。

オートファジーが関与する生理機能は抗原提示や変性タンパク質の除去、細菌感染など多岐に渡っている(48-50)。中でも、一度に大量のタンパク質を分解しアミノ酸へと変換できるという特徴的なメカニズムに加え、オートファジーが飢餓により誘導され(51)、酵母とマウスいずれにおいてもその欠損が飢餓に対する抵抗性を弱めることなどから(52,53)、飢餓に対する適応反応がオートファジーの持つ主要な役割の一つであると考えられている(54)。

## 5-3. カルパイン系

3 つ目の分解系を担うカルパインは、Ca<sup>2+</sup>により活性化される細胞内 Cys プロテアーゼであり、ほぼ全ての真核生物と一部の真正細菌に存在しスーパーファミリーを形成している。これまでに紹介してきた前 2 者の分解系が主として基質の分解・消去を目的としたものであるのに対し、カルパイン系による分解は、「分解」というよりもむしろ基質を特異的部位で限定的に切断することで基質の機能を不可逆的に変換・制御するという点に特徴がある(図VII) (55,56)。カルパインが関与する生理機能は非常に多岐にわたると考えられており、KO マウスを用いた解析によってもこの系が哺乳類の生存にとって必須であることが示されている(57,58)。

哺乳類には 15 のカルパインの分子種が存在し、これらはその構造により典型型と非典型型、あるいは発現組織分布により普遍型と組織特異型というように分類されている(55,56)。このうち、組織普遍的に発現し量的にも多い $\mu$ -、m-カルパインの 2 種(*in vitro*での活性化にそれぞれ $\mu$ M、mM 程度の Ca<sup>2+</sup>が必要)が古くから盛んに研究されている分子種である。両者は互いに相同な活性サブユニット(分子量が約 80kDa で、それぞれ $\mu$ CL、mCL と呼ばれる)と共通の調節サブユニット(約 28kDa で、30K と呼ばれる)からなるヘテロダイマー構造をとっている。活性サブユニットは N 末端側からドメイン I~IV と呼ばれる 4 つのドメインに分かれている。これらはそれぞれ、活性制御ドメイン、プロテアーゼドメイン(Ca<sup>2+</sup>の結合していない非活性状態ではドメイン IIa と IIb に分かれている)、Ca<sup>2+</sup>を結合しリン脂質や基質との相互作用に関与する C2 様ドメイン、5 つの EF ハンドを持ち Ca<sup>2+</sup>を結合する PEF (Penta-EF hand)ドメインである。一方、調節サブユニットは N 末端側から Gly に富む疎水的なドメイン V と、ドメイン IV と相同なドメイン VI から構成されている。また、活性サブユニットと調節サブユニットはドメイン IV と VI の 5 つ目の EF ハンドドメインを介してヘテロダイマーを形成している(図VII) (59-61)。カルパイン分子種が構造的に典型型か非典型型かは、活性サブユニットと相同な構造、特にドメイン IV を有するかどうかにより分類されている。組織特異的カルパインの代表例としては、胃特異的カルパイン nCL-2 や消化管特異的カルパイン nCL-4、骨格筋特異的カルパインである p94 が挙げられる(62-64)。ここで、骨格筋の M 線領域において MuRF1 とシグナル伝達複合体を形成し、機能的に相互作用することが予想されている p94 について更に解説する。

p94 は組織特異的に発現するカルパインとして最初に同定された分子種である(64)。また、p94 遺伝子の変異が肢体型筋ジストロフィー-2A (LGMD2A)の原因となることから、 $\mu$ -、m-カルパインと並んで最も盛んに研究されている分子種でもある(25)。構造的には典型型カルパインの一つであるが、特異的な第一ドメイン(NS)を有し、ドメイン IIb 中およびドメイン III と IV の間には特異的挿入配列(IS1、IS2)が存在するという特徴がある(図VII)。また、調節サブユニットとは結合しないこと、*in vitro*では一見 Ca<sup>2+</sup>非依存的な急速な自己消化を起こし半減期 10 分以内に消失してしまうこと、*in vivo*ではコネクチンと相互作用し安定に保たれていることなどのユニークな性質を有する(18,22,65,66)。

p94 の機能については、急速な自己消化という特異な性質ゆえ解析が困難であるため、未

だ不明な点が多い。しかし、LGMD2A を引き起こす遺伝子変異を導入した p94 を COS7 細胞に発現させた解析から、p94 のプロテアーゼ活性の消失が少なくとも LGMD2A 発症の原因の一部となることが明らかとなっている(67)。ここで重要なのは、「プロテアーゼ活性の不全により筋ジストロフィーが発症する」という点である。実際、p94 の正常なプロテアーゼ活性が消失するような遺伝子改変を施されたマウスがいずれも筋ジストロフィー様の表現型を呈することからも、p94 のプロテアーゼ活性の適切な制御が極めて重要であることが示されている(68-70)。これらのことは、p94 が単に基質を分解・消去するのではなく、むしろ基質を限定分解することでその機能を変換・制御するような役割を担い、それにより筋細胞の恒常性維持に寄与していることを示唆している。例えば、先述したように、p94 は Z 線、N2A 領域、M 線のコネクチンを足場にしたシグナル伝達複体のいずれにおいてもその構成因子であり、このようなシグナル伝達系の制御を担っている可能性がある。実際、N2A 領域でのシグナル伝達複体では p94 が転写調節因子を限定的に切断することが示されており、また、p94 がプロテアーゼ活性依存的にサルコメア長の変化に応じてこの複体間を移動するなどの興味深い事実も報告されている(15,20)。

このように、カルパイン系は限定分解という切断様式により基質の機能調節を行うが、特に、骨格筋では骨格筋特異的な分子種 p94 が中心となり、骨格筋の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられている。

#### 5-4. 筋タンパク質分解における 3 つの系

以上、細胞内における主要なタンパク質分解系について概説した。このように、一般には、Ub-プロテアソーム系が短寿命タンパク質の選択的な、オートファジー-リソソーム系が長寿命タンパク質の非選択的かつ大量な分解・消去を行い、カルパイン系は基質タンパク質の機能の変換・制御を担っていると言える。しかし、筋細胞の細胞質の大半は筋原線維という特異な構造体により占められているため、3 つの系の働きは他の細胞での機能と多少異なる部分があると考えられている。

例えば、筋萎縮時に観られる筋タンパク質分解量の昂進がどのようなタンパク質分解系に起因しているのかを調べた解析では、特異性の高いプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンが筋萎縮誘導時の筋タンパク質分解量の昂進を抑えることが示されている(71)。このことから、筋タンパク質分解には Ub-プロテアソーム系の寄与が大きい、つまり、筋細胞内では Ub-プロテアソーム系がバルクの分解系としても機能しているとされている(1)。これに対し、オートファジー-リソソーム系については、初期の解析では ATP 依存的な分解を全て Ub-プロテアソーム系と解釈しており、オートファジー-リソソーム系は筋原線維タンパク質を分解していないという考えがある。しかし、この系も ATP が必要であり、更には飢餓により骨格筋中でオートファゴソーム形成が昂進し(72)、骨格筋内ではオートファジー関連遺伝

子の一部と Ub-プロテアソーム系の一部が共通の制御を受けていることが明らかにされており(73,74)、やはりこの系も筋タンパク質分解に対し大きく寄与していると考えられている。

一方、筋タンパク質の大部分を占める筋原線維構造は非常に密で巨大な構造であるため、このままではこれら分解系が作用出来ないことも知られている(75)。そのため、筋タンパク質の分解過程では、まず、筋原線維構造を解きほぐすような何らかの機構が必要であると考えられている(76)。この点については、Z線の構造が  $Ca^{2+}$  依存的に崩壊すること、培養細胞の系では不活性型変異体 m-カルパインやカルパインの内在性阻害剤カルパスタチンの過剰発現がタンパク質分解量を抑えること、カルパスタチンの過剰発現マウスでは筋萎縮の進行が抑えられること、p94 の KO マウスでは Ub-プロテアソーム系を介した筋原線維の再構築に支障をきたすことなどから、筋タンパク質分解の上流過程においてカルパインが作用することが重要であるとされている(77-82)。筋タンパク質の分解に寄与するのはカルパイン系ではなくカスパーゼ 3 であるとする報告もごく一部にはあるものの(83)、これらをまとめると、筋細胞内ではカルパイン系が筋タンパク質分解の上流としての機能を果たし、その作用により遊離してきた筋原線維タンパク質などを Ub-プロテアソーム系、オートファジー-リソソーム系がバルクな分解系として分解除去していると考えられている。

## 6. 筋萎縮時に発現誘導を受ける分子

これまでに述べてきた内容は、主に各分解系が総体としてどのように筋萎縮へ寄与しているかというものである。一方で、近年では DNA マイクロアレイ解析などを用いて筋萎縮過程に発現量の変動する遺伝子を同定する試みも盛んになされている(28,84,85)。このような変動を示す遺伝子群 (“atrogenes”とも称される)の中にはタンパク質分解系に関連する遺伝子が多数含まれているのが特徴である。例えば、Ub やプロテアソームのサブユニット、あるいはリソソーム中の酵素であるカテプシン L の発現量が増加することが知られている(84)。数多くあるプロテアソームサブユニットやリソソーム酵素の中で一部のみが発現誘導を受けている点も含め、この結果が実際のタンパク質分解活性とどの程度相関しているのか解釈の難しい部分もあるが、少なくとも筋萎縮誘導過程への筋タンパク質分解の関与を裏付ける結果となっている。これら発現変動する遺伝子群の中には、MuRF1 と atrogen-1/MAFbx (Muscle Atrophy F-box) という 2 つの Ub-E3 が含まれている。この 2 つの Ub-E3 はあらゆるタイプの筋萎縮時に発現量が増加することに加え、MuRF1 KO マウスと atrogen-1 KO マウスは筋萎縮に対し耐性を示す(28)。このことから、MuRF1 と atrogen-1 はどちらも筋萎縮誘導の中心的分子と考えられている。atrogen-1 の基質としては、現在までに calcineurin や筋分化に関わる転写因子 myoD が同定されているが、MuRF1 との差異を含め、その機能についてはまだ不明な点が多い(86,87)。

## 7. 筋萎縮・筋肥大の発現制御に関わる上流の遺伝子群

MuRF1 と atrogen-1 の基質の探索に加え、両者の発現誘導のメカニズムも盛んに解析されている。特に、これらの解析結果は、筋肥大を招くシグナル経路を解析した結果と密接に関連しており、筋細胞の大きさのバランスが保たれる機構が明らかになりつつある (図 VIII)。

両者の発現はインスリン様増殖因子 IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) により抑制されている。まず、IGF-1 による増殖刺激が加わると、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) の活性化を介してプロテインキナーゼ B (Akt/PKB) が活性化される。活性化された Akt はフォークヘッドドメインを有する転写因子 FoxO1、FoxO3 をリン酸化する。FoxO はインスリン刺激による代謝調節に関与する転写因子であり、脱リン酸化型で核内に局在するが、リン酸化により核外へと移行しその転写活性化能を失う。MuRF1 および atrogen-1 は FoxO により発現誘導を受けており、結果として、IGF-1 刺激によりこれらの発現は抑制される(41,88)。また、FoxO3 はこの 2 つの Ub-E3 とともにオートファジー関連遺伝子の発現も誘導するため、IGF-1/PI3K/Akt 経路は筋細胞内のオートファジーを介した筋タンパク質分解量も減少させることになる(73,74)。このように IGF-1/PI3K/Akt 経路は FoxO を介してタンパク質分解系の発現制御を行うが、それと同時にタンパク質合成系の制御も行っている。まず、Akt は mTOR (mammalian Target of Rapamycin) 経路を活性化させることで、その下流の p70S6 kinase の活性化や 4E-BP (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E - Binding Protein) の不活性化を行う。また、Akt は mTOR と並行して GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) 経路を阻害することも知られている。結果として、IGF-1/PI3K/Akt 経路はタンパク質合成については正に制御している(89)。これらのことを統合すると、IGF-1 のような増殖因子による刺激の存在下、筋細胞内では筋タンパク質分解に関わる MuRF1、atrogen-1 およびオートファジー関連遺伝子の発現が抑制され、一方で、筋タンパク質合成は促進される。逆に、このような増殖刺激のない時には筋細胞内では MuRF1、atrogen-1、オートファジーを介した筋タンパク質分解量が昂進し、筋タンパク質合成量は減少すると考えられる。

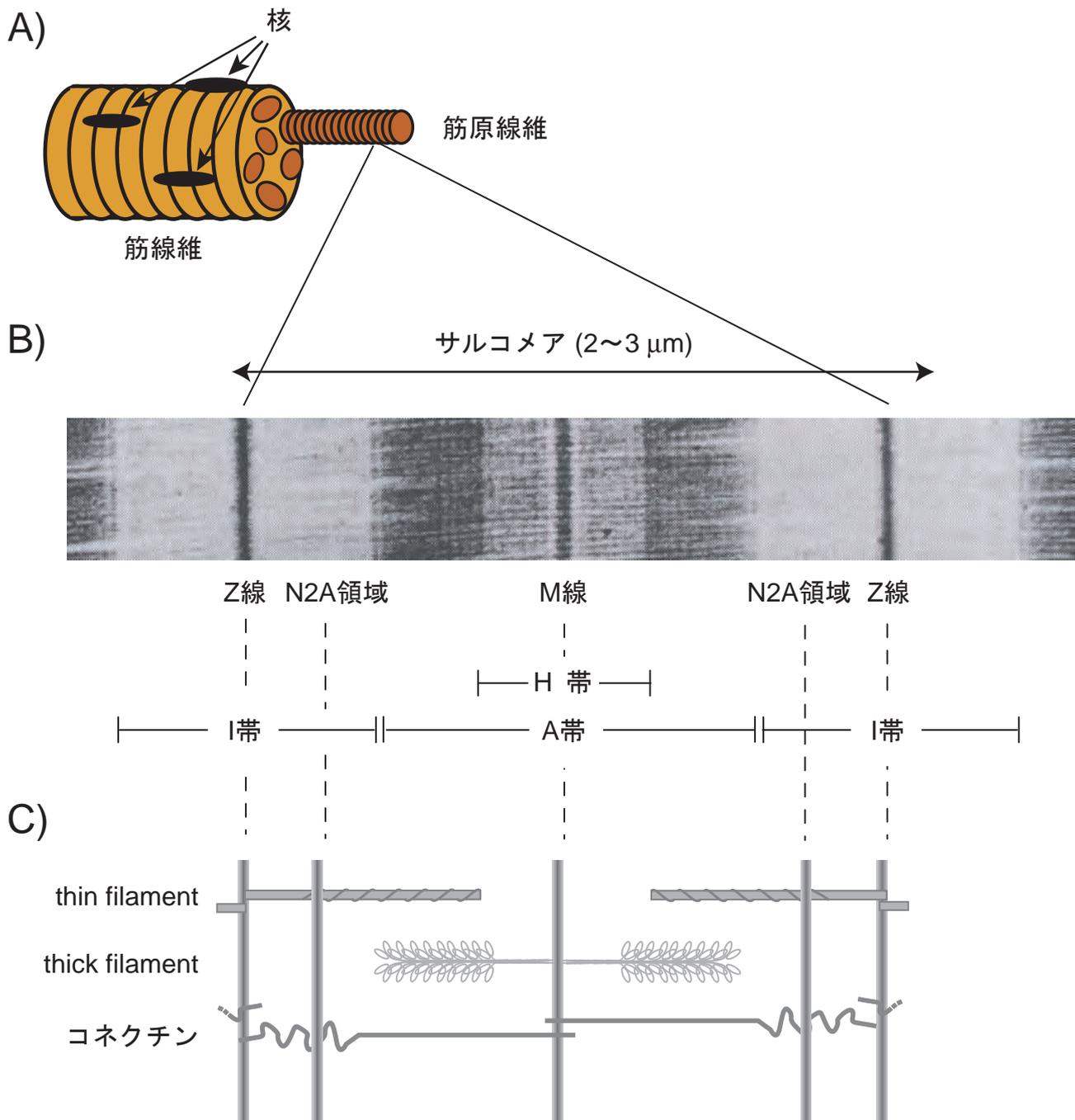
筋萎縮はまた、ガンやエイズなどの様々な病気、あるいはリポ多糖の投与によっても誘発される。これは、腫瘍壊死因子 TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) が p38 MAPK 経路を介して MuRF1、atrogen-1 の発現を誘導しているためと考えられている(42,90)。TNF $\alpha$  の下流には、p38 MAPK 経路に加え NF- $\kappa$ B 経路も存在する。しかし、NF- $\kappa$ B 経路については、この経路が MuRF1 の発現誘導に関与しないという報告もある一方(42)、骨格筋特異的に恒常的に NF- $\kappa$ B を活性化させた遺伝子改変マウスでは MuRF1 の発現量が増加し (atrogen-1 の発現量は変化しない)筋萎縮症状を示したという報告もあり、いまだ不明な点が多い(91)。

## 8. 本研究の目的

ここまで述べてきたように、筋細胞内のタンパク質分解は、Ub-プロテアソーム系、オートファジー-リソソーム系とカルパイン系が協調的に働くことで成し遂げられている。これらの中でも、MuRF1 は筋萎縮を引き起こすような条件下において、その Ub-E3 活性により中心的役割を担っていると考えられている。

また、MuRF1 はサルコメアの M 線においてコネクチンのキナーゼ領域近傍に結合し、骨格筋特異的カルパイン p94 とも近接して存在している。これらのことから、M 線領域では MuRF1 と p94 という 2 つの分解系関連因子が ttk とともにシグナル伝達複合体を形成し、筋萎縮につながるようなストレス刺激に対する応答の際に重要な役割を担っている可能性が考えられている。しかし、MuRF1 や p94 を介した M 線におけるシグナル伝達系についてはほとんど何も明らかにされていない。

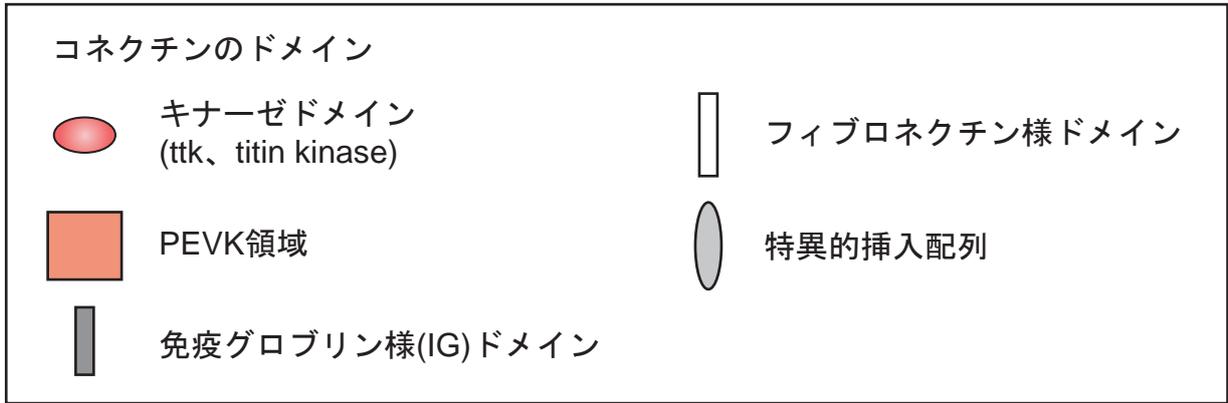
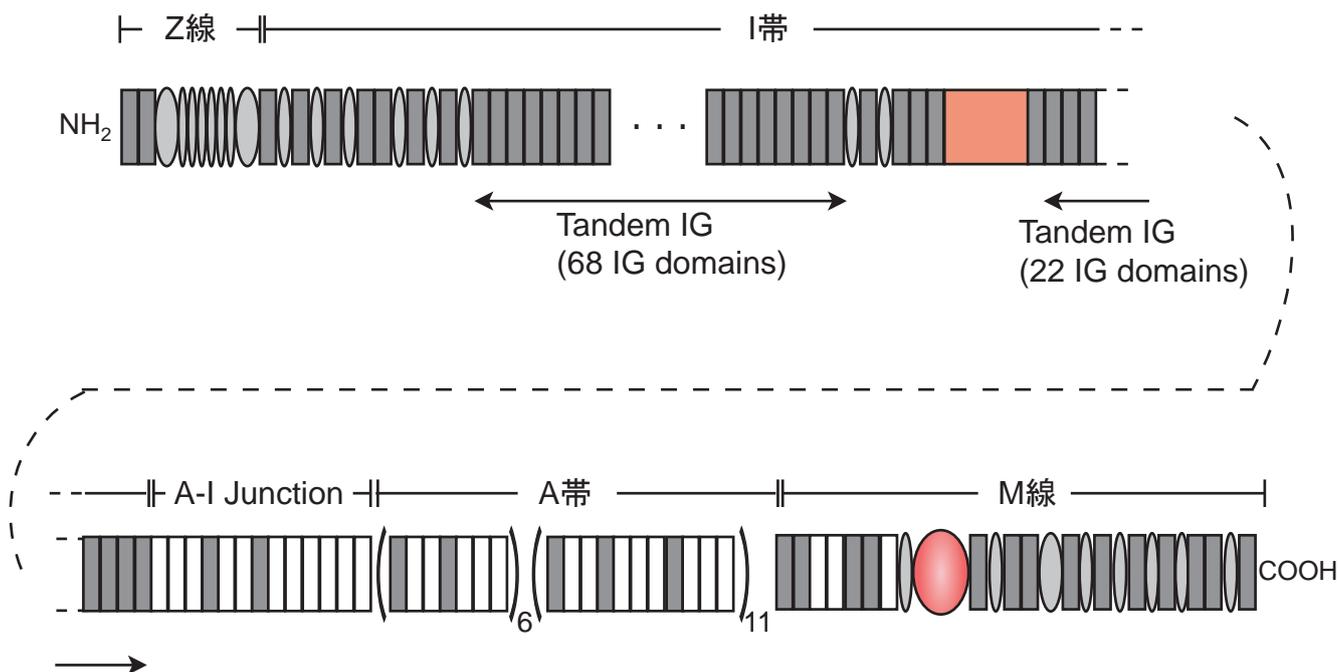
そこで、本研究では、このシグナル伝達系の実態を明らかにする手がかりを得るために、まず MuRF1 に焦点をあて、その機能を分子レベルおよび個体レベルで解析した。



## 図 I 骨格筋の構造

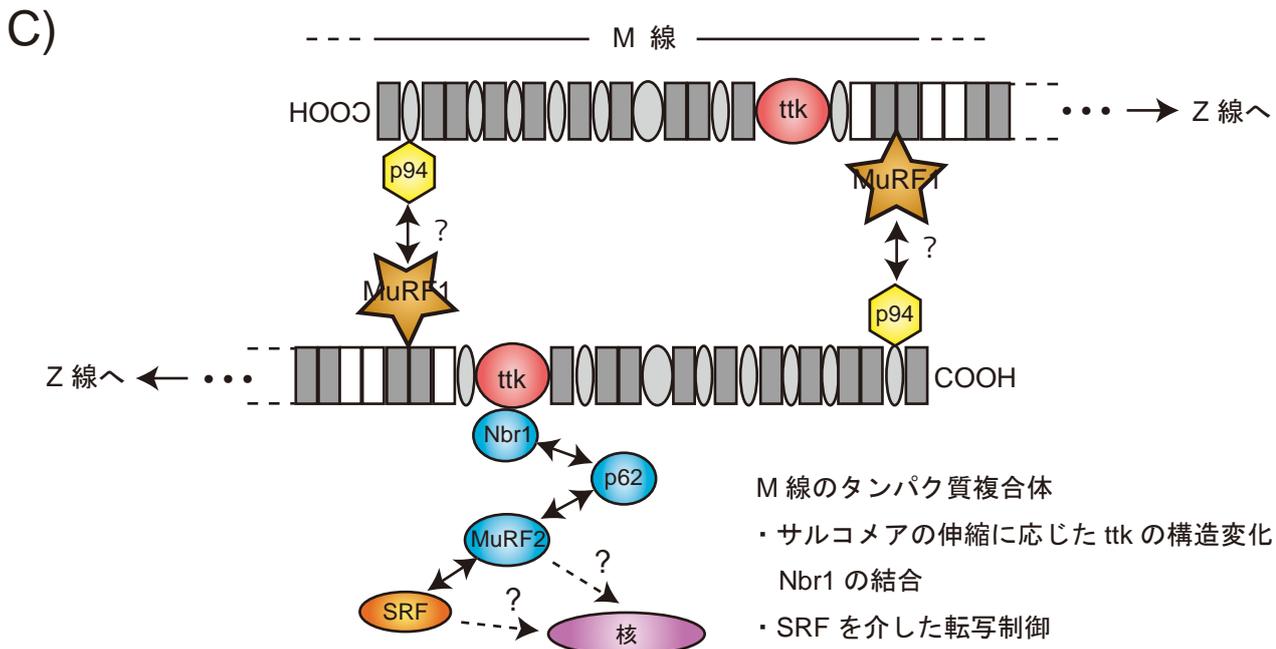
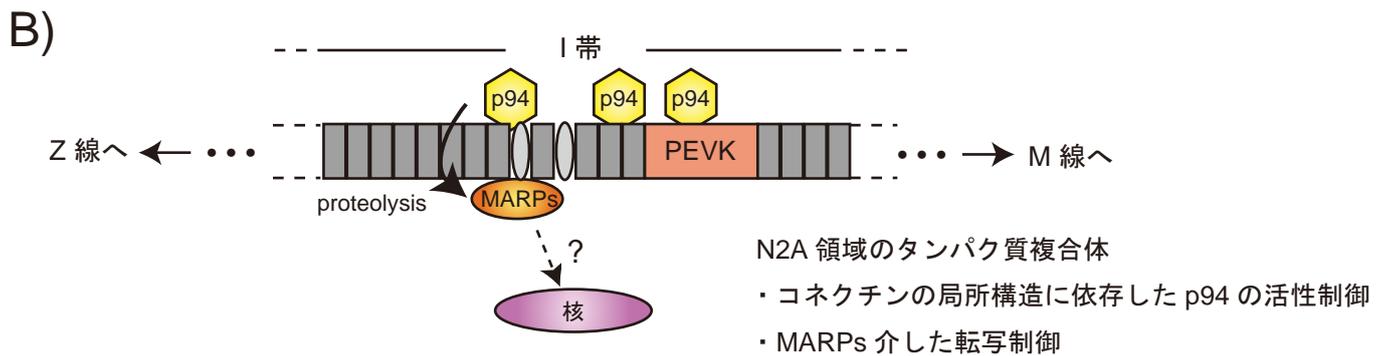
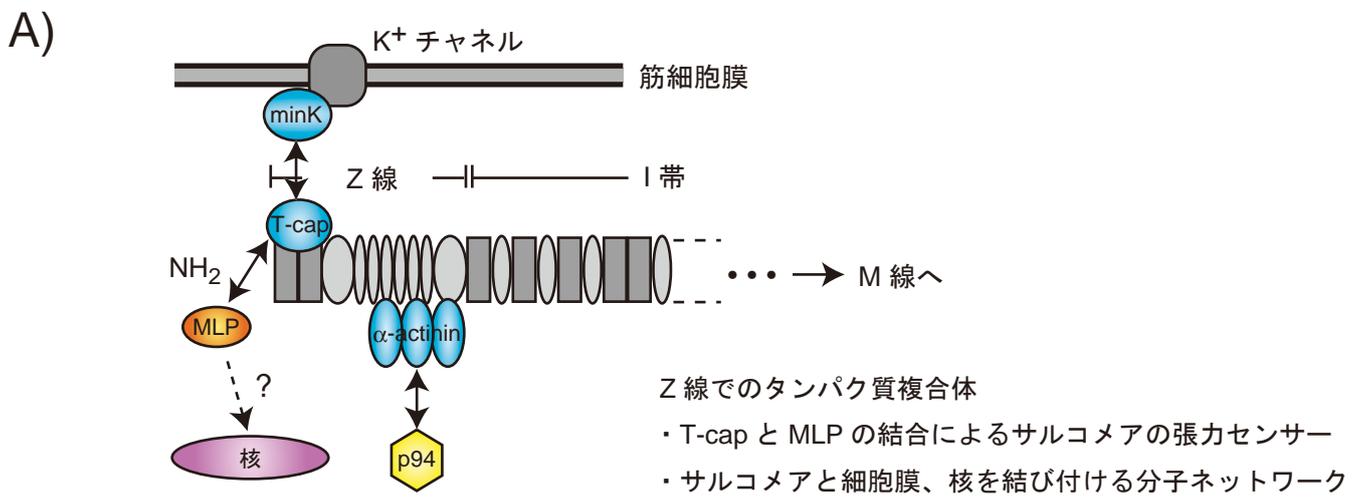
- A) 筋線維 (筋細胞) は多核の細胞であり、その細胞質の大部分は収縮成分である筋原線維で占められている。
- B) 筋原線維の電子顕微鏡写真。2 ~ 3  $\mu\text{m}$  おきに現れる高電子密度の明瞭なZ線と呼ばれる構造体に挟まれた繰り返し単位はサルコメアと呼ばれ、筋原線維の基本構造となる。サルコメアの中央部には別の高電子密度部位であるM線が存在する。M線からZ線にかけては、電子密度に応じて更にH帯、A帯、I帯の3つの部位に分けられている。
- C) サルコメアの模式図。サルコメアには、アクチンが主成分のthin filament、ミオシンが主成分のthick filament およびコネクチン (Z線からM線を1分子でつなぐ超巨大ポリペプチド) の3つのフィラメントが存在している。

(電子顕微鏡写真は、Myology第3版p130より引用した)

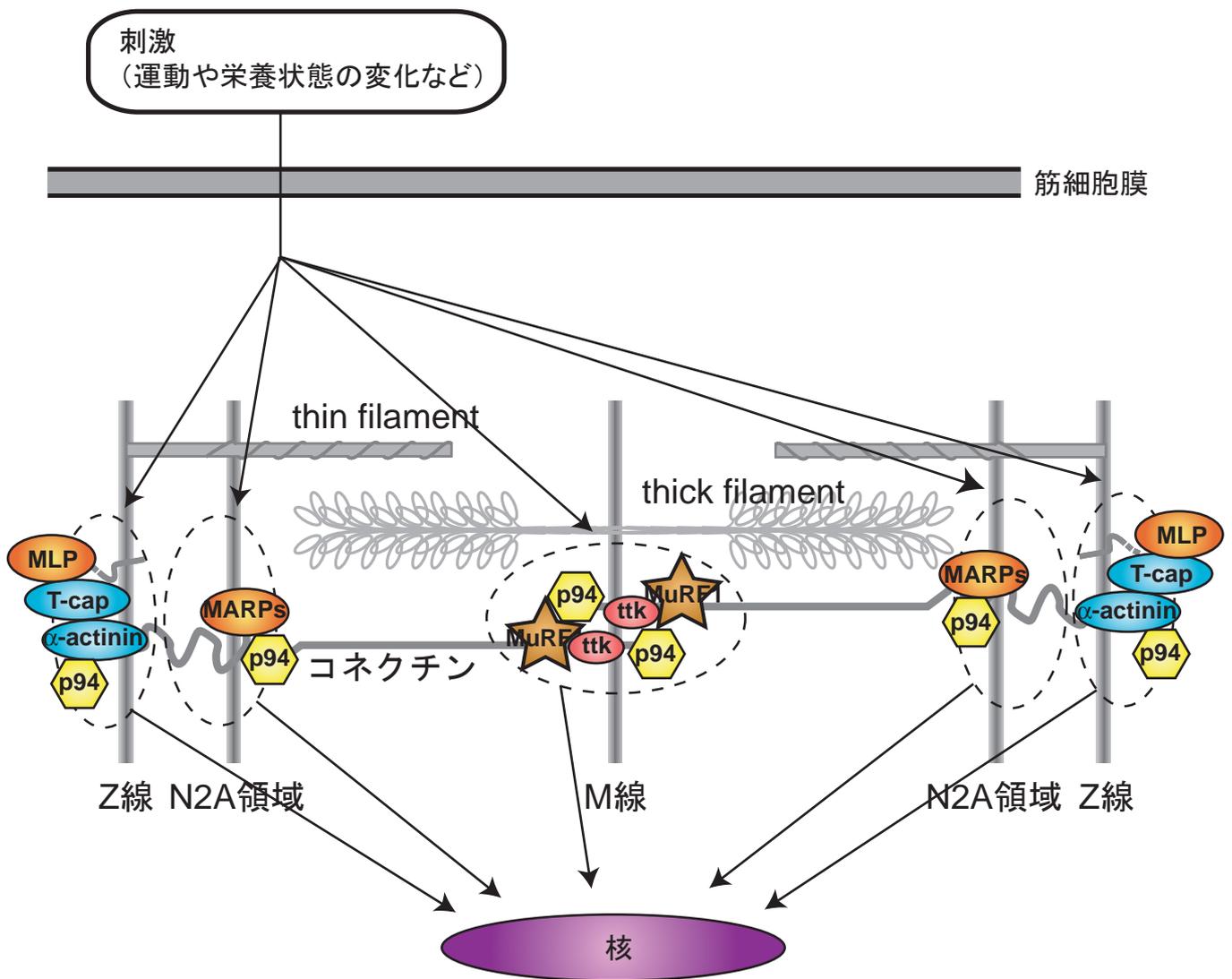


図II コネクチンの構造の模式図

コネクチンは、1分子でサルコメアのZ線からM線までを結ぶ超巨大タンパク質 (分子量 3 MDa、長さ1 μm以上) である。免疫グロブリン様(IG)ドメイン、フィブロネクチン様ドメインからなる繰り返し構造の他、サルコメアの伸縮に寄与するPEVK領域やキナーゼドメイン(ttk)などいくつかの特異的配列を有する。

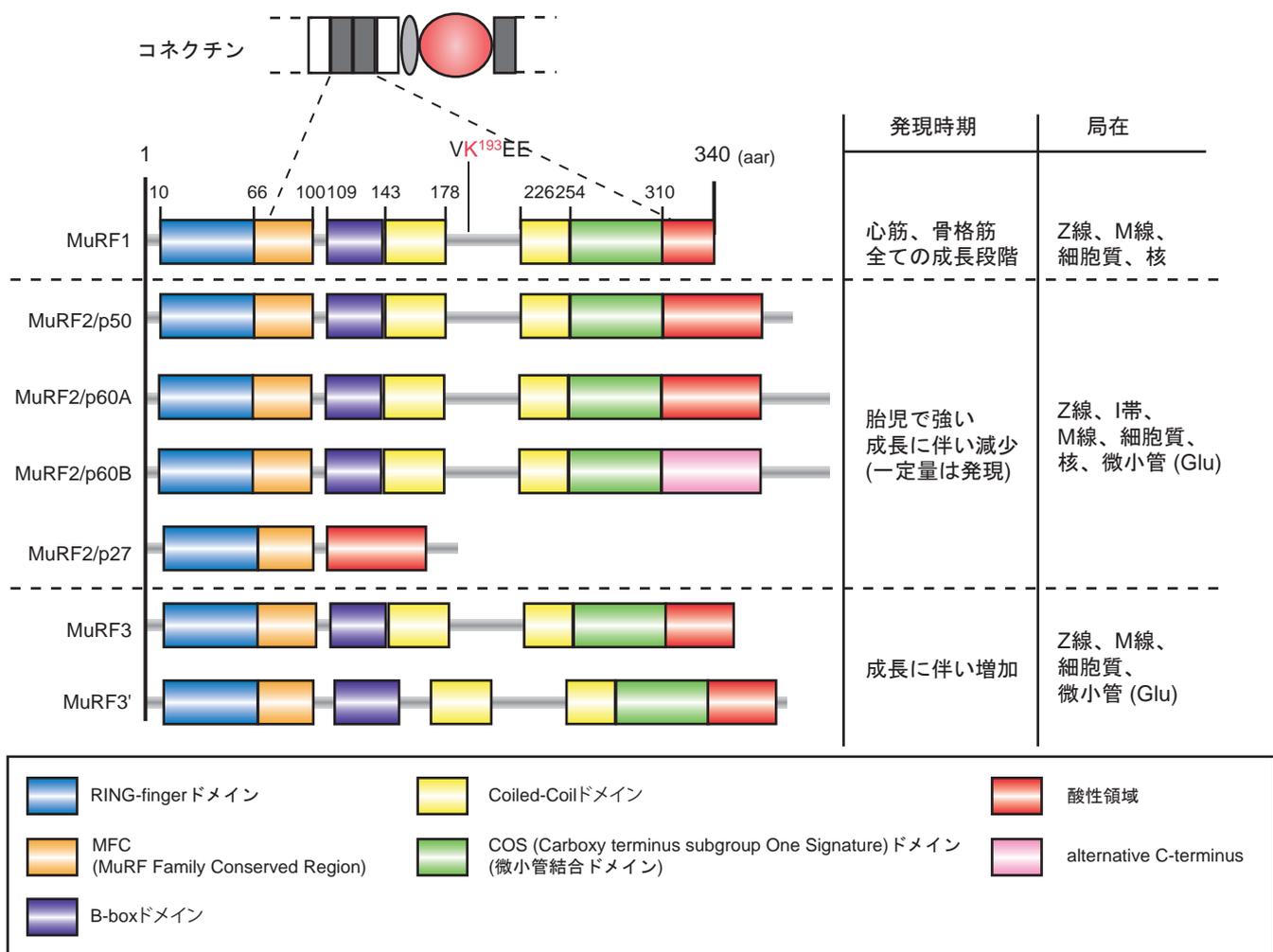


図Ⅲ Z 線、N2A 領域、M 線におけるコネクチンへの結合分子とその関連分子  
Z 線、N2A 領域、M 線におけるコネクチンへの結合分子とその関連分子について、本文中に記載したものをそれぞれ A)、B)、C) にまとめた。各部位において、いくつかの分子の相互作用を介して転写調節因子が核へと情報を伝えていると考えられている。なお、コネクチンの構造については図Ⅱの表記法に従う。また、図中、オレンジ色の分子はそれが転写調節因子であることを表している。



図IV コネクチンを足場としたシグナル伝達系

Z線、N2A領域およびM線上では、コネクチンに対して直接、もしくは間接的に多くの筋タンパク質が結合し複合体を形成している。これらは、外部からの刺激 (収縮や栄養状態など) に応じて核移行しシグナルを伝達していると考えられている。

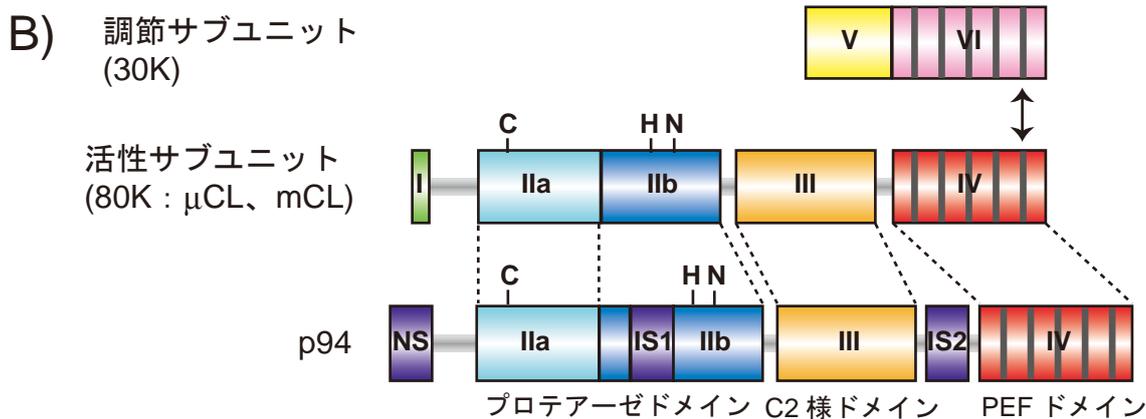
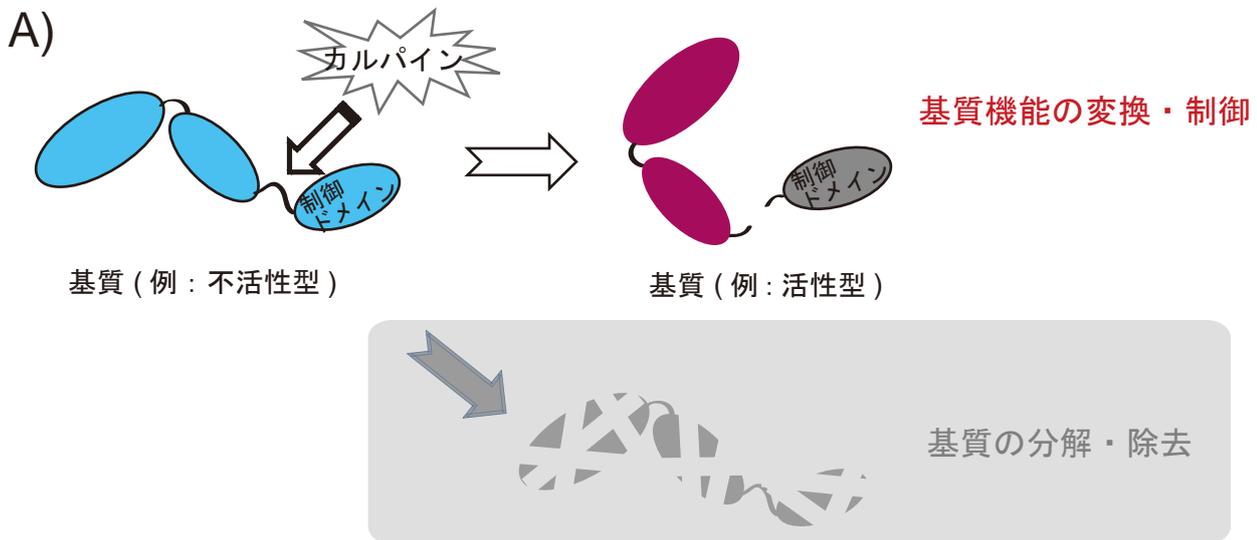


	結合分子などの知見	予想される機能
MuRF1	筋萎縮時に発現量増加	筋萎縮誘導の中心的役割
	KOマウスが筋萎縮耐性	
	Ub-E3活性	Ub修飾系による筋タンパク質分解
	ISOT-3と結合	SUMO修飾系で機能、あるいはSUMO化による活性制御
	UBC9、SUMO3と結合	
	SUMO1化のコンセンサス配列を有する	
GMEB1と結合、核内にも局在	転写調節	
p94、ttkの近傍に位置する	M線におけるシグナル伝達系	
MuRF2	ノックダウンにより、筋原線維形成の遅延、M線の構造異常	筋原線維の形成
	微小管、ミオシン、コネクチンと結合し、一過的に共局在	M線から核内への情報伝達
	ttk、Nbr1、SRFによるシグナル伝達系に関与	
MuRF3	ノックダウンにより、筋細胞の分化、成熟が阻害 (Glu修飾型の微小管の形成不全、MyoD、myozeninの発現量低下)	微小管の安定化、転写調節による筋細胞の分化、成熟制御
	Glu型微小管に結合	
	SRFと結合	

図V MuRFsの構造と予想される機能

MuRFsの構造を模式図で示した。MuRF2、MuRF3についてはスプライスバリエントも示した。また、MuRF1についてはコネクチンとの結合部位およびSUMO化のコンセンサス配列も示した。これらMuRFsはCoiled-Coilモチーフを介してホモおよびヘテロダイマー化できる(MuRF2/p27は例外)。また、構造の右にはMuRFsの発現時期と細胞内局在を、構造の下にはMuRFsの予想される機能をまとめた。MuRF2、MuRF3にはスプライスバリエントがあるが、これらの間での違いは分かっていない。コネクチンのドメイン構造については、図IIに従う。





## 図VII カルパインの機能と構造

### A) カルパインの機能

カルパインは基質を特異的かつ限定的に切断し、その機能の変換・制御を行う「モジュレータ・プロテアーゼ」として機能する。

### B) カルパイン ( $\mu$ -、m- カルパインおよび p94) の構造

$\mu$ -、m- カルパインは共通の調節サブユニット (30K) と、相同な活性サブユニット (80K。それぞれ  $\mu$ CL、mCL) からなるヘテロダイマー構造をとる。80K、30K はそれぞれ次のような4つのドメイン (ドメイン I~IV) および2つのドメイン (ドメイン V、VI) から構成されている。

ドメイン I: 活性制御ドメイン

ドメイン II: プロテアーゼドメイン ( $\text{Ca}^{2+}$  の非結合状態では、IIa と II b に分かれる)

ドメイン III: C2 様ドメイン。  $\text{Ca}^{2+}$  と結合し、リン脂質や基質との相互作用に関与

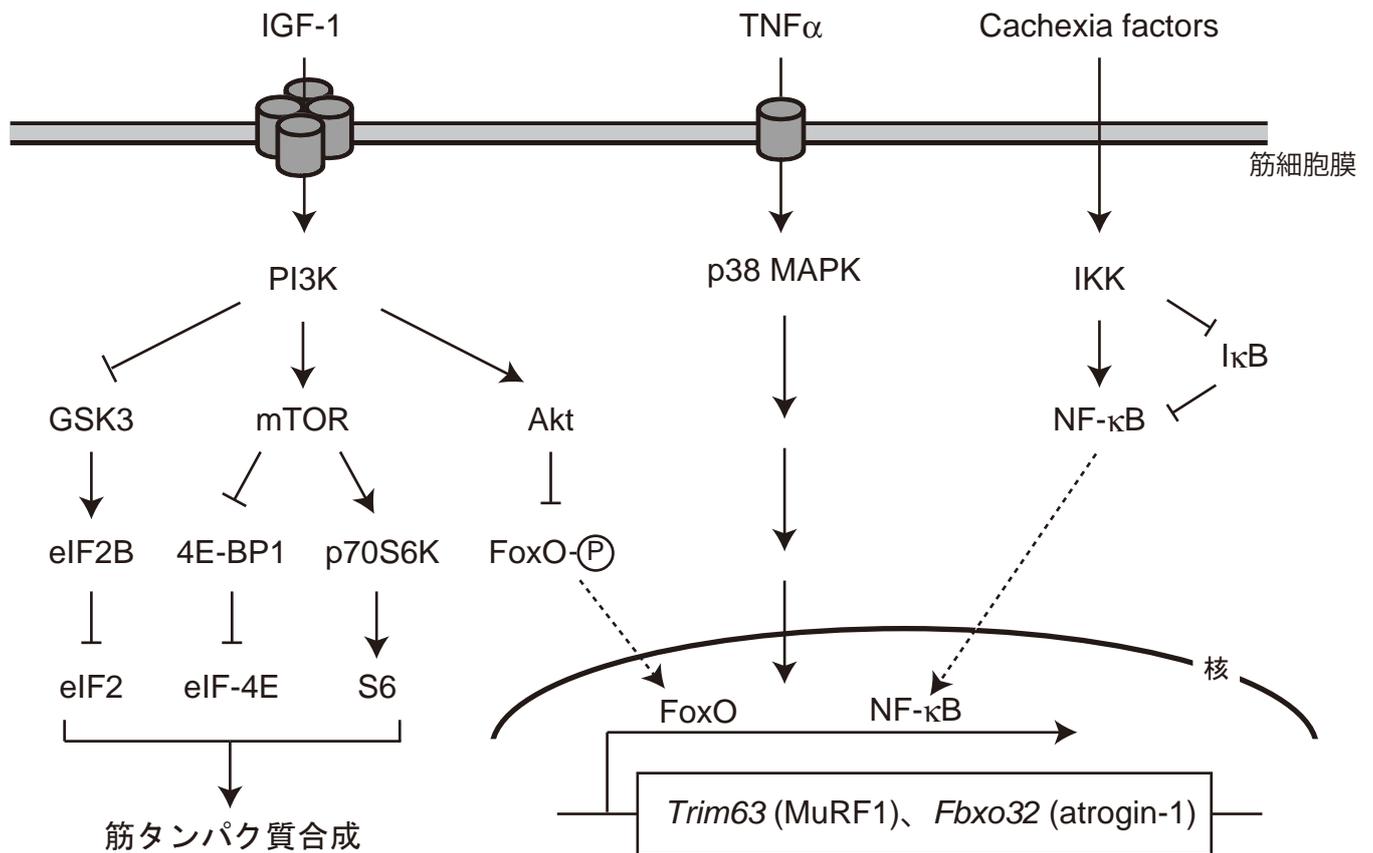
ドメイン IV: PEF (penta-EF hand) ドメイン。EF ハンドを5つ有する

ドメイン V: Gly に富む疎水的な領域

ドメイン VI: ドメイン IV と相同な領域

80K と 30K はドメイン IV とドメイン VI の5つ目の EF ハンドを介して相互作用する。

骨格筋特異的カルパイン p94 は 80K と相同な構造をとるが、特異的なドメイン I である NS 領域および特異的挿入配列 IS1、IS2 を有する。また、p94 はドメイン IV を有するが、 $\mu$ CL、mCL と異なり 30K とは相互作用を示さない。



(FoxO3 は、オートファジー関連遺伝子 (*LC3b*, *Gabarapl1*, *Atg12l*) も発現誘導する。NF-κB 経路が *atrogin-1* も発現誘導するかは現時点では不明)

## 図VIII 筋萎縮・筋肥大に関わるシグナル伝達系

筋萎縮および筋肥大の誘導に関わるシグナル伝達系をまとめた。IGF1 は FoxO を不活性化させ MuRF1、atrogin-1 の発現を抑制することで、筋タンパク質分解量を減少させる。それと共に、GSK3 経路や mTOR 経路を介して筋タンパク質合成を促進させることで、筋肥大を誘導する。一方、TNFα は p38 MAPK 経路を介して MuRF1 や atrogin-1 の発現を誘導し、筋タンパク質分解を昂進させる。NF-κB 経路が MuRF1 の発現を誘導することも示されているが、atrogin-1 も同様の制御を受けるか、また、その上流経路はどうなっているのかは明らかにされていない。

## 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料類の由来、調製法などを示した。なお、各装置類などの開発、及び製造元の社名は基本的に社名の後に社あるいは(株)と略記した。

#### <1> 実験動物

マウス(C57BL/6)は日本 SLC 社より購入した。MuRF1 KO マウスはマンハイム医科大学の Siegfried Labeit 博士、Christian C. Witt 博士より御供与頂いた。

#### <2> 大腸菌株、酵母、培養細胞

大腸菌 XL-10 Gold 株及び BL-21 (DE3)株、アフリカミドリザル腎由来 COS7 細胞は、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より御供与頂いた。

#### <3> 装置類

PCR 装置: GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Model TP600 (タカラバイオ(株))

DNA シークエンサー:

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)

電気泳動槽及びパワーサプライ:

スラブ電気泳動装置 (日本エイドー(株))

Mupid-ex (アドバンスバイオ社)

ウエスタン用プロッターAE-6677 S (アトー(株))

パワーステーション 1000VC (アトー(株))

蛋白質泳動用濃度勾配ゲル:

Perfect NT Gel 5-20% M サイズ(デイー・アール・シー(株))

アガロースゲルの撮影:

UV サンプル撮影装置 FAS-IIIフルシステム(TOYOBO(株))

超音波破碎機: トミー超音波発生機 UD-201(トミー精工(株))

クリオスタット: クリオスタット CM1900 (Leica 社)

スライドガラス: MICRO SLIDE GLASS (APS コート付) (MATSUNAMI 社)

カバーガラス: MICRO COVER GLASS (MATSUNAMI 社)

大腸菌培養用シェーカー: BR-FM43FL MR (タイテック社)

恒温シェーカー: M-BR-022 (タイテック社)

マルチシェーカー: MMS (EYELA 社)

エアインキュベータ: SLI-400 (EYELA 社)

CO<sub>2</sub> インキュベータ: HERACELL (ケンドロ社)

低温槽バケット: ECB (タイテック社)

ヒートブロック: ND-M01 (日伸理化社)

吸光光度計: Smart Spec 3000 (BIO-RAD 社)  
心臓採血用注射器: マイジェクター27G×1/2” (ニードル)、  
テルモシリンジ 1mL (ガンマ線滅菌済) (TERUMO 社)  
ハンドホモジナイザー  
: MH-1000 (本体)、G-1005、G-1010 (ジェネレーター) (アズワン(株))  
質量分析装置: 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems 社)  
質量分析用フィルターチップ: DIAMOND FILTER TIP (GILSON 社)  
質量分析用 Zip Tip : Zip Tip C18 (MILLIPORE 社)  
質量分析用チューブ: LOCK-CAP チューブ 1.5 mL (TreffLab 社)  
質量分析用プレート: Opti-TOF™ 384 well Insert (123 x 81 mm)  
(Applied Biosystems 社)  
卓上小型遠心濃縮機: HVC-500 (IWAKI 社)  
外部真空ポンプ: OMT-050A (アルバック機工(株))  
遠心機: 3740 (本体)、AF-2724A、AF-5004CF (ローター)、SF-240 (スイングローター)  
(KUBOTA 社)  
2410 (テーブルトップ遠心機) (KUBOTA 社)  
顕微鏡: BX-60-34-FLB2 落射蛍光顕微鏡(OLYMPUS 社)  
Axiovert 40C 倒立型培養顕微鏡(ZWISS 社)  
遺伝子導入装置: ジーンパルサーII (Bio-Rad 社)  
pH メータ: F-51 (HORIBA 社)  
オートクレーブ装置: SX-300 (TOMY 社)  
DNA チップ: Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix 社)  
DNA チップ読み込み装置: GeneChip Scanner 3000 for High-Resolution Scanning  
(Affymetrix 社)  
濾過滅菌用フィルター: 0.20 µm フィルター (Sartorius stedim 社)

#### <4> ソフトウェア類

核酸・アミノ酸配列解析ソフト: GENETYX-WIN Ver.5.0 (ソフトウェア開発社)  
DNA マイクロアレイ解析ソフト:  
GeneChip OperatingSoftware (GCOS) (Affymetrix 社)  
質量分析解析ソフト: GPS Explorer™ (Applied Biosystems 社)

#### <5> キット類

ペルオキシダーゼ発色キット: POD Immunostain Set (和光純薬(株))  
タンパク質定量キット: Bio-Rad RC DC protein assay Kit (Bio-Rad 社)  
DNA シークエンスキット: BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems 社)

DNA 連結キット: TaKaRa DNA ligation kit (タカラバイオ(株))

cDNA 合成キット:

First-Strand cDNA synthesis kit (GE healthcare 社)

銀染色キット:

Silver Staining kit, Protein (GE healthcare 社)

プラスミド抽出キット:

QIAprep Miniprep kit (QIAGEN 社)

Endofree Plasmid Maki kit (QIAGEN 社)

DNA マイクロアレイ関連キット:

RNeasy mini kit (QIAGEN 社)

DNase I set (QIAGEN 社)

One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix 社)

Sample Cleanup Module (Affymetrix 社)

GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix 社)

#### <6> 各種酵素類

DNA 合成酵素:

Ex Taq DNA polymerase (タカラバイオ(株))

Cloned pfu polymerase (Stratagene 社)

DNA polymerase I Klenow fragment (タカラバイオ(株))

各種制限酵素:

タカラバイオ(株)、New England Biolabs 社、東洋紡社より購入した。

DNA 修飾酵素:

T4 polynucleotide kinase (タカラバイオ(株))

CIAP (タカラバイオ(株))

RNA 分解酵素: RNase A (Sigma 社)

Pronase E (Sigma 社)

Proteinase K (Roche 社)

Hexokinase (Sigma 社)

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma 社)

Trypsin (Promega 社)

Heparin (Sigma 社)

#### <7> 各種核酸類

pGEX (GE healthcare 社)

pcDNA FLAG-MuRF1、pcDNA FLAG-MuRF2、pcDNA FLAG-MuRF3、

pcDNA myc-MARP1、pAS2-1C :

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より御供与頂いた。

pcDNA myc、pcDNA-FLAG :

東京大学分子細胞生物学研究所の前田達哉博士より御供与頂いた。

pcDNA HA-Ub :

東京都臨床医学総合研究所先端研究センターの千葉智樹博士より御供与頂いた。

pET HIBADH :

マンハイム医科大学の Siegfried Labeit 博士より御供与頂いた。

dNTP mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) (タカラバイオ(株))

<8> メンブレン、フィルター類

Immobilon-P Transfer Membrane (ウエスタンブロット用 PVDF 膜) (MILLIPORE 社)

MILLEX-GV (0.22  $\mu\text{m}$  フィルター) (MILLIPORE 社)

MILLEX-HV (0.45  $\mu\text{m}$  フィルター) (MILLIPORE 社)

<9> 細胞等の培養用試薬

(1)大腸菌培養用

Bacto Trypton (DIFCO Laboratories 社)

Yeast Extract (DIFCO Laboratories 社)

Bacto Agar (DIFCO Laboratories 社)

(2) COS7 細胞培養用

DMEM (Sigma 社)

FBS (Sigma 社もしくは JRH 社)

<10> クロマトグラフィー担体、カラム類

anti-FLAG (M2) Beads (Sigma 社)

Glutathione Sepharose Beads 4B (GE healthcare 社)

Protein G Sepharose 4 (GE healthcare 社)

DNA 回収用 GenElute™ Agarose Spin Columns (Sigma 社)

<11> 抗生物質

Ampicillin (Sigma 社)

Kanamycin (Sigma 社)

<12> 蛋白質分解酵素阻害剤

Aprotinin、E-64c、Leupeptin、PMSF (Sigma 社)

MG132 (ペプチド研究所(株))

<13> 組織染色関連試薬

マイヤーヘマトキシリン(和光純薬(株))

エオシン Y (関東化学(株))

LIQUID BLOCKER (大道産業(株))

MOUNT-QUICK (大道産業(株))

トラガカントゴム (和光純薬工業(株))

<14> 抗体、その他の試薬

抗 FLAG タグモノクローナル抗体(M2) (Stratagene 社)

抗 HA タグモノクローナル抗体(6E2) (Cell Signaling 社)

抗 GFP モノクローナル抗体(JL-8) (Invitrogen 社)

抗 myc タグモノクローナル抗体:

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博之博士より御供与頂いた  
ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 二次抗体 (Fab') (ニチレイ(株))

IPTG (ナカライテクス(株))

TRIzol Reagent (RNA 抽出用試薬) (Invitrogen 社)

40 (w/v)% アクリルアミド/ビス(29:1)混合液 (ナカライテクス(株))

$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) (和光純薬工業(株))

PHOSPHATE BUFFERED SALTS (タカラバイオ(株))

リゾチーム(Sigma 社)

<15> 調製試薬類

純水は Milli Q 水を使用した。試薬類は特級試薬、生化学実験用、分子生物学実験用試薬を所定の濃度に溶解し、オートクレーブ滅菌または濾過滅菌した後に使用した。

(1) 遺伝子操作用試薬

1 M Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.0-9.5)

Tris 溶液を塩酸で適当な pH (7.0-9.5)に合わせ、最終的に Tris 濃度が 1 M となるよう調製した。

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA 溶液を水酸化ナトリウム溶液で pH 8.0 に合わせ、最終的に EDTA 濃度が 0.5 M

となるよう調製した。

#### TE 緩衝液 (pH 8.0)

10 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA (pH 8.0)

#### 中性フェノール溶液

65°Cにて融解したフェノールに 0.1%ヒドロキシキノリンを加えた。0.1 M Tris/HCl (pH 8.0)を等量加え、十分に攪拌し水層を捨て、水層の pH が中性になるまで繰り返した。最後に水層を 1-2 cm ほど残し、冷暗所にて保存した。

#### フェノール-クロロホルム溶液

中性フェノール溶液に等量のクロロホルムを加え、水層を 1-2 cm 残して遮光、冷暗所にて保存した。

#### エチジウムブロマイド染色液

純水 200 ml/中に 10 mg/ml/エチジウムブロマイド溶液を 10  $\mu$ l加えたものを染色液とした。

#### 50×TAE 緩衝液

242.0 g	Tris
57.1 ml	酢酸
18.6 g	EDTA

以上を純水に溶解し全量を 1 lとした。使用時は 1×に希釈した。

#### 酢酸ナトリウム緩衝液

3 M 酢酸ナトリウム溶液を酢酸で pH 5.5 に合わせたものを調製した。

#### アガロース電気泳動用色素

0.25%	BPB
0.25%	キシレンシアノール
25%	フィコール

#### 制限酵素用緩衝液

各制限酵素に添付されている 10×緩衝液を 1×に希釈するか、または OPA+を制限酵素に合わせ 0.5、1、2×に希釈して使用した。OPA+の組成は以下の通り。

<10×OPA+ (One-Phor-All Buffer PLUS)>

100 mM	Tris/Acetate (pH 7.5)
100 mM	酢酸マグネシウム
500 mM	酢酸カリウム

PCR 緩衝液

各 PCR polymerase に添付されている 10×緩衝液を使用した。

リゾチーム緩衝液 (Solution I)

50 mM	グルコース
10 mM	EDTA (pH 8.0)
25 mM	Tris/HCl (pH 8.0)

アルカリ SDS 溶液 (Solution II)

0.2 M	水酸化ナトリウム
1%	SDS

High Salt 溶液 (Solution III)

147.2 g	酢酸カリウム
57.5 ml	酢酸

以上を純水に溶解して全量を 500 ml とした。

STE 溶液

100 mM	塩化ナトリウム
10 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA

PEG 溶液

20%	PEG6000
2.5 M	塩化ナトリウム

DNA 抽出緩衝液

100 mM	NaCl
10 mM	Tris/HCl (pH8.0)
25 mM	EDTA (pH8.0)
150 µm/ml	Proteinase K

100 µg/ml/ Pronase E

Proteinase K および Pronase E はそれぞれ 10 mg/ml、100 mg/ml となるように純水に溶解し-20℃で保存した。これらを使用時に必要量を加えた。

## (2) 大腸菌の培地

### LB 培地

1%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
1%	塩化ナトリウム

必要に応じて抗生物質を加えて使用した。

### SOB 培地

2%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
10 mM	塩化ナトリウム
2.5 mM	塩化カリウム

以上の溶液を滅菌後、1/100 量の 1 M 塩化マグネシウム、1 M 硫酸マグネシウムをそれぞれ加えて使用した。

### TB (Transformation Buffer)

10mM	PIPES
250mM	KCl
15mM	CaCl <sub>2</sub>
55mM	MnCl <sub>2</sub>

以上の溶液を 5N の KOH で pH6.7 に調整し、0.20 µm のフィルターを用いて濾過滅菌した。

### 抗生物質含有プレート

LB 培地に 1.5%のアガーを加えて滅菌した後、約 50℃で冷却し、必要量の抗生物質 (Ampicillin もしくは Kanamycin)を加えて混合し、滅菌シャーレに流し込んだ。

### IPTG 溶液

1 M の濃度になるように IPTG を純水で溶解して使用した。

## (3) COS7 細胞培養

### DMEM

Sigma 社製の DMEM を使用した。血清は 56°C、30 分の非働化を行った FBS を最終濃度 10% で使用した。

#### 10×K-PBS

18 g	塩化ナトリウム
90 g	塩化カリウム
29 g	リン酸水素二ナトリウム・12 水和物
2 g	リン酸二水素カリウム

以上を純水に溶解し、1 l になるよう調製した。

#### 1×K-PBS

上記 10×K-PBS を 1× に希釈後 1 M MgCl<sub>2</sub> を 1/400 量(2.5 mM)加え用いた。

#### (4) 蛋白質泳動、ウエスタンブロット用試薬

##### SDS-PAGE 分離用ゲル緩衝液

1.5 M	Tris/HCl (pH 8.8)
0.4%	SDS

##### SDS-PAGE 濃縮用ゲル緩衝液

0.5 M	Tris/HCl (pH 6.8)
0.4%	SDS

##### 10×SDS-PAGE 泳動用緩衝液

136.4 g	Tris
648 g	Glycine
45 g	SDS

以上を純水に溶解し、4.5 l になるよう調製した。

##### 1×SDS-PAGE 泳動用緩衝液

上記 10×SDS-PAGE 泳動用緩衝液を 1× に希釈して使用した

##### 10% APS 溶液

1 g の APS を 10 ml の純水に溶解した後、長期保存は -20°C、短期保存は 4°C で行った。

##### サンプル緩衝液

(2× stock solution)

125 mM	Tris/HCl (pH 6.8)
2%	SDS
5%	2-メルカプトエタノール
30%	グリセロール
0.1%	BPB

(5×stock solution)

250 mM	Tris/HCl (pH 6.8)
4%	SDS
10%	2-メルカプトエタノール
75%	グリセロール
0.3%	BPB

#### ウエスタンブロット用セミドライトランスファー緩衝液

18.15 g	Tris
21.8 g	Glycine
300 ml	メタノール

以上を純水に溶解し、1.5 l になるように調製した。

#### 1 M リン酸二水素カリウム

136.1 g リン酸二水素カリウム

を純水に溶解し、1 l になるように調製した。

#### 1 M リン酸水素二カリウム

174.2 g リン酸水素二カリウム

を純水に溶解し、1 l になるように調製した。

#### TPBS

146.1 g	塩化ナトリウム
25 ml	1 M リン酸二水素カリウム溶液
100 ml	1 M リン酸水素二カリウム溶液
2.5 l	Tween 20

以上を純粋に溶解し、5 l になるように調製した。

#### ブロッキング溶液

スキムミルクを最終濃度 5% になるように TPBS に溶解した。

(5) 組織染色用試薬

エオシン溶液

1% エオシン Y

(6) 血漿成分採取用試薬

ヘパリン溶液

1000 unit/ml となるように PBS に溶解後、4℃にて保存した。

(7) GST pull-down アッセイ、免疫沈降用試薬

PBS

PHOSPHATE BUFFERED SALTS を純水 100 ml あたりに 1 粒溶解させた。

TBS

10 mM Tris/HCl (pH 7.4)

150 mM NaCl

TNE 緩衝液

50 mM Tris/HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

5 mM EDTA

1% NP-40

必要に応じて 0.1 M PMSF、10 µg/ml Aprotinin、25 µM MG132 を加えた。

変性用 TNE 緩衝液

50 mM Tris/HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

5 mM EDTA

1% SDS

骨格筋抽出緩衝液

10 mM Tris/HCl (pH 7.5)

50 mM NaCl

1 mM EDTA

1% NP-40

1 mM DTT

1 mM	PMSF
10 µg/ml	Aprotinin
10 µM	E-64
100 µM	Leupeptin

GST pull-down アッセイ用、溶出緩衝液

10 mM	還元型グルタチオン
50 mM	Tris/HCl (pH 8.0)

50×抗 FLAG 抗体免疫沈降用、溶出緩衝液

FLAG peptide (Sigma 社)を、5 mg/mlの濃度になるように TBS に溶解した後、-20℃にて保存した。

1×抗 FLAG 抗体免疫沈降用、溶出緩衝液

上記 50×保存溶液を、1×に TNE 緩衝液を用いて希釈した。

(8) クレアチンキナーゼ活性測定用試薬

クレアチンキナーゼ抽出緩衝液

26 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
0.3 M	Sucrose
1%	NP-40
20 mM	2-メルカプトエタノール

クレアチンキナーゼ活性測定緩衝液

130 mM	KCl
10 mM	Tris/HCl (pH 7.4)
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	AMP
50 µM	diadenosine pentaphosphate
5 mM	glucose
0.7 mM	NADP
1.5 mM	ADP
9 mM	phosphocreatine
1.3 U	hexokinase
0.5 U	glucose-6-phosphodehydrogenase

## 実験方法

#### <1> DNA のアガロース電気泳動

アガロースゲルは 1×TAE に 0.6-1.5% となるようにアガロースを加え、加熱溶解して作製した。エチジウムブロマイド溶液に泳動後のアガロースゲルを浸し、UV トランスイルミネーターを用いて検出を行い、撮影した。

#### <2> エタノール沈殿、2-プロパノール沈殿

核酸を含む溶液に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム緩衝液と 2.5 倍量のエタノールを加え、4°C で 15 分間程度静置後、4°C で 20,000×g、15 分間遠心しエタノール沈殿を行った。また、2-プロパノール沈殿の場合はエタノールのかわりに等量の 2-プロパノールを加え室温で 10 分間静置して行った。核酸の沈殿物は 70%エタノールで洗浄後、減圧乾固し、適当量の純水または TE に溶解した。

#### <3> PEG 沈殿

核酸を含む溶液から DNA のみを沈殿させる目的で行った。0.6 倍量の 20% PEG 溶液を加え、軽く混ぜた後、氷中で 30 分間放置した。その後 4°C で 20,000×g、30 分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は 70%エタノールで洗浄後、減圧乾固し、適当量の純水または TE に溶解した。

#### <4> フェノール-クロロホルム抽出

核酸を含む溶液のタンパク質の除去、及び各種酵素の失活を目的として行った。等量のフェノール-クロロホルム溶液を加え、十分に攪拌した後、室温で 20,000×g、5 分間遠心することで水層と有機層を分離し、水層のみを回収した。必要に応じて複数回、操作を繰り返した。

#### <5> アガロースゲルからの DNA 断片の回収

目的 DNA を含む試料をアガロースゲルで電気泳動後、UV トランスイルミネーター上で撮影し、目的断片の移動度を定規で求めてからその断片をカッターナイフで切り取った。その後、切り取ったゲル断片を予め TE で平衡化した GenElute™ Agarose Spin Column に入れ、4°C、20,000×g、15 分間遠心することで目的 DNA 断片溶液を 1.5 ml チューブに回収した。回収した溶液はフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、減圧乾固後に適当量の TE に溶解した。

#### <6> 大腸菌形質転換

##### (1) コンピテント細胞の調製

各種大腸菌を 100 ml の SOB 培地に植菌した。22°C で  $A_{600}=0.4-0.8$  になるまで培養したのち、氷中で 10 分間冷却し、4°C、2,500×g、10 分間遠心して集菌した。菌体を 40 ml

の氷冷した TB に懸濁し、さらに 10 分間氷上に静置し、再び遠心(4°C、2,500×g、10 分間)して集菌した。沈殿を 10 ml の氷冷した TB に懸濁し、さらに 750 μl の DMSO を加えて穏やかに混和し、10 分間氷上に静置した。このコンピテント細胞液を 1.5 ml チューブに 100-200 μl ずつ分注し、直ちに液体窒素中で凍結させ、-80°C で保存した。

## (2) 形質転換

凍結コンピテント細胞を手早く融解し、ライゲーション反応の終わった DNA 試料もしくはプラスミド DNA に 60-100 μl のコンピテント細胞を加え、氷上で 15 分静置した。その後、42°C のヒートブロックで 40 秒間の熱ショックを与え、再び 1 分間氷上に静置し、これに 4 倍量の LB 培地を加えて 37°C で 1~2 時間振盪培養した(Kanamycin 耐性のプラスミドに関しては 2 時間、それ以外では 1 時間の培養を行った)。振盪培養ののち低速遠心で菌体を沈殿させ過剰量の培地を除去し、再度適当量の培地中で菌体を懸濁させてから適当な抗生物質を含む LB プレートに塗布して、37°C で一晩培養した。

## <7> プラスミドの調製

### (1) プラスミドの少量調製法

プラスミド抽出キット(QIAprep Miniprep kit(QIAGEN 社))を用いた。手順は、添付されたプロトコルに従った。

### (2) アルカリ-SDS 法(プラスミドの大量調製法)

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを適当な抗生物質を含む 150 ml の LB 培地(500 ml 用フラスコを使用)に植菌し、37°C、200 rpm にて一晩振盪培養したものを出発材料とした。培養液を 4°C、2,500×g、20 分間遠心して集菌後、氷冷した STE 溶液に懸濁させ、再度 4°C、2,500×g、20 分間遠心することで菌体を回収した。なお、次の手順に進まない時は、この菌体を-80°C にて凍結保存した。まず、この菌体に対し Solution I (10 ml)を加え懸濁した。続いて、リゾチーム 10 mg を加え良く混和し、10 ml の Solution II を加えて転倒混和させ、5~10 分間室温にて静置し菌体を溶解した。そこに氷冷した 10 ml の Solution III を加え、転倒混和し溶液を中和させ、氷中で 15 分間静置した。続いて 4°C で 14,000×g、15 分間遠心し、上清を 2-プロパノール沈殿した。得られた沈殿を 70%エタノール溶液にて洗浄後、0.5 ml の TE 緩衝液に溶解し、10 mg/ml の RNaseA 溶液を 2 μl 加え、37°C で 30 分間静置した。その後フェノール-クロロホルム処理を 3 回行ない、得られた水層を新しいチューブに移してから 50 μl の酢酸ナトリウム緩衝液と 1 ml のエタノールを加え、室温で 20,000×g、15 分間遠心した。沈殿を 1 ml の 70%エタノールで洗浄後、0.5 ml の TE 緩衝液に溶解した。この溶液に対し PEG 沈殿を行い、適等量(培養細胞への遺伝子導入用の場合、プラスミド濃度が 1 mg/ml になるように調節。それ以外では、100 μl の TE 緩衝液)の TE 緩衝液に溶解することでプラスミド溶液とした。

#### <8> 塩基配列の決定

ABI 310 DNA Sequencer によって決定した。方法を以下に記す。

BigDye Terminator kit に添付されているプレミックス溶液 2  $\mu$ l、5 $\times$ sequence 緩衝液 1  $\mu$ l、DNA 200 ng 分、プライマー1.6 pmol 分、滅菌水で全量を 10  $\mu$ l として、PCR にかけた。PCR 条件は以下の通りである。

(96 $^{\circ}$ C, 10 秒 $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C, 5 秒 $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C, 4 分) $\times$ 25 サイクル

PCR 終了後、反応液をエタノール沈殿し、沈殿を 70%エタノールで洗浄、減圧乾固した。これに 12  $\mu$ l の Hi-Di formamide 溶液(BigDye Terminator kit に添付)に溶解させた。溶解後、95 $^{\circ}$ C、2 分間の熱変性後、氷中で急冷させ、これをサンプルとした。Sequencer による配列の決定後、付属のソフトウェアを用いて解析を行った。

#### <9> オリゴヌクレオチドの合成

本研究で使用したプライマーはエスペックオリゴサービス(株)、グライナーージャパン(株)、もしくは北海道システム・サイエンス(株)に依頼して合成した。合成したプライマーの配列は以下の通りである。

##### ヒト M-CK 遺伝子クローニング用

(hCK-M 1S)                    5'- catgccattcggtaacacccac -3'  
(hCK-M 2S)                    5'- tggccgccagcatcaagggcta -3'  
(hCK-M 1A)                    5'- ctacttctgggcggggatcat -3'

##### ヒト SERCA1 遺伝子クローニング用

(hSERCA1 1S)                5'- tggaggccgctcatgctaaa -3'  
(hSERCA1 2S)                5'- ctggggacatcgtggaggtgg -3'  
(hSERCA1 3S)                5'- gccatctactactttaagattgccg-3'  
(hSERCA1 4S)                5'- caccgagacagcactcacca-3'  
(hSERCA1 5S)                5'- acaccctgcgctgcttggcct-3'  
(hSERCA1 6S)                5'- atgacaggtgatggcgtcaat3'  
(hSERCA1 1A)                5'- tgtcaacttcttcttcttcttctgg-3'

##### ヒト HIBADH 発現コンストラクト作製用

(hHIBADH 1S)                5'-caccagtatcaatgcaatagaagc-3'  
(hHIBADH 2S)                5'-gattccagcactattgatcctgc-3'  
(hHIBADH 5')                5'-tttggatccatggcagcctccttacggctcctcgg-3'  
(hHIBADH 3')                5'-tttctcgagacactcagaagggtctcctcctcctcgttagga-3'

ヒト GMEB1 発現コンストラクト作製用

(GMEB1 5')	5'-aggctctagaatggctaatgcagaagtgag-3'
(GMEB1 3')	5'-aggcactagtttaatcctctaagaccacaa-3'
(GMEB1 2S)	5'-aagagagctattcgtctgggtg-3'
(GMEB1 3S)	5'-caagtacagatgctgctgttc-3'

MuRF1 欠失変異体作製用

(delta-RING 5')	5'-cgccacgaggtgatcatggat-3'
(delta-MFC5')	5'-ctgcagaaggcagtcacccatg-3'
(MuRF1 B-box 5')	5'-tcaggatctagagtggccccattgacgagt-3'
(MuRF1 B-box 3')	5'-tcaggagggcccttactcgcaggccttgtggat-3'
(MuRF1 C.C1 5')	5'-tcaggatctagagtggccccattgcagagt-3'
(MuRF1 C.C2 3')	5'-tcaggagggcccttactggtgtccttcttc-3'
(hMuRF1 1S')	5'-catggagaacttgagaagcag-3'
(hMuRF1 2S)	5'-tgcaaggagcacgaagatgagaaa-3'
(hMuRF1 1A)	5'-ttactggtgtccttcttcttccc-3'
(MuRF1 YFP 5')	5'-cgataaggtaccatggagaacttga-3'
(MuRF1 MFC 3')	5'-tcaggatctagacggccgactggagcactc-3'

作製コンストラクト塩基配列決定用

(pcDNA-N)	5'-ctggctagcgtttaaacttaagc-3'
(pcDNA-Rv)	5'-tagaaggcacagtcgaggc-3'
(pGEX 5')	5'-cacgacgttgtaaaacgacccacgtttcgtcctggccacc-3'
(pGEX 3')	5'-ggataacaatttcacacaggcacgttttcaccctcatcacc-3'

MuRF1 KO マウスジェノタイプニング用

(mMuRF1 forward)	5'-ggccaggaaccggtgggtgcccttgg-3'
(mMuRF1 reverse)	5'-gcttgagctacatgtcaaggctccatccc3'

RT-PCR 用

(mouse MuRF1 s)	5'-gactcctgcagagtgaccaag-3'
(mouse MuRF1 as)	5'-cttctacaatgctcttgatgagc-3'
(atrogin-1/MAFbx s)	5'-gaatagcatccagatcagcag-3'
(atrogin-1/MAFbx as)	5'-gagaatgtggcagtgaaagca-3'
(calpain1 s)	5'-gaattggaataccacattttacgagg-3'

(calpain1 as)                      5'-tcaaaggtcacaacaccatccagg-3'

#### <10> PCR

##### (1) 遺伝子クローニング用 PCR

M-CK、SERCA1 遺伝子の単離はヒト skeletal muscle cDNA library に対する PCR によって行った。両遺伝子共通して、PCR の反応組成は以下の通りである。

##### 反応液組成(総液量 : 20 $\mu$ l)

100 ng	ヒト skeletal muscle cDNA library
0.4 $\mu$ M	5'プライマー
0.4 $\mu$ M	3'プライマー
2 $\mu$ l	10 $\times$ Cloned Pfu turbo polymerase PCR 緩衝液
250 $\mu$ M	dNTPs
1 U	Cloned Pfu turbo polymerase
	滅菌水

##### M-CK 反応条件

5'プライマー                      hCK-M 1S

3'プライマー                      hCK-M 1A

反応条件: 94 $^{\circ}$ C, 2分 $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C, 30秒 $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C, 30秒 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 1分 20秒) $\times$ 30 サイクル $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 3分

##### SERCA1 反応条件

5'プライマー                      hSERCA1 1S

3'プライマー                      hSERCA1 1A

反応条件: 94 $^{\circ}$ C, 2分 $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C, 30秒 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C, 30秒 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 3分) $\times$ 30 サイクル $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 3分

##### (2) GMEB1、HIBADH コンストラクトつなぎ換え用 PCR

GMEB1、HIBADH 遺伝子の培養細胞発現コンストラクトは、御供与頂いた酵母用コンストラクト及び大腸菌発現用コンストラクトをテンプレートに PCR を行い、得られた PCR 産物を培養細胞発現用ベクターに組み込むことで作出した。以下にその際の PCR 条件を記す。

##### 反応液組成(総液量 : 20 $\mu$ l)

10 ng	各テンプレートプラスミド
0.4 $\mu$ M	5'プライマー
0.4 $\mu$ M	3'プライマー

2 $\mu$ l	10× Cloned Pfu turbo polymerase PCR 緩衝液
250 $\mu$ M	dNTPs
1 U	Cloned Pfu turbo polymerase 滅菌水

#### HIBADH 反応条件

5'プライマー                    hHIBADH 5'

3'プライマー                    hHIBADH 3'

反応条件: 94°C,2分→(94°C,30秒→65°C,30秒→72°C,1分20秒)×30サイクル→72°C,3分

#### GMEB1 反応条件

5'プライマー                    GMEB1 5'

3'プライマー                    GMEB1 3'

反応条件 : 94°C,2分→(94°C,30秒→53°C,30秒→72°C,2分)×30サイクル→72°C,3分

#### (3) MuRF1 欠失変異体作製用 PCR-1

MuRF1 の欠失変異体発現用コンストラクトの一部は、ヒト skeletal muscle cDNA library に対する PCR を行い、得られた PCR 産物を培養細胞発現用ベクターに組み込むことで作出した。以下にその際の PCR 条件を記す。

#### 反応液組成(総液量 : 20 $\mu$ l)

100 ng	ヒト skeletal muscle cDNA library
0.4 $\mu$ M	5'プライマー
0.4 $\mu$ M	3'プライマー
2 $\mu$ l	10× Cloned Pfu turbo polymerase 緩衝液
1 U	Cloned Pfu turbo polymerase
250 $\mu$ M	dNTPs 滅菌水

#### $\Delta$ RING 変異体反応条件

5'プライマー                    delta-RING 5'

3'プライマー                    hMuRF1 1A

反応条件 : 94°C,2分→(94°C,30秒→53°C,30秒→72°C,2分)×30サイクル→72°C,3分

#### $\Delta$ MFC 変異体反応条件

5'プライマー                    delta-MFC 5'

3'プライマー hMuRF1 1A

反応条件：94°C,2分→(94°C,30秒→53°C,30秒→72°C,2分)×30サイクル→72°C,3分

#### (4) MuRF1 欠失変異体作製用 PCR-2

MuRF1 の欠失変異体発現用コンストラクトの一部は、pcDNA FLAG-MuRF1 をテンプレートに PCR を行い、得られた PCR 産物を培養細胞発現用ベクターに組み込むことで作出した。以下にその際の PCR 条件を記す。

##### ΔCC 変異体反応条件

5'プライマー MuRF1 YFP5'

3'プライマー MuRF1 MFC3'

反応条件：94°C,2分→(94°C,30秒→55°C,30秒→72°C,1分)×30サイクル→72°C,3分

##### B-box ドメインのみを有する変異体

5'プライマー MuRF1 B-box 5'

3'プライマー MuRF1 B-box 3'

反応条件：94°C,2分→(94°C,30秒→55°C,30秒→72°C,1分)×30サイクル→72°C,3分

##### ΔB-box 変異体

5'プライマー MuRF1 C.C1 5'

3'プライマー MuRF1 C.C2 3'

反応条件：94°C,2分→(94°C,30秒→50°C,30秒→72°C,1分)×30サイクル→72°C,3分

#### (5) MuRF1 KO マウスジェノタイピング

##### 反応液組成(総液量：20 μl)

1 μl	テンプレート
0.5 μM	mMuRF1 forward
0.5 μM	mMuRF1 reverse
2 μl	10×Ex taq polymerase 緩衝液
200 μM	dNTPs
0.5 U	Ex taq polymerase
	滅菌水

##### 反応条件

95°C,1分→(95°C,30秒→65°C,30秒→72°C,4分)×32サイクル→72°C,10分

テンプレートは、別項の記述に従って用意した。

## (6) RT-PCR

### 反応液組成(総液量：20 $\mu$ l)

1 $\mu$ l	テンプレート
0.2 $\mu$ M	5'プライマー
0.2 $\mu$ M	3'プライマー
2 $\mu$ l	10× Ex taq polymerase 緩衝液
200 $\mu$ M	dNTPs
0.5 U	Ex taq
	滅菌水

### 反応条件

94°C,1分→(94°C,30秒→57°C,30秒→72°C,1分)×25→72°C,5分

テンプレートは、別項の記述に従って用意した。サイクル数に関しては、20サイクルから30サイクルの間で条件検討を行い、25サイクル時点でどのサンプルも指数関数的な増幅段階にあることを確認して採用した。

## <11> サブクローニング

### (1) ベクターDNAの調製

OPA<sup>+</sup> 緩衝液もしくは各制限酵素に添付された緩衝液中でベクターDNAに制限酵素を加えて完全に分解した。必要ならば、続けて CIAP による脱リン酸化処理、Klenow fragment による平滑末端処理を行った。詳しくは、<11>-(4)に記す。

### (2) インサート DNA の調製

インサート DNA は各種制限酵素処理、平滑末端化処理、リン酸化処理を適宜行い、それぞれの DNA 断片をアガロースゲルで分離し、目的断片を回収して使用した。詳しくは、<11>-(4)に記す。

### (3) ライゲーション反応

上記の方法で作成したベクターDNAとインサートDNAをモル濃度比が1:2:1:10となるように混合し、この混合液に等量の2×Ligation solution (TaKaRa DNA Ligation kit)を加え、16°Cで30分以上静置した。

### (4) 各コンストラクトの作製

#### (1) pcDNA myc-MuRF1、MuRF2、MuRF3

pcDNA FLAG-MuRF1、MuRF2、MuRF3 を KpnI、XbaI で切断し、そのインサートを KpnI、XbaI 処理した pcDNA myc とライゲーションした。

#### (2) pcDNA myc-MuRF1 ΔRING、ΔMFC

<10>-(3)「ΔRING 変異体」「ΔMFC 変異体」に記載した手法により得られた PCR 産物を、kpnI、CIAP および Klenow fragment 処理した pcDNA myc とライゲーションした。

#### (3) pSRD myc-MuRF1 ΔCC

<10>-(4)「ΔCC 変異体」に記載した手法により得られた PCR 産物を KpnI および XbaI 処理し、KpnI、XbaI 処理した pSRD myc とライゲーションした。

#### (4) pcDNA myc-MuRF1 B-box、pEGFP MuRF1 B-box

<10>-(4)「B-box のみを有する変異体」に記載した手法により得られた PCR 産物を ApaI および XbaI 処理し、ApaI、XbaI 処理した pcDNA myc とライゲーションして pcDNA myc-MuRF1 B-box を得た。また、これを KpnI および ApaI 処理し、KpnI、ApaI 処理した pEGFP-C1 とライゲーションさせた後、得られたプラスミドを EcoRI 処理によりセルフライゲーションすることで pEGFP MuRF1 B-box を得た。

#### (5) pSRD myc-MuRF1 ΔB-box

<10>-(4)「ΔB-box 変異体」に記載した手法により得られた PCR 産物を XbaI、ApaI で切断し、XbaI、ApaI で切断した pSRD myc-MuRF1 ΔCC とライゲーションした。

#### (6) pAS2-1c M-CK、pcDNA FLAG M-CK、pcDNA myc M-CK

<10>-(1)に記載した手法により得られた PCR 産物を EcoRI、CIAP、Klenow fragment 処理した pAS2-1c とライゲーションし、pAS2-1c M-CK を得た。また、これを EcoRI 処理して得られたインサートを EcoRI、CIAP 処理した pcDNA FLAG、pcDNA myc とライゲーションし、pcDNA FLAG M-CK、pcDNA myc M-CK を得た。

#### (7) pAS2-1c SERCA1、pSRD SERCA1

<10>-(1)に記載した手法により得られた PCR 産物を NdeI、CIAP、Klenow fragment 処理した pAS2-1c とライゲーションし、pAS2-1c SERCA1 を得た。また、これを NdeI、Klenow fragment 処理して得られたインサートを、EcoRI、CIAP 処理した pSRD とライゲーションすることで pSRD SERCA1 を得た。

#### (8) pSRD FLAG-GMEB1

<10>-(2)に記載された手法により得られた PCR 産物を SpeI、XbaI 処理し、これを SpeI、XbaI で切断した pSRD FLAG とライゲーションした。

#### (9) pcDNA FLAG-HIBADH

<10>-(2)に記載された手法により得られた PCR 産物を BamHI、XhoI 処理し、これを BamHI、XhoI 処理した pcDNA FLAG とライゲーションした。

#### <12> MuRF1 KO マウスのジェノタイピング

MuRF1 KO マウスのジェノタイピングは、次の手順で行った。まず、マウスの尾の一部を切り取り 500  $\mu$ l の DNA 抽出緩衝液に加え、55°C で 3 時間以上振盪した。これに 50  $\mu$ l のフェノール-クロロホルム溶液を加え室温にて一晩転倒混和し、室温、20,000 $\times g$  で 5 分間遠心後、上清の一部をとり純水で 100 倍希釈し、PCR のテンプレートとした。<10>-(5)に記載されたプロトコルに従って PCR を行い、1%アガロースゲルによる電気泳動後によってその遺伝子型を確認した。WT マウスでは 580 bp のバンドのみ観察され、MuRF1 KO マウスでは 1380 bp のバンドのみが観察される。ヘテロマウスでは、この 2 本のバンドがどちらも観察される。

#### <13> タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

表に示した組成の分離用ゲル溶液を作製し、直ちに予め組み立てておいた SDS-PAGE 用硝子板に流し込み、続いて 2-プロパノールを重層した。アクリルアミドが固化した後、2-プロパノールを水洗により除き、次に濃縮用ゲル溶液を作製して分離ゲルの上に流し込み、コームを差してゲルを固化させた。泳動は SDS-PAGE 泳動緩衝液を用いて、濃縮ゲル中で 8-10 mA、分離ゲル中では 15-20 mA の定電流で行った。

(表)

以下は、ミニスラブゲル一枚当たりのゲルの組成を示した。

(分離用ゲル組成)	6%	8%	10%	12%	15%
40% ポリアクリルアミド溶液	0.9 ml	1.2 ml	1.5 ml	1.8 ml	2.25 ml
分離ゲル用緩衝液	1.5 ml				
純水	3.6 ml	3.3 ml	3.0 ml	2.7 ml	2.25 ml
10% APS 溶液	30 $\mu$ l				
TEMED	7.0 $\mu$ l				

(濃縮ゲル組成)	4%
40% ポリアクリルアミド溶液	0.4 mI
濃縮ゲル緩衝液	1.0 mI
純水	2.6 mI
10% APS 溶液	30 $\mu$ I
TEMED	5.0 $\mu$ I

#### <14> CBB 染色

泳動後、ウェスタンブロットを行う場合はブロットが終了してから、そうでない場合は泳動直後にゲルを純水で 10 分間×3 回ほど洗浄してから CBB 染色液に浸した。その後、室温で 60 分間以上振盪しながら染色した。染色後のゲルは純水でよく洗浄し、ゲル乾燥機で乾燥した。

#### <15> ウェスタンブロット

電気泳動の終了したゲルをセミドライ転写緩衝液に浸し、室温で 15~30 分間振盪した。同様に PVDF 膜、濾紙もセミドライ転写緩衝液で同じ時間振盪した。PVDF 膜は予めメタノールに 1~2 分間程浸してプレウェットिंगしておいた。ブロッティング操作はセミドライ方式のウェスタンブロット装置を用い、2 mA/cm<sup>2</sup> の定電流で 90 分間転写した。転写後の PVDF 膜はブロッキング溶液に浸して室温で 30 分間以上振盪してブロッキングした。ブロッキング後の PVDF 膜は一次抗体希釈液を浸して 4°C で一晩もしくは 37°C で 60 分間抗体反応させた。反応後の PVDF 膜を 7 分間 TPBS 中で振盪することを 3 回繰り返して、洗浄した。次いで、二次抗体希釈液に浸して室温で 30 分間反応させ、TPBS 中で 5 分間の洗浄を 5 回繰り返した後、POD immunostain set を用いて発色反応を行った。

#### <16> COS7 細胞の継代

60-90%コンフルエントになった細胞の培地をアスピレーターで吸引し、培地の約 1/3 量の PBS で洗浄した。洗浄後、PBS を吸引し、培地の約 1/10 量のトリプシン溶液を加えて 37°C、5 分間程度放置した。細胞がディッシュ表面から剥離したことを顕微鏡観察により確認後、培地をトリプシンに対し 10 倍量加え細胞懸濁した。その後、この 1/10~1/20 量の細胞懸濁液を予め DMEM を分注しておいた新しいディッシュに懸濁液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 中で培養した。

#### <17> COS7 細胞への遺伝子導入とタンパク質の発現

トリプシン処理によりディッシュより剥離した細胞を PBS で 1 回洗浄した後、1 × 10<sup>7</sup> cell/ml の濃度になるように K-PBS に懸濁した。この懸濁液 500  $\mu$ I にトランスフェクトする DNA 5~30  $\mu$ g を加えて混合し、専用のキュベット(Bio-Rad 社)に移して氷中に 10

分間放置した。次いで 220 V、960  $\mu$ F の条件で電圧をかけ、再び氷中に 10 分間静置した。この反応液に 500  $\mu$ l の血清を含まない DMEM を加えて懸濁し室温に 5 分間静置した後、予め 10 ml の培養液を入れた 10 cm ディッシュに分注し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 中で培養した。

#### <18> COS7 細胞を用いた免疫沈降実験

上記手法により COS7 細胞に遺伝子導入を行ってから 72 時間後、培地を 25  $\mu$ M の MG132 を含む培地に交換し、更に 2.5 時間培養を続けた。続いて、培地を除去し 5 ml の氷冷した PBS で細胞を 2 回洗浄した後、500  $\mu$ l の TNE\*緩衝液(TNE 緩衝液に 10  $\mu$ g/ml Aprotinin、0.1 mM PMSF、25  $\mu$ M MG132 を添加したもの)を用いて細胞を溶解させ、更に氷中にて超音波破碎(output 3、50%、20 回)を行った。この細胞破碎液を 20,000 $\times$ g、4°C、30 分間遠心した後、その上清を発現チェックおよび免疫沈降に供した。免疫沈降は、用いる抗体に応じて次のように行った。

抗 myc 抗体を用いた免疫沈降の場合、まず、得られた上清に対して 20  $\mu$ l の 50 (v/v) % protein G Sepharose 4 を加え、4°C で 1 時間転倒混和した。次いで、このサンプルを 20,000 $\times$ g、4°C で 10 秒間遠心した後、上清に対し 1/100 量の抗 myc 抗体を加え、4°C で 2 時間転倒混和した。その後、この溶液に対し 20  $\mu$ l の 50 (v/v) % protein G Sepharose 4 を加え更に 4°C で 1 時間、転倒混和した。この溶液を 20,000 $\times$ g、4°C、10 秒間の遠心と 1 ml の TNE 緩衝液による懸濁を 5 回繰り返すことで洗浄した後、沈降物に 15  $\mu$ l のサンプル緩衝液(2 $\times$  stock solution)を加え 95°C で 5 分間煮沸し、サンプルとした。

FLAG タグに対する免疫沈降の場合、上清に対し 20  $\mu$ l の 50 (v/v) % anti-FLAG (M2) agarose beads を加え 4°C にて 2 時間、転倒混和した。この溶液に対し 1 ml の TNE 緩衝液による洗浄を 5 回繰り返した後、沈降物に 30  $\mu$ l の 1 $\times$ 抗 FLAG 抗体免疫沈降用溶出緩衝液(100  $\mu$ g/ml)を加え、2~3 分毎に混和させながら氷上にて 30 分間反応させた。この溶液を 20,000 $\times$ g、4°C で 10 秒間遠心した後、その上清をサンプルとした。

なお、protein G Sepharose 4 および anti-FLAG (M2) agarose beads は、使用前に数回 TNE 緩衝液で洗浄した後、TNE 緩衝液で目的濃度に揃えた。

#### <19> COS7 細胞を用いた Ub 化アッセイ

<17>に記載した手法により COS7 細胞に遺伝子導入を行った。なお、Ub 化アッセイにおいては、細胞を半数ずつ、5 ml の培養液を加えた 60 mm ディッシュに播いた。72 時間後、培地を 25  $\mu$ M の MG132 を含む培地に交換し、更に 2.5 時間培養を続けた。続いて、培地を除去し 5 ml の氷冷した PBS で細胞を 2 回洗浄した後、変性用 TNE 緩衝液 200  $\mu$ l を用いて細胞を溶解した。この溶解液に対し超音波処理(output 3、50%)を、ピペッティングした際に粘性が観られなくなるまで行った。この液を 95°C で 5 分間煮沸し、4°C、20,000 $\times$ g、30 分間遠心した後、上清を発現チェックおよび免疫沈降に供した。免疫沈降は、この上清を TNE 緩衝液にて 10 倍希釈(SDS の終濃度が 0.1%になる)させた後に anti-FLAG

(M2) agarose beads を加え、以降は<18>に記載されたものと同様の手順にて行った。

## <20> GST pull-down アッセイ

### (1) GST タグ融合タンパク質発現大腸菌のグリセロールストック調整

発現コンストラクトを大腸菌 BL21 (DE3)株に形質転換し Amp を含む LB プレートでコロニーを形成させた。コロニーは Amp を含む LB 培地に懸濁させ、37°Cで一晩振盪培養した。その後、この培養液に 60%グリセロールを添加し最終濃度 40%とし、液体窒素中で急凍した後-80°Cにて保存した。

### (2) GST タグ融合タンパク質の発現

上記グリセロールストックを爪楊枝で少量掻き取り、Amp を含む LB 培地 10 ml(50 mlのチューブを使用)に懸濁後、37°Cで一晩振盪培養した。翌日、この培養液の一部を Amp を含む 50 mlの LB 培地中に加え、37°Cで振盪培養した。A<sub>600</sub>が 0.6-0.8 に達したところで終濃度 0.5 mM となるように IPTG を加え、18°Cで 5 時間誘導発現した。発現誘導した菌体は遠心回収したのち、氷冷した PBS 中で再懸濁することで洗浄した。洗浄後、菌体を再度遠心により回収し、使用時まで-80°Cにて保存した。使用時は、菌体を氷上にて解凍し、そこに 2.5 mlの PBS\* (PBS に 0.1 M PMSF、10 µg/ml Aprotinin を加えたもの) を加え懸濁後、超音波による破碎を行った。その後、破碎液に終濃度 1%となるように NP-40 を加え、氷上にて 30 分溶解をさせた後、4°C、20,000×g で 15 分間遠心して上清を回収した。次いで、得られた GST タグ融合タンパク質を下記の方法により精製した。

### (3) GST タグ融合タンパク質 の精製

上述した GST タグ融合タンパク質の粗抽出液に 50 µl の 50 (v/v) % Gluthatione Sepharose 4B を加え 4°Cにて 30 分穏やかに混和した。続いて、この溶液を 4°C、20,000×g、10 秒の遠心と PBS による懸濁を 5 回繰り返すことで洗浄した。次いで、この洗浄サンプルに対し等量の溶出緩衝液を添加し、氷上で 10 分間懸濁させた後、4°Cで 10 秒間、20,000×g の遠心を行い、その上清を回収した。この溶出緩衝液添加以降の一連の作業を 3 回繰り返すことでサンプルとした。サンプルの純度および濃度は、SDS-PAGE および RC DC Protein Assay により確認、決定した。濃度測定の標準物質には、牛血清アルブミンを用いた。

### (4) MuRF1 KO マウス骨格筋抽出液の調製

MuRF1 KO マウスの骨格筋抽出液の調製は次のように行った。まず MuRF1 KO マウス (8・10 週齢、♂)から腓腹筋(GC)を採取し液体窒素中で急凍することで凍結筋肉を得た。この凍結筋肉をクリオスタットで薄切し(20 µm×200 枚)、10 倍量の骨格筋抽出緩衝液を加え 4°Cで 1 時間転倒混和した。続いて、4°C、20,000×g で 20 分間遠心しその上清を回収する

ことで骨格筋抽出液とした。RC DC Protein Assay による濃度測定後、1 mg 分を以降の GST pull-down アッセイに供した。

#### (5) 骨格筋抽出液に対する GST pull-down アッセイ

まず、(4)にて調製した骨格筋抽出液 1 mg 分に対して 20  $\mu$ l の 50 (v/v) % Gluthatione Sepharose 4B (骨格筋抽出緩衝液中に懸濁されている)を加え骨格筋抽出緩衝液で 500  $\mu$ l に全量をそろえた後、4 $^{\circ}$ C で 1 時間転倒混和した。続いて、4  $^{\circ}$ C、500 $\times$ g で 5 分間遠心しその上清を回収することで Gluthatione Sepharose 4B に対する非特異的な結合タンパク質を除去した。この骨格筋抽出液に対して(3)で用意した 3  $\mu$ g の GST-MuRF1 もしくは GST を加え、4 $^{\circ}$ Cにて 3 時間転倒混和し、その後 10  $\mu$ l の 50 (v/v) % Gluthatione Sepharose 4B を加えさらに 30 分間転倒混和した。次いで、4 $^{\circ}$ C、500 $\times$ g、5 分間の遠心と骨格筋抽出緩衝液による洗浄を 5 回繰り返す、最終的に 10  $\mu$ l のサンプル緩衝液(2 $\times$ stock solution)を加え 95 $^{\circ}$ C で 5 分間煮ることによりサンプルとした。

#### (6) SDS-PAGE および銀染色

上記(3)にて調製されたサンプルを Perfect NT Gel 5-20% M サイズを用いて SDS-PAGE し、このゲルを Silver Staining kit, Protein を用いて銀染色した。銀染色は、Silver Stainind kit, Protein に添付されたプロトコルに従った。ただし、この際にグルタルアルデヒドは添加せずに行った。

#### (7) in gel digestion

(6)において MuRF1 に対する特異的な結合分子として観察されたバンドについて、ゲルからの切り出しおよび in gel digestion を行った。まず、バンド部分をカッターで切り取り、約 1 mm 角に刻みエッペンドルフチューブに入れ、そこに 0.1 ml の 15 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ /50mM  $Na_2S_2O_3$ を加え室温で 10 分振盪してから液を捨てた。その後 0.5 ml の純水を添加し室温で 15 分振盪する作業を 3 回繰り返した。次いで 0.1 ml の AcCN 中、室温で 5 分間の振盪を行った。この操作により乾燥したゲル片に対して 0.1 ml の 10 mM DTT/25 mM  $NH_4HCO_3$ を加え 56 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪し、その後 0.1 ml の 25 mM  $NH_4CO_3$ 中、室温 10 分間の振盪、0.1 ml の 55 mM iodoacetamide/25 mM  $NH_4HCO_3$ 中、室温 45 分間、遮光での振盪、0.1 ml の 25 mM  $NH_4CO_3$ 中、室温 10 分間の振盪をこの順に行った。さらに 0.2 ml の 50% AcCN/25 mM  $NH_4CO_3$ 中、室温 10 分の振盪を 2 回繰り返すことで脱水を行い(この作業で脱水が不十分な時はさらに 0.1 ml の AcCN を加えることで脱水操作を行った)、減圧遠心することで乾固させた。このゲル片に対して 10  $\mu$ g/ml の trypsin (50 mM  $NH_4CO_3$ 中に溶けている)をゲルが浸るくらいまで加え、氷上で 30 分静置してから余分な液を取り除き、50 mM  $NH_4CO_3$ を少量加え、37 $^{\circ}$ C のエアインキュベータにて一晩静置した。その後 0.1 ml の 5% TFA/50% AcCN を加え室温で 30 分振盪後、スピンドウンして上清を

新しいチューブに回収し減圧遠心により 5-10  $\mu$ l になるまで濃縮した。この濃縮液を以降の ZipTip 脱塩処理に用いた。

#### (8) ZipTip による脱塩処理

まず、10  $\mu$ l の 50% AcCN/0.1% TFA を数回ピペッティングすることで ZipTip の洗浄を行い、続いて 10  $\mu$ l の 0.1% TFA を 2 回ピペッティングし ZipTip の平衡化を行った。その後、(7)の操作で調整したサンプルを 8 回ほどピペッティングすることで ZipTip に吸着させ、10  $\mu$ l の 0.1% TFA を 3 回ピペッティングし ZipTip を洗浄後、3  $\mu$ l の 2.5 mg/ml CHCA/50% AcCN/0.1% TFA を 8 回ほどピペッティングしてサンプルの溶出を行った。このうち 1  $\mu$ l を MALDI plate にスポットし、風乾後、解析を行った。

### <21> 絶食実験、アミノ酸欠乏実験

#### (1) マウスの飼育

WT マウスおよび MuRF1 KO マウスともに、生後 7 週までは通常の飼育を行った。8 週目に、通常飼育コントロール(control)群と絶食(starved)群もしくはアミノ酸飢餓(-AA)群を設け実験を開始した。このうち、control 群は通常食および飲料水を自由に与えた。これに対し、starved 群は飲料水のみを、-AA 群は 10%グルコース水溶液と飲料水を自由に与えた。実験開始日を 0 日目とし、24 時間ごとに体重を測定した。アミノ酸飢餓実験の際は、-AA 群の 10%グルコース水溶液、飲料水の摂取量も計測した。

#### (2) マウスの解剖、血漿成分の採取

絶食実験での DNA マイクロアレイ解析の際には実験開始から 2 日目のマウスを、-AA 実験での血漿中のアミノ酸濃度測定の際には実験開始から 7 日目のマウスを使用した。麻酔にはジエチルエーテルを用いた。ジエチルエーテルによる麻酔後、マウスの手足を固定し仰向けにさせ、予めヘパリン処理しておいた注射針を用いて心臓採血を行った。採取した血液をすぐに 9,200 $\times$ g、5 分間の遠心につけ、その上清を回収することで血漿成分を得た。血漿成分は液体窒素により急凍し、成分検査に用いるまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。成分検査は SRL (株)に依頼した。

解剖は心臓採血後、ただちに行った。両足から前脛骨筋(TA)、腓腹筋(GC)、ヒラメ筋(SOL)および大腿四頭筋(Q)を、さらに心臓および肝臓を採取した。これらの重量を測定後、ドラガントゴムに包埋し、液体窒素にて冷却したイソペンタン中に浸すことで空気を除去し、次いで液体窒素に浸すことで急凍した。また、TA、GC、SOL および Q については、RNA 採取用として片足分は包埋せずにそのまま液体窒素により急凍した。

### <22> 組織染色

上述した方法により採取した凍結筋肉(TA)を用いて HE 染色を行った。HE 染色は次の手

順で行った。まず、クリオスタットを用いて凍結切片を薄切し(10  $\mu\text{m}$ )、スライドガラスに貼り付け、その切片を取り囲むように Liquid Blocker で縁を描き、切片上にマイヤーヘマトキシリンを垂らし室温にて 15 分静置した。その後、弱流水によるマイヤーヘマトキシリンの洗浄を 15 分ほど行い、更に 1%エオシンを同様に切片上に載せて室温で 3 分ほど静置した。エオシンの除去はスライドガラスを水中に数回軽くくぐらせることで行い、その後このスライドガラスを 50%エタノール、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、100%エタノール、キシレンの中にこの順で(最後のキシレンは 2 回) 15 秒ずつくぐらせることで脱水を行った。脱水後、スライドガラス上に Mount-Quick を垂らし、気泡が入らないようにカバーガラスを載せ、乾燥後顕微鏡による観察を行った。筋線維断面積の計測は、ある視野内の筋線維数を求め、視野の面積を筋線維数で割ることにより求めた。これを 1 匹のマウスにつき 4 つの視野で行い、その平均値をそのマウスの筋線維断面積とした。

### <23> DNA マイクロアレイ解析

#### (1) total RNA の抽出

上述した方法により採取した凍結筋肉(TA、GC、SOL、Q)から TRIzol Reagent を用いて total RNA を抽出した。まず、凍結筋肉に対してその 10 倍量の TRIzol Reagent を加え、ハンドホモジナイザー(ジェネレーター G-1010、30,000 rpm)を用いて完全に破碎し室温にて 5 分間静置した。その後、4°C、20,000 $\times g$  で 10 分間遠心し上清を回収後、上清に対して用いた TRIzol Reagent の 0.2 倍量の 2-プロパノールを加え激しく混和し、室温で 3 分間静置した。この溶液を 4°C、20,000 $\times g$  にて 15 分間遠心し、回収した上清に対して 2-プロパノール沈殿、75%エタノールによる洗浄を行い、最終的に 50  $\mu\text{l}$  の DEPC 水に溶解した。

#### (2) total RNA の精製

上記(1)にて抽出した total RNA の 15  $\mu\text{l}$  分を、RNeasy mini kit および DNase I set を用いて精製した。手順は、添付されたプロトコルに従った。精製度は、0.3  $\mu\text{g}$  分を電気泳動することで確認した。

#### (3) cDNA の合成

まず、上記(2)により得られた精製 RNA を全量フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿し、得られた沈殿物を 1 mg/ml の濃度になるように DEPC 水に溶解した。これの 2 mg 分を鋳型に、One-Cycle cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。手順は添付されたプロトコルに従った。

#### (4) cDNA の精製

上記(3)により得られた cDNA を、Sample Cleanup Module を用いて精製した。手順は添付されたプロトコルに従った。ここで得られたサンプルは、以降のステップに進むまで

-20°Cにて保存した。

#### (5) ビオチン化 cRNA の合成、断片化

上記(4)により得られた cDNA の全量を鋳型に、Gene Chip IVT Labeling Kit を用いてビオチン化 cRNA を合成した。手順は、添付されたプロトコルに従った。得られたサンプルを 140 倍希釈して濃度を測定し、また、1 µg 分を電気泳動して確認した。断片化は、このうちの 20 µg 分を用いて行った。

#### (6) cRNA のハイブリダイゼーション、データの取り込み、解析

上記(5)により得られた断片化 cRNA の 15 µg をハイブリダイゼーションに用いた。手順は Affymetrix 社のプロトコルに従った。データの取り込みは、GeneChip Scanner 3000 および GeneChip Operating Software (GCOS) を用いて行った。得られたデータは、全プローブのシグナル値を基に正規化した。

### <24> RT-PCR による遺伝子発現変化の確認

#### (1) total RNA の抽出

total RNA の抽出は、上記<23>-(1)に従った。

#### (2) 一本鎖 cDNA の合成

抽出した total RNA を鋳型に、First-Strand cDNA synthesis kit を用いて次の手順で一本鎖 cDNA の合成を行った。まず、total RNA 3 µg 分に DEPC 水を合計 20 µl になるように加え、65°C で 10 分間の熱処理後直ちに氷上に移し、しばらく静置した。この溶液を First-Strand cDNA synthesis kit に添付された Bulk first strand reaction mix 11 µl と DTT 溶液 1 µl、NotI-d(T)18 プライマー 0.2 µg (1 µl となるように適宜希釈して用いた) の混合溶液に加え、37°C にて 1 時間静置後、90°C で 5 分間熱処理をし、その後直ちに氷上に移しサンプルとした。

#### (3) RT-PCR

RT-PCR の反応組成および反応条件は<10>の(6) RT-PCR の欄に記載した。用いる温度は、標準遺伝子 *CAPN1* がどのサンプルでも同程度増幅されることを確認して、(2) により合成した一本鎖 cDNA をそのまま用いた。

### <25> クレアチンキナーゼ活性測定

<21> により用意されたマウス凍結筋肉をクリオスタットにより薄切し(20 µm×10 枚)、その 1,000 倍量のクレアチンキナーゼ抽出緩衝液を加えハンドホモジナイザーによりホモジナイズした(ジェネレーター G-1010、10,000 rpm)。このうち 50 µl をとり、1 ml のクレ

アチンキナーゼ活性測定緩衝液中に加え、25°Cで20分間静置後、直ちに340 nmの吸光度(A<sub>340</sub>)を測定した。クレアチンキナーゼの活性により生じたATPを利用して、活性測定緩衝液中のhexokinaseおよびglucose-6-phosphate dehydrogenaseがNADPからNADPHを生成する。このNADPHによるA<sub>340</sub>を測定することにより、クレアチンキナーゼの活性を測定している(92)。また、ホモジネートの一部を用いてRC DC protein assayを行うことで活性測定緩衝液に加えられたタンパク質量を求めた。クレアチンキナーゼの活性量は、A<sub>340</sub>値を活性測定緩衝液に加えられたタンパク質量(mg)および反応時間(分)で割ることにより表した。

#### <26> 筋タンパク質合成量の測定

筋タンパク質合成量の測定では、実験開始から48時間後にマウスの腹腔内に体重100 g当たり50 μmolの重水素ラベルされたフェニルアラニンD5-Fを投与した。これらのマウスをその後更に48時間飼育し、実験開始から4日目の時点でこれらのマウスを解剖に供した。得られた骨格筋(大腿四頭筋、Q)を8倍量の90 mM perchloric acid (PCA)中でホモジナイザーにより破碎した。この破碎液を遠心し、沈殿画分を4倍量の0.2 M PCAで洗浄した。その後沈殿画分を0.3 MのNaOHで懸濁し、37°Cで2時間反応させ溶解させた。続いて、一晩、4°C、2 MのPCA中で反応させることで、タンパク質画分を沈殿させた。このタンパク質の沈殿画分を6 MのHCl中、110°C、24時間反応させ、加水分解させた。HClを蒸発させ、H<sub>2</sub>Oにより再度溶解させた後、この溶液を陽イオン交換カラムにかけた。4 MのNH<sub>4</sub>OHによりペプチドをカラムから溶出させ乾固させた後に、70:30:1=メタノール:H<sub>2</sub>O:TFAの混合溶液中で再度の溶解を行った。このサンプル中のD5-Fとフェニルアラニンの相対量を質量分析法により測定し、筋タンパク質合成量を解析した。

## 第 1 章 MuRF1 の分子レベルでの機能解析

## 結果

### 1-1. 相互作用分子の同定

本研究を開始した当初、酵母 Two Hybrid 法により MuRF1 相互作用分子として SUMO 修飾系関連分子である UBC9 が同定されていた。そのため、MuRF1 が SUMO1 化修飾を受け機能制御を受ける可能性が考えられていたものの、培養細胞を用いた系では MuRF1 の SUMO 化修飾は観察されなかった。また、仮に MuRF1 が SUMO1 化修飾による機能制御を受けたとしても、そもそも MuRF1 がどのような分子に対して作用しているのかについては手がかりがほとんどなかった。そこで、本研究では、新たな MuRF1 相互作用分子の同定を次のような手法により試みた。

まず、MuRF1 KO マウスの骨格筋抽出液に対し、大腸菌で発現、精製した GST-MuRF1 を bait として加えた。この混合液に対し GST pull-down アッセイを行い、沈降物を SDS-PAGE により分離後、銀染色を行った。何度か試行を繰り返し、共通して MuRF1 と共沈してくるバンドが確認された(図 1-1)。そこで、これらをゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化ののち、質量分析法によりタンパク質の同定を試みた。その結果、図中、バンド 1 が SERCA1 (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1)、バンド 3 が M-CK (Creatine kinase muscle-type) と同定された。バンド 2 については同定することはできなかった。

#### 1-1-1. SERCA1

SERCA は、小胞体膜上に存在する 10 回膜貫通型の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送 ATPase である。細胞質側からの  $\text{Ca}^{2+}$  の結合により活性化し、ATP の加水分解に伴い  $\text{Ca}^{2+}$  を小胞体内へ取り込む機能を有する(図 1-2) (93)。SERCA は発現組織により異なる 3 つの遺伝子にコードされている。このうち、SERCA1 が主に骨格筋、SERCA2 が主に心筋、SERCA3 が主に非筋細胞で発現しており、これらはさらにそれぞれいくつかのスプライスバリエントを有している(94)。分子量は約 110 kDa であり、これは SDS-PAGE 上の分子量とも一致していた。

$\text{Ca}^{2+}$  は細胞内の様々なシグナル伝達に関与するが、筋細胞の場合、特に筋収縮を制御するという点でも重要である。筋細胞の収縮は、神経細胞の興奮が T 管(筋細胞膜の一部が細胞内部にくびれ込んだ膜上の構造体で、筋小胞体膜近傍まで伸びている)上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル、DHPR (Dihydropyridine Receptor) および筋小胞体膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル、リアノジン受容体(Ryanodine Receptor)の活性化へと変換されることで引き起こされる。これにより  $\text{Ca}^{2+}$  が筋細胞外や筋小胞体内から筋細胞質中へと流入し、細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。その結果、アクチンとミオシンの相互作用が可能となり、筋収縮が起こる。逆に、神経の興奮が収まると、SERCA が  $\text{Ca}^{2+}$  を筋小胞体内へと取り込み、筋肉が弛緩する(図 1-2) (1)。こ

のような収縮メカニズムに対し、SERCA による  $\text{Ca}^{2+}$  の筋小胞体への取り込みは、筋収縮後に細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を下げ筋肉の緊張を弛緩させること、筋小胞体内に一定量の  $\text{Ca}^{2+}$  を保持し連続的な収縮に対する  $\text{Ca}^{2+}$  の供給源を確保しておくこと、という 2 点で機能している(94)。筋小胞体は筋原線維を取り囲むように発達しており、SERCA1 と MuRF1 の局在は矛盾しないと考えられる。

### 1-1-2. M-CK

CK (Creatine Kinase) (EC2.7.3.2)は、次のような反応を両方向に触媒する酵素であり、ATP の産生と貯蔵に重要である(図 1-3)。



CK は、単量体が 2 つ集まり二量体を形成して機能している。単量体には筋型(M-CK)と脳型(B-CK)の 2 種類が存在し、どちらも分子量は約 43 kDa である。これらが、骨格筋では MM、心筋では MB、その他の組織では BB というように、組織により異なる二量体を形成している。また、ミトコンドリアにも 2 種類のタイプ、組織普遍型と筋型の CK が存在しており(総称して mt-CK)、これらは 2 量体、あるいは 8 量体として機能している(95)。各単量体は、N 末端側の  $\alpha$ ヘリックスのみからなる小さなドメイン(約 100 残基)と C 末端側の大きな活性中心ドメイン(約 250 残基)の 2 つのドメインから成る、ATP-グアニジンリン酸転移酵素ファミリーに共通した構造をとる(図 1-3) (96)。

CK による ATP の産生反応は可逆的であるものの、生体内、特に骨格筋の様に大量の ATP を消費する組織中では次の方向に反応が進んでいると考えられている。まず、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化や解糖系酵素の作用で ATP が産生される。この ATP から、mt-CK や解糖系酵素の近傍に位置する M-CK の作用でホスホクレアチンと ADP が作られる。その後、ホスホクレアチンは ATP の消費場所に運ばれ、M-CK の作用により ATP とクレアチンに変換され、ATP が消費される(図 1-3) (97)。M-CK は筋細胞質中の主要なタンパク質であるが、大量の ATP を必要とする部位、つまり、 $\text{Ca}^{2+}$  輸送 ATPase (SERCA)のある筋小胞体膜上や、ミオシン ATPase 近傍のサルコメアの M 線に多く存在している。このことから、M-CK は MuRF1 と生体内においても相互作用しうると考えられる(98)。

### 1-2. MuRF1 の相互作用分子に対する解析

このように、GST pull-down 法と質量分析法により、MuRF1 の相互作用分子として 2 つ

の分子が同定された。これらは  $\text{Ca}^{2+}$  濃度制御と ATP の供給という筋収縮過程に関わる重要な分子である。また、M-CK の KO マウスの筋細胞で SERCA による  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み能に低下が観られるように、両者の間では ATP の産生と消費を介して機能的相互作用がある(99)。そこで、これらの分子に対する MuRF1 の相互作用は生理的に意味があると考え、両者に対して解析を試みた。しかし、SERCA1 については培養細胞に遺伝子導入を試みたが発現が観察されず、野性型(WT)マウスおよび MuRF1 KO マウスの筋組織サンプルに対し抗 SERCA1 抗体を用いたウエスタンブロット解析によっても差異が観られなかった(data not shown)。そこで、以降の解析は M-CK に対象を絞って行った。

### 1-2-1. MuRF1 と M-CK の相互作用部位の同定

まず、MuRF1 と M-CK の相互作用を生細胞内においても確認するため、COS7 細胞に myc-MuRF1 および FLAG-M-CK を共発現させ、抗 myc-抗体による免疫沈降を行った。その結果、培養細胞内においても両者の結合が観察された(図 1-4B、レーン 7)。同様の解析を MuRF2 および MuRF3 を用いて行ったところ、MuRF3 と M-CK との結合は観察されたが、MuRF2 と M-CK の結合はこの条件下では観察されなかった(図 1-4B、レーン 8、9)。

生細胞内での MuRF1 と M-CK の結合が観察出来たことから、続いて、MuRF1 の様々な欠失変異体を用いて MuRF1 の相互作用部位の同定を試みた。その結果、MuRF1 の B-box ドメインのみを欠いた変異体( $\Delta$ B-box)では結合が観察されなかったが、B-box ドメインのみのコンストラクト(MuRF1-B-box)では結合が観察された(図 1-5B、レーン 16、20)。このことから、MuRF1 は少なくとも B-box ドメインを結合サイトの一つとして M-CK に結合していると考えられた。RBCC/Trim タンパク質の B-box ドメインが基質との結合に関与する例は他にも知られている(100-102)。また、最近、MuRF1 が B-box と Coiled-Coil 領域を介していくつかの分子と結合することも示されている(39)。MuRF ファミリー内の B-box ドメインの相同性を比較すると、MuRF2 の MuRF1 に対する相同性は MuRF3 と MuRF1 のものよりも若干低くなっている。免疫沈降実験において MuRF1 の結合能が最も高く、次いで MuRF3 が結合し、MuRF2 に関しては結合が観察されなかったのは、このことを反映しているかもしれない(図 1-4B、レーン 8、9)。また、後に詳述するが、MuRF1 と M-CK の結合は他のグループも同時期に見出しており、それによると MuRF1 は酸化型の M-CK とのみ結合し、生体の中で大部分を占めている還元型の M-CK とは結合を示さない(103)。本解析において MuRF1 と M-CK の結合が弱いのは、このためと考えられる。

### 1-2-2. M-CK に対する MuRFs の Ub-E3 活性

続いて、MuRF1 が Ub-E3 活性を有することから、MuRF1 が M-CK に対して Ub-E3 として機能するかを、COS7 細胞を用いた共発現実験により解析した。myc-MuRF1、FLAG-M-CK に加え HA-Ub を COS7 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体により M-CK を免疫沈降した後、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体により M-CK の Ub 化を観察した。なお、この際、自己 Ub 化した MuRF1 も共沈してくるのを防ぐため、免疫沈降は変性条件下において行った。その結果、MuRF1 存在下、プロテアソーム阻害剤である MG132 処理を施すと M-CK が Ub 化されているのが観察された(図 1-6、レーン 9)。一方、RING 型 E3 が機能するのに必要な RING-Finger ドメインを欠いたコンストラクト(MuRF1  $\Delta$ RING)を用いた場合、M-CK の Ub 化は観察されなかった(図 1-6、レーン 10)。このことから、MuRF1 は RING-Finger ドメイン依存的に M-CK を Ub 化し分解に導いていると考えられた。MuRF2 および MuRF3 も M-CK に対して Ub-E3 として機能するかを解析したところ、両者ともに M-CK に対する Ub-E3 として機能することが観察された(図 1-6、レーン 11、12)。MuRF3 を用いた場合、MG132 処理を行わなくても Ub 化した M-CK が観察されており、興味深い(図 1-6、レーン 6)。この生理的意義については今後の更なる解析が必要であるが、総合討論においても議論した。

### 1-3. MuRF1 の GMEB1、HIBADH に対する作用

本研究により GST pull-down 法および質量分析法を用いて MuRF1 の相互作用分子を同定する一方で、共同研究者らにより酵母 Two Hybrid 法を用いた MuRF1 相互作用分子の探索も進められた。この解析により、MuRF1 がいくつかの筋原線維構成タンパク質に加え、代謝酵素や転写調節因子、翻訳関連因子と相互作用することが明らかとなった(表 1)。その中で、本研究では GMEB1 および HIBADH (3-Hydroxyisobutyric acid dehydrogenase) に注目して解析を行った。その理由は、以下に述べた理由から、これらに対する結合に生理的に重要な意義が考えられたからである。

#### 1-3-1. MuRF1 の GMEB1 に対する作用

GMEB1 は、ステロイドホルモンの一種、グルココルチコイドによる転写調節に関与する転写調節因子で、その相同分子 GMEB2 と複合体を形成してグルココルチコイド調節配列(GME (Glucocorticoid modulatory element))に結合する。GME はグルココルチコイド応答配列(GRE (Glucocorticoid response element))の上流側に位置する 21 塩基からなる特有の塩基配列である(104)。GME へ結合した GMEB1、GMEB2 複合体は更にグルココルチコイド受容体(GR)や転写因子と複合体を形成することで、グルココルチコイドに対する標的遺

伝子の応答性を制御していると考えられている(105)。GMEB1のDNA結合はN末端側に存在するKDWKドメインを介している。KDWKドメインはいくつかの転写調節因子に共通して含まれるKDWKという保存された配列を有するドメインで、SANDドメイン(転写調節因子Sp100、AIRE1、NucP41/75、DEAF1に由来)とも呼ばれている。この他、Ser/Thrに富んだ領域、Glnに富んだ領域を各2カ所、また、C末端領域にはCoiled-Coilと推定される領域を有している(図1-7A)(106-109)。

グルココルチコイドは糖新生を促進させる効果を持つホルモンであり、骨格筋に対しては筋萎縮を誘導させる。そして、この筋萎縮誘導はMuRF1の発現上昇を介することが知られている(28)。このことから、GMEB1はMuRF1と機能的に相互作用することが予想された。そこで、M-CKでの解析と同様に、FLAG-GMEB1をmyc-MuRF1およびHA-UbとともにCOS7細胞に共発現させ、そのUb化を解析した。その結果、MG132存在下、MuRF1依存的にGMEB1のUb化が昂進するのが観察された(図1-7B、レーン5)。このことから、MuRF1がGMEB1に対してもUb-E3として機能し、分解へと導いていると考えられた。

### 1-3-2. MuRF1のHIBADHに対する作用

HIBADHは、Valの代謝中間物、HIBA(3-Hydroxyisobutyric acid)をMMS(Methylmalonate semialdehyde)へと変換する脱水素酵素である(図1-9)。N末端側のヌクレオチド結合に必要なドメインIとC末端側のドメインIIから構成され、4量体で機能することが推測されている(図1-8A)(110)。

HIBADHの反応産物MMSはその後ミトコンドリアでプロピニルCoA、スクシニルCoAへと変換されていき、代謝される(図1-9)。一方、HIBAは脂質二重膜に対する透過能が他のVal代謝中間産物に比べ高い物質である。そのため、HIBAは末梢器官から放出され肝臓に取り込まれ糖新生に利用されるValの代謝中間物の中でも重要な物質であり、HIBADHもValの代謝制御の中心的な酵素である(111)。また、骨格筋中では、分岐鎖アミノ酸であるValやLeu、Ileに対する代謝が盛んに行われている(1,112)。そのため、MuRF1がHIBADHに対し何らかの作用を示せば、筋細胞の代謝制御に大きな意味を持つと考えられる。そこで、HIBADHに対してもMuRF1がUb-E3として機能するか、COS7細胞を用いた同様の系により解析した。その結果、HIBADHもMG132存在下、MuRF1依存的にUb化されているのが観察された(図1-8B、レーン5)。このことから、MuRF1がHIBADHに対してもUb-E3として機能し分解へと導いていることがわかった。

## 考察

### 1-4-1. MuRF1 の M-CK に対する作用

まず、MuRF1 が M-CK を分解制御する生理的意義について考察する。

MuRF1 の発現は、絶食時や糖尿病(84)、敗血症(113)あるいはグルココルチコイド(28)やリポ多糖投与による炎症誘導(114)などにより上昇する。また、その発現調節機構についても分子レベルでの解析が進められており、IGF-1/PI3K/Akt 経路の活性化を介して FoxO の働きが抑制されることにより MuRF1 の発現が抑えられ(41,115)、炎症反応を誘導する NF- $\kappa$ B 経路や TNF $\alpha$ 、p38 MAPK 経路を介して発現が誘導される(42,91)。つまり、MuRF1 は生体がエネルギー源やアミノ酸源の不足に直面している際に発現誘導されると考えられる。このような条件下では、生体は骨格筋や肝臓など自分自身の一部を削り、脳のように定常的に多くのエネルギーやアミノ酸を必要とする臓器にそれを供給することでこの危機を乗り越えることになる。このことから、MuRF1 も骨格筋内でのエネルギー消費、アミノ酸消費を抑える方向に機能していると思われる。

M-CK は、生体内では主に ATP を産生する方向に働いている。このことから、原理的には、MuRF1 の発現誘導に伴い M-CK が分解されれば、筋細胞内の ATP 消費は抑えられると考えられる。

MuRF1 の M-CK に対する作用は他のグループも同時期に見出している。それによると、MuRF1 は酸化型の M-CK にのみ作用し、この酸化型は還元型に比べ活性が低下しているという(103)。また、M-CK の酸化型と還元型の変換は可逆的で、生体内では M-CK の全体量に対し酸化型 M-CK の占める割合はごく一部である(116)。本研究の COS7 細胞を用いた Ub 化実験で、MuRF1 により Ub 化されている M-CK が少量なのは、細胞内では M-CK の酸化型が少ないことを反映していると考えられる。

ここで、細胞内で MuRF1 が活性の低下している一部の M-CK のみを選択的に分解する意味としては次のような可能性が考えられる。筋細胞にとって、M-CK により産生される ATP は、筋収縮や弛緩の際にミオシン ATPase や SERCA へのエネルギー源として非常に重要である。例えば M-CK の KO マウス筋組織を用いた解析では、短時間の高頻度な電気刺激に対し急速な張力の低下が観察されている(117-119)。このことは、咄嗟の動きを要求される場面での能力が低下していることを意味する。もし、MuRF1 が M-CK を無条件に Ub 化していたら、異化的な条件下では発現誘導されている MuRF1 により M-CK の量の大幅な減少を招き、瞬時の運動能力が低下する危険性が考えられる。生体は低栄養時に無駄なエネルギー消費を抑える必要があるとはいえ、餌を見つけた時、あるいは逆に捕食者との遭遇などの危険が迫った際には素早く動かなければならない。MuRF1 が M-CK のうち一部の酸化型のみを Ub 化するのは、筋細胞内の ATP 産生を抑え、なお且つ、運動能力が極端に低下するのを防ぐための制御機構かもしれない。

## 1-4-2. GMEB1 に対する作用

MuRF1 が転写調節因子 GMEB1 を Ub 化し分解へと導いたことから、MuRF1 が転写制御に関わることが予想される。GMEB1 の結合配列である GME は標的遺伝子のグルコルチコイドに対する応答性を高めるとされている(104,105)。現在、GMEB 複合体と GME による制御を受ける遺伝子としては、TAT (Tyrosine Aminotransferase)が知られている。本研究では、次章で述べるように、二日間の絶食飼育により MuRF1 の発現を誘導した条件下で WT マウスと MuRF1 KO マウスの骨格筋 RNA サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行っているが、TAT 遺伝子の発現量に WT マウスと MuRF1 KO マウスの間で変化は見られなかった(表 2-1)。

GMEB1 の作用機序については報告が限られており、未だ不明な点が多い。例えば、培養細胞でレポーター遺伝子を用いた解析では、GMEB1 を遺伝子導入により過剰発現させるとレポーター遺伝子の応答性が低くなっている。しかし、この結果は、単純に GMEB1 が応答抑制に働いたのではなく、GMEB1 の過剰発現により GR などの存在量が少ない因子が奪われてしまった結果と捉えられている(109)。また、GMEB1 は GMEB2、GME、GR などと複合体を作ると予想されているが、この複合体の構成因子についても不明な点が多い(105,120)。そのため、現時点では MuRF1 による GMEB1 の分解制御が標的遺伝子の応答性を正・負どちらに制御しているのかは予想できない。むしろ、グルコルチコイド刺激が筋萎縮誘導刺激の一つとして MuRF1 の発現も誘導することを考えると、MuRF1 による GMEB1 の分解は、ある時には正的作用として筋萎縮シグナルをより増強し、ある時には、負のフィードバック効果により過度の筋萎縮誘導を防ぐ、などの複雑な制御効果をもたらす可能性が考えられる。今後、GMEB1 による転写制御の仕組みが明らかになれば、その知見をマイクロアレイデータなどと照らし合わせることで、MuRF1 の転写制御系への関与が明らかになると考えられる。

また、GMEB1 が転写調節を行う際の複合体中には、MuRF1 と相互作用する UBC9 が含まれていることも知られている(120)。果たして MuRF1 が GMEB1、UBC9 と複合体を形成して機能しているのか、興味深い点である。

一方、GMEB1 の転写制御とは全く異なる機能も報告されている(108,121,122)。これらの報告によれば、GMEB1 は核内のみならず細胞質にも存在し、カスパーゼ-2、-8、-9 の前駆体に結合し、これらが活性化するのを阻害している。その結果、GMEB1 は TNF $\alpha$ 刺激や酸化ストレスによるカスパーゼを介したアポトーシスを抑制していると考えられている(121,122)。カスパーゼはアクチンの部分的切断を介して筋萎縮誘導に関与しているとも考えられている(83)。このことから、MuRF1 は GMEB1 の分解制御によりカスパーゼの活性化、更には筋タンパク質分解量の増加を引き起こしている可能性もあり、この点についても今後の解析が必要であると思われる。

### 1-4-3. HIBADH に対する作用

MuRF1 が HIBADH を分解制御する意義について考察する前に、まず、Val を含む分岐鎖アミノ酸(Val および Leu、Ile)の筋細胞内における代謝経路について簡単にまとめてみたい (図 1-9)。

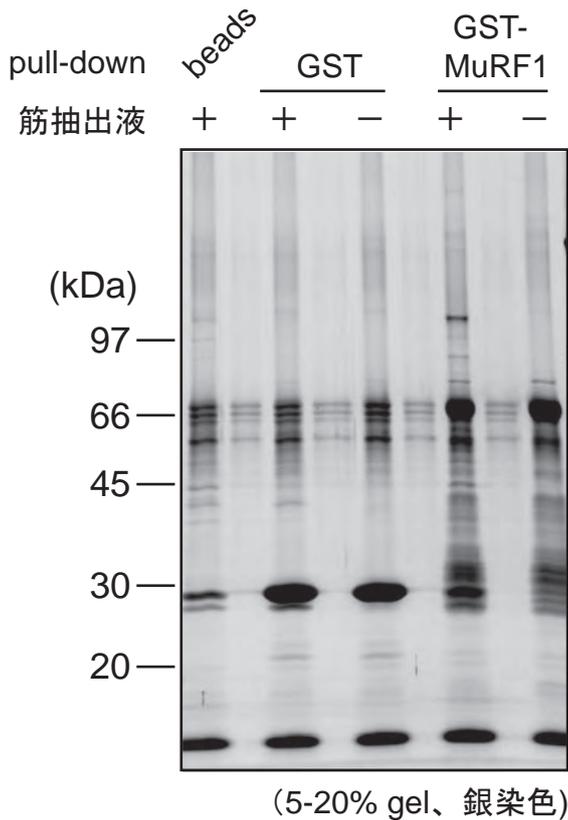
分岐鎖アミノ酸は筋細胞内で積極的に代謝されている。その第一段階は筋細胞内に過剰量存在する分岐アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用であり、分岐鎖アミノ酸は $\alpha$ -ケト酸へと変換される。生じた $\alpha$ -ケト酸はその後、 $\alpha$ -ケト酸デヒドロゲナーゼ、アシル CoA デヒドロゲナーゼの作用を受ける。この最初の 3 段階の代謝過程は分岐鎖アミノ酸 3 種の間で共通であり、 $\alpha$ -ケト酸デヒドロゲナーゼが不可逆かつ律速反応である(123)。この一連の過程により生じた代謝中間物は、その後、各アミノ酸の炭素骨格に応じた代謝経路を進んでいく。結果として Leu はアセチル CoA を、Val はスクシニル CoA を、Ile はアセチル CoA とスクシニル CoA を生じる。このうち、アセチル CoA はトリカルボン酸回路(TCA 回路)で酸化されエネルギー源となる。これに対し、TCA 回路の中間体であるスクシニル CoA は TCA 回路から 2-オキシグルタル酸となり、Glu や Gln へと変換されている。つまり、Leu は脱アミノされたあと筋細胞内の主要なエネルギー源として酸化されるのに対し、Val、Ile の一部は Glu、Gln へと変換され、残りはそのままの形やスクシニル CoA への変換過程への中間体として血中に放出され、他の器官で利用されている(1,124)。

この一連の代謝過程の中で、Val の代謝には、他の分岐鎖アミノ酸の代謝過程と異なり、途中で CoA 基を有さない化合物 HIBA が生成するという特徴がある。CoA 基がない HIBA は Val の代謝過程では最も脂質二重膜の透過性が高く一番血中へと放出されやすい物質であり、末梢器官から肝臓へと移行する重要な糖新生の原料であるとされている(111)。実際、肝臓や腎臓は HIBA を取り込み糖新生に利用しており(111)、脂肪酸(octanoate)処理して $\alpha$ -ケト酸デヒドロゲナーゼを活性化した骨格筋からは HIBA の放出量が増加することが観察されている(125)。この HIBA が細胞内で代謝されるか、細胞外へと放出されるかは HIBA と HIBADH の量に依存するとされており、HIBADH は Val 代謝の最も重要な酵素の一つである。

ここで、飢餓やグルココルチコイド刺激、敗血症、サイトカインによる炎症誘導など、MuRF1 の発現が誘導されるような異化的な条件下における代謝について考えてみたい。このような条件下では、肝臓では糖新生が促進され、骨格筋では MuRF1 や atrogen-1 の発現量が増加し、筋タンパク質の分解が昂進する。また、骨格筋では $\alpha$ -ケト酸デヒドロゲナーゼも異化的な条件下で活性化されることが知られている(126)。つまり、異化的な条件下では、骨格筋から筋タンパク質分解により多くのアミノ酸が生じ全身で利用されるとともに、生じた分岐鎖アミノ酸については、活性化された $\alpha$ -ケト酸デヒドロゲナーゼの作用により筋細胞内で積極的に代謝されるようになる。

以上のことから、MuRF1 による HIBADH の分解制御は異化的な条件下での HIBADH

量の減少を引き起こし、結果として筋細胞からより多くの HIBA を放出させることにつながると思われる。Val が更に代謝されていくことで生じる 2-オキソグルタル酸は、分岐鎖アミノ酸の代謝過程の第一段階、脱アミノ反応の際のアミノ基の受け手であり、2-オキソグルタル酸の変換により得られる Gln も腸細胞や免疫系細胞には重要なエネルギー源として利用されている(123,127)。そのため、MuRF1 による HIBADH の分解が HIBA の筋細胞外への放出量を増加させた場合、それが生体にどのような効果をもたらすかについては一概に推察できない。しかし、少なくともこの結果から、HIBADH の分解を介して MuRF1 が Val の代謝制御に関与していると考えられた。また、MuRF1 が骨格筋からの HIBA の放出量を増加させ、異化的な条件下での糖新生の制御に関与している可能性も示されたといえる。



MuRF1 KO マウス筋抽出液  
↓  
+ GST-MuRF1  
インキュベート  
↓  
+ glutathione beads  
インキュベート  
↓  
wash  
↓  
ppt + SDS-sample buffer  
↓  
SDS-PAGE  
↓  
ゲルから切り出し、ゲル内消化  
↓  
MALDI-TOF/TOF

### MALDI-TOF/TOF結果

- バンド 1 : SERCA1 (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 1)
- バンド 2 : 同定できず
- バンド 3 : M-CK (Creatine Kinase muscle-type)

図1-1 MuRF1相互作用分子の同定

MuRF1 KOマウスの筋抽出液に対してGST-MuRF1をbaitにしたGST pull-downアッセイを行った。共沈物をSDS-PAGEにより分離後、銀染色した。これにより得られたバンド1、2、3をゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内消化後、MALDI-TOF/TOF解析によりMuRF1と相互作用する分子の同定を行った。その結果、バンド1とバンド3からそれぞれSERCA1 (110kDa) および M-CK (43kDa) が同定された。

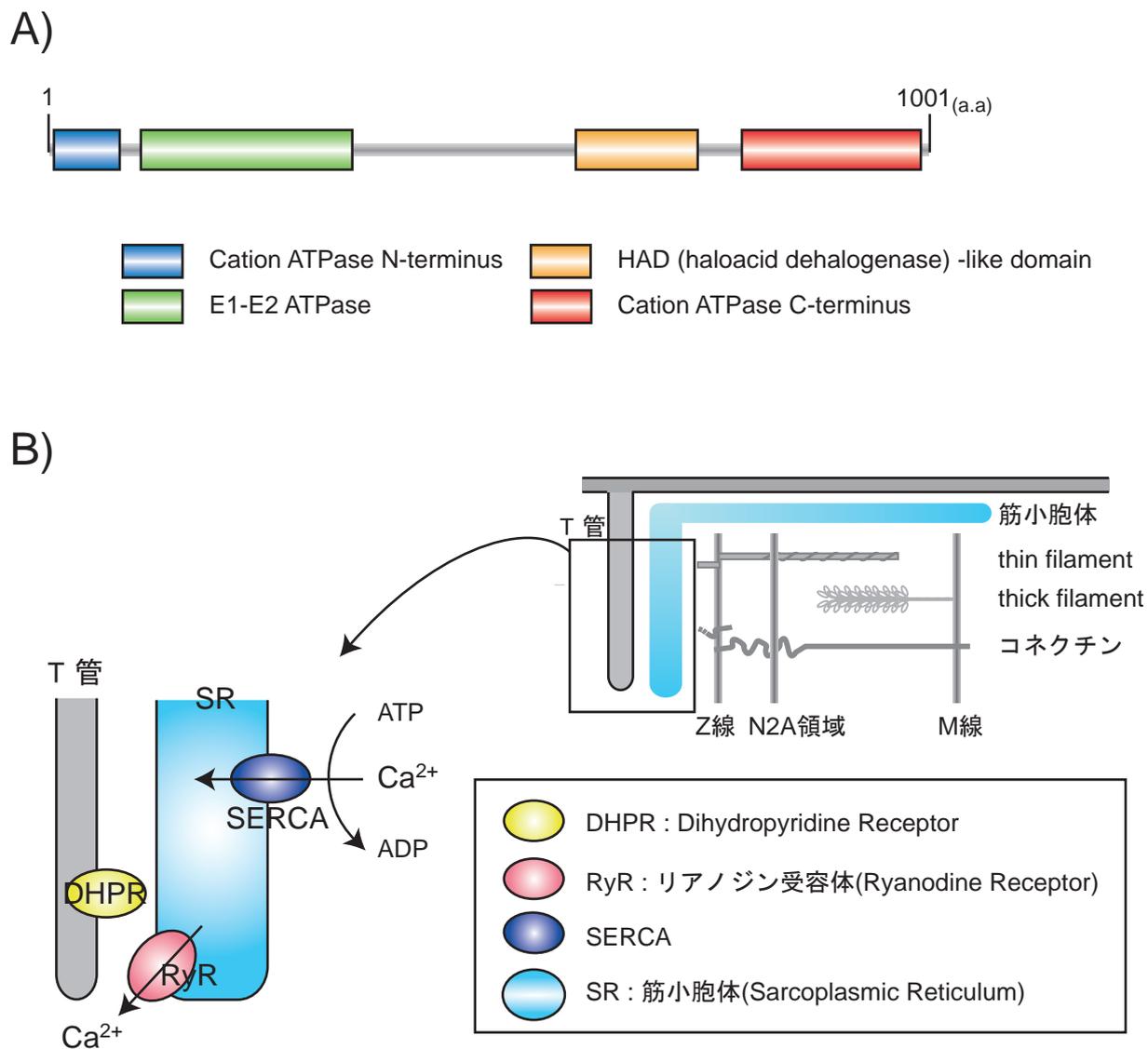
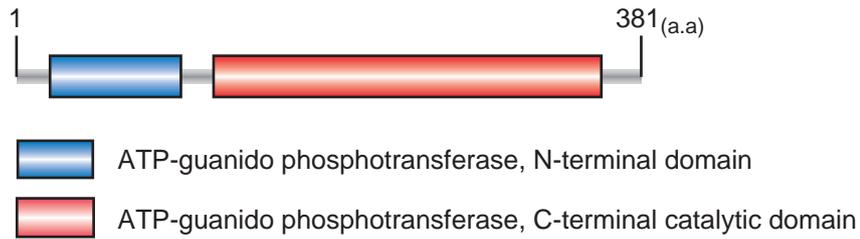


図1-2 SERCA の機能と構造

A) SERCAのドメイン構造

B) SERCA による筋細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の調節。神経細胞の興奮が T 管まで伝達されると、T 管上の Ca<sup>2+</sup> チャンネルである DHPR がシグナルを筋小胞体に伝える。これにより、筋小胞体中の Ca<sup>2+</sup> が RyR(リアノジン受容体)から放出される。神経細胞の興奮が収まると、筋細胞内の Ca<sup>2+</sup> は SERCA により筋小胞体内へと取り込まれる。

A)



B)

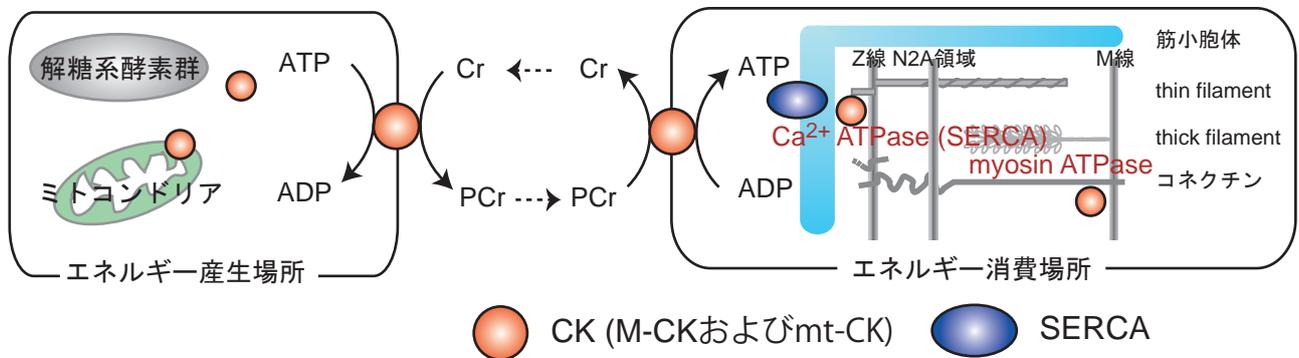


図1-3 M-CKの構造と役割

A) M-CKのドメイン構造

B) M-CKの機能

リン酸基の転移により、ATPの産生を可逆的に行う。筋細胞内では、ミトコンドリア型のクレアチンキナーゼ (mt-CK)、あるいは解糖系酵素の近傍に位置するM-CKがATPからホスホクレアチンを産生し、エネルギー消費場所であるM線や筋小胞体膜上に存在するM-CKがホスホクレアチンからATPを産生する方向に反応が進んでいる。

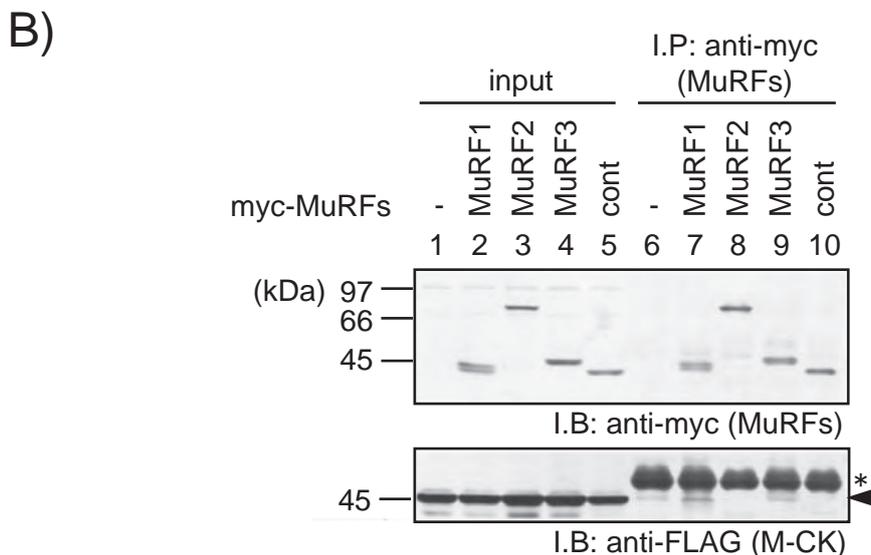
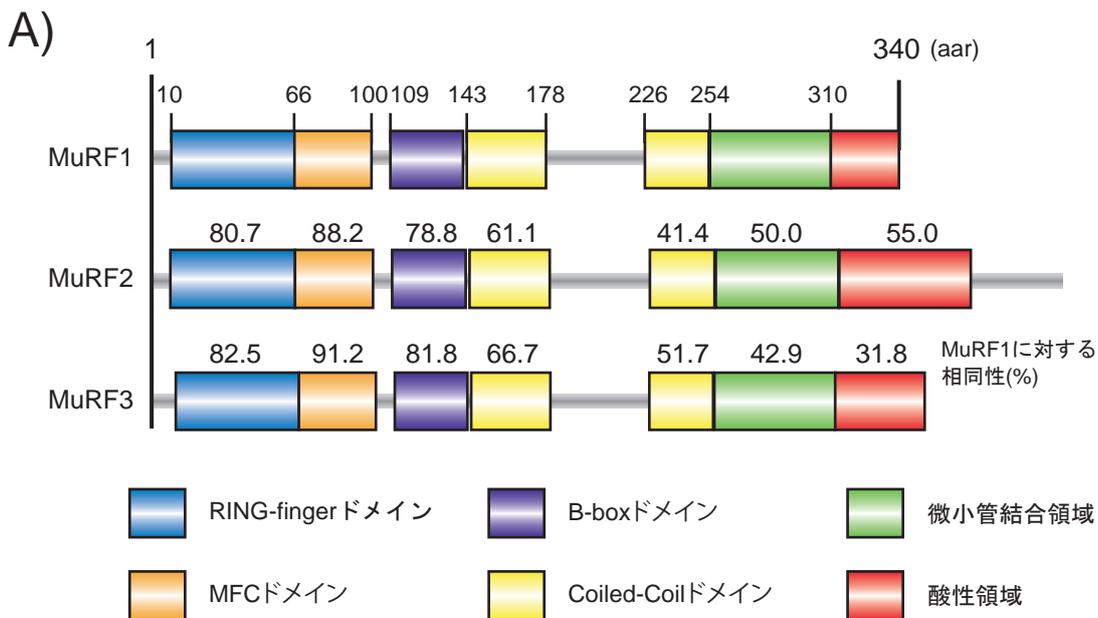


図1-4 MuRFsとM-CKの相互作用

A) MuRF1、MuRF2、MuRF3の構造。MuRF2、MuRF3については、いくつかのサブライスバリエントのうち、MuRF2/p60A、MuRF3を用いた。また、各ドメインのMuRF1に対する相同性 (%) を、ドメイン構造の上に記した。

B) COS7細胞にFLAG - M-CKをmyc-MuRF1 (レーン2、7)、MuRF2 (レーン3、8)、MuRF3 (レーン4、9)、空ベクター (レーン1、6)、あるいはネガティブコントロールとしてmyc-MARP1 (レーン5、10) と共発現させた。48時間後、細胞を25  $\mu$ MのMG132で2.5時間処理したのち、細胞を回収し、上清を抗myc抗体を用いた免疫沈降に供した。沈降物 (レーン6~10) および上清画分 (レーン1~5) をSDS-PAGE後、抗myc抗体および抗FLAG抗体を用いてウエスタン解析を行った。

\* : 非特異的バンド、 ◀ : FLAG-M-CK

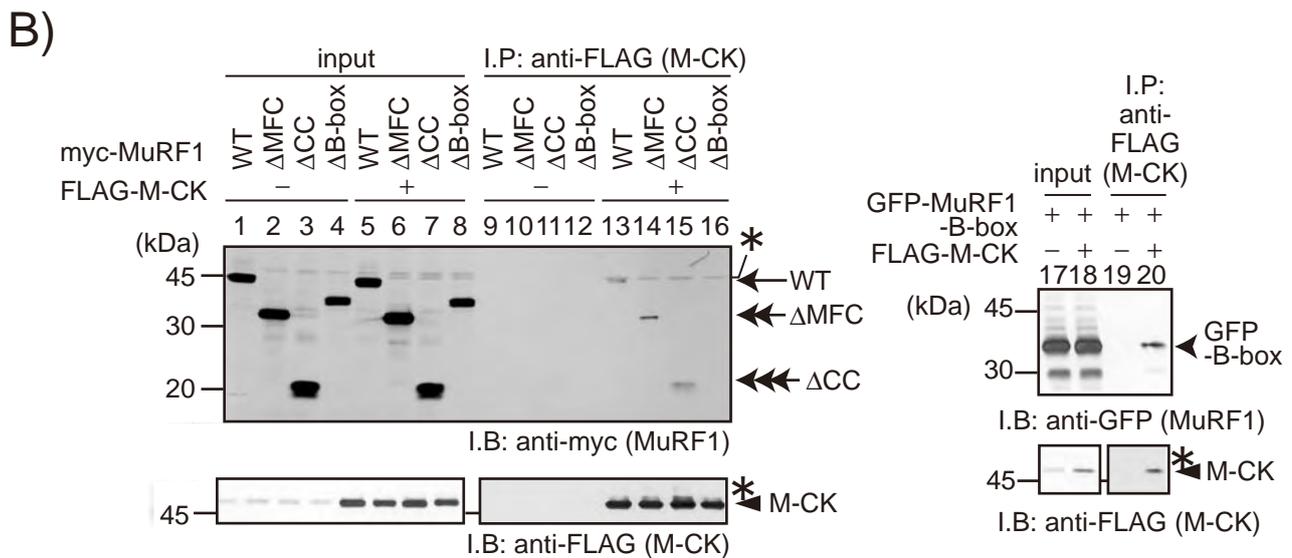
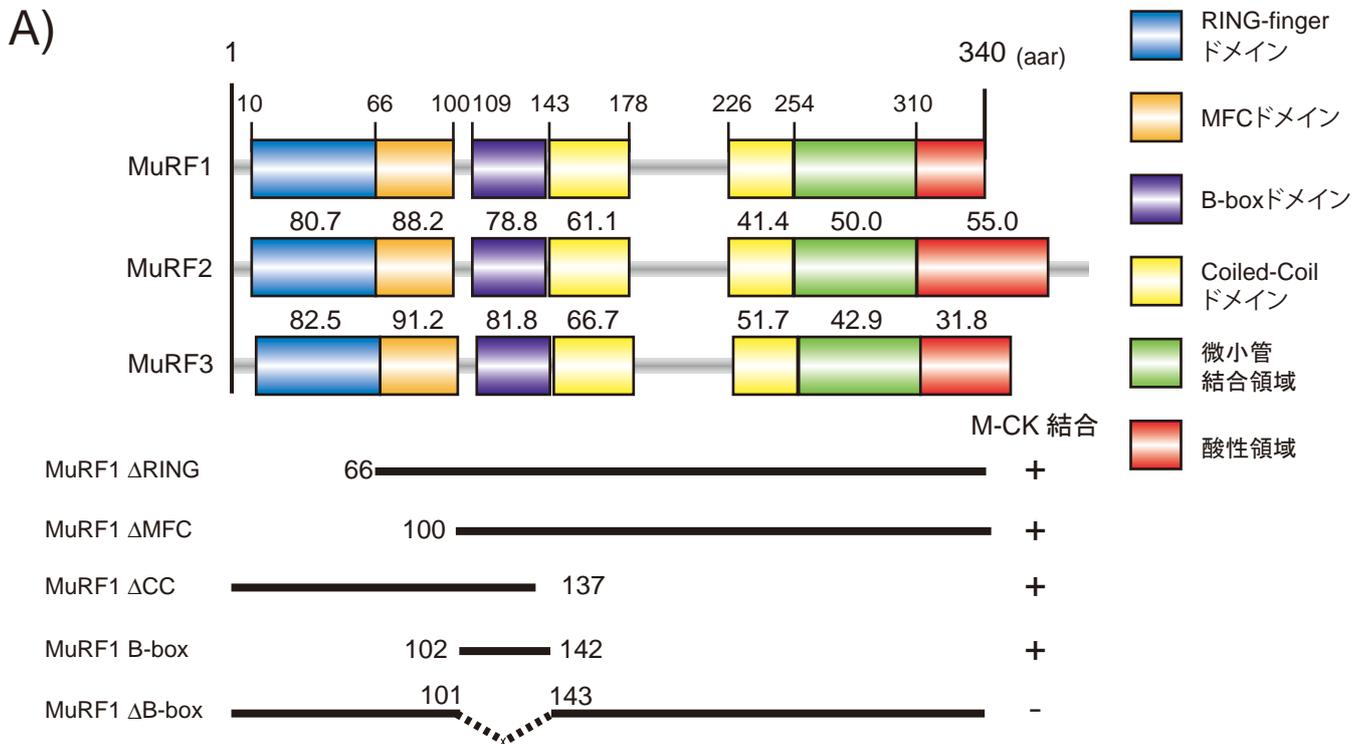


図 1-5 MuRF1 と M-CK の相互作用部位の同定

A) 用いた MuRF1 の欠失変異体を太線で示した。また、その上部には、図 1-4 と同様、MuRFs のドメイン構造と、MuRF1 への相同性 (%) を記した。

B) COS7 細胞に、myc タグもしくは GFP タグの付いた各 MuRF1 の欠失変異体を FLAG - M-CK ( レーン 5 ~ 8、13 ~ 16、18、20) あるいは空ベクター ( レーン 1 ~ 4、9 ~ 12、17、19) と共発現させた。48 時間後、細胞を 25 μM MG132 で 2.5 時間処理した後、その上清を抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供した。沈降物 ( レーン 9 ~ 16、19、20) と上清画分 ( レーン 1 ~ 8、17、18) を SDS-PAGE 後、抗 FLAG 抗体と抗 myc 抗体もしくは抗 GFP 抗体を用いてウエスタン解析した。

\* : 非特異的バンド

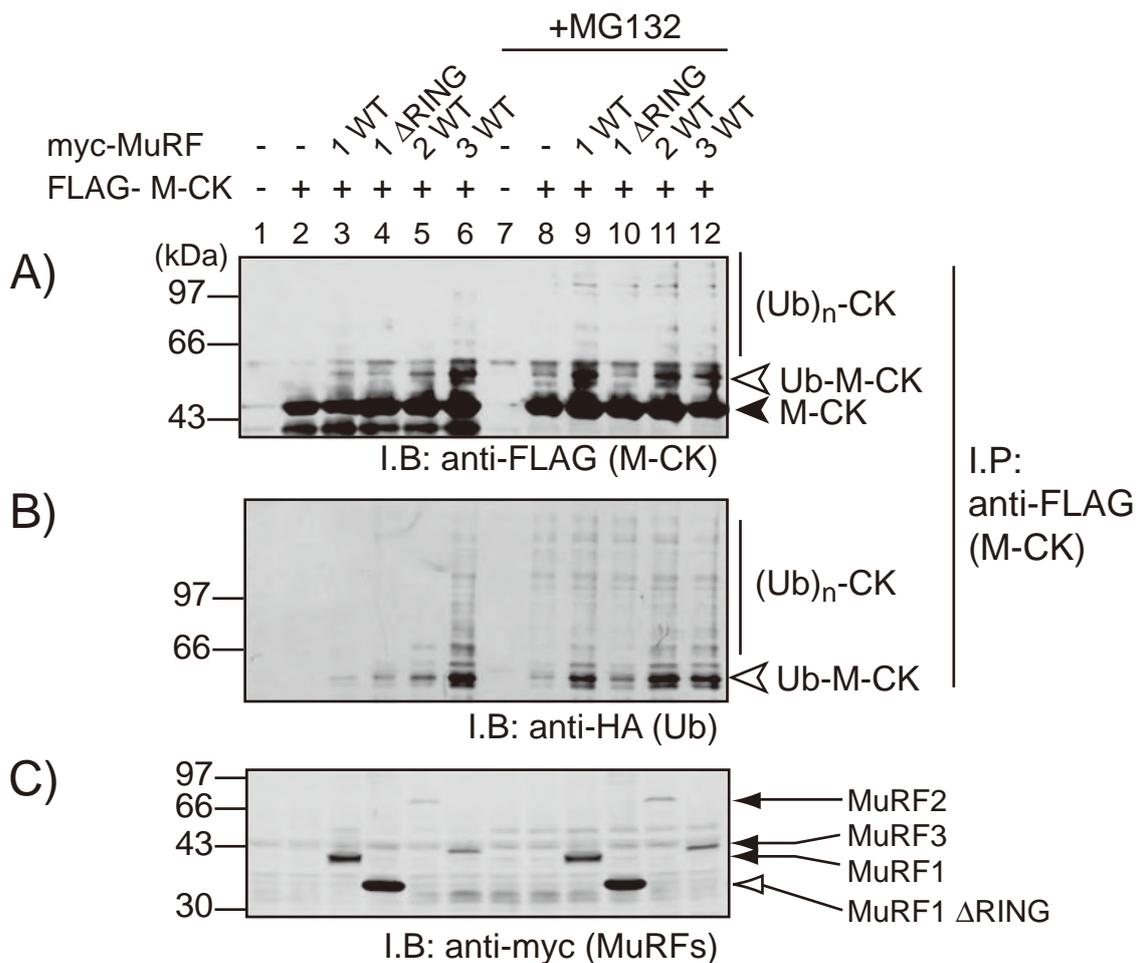


図 1-6 MuRFs の M-CK に対する Ub-E3 活性

COS7 細胞に、HA-Ub を FLAG - M-CK ( レーン 2 ~ 6、 8 ~ 12) および myc-MuRF1 ( レーン 3、 9)、 myc-MuRF 1 ΔRING ( レーン 4、 10)、 myc-MuRF2 ( レーン 5、 11) もしくは myc-MuRF3 ( レーン 6、 12) と共発現させた。48 時間後、半数を 25 μM MG132 ( レーン 7 ~ 12) で、残りの半数 ( レーン 1 ~ 6) を DMSO で 2.5 時間処理した。細胞を変性条件下で回収した後、上清を抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。その後、沈降物を SDS-PAGE し、抗 FLAG 抗体 (A) および 抗 HA 抗体 (B) でウエスタン解析した。また、上清画分を抗 myc 抗体によりウエスタン解析した (C)。

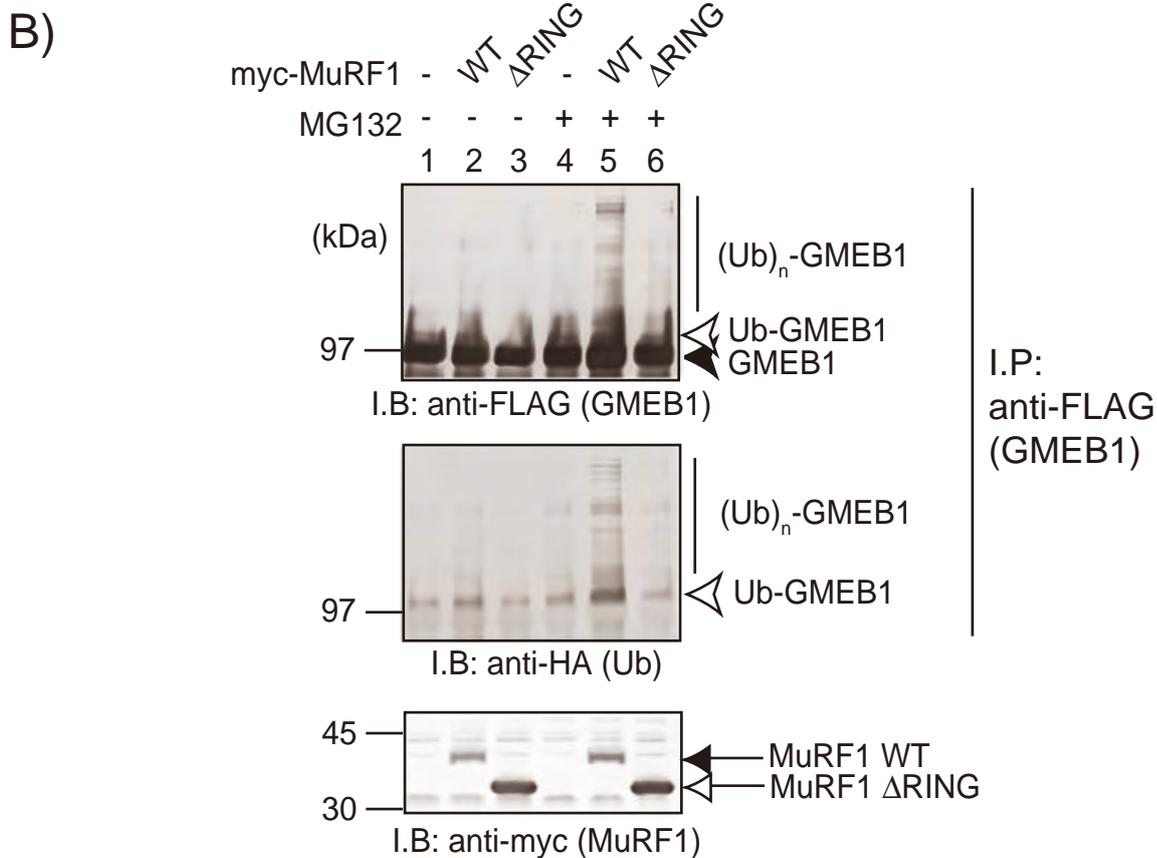
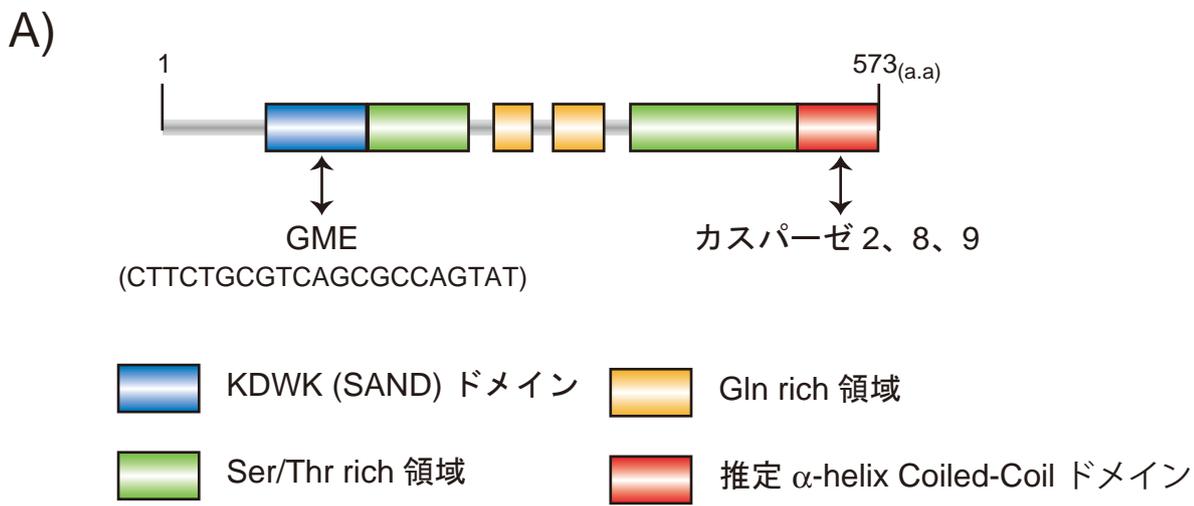


図 1-7 GMEB1 に対する MuRF1 の Ub-E3 活性

- A) GMEB1 のドメイン構造。また、GME およびカスパーゼ 2、8、9 との相互作用部位について示した。GME の配列も同時に記した。
- B) COS7 細胞に HA-Ub、FLAG-GMEB1 を myc-MuRF1 ( レーン 2、5)、myc-MuRF1  $\Delta$ RING ( レーン 3、6) と共発現した。48 時間後、半数 ( レーン 4 ~ 6) を 25  $\mu$ M MG132 で、残りの半数 ( レーン 1 ~ 3) を DMSO で 2.5 時間処理し、細胞を変性条件下で回収した後、上清を抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。その後、沈降物を SDS-PAGE し、抗 FLAG 抗体 ( 上段) および抗 HA 抗体 ( 中段) を用いてウエスタン解析した。また、細胞上清に対し、抗 myc 抗体を用いてウエスタン解析を行った ( 下段)。

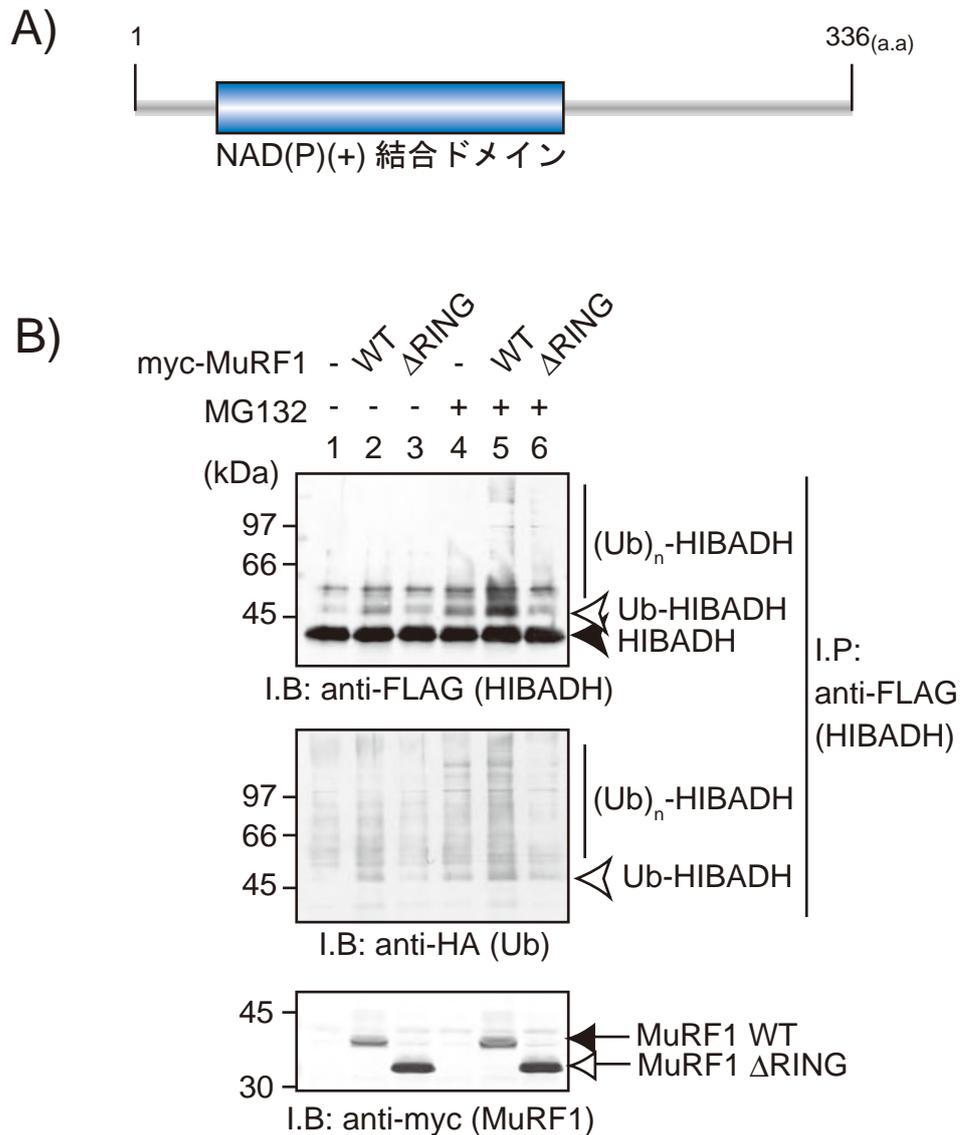


図 1-8 HIBADH に対する MuRF1 の Ub-E3 活性

A) HIBADH のドメイン構造

B) COS7 細胞に HA-Ub、FLAG-HIBADH を myc-MuRF1 ( レーン 2、5)、myc-MuRF1  $\Delta$ RING ( レーン 3、6) と共発現した。48 時間後、半数 ( レーン 4 ~ 6) を 25  $\mu$ M MG132 で、残り半数 ( レーン 1 ~ 3) を DMSO で 2.5 時間処理した。細胞を変性条件下で回収し、上清を抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。その後、沈降物を SDS-PAGE し、抗 FLAG 抗体 ( 上段)、抗 HA 抗体 ( 中段) でウエスタン解析した。また、上清を抗 myc 抗体を用いてウエスタン解析した ( 下段)。

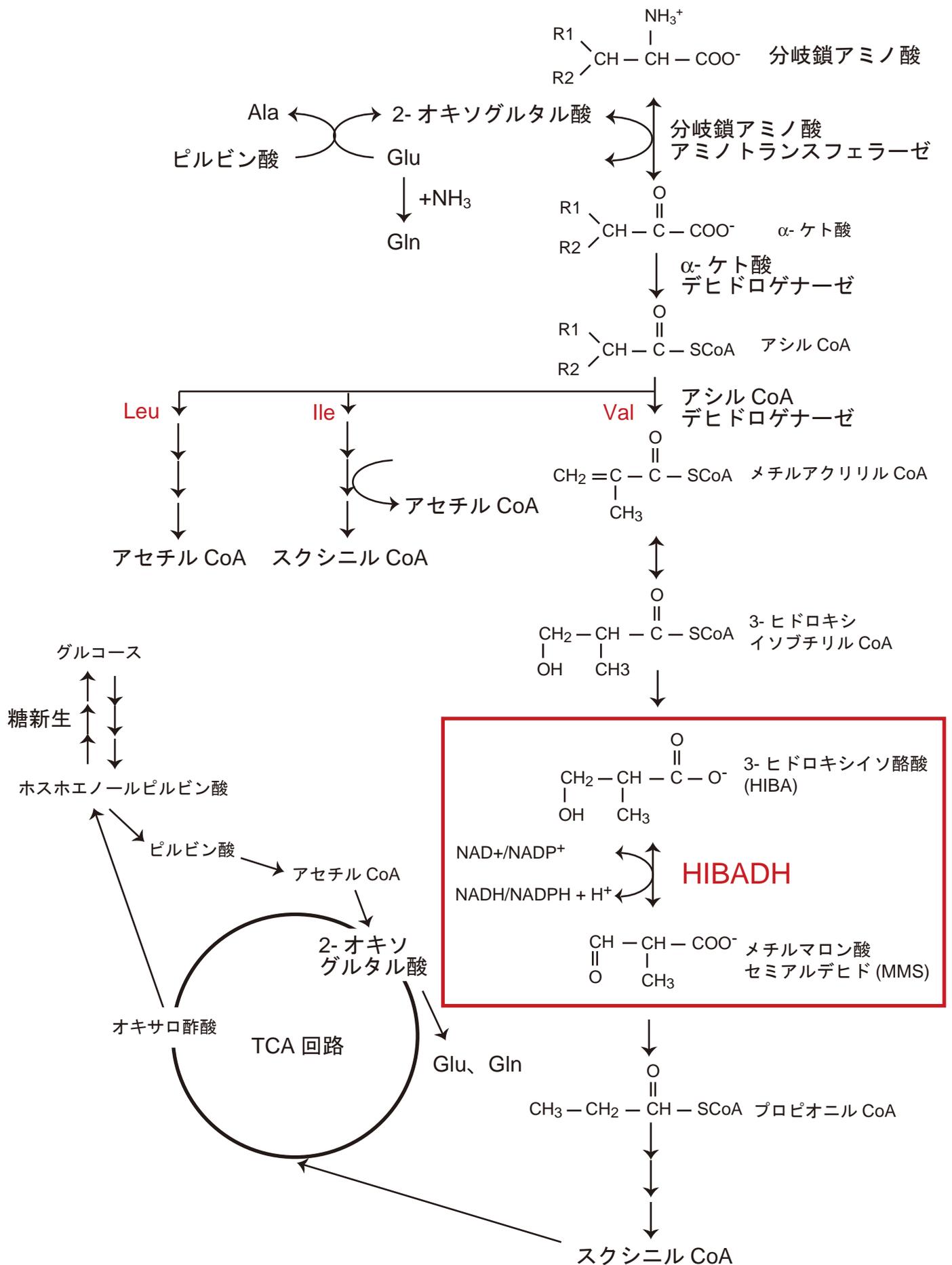


図 1-9 分岐鎖アミノ酸の代謝経路

Val の代謝を中心にまとめた。酵素名については、本文中に記載されているものについてのみ、記した。

表1 酵母Two-Hybridにより同定されたMuRF1相互作用分子

**筋原線維構成タンパク質**

遺伝子名	Accession No.
T-cap (Telethonin)	NM_003673
Myotilin	NM_006790
Titin (A帯)	X90568
Nebulin	X83957
Nebulin-related anchoring protein (NRAP)	NM_006175
Troponin I, skeletal muscle, fast	L21715
Troponin T1, skeletal muscle, slow	BC010963
Troponin T3, skeletal muscle, fast	BT019997
Desmin	BC010072
Myosin light chain-2 (slow, regulatory)	BC031006

**代謝酵素**

遺伝子名	Accession No.
<b>Muscle Creatine Kinase (M-CK)</b>	NM_001824
NADH dehydrogenase 1	NM_005005
Adenylate Kinase 1 (AK1)	NM_000476
Pyruvate Kinase	NM_182471
Aldorase 1	BC000376
NADH-ubiquinone oxidoreductase	AF067186
Aldo-keto reductase family 7	BC007352
Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	BC000439
Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	BC009586
Enoyl CoA hydratase	NM_004092
Pyruvate dehydrogenase kinase	NM_002612
<b>3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBADH)</b>	BC032324

**転写調節因子**

遺伝子名	Accession No.
<b>Glucocorticoid modulatory element binding protein 1 (GMEB1)</b>	NM_006582
myozenin	BC025753
Muscle ankyrin repeat protein 1 (MARP1)	NM_014391
Nuclear receptor-interacting protein (NRIP)	NM_018442
Four and a half LIM domain 2 (FHL2)	NM_001450
p62	NM_003900
Protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1)	NM_016166
Ubiquitously-expressed transcript (UXT)	NM_004182
LIM and cyteine-rich domain 1 (LMCD1)	BC000646
Nodal modulator (NOMO)	NM_014287

**翻訳関連因子**

遺伝子名	Accession No.
eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (eEF1γ)	NM_001404
G elongation factor 1 (EFG1)	NM_024996
translation initiation factor 3 (INT6)	BC000734

Witt et al., 2005およびWitt et al., 2008より  
赤字は、本研究で着目した遺伝子