

第 2 章 MuRF1 の個体レベルでの解析

結果

2-1. MuRF1 依存的な筋萎縮誘導系

本研究では、MuRF1 の持つ生理的機能を明らかにするために、分子レベルでの解析と並行して WT マウスと MuRF1 KO マウスの比較解析を行った。他のグループの報告によれば、MuRF1 KO マウスは通常条件下においては一見正常で目立った表現型を示さないが、除神経による筋萎縮誘導条件において、筋萎縮耐性という WT マウスとの違いを示す(28)。本研究でも、通常飼育時では WT マウスと MuRF1 KO マウスの間に明確な差異は観察されなかった。そこで、WT マウスと MuRF1 KO マウスを MuRF1 依存的な筋萎縮誘導条件下で飼育し、両者を比較解析することで MuRF1 の生理機能に迫ることとした。現在までに、尾部懸垂、除神経、無重力環境での飼育、あるいは薬剤処理を介した炎症誘導による筋萎縮誘導時に MuRF1 の発現量が増加することが報告されている(28,42,84,85,114)。一方、本研究では代謝調節器官としての骨格筋の機能に注目しており、MuRF1 による筋萎縮誘導がアミノ酸代謝に与える影響を解析するための実験系を用いた。具体的には、絶食とアミノ酸飢餓という 2 つの実験系による筋萎縮誘導を試みた。なお、後述するように、絶食による実験系は実験開始当初の予備段階で採用していたが、アミノ酸飢餓の方が生体にとってより穏やかで MuRF1 の有無による差異を観察するのに適していると考えられたため、大部分の実験はアミノ酸飢餓の系を用いて行われた。

2-2-1. 絶食による筋萎縮誘導

絶食による筋萎縮の誘導は古くから一般的に行われている手法であり、絶食により MuRF1 の発現が誘導されていることも報告されている(84)。そこで、まずは WT マウスと MuRF1 KO マウスを通常条件下(control 群)および絶食条件下(starved 群)で飼育した。体重の変化について観察したところ、starved 群では WT マウス、MuRF1 KO マウスともに絶食開始から 2 日間で体重が 80%程度まで減少した(図 2-1)。絶食期間の延長とともに体重は更に減少し続けたが、その減少速度は最初の 2 日間に比べ若干低下する傾向が観られた。この期間の体重変化に WT マウスと MuRF1 KO マウスの間で違いはなかった。

2-2-2. WT マウスと MuRF1 KO マウスの絶食時の遺伝子発現変化

前述したように、MuRF1 は転写調節因子 GMEB1 と相互作用し、なおかつ核内にも局在することが観察されている。このことから、MuRF1 が何らかの転写制御に関与しているこ

とが予想される。そこで、上述した絶食実験に用いたマウス(WT control、WT starved、KO control、KO starved 群の計 4 つの群)の骨格筋から抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、MuRF1 により発現が制御されている可能性のある分子の探索を行った。解析は Affimetrix 社の Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて行った。なお、絶食を開始してから 3 日目以降は体重の減少速度が鈍くなることから、絶食に対する適応現象がより顕著に起こっていると考えられる、絶食 2 日目の時点で解剖したマウスの骨格筋サンプルを用いて実験を行った。

まず、上述した 4 つの群についてデータを取得し、全プローブに対するシグナル値を基にして正規化を行った。このデータを用いてスキャッタープロットにより群間比較を行ったところ、同じ飼育条件における WT マウスと MuRF1 KO マウス間(WT control vs KO control、WT starved vs KO starved)の遺伝子発現の違いは、異なる飼育条件の群間比較(control vs starved、マウスの遺伝子型には依らない)に比べ小さかった(図 2-2A)。特に、WT control と KO control、あるいは WT starved と KO starved 間の相関係数はいずれも 0.98 前後であり 1 に近い値であったことから、実験操作上のデータのばらつきは比較的小さいと考えられた。そこで、いくつかの遺伝子の発現量変化が過去の知見と一致するかを調べるとともに、MuRF1 の発現が絶食により誘導されているかを解析することで、この実験系の妥当性を評価した。ラットを用いた DNA マイクロアレイ解析では、絶食によりプロテアソームサブユニットのいくつかの遺伝子の発現量が増加し、エネルギー代謝に関わる酵素群については発現量が減少することが報告されている(84,85)。本研究においても、19 S プロテアソームサブユニットの non-ATPase11、あるいは 20 S プロテアソームのサブユニット $\alpha 5$ などプロテアソームサブユニットの一部の遺伝子の発現量が増加していた。逆に、グリコーゲンからのグルコース生成を促進させるホスホリラーゼキナーゼなど、いくつかのエネルギー産生に関わる酵素群の発現量は大きく減少していた(表 2-1、これらはいずれも後述する判定基準により発現量に変化していると判断されたもの)。また、MuRF1 の発現量は KO control 群で WT control 群の 1 割にも満たず、WT starved 群では WT control 群と比べ 4 倍程度増加していた(表 2-1)。これらのことから、この解析結果は妥当であると判断し、以降の解析を行った。なお、19 S プロテアソームサブユニットの non-ATPase11 については、複数あるプローブのうち 1 つで WT と MuRF1 KO マウスの間に顕著な差が観られたが、他のプローブには差がなくそのプローブのみシグナル値が低かったことから、誤差であると判断した。

まず、いくつかの遺伝子に着目し、それらの発現量変化を解析した。他の MuRF ファミリー、MuRF2 および MuRF3 の発現量について調べたところ、MuRF3 の発現量は WT と MuRF1 KO 間で変化しておらず、絶食による発現誘導も観察されなかった。MuRF2 については使用したアレイにプローブが載っていなかった。また、MuRF1 とともに筋萎縮時に中心的役割を果たしている atrogen-1 の発現量は MuRF1 同様 starved 群で増加しており、WT と MuRF1 KO マウスの間に違いは観察されなかった(表 2-1)。筋タンパク質分解の上流

で機能し、MuRF1 との相互作用も予想されているカルパインについても、骨格筋で発現している分子種でアレイ上にプローブが載っている全ての分子種について、その発現量を調べた(表 2-1)。その結果、全般的に starved 群で発現量が減少しているのが観察された。カルパインに対する内在性の特異的阻害剤、カルパスタチンについては、プローブ間の差が大きく、明確な結論を出すには至らなかった。また、先述したように、GMEB1 により発現制御を受ける TAT の発現量についても、WT マウスと MuRF1 KO マウスの間で違いは観られなかった(表 2-1)。

続いて、次のようにして MuRF1 により発現が制御されている候補遺伝子の抽出を行った。もし MuRF1 により発現が制御されている遺伝子があれば、WT マウスの場合それらの発現量は starved 群で control 群と比べ増加もしくは減少しているが、MuRF1 KO マウスでは変化していないことが予想される。そこでまず、WT マウスの starved 群と control 群間、MuRF1 KO マウスの starved 群と control 群間で発現量が変化している遺伝子を抽出した。この際、「発現量が starved 群で control 群と比較し 2 倍以上、あるいは 1/2 倍以下となっていること」「GCOS ソフトウェアの判定で、増加あるいは減少となっており、かつ、少なくともシグナル値の大きい方の実験群では発現していると判定されていること」を判定基準とした。その結果、全 45,056 プローブ中、WT マウスでは発現量が増加したものとして 981 プローブ、減少したものとして 798 プローブ抽出された。これに対し、MuRF1 KO マウスでは、増加が 1,162 プローブ、減少が 1,101 プローブ抽出された。これらのうち、WT マウスのみで変化が観察されたもの、つまり MuRF1 により発現制御される候補遺伝子として、MuRF1 により発現が増加するものが 516 プローブ、抑制されるものが 332 プローブ抽出された(図 2-2B)。また、これらのうち、WT マウスでのみ発現量が 4 倍以上になっていた 116 プローブ(114 遺伝子)と、1/4 以下になっていた 22 プローブ(22 遺伝子)については表 2-2 にまとめた。発現が増加するものの中には、cathepsin 8 (Cts8)や RING-Finger protein 26 (Rnf26)、checkpoint with forkhead and RING-Finger domains (Chfr)、autophagy-related 4A (Atg4a)などタンパク質分解に関連するもの、Jumonji AT rich interactive domain 1C (Jarid1c)、POU domain class 3 (Pou3f3)、ankyrin repeat domain 1 (MARF1、CARP あるいは Ankrd1 と呼ばれる)などの転写調節に関連するもの、あるいは calcium activated nucleotidase 1 (Cant1)、phosphodiesterase 6G (Pde6g)などのシグナル伝達に関連するものなどが含まれていた。発現が抑制されるものの中には、転写調節に関与する FBJ osteosarcoma oncogene (fos)などが含まれていた。

2-3. アミノ酸飢餓による筋萎縮誘導

筋萎縮は低栄養条件において引き起こされる。絶食はその最も極端な例であり、エネルギー源を摂取できないために、生体にとっては極めて厳しい条件でもある。一方、筋萎縮

はエネルギー源が充足していても食餌からのアミノ酸摂取量が不足すれば誘導される。そこで本研究では、絶食による筋萎縮誘導系とともに、エネルギー摂取が可能で比較的穏やかな条件と考えられるアミノ酸飢餓による筋萎縮誘導系も試みた。具体的には、WT マウスと MuRF1 KO マウスを 10%グルコース水および飲料水のみで飼育した。この系(以降、-AA と表記する)はグルコース水によりエネルギー源は自由摂取出来き穏やかな条件であるため、絶食条件と比べ、より筋タンパク質のターンオーバーに焦点を当てた解析が可能と考えられる。実際、この系では 1 週間の飼育で WT、MuRF1 KO マウスの体重の減少はどちらも 90%程度にとどまっており、絶食条件に比べ軽減されているのが観察された(なお、この体重変化に WT マウスと MuRF1 KO マウスの間で違いは観られなかった)(図 2-3A)。そこで、絶食の系に比べ-AA の系が本研究の目的により適していると考え、詳細な解析を進めた。

まず、-AA の系で 7 日間飼育したマウスの筋重量および筋細胞の径を測定した。筋重量および筋細胞の径は筋萎縮の指標であり、筋萎縮時にはこれらの値が小さくなる。測定の結果、MuRF1 KO マウスでは WT マウスに比べ筋重量および筋細胞の径の減少が抑えられていることが観察された($p < 0.05$)(図 2-4A、B)。マウスの心臓の重量についても測定したところ、有意差は観られないものの、骨格筋同様、MuRF1 KO マウスでは心臓も萎縮に対し耐性を示す傾向が観察された(図 2-4D)。なお、この時、筋組織の様子に MuRF1 KO マウスと WT マウスで際立った差異は観察されなかった(図 2-4C)。次いで、これらのマウスの筋組織から total RNA を抽出し、MuRF1 の発現量変化を半定量 RT-PCR により解析した。その結果、WT マウスでは通常飼育の control 群に比べ-AA 群で MuRF1 の発現量が増加していることが観察された(図 2-3B)。これらの結果から、-AA による筋萎縮誘導時に MuRF1 の発現が誘導され、MuRF1 KO マウスでは筋萎縮が軽減されることが示された。このことにより、MuRF1 が他の筋萎縮誘導系と同様に、-AA による筋萎縮の誘導過程においても中心的役割を果たしていることが確認された。

なお、MuRF1 とともに筋萎縮誘導に中心的役割を果たしているもう 1 つの Ub-E3 である atrogen-1 の発現量変化も半定量 RT-PCR により解析した結果、1 週間の-AA 飼育で増加していることが観察された(図 2-3B)。また、絶食実験の結果と同様、-AA 時の atrogen-1 の発現量に WT マウスと MuRF1 KO マウスの間に違い、例えば MuRF1 KO マウスで MuRF1 を補償するような atrogen-1 の発現量の増加は観られなかった。これらのことから、MuRF1 と atrogen-1 の発現制御は独立に行われているということ、atrogen-1 の発現量増加だけでは MuRF1 KO マウスの筋萎縮を野生型マウスのレベルまで誘導するには不十分であるということが分かった。

2-3-1. -AA 時の筋中 M-CK 量の変化

上述したように、-AA 条件が MuRF1 依存的に筋萎縮を誘導することが確認できた。そ

ここで、培養細胞の系で観察された MuRF1 と M-CK の相互作用の生理的意義を解析するために、WT マウスおよび MuRF1 KO マウスの通常飼育時および-AA 時の筋中 CK 量を測定した。CK の量と活性量は相関するので、過剰量のホスホクレアチン存在下において ADP から ATP が産生される量を指標にして、筋重量あたりの CK 量を測定できる(92)。また、骨格筋中には2種類の CK、M-CK と mt-CK が存在するが、M-CK がその大部分を占めており、この解析により求められた CK 量は筋中の M-CK 量を反映していると考えられる(97)。この結果、通常飼育時には WT マウスと MuRF1 KO マウスの間で M-CK 量に差はないが、MuRF1 の発現が誘導されている-AA 時には、MuRF1 KO マウスで WT マウスに比べ M-CK 量が有意に多いことが観察された(図 2-5)。培養細胞の系での結果と合わせて考えると、*in vivo* でも MuRF1 が M-CK に対する Ub-E3 として機能し、M-CK を分解に導いていると考えられた。

2-3-2. -AA による血中アミノ酸濃度の変化

食餌からのアミノ酸摂取量が不十分である場合、骨格筋および肝臓中のタンパク質分解量が増加し、生じたアミノ酸は血流に乗り全身へと運ばれ利用されるようになる。本研究で用いた-AA の系では食餌からのアミノ酸摂取がないため、血中アミノ酸量はこれらの臓器中でのタンパク質分解量を反映したものになると考えられる。そこで、MuRF1 の筋タンパク質分解への寄与を明らかにするため、各マウスの血中アミノ酸量の解析を行った(表 2-3)。その結果、まず、WT マウスでは、-AA 時に全アミノ酸量及び非必須アミノ酸量が通常飼育時に比べて増加していた($p<0.05$)。個々のアミノ酸では、Ala および Gln の量が顕著に増大していた。その一方で、必須アミノ酸量については通常飼育時に比べて変化していないことが観察された。これに対し、-AA 時の MuRF1 KO マウスでは、通常飼育時と比べ全アミノ酸量は増加しているものの有意差は観察されず、逆に必須アミノ酸量は有意に減少していた(WT、MuRF1 KO どちらに対しても $p<0.05$)。特に、分岐鎖アミノ酸については、-AA 時の WT マウスと比較しても有意に減少していた($p<0.05$)。このことから、MuRF1 が-AA のような低栄養条件下において分岐鎖アミノ酸をはじめとする血中必須アミノ酸量の維持に働いていることが明らかとなった。この詳しいメカニズムについては不明であるが、1-3 で述べた HIBADH の分解制御が一部寄与している可能性が考えられる。HIBADH に対する作用も含めた、MuRF1 による血中アミノ酸量の維持のメカニズムについては後ほど考察する。

2-4. MuRF1 の筋タンパク質合成系への関与

上述した様に、MuRF1 KO マウスでは-AA 時に必須アミノ酸の血中量が低下している。これは、MuRF1 が Ub-E3 活性を有することから、少なくともその一部は MuRF1 を介した筋タンパク質分解系が機能しなくなったためと考えられる。一方で、血中アミノ酸量はタンパク質分解量だけでなくタンパク質の合成量にも影響を受ける。そこで、共同研究者らと、MuRF1 の筋タンパク質合成系への関与について解析を行った。筋タンパク質の合成量は、重水素ラベルされたフェニルアラニン(D5-F)をマウスの腹腔内に投与し、一定時間飼育した後に筋タンパク質中に取り込まれた D5-F 量をフェニルアラニン量と比較することで測定した。上記までの実験と同様に、まず、-AA 条件下で 7 日間飼育したマウスを用いたところ、D5-F の筋タンパク質内への明確な取り込みは観察されなかった(data not shown)。これは、栄養の不足が長期に及び、筋タンパク質合成量が大きく減少しているためと考えられた。そこで、-AA での飼育期間を短くして解析を行うこととした。-AA 条件下での飼育 2 日目から 4 日目は、7 日目に比べより穏やかな体重減少を示し、生体への負担はより少ないと考えられる。それに対し、筋重量の減少は MuRF1 KO マウスで WT マウスに比べ軽減されている傾向を保っており、MuRF1 KO マウスと WT マウスとの間の差異は観察可能であると考えた(図 2-6A、B)。そこで、-AA 飼育開始から 48 時間後にマウス腹腔内に D5-F を投与し、その後更に 48 時間飼育した後、D5-F の取り込み量を測定した。その結果、MuRF1 KO マウスでは WT マウスに比べ D5-F の取り込み量が 2 倍程度多いこと、つまり、筋タンパク質合成量が多いことが観察された(図 2-6C)。この結果から、MuRF1 が筋タンパク質の分解系のみならず、合成系の制御にも関与していることが明らかとなった。このメカニズムについては後で考察する。

考察

2-5-1. 絶食時の WT マウスと MuRF1 KO マウスの遺伝子発現変化

まず、WT、MuRF1 KO マウスの中で atrogen-1、MuRF3 の発現量に差が観られなかったことから、MuRF1 と atrogen-1、MuRF3 という機能的(MuRF1 と atrogen-1)、あるいは構造的(MuRF1 と MuRF3)に類似している遺伝子間の発現制御には、MuRF1 の発現量によるフィードバック制御はないことが分かる(前述したように、atrogen-1 については-AA の系でも同様の結果が得られている)。特に、MuRF3 の発現量は control 群と starved 群の間でも変化していないことから、少なくとも飢餓という異化シグナルには MuRF3 は積極的に関与していないと考えられる。このような MuRF ファミリー間の機能の差異については総合討論でより詳しく述べたい。

MuRF1 依存的に発現制御を受ける候補遺伝子として抽出された遺伝子群について考えると、発現量が MuRF1 依存的に4倍以上の増加を示しているもの(114 遺伝子)は、1/4 以下に減少しているもの(22 遺伝子)に比べ顕著に多かった。この結果を単純に解釈すれば、MuRF1 が転写因子様の機能、あるいは転写を負に制御している分子を分解に導くような機能を有していることを示唆していると考えられる。この場合、2-4.で述べたように、MuRF1 は筋タンパク質合成を負に制御していることから、MuRF1 による遺伝子発現の正の制御は一部の異化シグナルに対応するための遺伝子群にのみ働いており、全体として筋タンパク質の合成を増加させる方向には作用していないと考えられる。また、発現量が4倍以上になっていた遺伝子の中の一つ、MARF1 は筋ジストロフィーのいくつかのタイプで発現量が増加すること(128,129)、MuRF1 の結合サイトを含むコネクチンの C 末端領域の欠損マウスでも発現量が増加すること(130)、MuRF1 と MARF1 は結合しうることが報告されており(39)、非常に興味深い。

このように、マイクロアレイの結果からいくつかの興味深い知見を得ることができた。しかし、表 2-2 に記載されているように候補遺伝子として抽出された遺伝子のシグナル値の多くが小さな値であり、試行数も各群 1 回のみであることから、この結果だけで MuRF1 の遺伝子発現への作用を詳細に解析することは難しい。事実、先述したように、19 S プロテアソームサブユニットの non-ATPase11 については、複数あるプローブのうち多くは WT マウスと MuRF1 KO マウス間で差が観られないが、シグナル値の小さい 1 つのプローブに関しては候補遺伝子としての基準を満たす結果となっている。この問題点に対して、試行数を増やしデータの精度を上げていくことが対応策として考えられる。また、それとともに、MuRF1 がいくつかの転写調節因子と相互作用することから、それらに対する分子レベルでの解析結果と、このマイクロアレイデータを組み合わせて解析をしていきたい。

2-5-2. 血中アミノ酸量の維持に対する MuRF1 の役割

上述したように、WT マウスでは、必須アミノ酸量は通常飼育時と比較して同程度に保たれていたが、非必須アミノ酸量および全アミノ酸量に関しては通常時よりも増加していた。中でも、Ala 及び Gln の量の増大が顕著であった。

アミノ酸の代謝の第一段階は、アミノ酸からの α -アミノ基の除去である。この反応はアミノトランスフェラーゼが触媒し、2-オキソ酸へとアミノ基を転移させている。一般に、アミノ基を受け取る2-オキソ酸には2-オキソグルタル酸が用いられ、結果としてGluが生じる。生じたGluは更にアンモニアからアミノ基を受け取ることでGlnへと変換され、肝臓で代謝されている。また、筋細胞内では2-オキソ酸にピルビン酸も用いられており、結果としてAlaも生じる(124,127,131)(図1-9参照)。つまり、-AA時におけるAlaとGlnの量の顕著な増大は、-AA条件下で骨格筋中でのタンパク質分解量が昂進していることを表している。そのため、食餌中からのアミノ酸摂取が無いにも関わらずWTで全アミノ酸量が増加し必須アミノ酸量が通常飼育時と同程度に保たれていることは、この筋タンパク質分解がアミノ酸量の維持の少なくとも一部に寄与していることを示していると考えられる。一方で、MuRF1 KO マウスでは全アミノ酸量が増えているものの通常飼育時との有意差はなく、また、必須アミノ酸量は減少していた。このことは、MuRF1 KO マウスでも筋タンパク質の分解が昂進しているが、WT マウスに比べると分解量が少ないために、必須アミノ酸量を保てないということを示している可能性がある。本研究で示したように、MuRF1 は複数の分子をUb化し分解へと導いている。また、酵母Two-Hybrid法を用いた解析では、筋原線維タンパク質を中心に多くの分子がMuRF1の基質候補分子として同定されている(表1参照)(39,132)。MuRF1が実際にこれらの分子に対してもUb-E3として機能するかどうかについては更なる解析が必要であるが、MuRF1遺伝子を単独で破壊しただけでマウスが筋萎縮耐性を示すことから、MuRF1の基質特異性はかなりの広域に及ぶと予想される。このことから、本研究で示したMuRF1 KOマウスの-AA時の血中アミノ酸量の結果は、少なくともその一部はMuRF1を介した筋タンパク質分解系の破綻に起因していると考えられた。

このように、MuRF1による血中アミノ酸量の維持の一端は筋タンパク質分解を介したアミノ酸の供給により担われていると考えられる。その一方で、このような結果は、単純な筋タンパク質分解量の増加以外にも、アミノ酸代謝過程の制御や筋タンパク質合成量の制御によっても起こりうる。実際、2-4で述べたように、MuRF1は筋タンパク質合成を負に制御しており、このこともMuRF1による血中アミノ酸量維持のメカニズムの1つであると考えられる。また、1-3で述べたように、MuRF1はValの代謝酵素HIBADHを分解制御する。MuRF1がHIBADHを分解することは血中のHIBA量を増加させることにつながると予想される。実際に血中のHIBA量が増加した場合、このことがValの血中アミノ酸量にどのような影響を与えるのかは不明であるが、何らかの作用を及ぼしている可能性は考えられる。必須アミノ酸の中でも特に、分岐鎖アミノ酸の血中量がWTマウスと

MuRF1 KO マウス間で異なる傾向が観られたことから、他の分岐鎖アミノ酸である Leu や Ile の代謝酵素に対しても MuRF1 が作用するかどうかについては非常に興味深い点であり、今後の解析が必要であると考えられる。

以上のように、詳しいメカニズムについては不明なものの、MuRF1 は筋タンパク質分解量を昂進させるとともに筋タンパク質合成量を減少させ、アミノ酸代謝酵素にも作用をすることで、血中アミノ酸量の維持に働いているという可能性が考えられた。今度は、MuRF1 の基質候補分子の中でも、豊富に存在するためにその分解が大量のアミノ酸供給源になるとされる筋原線維構成タンパク質や、逆に、量的には血中アミノ酸量の増大に直接つながらなくても、代謝を制御することで間接的に血中アミノ酸量の維持に寄与すると思われる代謝酵素や転写、翻訳制御因子に対する解析を行うことで、MuRF1 による血中アミノ酸量の維持のメカニズムが明らかになっていくと考えられる。

2-5-3. MuRF1 による筋タンパク質合成制御

これまで、MuRF1 と atrogin-1 という筋萎縮に関わる 2 つの Ub-E3 についての機能解析は、筋タンパク質分解の昂進という観点に重点が置かれてきた。その中で本研究では、筋タンパク質合成系の負の制御という MuRF1 の持つ新たな機能を明らかにすることが出来た。先述したように、MuRF1 は筋タンパク質分解を介して血中アミノ酸濃度を維持していると推察されるが、同時に筋タンパク質合成も抑制することで、より効果的に血中アミノ酸量の維持を行っていると考えられる。序論でも述べたように、MuRF1 や atrogin-1 の発現制御、あるいは筋肥大を招く機構の解析から、筋細胞中のタンパク質合成と分解を制御する経路が明らかになりつつある。それらによると、両者の上流過程は IGF-1/PI3K/Akt という共通の経路により制御されている(89,133,134)。つまり、IGF-1 のような増殖刺激因子は MuRF1、atrogin-1 の発現を抑制し筋タンパク質分解量を減らす一方で、筋タンパク質の合成量を増加させる。逆に、増殖刺激がない時は、MuRF1、atrogin-1 の発現が誘導され筋タンパク質分解量が増加し、筋タンパク質合成量は減少する。MuRF1 が筋タンパク質合成を負に制御するという事は、増殖刺激がない時の筋細胞の適応応答をその下流のシグナル因子が更に促進していることになり、異化的条件という緊急事態における対応として非常に理にかなっていると考えられる。

本研究で得られた結果からでは、MuRF1 によるタンパク質合成抑制のメカニズムは全く不明である。しかし、MuRF1 がいくつかの転写調節因子と相互作用し(表 1-1 参照) (39)、本研究で示したように GMEB1 に対しては Ub-E3 として機能していることから、その一部は転写レベルでの制御である可能性が考えられる。また、MuRF1 は翻訳関連因子とも相互作用することが示されており(表 1-1 参照) (39)、それらの因子の中の 1 つであるポリペプチド鎖伸長因子 1 (EF-1)複合体の構成因子 eEF1 γ については、TNF- α 刺激時に MuRF1 KO マ

ウスで WT マウスよりもタンパク質量が多くなることが報告されている(42)。これが MuRF1 の Ub-E3 活性による eEF1 γ の分解の結果なのかどうかについては明らかにされていないが、これらのことから MuRF1 は何らかの形で翻訳過程の制御にも働いていると考えられる。今後は、MuRF1 の基質候補分子の中から転写、翻訳制御に関わるものに対する解析を行い分子レベルでそのメカニズムを明らかにする必要がある。それと同時に DNA マイクロアレイ解析などを活用し標的遺伝子を同定して、分子レベルでの解析結果と照らし合わせることも重要であろう。

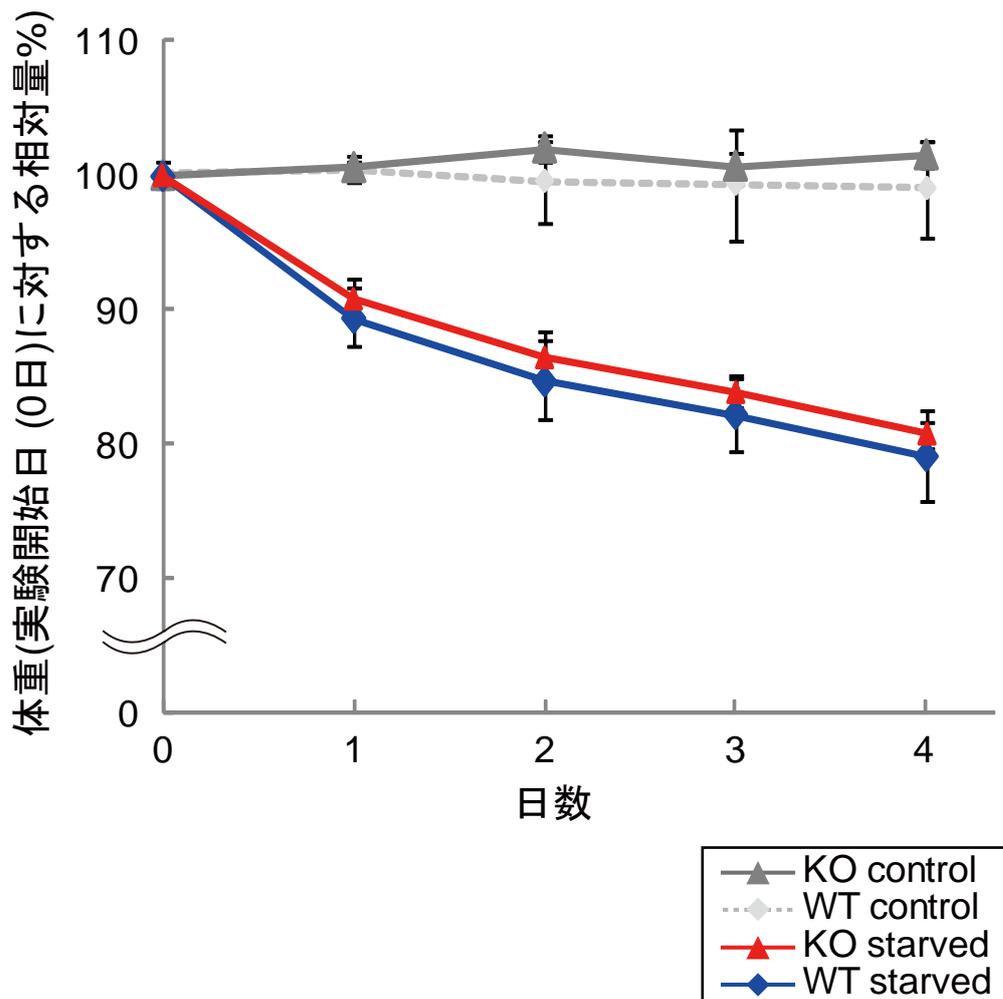
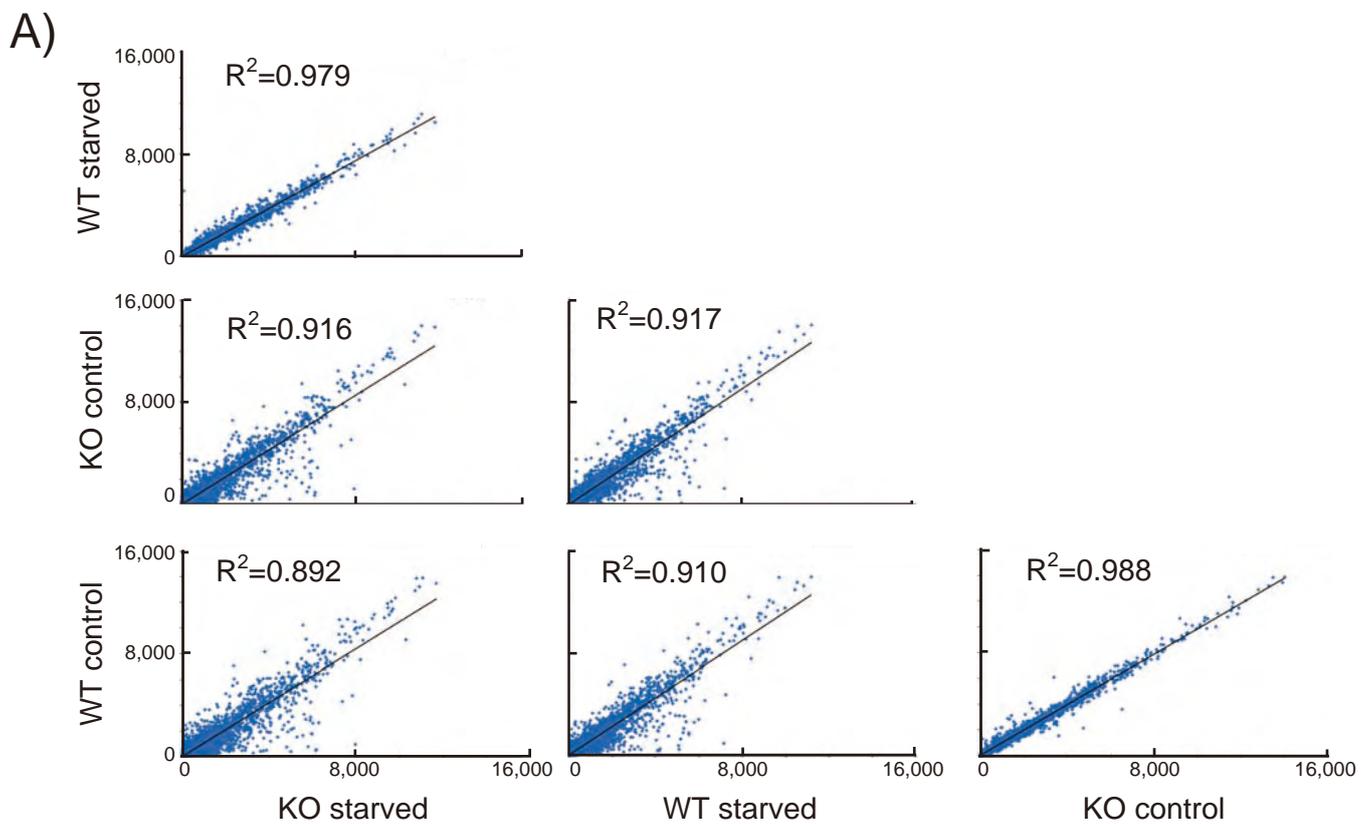


図2-1 絶食による体重変化

WT マウスと MuRF1 KO マウスを通常条件下 (control) もしくは絶食条件下 (starved) で飼育した。

実験開始日を 0 日とし、各日の体重を測定した。結果は、各群の平均値を 0 日に対する相対値 (%) として表した。mean ± S.D. (control 群、2 日目まで n=4、それ以降 n=3。

starved 群、2 日目まで n=3、4 日目まで n=2)



B) MuRF1 KO マウスで絶食時に発現上昇 (1,162 プローブ)

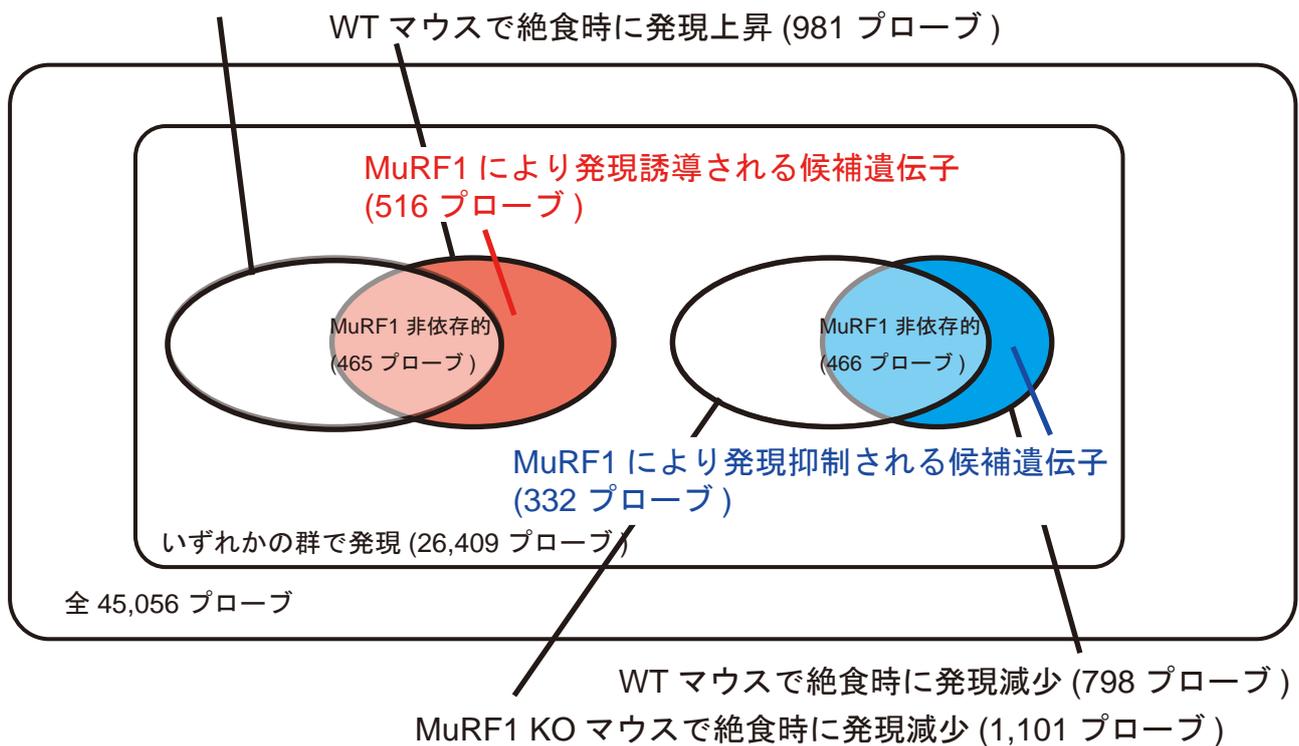


図2-2 WTマウスとMuRF1 KOマウスの絶食時における遺伝子発現変化

図 2-1 に示した各群のマウスについて、実験開始 2 日目に 1 匹ずつを解剖した。得られた骨格筋から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

- A) 全プローブのシグナル値により正規化後、各群の間でスキャッタープロットを作成した。
- B) WT、MuRF1 KO マウスそれぞれについて、control 群と starved 群間で発現量が変化している遺伝子を抽出した。この際、「シグナル値に 2 倍以上の差がある」「GCOS により発現量に変化していると判定され、かつ、少なくとも一つの群で発現が認められる」を判定基準とした。

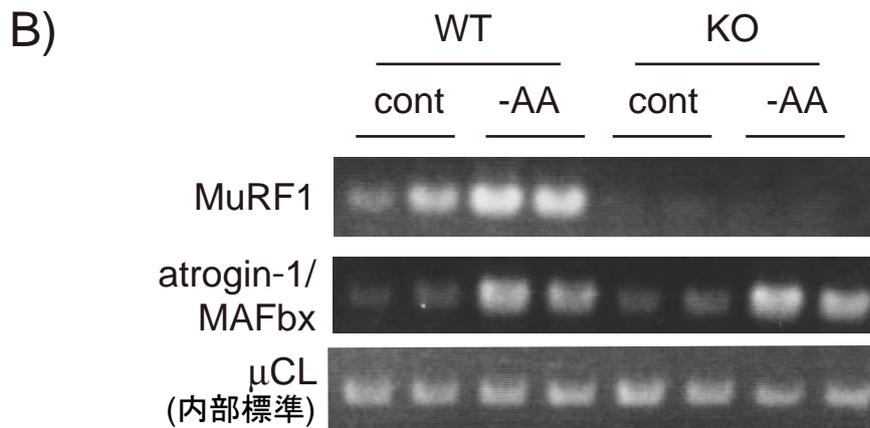
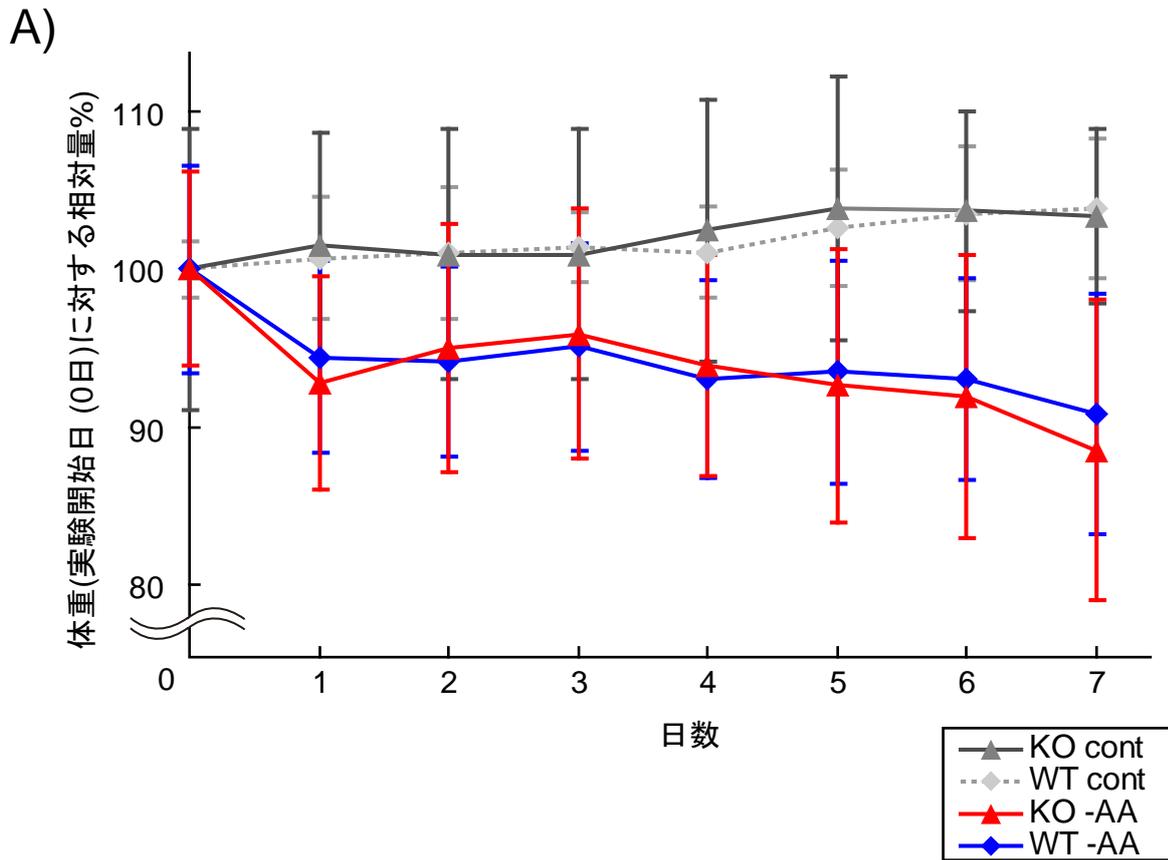


図2-3 アミノ酸飢餓(-AA)による体重変化と、MuRF1の発現量変化

WTマウスとMuRF1 KOマウスを通常条件下(cont)もしくはアミノ酸飢餓条件下(-AA)で飼育した。

- A) 実験開始日を0日とし、各日の体重を測定した。結果は、各群の平均値を0日に対する相対値(%)として表した。mean \pm S.D. (n=3)
- B) 各群のマウスを7日目に解剖し、骨格筋を採取した。そこからtotal RNAを抽出し、半定量RT-PCRによりMuRF1とatrogen-1の発現量を比較した。 μ CLは内部標準として行った。なお、PCRのサイクル数を何通りか設定して行い、PCR産物がプラトーに達していないことを確認した。