

博士論文

骨格筋肥大におけるリボソーム生合成の役割
(Roles played by ribosome biogenesis in skeletal muscle
hypertrophy)

中田智史

略語一覧

WK 群 : Weak overload 群
MO 群 : Moderate overload 群
MI 群 : Middle overload 群
ST 群 : Strong overload 群
CON 群 : コントロール群
AcD : アクチノマイシン D
OL 脚 : Overload 脚
NL 脚 : Non- Overload 脚
PLA : plantaris muscle
GAS : gastrocnemius muscle
TA : tibialis anterior muscle
EDL : extensor digitorum longus muscle
SOL : soleus muscle
CSA : cross sectional area
MND : myonuclear domain
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
UV : ultra violet
RIPA バッファー : Radio-Immunoprecipitation Assay バッファー
CBB : Coomassie Brilliant Blue
mTOR : mammalian target of rapamycin
p70S6K : p70 ribosomal S6 kinase
rpS6 : ribosomal protein S6
mRNA : messenger RNA
rRNA : ribosomal RNA
tRNA : transfer RNA
MHC : myosin heavy chain
Pol I : RNA ポリメラーゼ I
Pol II : RNA ポリメラーゼ II
UBF : upstream binding factor
pRb : retinoblastoma protein
ppRb : phospho- retinoblastoma protein
PBS : リン酸塩緩衝生理食塩水(phosphate- buffer saline)
TBS : トリス緩衝生理食塩水(Tris- buffer saline)
TBST : トリス緩衝生理食塩水(Tris- buffer saline)- 0.1% tween-20
PVDF : polyvinylidene difluoride
SDS : ラウリル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate)
EGTA : グリコールエーテルジアミン四酢酸
EDTA : エチレンジアミン四酢酸
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

目次

序章.....	1
1) 研究背景.....	2
a. 始めに.....	2
b. 筋核数と筋肥大.....	4
c. タンパク合成と筋肥大.....	10
d. タンパク翻訳効率と筋肥大.....	11
e. タンパク翻訳キャパシティと筋肥大.....	14
2) 本研究の目的と仮説.....	17
3) 論文構成.....	18
第1章(筋肥大率を変えることのできる動物モデルの開発).....	20
1) 背景.....	21
2) 方法.....	23
実験動物.....	23
協働筋切除手術.....	23
筋のサンプリング.....	25
組織学的分析.....	25
統計処理.....	25
3) 結果.....	27
術前術後の体重の変化.....	27
筋重量.....	28
筋線維横断面積.....	30
4) 考察.....	33
第2章(筋核数と筋肥大率).....	35
1) 背景.....	36
2) 方法.....	37
実験動物.....	37
協働筋切除手術.....	37
筋のサンプリング.....	37
筋線維の単離.....	38
筋核の可視化.....	38
焦点の異なる複数枚の画像の取得.....	39
筋線維横紋の観察.....	38
筋核数のカウント.....	39
サルコメア長の測定.....	39
100サルコメアあたりの筋核数の算出.....	40
統計処理.....	40

3) 結果.....	41
100 サルコメアあたりの筋核数の変化.....	41
筋重量/体重と 100 サルコメアあたりの筋核数の相関.....	42
4) 考察.....	43
第 3 章 (翻訳調節因子と筋肥大率)	45
1) 背景.....	46
2) 方法.....	48
実験動物.....	48
協働筋切除手術.....	48
実験期間の設定.....	48
筋のサンプリング.....	48
ウェスタンブロットティング.....	49
RNA の抽出.....	50
rRNA の定量.....	51
筋肥大率との間の量的関係の検討.....	51
統計処理.....	52
3) 結果.....	53
体重, 筋重量の変化.....	53
p70S6K.....	53
rpS6.....	55
UBF.....	57
CBB.....	59
18+28S rRNA 量.....	60
リボソーム生合成の効率の評価.....	62
翻訳調節因子の量と筋重量/体重の関係.....	63
リボソーム生合成に関わる上流因子と rRNA 量との関係.....	66
4) 考察.....	68
第 4 章 (リボソーム生合成は筋肥大率を規定するか?)	74
1) 背景.....	75
2) 方法.....	76
実験動物.....	76
アクチノマイシン D 投与.....	76
協働筋切除手術.....	77
筋のサンプリングとタンパク質合成の定量.....	78
RNA の抽出.....	78
rRNA の定量.....	79
ウェスタンブロットティング.....	79
統計処理.....	80
3) 結果.....	81

体重の変化.....	81
摂餌量の変化.....	82
筋重量/体重.....	83
筋 1 mg あたりの 18+28S rRNA 量.....	84
タンパク合成速度.....	85
rRNA 量と筋重量/体重の関係.....	86
4) 考察.....	87
第 5 章 (総合論議)	90
1) 結果のまとめ.....	91
2) 重回帰分析による筋肥大率に対する寄与度の判定.....	94
3) 筋肥大と筋核数の関係.....	94
4) 筋肥大とタンパク翻訳効率調節因子, 翻訳キャパシテイ.....	95
5) 展望.....	97
参考文献.....	99
謝辞.....	108

序章

序章

1) 研究背景

a. 始めに

骨格筋は人体の組織の中でも有数の可塑性を持つ組織であり、トレーニングなどの負荷の増大によって骨格筋は肥大し(Goldberg 1967; Gonyea & Ericson 1976; Ogasawara et al. 2012; Tamaki et al. 1992; Watanabe et al. 2013), また逆に不活動などに伴う負荷の減少によって萎縮する(Thomason & Booth 1990; Ikezoe et al. 2011).

骨格筋は生体における単なる動力源であるだけに留まらず、近年で人体最大の内分泌器官として働いている可能性があることも知られてきている(Febbraio & Pedersen 2005; Manabe et al. 2012; Pedersen 2011). そのため、筋量の維持や増加はスポーツ選手のパフォーマンス改善だけでなく、生活習慣病の予防や加齢による筋減弱症(サルコペニア)予防(Borst 2004, Zurlo et al 1990)といった観点から再評価されはじめている。これらのことから、骨格筋肥大のメカニズムの解明は運動生理学やスポーツ科学の知見を増やすだけに留まらず、健康な社会作りやスポーツの発展など多角的な貢献に繋がると考えられる。

これまでも骨格筋肥大のメカニズムの解明を目的とした研究は多く行われており、骨格筋の肥大には様々な因子が関与することが明らかになってきている。そのなかでも、筋核数の増加(Rehfeldt 2007b), mTOR 系シグナルの活性化(Baar & Esser 1999; Terzis et al. 2008), リボソーム生合成の活性化(Chaillou et al. 2014; Figueiredo et al. 2015)が筋肥大の程度を大きく規定する可能性の高い代表的な因子として着目されている。筋核数の増加は筋線維が制御可能な細胞質の大きさを広げると考えられ、長年着目されている。また、mTOR 系シグナルの活性化はタンパク合成の律速段階であるタンパク翻訳開始段階を促進することから、筋肥大を引き起こす中心的な役割を担っていると考えられ、近年多くの研究が行われている。さらに、リボソーム生合成はこれまで筋肥大との間の関係は不明であったが、ごく最近、徐々に筋肥大に対して重要な役割を担っている可能性が報告され始めており関心が高まってきている。しかし、こ

序章

これまでこれらの因子の活性化と筋肥大の関係は、単独での検討しか行われていない。そのためこれらの因子の寄与の大きさを比較することができず、実際にどの因子が筋肥大率を規定しうるのかについては分かっていない。

本研究では、筋肥大率を規定する因子の候補として有力な筋核数の増加、mTOR 系シグナルの活性、リボソーム生合成について、同一の筋肥大率可変モデルを用いて筋肥大率との間の量的関係を調べることでどの因子が筋肥大率を規定する因子になりうるのかを調べる。

b. 筋核数と筋肥大

筋核と MND 仮説

骨格筋が高い可塑性を有している一因として、筋線維が多数の筋核が巨大な細胞質を共有する多核細胞であることが挙げられる。それぞれの筋線維は多くの筋核をその細胞膜直下に含んでおり (Fig.0-1), この核は多数の筋芽細胞が筋管へと融合したことに由来する (Zammit et al. 2006).

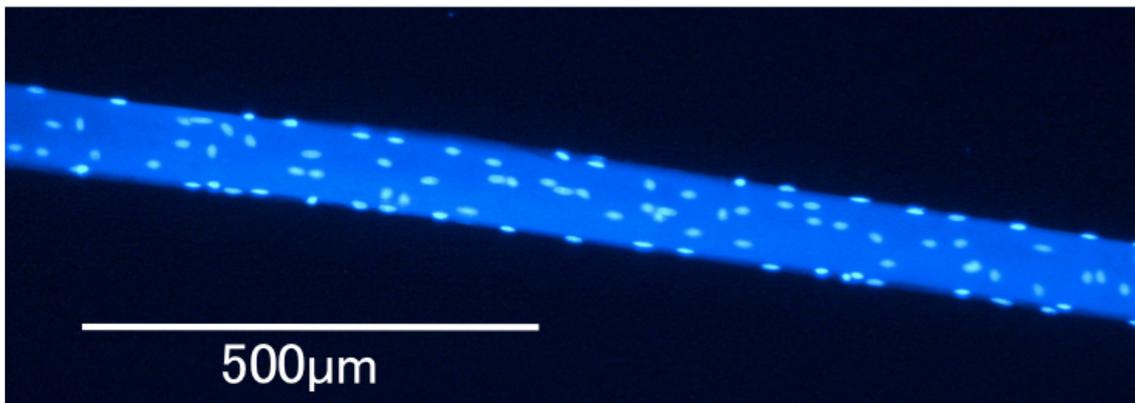


Fig.0-1 筋線維中に筋核は多数存在する。

単離したラット足底筋筋線維を DAPI により染色した。

これらの筋核は細胞質を共有しているが、それぞれの核ごとに筋核ドメイン (myonuclear domain ; MND) と呼ばれる支配細胞領域があり、その支配領域には上限があるとする MND 仮説が提唱されている (Cheek 1985; Hall & Ralston 1989; Allen et al. 1995; Allen et al. 1999). この仮説はある筋核から転写された mRNA はその核の直近の領域にのみ存在したとする報告に基づいている (Hall & Ralston 1989). この mRNA の偏在は、核から転写された mRNA は細胞質内へ拡散するが mRNA は時間とともに分解されるため、mRNA の拡散は由来となる核からある程度の範囲のみに限定されるためだろうと考えられている (Edgerton & Roy 1991). また、mRNA だけでなく作られるタンパクも由来となる筋核の周辺に偏在すると考えられ、実際にヒト由来の筋芽細胞とマウス由

来の筋芽細胞を共培養し、キメラ筋管細胞を作成した研究ではヒトの筋核由来のミオシン重鎖はその核の周辺にのみ存在したことを報告している (Fig.0-2)(Pavlath et al. 1989). そのため、筋線維のそれぞれの筋核は支配できる細胞質領域に上限があるとする MND 仮説が支持されている.

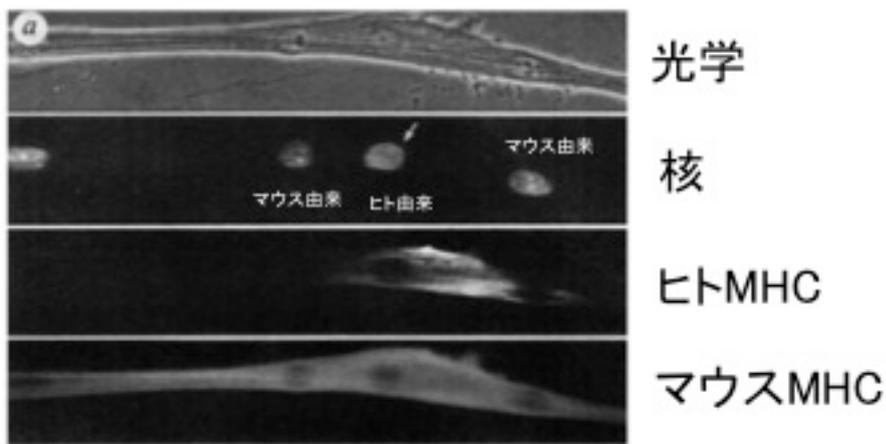


Fig.0-2 核から作られるタンパク質は由来となる核の周りに偏在する.

上から順に、筋管細胞の光学による観察像、筋核の Hoechst33258 染色像、ヒト MHC の免疫染色像、マウス MHC の免疫染色像.

Pavlath et al. 1989 より図を改変.

MND 仮説によると, 大きな筋線維は支配すべき細胞質が大きいいため多くの筋核が必要になると考えられる. 実際に成熟した動物において安定した状態にある筋線維に存在する筋核数は筋線維の大きさに正比例することが知られている (Fig.0-3) (Bruusgaard et al. 2003; Brack et al. 2005; Liu et al. 2009; Kadi et al. 1999; Sinha-Hikim et al. 2002). このことも MND 仮説を間接的に支持していると言える.

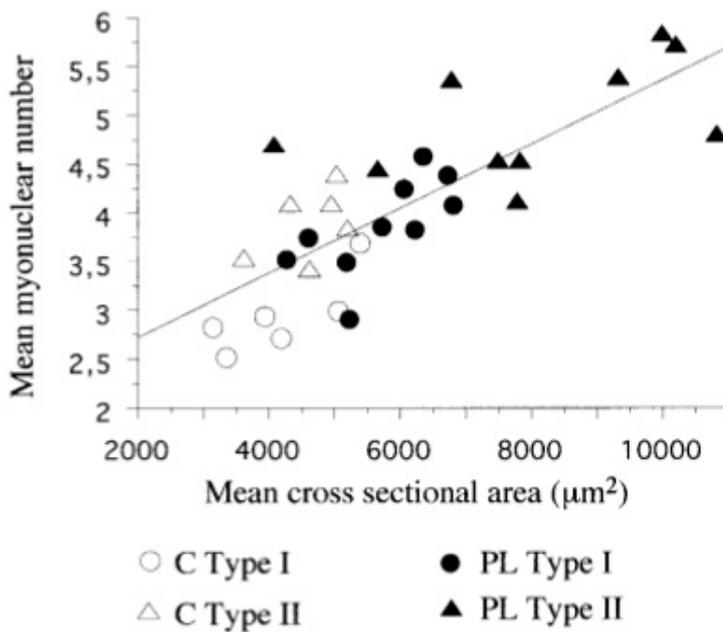


Fig.0-3 筋線維の大きさと筋核数の間には相関がある.

僧帽筋筋線維の大きさと筋核数の関係 (パワーリフティング選手(PL)と一般男性(C)の比較).

横断切片(5μm 厚)において筋線維 1 本あたりに含まれる筋核数と筋線維横断面積を測定.

F Kadi et al. 1999 より.

MND 仮説と筋肥大

MND サイズに制限があると仮定すると、細胞質の大きさが急速に大きくなる骨格筋肥大の際には MND サイズの維持のために新たな筋核を追加する必要があると考えられる。しかし、筋肥大に筋核の追加が必須か否かについては相反する報告がある(O'Connor et al. 2007; Rehfeldt 2007a)。筋肥大の際の MND サイズの変化を調べた研究では、筋肥大の前後で MND サイズが一定に保たれていることがヒト、実験動物両方で報告されている(Allen et al. 1995; Roy et al. 1999; van der Meer et al. 2011; Adams et al. 2002; Petrella et al. 2006)。また、筋にガンマ線を照射し、筋核の供給元であるサテライト細胞の有糸分裂活性を破壊し、その後に過負荷をかけた研究(Fig.0-4)では、筋肥大が起こらないことが報告されている(Adams et al. 2002; Phelan & Gonyea 1997; Rosenblatt & Parry 1992)。そのため、骨格筋の肥大には筋核数の増加が必須であり(Fig.0-5)、筋核数の増加が筋肥大を規定していると長い間一般的に考えられていた。

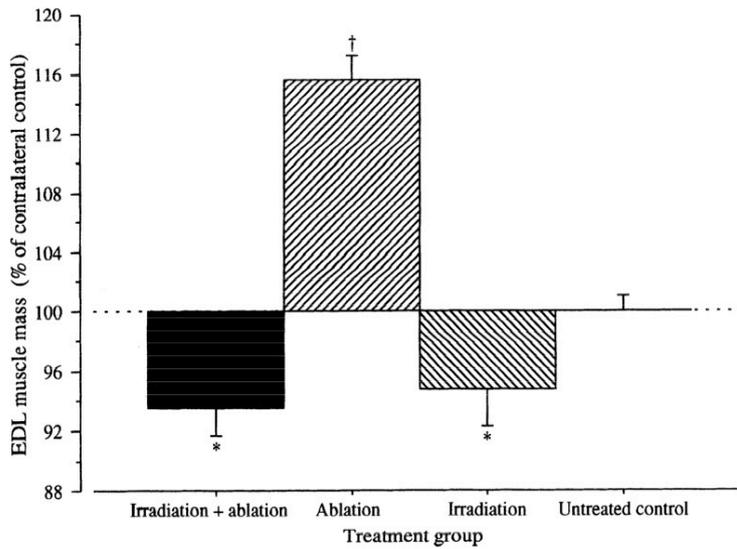


Fig.0-4 ガンマ線照射により筋肥大は阻害される.

ガンマ線照射(Irradiation)+協働筋切除(Ablation), 協働筋切除, ガンマ線照射, 安静状態(Untreated control)の Maus 長趾伸筋の筋量 (安静状態を 100%として表示).

Rosenblatt & Parry 1992 より.

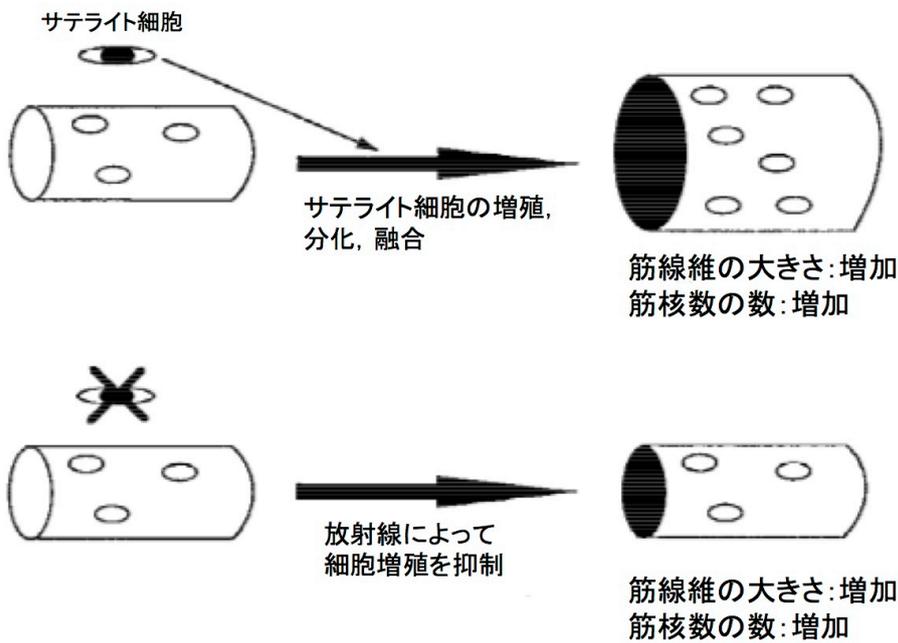


Fig.0-5 筋核数の増加と筋肥大の間の関係の模式図.

Allen et al. 1999 より図を改変.

しかし、ある程度の筋肥大ならば筋核の追加が起きなくても、筋肥大が可能であるとする研究も多く報告されていることから(van der Meer et al. 2011; Petrella et al. 2006; Kadi et al. 2004; Snow 1990), 筋核が筋肥大に必須であるとする説は疑問がもたれている。また、最近の条件的遺伝子改変マウスを用いた研究では、後天的にサテライト細胞を除去した後に筋に過負荷をかけたところ、筋肥大が全く損なわれていなかったと報告された(McCarthy et al. 2011)。

このように筋肥大に対して筋核の増加が必須か否かについては研究者ごとに意見が相反している。そのため、筋核数の増加が筋肥大に対してどの程度寄与しているのかについては未だ明らかになっていない。

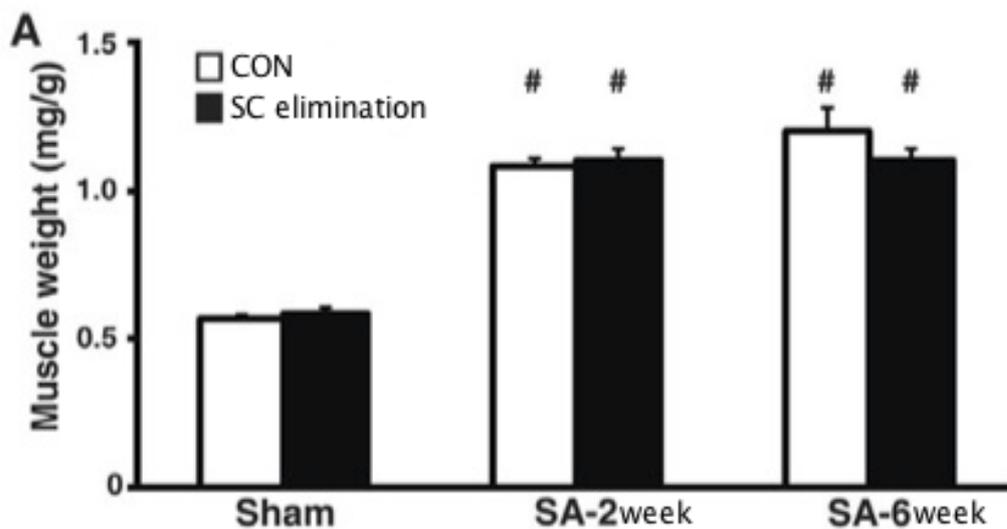


Fig.0-6 条件的遺伝子改変によるサテライト細胞除去は協働筋切除による筋肥大に影響を及ぼさない。

SA : 協働筋切除, McCarthy et al. 2011 より図を改変.

c. タンパク合成と筋肥大

骨格筋に対する負荷の増大に適応しておこる筋肥大は筋原線維タンパクなどを新たに作る必要があるため、タンパク合成を高める必要がある(Timson 1990). タンパク合成には DNA から mRNA の転写過程, mRNA からタンパクへの翻訳過程, 翻訳後の修飾などの複数の過程があるが, その中でも特にタンパク翻訳の過程が最も重要なイベントであると考えられている.

タンパク翻訳には翻訳キャパシティと翻訳効率の2つの要素があり, 翻訳キャパシティは単位組織中の翻訳装置(リボソーム, tRNA, 翻訳因子)の量, 翻訳効率は翻訳装置の稼働率によって決定されるとされている(McCarthy & Esser 2010; Millward et al. 1973). そのため, タンパク翻訳活性に関して以下の式が成り立つ.

$$\text{タンパク翻訳活性} = \text{翻訳キャパシティ} \times \text{翻訳効率}$$

骨格筋において, 一過性(分~時間単位)の刺激は既存の翻訳装置の活性化, つまり翻訳効率の増加によってタンパク合成を促す. 一方で長期間(時間~日単位)の刺激はリボソーム生合成を高めることでリボソームの増加, つまり翻訳キャパシティの増加によってタンパク合成の増加を引き起こすと考えられている(Chaillou et al. 2014).

d. タンパク翻訳効率と筋肥大

翻訳効率と筋肥大の関係

タンパク翻訳の過程は、開始段階、伸長段階、終了段階の3つの段階からなっている(Bergmann & Lodish 1979). この3つすべての段階が様々な調整を受けているが、特に開始段階がタンパク翻訳の律速段階になっており、翻訳効率を決める重要な段階になっていることが示されている(Kahvejian et al. 2005; Sonenberg & Gingras 1998)

mTOR 系シグナル経路は翻訳の開始段階を調節する重要な因子として知られている(Kleijn et al. 1998). mTOR はその下流の因子である p70S6K をリン酸化し、さらに活性化された p70S6K はリボソームの 40S サブユニットに存在するタンパクである rpS6 をリン酸化することでリボソームによる mRNA の翻訳開始が活性化される.

p70S6K は骨格筋への負荷が増大することで活性化されることが知られており(Zanchi & Lancha 2008), さらに mTOR の特異的な阻害剤であるラパマイシンは p70S6K の活性化を抑制するため、ラパマイシンの投与は協働筋切除による骨格筋肥大や分裂促進因子による培養筋芽細胞の成長を抑制することが報告されている(Fig.0-7)(Bodine et al. 2001; Kimball et al. 1998; Anthony et al. 1999; Goodman et al. 2011b). そのため、筋への負荷が増大した際に、骨格筋は p70S6K 活性化を介してタンパク翻訳効率を高めることで筋肥大を引き起こしていると考えられることから、骨格筋量との間の関係が着目されている.

p70S6K と筋肥大率との間の関係

骨格筋量と p70S6K 活性化との間の関係は Baar らによって初めて報告された(Baar & Esser 1999). Baar らは脊椎を通して電気刺激をすることで、ラット下腿の複数の筋に対して、レジスタンス運動を模した筋収縮を起こすモデルを用いて、p70S6K 活性化と筋肥大の間の関係を調べた(Fig.0-8). その結果、電気刺激後 6 時間後の p70S6K 活性化量と電気刺激による 6 週間のトレーニングによって得られる筋量の増加の間には強い正の相関が見られた. さらにヒトに対するレジスタンストレーニングでも、初回のレジスタンス運動の後の p70S6K 活性化量と 12 週間のレジスタンストレーニングによって得られる筋量の間には正の相関が見られている(Terzis et al. 2008). そのため、多くの研究者が筋に対する負荷増大後の p70S6K 活性化量とその後得られる筋肥大率との間に強い関連性があり、筋肥大率を規定する因子の候補として考えている.

しかし、p70S6K 活性化量と筋肥大率の相関が弱いもしくは見られないこともあることから(Mitchell et al. 2012; Mitchell et al. 2013), p70S6K 活性と筋肥大率の間の関係は未だ不明な点が多い.

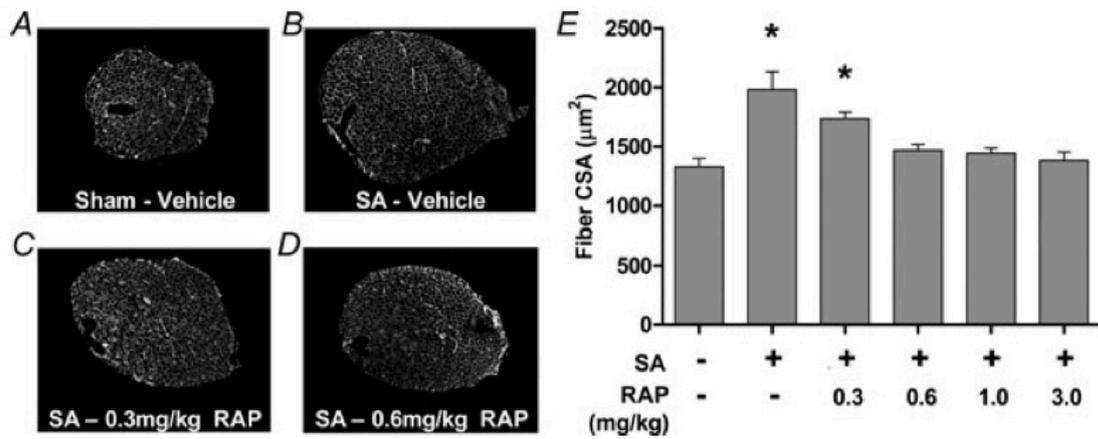


Fig.0-7 協働筋切除によって起こる筋肥大はラパマイシン投与によって抑制される。

Goodman et al. 2011b より.

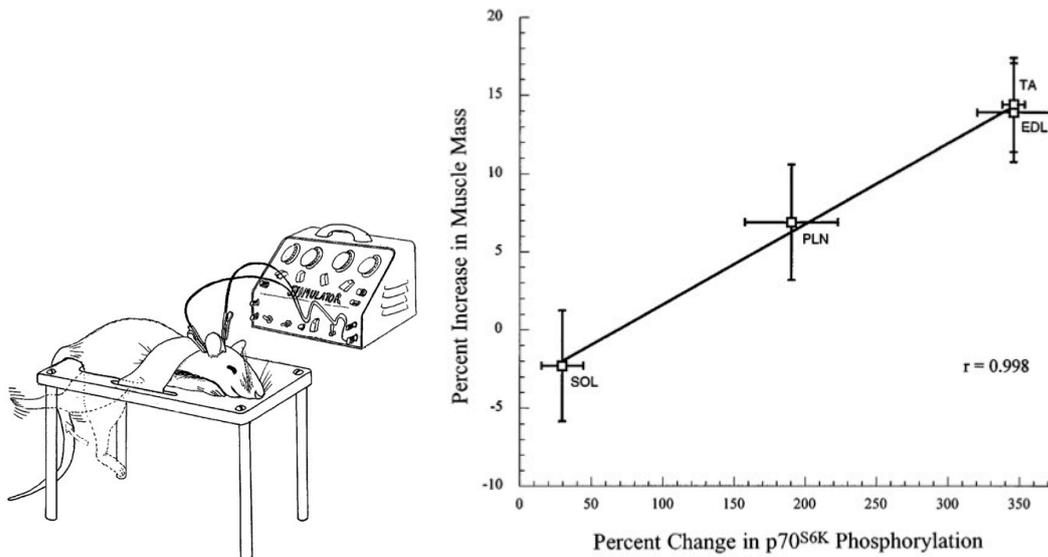


Fig.0-8 電気刺激後早期の p70S6K 活性化の増加量とその後の筋肥大率の間には強い正の相関が見られる。

Baar & Esser 1999 より.

e. タンパク翻訳キャパシティと筋肥大

タンパク翻訳キャパシティとリボソーム生合成の関係

翻訳キャパシティは単位組織中の翻訳装置（リボソーム， tRNA， 翻訳因子）の量によって決定されるとされている(McCarthy & Esser 2010; Millward et al. 1973)が， このなかでも特に翻訳自体を行うリボソーム量が翻訳キャパシティの決定的な因子として考えられている。

リボソームは 18S, 28S, 5.8S, 5S からなる 4 種類のリボソーム RNA と約 80 種類のリボソームタンパクから構成されており， 必要な因子の合成やそれらの組み立てはリボソーム生合成と呼ばれている(Moss et al. 2007).

細胞はリボソーム生合成に対して多くのコストをかけており， 盛んに増殖を行っている細胞では転写されている RNA のうち 80%が rRNA であることや， RNA ポリメラーゼ II によって転写される mRNA のうち約 50%がリボソームタンパクに関わるものであることが知られている(Warner 1999; Granneman & Tollervey 2007). このように細胞はリボソーム生合成に莫大なエネルギーを費やしていることから細胞の成長や維持にリボソーム生合成が中心的な役割を果たしていると考えられる。

リボソーム生合成を調節する因子

ヒトにおいて 28S, 5.8S, 18S rRNA は一つの転写単位に由来し， 45S pre rRNA としてポリメラーゼ I (Pol I)によって核小体で転写される。 Pol I による rRNA の転写を行うためには， Pol I と Upstream binding factor(UBF)と Selectivity factor 1(SL1)からなる転写開始複合体を形成する必要がある。 SL1 はリボソーム RNA 遺伝子のコアプロモーター配列(Core promoter element)に結合， UBF はコアプロモーター配列の上流(Upstream promoter element)に結合することで転写開始複合体の形成が促され， rRNA が転写される(Fig.0-9). UBF や SL1 は mTOR 系シグナル， c-myc シグナル系と言った様々な上流シグナルによる調整を受けており， それらによる UBF タンパク量の増加や UBF のリン酸化， アセチル化は転写開始複合体の形成を促進し， rRNA 転写に影響を

与えている。UBF は様々な調整を受けることが知られており、mTOR 系による UBF のリン酸化は SL1 との結合力を増加させ、rRNA の転写を促進する (Hannan et al. 2003)。またリン酸化以外にも UBF のタンパク量自体も rRNA 転写能力に影響を与えていると考えられ、c-MYC は UBF の発現を促進することで rRNA の転写を促進する。実際に、UBF のリン酸化の増加や UBF 量の増加は rRNA の転写を増加することが報告されている (Hannan et al. 2003; Sanij et al. 2008; Brandenburger et al. 2001)。

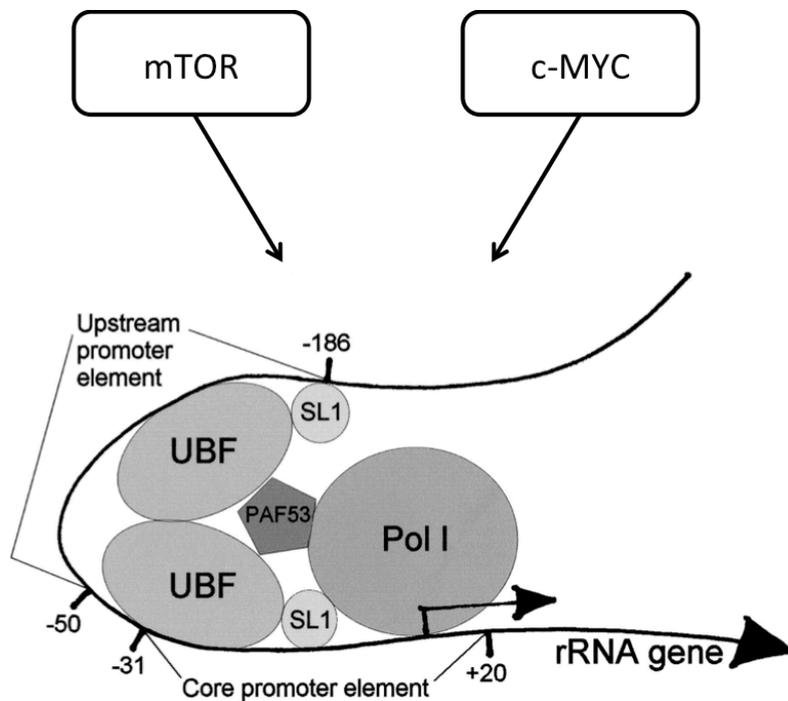


Fig.0-9 Pol I , UBF, SL1 からなる rRNA 転写開始複合体の模式図.

Bjerregaard 2003 より改変.

リボソーム生合成と筋肥大の関係

これまで筋肥大の際のタンパク合成には翻訳効率の活性化に関して研究が多く行われている一方で、リボソーム生合成が筋肥大の際にどのような役割をもっているかについてはあまり着目されてこなかった。

しかし、Fig.0-10 に示す様に近年骨格筋に過負荷がかかった際に UBF や Retinoblastoma protein (pRb)などが活性化することが、培養筋管細胞を用いた研究やマウスを用いた研究で示されている(Goodman et al. 2011b; Nader et al. 2005), そのため、リボソーム生合成が筋肥大に与える影響について関心が集まり始めている(Chaillou et al. 2014). また、ごく最近のヒトのレジスタンストレーニングの際のリボソーム生合成の関係を調べた研究から、筋肥大の程度とリボソーム生合成の活性化の程度の間に関係性があると報告されている(Figueiredo et al. 2015). そのため、リボソーム生合成はこれまで考えられていた以上に筋肥大の達成に対して重要である可能性が考えられる。

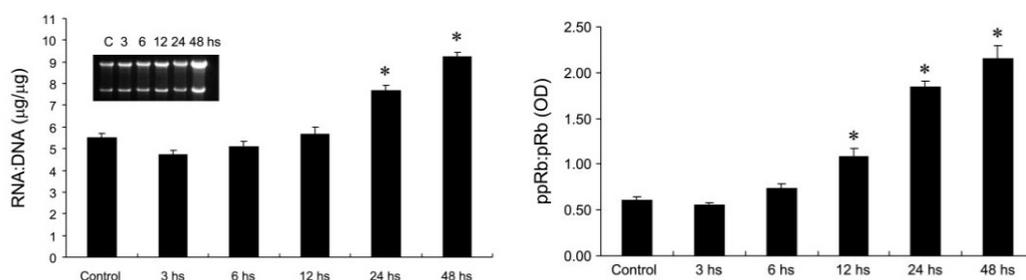


Fig.0-10 血清刺激した培養筋管細胞における RNA 量，活性化 pRb(ppRb)量の変化.

Nader et al. 2005 より.

2) 本研究の目的と仮説

本研究の目的は、筋肥大率を規定する因子の候補として有力な筋核数の増加, mTOR 系シグナルの活性, リボソーム生合成について, 同一の筋肥大率可変モデルを用いて筋肥大率との間の量的関係を調べることでどの因子が筋肥大率を規定する因子になりうるのかを調べる.

肥大率を変えることのできる筋肥大モデルを用いて, 得られる筋肥大率と筋肥大を規定する可能性の高い筋核数, 翻訳効率を高める細胞内シグナルの活性化量, リボソーム生合成の活性化量の量的関係を調べる. それにより, Fig.0-11 のように肥大率と因子の量の間から, その因子が筋肥大に対してどのように寄与しているかを予測することができると考えられる. ある因子の活性化量と筋肥大率の間に強い相関があれば, その因子は筋肥大率を規定している可能性のある因子として有力であると考えられる. 筋肥大率を規定する因子として有力であった因子は, 実際に筋肥大率を規定する因子として働いているのかを阻害実験を行うことで検討する.

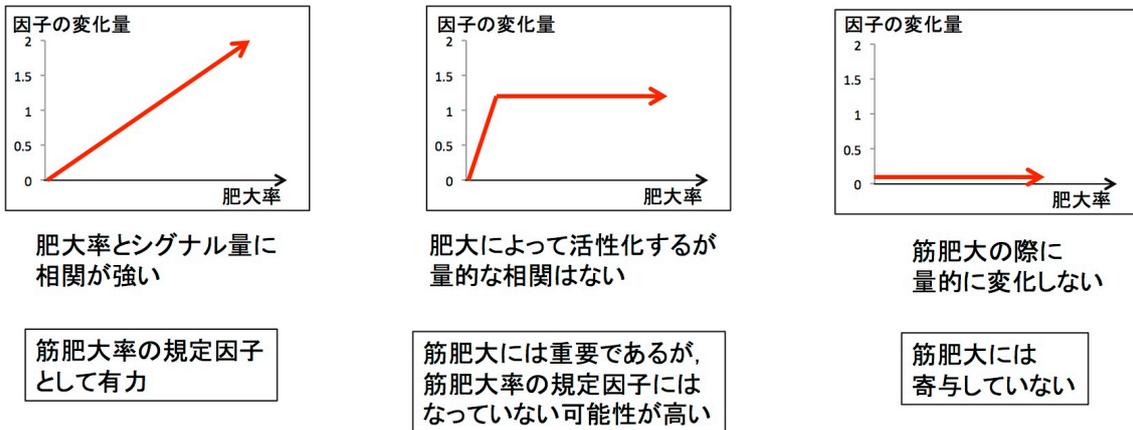


Fig.0-11 筋肥大率と関連因子の活性化量との間の量的関係.

3) 論文構成

本研究は4つの研究により構成される。

研究1

研究1では、筋肥大率を変えることのできる動物モデルの作成を目的とした。従来の協働筋切除による足底筋筋肥大モデルを改良し、足底筋にかかる過負荷の大きさを4段階に変えることのできる筋肥大モデルを作成した。このモデルを用いて14日間の力学的過負荷を足底筋にあたえ、筋重量の変化と筋線維横断面積の変化を調べ、作成したモデルが実際に筋肥大率を変えることのできる動物モデルとして妥当かどうかを検討した（第1章）。

研究2

研究2では、筋核数が筋肥大率に対してどの程度寄与しているかについて検討した。研究1で作成したモデルを用いて、過負荷を施して14日後の筋核数の変化を単離筋線維レベルで測定し、筋肥大率との間の量的関係を検討した（第2章）。

研究3

研究3では、翻訳活性を決定する翻訳効率と翻訳キャパシティに関係する因子が筋肥大率に対してどの程度寄与しているかについて検討した。研究1で作成したモデルを用いて、過負荷を施して5日後の翻訳効率を活性化するp70S6Kのリン酸化がどのように変化するかを測定し、筋肥大率との間の量的関係を検討した。またrRNA量とリボソームタンパク量がどのように変化するかを調べ、それらが筋肥大率とどのような量的関係を持っているのかについて検討した。また、リボソーム生合成を高めるシグナルの量がどのように変化するかについても検討を行った（第3章）。

研究4

研究4では、リボソーム生合成の薬理的阻害が筋肥大に与える影響を検討

序章

した。アクチノマイシン D により rRNA 合成を阻害した状態で、協働筋切除による筋に過負荷を与え、5 日後の筋重量やタンパク合成速度にどのような影響があるかを検討した (第 4 章)。

以上の実験結果を総括し、筋肥大率を規定する因子について考察した。さらに本研究で明らかにできなかった点をふまえ、今後の展望について検討した(第 5 章)。

第1章

筋肥大率を変えることのできる動物モデルの開発

1) 背景

筋肥大率を規定する因子の探索のためには研究に適した動物モデルの選択が重要である。しかし、これまでもいくつかの筋肥大率を変える試みは行われてきたものの、真に適したモデルは存在しなかった。Royらは協働筋切除によって足底筋に過負荷を与えるのに加え、トレッドミルによる走行トレーニングを追加することで更なる筋肥大が起こるモデルを作成した(Roy et al. 1999)。これによって得られる安静群、協働筋切除群、協働筋切除+走行群の3つ群の肥大率を比較し、筋肥大率と筋核数の変化の関係を観察している。しかし、彼らのモデルは協働筋切除による過負荷という慢性的な機械的刺激と一過性の刺激である走行運動を組み合わせているため、筋の適応反応の時間的な変化が複雑になると予想される。そのため、細胞内シグナルの変化を観察する場合には観察するタイムポイントの設定が困難になると予想されるため、一般的には使いつらい。また、Baarらは長趾伸筋(EDL)、前脛骨筋(TA)、足底筋(PLA)、ヒラメ筋(SOL)の下腿の筋を電気刺激によって同時に収縮させるレジスタンス運動を模した動物モデルを作成した(Baar & Esser 1999)。6週間の定期的な電気刺激によるトレーニングによって4つの筋ではそれぞれ異なる肥大率が得られるため、その際の筋内の反応を観察している。しかし、彼らのモデルはそれぞれの筋が元々持っている筋線維横断面積や筋線維タイプ組成といった筋線維の特性が大きく異なる(速筋比率 EDL: 98%, TA: 99%, PLA: 91%, SOL: 13%)(Armstrong & Phelps 1984)ため、元々の特性の違いが筋肥大率や生理学的な変化に与える影響を排除することができない。これらのことから筋肥大率を規定する因子を探するためには、適した動物モデルを新たに作る必要がある。

そこで著者は協働筋切除による代償性肥大モデルに着目した。従来の協働筋切除モデルはGoldbergらによって開発された筋肥大モデルである(Goldberg 1967)。この実験モデルは足底筋の協働筋である腓腹筋とヒラメ筋を外科的に切除し、それらの筋が担っていた体重からの負荷を残った足底筋にかけることで大きな力学的負荷を与え、足底筋に2週間程度で約150%の大幅な筋肥大を引き起こすモデルである(Soltow et al. 2006)(Fig.1-1)。従来のモデルは腓腹筋とヒラ

第1章：筋肥大率を変えることのできる動物モデルの開発

メ筋を完全に切除し大きな過負荷を足底筋にかけていたが、著者は手術の際に切除する協働筋の量を変えれば足底筋にかかる過負荷の大きさを変えることができるのではないかと考えた。

そこで、第1章では、協働筋の切除方法の変更が、筋重量や筋線維横断面積といった筋肥大の指標にどのような影響を与えるかを調べる。それにより、筋肥大率を変えることのできる動物モデルを確立することを目的とした。

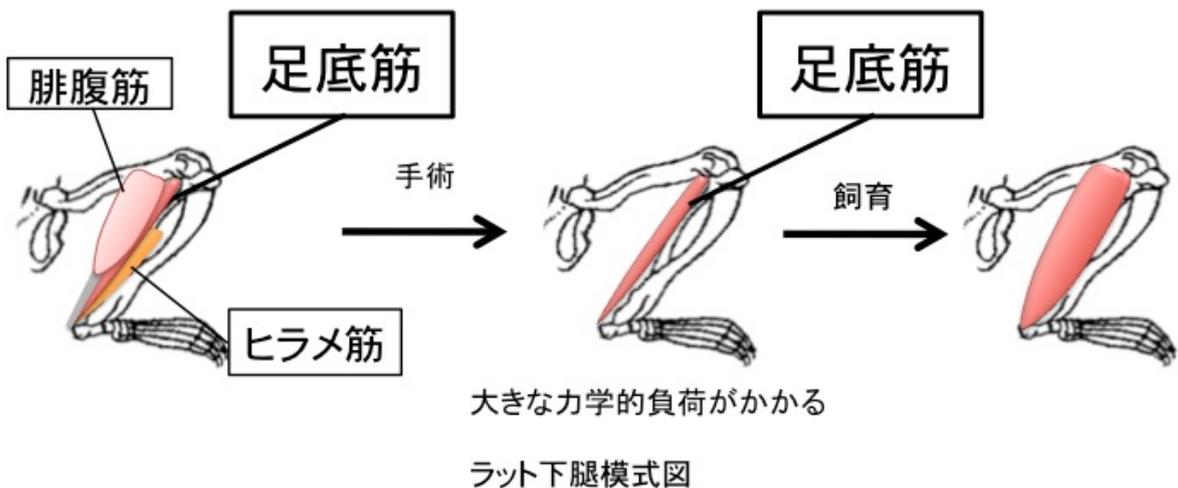


Fig.1-1 従来の協働筋切除手術模式図。

2) 方法

実験動物

Wistar系の雄ラット(11週齢;体重約330g)を日本クレアから購入し、1週間の予備飼育後実験に使用した。ラットは個別のケージに分け、室温22℃、湿度60%、12時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。飼料(CE2;日本クレア)と飲水は自由摂取とした。ラットの扱いと全ての実験手法はThe policy statement of the American College of Sports Medicine on research with experimental animalsに従って採用した。また、本実験は東京大学総合文化研究科実験動物委員会の承認を得た上で行った。

協働筋切除手術

1週間の予備飼育の後、ラットを4群(各8匹)にわけた。4つの群はそれぞれ”weak”過負荷群(WK), ”moderate”過負荷群(MO), ”middle”過負荷群(MI), ”strong”過負荷群(ST)として4種類の異なる協働筋切除手術を施した。足底筋に対する過負荷の大きさをコントロールするため、手術の際に協働筋の切除する部位を群ごとに変更した(Fig.1-2)。

手術はイソフルラン吸入による軽麻酔後、ペントバルビタールを腹腔投与(60 mg/kg body weight)し、麻酔が効いていることを確認の上行った。神経および血管を傷つけないように注意を払い、アキレス腱部から膝窩にかけて皮膚の切開を行った。その後、ST群は足底筋の主要な協働筋である腓腹筋とヒラメ筋を完全に切除した。WK群は腓腹筋の内側頭(①)、外側頭(②+③)に分け、内側頭側を切除した。MO群は腓腹筋の内側頭(①)の切除に加え、さらに外側頭の半分(③)とヒラメ筋を切除した。MI群は腓腹筋の外側頭(②+③)とヒラメ筋を切除した。WK, MO, MI群では腓腹筋の部分切除を行ったが、その際に部分的に残された腓腹筋の筋機能が維持されるように、起始停止の腱と支配する運動神経を損傷しないように留意した。部分的に残された腓腹筋は2週間の期間の間、萎縮の兆候を見せないことを予備実験で確認している。そのため、WK, MO, MI群では腓腹筋の機能を部分的に残した状態で腓腹筋が担っていた負荷の一

部を足底筋に加えることができたと考えられる。

切除後、手術を行った下腿は4-0 ナイロン糸によって縫合した。その後、ラットはケージに戻され、解剖時まで安静とした。

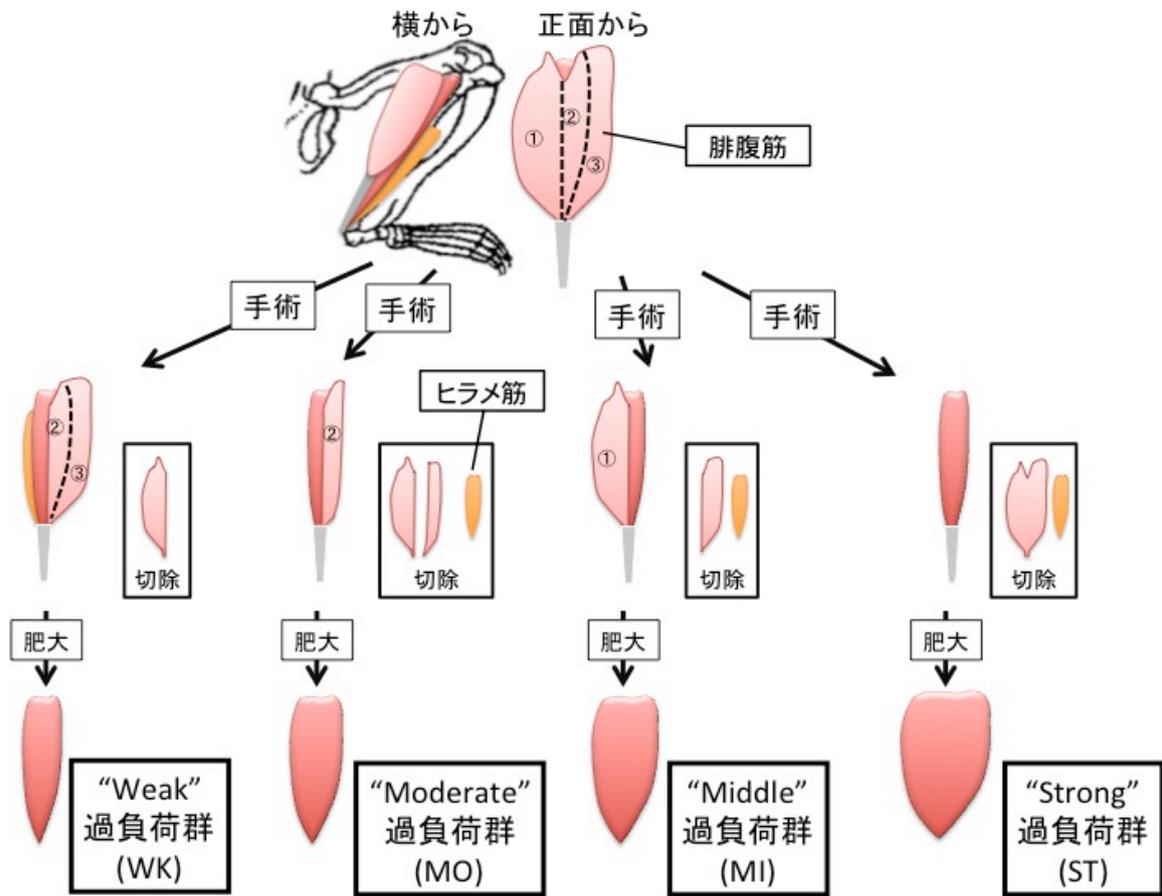


Fig.1-2 協働筋切除モデルのスキーム。

筋のサンプリング

手術から14日後、イソフルラン吸入による軽麻酔後、ペントバルビタールの過剰投与(120 mg/kg body weight, i.p.)によってラットの安楽死を行った後、筋の摘出を行った。摘出した両脚の足底筋はそれぞれ筋湿重量を測定した。足底筋の筋重量は体重の影響を強く受けることが知られている(Tamaki & Uchiyama 1995)。そのため、筋重量は体重の違いの影響を除外するために体重で補正し、筋重量/体重で表記した。筋重量の測定後、足底筋は筋腹の中央で横断的に切断した。切断した遠位部足底筋は OCT コンパウンド(サクラファインテック)で覆った後、液体窒素で冷却したイソペンタンにより急速凍結を行い、組織学的分析用サンプルとした。組織学的分析用サンプルは組織学的分析まで-80°Cで保存した。

組織学的分析

組織学的分析用サンプルはクリオスタットにより薄切し、10 μm 厚の横断切片を作成した。横断切片はスライドガラスに張りつけ後、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。染色した切片は明視野で顕微鏡(Eclipse TE300; Nikon, Tokyo, Japan)による観察を行い、デジタルカメラ(DS-5M; Nikon, Tokyo, Japan)を用いて撮影を行った。撮影した横断切片画像から ImageJ(v. 1.46r; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いてそれぞれの筋に対して1000本以上の筋線維の横断面積(CSA)を測定した。筋線維 CSA は筋重量と同様に体重の影響を受けると考えられるため、筋線維 CSA/体重で表記した。

統計処理

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。体重の結果は対応のある二元配置分散分析(ANOVA; 実験前後 \times 群)を行い、有意な主効果か交互作用があれば、実験前後もしくは個別の群に対して Sidak post hoc テストを用いた多重比較を行った。筋重量/体重、筋線維 CSA/体重は、NL, OL で対応のある二元配置分散分析(NL and OL \times 4 群)を行った。有意な主効果か交互作用が見られた

第1章：筋肥大率を変えることのできる動物モデルの開発

場合、それぞれの群に対して NL-OL 間で Sidak 法を用いた比較を行った。また、4 群間で手術法の差異による効果に有意な差が見られるかを検討するために、NL, OL それぞれに対して 4 群間で Tukey 法を用いた多重比較を行った。筋重量/体重と筋線維 CSA/体重の関係についてはピアソンの積率相関分析を用いて調べた。P 値は 0.05 未満をもって有意とした。

3) 結果

術前術後の体重の変化

表 1-1 にはラットの手術前、手術 14 日後の体重の変化を示した。手術前後とグループの間には交互作用は見られなかった($P=0.23$)。手術前と比較すると手術 14 日後の体重は全ての群で有意に変化しており($P < 0.0001$)、12%程度増加していた。手術前と手術 14 日後の体重の変化率を群間で比較したところ、有意な差は見られなかった($P=0.098$)。

表 1-1 ラット体重の変化。

群	n	体重, g		
		手術前	手術14日後	%増加
WK	8	332.4 ± 6.4	375.4 ± 9.2	12.86 ± 0.78
MO	8	352.1 ± 6.6	384.5 ± 6.4	9.25 ± 0.89
MI	8	327.3 ± 2.6	366.6 ± 4.8	12.02 ± 1.06
ST	8	334.1 ± 5.5	371.3 ± 9.1	11.03 ± 1.29

値は平均値 ± 標準誤差。

筋重量

体重で標準化した足底筋湿重量（筋重量/体重）の結果を Fig.1-3 に示す. 二元配置分散分析を行ったところ, 交互作用が見られた($P < 0.0001$). それぞれの群について NL と OL の比較をしたところ, 全ての群で OL 脚の足底筋の筋重量/体重は NL 脚足底筋に比べて有意に大きな値を示していた(WK; $7.9 \pm 2.4\%$ 増, MO; $18.7 \pm 2.0\%$ 増, MI; $33.1 \pm 3.0\%$ 増, ST; $50.4 \pm 5.3\%$ 増, それぞれ $P = 0.0004$, $P = 0.0003$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$). OL 脚足底筋について群間の比較をしたところ, WK_OL vs. MO_OL ($P = 0.14$)以外では全ての群間で有意な差が見られた. これらの結果から, 4つの群の OL 脚に施した4つの協働筋切除手術は4つの異なる筋重量/体重を作成できたと考えられる. また, NL 脚足底筋について群間の比較をしたところ, 有意な差は見られなかった($P = 0.22$). そのため, 協働筋切除手術の違いは NL 脚の足底筋には影響を及ぼさなかったと考えられる.

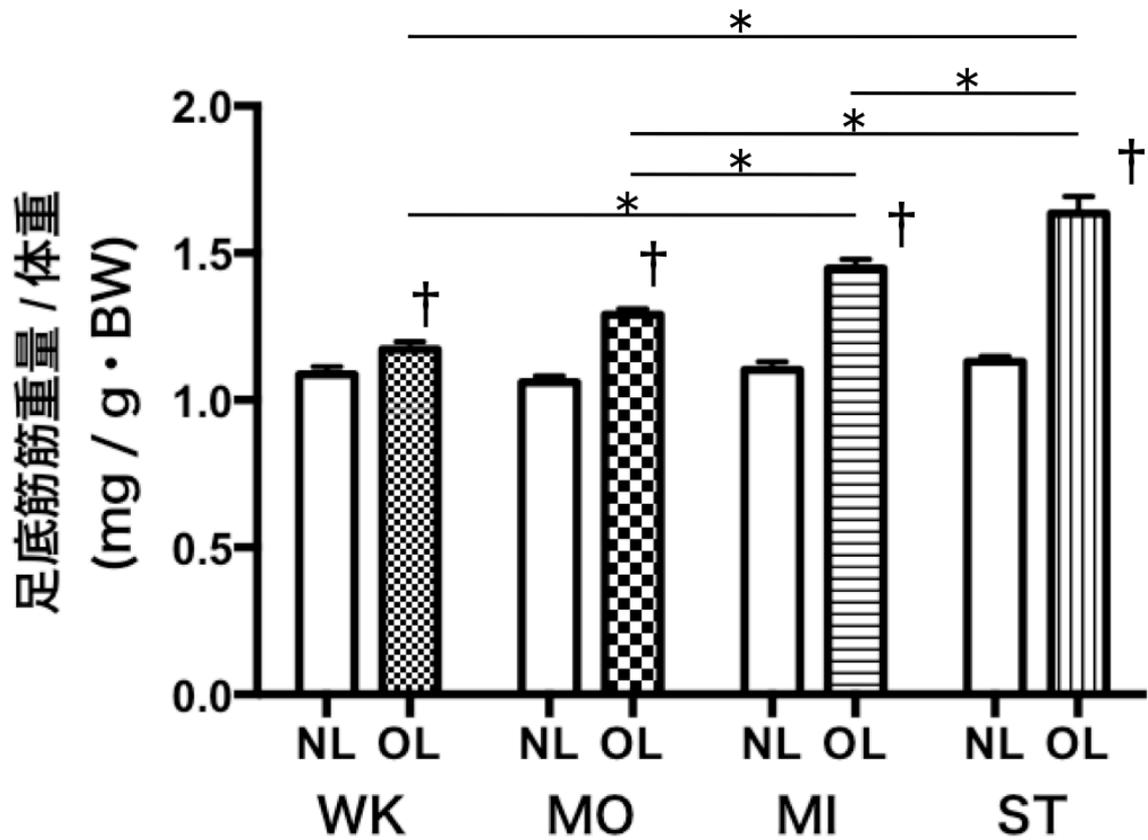


Fig.1-3 協働筋切除手術 14 日後の足底筋重量/体重の比較.

値は平均値 ± 標準誤差 (n=8).

†: 同じ群の NL と比較して有意に異なる ($P < 0.05$).

*: OL 脚間で比較した際に有意に異なる ($P < 0.05$).

筋線維横断面積

筋線維横断切片の顕微鏡画像の例を Fig.1-4 A に示す。すべての群の OL 脚の足底筋では浮腫やアポトーシスといった異常な所見は見られなかった。

Fig.1-4 B に体重で補正した筋線維 CSA を示した。二元配置分散分析を行ったところ、交互作用が見られた($P=0.0014$)それぞれの群について NL と OL の比較をしたところ、MO 群、MI 群、ST 群で OL 脚足底筋の筋線維 CSA/体重は NL 脚足底筋に比べて有意に大きな値を示していた(MO; $31.1 \pm 6.3\%$ 増, MI; $23.0 \pm 3.8\%$ 増, ST; $42.4 \pm 7.0\%$ 増, それぞれ $P=0.0011$, $P=0.0005$, $P=0.0001$)。また有意ではないものの、WK 群の OL 脚足底筋の筋線維 CSA/体重は NL 脚足底筋に比べて大きい傾向にあった(WK; $10.3 \pm 4.8\%$ 増, $P=0.07$)。OL 脚足底筋について群間の比較をしたところ、WK_OL vs. MI_OL ($P=0.045$), WK_OL vs. ST_OL ($P=0.0003$), MO_OL vs. ST_OL ($P=0.049$)で有意な差が見られた。また、NL 脚足底筋について群間の比較をしたところ、有意な差は見られなかった($P=0.18$)。

Fig.1-5 に筋重量/体重と筋線維 CSA/体重の関係を示した。この結果から、筋重量/体重の変化と筋線維 CSA/体重の変化が対応しており、筋重量/体重の増加とともに筋線維 CSA/体重が増加していることが分かる。

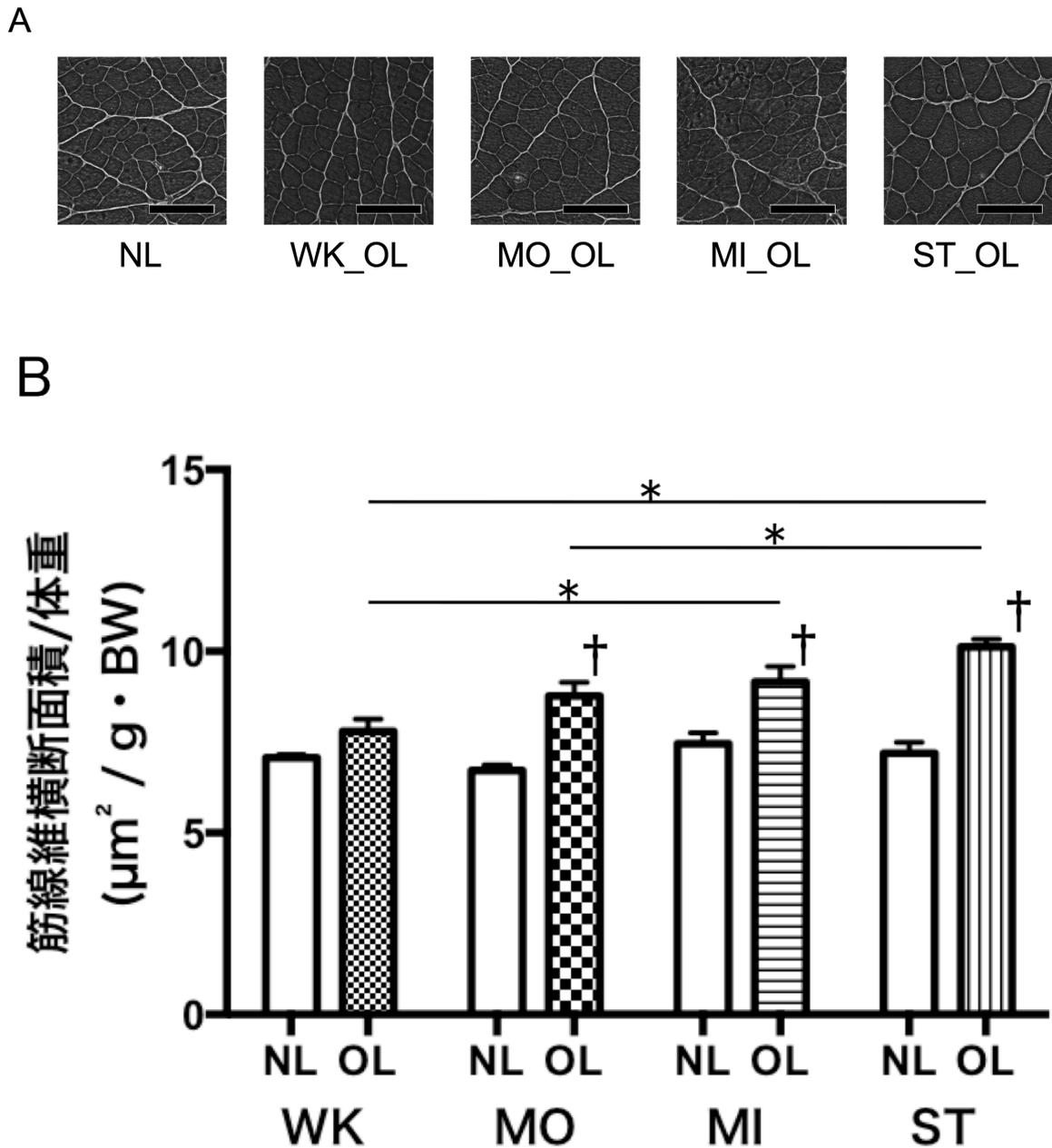


Fig.1-4 協働筋切除 14 日後の足底筋の組織学的分析.

A: 足底筋横断切片画像, Bar = 100 μm .

B: 平均筋線維 CSA/体重, 値は平均値 \pm 標準誤差 (n=8). †: 同じ群の NL と比較して有意に異なる ($P < 0.05$). *: OL 脚間で比較した際に有意に異なる ($P < 0.05$).

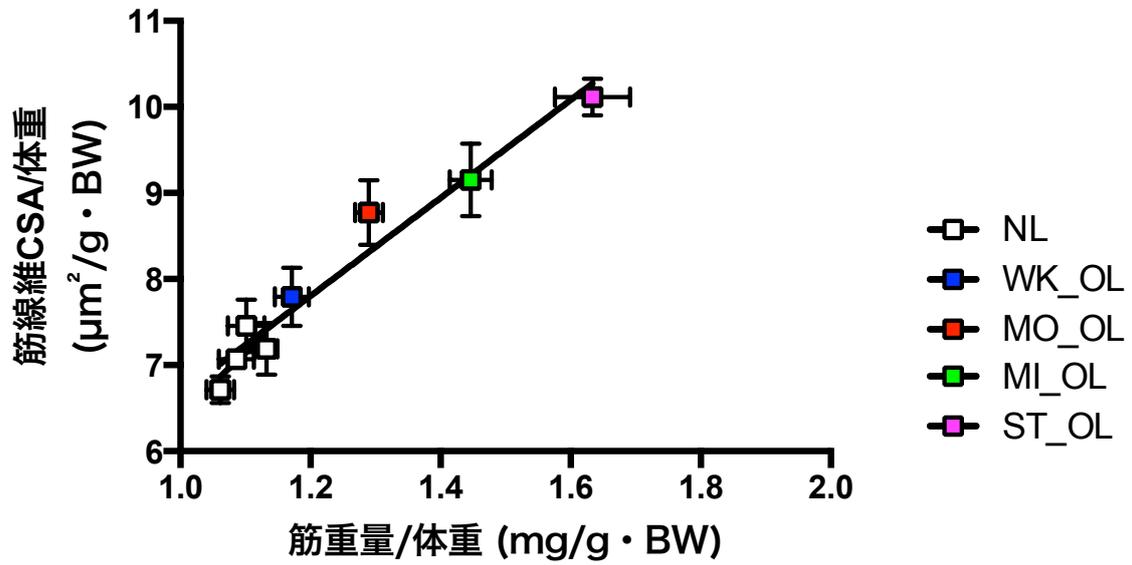


Fig.1-5 筋重量/体重と筋線維 CSA/体重の関係.

値は平均値 ± 標準誤差 (n=8).

回帰直線 : $Y = 5.693 \cdot X + 0.9720$ ($R = 0.98$, $P < 0.0001$).

4) 考察

これまで、複数の筋肥大率を得られるモデルを作成し、肥大率とそれを達成するためのメカニズムの関係について検討した研究は限られた数しかない (Baar & Esser 1999; Roy et al. 1999). これは動物モデルにおいて筋への負荷の大きさをコントロールすることが極めて困難であることが大きな理由である. そこで、著者は協働筋を部分的に切除することで足底筋への負荷の大きさをコントロールできる新たな協働筋切除手術を開発し(Fig.1-1), 実際に複数の筋肥大率を作り出すことができるのかを検討した.

体重に関して

今回、足底筋にかかる過負荷の大きさを変える方法として協働筋の切除量を変えることで行った. その際に、切除量が異なることによって手術による生体へのダメージが群ごとに異なる可能性が懸念された. 生体へのダメージの違いは食事量や活動量などに差が生じる可能性がある. しかし、手術前、手術14日後の間のラットの体重の変化は全ての群で差が見られなかった. 体重は食事量や活動量を間接的に反映していると考えられる. そのため、協働筋切除量の違いはラットの体調の違いを起さなかったと考えられ、生体へのダメージの違いは最小限に抑えられたと言える.

筋肥大

従来の協働筋切除と同等の ST 群では 45%の筋肥大率が得られた. これは Soltow らが報告している2週間で 50%の筋肥大とする結果と一致している (Soltow et al. 2006). また、ST 群に加え、よりマイルドな過負荷モデルとして WK, MO, MI を加えたところ、それぞれ 8%, 22%, 34%の筋肥大率を得ることができた. さらにこの際に、手術を行わなかった NL の筋重量/体重は全ての群間で有意な差が見られなかったことから、協働筋の切除の方法の違いは NL 脚には影響を及ぼさなかったと言える. そのため、NL の足底筋は内部コントロールとして扱うことができると考えられる. さらにここで確認された筋重量/体

重の段階的な変化は筋線維 CSA/体重でも見られ、筋重量/体重の変化と筋線維 CSA/体重の変化が対応していることが確認された。そのため、開発したモデルによって得られた段階的な筋肥大は筋線維レベルから起きていると言える。

この方法の利点

今回作成した新たな協働筋切除手術には、同じ筋に対して、幅広い範囲の筋肥大率について検討できるという特徴が挙げられる。同じ筋に対して異なる肥大率を作るという特徴から、筋のもつ本来の特性の差を考慮する必要がないというメリットが挙げられる。Baar らが用いたモデルでは複数の筋が動員される下腿の電気刺激を用いてトレーニングを行い、それによって得られる GAS, SOL, PLA, TA の4つの筋の筋肥大率を比較している(Baar & Esser 1999)。しかし、この方法は異なる筋を用いて比較を行っているため、元々の筋線維の大きさ、筋線維タイプ組成の違いによる影響を排除することができないという問題点が排除できなかった。一方、本研究で開発した方法は全ての群が PLA を用いているため、全ての群の PLA は手術前の段階では同一の特性を持っていると考えることができる。そのため、筋内の反応と筋肥大率の間関係を調べるうえで、より簡潔に比較することができる。

さらに幅広い範囲の筋肥大率について筋肥大率について検討できるという特徴から、筋肥大率とそれを達成するために動員されるメカニズムの間関係を詳細に調べることが可能になるというメリットがある。これまで Baar らの方法では 0~15%という比較的狭い幅の肥大率について調べていたが、開発したモデルは得られる肥大率は 8, 22, 34, 45%という筋肥大率のため、約 10%刻みで観察可能である。そのため、筋内の反応と筋肥大率の間関係を詳細に調べることが可能になると考えられる。

第2章

筋核数の増加は筋肥大率に どの程度寄与しているか

1) 背景

筋線維は巨大な細胞質を多くの筋核が共有している多核の細胞である。筋線維のそれぞれの筋核は制御可能な細胞質量に上限があると考えられており、MND 仮説と呼ばれている（序章 1 b. 筋核数と筋肥大 参照)(Bruusgaard et al. 2010)。MND 仮説を元に考えると、細胞質容量が急速に増加する骨格筋肥大の際には筋核の増加が必須となると考えられるが、実際に筋肥大に筋核の追加が必須か否かについては意見が相反している(O'Connor et al. 2007; Rehfeldt 2007a)。そのため、実際に筋肥大に対して筋核数の増加がどの程度寄与しているのかについては不明な点が多い。

そこで第2章では、第1章で開発した動物モデルを用いて筋肥大率と筋核数増加の間の関係を調べることにより、筋肥大率に対して筋核数の増加がどの程度寄与しているのかを調べる。

2) 方法

実験動物

Wistar 系の雄ラット（11 週齢；体重 約 330g）を日本クレアから購入した。ラットは個別のケージに分け、室温 22°C、湿度 60%、12 時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。餌(CE2; 日本クレア)と飲水は自由摂取とした。ラットの扱いと全ての実験手法は The policy statement of the American College of Sports Medicine on research with experimental animals に従って採用した。また、本実験は東京大学総合文化研究科実験動物委員会の承認を得た上で行った。

協働筋切除手術

1 週間の予備飼育の後、ラットを 4 群（各 8 匹）にわけた。4 つの群はそれぞれ第 1 章で作成した改良型協働筋切除法に則り，“weak”過負荷群(WK)，“moderate”過負荷群(MO)，“middle”過負荷群(MI)，“strong”過負荷群(ST)として 4 種類の異なる協働筋切除手術を施した。

筋のサンプリング

手術から 14 日後、イソフルラン吸入による軽麻酔後、ペントバルビタールの過剰投与(120 mg/kg body weight, i.p.)によってラットの安楽死を行った。その後、筋の摘出を行った。摘出した両脚の足底筋はそれぞれ筋重量を測定した。筋重量の測定後、足底筋は液体窒素によって凍結し、分析まで-80°Cで保存した。

筋線維の単離

骨格筋から筋線維以外の細胞を除去し、筋線維のみを観察するために筋線維の単離を行った。筋線維の単離は Wada らの水酸化ナトリウム消化法を参考に行った(Wada et al. 2002)。まず凍結した足底筋サンプルをカルシウムキレート剤を含むバッファー（137mM NaCl, 5.4mM KCl, 5mM MgCl₂, 4mM EGTA, 5mM HEPES）に浸け、解凍した(室温 10 分)。その後、解凍した筋サンプルは

第2章：筋核数の増加は筋肥大率にどの程度寄与しているか

カルシウムキレート剤を含む固定液によって固定した(137mM NaCl, 5.4mM KCl, 5mM MgCl₂, 4mM EGTA, 5mM HEPES in マイルドホルム 10N(Wako)) (室温 2日以上). 固定した筋サンプルは 40% 水酸化ナトリウム水溶液に浸し, 結合組織の溶解を行った (室温 3時間). その際に, 1時間おきにサンプルを取り出し, 腱などの結合組織を除去し, ピンセットによって軽くほぐした後, 元の水酸化ナトリウム水溶液に戻した. 結合組織の溶解によって単離した筋サンプルは PBS で3回洗浄をおこない中和した. 単離した筋サンプルは PBS 中で測定まで 4°Cで保存した.

筋核の可視化

単離した筋線維は 1%ゼラチン溶液に浸し, スライドガラス上に並べ, 室温にて乾燥させ貼付けた. 貼付けた筋線維は PBS で再び湿潤化した後に, DAPI 溶液によって核を染色した(室温 10分). その後, PBS で洗浄し, 10%グリセリンを用いてカバーガラスで封入した. 出来上がったスライドガラスは UV 励起によって筋核を可視化し, 顕微鏡観察(Eclipse TE300; Nikon)と冷却 CCD カメラ(Hamamatsu)による撮影を行った. 線維の観察はそれぞれの筋につき 50 本とした.

焦点の異なる複数枚の画像の取得

筋線維は厚みがあるため, 焦点深度の浅い高倍率レンズでは全ての筋核に同時に焦点を合わせることができない. そのため, 焦点の異なる複数枚の画像から多焦点画像を合成する方法を取った. 顕微鏡観察の際に同一視野で焦点のみ異なる複数枚の画像を取得した. 複数枚の写真を ImageJ(Stack Focuser)により合成し, 多焦点画像を作成した.

筋線維横紋の観察

筋線維の収縮状態の程度を知るため, 筋線維の横紋を観察した. 筋核の観察の直後に, 同一線維において明視野位相差条件下で筋線維の横紋を観察し, 画

像を取得した。

筋核数のカウント

多焦点画像を用いて ImageJ(Cell Counter)上で筋核数のカウントを行い，筋線維長軸 1mm あたりの筋核数を算出した。

サルコメア長の測定

筋核の観察と同時に明視野位相差条件下で高倍率によって筋線維の横紋を観察できる画像を取得した。横紋画像を用いて，ImageJ(Plot Profile)上で横紋が見られる部位に筋線維長軸に対して平行な直線を引き，その直線上の輝度の変化を観察した(Fig.2-1)。輝度の変化を元に横紋の間の長さを測定し，サルコメア長とした。

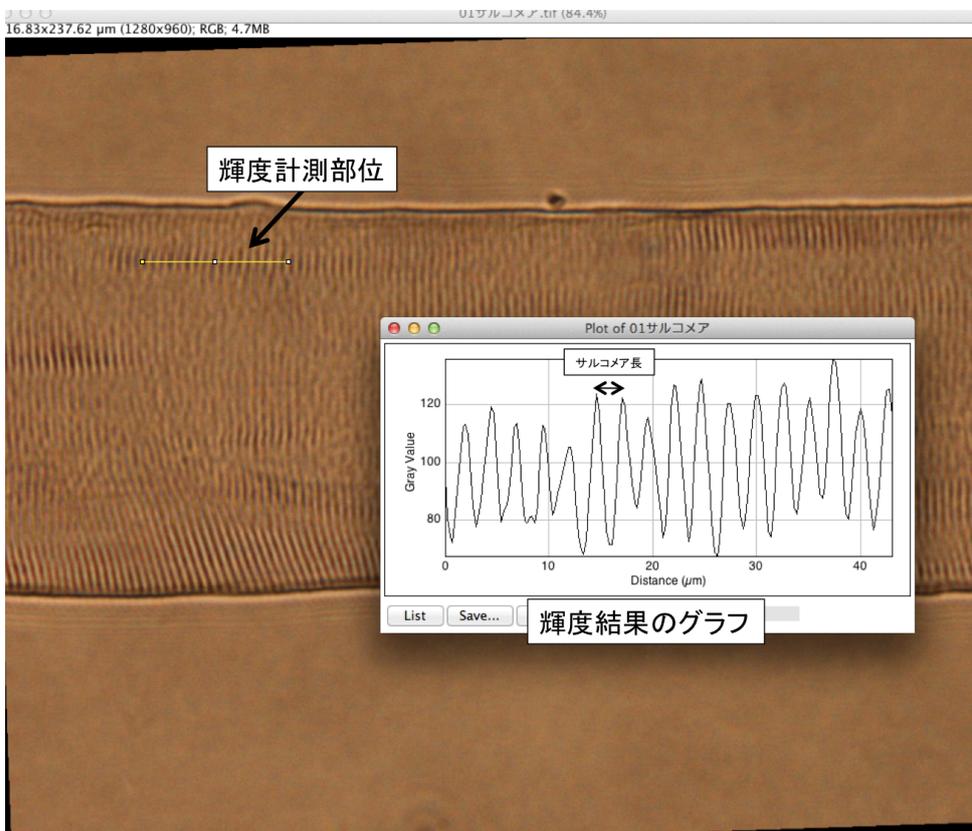


Fig.2-1 サルコメア長測定画面。

100 サルコメアあたりの筋核数の算出

1mm あたりの筋核数は筋線維の収縮状態によって顕微鏡の視野で観察される数が増える可能性がある(Bruusgaard et al. 2012)(Fig.2-2). そのため、筋線維の収縮状態を補正するため、それぞれの筋線維について 1mm あたりの筋核数をサルコメア長で補正し、100 サルコメアあたりの筋核数を算出した。

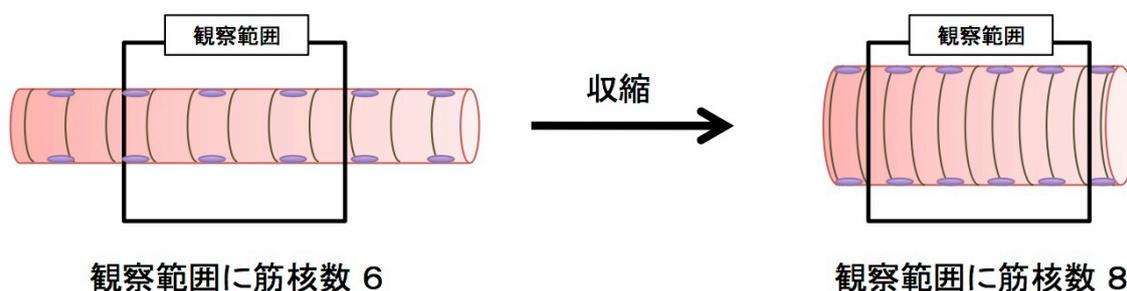


Fig.2-2 筋線維の収縮状態による筋核数計測への影響.

統計処理

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。100 サルコメアあたりの筋核数は、NL, OL で対応のある二元配置分散分析(NL and OL \times 4 群)を行った。有意な主効果か交互作用が見られた場合、それぞれの群に対して NL-OL 間で Sidak 法を用いた比較を行った。また、4 群間で手術法の差異による効果に有意な差が見られるかを検討するために、NL, OL それぞれに対して 4 群間で Tukey 法を用いた多重比較を行った。100 サルコメアあたりの筋核数と筋重量/体重の関係についてはピアソンの積率相関分析を用いて調べた。p 値は 0.05 未満をもって有意とした。

3) 結果

100サルコメアあたりの筋核数の変化

Fig.2-3 に 100 サルコメアあたりの筋核数の結果を示した. 二元配置分散分析を行ったところ, 群間の差は見られなかった($P=0.061$)が, NL-OL 間には有意な差が見られた($P=0.0012$), また交互作用は見られなかった($P=0.98$). しかし, それぞれの群で NL-OL 間を比較したところ, 全ての群で有意な差が見られなかった(それぞれ, $P=0.53$, $P=0.34$, $P=0.14$, $P=0.081$).

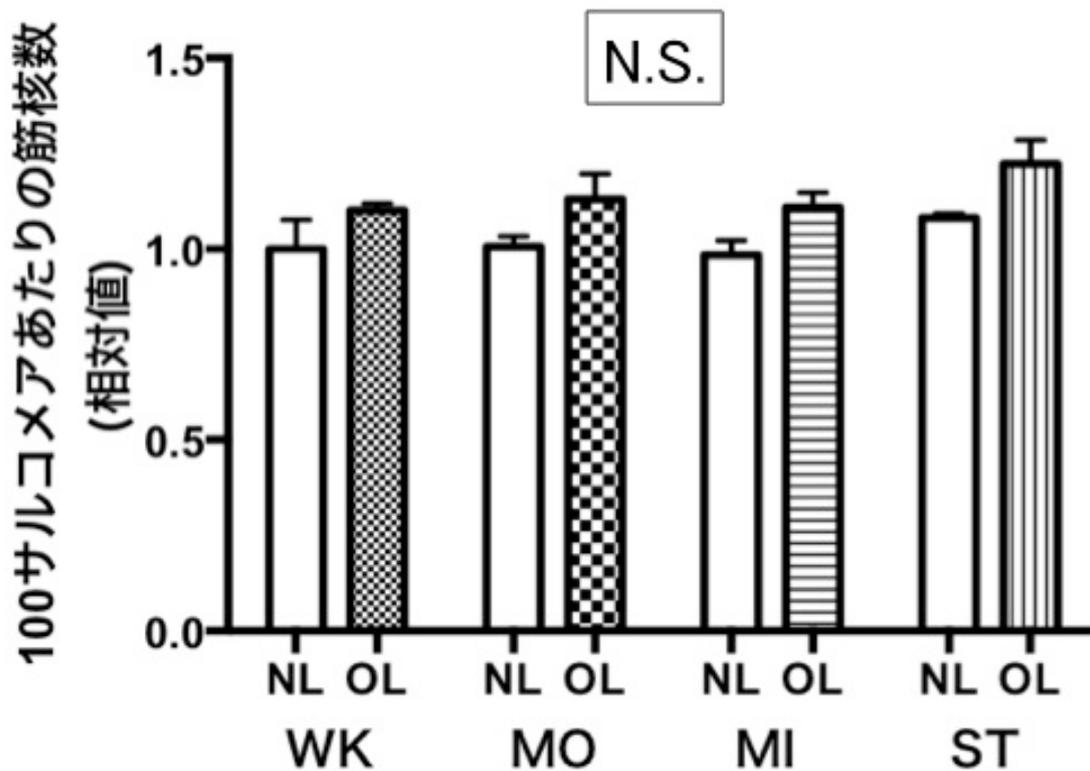


Fig.2-3. 100 サルコメアあたりの筋核数.

平均値 ± 標準誤差を示した.

筋重量/体重と 100 サルコメアあたりの筋核数の相関

WK_NL を 1 として補正した 100 サルコメアあたりの筋核数と筋重量/体重の間の相関関係を Fig.2-4 に示した。相関分析を行った結果、強い正の相関が見られた($R = 0.86, P = 0.0061$)。また、その回帰直線は $Y = 0.3418 * X + 0.6583$ となっていた。

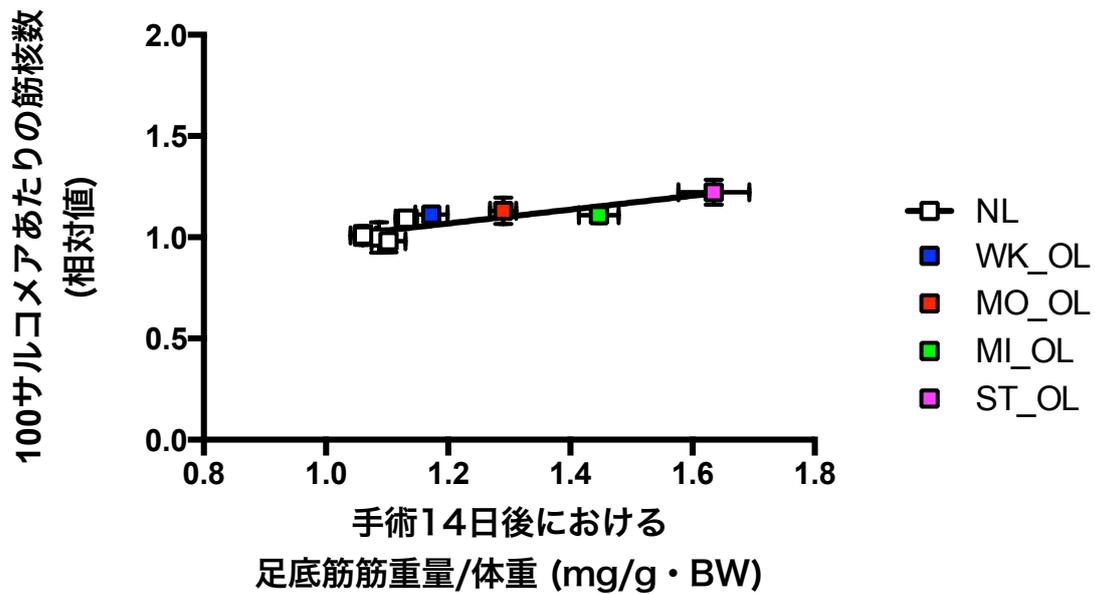


Fig.2-4 筋重量/体重と 100 サルコメアあたりの筋核数の相関。

100 サルコメアあたりの筋核数は WK_NL を 1 とした。

平均値 ± 標準誤差を示した。

回帰直線: $Y = 0.3418 * X + 0.6583$ ($R = 0.86, P = 0.0061$)。

4) 考察

筋核数の増加は筋肥大にたいしてどの程度貢献しているか

これまで、筋核数の増加が筋肥大にとって必須のものかどうかについては相反する報告があり、筋核の増加が筋肥大にどの程度寄与しているのかについては多くが不明であった。今回、本実験では8, 22, 34, 45%と得られる筋肥大率が異なる手法を用いたが、筋肥大率は大きく異なるにもかかわらず、全ての群で筋核数の大きな変化は見られなかった。そのため、協働筋切除後2週間では筋核数の増加は起きなくても、少なくとも45%増までの筋肥大は問題なく起こすことができると言える。McCarthyらの研究でも筋核数の増加無しに2倍の筋肥大を得ることができているため(McCarthy et al. 2011)、極めて急激な筋肥大でも既存の筋核だけで筋肥大を達成することは可能であると言える。

筋核の増加は筋肥大のどのタイミングで起こるか

これまで筋核が筋肥大のどの段階で増加するかについては異なる報告がある。van der Meerらは協働筋切除による筋肥大の2週目では筋核が増加しなかったことを報告している(van der Meer et al. 2011)。一方、Bruusgaardらは協働筋切除後の筋肥大を生体内イメージングを用いて観察し、筋肥大に先行して筋核の増加が起きたと報告している(Bruusgaard et al. 2010)。著者の研究では、協働筋切除後2週間では筋はST群で45%の増加を示しているものの、筋核の有意な増加は見られていない。そのため、この結果はvan der Meerらの報告と一致する。

短期の筋肥大では筋核の増加が観察されないことが多いものの、長期の肥大期間では筋核の増加が観察されることも多い。van der Meerらはさらに実験期間を延ばし、4週間の実験期間では筋核数が増加することを報告している。また遺伝子改変によってサテライト細胞を成熟後に除去し、筋核の供給を阻害した状態で協働筋切除を行った研究では、短期間での筋肥大は問題なく起こるものの、さらに長期間では肥大した筋線維が繊維化することが観察されている(McCarthy et al. 2011; Fry et al. 2013)。この繊維化は筋核が供給されなかった

第2章：筋核数の増加は筋肥大率にどの程度寄与しているか

ことにより筋線維の微小環境が悪化したためと考えられている。そのため、筋核数の増加は短期の筋肥大の達成のためには寄与しておらず、肥大した後に筋核数を供給することで肥大した筋を安定させ長期間維持するために寄与していると考えられる。著者の実験でもさらに実験期間を延ばすことで筋肥大率に応じた筋核数の増加が観察される可能性がある。しかし、たとえ実験期間の延長によって筋核数が増加したとしても、すでに手術後2週間までに筋はほぼ負荷に対する適応を終えており、安定した状態になっていると考えられるため、その後のタイミングで筋核数が増加したとしても更なる筋肥大が起こるとは考えづらい。そのため、筋核数の増加が筋肥大の初期過程において果たす役割は極めて小さいと考えられる。

第3章

翻訳調節因子と筋肥大率

4) 背景

第2章から、筋核数の増加が筋肥大の達成に与える影響は極めて少ないことが示された。このことから骨格筋は既存の筋核の働きを高めることで、少なくとも短期的には十分に筋肥大を達成することができると考えられる。そこで筋肥大を達成するためにはタンパク合成を活性化させ、新たにタンパクを蓄積させる必要があることから、タンパク合成の活性化に関わる因子に着目した。特に第3章ではタンパク翻訳活性を高める因子に焦点を当てて検討を行った。翻訳活性は以下のような定義式に従っている。

$$\text{翻訳活性} = \text{翻訳効率} \times \text{翻訳キャパシティ}$$

そのため、翻訳効率と翻訳キャパシティ両方が翻訳活性の決定に関わる。

これまで骨格筋の肥大に関する研究は翻訳効率の活性化に関する研究が多く行われている。翻訳の効率はリボソームひとつあたりのタンパク翻訳活性の指標だが、タンパク翻訳は開始段階が律速段階に有ることが知られていることから開始段階の活性化は翻訳効率を高めると考えられる。mTOR系シグナルはp70S6K, rpS6といった因子を介してこの開始段階を活性化するため筋肥大に対しても大きな影響を持っている(Lee et al. 2007)。特に筋に負荷がかかった際の早期のp70S6Kのリン酸化量とその後の筋肥大の程度の間には相関があることが報告されていることから(Baar & Esser 1999; Terzis et al. 2008)、多くの研究者がp70S6Kリン酸化量を筋肥大率を規定する因子の候補と考えている。しかし、いくつかの研究ではp70S6K活性化量と筋肥大率の相関が弱いもしくは見られないこともあることから(Mitchell et al. 2013; Mitchell et al. 2012; Burd et al. 2010)、p70S6Kリン酸化量と筋肥大率の間関係は未だ不明な点が多い。

一方、翻訳キャパシティは上記の定義式から翻訳効率とともに翻訳活性を決定する因子であると考えられるが、これまで翻訳キャパシティが筋肥大の際にどのように変化するかに関しては研究が限られており、多くのことが分かっていない。

翻訳キャパシティは細胞内の翻訳装置、特にリボソーム量によって決まると

第3章：翻訳調節因子と筋肥大率

されているため(McCarthy & Esser 2010; Millward et al. 1973), リボソーム生合成による細胞内のリボソーム量の増加は翻訳キャパシティを高めると考えられる。近年の研究から筋に負荷がかかった後にリボソーム生合成が高まることが報告されているため、リボソーム生合成が筋肥大の達成に大きな影響を持っている可能性が指摘されている(Chaillou et al. 2014)。そのため、リボソーム生合成が筋肥大率を規定する因子になっている可能性が考えられるが、これまで筋に負荷がかかった際のリボソーム生合成の活性化の大きさとその後の筋肥大率の間にどのような量的関係があるのかはこれまで明らかになっていない。

これらのことから、第3章では翻訳効率を高める p70S6K リン酸化量と翻訳キャパシティを高めるリボソーム生合成量が筋肥大率とどのような量的関係を持つのかを調べ、肥大率を規定する因子になりうるのかを検討する。またリボソーム生合成に関してはリボソームの構成要素の量比を調べ、リボソーム生合成がどの程度効率的に行われているかを調べる。さらにリボソーム生合成を調整する因子の活性化についても検討を行う。

5) 方法

実験動物

Wistar 系の雄ラット（11 週齢；体重 約 330g）を日本クレアから購入した。ラットは個別のケージに分け、室温 22°C、湿度 60%、12 時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。飼料(CE2; 日本クレア)と飲水は自由摂取とした。ラットの扱いと全ての実験手法は The policy statement of the American College of Sports Medicine on research with experimental animals に従って採用した。

協働筋切除手術

1 週間の予備飼育の後、ラットを 4 群（各 8 匹）にわけた。4 つの群はそれぞれ第 1 章で作成した改良型協働筋切除法に則り，“weak”過負荷群(WK), “moderate”過負荷群(MO), “middle”過負荷群(MI), “strong”過負荷群(ST)として 4 種類の異なる協働筋切除手術を施した。

実験期間の設定

Miyazaki らの研究から協働筋切除後に p70S6K リン酸化量は 2～7 日まで高値を示していた(Miyazaki et al. 2011)。また Goodman らの研究から協働筋切除 7 日後で既にリボソーム生合成が高まり、rRNA の蓄積が起きていることが確認されている(Goodman et al. 2011b)。細胞内の rRNA 量は蓄積されていく指標のため、実験期間が短い場合、明確に変化が観察されない可能性が考えられた。これらのことから、p70S6K リン酸化量の変化とリボソーム生合成の変化を同時に観察する実験期間として手術後 5 日と設定し、サンプリングを行った。

筋のサンプリング

手術から 5 日後、イソフルランによる吸入麻酔下でペントバルビタール(60 mg/kg body weight, i.p.)を腹腔投与することでラットに麻酔をかけた。足底筋の摘出を行った後、ペントバルビタールの過剰投与(120 mg/kg body weight, i.p.)によってラットの安楽死を行った。摘出した両脚の足底筋はそれぞれ筋重量

を測定した。筋重量の測定後、足底筋は液体窒素によって凍結し、分析まで -80°C で保存した。

ウェスタンブロッティング

筋中の p70S6K タンパク量と p70S6K リン酸化量, rpS6 タンパク量, rpS6 リン酸化量, UBF タンパク量の定量をウェスタンブロッティングにより行った。粉末化した筋サンプルを 50mg 分取し、プロテアーゼ阻害剤(Complete mini, Roche)とフォスファターゼ阻害剤(PhosSTOP, Roche)を含む氷冷した RIPA バッファー(100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl)とジルコニアビーズ (3mm × 3個)を加えた。その後、ビーズ破砕機($\mu\text{T-12}$; Taitec, Tokyo, Japan)を用いてホモジナイズを行った(3200 rpm, 1min)。その後、遠心処理(12000 × g, 15min, 4°C)を行い、上清をタンパク抽出サンプルとした。タンパク抽出サンプルのタンパク濃度はタンパク濃度測定キット(Protein Assay Rapid Kit; Wako)により測定した。測定結果を元にタンパク抽出サンプルは全てのサンプルのタンパク濃度が一定になる様に希釈した後、サンプルバッファー(1.0% v/v 2-メルカプトエタノール, 4.0% w/v SDS, 0.16 M Tris-HCl (pH 6.8), 43% v/v グリセロール, 0.2% ブロモフェノールブルー)と混合し、 95°C で 5 min 加熱し、ウェスタンブロッティング用サンプルとした。

等量のタンパク質(50 μg)を含むウェスタンブロッティング用サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離後、polyvinylidene difluoride(PVDF)膜(Wako)にタンパク質を転写した。TBST で洗浄後、5% スキムミルク in TBST でブロッキングを行った (室温 1時間)。次に 1次抗体反応を行った(4°C , overnight)。1次抗体は Total-p70S6K 抗体(1:1000; Cell Signaling Technology), p70S6K リン酸化抗体(Thr 389, 1:1000; Cell Signaling Technology), Total-rpS6 抗体(1:1000; Cell Signaling Technology), rpS6 リン酸化抗体(Ser 240, 244, 1:1000; Cell Signaling Technology), UBF 抗体(1:1000; Santacruz)を用いた。

1次抗体反応後、TBSTで洗浄後、2次抗体反応(1:5000, HRP 標識 Anti-rabbit, Cell Signaling Technology) (1:5000, HRP 標識 Anti-mouse, Cell Signaling Technology)を行った(室温, 1時間)。二次抗体反応終了後、TBSTによってメンブレンを洗浄し、発光試薬(Luminata Forte, Millipore)を用いてバンドを化学発光させ、冷却 CCD 撮影装置で撮影後、ImageJ を用いて発光強度を定量した。定量した値は WK_NL の平均値を 1 として表した。実験の際に 8 つの実験条件 (NL and OL× 4 群) は直接比較ができるように同じゲル上で泳動を行いメンブレンに転写を行った。また、全てのゲルに同一のサンプル 1 つを流すことでゲル間の補正を行った。測定後、メンブレンは抗体除去バッファー(Restore Plus; Thermo Scientific)を用いて結合した抗体の除去を行い、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色を行い、全てのレーンに同じタンパク量がアプライされていることを確認した (Welinder & Ekblad 2011)。また測定の際に発光シグナルが飽和した場合、目的のタンパク量が増加したとしても発光シグナルに反映されない可能性が考えられる。そこで測定の際に発光シグナルが飽和状態になっていない範囲で行う様に留意して行った。

RNA の抽出

液体窒素下で粉末化した足底筋を 50mg 分取し、Isogen (Nippon gene, Tokyo, Japan) 750 μ l と 3mm のジルコニアビーズ 3 つを加えた。その後、ビーズ破砕機(μ T-12; Taitec, Tokyo, Japan)を用いて振盪破砕を行った(3200 rpm 1min)。破砕後、遠心処理(12000 \times g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)を行い、上清を回収し、室温にて 5 min インキュベートした。その後、クロロホルムを 150 μ l 加え、ボルテックス後、室温にて 3 min インキュベートを行った。これを遠心処理し(12000 \times g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)、水層を全て採取した。回収した水層にイソプロパノール 375 μ l 加え、ボルテックス後、室温で 10 min インキュベートを行った。その後、遠心処理(12000 \times g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)し、上清を捨て 70% エタノール 1000 μ l を加えた。ボルテックス後、遠心処理し(12000 \times g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C)、ペレットを採取した。得られた RNA ペレットは風乾後、200 μ l の DNase, RNase フリーの TE バッ

ファ(pH 8.0)に溶解した。

rRNA の定量

RNA 抽出液は rRNA 以外に mRNA, tRNA, small RNA など様々な RNA を含んでいる。そこでリボソーム RNA のみを分離し定量を行うために、アガロースゲル電気泳動を行った。方法は Goodman らの方法を参考に行った(Goodman et al. 2011b)。筋 125 μ g 分に相当する RNA 抽出液を蛍光色素(GRR-1000GR Red; Bio-Craft, Tokyo)と混濁後、1%アガロースゲルによって 60mA の定電流で 30min 電気泳動を行った。泳動を終えたゲルは UV 励起によりバンドの可視化後、撮影を行った。得られた画像から 18S と 28S の rRNA に相当するバンドを ImageJ によって定量を行った。定量した値は WK_NL の平均値を 1 として表した。実験の際に 8 つの実験条件 (NL and OL \times 4 群) は直接比較ができるように同じゲル上で泳動を行った。また、全てのゲルに同一のサンプル 1 つを流すことでゲル間の補正を行った。

筋肥大率との間の量的関係の検討

測定したその要素が筋肥大率を規定する因子として働く可能性があるかどうかを判定するために、得られた因子の活性化量とその後に得られる筋肥大率とどのような量的関係を持っているのかを検討した。筋肥大率のデータは第 1 章で得られた手術 14 日後の筋重量/体重のデータを用いた。

統計処理

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表示した。p70S6K タンパク量, p70S6K リン酸化量, rpS6 タンパク量, rpS6 リン酸化量, UBF タンパク量, 18+28S rRNA 量は, NL, OL で対応のある二元配置分散分析(NL and OL \times 4 群)を行った。有意な主効果か交互作用が見られた場合、それぞれの群に対して NL-OL

第3章：翻訳調節因子と筋肥大率

間で Sidak 法を用いた比較を行った。また、4 群間で手術法の差異による効果に有意な差が見られるかを検討するために、NL, OL それぞれに対して4 群間で Tukey 法を用いた多重比較を行った。p70S6K リン酸化量と筋重量/体重(14days OL)の関係、rpS6 リン酸化量と筋重量/体重(14days OL)の関係、18+28SrRNA 量と筋重量/体重(14days OL)の関係、rpS6 タンパク量と 18+28S rRNA 量の関係、UBF タンパク量と 18+28S rRNA 量の関係、p70S6K リン酸化量と 18+28S rRNA 量の間関係についてはピアソンの積率相関分析を用いて調べた。P 値は 0.05 未満をもって有意とした。

6) 結果

体重，筋重量の変化

体重，筋重量/体重の結果を表 3-1 に示した．手術前後では全ての群で体重の変化は見られなかった．

表 3-1. 体重，筋重量/体重

	WK		MO		MI		ST	
N.	8		8		8		8	
体重								
手術前 (g)	355.4 ± 4.7		351 ± 3.6		386.5 ± 6.3		355.9 ± 5.0	
手術5日後 (g)	361.5 ± 4.5		353.4 ± 3.4		385.1 ± 5.8		357.0 ± 3.7	
体重増加率(%)	101.8 ± 1		100.7 ± 0.6		99.7 ± 0.5		100.4 ± 0.9	
足底筋	NL	OL	NL	OL	NL	OL	NL	OL
筋重量/体重 (mg/g)	1.1 ± 0.02	1.15 ± 0.02	1.07 ± 0.03	1.25 ± 0.04	1.1 ± 0.02	1.28 ± 0.02	1.12 ± 0.02	1.49 ± 0.05

平均値 ± 標準誤差を示した．

p70S6K

p70S6K タンパク量(WK_NL の量を 1 とする)を Fig.3-1 A に示した．二元配置分散分析を行ったところ，NL-OL 間の差，群間の差ともに見られなかった(それぞれ， $P = 0.93$ ， $P = 0.43$)．また交互作用は見られなかった($P = 0.17$)．これらの結果から，p70S6K タンパク量は筋への負荷の強さや有無にかかわらず変化しないと考えられる．

p70S6K Thr389 リン酸化量(WK_NL の量を 1 とする)を Fig.3-1 B に示した．二元配置分散分析を行ったところ，交互作用が見られた($P = 0.044$)．それぞれの群内で NL と OL を比較したところ，MO_OL，MI_OL，ST_OL はそれぞれの NL に比べて有意に高い値を示していた．NL について群間で比較したところ，全ての群間に有意な差は見られなかった($P = 0.52$)．OL について群間で比較したところ，WK_OL vs. MO_OL，WK_OL vs. MI_OL，WK_OL vs. ST_OL で有意な差が見られた(それぞれ $P = 0.0001$ ， $P = 0.073$ ， $P = 0.041$)．

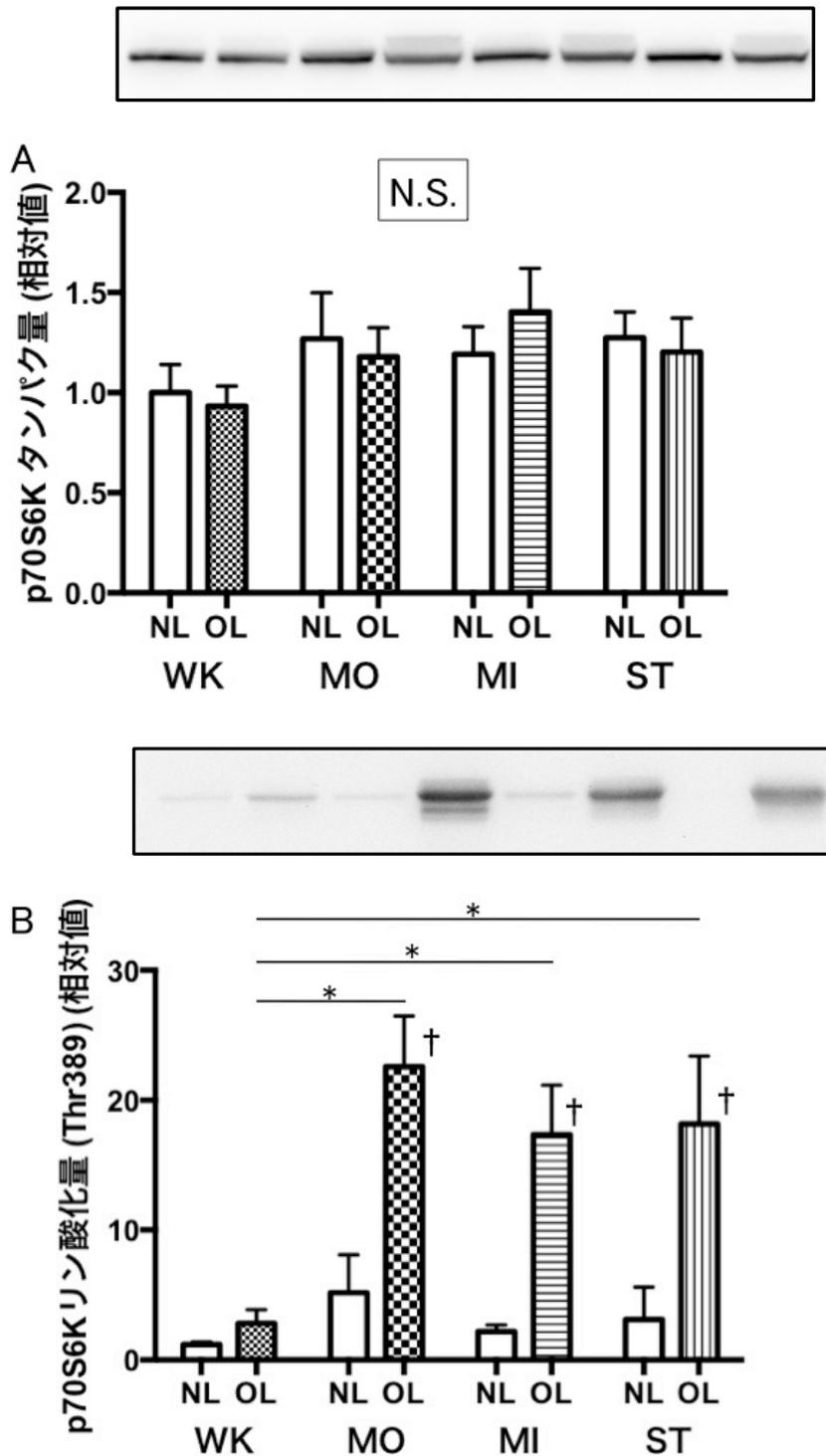


Fig.3-1. p70S6K タンパク量(A)およびリン酸化量(B).

平均値 ± 標準誤差を示した.

†: 同じ群の NL と比較して有意に異なる ($P < 0.05$).

*: OL 脚間で比較した際に有意に異なる ($P < 0.05$).

rpS6

rpS6 タンパク量(WK_NL の量を 1 とする)を Fig.3-2 A に示した. 二元配置分散分析を行ったところ, 交互作用が見られた($P = 0.0010$). それぞれの群内で NL と OL を比較したところ, 全ての群の OL はそれぞれの NL に比べて有意に高い値を示していた (それぞれ, $P = 0.043$, $P = 0.029$, $P = 0.0004$, $P = 0.0014$). NL について群間で比較したところ, 全ての群間に有意な差は見られなかった($P = 0.10$). OL について群間で比較したところ, WK_OL vs. MI_OL, WK_OL vs. ST_OL で有意な差が見られた(それぞれ, $P = 0.010$, $P = 0.017$).

rpS6 のリン酸化量(WK_NL の量を 1 とする)を Fig.3-2 B に示した. 二元配置分散分析を行ったところ, 交互作用が見られた($P = 0.0005$). それぞれの群内で NL と OL を比較したところ, MO_OL, MI_OL, ST_OL はそれぞれの NL に比べて有意に高い値を示していた (それぞれ, $P = 0.0070$, $P = 0.0002$, $P = 0.0004$). NL について群間で比較したところ, 全ての群間に有意な差は見られなかった($P = 0.076$). また, OL について群間で比較したところ, WK_OL vs. MO_OL, WK_OL vs. MI_OL, WK_OL vs. ST_OL で有意な差が見られた(それぞれ, $P = 0.0001$, $P < 0.0001$, $P = 0.0001$).

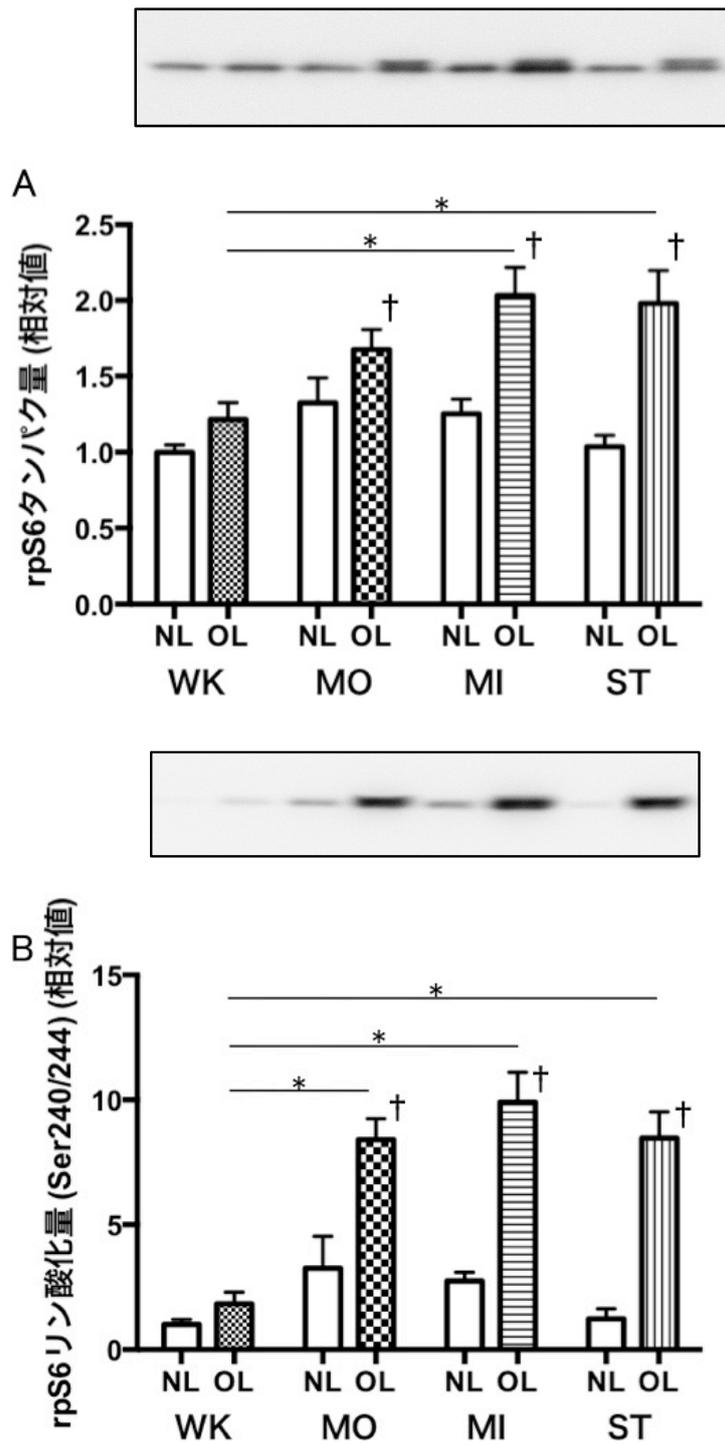


Fig.3-2. rpS6 タンパク量(A)及びリン酸化量(B).

平均値 ± 標準誤差を示した.

†: 同じ群の NL と比較して有意に異なる ($P < 0.05$).

*: OL 脚間で比較した際に有意に異なる ($P < 0.05$).

UBF

UBF タンパク量の結果を Fig.3-3 に示した。WK_NL の平均値を 1 として示した。二元配置分散分析を行ったところ、NL-OL 間、群間ともに有意な差が見られた(それぞれ、 $P < 0.0001$, $P < 0.0001$)。また交互作用は見られなかった($P = 0.068$)。それぞれの群内で NL 脚と OL 脚の UBF タンパク量を比較したところ、MO, MI, ST 群で有意に大きな値を示していた(MO: $P = 0.0004$, MI: $P = 0.0002$, ST: $P = 0.0005$)。NL について群間で比較したところ、全ての群間に有意な差は見られなかった($P = 0.19$)。また OL について群間で比較したところ、WK_OL vs. MO_OL, WK_OL vs. MI_OL, WK_OL vs. ST_OL に有意な差が見られた(それぞれ、 $P = 0.008$, $P = 0.0005$, $P = 0.0099$)。

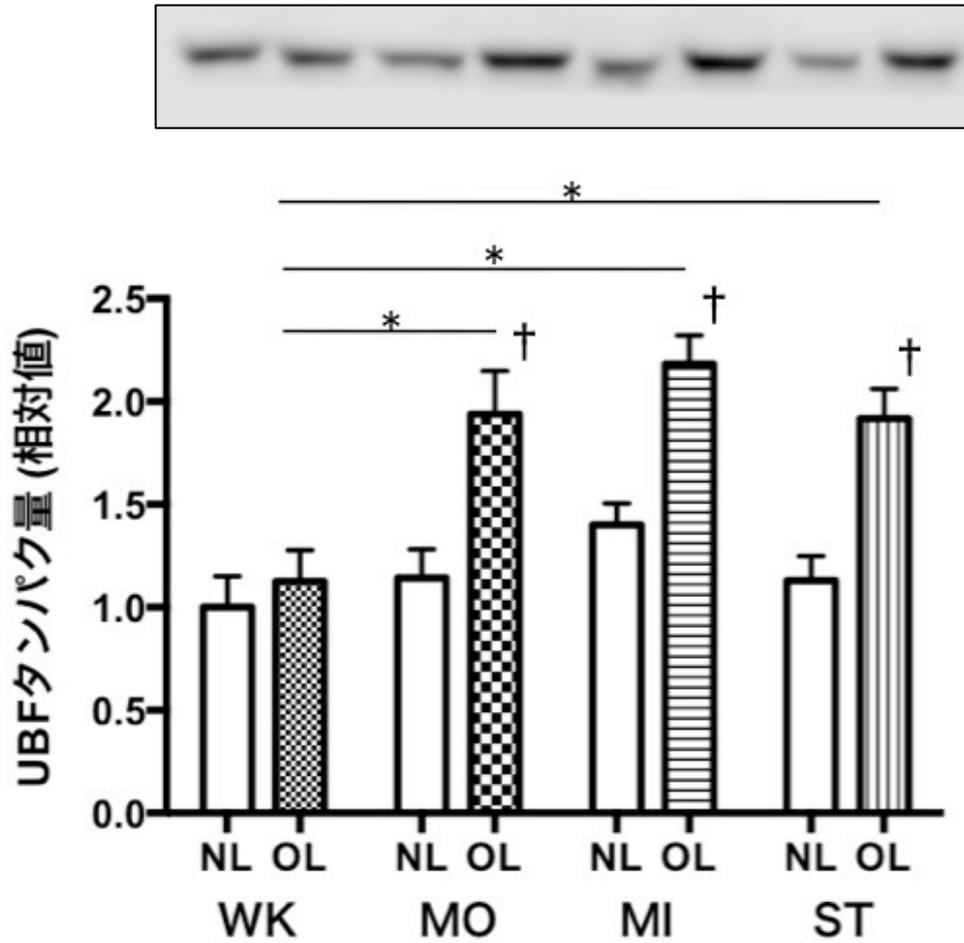


Fig.3-3. UBF タンパク量.

平均値 ± 標準誤差を示した.

†: 同じ群の NL と比較して有意に異なる ($P < 0.05$).

*: OL 脚間で比較した際に有意に異なる ($P < 0.05$).

CBB

CBBによるタンパクアプライ量(WK_NLの量を1とする)をFig.3-4に示した。二元配置分散分析を行ったところ、NL-OL間の差、群間の差ともに見られなかった(それぞれ、 $P=0.24$, $P=0.54$)。また交互作用は見られなかった($P=0.23$)。そのため、ウェスタンブロッティングの際に、同じ量のタンパクを分析することができたと考えられる。

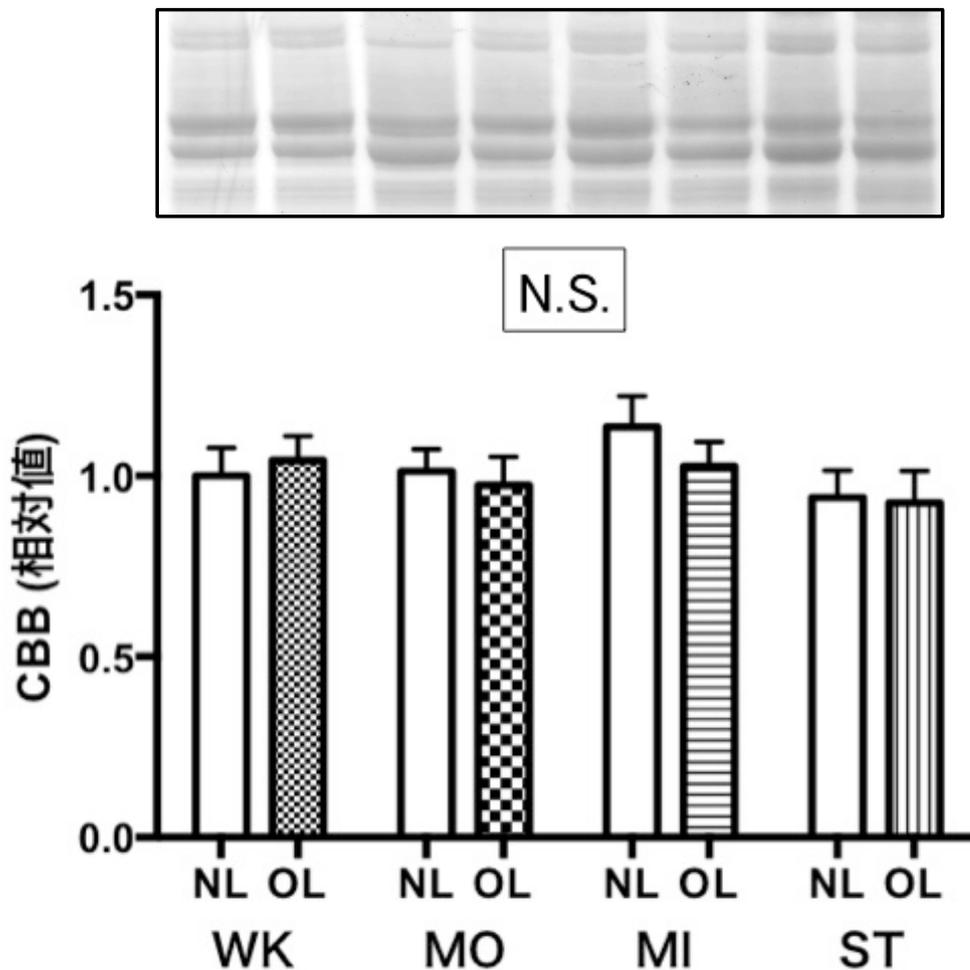


Fig.3-4 CBB 染色による泳動したタンパク量の比較。

平均値 ± 標準誤差を示した。

18+28S rRNA 量

足底筋 1 mg 中の 18+28S rRNA 量(WK_NL の量を 1 とする)を Fig.3-5 に示した.

二元配置分散分析を行ったところ、交互作用が見られた($P < 0.0001$). それぞれの群内で NL と OL を比較したところ、MO_OL, MI_OL, ST_OL はそれぞれの NL に比べて有意に高い値を示しており、それぞれ $75.6 \pm 12.1\%$, $117.9 \pm 12.9\%$, $153.5 \pm 18.2\%$ の増加となっていた. NL について群間で比較したところ、全ての群間に有意な差は見られなかった($P = 0.39$). また、OL について群間で比較したところ、WK_OL vs. MO_OL, WK_OL vs. MI_OL, WK_OL vs. ST_OL と MO_OL vs. ST_OL で有意な差が見られた(それぞれ $P = 0.0032$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P = 0.0018$). これらの結果から、単位筋量あたりの rRNA 量は筋への力学的負荷が増加するにつれて増加することが考えられる.

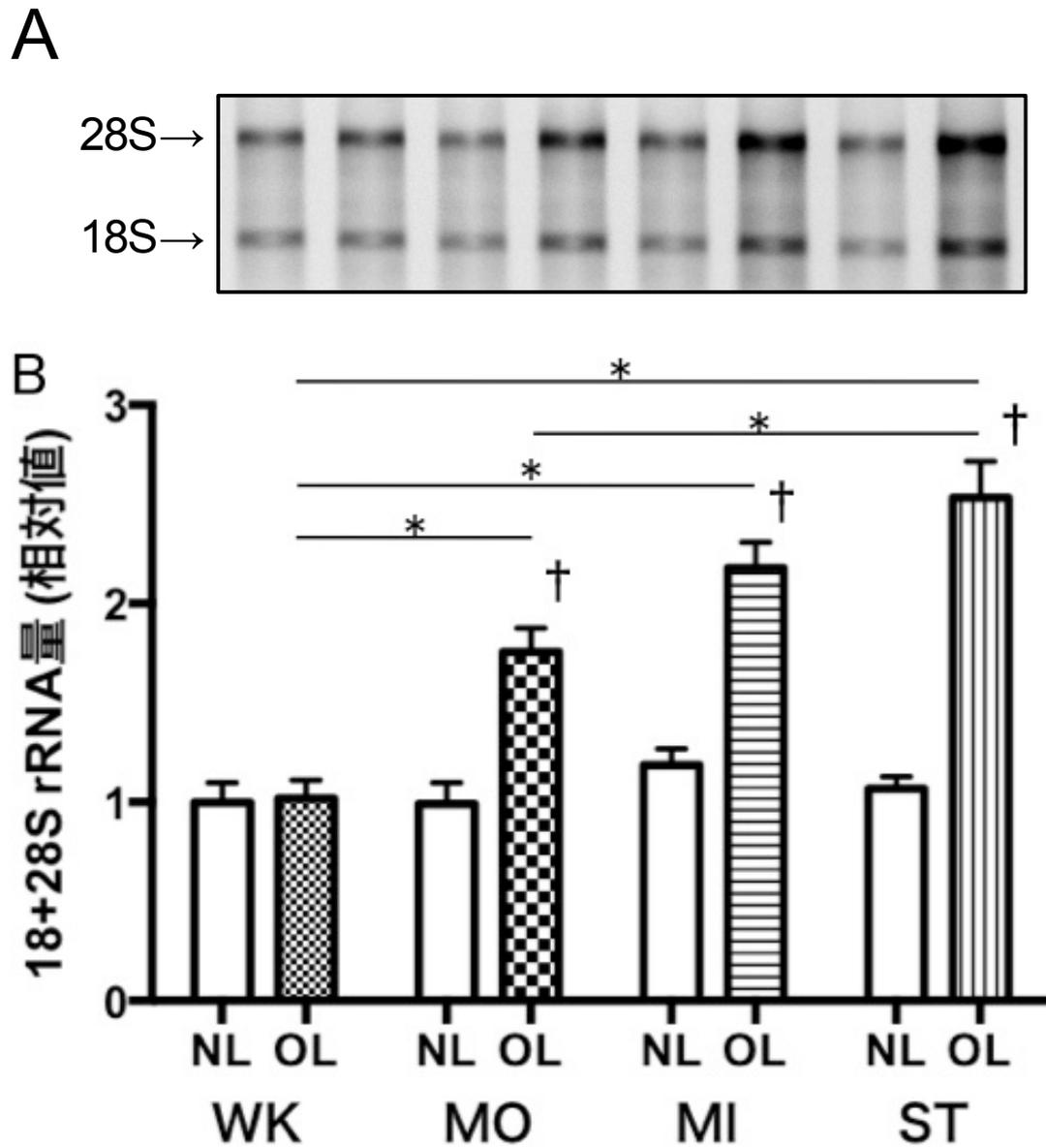


Fig.3-5. 18+28S rRNA 量.

平均値 ± 標準誤差を示した.

A: rRNA の電気泳動像

B: 18+28S rRNA 量

†: 同じ群の NL と比較して有意に異なる ($P < 0.05$).

*: OL 脚間で比較した際に有意に異なる ($P < 0.05$).

リボソーム生合成の効率の評価

リボソーム RNA 量と rpS6 タンパク量との相関関係を Fig.3-6 に示した。相関分析を行った結果、18+28S rRNA 量と rpS6 タンパク量の間には正の相関が見られた($R = 0.73$)。また、その回帰直線は $Y = 0.91 * X + 0.21$ となっていた。rpS6 タンパク量、rRNA 量ともに WK_NL における平均値を 1 として相対化しているため、回帰直線の傾きが 0.91 となっていることから、18+28S rRNA 量と rpS6 タンパク量はほぼ同じ割合で量的変化していることが分かった。

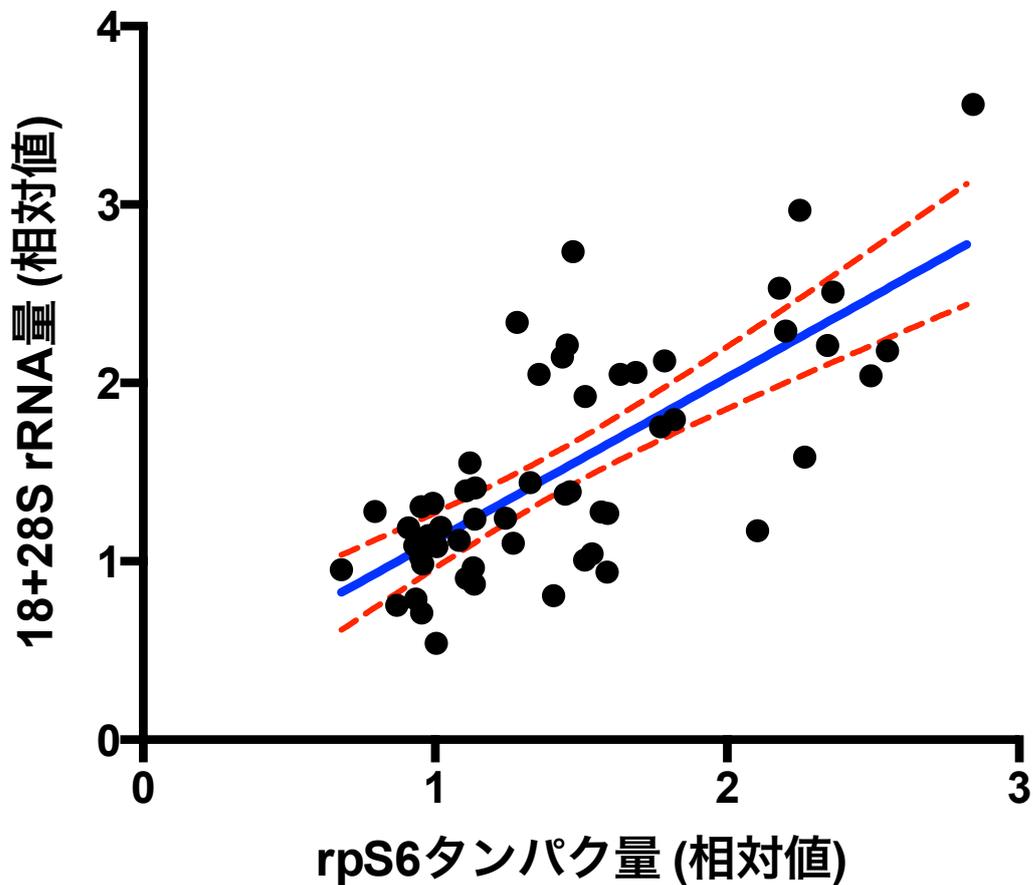


Fig.3-6 リボソームタンパク量と 18+28S rRNA 量の関係。

回帰直線： $Y = 0.91 * X + 0.21$ ($R = 0.73$, $P < 0.0001$)。

破線は 95%信頼区間を示した。

翻訳調節因子の量と筋重量/体重の関係

p70S6K リン酸化量と手術 14 日後の筋重量/体重の関係

Fig.3-7 に協働筋切除後 5 日の p70S6K リン酸化量と切除後 14 日の筋重量/体重の関係を示した。14 日における足底筋筋重量/体重が約 1.1~1.3 に相当する範囲では p70S6K リン酸化量の大幅な増加が見られたが、1.3 以上に相当する範囲ではリン酸化量の変化が見られなかった。

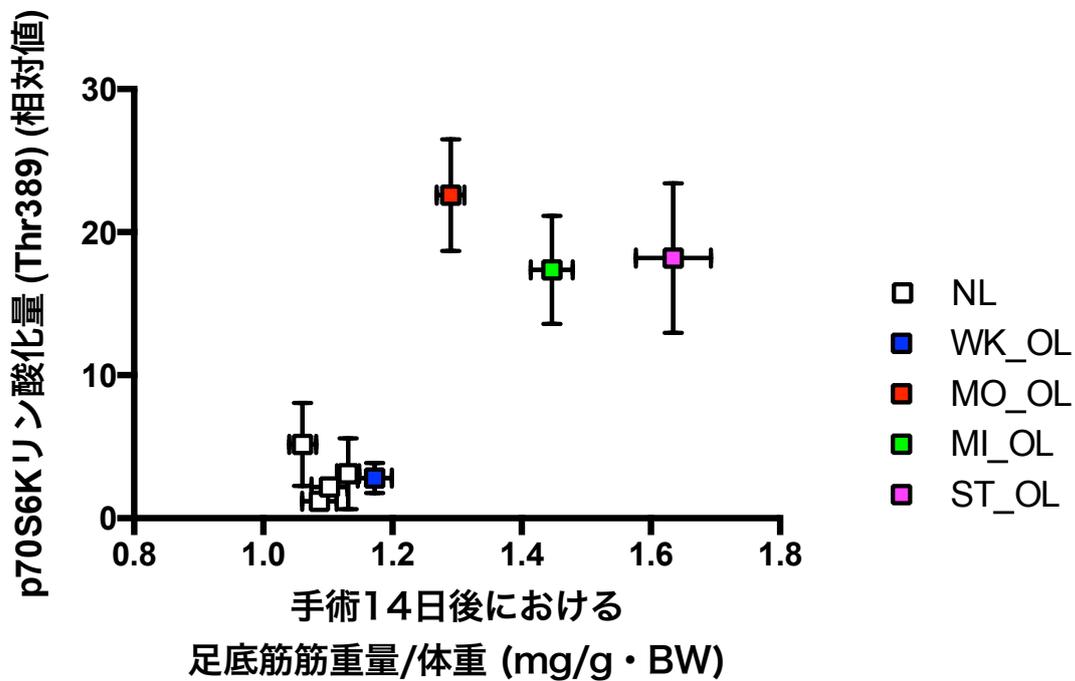


Fig.3-7. 協働筋切除後 5 日の p70S6K リン酸化量(WK_NL の平均値を 1 とする)と切除後 14 日の筋重量/体重の関係。

平均値 ± 標準誤差を示した。

rpS6 リン酸化量と手術 14 日後の筋重量/体重の関係

また, Fig.3-8 に協働筋切除後 5 日の rpS6 リン酸化量と切除後 14 日の筋重量/体重の関係を示した。14 日における足底筋筋重量/体重が約 1.1~1.3 に相当する範囲では rpS6 リン酸化量の増加が見られたが, 1.3 以上に相当する範囲ではリン酸化量の変化が見られなかった。

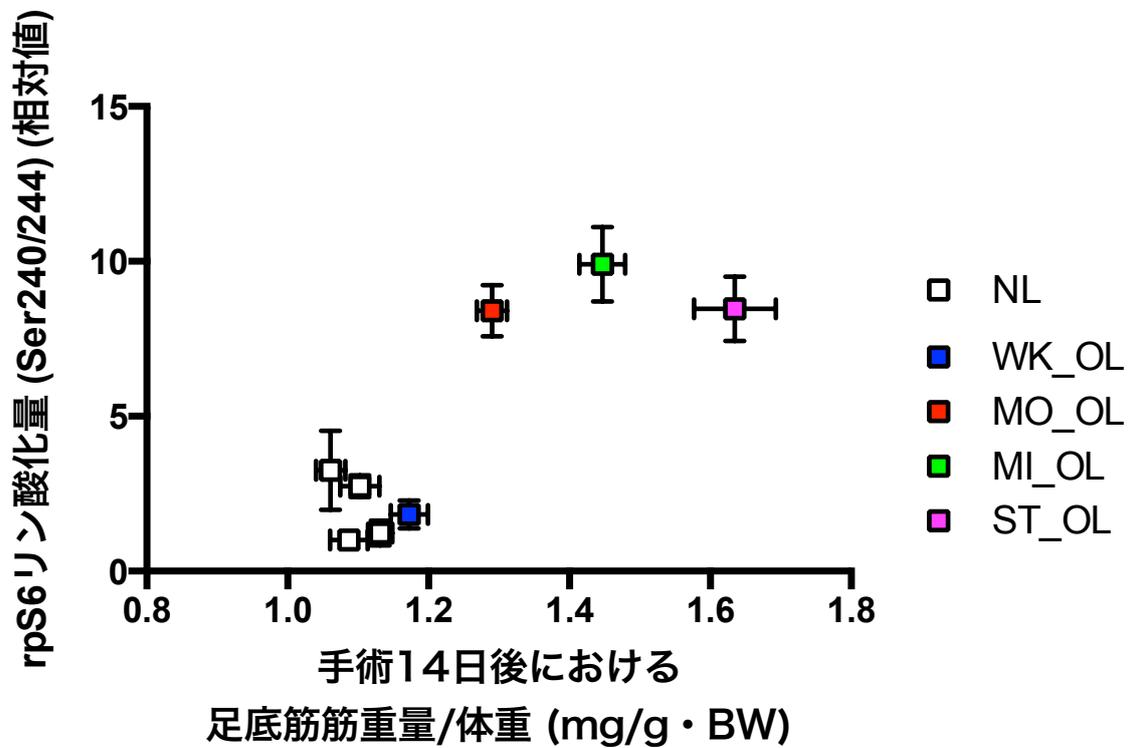


Fig.3-8. 協働筋切除後 5 日の rpS6 リン酸化量と切除後 14 日の筋重量/体重の関係。

平均値 ± 標準誤差を示した。

18+28S rRNA と手術 14 日後の筋重量/体重の関係

Fig.3-9 に協働筋切除後 5 日の 18+28S rRNA 量と切除後 14 日の筋重量/体重の関係を示した。相関分析を行った結果、強い正の相関が見られた($R = 0.98$)。また、その回帰直線は $Y = 2.918 * X - 2.153$ となっていた。

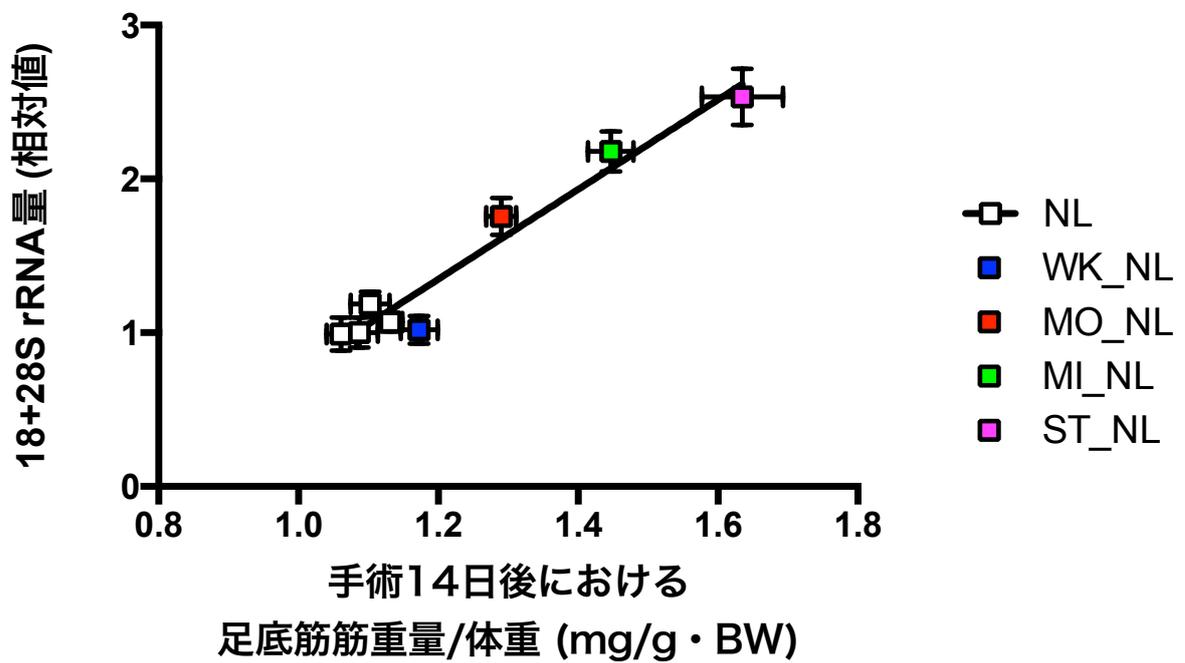


Fig.3-9. 協働筋切除後 5 日の 18+28S rRNA 量と切除後 14 日の筋重量/体重の関係。

平均値 ± 標準誤差を示した。

$R=0.98, P < 0.0001$

リボソーム生合成に関わる上流因子と rRNA 量との関係

UBF タンパク量と 18+28S rRNA 量の関係

Fig.3-10 に UBF タンパク量と 18+28S rRNA 量との関係を示した。相関分析を行った結果、強い正の相関が見られた($R = 0.69$, $P < 0.0001$)。また、その回帰直線は $Y = 0.7028 * X + 0.3924$ となっていた。

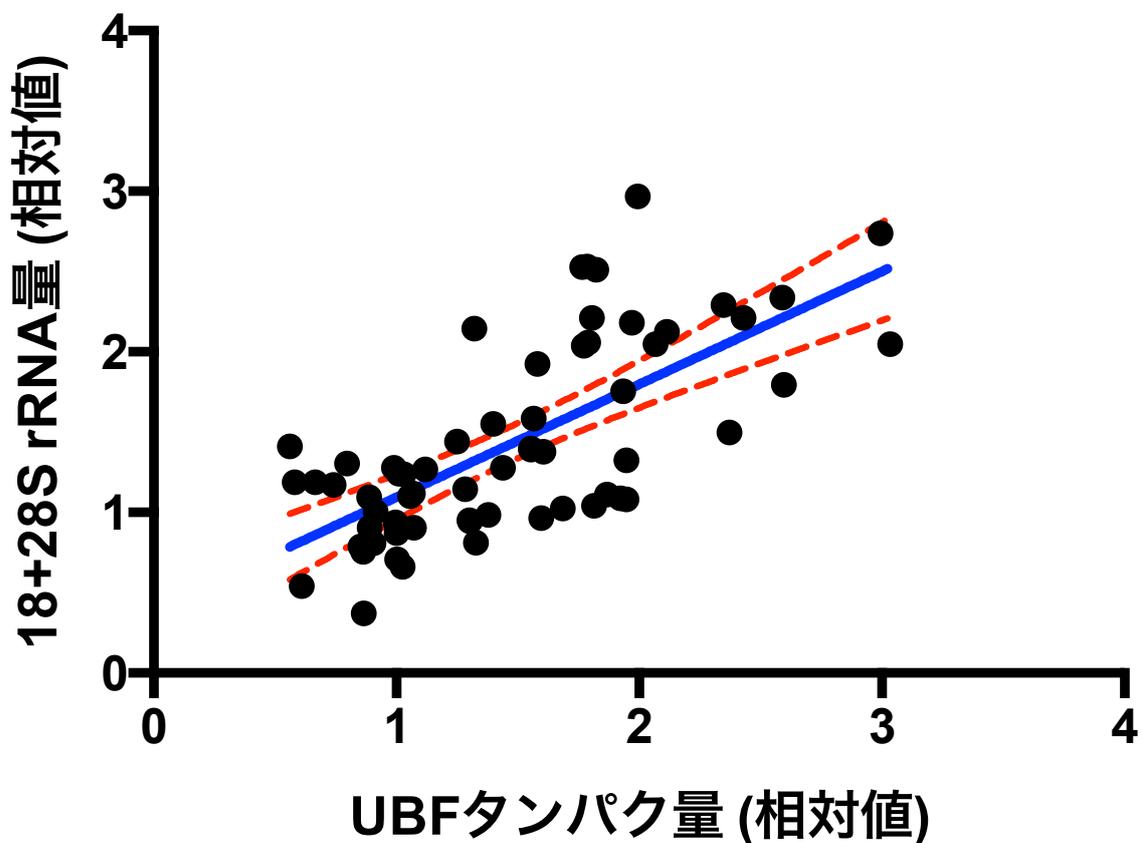


Fig.3-10. UBF 量と 18+28S rRNA 量との関係.

回帰直線 : $Y = 0.7028 * X + 0.3924$ ($R = 0.69$, $P < 0.0001$).

破線は 95%信頼区間を示した。

p70S6k リン酸化量と 18+28SrRNA 量の関係

Fig.3-12 に p70S6K リン酸化量と 18+28S rRNA 量の関係を示した。相関分析を行った結果、正の相関が見られた($R = 0.60$, $P < 0.0001$)。また、その回帰直線は $Y = 0.03398 * X + 1.158$ となっていた。

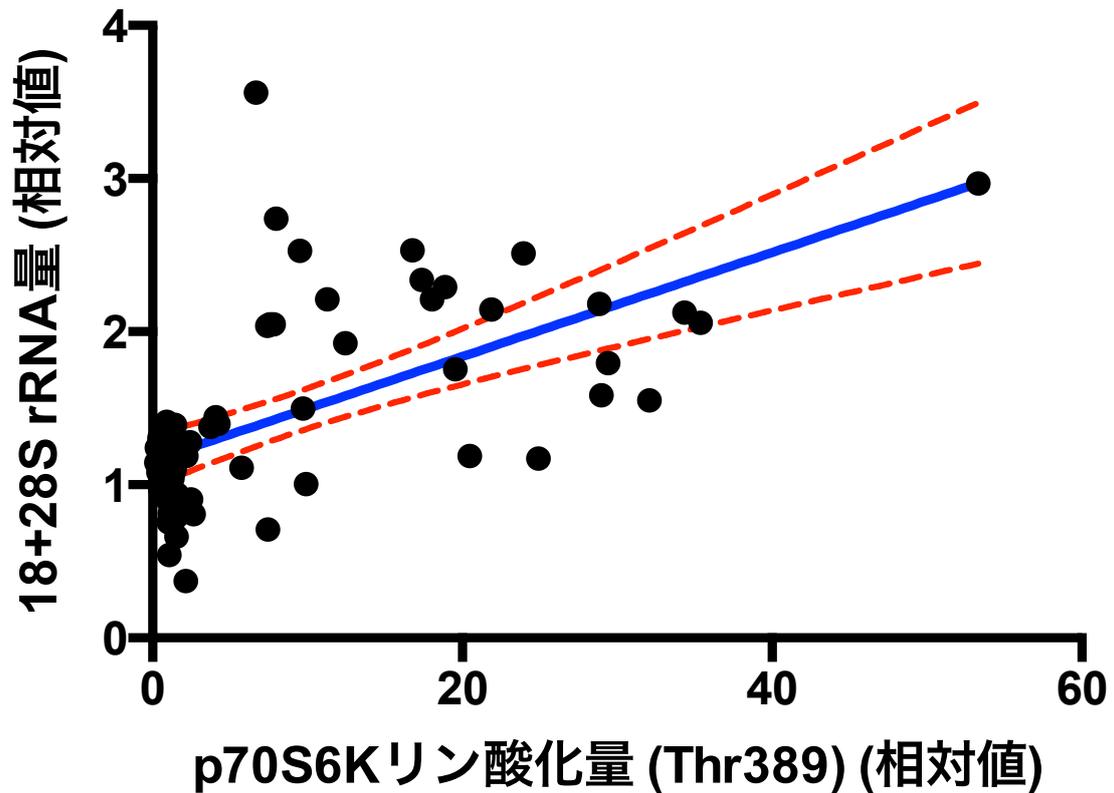


Fig.3-12 p70S6K リン酸化量と 18+28S rRNA 量との関係.

回帰直線 : $Y = 0.03398 * X + 1.158$ ($R = 0.60$, $P < 0.0001$).

破線は 95%信頼区間を示した。

7) 考察

p70S6K リン酸化量の変化について

Weigl は筋へ過負荷をかけて早い段階で、mTOR シグナルカスケードの下流のタンパクである p70S6K の 389 番目のスレオニン残基がリン酸化され、タンパク翻訳を活性化することを示している(Weigl 2012). 観察している筋肥大率の幅はかぎられているものの、Baar らと Terzis らは初期の p70S6K リン酸化量とその後得られる筋肥大の程度の間には強い正の相関を報告している(Baar & Esser 1999; Terzis et al. 2008). そのため、筋への負荷がかかった初期の p70S6K リン酸化の度合いは筋肥大の程度決定因子になっているのではないかと考えられている(Phillips 2009). しかし、最近の臨床的なレジスタンス運動の研究では p70S6K リン酸化量と筋肥大の程度の間には弱い相関か相関が見られなかったことを報告している(Mitchell et al. 2013; Mitchell et al. 2012; Burd et al. 2010).

本研究では p70S6K は手術後 14 日での筋重量/体重が 1.06~1.29 に相当する負荷の範囲ではリン酸化量が急激に増加する様子が観察された. これは協働筋切除後 2~7 日の間 p70S6K リン酸化量が大幅に増加すると報告している先行研究と一致する(Adams et al. 2002; Goodman et al. 2011b; Miyazaki et al. 2011; Chaillou et al. 2012). しかし、さらに筋へかかる負荷が大きくなる負荷の範囲(筋重量/体重が 1.29~1.63 に相当)ではリン酸化量の変化がプラトーになる様子が観察された. そのため、p70S6K リン酸化量は、弱い負荷の範囲においてはリン酸化量が負荷の増大に従って増加する増加相、中から強い負荷の範囲ではリン酸化量が増えなくなるプラトー相の二相性の変化が観察された.

このプラトー現象が表れた原因は定かではないが、ひとつの要因として細胞内シグナルの基質の減少が考えられる. 今回のような急速な肥大が起こる協働筋切除の際に、基質となる非リン酸化 p70S6K が減少することでシグナルの活性化がそれ以上増加しなくなる可能性が考えられる.

このリン酸化量変化のプラトー現象は、筋肥大反応初期の p70S6K のリン酸化量とその後得られる筋肥大の程度の間には直線的な量的関係があるとする

Baar らや Terzis らの報告と反する(Baar & Esser 1999; Terzis et al. 2008). この食い違いは先行研究で観察されている負荷の範囲に比べて本研究で観察した負荷の範囲がより広い範囲を観察していることによる可能性が考えられる. 本研究では従来の協働筋切除法に加えて, より弱い負荷がかかる3つの手術方法を導入している. しかし, これらの手術方法も, Baar らによるラットの電気刺激(Baar & Esser 1999)やヒトでのレジスタンス運動(Terzis et al. 2008)に比べて, 依然として負荷が強い可能性がある. このことから考えると, 先行研究で見られたような p70S6K リン酸化量とその後の筋肥大の程度との直線的な関係は, 筋への負荷が比較的弱い場合でのみ成り立ち, 負荷が強い場合にはリン酸化量の変化は頭打ちになる可能性がある.

そのため, p70S6K リン酸化は骨格筋肥大を引き起こすこと自体には重要であるものの, 特に筋に高い負荷がかかった場合には, 筋肥大率を規定する因子にはなっていない可能性がある.

rpS6 リン酸化量の変化について

本研究では p70S6K リン酸化量と同様にその下流にある rpS6 リン酸化量の変化が筋肥大率とどのような量的関係を持つかについても検討した. rpS6 リン酸化量リボソームに直接的に働きタンパク翻訳の開始段階を促進するため, 筋肥大率を規定する因子の候補と考えられた, しかし今回検討を行ったところ rpS6 リン酸化の変化も p70S6K リン酸化と同様に14日での筋重量/体重が1.33以上に相当する範囲ではリン酸化量が頭打ちになることが分かった. そのため, rpS6 リン酸化量は筋肥大率を規定する因子になっていない可能性がある.

rRNA 量の変化について

先行研究から協働筋切除7日後のマウスの足底筋(Goodman et al. 2011b)や、血清により活性化した筋管細胞(Nader et al. 2005)でリボソーム生合成が高まることが示されていた。しかし、リボソーム生合成と筋肥大の程度の間の量的な関係についてはこれまで報告されておらず、分かっていないことが多かった。

本実験から細胞内のリボソーム量の指標である 18+28S rRNA は協働筋切除後に有意に増加することが示された。rRNA 量は細胞内の全 RNA 量の約 8 割を占めることから、この結果は協働筋切除による筋肥大の際に細胞内の RNA 量が増加したとする先行研究と一致する(Goodman et al. 2011b; von Walden et al. 2012; Adams et al. 2002; Miyazaki et al. 2011; Chaillou et al. 2012; Chaillou et al. 2013)。

加えて、我々は筋にかかる負荷の大きさの増加とともに手術後5日での rRNA 量が増加することを見いだした(Fig.3-5)。手術後5日での rRNA 量と14日の筋重量/体重をプロットしたところ強い相関を示したことから($R = 0.98$, $P < 0.0001$)、筋への過負荷によるリボソーム生合成の活性化はその後の筋肥大の程度を決定する重要な役割を担っている可能性があると考えられる。

ヒトにレジスタンストレーニングを課してリボソーム生合成を調べた最近の研究では、骨格筋 1mg あたりの RNA 量がトレーニング前後の CSA 変化と相関があることが報告されている(Figueiredo et al. 2015)。この研究では同一のレジスタンス運動を被験者に行わせ、被験者それぞれの筋肥大を比較しているためこの結果は被験者ごとの筋肥大のしやすさの個人差とリボソーム生合成の程度が関係する可能性を示している。我々の今回の結果は、先行研究で示された個人の肥大のしやすさだけでなく、リボソーム生合成の活性の度合いが筋にかかる負荷の大きさによっても変化しうることを示しており、そのリボソーム生合成の度合いが筋肥大の程度と密接に関連する可能性を示した。

リボソーム生合成がどの程度効率的に行われているか？

機能的に完全なリボソームを組み立てるためには、リボソームを構成している構成要素が化学量論的に適切な量あることが必要であると考えられている (Ben-Shem et al. 2011; Ben-Shem et al. 2010; Warner 1999). そのため本実験では 18+28S rRNA と 40S サブユニット由来である rpS6 タンパクがどのような量比で存在するかを調べた. その結果, 18+28S rRNA 量と rpS6 タンパク量の間に強い相関が見られ (Fig.3-6; $R = 0.73$), その回帰直線は $Y = 0.91 * X + 0.21$ となっていた. この回帰直線の結果から 18+28S rRNA と rpS6 タンパク量はほぼ同じ割合で量的変化すると考えられる. このことから rRNA と rpS6 タンパクは協働筋切除の際に同様の量的調節を受けることで効率的なリボソーム生合成を行っていると考えられる.

このような rRNA とリボソームタンパクの間の量的な相関は肝臓部分切除による再生肝でも見られており (Tsurugi et al. 1972a; Tsurugi et al. 1972b), リボソーム生合成を効率的に行う上で重要であると考えられている. リボソームタンパク 1 種類の測定ではあるが, 本研究の結果から筋に過負荷がかかった際でも再生肝の研究と同様に, rRNA とリボソームタンパクの両方が適切な割合で合成されることで, 効率的なリボソーム生合成が行われていると考えられる. これらの結果は骨格筋にかかる負荷の大きさによってリボソーム生合成全体が効率的に量的調整されている可能性を示唆している.

リボソーム生合成を調整する因子について

リボソーム生合成を活性化する因子が筋肥大の際にどのように活性化され, それが筋への負荷の大きさの変化によってどのように応答するかを調べるため, UBF タンパク量と p70S6K リン酸化量が rRNA 量の変化とどのように関連するか調べた. 今回, 筋中の UBF 量を測定したところ, MO, MI, ST 群で過負荷によって増加することが確認された. これは先行研究の Goodman らや, von Walden らの研究と同様である (Goodman et al. 2011b; von Walden et al. 2012). また UBF 量と rRNA 量の間を調べたところ, 強い相関 (Fig.3-10, $R =$

0.69)があることが分かった。UBF リン酸化量の増加や UBF タンパク量の増加は Pol I による 45S pre rRNA の転写を促進することが様々な研究から報告されていることから(Hannan et al. 1995; Hannan et al. 1996; Voit & Grummt 2001; Voit et al. 1997), 同様に協働筋切除による骨格筋肥大の際にも rRNA 合成の活性化は UBF を介した経路の影響が強いと考えられる。

また, p70S6K リン酸化は UBF のリン酸化を介して rRNA の転写を活性化する可能性が指摘されている。しかし, 今回 rRNA 量と p70S6K リン酸化量との間の量的関係を見たところ, rRNA 量と相関はあるものの (Fig.3-12, $R = 0.6$), その傾きは極めて小さいことが分かった(傾き 0.033)。これは Goodman らの報告にあるように rRNA 量は骨格筋 mTOR 非依存性であるとする結果と一致する (Goodman et al. 2011b)。そのため, 少なくとも協働筋切除による骨格筋肥大の際の rRNA 合成は p70S6k リン酸化を介する経路の影響は強くないと言える。

まとめ

これらのことから, 協働筋切除による筋肥大の際には p70S6K リン酸化の量の変化はある程度のところで頭打ちになり, 筋への負荷がそれ以上強くなっても変化しなくなることが分かった。そのため, p70S6K リン酸化によって調節を受けているタンパク翻訳効率に関しても同様の変化を受けている可能性が考えられる。

一方で, 18+28S rRNA 量は筋への負荷が強くなるに連れて直線的に増加することが観察された。またリボソームの構成要素である rpS6 タンパク量も同様に増加することから, リボソーム生合成全体が筋への負荷の大きさに合わせて増加することが考えられる。タンパク翻訳キャパシティは細胞内のリボソーム量によって大きな影響を受けるため, タンパク翻訳キャパシティも同様に筋への負荷の大きさに合わせて増加すると考えられる。

筋肥大率をどのような因子が規定するかを考えた場合, リボソーム生合成が筋肥大率を規定する可能性の高い因子として考えられる。

Limitation

今回の研究は先行研究から考え、p70S6K リン酸化量と rRNA 量の蓄積の兼ね合いから協働筋切除5日後にサンプリングを行った。しかしサンプリングのタイミングと回数の問題から以下の2つの問題点が考えられることから、結論が限定される可能性が考えられる。

1) リン酸化量のピークを過ぎている可能性がある。

協働筋切除による p70S6K のリン酸化は切除2日で大幅に増加し、その後7日まで高値を維持することが示されている(Miyazaki et al. 2011)。そのため、本研究の手術5日後の段階でも十分に高い値を示していると考えられるが、そのピークのタイミングを逃している可能性がある。また、本研究では足底筋にかかる負荷の大きさを4段階に変化させているため、群ごとにリン酸化のピークのタイミングが異なっている可能性がある。

2) 一つのタイムポイントで結論を出すには限界がある

p70S6K のリン酸化はその時点での翻訳効率と関連性が高いと考えられる。しかし、筋肥大は長期間のタンパク合成活性化の総和によって決定されると考えられる。このことから一つのタイムポイントから p70S6K の寄与に関して結論を出すには限界がある可能性がある。そのためより詳細に検討するには、多くのタイムポイントにおいてサンプリングを行い、そのリン酸化量の曲線下面積などを用いて検討を行う必要があると考えられる。

これらのことから、p70S6K リン酸化量が筋肥大率に対してどの程度寄与しているのかを判定する上で、今回の研究の結果が当てはまる条件は限定される可能性がある。

第4章

リボソーム生合成は 筋肥大率を規定するか？ —薬理学的阻害による検討—

1) 背景

第3章ではリボソーム生合成とその後に得られる筋重量/体重の間に強い相関があることが示された。そのため、リボソーム生合成が筋肥大率を規定する因子として有力であると考えられる。しかしこの量的相関が、リボソーム生合成が筋肥大率を規定していることによって生じる因果関係に基づく相関なのか、もしくは単に筋肥大に付随して起こることから生じる付随現象による相関なのかについては明らかにはできなかつた。そのため、リボソーム生合成が実際に筋肥大率を規定している因子であると確証するためには、リボソーム生合成に対して介入することで、筋肥大率がどのように変化するかを検討する必要がある。

そこで第4章では、協働筋切除によって筋に過負荷をかけた際に、リボソーム生合成を薬理的に阻害すると筋肥大率やタンパク合成速度にどのような影響が表れるかを調べた。リボソーム生合成の阻害はRNA合成の阻害剤であるアクチノマイシンD(AcD)を用いた。AcDはDNA鎖に挿入されることでRNAの合成を阻害する薬剤である。そのため、全てのRNA種の合成が阻害の対象になりうるが、18S、28S rRNAの元となる45S pre rRNAはmRNAやtRNAと比較してそれぞれ30~50倍阻害されやすいことが報告されている(Perry & Kelley 1970)。そのため、低用量のAcD投与は45S pre rRNAの合成を特異的に阻害することができると考えられる。リボソーム生合成はリボソームの構成要素が化学量論的に適切な量存在しないと効率的に合成を行えないと考えられていることから(Ben-Shem et al. 2011; Ben-Shem et al. 2010; Warner 1999)、45S pre rRNAの合成阻害はリボソーム生合成全体を阻害することができると考えられる。

本研究では、mRNA合成やtRNA合成に影響が出ない投与量の範囲で2通りの投与量のAcDを投与し、それによってrRNA量、筋重量/体重やタンパク合成速度がどのように変化するかを検討する。リボソーム生合成が筋肥大率を規定する因子であるならば、AcD投与によるリボソーム生合成阻害によって筋肥大やタンパク合成速度が抑制されると予想される。

2) 方法

実験動物

Wistar 系の雄ラット (11 週齢 ; 体重 約 330g) を日本クレアから購入した。ラットは購入から 1 週間の予備飼育の後, 実験に用いた。ラットは 2 群に分け, それぞれ CON 群(n=9), AcD 群(n=10)とした。ラットは個別のケージに分け, 室温 22°C, 湿度 60%, 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育を行った。飼料(CE2; 日本クレア), 飲水は自由摂取とした。ラットの扱いと全ての実験手法は The policy statement of the American College of Sports Medicine on research with experimental animals に従って採用した。また、本実験は東京大学総合文化研究科実験動物委員会の承認を得た上で行った。

アクチノマイシン D 投与

実験のタイムコースを Fig.4-1 に示した。AcD 群は AcD 214.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weigh を腹腔投与した。この投与量はラットにおいて RNA ポリメラーゼ 2 の活性が阻害されないとされる投与量 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight 以下 (Lindell et al. 1978)でかつ, 単回投与で 95%のラットが 3 週間生存したとする投与量 214.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (Jhee et al. 1965)を元にした。AcD はジメチルスルオキシドに溶解したものをストック溶液とし, ストック溶液を PBS に懸濁することで投与用溶液を作成した。また CON 群では AcD 群と同じ溶液量の PBS を腹腔投与した。

協働筋切除手術

腹腔投与から3時間後、イソフルラン吸入麻酔下でラットの右の下腿に対して協働筋切除手術を施した。この協働筋切除手術は第1章におけるST群の手術と同様のものである。以降、手術を行った下腿の足底筋をOL、行わなかった下腿の足底筋をNLとして表記する。手術後、切開した皮膚を4-0 ナイロン糸によって縫合し、ケージに戻し安静とした。その後、毎日体重の変化と摂餌量の変化を測定した。

AcD 投与群は約6匹に1匹程度、摂餌量の顕著な低下とそれに伴う体重の持続的な減少を示す個体が存在した。これらのラットを解剖すると腹水と内臓外壁に白色の腫瘍状の物体が見られた。これはAcDの毒性による臓器不全によるものであると考えられる。これらのラットは結果から除外している。

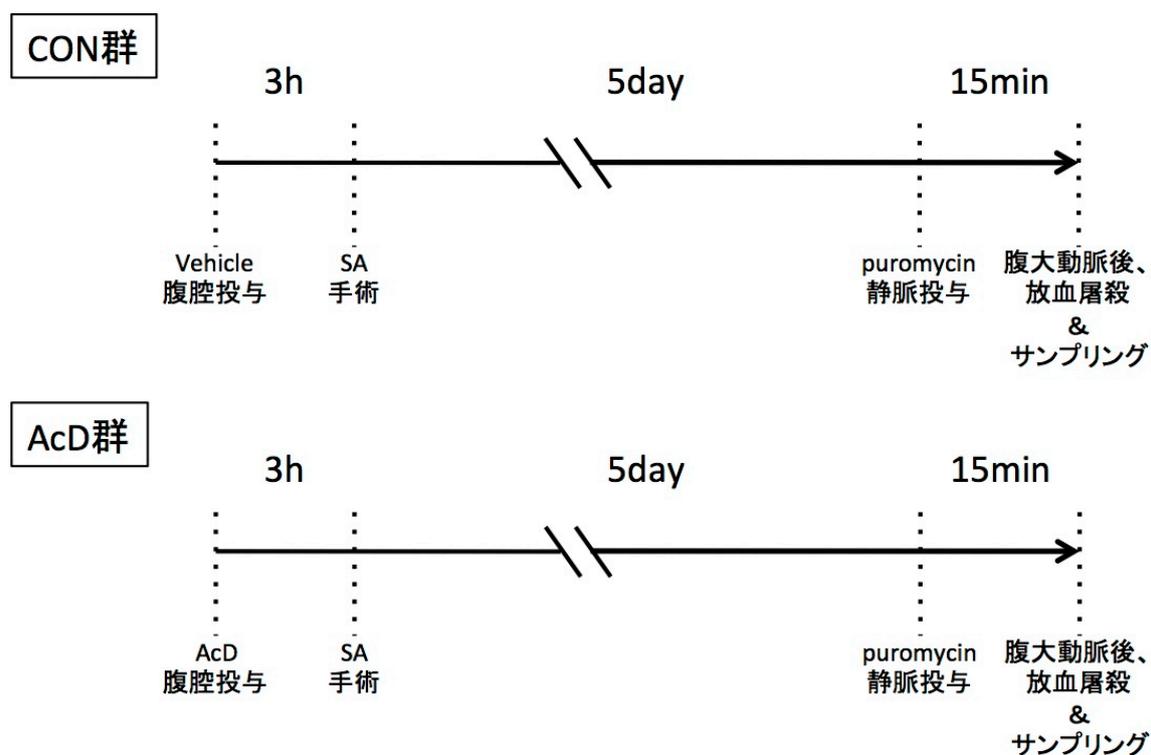


Fig.4-1. 実験のタイムコース。

筋のサンプリングとタンパク質合成の定量

CON 群, AcD 群の一部に対して(CON; n = 5, AcD; n = 4), ピューロマイシンを用いた合成タンパク標識 (SUnSET 法) によるタンパク合成速度の測定を行った(Goodman et al. 2011a; Ogasawara et al. 2014). ピューロマイシンはアミノアシル tRNA の 3'末端に類似した構造を持ち, タンパク翻訳の際に誤って伸長中のポリペプチド鎖に取り込まれる. ピューロマイシン化されたタンパクを認識する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行うことで, タンパク合成速度を算出することができる. ピューロマイシンの投与と筋のサンプリングは Ogasawara らの方法を元に改変して行った(Ogasawara et al. 2014). 手術から 5 日後, 解剖の 12 時間前に飼料を除いた. 12 時間の絶食の後, ラットはイソフルランによる吸入麻酔下で腹部を開き, 後大静脈を露出した. その後, ピューロマイシン 0.04 mmol/kg body weight を後大静脈から静脈投与した. 投与 15 分後, クレンメによって腹大動脈を阻血し足底筋への血流を止めた後, 心臓に切れ目を入れ放血屠殺を行った. その後, 足底筋の摘出を行った. 摘出した筋は筋重量の測定後, 液体窒素で凍結した. 凍結した筋は液体窒素下で粉末化し, 以降の分析まで -80°C で保存した.

RNA の抽出

液体窒素下で粉末化した足底筋を 50mg 分取し, Isogen (Nippon gene) 750 μl を加え, ポリトロンホモジナイザー(Ultra Turrax T8 homogenizer; IKA)によって均一化した. その後, 遠心処理(12000 \times g, 10 min, 4°C)を行い, 上清を回収し, 室温にて 5 min インキュベートした. その後, クロロホルムを 150 μl 加え, ボルテックス後, 室温にて 3 min インキュベートを行った. これを遠心処理し(12000 \times g, 15 min, 4°C), 水層を全て採取した. 回収した水層にイソプロパノール 375 μl 加え, ボルテックス後, 室温で 10 min インキュベートを行った. その後, 遠心処理(12000 \times g, 10 min, 4°C)し, 上清を捨て 70% エタノール 1000 μl を加えた. ボルテックス後, 遠心処理し(12000 \times g, 5 min, 4°C), ペレットを採取した. 得られた RNA ペレットは風乾後, 200 μl の DNase, RNase

フリーの TE バッファ(pH 8.0)に溶解した。

rRNA の定量

筋 125 μ g 分に相当する RNA 抽出液を蛍光色素(GRR-1000GR Red; Bio-Craft, Tokyo)と混濁後, 1%アガロースゲルによって 60mA の定電流で 30 min 電気泳動を行った。泳動を終えたゲルは UV 励起によりバンドの可視化後, 撮影を行った。得られた画像から 18S と 28S の rRNA に相当するバンドを ImageJ によって定量を行った。定量した値は CON_NL の平均値を 1 として表した。電気泳動の際に 6 つの実験条件 (NL and OL \times 3 群) は直接比較ができるように同じゲル上で泳動を行った。また, 全てのゲルに同一のサンプル 1 つを流すことでゲル間の補正を行った。

ウェスタンブロッティング

液体窒素下でパウダー化した筋サンプルを 50mg 分取し, プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤(Protease and Phosphatase inhibitor cocktail, Halt)を含む氷冷した RIPA バッファ(100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl)を加え, ポリトロンホモジナイザー(Ultra Turrax T8 homogenizer; IKA)によって均一化した。ホモジナイズ後, 遠心処理(12000 \times g, 15min, 4 $^{\circ}$ C)し, 上清を回収し, タンパク抽出サンプルとした。タンパク抽出サンプルのタンパク濃度はタンパク濃度測定キット(Protein Assay Rapid Kit; Wako)により測定した。測定した値を元にタンパク抽出サンプルは全てのサンプルのタンパク濃度が一定になる様に希釈し, サンプルバッファ(1.0% v/v 2-メルカプトエタノール, 4.0% w/v SDS, 0.16 M Tris-HCl (pH 6.8), 43% v/v グリセロール, 0.2% ブロモフェノールブルー)と混合し, 95 $^{\circ}$ Cで 5min 加熱し, ウェスタンブロッティング用サンプルとした。

等量のタンパク質(50 μ g)を含むウェスタンブロッティング用サンプルを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離後, polyvinylidene

第4章：リボソーム合成は筋肥大率を規定するか？

difluoride(PVDF)膜(Wako)にタンパク質を転写した。TBST で洗浄後、5% スキムミルク in TBST でブロッキングを行った(室温 1 時間)。次に抗 Puromycin 抗体(1:1000, Millipore)を用いて 1 次抗体反応を行った(4 °C, O/N)。1 次抗体反応後、TBST で洗浄後、2 次抗体反応(1:5000, HRP 標識 Anti-mouse, Cell Signaling Technology)を行った(室温, 1 時間)。二次抗体反応終了後、TBST によってメンブレンを洗浄し、発光試薬(Luminata Forte; Millipore)を用いてバンドを化学発光させ、冷却 CCD カメラで撮影後、ImageJ を用いて発光強度を定量した。定量した値はタンパク合成速度として用いた。実験の際に 4 つの実験条件 (NL and OL × 2 群) は直接比較ができるように同じゲル上で泳動を行いメンブレンに転写を行った。また、全てのゲルに同一のサンプルを 1 つ流すことでゲル間の補正を行った。測定後、メンブレンは抗体除去バッファー(Restore Plus; Thermo Scientific)を用いて結合した抗体の除去を行った後、クマシーブルー(CBB)染色を行い、全てのレーンに同じタンパク量がアプライされていることを確かめた (Welinder & Ekblad 2011)。

統計処理

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表示した。まず NL-OL 間で対応のある 2 元配置分散分析(NL-OL × 2 群)を行い、NL-OL の主効果が認められた場合にそれぞれの群で NL-OL 間の比較を行った。また、有意な交互作用が認められた場合に OL/NL(%)について対応のない t 検定を用いて 2 群間で比較を行った。18+28S rRNA 量と筋重量/体重の関係、18+28S rRNA 量とタンパク合成速度の関係についてはピアソンの積率相関分析を用いて調べた。P 値は 0.05 未満をもって有意とした。

3) 結果

体重の変化

Fig.4-2 にラットの体重の変化を示した。CON 群, AcD 群の間には明確な差は見られなかった。

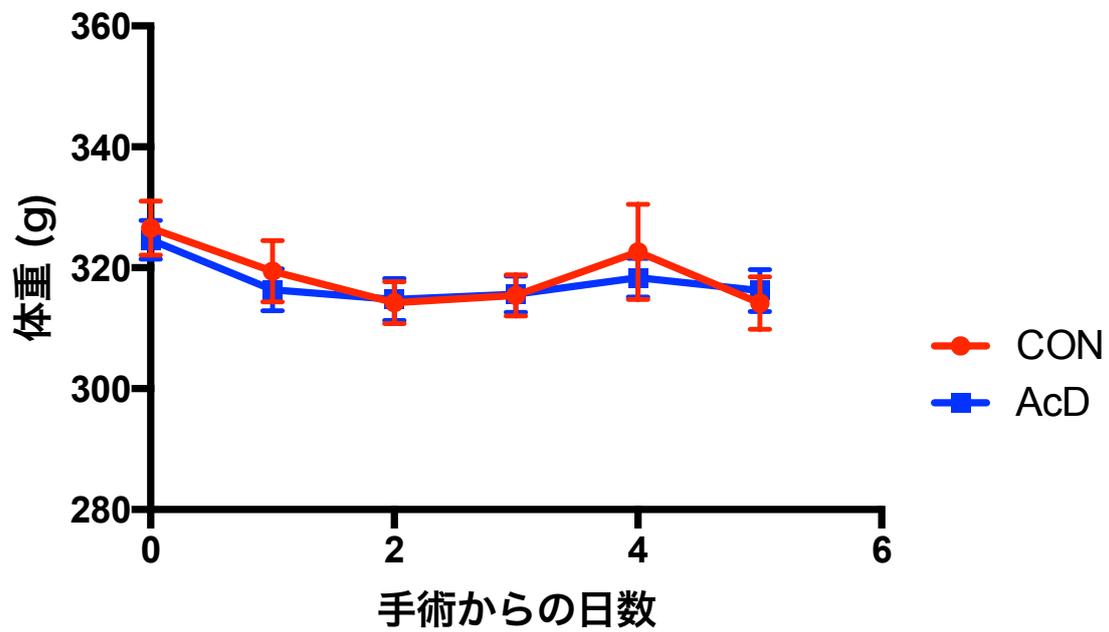


Fig.4-2. 体重の変化.

値は平均値 ± 標準誤差で示した。

摂餌量の変化

Fig.4-3 に摂餌量の変化を示した。CON 群, AcD 群の間には明確な差は見られなかった。

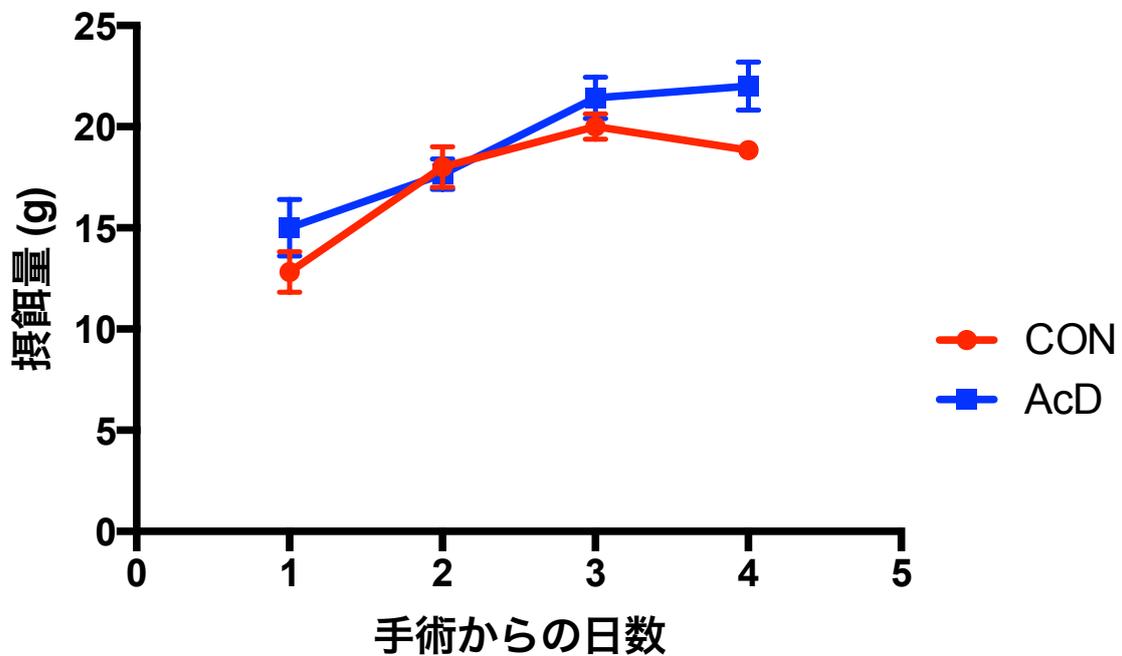


Fig.4-3. 摂餌量の変化.

値は平均値 \pm 標準誤差で示した。

筋重量/体重

体重で標準化した足底筋筋重量（筋重量/体重）の結果を Fig.4-4 に示す．分散分析の結果，NL と OL の間で主効果が認められたため($P < 0.0001$)，それぞれの群について NL と OL の比較をしたところ，両群で OL 脚の足底筋の筋重量/体重は NL 脚足底筋に比べて有意に大きな値を示していた(CON; $33.8 \pm 5.0\%$ 増, AcD; $23.3 \pm 2.6\%$ 増, それぞれ $P < 0.0001$, $P < 0.0001$)．また分散分析の結果，有意な交互作用が認められたため($P = 0.036$)，OL/NL を群間で比較したところ，CON 群は AcD 群に比べて有意に大きな値を示していた($P = 0.035$)．

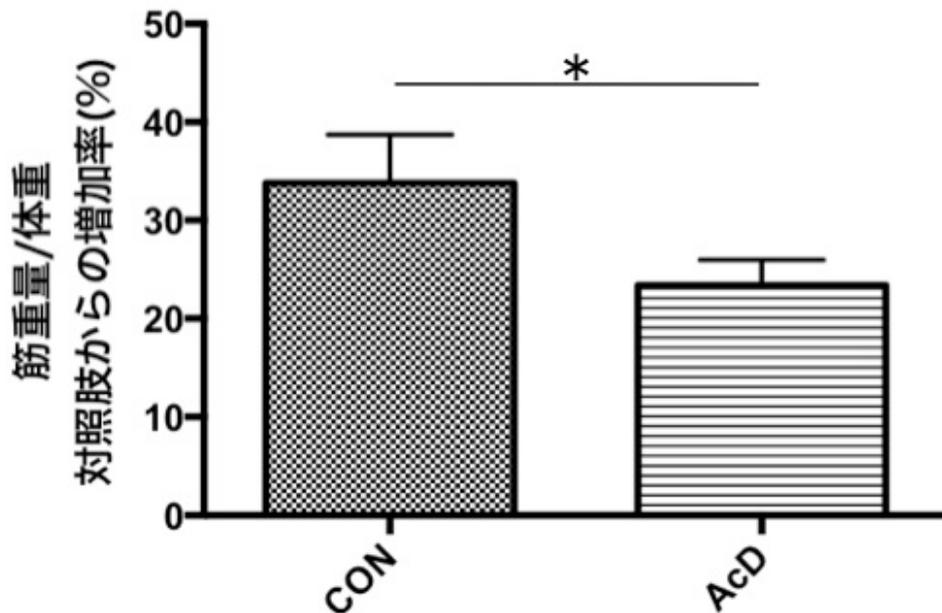


Fig.4-4. 筋重量/体重.

値は平均値 \pm 標準誤差で示した.

*: 群間で有意に異なる ($P < 0.05$).

筋 1mg あたりの 18+28S rRNA 量

それぞれのNLで補正した筋 1mg あたりの 18+28S rRNA 量の結果を Fig.4-5 に示す. 分散分析の結果, NL と OL の間で主効果が認められたため($P < 0.0001$), それぞれの群について NL と OL の間の比較を行ったところ, 全ての群で OL 脚はNL脚に比べて有意に大きな値を示していた(CON; 2.05 ± 0.087 , AcD; 1.75 ± 0.027 倍, それぞれ $P < 0.0001$, $P < 0.0001$). また分散分析の結果, 有意な交互作用が認められたため($P = 0.0012$), OL/NL を群間で比較したところ, 有意な差が見られた(それぞれ $P = 0.0023$).

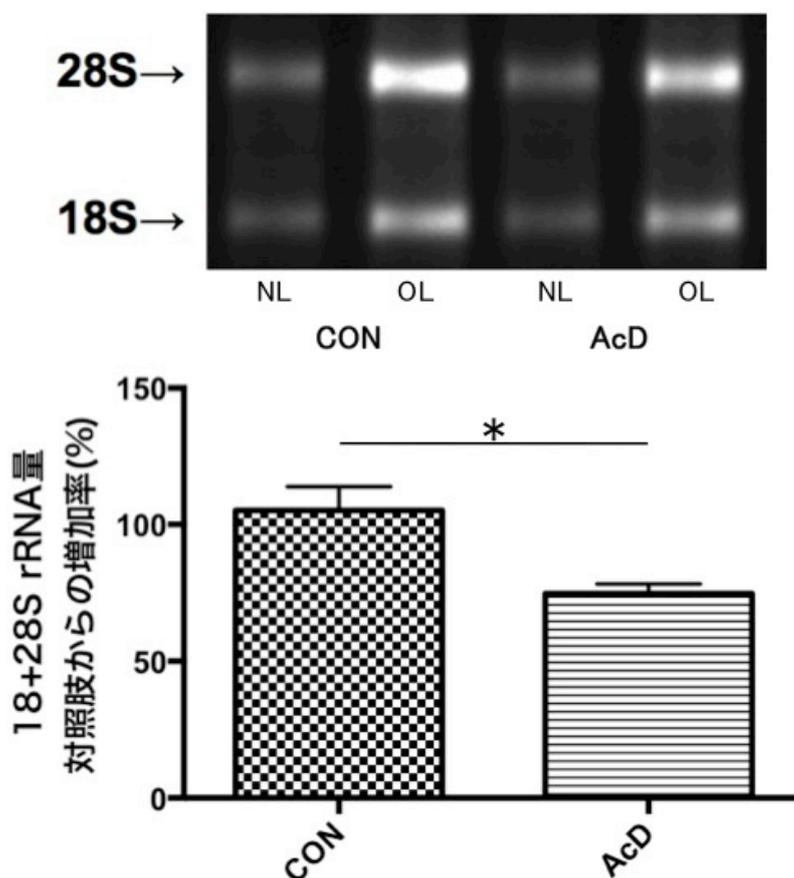


Fig.4-5. 筋 1 mg あたりの 18+28S rRNA.

値は平均値 \pm 標準誤差で示した.

*: 群間で有意に異なる ($P < 0.05$).

タンパク合成速度

タンパク合成速度測定の結果を Fig.4-6 に示す. 分散分析の結果, NL と OL の間で主効果が認められたため($P = 0.0002$), それぞれの群について NL と OL の比較をしたところ, 両群で OL 脚は NL 脚に比べて有意に大きな値を示していた(CON; 4.7 ± 1.1 倍, AcD; 3.8 ± 0.34 倍, それぞれ $P = 0.0075$, $P = 0.0082$). また分散分析の結果, 有意な交互作用は認められなかった($P = 0.51$).

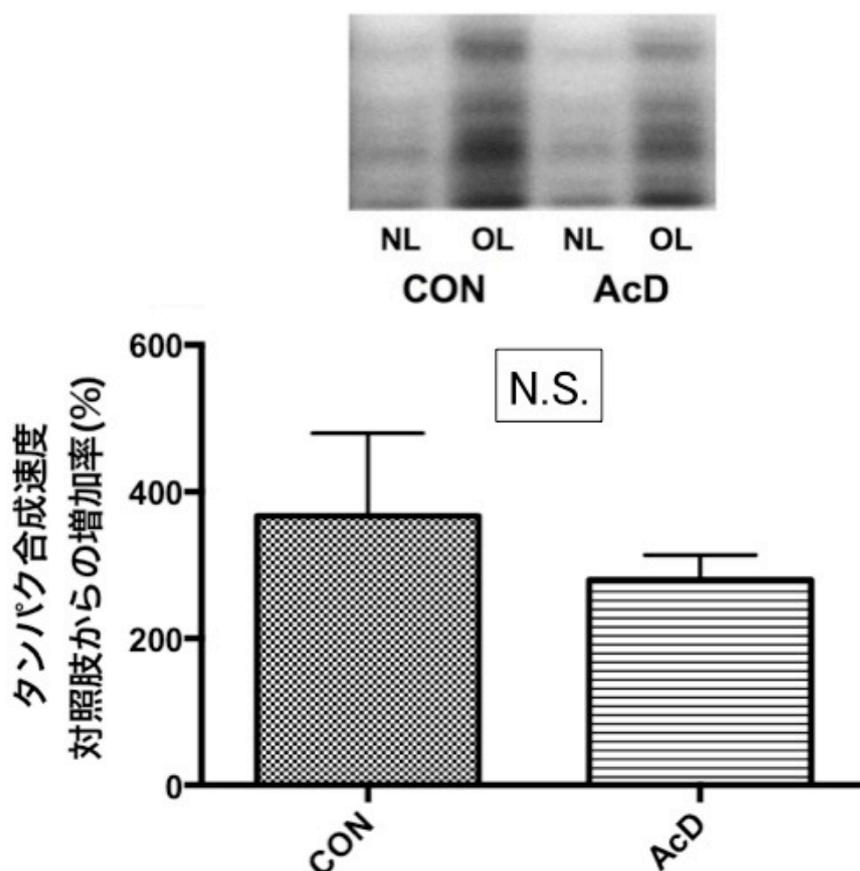


Fig.4-6 タンパク合成速度

値は平均値 \pm 標準誤差を示した.

rRNA 量と筋重量/体重の関係

18+28S rRNA 増加率と筋重量/体重増加率の間の相関関係を Fig.4-7 に示した。相関分析を行った結果、正の相関が見られた($R = 0.73$, $P = 0.0004$)。また、その回帰直線は $Y = 0.3405 * X + 0.7907$ となっていた。

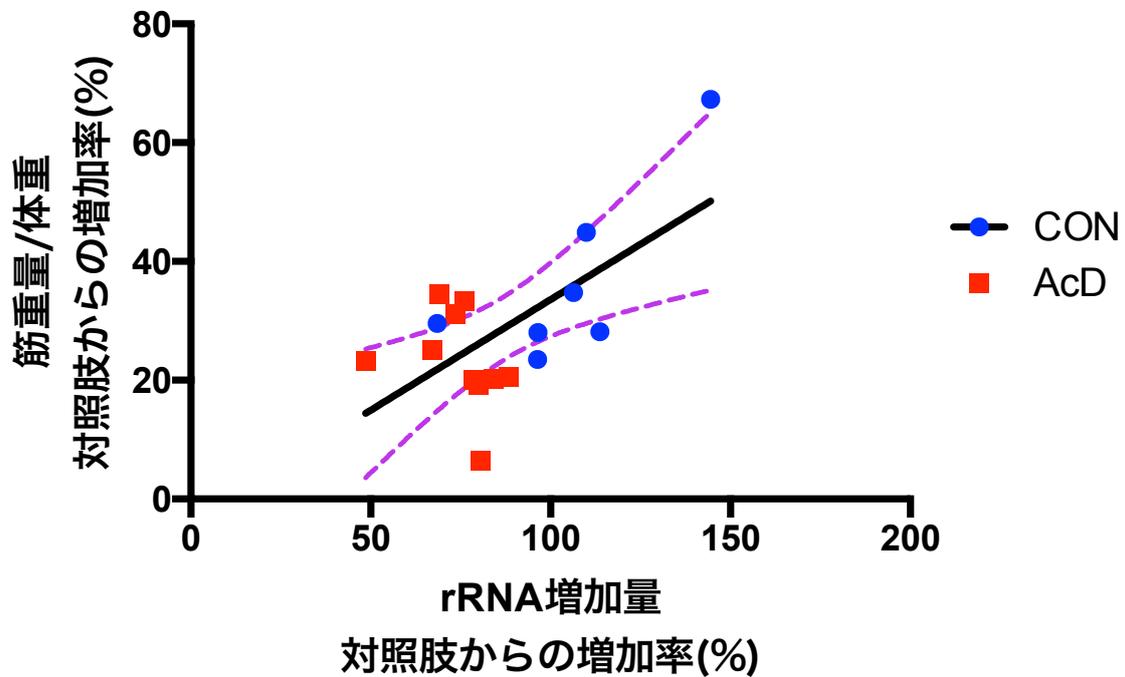


Fig.4-7. 18+28S rRNA と筋重量/体重の関係。
回帰直線: $Y = 0.3728 * X - 3.697$ ($R = 0.6429$, $P = 0.0054$).
破線は 95%信頼区間を示した。

4) 考察

rRNA 量について

CON では過負荷によって rRNA 量が約 2 倍に増加することが確認された。一方、AcD 群は CON 群の増加量から約 25%減少していた。そのため、今回投与した AcD は rRNA の増加を抑制することでリボソーム生合成を抑制できたと考えられる。

しかし一方で、rRNA 量の増加は完全に抑えることはできなかった。この原因は AcD の投与量と投与方法にあると考えられる。今回の実験ではラットの生存と体調を最優先に行ったため AcD は単回投与とし、その投与量も少ない量を用いている。そのため、rRNA 合成の抑制は部分的な抑制に留まったと考えられる。

筋重量/体重について

筋重量/体重の増加は AcD 投与によって抑制された。また rRNA 増加率と筋重量/体重増加率の関係から、rRNA 増加率が低下するにつれて筋重量/体重の増加率が低下する様子が観察された。このことから協働筋切除によって引き起こされる筋肥大の際には rRNA の増加、つまりリボソーム生合成の増加が大きな影響を持っていると推察される。このことから、リボソーム生合成が筋肥大率を規定する因子である可能性がさらに高まった。

タンパク合成速度について

ピューロマイシンによるタンパク合成速度測定より、CON 群 OL では筋への過負荷によってタンパク合成速度が NL に比較し約 3.5 倍になることが確認された。

また、AcD 群の結果から、AcD 投与によるタンパク合成速度への影響は有意な差が見られなかった。これはタンパク合成速度の測定に用いた個体数(n=5)が少なかったことによると考えられる。

今後さらに検討すべき内容

AcDの投与方法は適切であったか？

今回の実験ではラットが AcD の毒性によって実験期間中に死なないことと、mRNA 合成などを抑制しないことを最優先に AcD 投与条件を決定した。そのため、AcD 投与量と投与の回数を低く設定している。特に投与の回数は単回投与のため、AcD の血中での半減期は 36 時間であることを考慮すると 3 日後には血中濃度が四分の一になると考えられる。そのため、今回投与した AcD が rRNA 合成を阻害している期間は肥大期間 5 日のうち前半程度しか効いていない可能性が考えられる。そのため、過負荷による rRNA 量増加に対して AcD 投与は部分的な抑制にとどまったと考えられる。そのため、リボソーム生合成をさらに抑制した場合に筋肥大にどのような影響があるかについては明らかになっていない。そのため、今後は投与量や投与方法などに関して検討を行い、リボソーム生合成の抑制率をさらに高めるよう工夫を行う必要がある。

また、AcD 投与方法に関しても検討の余地がある。AcD は現在でも小児がんで投与されているが、血管内からの投与に限られている。これは AcD が腐食性の抗癌剤であり、血管外への漏出は潰瘍などの発生を引き起こすと言われている。今回はラットの AcD 投与実験で一般的に用いられている腹腔投与を用いたが、一部のラットで内臓に白色の腫瘍状のものができ、食欲の顕著な減少が見られた。そのため、AcD 投与において腹腔投与は適切でなく、効果的でなかった可能性がある。今後は、尾静脈投与など他の投与方法も検討し、より安全かつ効果的な投与方法を検討する必要がある。

rRNA 以外の RNA 種の合成は阻害されていないか？

AcD は理論的には全ての RNA 種の転写を抑制しうるが、RNA 種によってその過敏さが異なり、rRNA は他の RNA 種の 30~50 倍ほど抑制されやすい(Jhee et al. 1965)。また、先行研究でラット胎児に AcD の投与量を振って投与した研究を参考に mRNA 転写に関わる Pol2 の活性が低下する 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW よりも低濃度に抑えた(Lindell et al. 1978)。そのため、tRNA や mRNA の合成は AcD

第4章：リボソーム生合成は筋肥大率を規定するか？

投与の影響を受けていないと考えられる。しかし、今回測定したRNA種はrRNAのみであり、実際にrRNA以外のRNA種の合成がAcD投与によってどの程度保たれているかについては不明である。そのため、AcD投与による筋肥大率の低下がmRNAやtRNA転写が阻害されたことによって引き起こされた可能性を完全には否定しきれない。そのため、今後更なる検討を行い、他のRNA種の転写が保たれているか検証する必要がある。

翻訳効率を高めるシグナル活性は保たれているか？

この実験ではAcD投与がrRNA量にのみ作用し、翻訳効率を調整する細胞内シグナルなどに対しては影響がないことを前提に実験を行っている。これまで、AcDがmTOR系などのシグナル伝達系に対してどのような影響があるかについての研究は行われておらず、ほとんど分かっていない。そのため、AcDが細胞内シグナル伝達系を阻害することで、翻訳効率の増加を抑制している可能性は完全には否定できない。今後はシグナル分子の活性化が抑制されていないか直接検証する必要がある。

第5章

総合論議

1) 結果のまとめ

本研究は以下のことを行った。

本研究は得られる筋肥大率を4段階に変えることができる協働筋切除手術を開発し（研究1）、用いることで以下の点が明らかになった。

●筋核の増加：筋への負荷によって筋核はほとんど増加しない。そのため、筋核の増加がなくとも既存の筋核だけで筋肥大を起こすことが可能である。筋肥大への貢献度は低い。（研究2 Fig.5-1）

●タンパク翻訳効率：筋への負荷によってタンパク翻訳効率を活性化するp70S6Kリン酸化は大幅に増加するものの、プラトーになり変化しなくなる。筋肥大を引き起こすこと自体には貢献度は高いと考えられるが、筋肥大率を規定する因子とは考えづらい。（研究3 Fig.5-2）

●タンパク翻訳キャパシティ：筋への負荷によってタンパク翻訳キャパシティを高めるリボソーム生合成が高まる。リボソーム生合成の程度はその後の筋肥大率と強く相関することから、筋肥大率を規定する因子として有力である。（研究3 Fig.5-3）

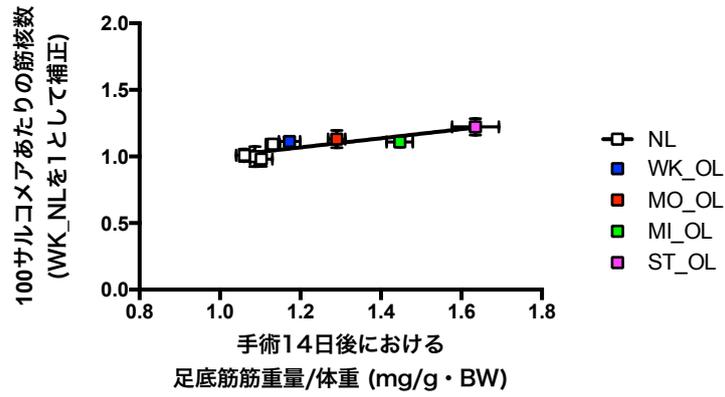


Fig.5-1. 筋核数と筋肥大の関係。

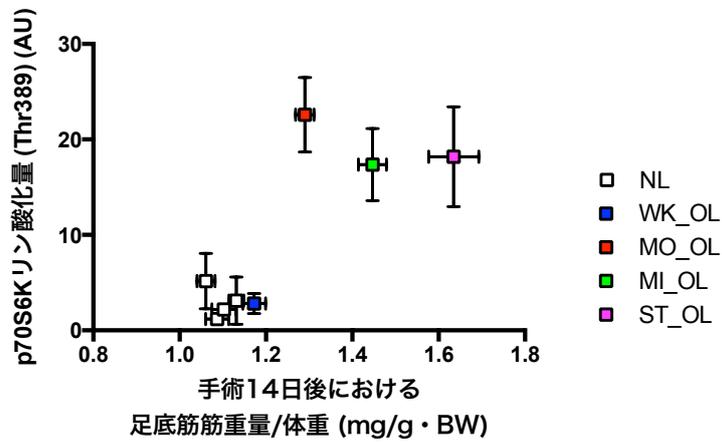


Fig.5-2. p70S6K リン酸化と筋肥大の関係。

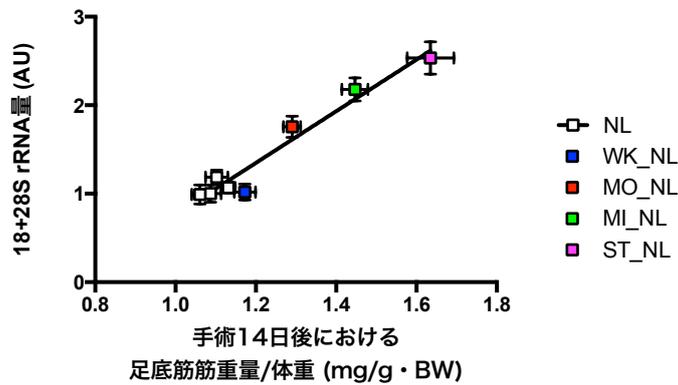


Fig.5-3. rRNA 量と筋肥大の関係。

●これを元に、リボソーム生合成が筋肥大率を規定するかどうかについて薬理的なリボソーム生合成阻害を用いて確認を行った。(研究4 Fig.5-4)

アクチノマイシンD投与によるrRNA増加の抑制は過負荷による足底筋重量の増加を抑制する結果となった。そのため、リボソーム生合成が筋肥大率を規定する可能性がより強まった。

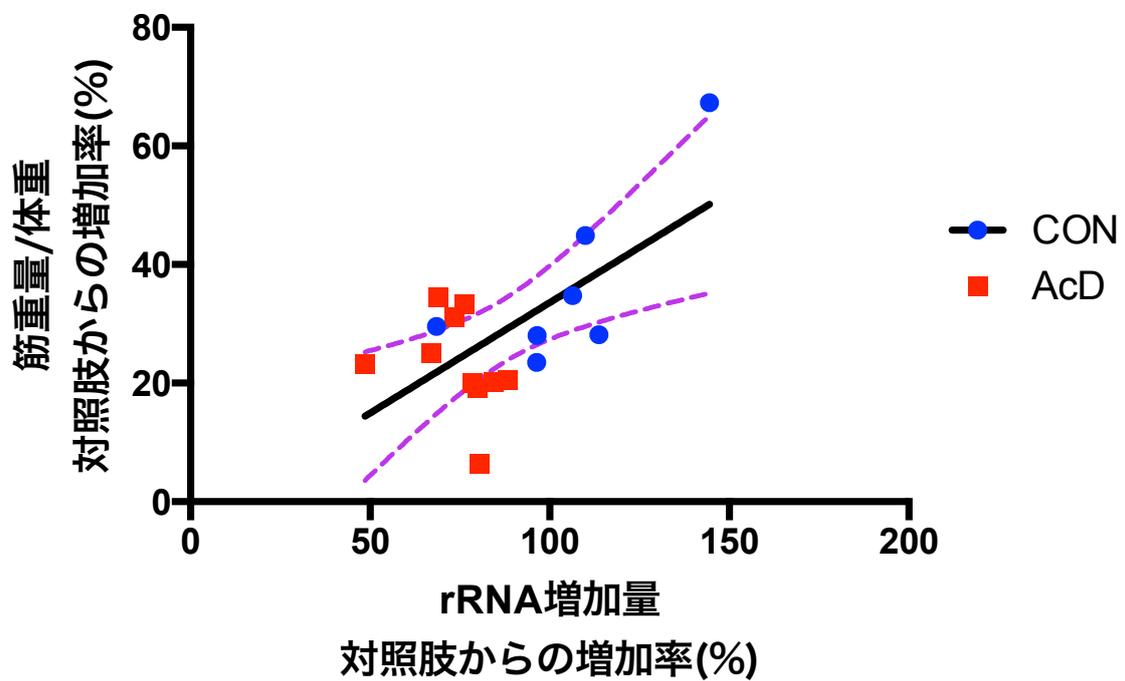


Fig.5-4. リボソーム生合成の阻害が筋肥大に及ぼす影響.

2) 重回帰分析による筋肥大率に対する寄与度の判定

研究2,3の結果から、手術14日における足底筋重量/体重を目的変数、100サルコメアあたりの筋核数、p70S6Kリン酸化量、18+28S rRNA量を説明変数とする重回帰分析を行い、それぞれの説明変数が目的変数の決定に対してどの程度寄与しているかを検討した。その際に、100サルコメアあたりの筋核数、p70S6Kリン酸化量、18+28S rRNA量の多重共線性の有無に関して調べ、多重共線性を持たないことを確認し、行った。

重回帰分析の結果、100サルコメアあたりの筋核数、p70S6Kリン酸化量、18+28S rRNA量の標準化偏回帰係数はそれぞれ、0.300、-0.240、0.952となっていた。そのため、これらの説明変数のうち標準化偏回帰係数が最も大きい18+28S rRNA量が手術14日における足底筋重量/体重を決定するうえで最も寄与度の大きい変数となっていることが分かった。

3) 筋肥大と筋核数の関係

これまで、筋核数の増加が筋肥大にどのような影響を及ぼすのかについては、意見が相反していた。研究2により得られる筋肥大率を~45%まで段階的に変えることのできる動物モデルを用いて、筋肥大率と筋核数の増加の間の関係を検討したところ、2週間の肥大期間では筋肥大率に関わらず筋核数の増加はわずかであった。そのため、~45%までの筋肥大を達成するためには筋核数の増加は必須の要因ではないと考えられる。そのため、通常の生理学的な条件の場合、筋核数の増加が筋肥大率を規定する因子にはなっていないと言える。

条件的遺伝子改変により成熟後にサテライト細胞を除き、筋核の増加を阻害した先行研究では、短期間の筋肥大は十分に行えているものの、その後筋線維の繊維化などが進行し長期間維持することができなかつたと報告している(McCarthy et al. 2011; Fry et al. 2013)。このことから、筋核が筋に対して持っている役割は筋肥大の達成ではなく、達成した筋肥大を維持することにある可能性がある。そのため、本研究で開発した動物モデルを用いて、より長期の実験期間の際に筋内の微小環境と筋核の関係を調べることで、筋核が筋に及ぼす

役割についてさらに新たな知見を得ることができる可能性がある。

4) 筋肥大とタンパク翻訳効率調節因子，翻訳キャパシティ

本研究で筋肥大率を幅広く変えることのできる動物モデルによって翻訳効率，翻訳キャパシティに影響を及ぼす因子の活性化の変化を検討したところ，翻訳効率に強い影響を与える p70S6K リン酸化量は弱い負荷の範囲では負荷の増大に伴い大幅な増加が見られたが，さらに負荷が強くなるとリン酸化量が変化しなくなる様子が観察された（研究3）．一方で翻訳キャパシティに影響を与えるリボソーム生合成は筋肥大率と直線的な量的関係が観察された（研究3）．さらにリボソーム生合成の薬理的阻害の検討では，リボソーム生合成の抑制に伴って筋重量/体重の増加が抑制された（研究4）．このことはリボソーム生合成の活性化による翻訳キャパシティの高まりが，筋肥大率の規定に大きな影響を与えていることを示唆している．

リボソーム生合成は4つの rRNA と多数のリボソームタンパクを合成し，組み立てる極めて複雑な過程が必要になるため，リボソーム生合成は多くのエネルギーが必要であると考えられている．そのため，骨格筋にとってリボソーム生合成は「高価な」反応であると言える．一方で，翻訳効率の活性化は細胞内のシグナル伝達によって比較的速やかに活性化されるため，骨格筋にとって比較的「安価な」反応であると言える．そのため，筋に負荷がかかった際には，まず「安価な」翻訳効率活性化を急激に高めることで迅速な応答を行い，「高価な」翻訳キャパシティは筋への負荷の大きさに合わせて厳密に調整されることで，迅速かつ経済的な適応実現していると考えられる．

力学的負荷の大きさと翻訳効率調節因子，翻訳キャパシティの活性化の間の関係の概略図を Fig.5-5 に示した．

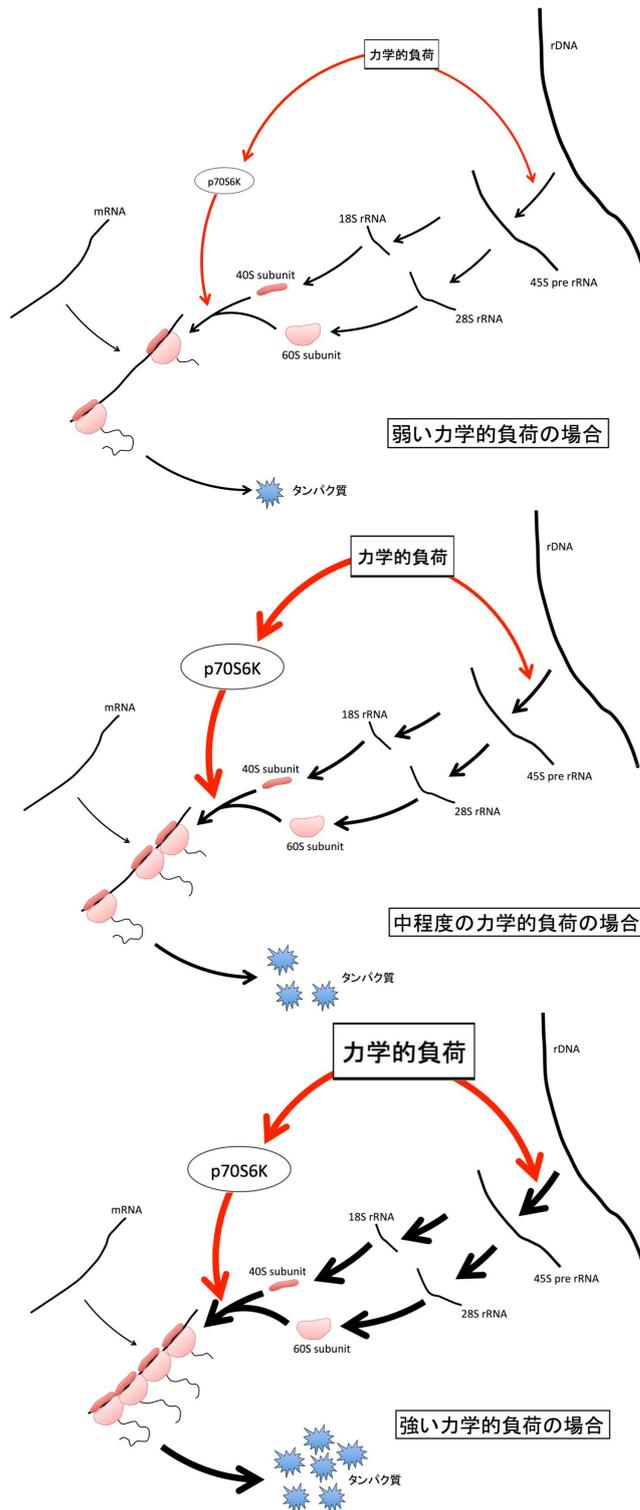


Fig.5-5. 力学的負荷の大きさと翻訳効率調節因子，翻訳キャパシティの活性化の間の関係の概略図。

5) 展望

リボソーム生合成に着目した骨格筋研究

リボソーム生合成に着目し筋生理学に関する研究を行うことで新たな知見を得られる可能性がある。例えば生体は加齢によって筋が萎縮するだけでなく、レジスタンストレーニングなどの筋への刺激に対しても反応が鈍くなることが知られている(Degens & Alway 2003)。加齢によるこの現象は様々な理由が考えられるが、その一因としてリボソーム生合成能力が低下することにある可能性がある。ヒトにおいてレジスタンストレーニングを行い、筋内のリボソーム生合成を見た研究では高齢のグループではトレーニングによるリボソーム生合成の活性化が若年者に比べて低下していることが報告されている(Stec et al. 2015)。また老齢のラットを用いた研究では肝臓と精子の細胞で rRNA の転写の元になる rDNA のメチル化が過剰に引き起こされていることが示されている(Oakes et al. 2003)。このような加齢による rDNA の過剰なメチル化は骨格筋でも起きている可能性があり、筋への刺激に応答したリボソーム生合成の活性化が阻害されることで骨格筋が肥大しづらくなることに繋がると考えられる。同様に様々な研究でリボソーム生合成に着目して研究を行うことで新たな発展が見られる可能性がある。

ヒトにおけるレジスタンストレーニングへの応用

本研究より得られたリボソーム生合成の程度と筋肥大率の関係性に関する知見は、ヒトにおけるレジスタンストレーニングの効果をより引き出す方策に応用できる可能性を持っている。しかし、本研究の知見をヒトにおけるレジスタンストレーニングに応用するためには両者の筋肥大の特徴の違いについて考慮する必要がある。

本研究で用いた協働筋切除による過負荷モデルは、協働筋を切除し体重による慢性的な負荷を残された足底筋にかけることで短期間で筋肥大を起こす方法である。そのため、足底筋には歩行の際の接地や姿勢維持などによって過剰な

負荷が慢性的にかかることになる。また、刺激への適応によって筋重量が増加するに従って、足底筋にかかる負荷は相対的に弱まっていくと考えられる。一方で、レジスタンストレーニングは、強い筋力発揮を繰り返す運動を行い、筋に一過性の刺激を与えるという特徴がある。これを日にちをあけて繰り返し行うことで徐々に適応を起こして、筋重量が増加する。一般的に筋が発揮できる最大の筋力に対して一定の割合の負荷を設定するため、筋にかかる相対的な負荷は一定になる。このように二つの筋肥大の方法は異なる特徴を持っているため、本研究で得られた知見をレジスタンストレーニングに対してどの程度適応できるかは明らかでない。

しかし、最近のレジスタンストレーニングの際のリボソーム生合成を調べた研究でも、トレーニングの後にリボソーム生合成が高まることが報告されている(Figueiredo et al. 2015)。また著者のグループでもラットに対してレジスタンストレーニングを模した電気刺激を施すことで、筋中のリボソーム量が増加することが確認されており、その増加量が筋重量の増加と関係がある可能性がある。

このことから本研究の筋肥大モデルとレジスタンストレーニングの間には多くの特徴の違いはあるが、どちらにおいてもリボソーム生合成が筋肥大に対して重要な役割を担っている可能性は高いと考えられる。そのため、本研究で得られた知見をレジスタンストレーニングに対して直接適応することはできない可能性はあるものの、同様のメカニズムが働いている可能性が考えられる。今後はヒトでのレジスタンストレーニングにおける応用を視野にいれ、よりレジスタンストレーニングに近いモデルを用いた研究を行う必要がある。

参考文献

- Adams, G.R. et al., 2002. Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(4), pp.C1182–95.
- Allen, D.L. et al., 1995. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*, 78(5), pp.1969–76.
- Allen, D.L., Roy, R.R. & Edgerton, V.R., 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*, 22(10), pp.1350–60.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G. & Layman, D.K., 1999. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *J Nutr*, 129(6), pp.1102–1106.
- Armstrong, R.B. & Phelps, R.O., 1984. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat*, 171(3), pp.259–72.
- Baar, K. & Esser, K., 1999. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 1), pp.C120–C127.
- Ben-Shem, A. et al., 2010. Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science*, 330(6008), pp.1203–1209.
- Ben-Shem, A. et al., 2011. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*, 334(6062), pp.1524–1529.
- Bergmann, J.E. & Lodish, H.F., 1979. A kinetic model of protein synthesis. Application to hemoglobin synthesis and translational control. *J Biol Chem*, 254(23), pp.11927–37.
- Bjerregaard, B., 2003. Regulation of Ribosomal RNA Synthesis During the Final Phases of Porcine Oocyte Growth. *Biol Reprod*, 70(4), pp.925–935.
- Bodine, S.C. et al., 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), pp.1014–9.
- Brack, A.S., Bildsoe, H. & Hughes, S.M., 2005. Evidence that satellite cell

- decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci*, 118(Pt 20), pp.4813–21.
- Brandenburger, Y. et al., 2001. Increased expression of UBF is a critical determinant for rRNA synthesis and hypertrophic growth of cardiac myocytes. *FASEB J*, 15(11), pp.2051–3.
- Bruusgaard, J.C. et al., 2010. Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), pp.15111–6.
- Bruusgaard, J.C. et al., 2012. No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *J Appl Physiol*, 113(2), pp.290–6.
- Bruusgaard, J.C. et al., 2003. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J Physiol*, 551(Pt 2), pp.467–78.
- Burd, N. A et al., 2010. Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *J Physiol*, 588(Pt 16), pp.3119–3130.
- Chaillou, T. et al., 2012. Hypoxia transiently affects skeletal muscle hypertrophy in a functional overload model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(5), pp.R643–54.
- Chaillou, T. et al., 2013. Time course of gene expression during mouse skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 115(7), pp.1065–74.
- Chaillou, T., Kirby, T.J. & McCarthy, J.J., 2014. Ribosome biogenesis: emerging evidence for a central role in the regulation of skeletal muscle mass. *J Cell Physiol*, 229(11), pp.1584–94.
- Cheek, D.B., 1985. The control of cell mass and replication. The DNA unit--a personal 20-year study. *Early Hum Dev*, 12(3), pp.211–39.
- Degens, H. & Alway, S.E., 2003. Skeletal muscle function and hypertrophy are diminished in old age. *Muscle Nerve*, 27(3), pp.339–47.
- Edgerton, V.R. & Roy, R.R., 1991. Regulation of skeletal muscle fiber size,

- shape and function. *J Biomech*, 24 Suppl 1, pp.123–33.
- Febbraio, M.A. & Pedersen, B.K., 2005. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev*, 33(3), pp.114–119.
- Figueiredo, V.C. et al., 2015. Ribosome biogenesis adaptation in resistance training-induced human skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*, 309(1), pp.72–83.
- Fry, C.S. et al., 2013. Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. *FASEB J*, pp.1–12.
- Goldberg, A. L., 1967. Work-induced growth of skeletal muscle in normal and hypophysectomized rats. *Am J Physiol*, 213(5), pp.1193–8.
- Gonyea, W.J. & Ericson, G.C., 1976. An experimental model for the study of exercise-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 40(4), pp.630–3.
- Goodman, C. A, Mabrey, D.M., et al., 2011. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique. *FASEB J*, 25(3), pp.1028–39.
- Goodman, C. A, Frey, J.W., et al., 2011. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J Physiol*, 589(Pt 22), pp.5485–5501.
- Granneman, S. & Tollervey, D., 2007. Building Ribosomes: Even More Expensive Than Expected? *Curr Biol*, 17, pp.415–417.
- Hall, Z.W. & Ralston, E., 1989. Nuclear domains in muscle cells. *Cell*, 59, pp.771–772.
- Hannan, K.M. et al., 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol*, 23(23), pp.8862–8877.
- Hannan, R.D., Luyken, J. & Rothblum, L.I., 1995. Regulation of rDNA transcription factors during cardiomyocyte hypertrophy induced by

- adrenergic agents. *J Biol Chem*, 270(14), pp.8290–8297.
- Hannan, R.D., Luyken, J. & Rothblum, L.I., 1996. Regulation of ribosomal DNA transcription during contraction-induced hypertrophy of neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 271, pp.3213–3220.
- Ikezoe, T. et al., 2011. Atrophy of the lower limbs in elderly women: is it related to walking ability? *Eur J Appl Physiol*, 111(6), pp.989–95.
- Jhee, H.T., Han, S.S. & Avery, J.K., 1965. A study of salivary glands of rats injected with actinomycin D. *Am J Anat*, 116(3), pp.631–651.
- Kadi, F. et al., 1999. Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol*, 111(3), pp.189–95.
- Kadi, F. et al., 2004. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol*, 558(Pt 3), pp.1005–12.
- Kahvejian, A. et al., 2005. Mammalian poly (A) -binding protein is a eukaryotic translation initiation factor , which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev*, 19, pp.104–113.
- Kimball, S.R., Horetsky, R.L. & Jefferson, L.S., 1998. Signal transduction pathways involved in the regulation of protein synthesis by insulin in L6 myoblasts. *Am J Physiol*, 274(1 Pt 1), pp.C221–C228.
- Kleijn, M. et al., 1998. Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur J Biochem*, 253, pp.531–544.
- Lee, C.-H., Inoki, K. & Guan, K.-L., 2007. mTOR Pathway as a Target in Tissue Hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47(1), pp.443–467.
- Lindell, T.J., O'Malley, A F. & Puglisi, B., 1978. Inhibition of nucleoplasmic transcription and the translation of rapidly labeled nuclear proteins by low concentrations of actinomycin D in vivo. Proposed role of messenger RNA in ribosomal RNA transcription. *Biochemistry*, 17(7), pp.1154–1160.
- Liu, J.-X. et al., 2009. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle fibres from mammals representing a 100,000-fold

- difference in body size. *Exp Physiol*, 94(1), pp.117–29.
- Manabe, Y., Miyatake, S. & Takagi, M., 2012. Myokines: Do they really exist? *J Phys Fit Sport Med*, 1(1), pp.51–58.
- McCarthy, J.J. et al., 2011. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. , 138(17), pp.3657–3666.
- McCarthy, J.J. & Esser, K.A., 2010. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(3), pp.230–5.
- van der Meer, S.F.T., Jaspers, R.T., Jones, D. A, et al., 2011. The time course of myonuclear accretion during hypertrophy in young adult and older rat plantaris muscle. *Ann Anat*, 193(1), pp.56–63.
- van der Meer, S.F.T., Jaspers, R.T., Jones, D.A., et al., 2011. The time course of myonuclear accretion during hypertrophy in young adult and older rat plantaris muscle. *Ann Anat*, 193(1), pp.56–63.
- Millward, D.J. et al., 1973. Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle. *Nature*, 241(5386), pp.204–5.
- Mitchell, C.J. et al., 2013. Muscular and systemic correlates of resistance training-induced muscle hypertrophy. *PLoS One*, 8(10), p.e78636.
- Mitchell, C.J. et al., 2012. Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. *J Appl Physiol*, 113(1), pp.71–7.
- Miyazaki, M. et al., 2011. Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol*, 589(Pt 7), pp.1831–46.
- Moss, T. et al., 2007. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 64(1), pp.29–49.
- Nader, G.A. et al., 2005. mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(6), pp.C1457–65.
- O'Connor, R.S. et al., 2007. Counterpoint: Satellite cell addition is not

- obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 103(3), p.1100.
- Oakes, C.C. et al., 2003. Aging results in hypermethylation of ribosomal DNA in sperm and liver of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), pp.1775–1780.
- Ogasawara, R. et al., 2012. Comparison of muscle hypertrophy following 6-month of continuous and periodic strength training. *Eur J Appl Physiol*, 113(4), pp.975–85.
- Ogasawara, R. et al., 2013. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 114, pp.934–40.
- Ogasawara, R. et al., 2014. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(10), pp.E1155–62.
- Pavlati, G.K. et al., 1989. Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature*, 337(6207), pp.570–3.
- Pedersen, B.K., 2011. Muscles and their myokines. *J Exp Biol*, 214(Pt 2), pp.337–46.
- Perry, R.P. & Kelley, D.E., 1970. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol*, 76(2), pp.127–139.
- Petrella, J.K. et al., 2006. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(5), pp.E937–46.
- Phelan, J.N. & Gonyea, W.J., 1997. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec*, 247(2), pp.179–88.
- Phillips, S.M., 2009. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle

- (protein and exercise dose effects). *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(3), pp.403–10.
- Rehfeldt, C., 2007a. In response to Point:Counterpoint: “Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy”. *J Appl Physiol*, 103(3), p.1104.
- Rehfeldt, C., 2007b. Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 103(3), p.1104.
- Rosenblatt, J.D. & Parry, D.J., 1992. Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. *J Appl Physiol*, 73(6), pp.2538–43.
- Roy, R.R. et al., 1999. Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J Appl Physiol*, 87(2), pp.634–42.
- Sani, E. et al., 2008. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol*, 183(7), pp.1259–74.
- Sinha-Hikim, I. et al., 2002. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(1), p.E154.
- Snow, M.H., 1990. Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *Anat Rec*, 227(4), pp.437–446.
- Soltow, Q.A. et al., 2006. Ibuprofen inhibits skeletal muscle hypertrophy in rats. *Med Sci Sport Exerc*, 38(5), p.840.
- Sonenberg, N. & Gingras, A C., 1998. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 10(2), pp.268–275.
- Stec, M.J., Mayhew, D.L. & Bamman, M.M., 2015. The effects of age and resistance loading on skeletal muscle ribosome biogenesis. *J Appl Physiol*, 119(8), pp.851–7.
- Tamaki, T. & Uchiyama, S., 1995. Absolute and relative growth of rat skeletal muscle. *Physiol Behav*, 57(5), pp.913–919.

- Tamaki, T., Uchiyama, S. & Nakano, S., 1992. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc*, 24(8), pp.881–6.
- Terzis, G. et al., 2008. Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol*, 102(2), pp.145–52.
- Thomason, D.B. & Booth, F.W., 1990. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol*, 68(1), pp.1–12.
- Timson, B.F., 1990. Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement. *J Appl Physiol*, 69(6), pp.1935–45.
- Tsurugi, K., Morita, T. & Ogata, K., 1972a. Effects of the Inhibition of Ribosomal-RNA Synthesis on the Synthesis of Ribosomal Structural Proteins in Regenerating Rat Liver. *Eur J Biochem*, 29, pp.585–592.
- Tsurugi, K., Morita, T. & Ogata, K., 1972b. Studies on the Metabolism of Ribosomal Structural Proteins of Regenerating Rat Liver. Sites of Biosynthesis of Structural Proteins of Large Subunit and of Their Assembly with RNA Moiety. *Eur J Biochem*, 25(1), pp.117–128.
- Voit, R. & Grummt, I., 2001. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), pp.13631–13636.
- Voit, R., Schäfer, K. & Grummt, I., 1997. Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 17(8), pp.4230–4237.
- Wada, K.I. et al., 2002. No decrease in myonuclear number after long-term denervation in mature mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(2), pp.C484–8.
- von Walden, F. et al., 2012. Mechanical loading induces the expression of a Pol I regulon at the onset of skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(10), pp.C1523–30.

参考文献

- Warner, J.R., 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, 24(November), pp.437–440.
- Watanabe, Y. et al., 2013. Increased muscle size and strength from slow-movement, low-intensity resistance exercise and tonic force generation. *J Aging Phys Act*, 21(1), pp.71–84.
- Weigl, L.G., 2012. Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Pharmacol*, 12(3), pp.377–82.
- Welinder, C. & Ekblad, L., 2011. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res*, 10(3), pp.1416–9.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A. & Yablonka-Reuveni, Z., 2006. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem*, 54(11), pp.1177–91.
- Zanchi, N.E. & Lancha, A.H., 2008. Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70s6k and protein synthesis. *Eur J Appl Physiol*, 102(3), pp.253–63.

謝辞

東京大学大学院 石井直方教授には、修士課程、博士課程の間、長きにわたり多大なるご指導を賜りました。本博士論文に置いても、終止丁寧なご教示を賜りましたこと心から感謝申し上げます。

帝京大学大学 川田茂雄講師には本博士論文第1章のデータの解釈など様々な面での的確なご意見、ご助言を賜りましたことを心より感謝申し上げます

名古屋工業大学 小笠原理紀准教授には本博士論文第3章の実験の全般にあたりご指導いただきました。また実験手法、データの解釈など様々な面での的確なご意見、ご助言を賜りましたことを心より感謝申し上げます

石井研究室 畑中君、高木君、舟橋君、対馬さん、有原君、大田君には本博士論文における測定の補助をしていただきました。心より感謝申し上げます。

石井研究室の皆様には、研究内容について貴重なご意見、ご助言いただきました。この場を借りて深く感謝いたします。

同期の皆様には、公私ともに様々なご意見やアドバイス、支えなど頂きました。この場を借りて深く感謝いたします。

福島県立医科大学 瀬戸川将特任助教には友人として、スポーツ科学に携わる同僚として、私とは異なった面白いアイデアや力強い励ましを頂きました。この場を借りて深く感謝いたします。

そしてなによりこれまで長らく精神的に、経済的に援助くださった父母、中田家、横田家の皆様に感謝いたします。