

筋線維組成の差異から見た骨格筋オートファジー特性

小倉裕司、明間立雄

聖マリアンナ医科大学医学部生理学教室

1. 結言

オートファジーは骨格筋におけるタンパク質分解機構の一つである。その過程において、分解されるべきタンパク質やオルガネラは二重膜構造を持つ構造体によって他の細胞成分から隔離され（これはオートファゴソームと呼ばれる）、リソソームと融合し、リソソーム内部のプロテアーゼによって分解される (Mizushima, 2007; Gustafsson & Gottlieb, 2008)。オートファジーはその誘発因子によって著しく活性化される一方、低水準であるが安静状態でも恒常的に行われていることが知られている。オートファジーを遺伝子改変により抑制された動物では筋収縮機能不全や筋細胞の萎縮が観察されること (Masiero *et al.*, 2009) などから、安静時における恒常的なオートファジーは骨格筋の正常性維持に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

骨格筋は、含有するミオシン重鎖 (Myosin heavy chain: MyHC) 分子種に基づき二つの主要なタイプ：速筋および遅筋に分類することができるが、今日までに速筋と遅筋におけるタンパク質分解速度には違いがあることが知られている。例えば、Garlick *et al.* (1989) は、ラットを用いた研究により遅筋のタンパク質分解速度が速筋よりも速いことを報告している。また、Muthny *et al.* (2008) は総タンパク分解速度と筋原線維の分解速度のいずれも遅筋であるひらめ筋の方が速筋である長指伸筋よりも速いことを報告している。骨格筋のタンパク質分解はタンパク質分解機構によって行われるので、上述した筋線維タイプ毎にタンパク質分解速度が異なる要因には、タンパク質分解機構における活性水準の違いが反映されていると考えられる。しかしながら、これまでに安静状態におけるオートファジーと筋線維タイプの関連性については明らかでは無い。

オートファジーの活性水準は、microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) の免疫プロッティング法を用いて間接的に推定することが可能である (Kabeya *et al.*, 2000)。これを利用し、我々は、LC3 を含むオートファジーに関連するタンパク質およびその遺伝子発現を、安静状態にある動物の代表的な速筋 (足底筋) と遅筋 (ひらめ筋) で比較した。

2. 研究方法

2.1 実験動物

本研究は、当該施設の倫理承認を受けて実施された。雄の SD ラット ($n = 6, 376.5 \pm 3.5$ g) が実験に用いられた。ペントバルビタールナトリウムによる麻酔下にてひらめ筋と足底筋が摘出され、その後安楽死さ

せた。筋は素早く液体窒素で凍結した後、超低温槽(-80°C)にて保存した。

2.2 タンパク質発現

筋は氷冷ホモジネートバッファー(20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, pH 7.5) (Tanida *et al.*, 2008)で破碎した後、12000 × *g* で 20 分間遠心した。上清を別の容器に移した後そのタンパク質濃度を BCA 法にて分析した(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)。遠心沈殿は MyHC の分析 (後述) に利用した。

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3, LC3-I:非活性型、LC3-II:活性型)、Atg5 (ただし Atg5-12 複合体として)、および Atg7 発現量ウェスタンブロッティング法にて分析した。上清の一部を SDS サンプルバッファー(10% glycerol, 6% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.05% bromophenol blue, 100 mM Tris, pH 6.8) (Tanida *et al.*, 2008)にて溶解し、70°C で 15 分間ボイルした。その後、上清サンプルを SDS ポリアクリルアミド電気泳動法にて分離し、PVDF 膜に転写した。続いて PVDF 膜をブロッキング剤にてブロッキング処理を施した後、目的タンパク質に対する特異的二次抗体(LC3B, diluted to 1:2000, no. 2775; Cell Signalling Technologies, Beverly, U.S.A.)、Atg5-12 (1:1000, PM050; Molecular Biological Laboratories Co. Ltd.)、Atg7 (1:1000, no. 2631; Cell Signalling Technologies)を用いて反応させた。その後 HRP が結合した二次抗体で反応を行い、発光試薬 (ECL Advance; GE Healthcare UK Ltd.)を利用してタンパク量を検出した。なお、データはひらめ筋に対する相対比で示した。

2.3 ミオシン重鎖 (MyHC)

遠心沈殿は、MyHC 相対含量を分析するために SDS サンプルバッファー中で溶解し(30% glycerol, 6% β-mercaptoethanol, 2.3% SDS, 0.05% bromophenol blue, 62.5 mM Tris, pH 6.8)、70°C で 15 分間ボイルした。MyHC は、先行研究の変法によるグリセロール SDS-PAGE 法にて分離した(Ogura *et al.*, 2009)。ゲルは蛍光試薬を用い(Flamingo fluorescent gel stain; Bio-Rad Laboratories, Inc.)推奨される方法にて染色し、レーザーイメージスキャナ(Typhoon 9400; GE Healthcare UK Ltd.)で検出した後に、MyHC 総体含量比 (I、IIa、IIx、IIb)を算出した。

2.4 遺伝子発現

遺伝子発現を検討するために、冷凍筋試料を液体窒素中で粉碎し、Isogen 試薬(Nippon Gene Co. Ltd.,

Chiyoda-ku, Japan)に溶解し、指示された方法に従って総 RNA を抽出した。また、総 RNA から TURBO DNA-free kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)によってゲノム DNA を除いた。総 RNA 濃度を分光光度計 (Nanodrop1000; Thermo Fisher Scientific Inc.)にて計測し (全て A260/280 は 1.95 以上)、同時に RNA の安定性を 1%アガロースゲル電気泳動法にて確認した。

総 RNA は high-capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)により逆転写し、相補的な cDNA を産生させた。LC3、Atg5 および Atg7 の遺伝子発現はリアルタイム PCR 装置 (ABI Prism 7000; Applied Biosystems) を用いて検出した。各遺伝子に対応する特異的プライマーおよびプローブは既製品を利用した (Applied Biosystems) : LC3 (Rn00575883_m1)、Atg5 (Rn01767063_m1)、Atg7 (Rn01492725_m1)、 β -actin (Rat ACTB, 4352340E)。データは β -actin 遺伝子で補正し、ひらめ筋に対する相対値で表した。

2.5 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で示してある。群間の比較には対応のない Student の t-test を用いた。なお、有意水準は $P < 0.05$ とした。全ての統計解析は統計専用ソフト (Prism 5.0; GraphPad Software Inc., CA, USA)により実施した。

3. 結果

3.1 MyHC

ひらめ筋の MyHC 組成は type I : $87.2 \pm 1.7\%$ 、type IIa : $12.8 \pm 1.7\%$ であり、他のアイソフォームは観察されなかった。足底筋では、type I : $9.1 \pm 1.1\%$ 、type IIa : $15.3 \pm 1.2\%$ 、type IIx : $34.3 \pm 0.9\%$ 、type IIb : $41.2 \pm 2.5\%$ であった。これらは我々の先行研究でも確認されている値と同等であった (Ogura *et al.*, 2008; Ogura *et al.*, 2009)。この MyHC の組成に基づき、本研究ではひらめ筋を遅筋および足底筋を速筋として扱った。

3.2 タンパク質発現

タンパク質発現の結果を図 1 に示した。LC3 の発現は、LC3-I ($P < 0.01$ 、図 1A 上)、LC3-II ($P < 0.001$ 、図 1A 中)および LC3-II/I 比 ($P < 0.05$ 、図 1A 下)のいずれも足底筋がひらめ筋よりも有意に低値を示した。一方、Atg5-12 ($P < 0.05$ 、図 1B)および Atg7 ($P < 0.001$ 、図 1C)はいずれも足底筋がひらめ筋よりも高値を示した。

3.3 遺伝子発現

遺伝子発現の結果を図2に示した。LC3 遺伝子発現は足底筋がひらめ筋よりも有意に高値を示した($P < 0.001$ 、図2A)。一方、Atg5(図2B)およびAtg7(図2C)遺伝子発現はいずれも筋間に有意な差は観察されなかった。

4. 考察

我々は、足底筋とひらめ筋のいずれにおいても、安静状態でLC3-II発現を観察した。LC3-II発現は、オートファジーの過程で形成されるオートファゴソームの数と相関することから(Kabeya *et al.*, 2000)、しばしば骨格筋を含む細胞内のオートファジーのマーカーとして利用される。(Mizushima *et al.*, 2004; Tanida *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2010)。したがって、本研究の結果は、安静時においても骨格筋では一定のオートファジーが行われていることを改めて示しているが、そのLC3-II発現量は足底筋とひらめ筋で相違があった。本研究ではひらめ筋のLC3-II発現量は足底筋よりも約2.1倍高値であり、LC3-II/I比もひらめ筋が足底筋よりも有意に高値を示した。先行研究において、実験的飢餓により誘導されたオートファジーの応答性は速筋で遅筋よりも大きいことが報告されている(Mizushima *et al.*, 2004; Ogata *et al.*, 2010)が、本研究結果は、安静時では遅筋のオートファジー活性水準が速筋に比べて逆に大きいことを示唆している。

一方、Atg5-12およびAtg7発現量はひらめ筋において足底筋よりも低値であり、LC3の結果とは反対であった。これは、筋線維タイプとオートファジータンパク質発現の関係が全てのタンパク質で一様ではないことを示している。我々の知る限り、Atg5-12およびAtg7発現量の大小が安静時のオートファジーそれ自体に及ぼす影響については明らかになっていない。Atg5-12はオートファジー過程の中でAtg16と結合し、二重膜構造の伸長を媒介している(Gustafsson & Gottlieb, 2008)。また、Atg7はAtg5とAtg12の結合仲介(Tanida *et al.*, 1999)およびLC3-Iの活性化に寄与している(Ichimura *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2001)。したがって、我々は、Atg5-12やAtg7発現量が大きいことは上述した反応を促進することに繋がり安静時オートファジーをより活性化させていると予想したが、LC3-IIの結果はこれを支持しなかった。そのため、Atg5-12やAtg7発現量自体と安静時オートファジーが速筋よりも遅筋で大きいことには関連性がないのかも知れない。

本研究では筋線維タイプでオートファジー関連タンパク質に発現量の違いが見られたことから、その要因が遺伝子発現と関連している可能性を考え、LC3、Atg5およびAtg7のmRNA発現を定量した。しかし、LC3 mRNAには筋間に有意な差が見られたものの、そのタンパク発現の結果とは逆に足底筋がひらめ筋よ

りも高値を示した。また、Atg5 および Atg7 mRNA には筋間で差が見られなかった。したがって、本研究で観察されたオートファジー関連タンパク質の発現量の差異は転写レベル以外の機序で調節されているように思われる。同時に、LC3-II 発現あるいは LC3-II/I 比と LC3 遺伝子発現の結果を解釈すれば、安静時のオートファジー活性水準自体も遺伝子発現による制御とは別の機序が関与している可能性がある。

本研究で観察された速筋と遅筋で異なったオートファジー特性の意義についてはここで明らかにすることはできない。しかしながら、冒頭でも述べたように速筋と遅筋の間ではタンパク質分解の速度に相違があり (Garlick *et al.*, 1989; Muthny *et al.*, 2008; van Wessel *et al.*, 2010)。また、少なくとも骨格筋の主要なタンパク質分解機構であるユビキチン-プロテアソーム系において、プロテアソーム活性が速筋よりも遅筋で高いことが報告されている (Muthny *et al.*, 2008)。オートファジーも筋細胞内のタンパク質分解機構の一つであるので、本研究で見られた結果が従来知見の一部を説明できるかもしれない。

また、オートファジーによるミトコンドリアの分解は特にミトファジー (mitophagy) と呼ばれており、ミトコンドリアのターンオーバーにとって重要であると考えられている (Wang & Klionsky, 2011)。例えば、骨格筋でオートファジーが阻害されると、本来分解されるべきミトコンドリアの蓄積が観察される (Masiero *et al.*, 2009)。このミトコンドリアに関しては、ミトコンドリア密度を推定するミトコンドリア酵素活性は遅筋で多いことがラット骨格筋において知られており (Bigard *et al.*, 1991; Demirel *et al.*, 1999)、また、ヒト骨格筋においても電子顕微鏡を用いて計測されたミトコンドリア密度は type I 線維の方が type II 線維よりも高値を示すことが報告されている (Staron *et al.*, 1984)。このため、遅筋であるひらめ筋では高水準のオートファジーが恒常的に必要であるのかも知れない。

5. 結語

安静時のオートファジー関連タンパク質発現は速筋と遅筋で異なっており、LC-II あるいは LC3-II/I 比で評価された安静時オートファジーの活性水準は遅筋でより高い。そして、このようなタンパク質レベルでの相違は、転写レベル以外の制御の結果もたらされている可能性がある。

6. 謝辞

本研究を支援して下さった財団法人ミズノスポーツ振興財団に深謝致します。

参考文献

- Bigard AX, Brunet A, Guezennec CY & Monod H (1991). Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude. *J. Appl. Physiol.* **71**, 2114-2121.
- Demirel HA, Powers SK, Naito II, Hughes M & Coombes JS (1999). Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J. Appl. Physiol.* **86**, 1002-1008.
- Garlick PJ, Maltin CA, Baillie AG, Delday MJ & Grubb DA (1989). Fiber-type composition of nine rat muscles. II. Relationship to protein turnover. *Am. J. Physiol.* **257**, E828-832.
- Gustafsson AB & Gottlieb RA (2008). Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J. Mol. Cell Cardiol.* **44**, 654-661.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T & Ohsumi Y (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728.
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S & Sandri M (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* **10**, 507-515.
- Mizushima N (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861-2873.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T & Ohsumi Y (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1101-1111.
- Muthny T, Kovarik M, Sispera L, Tilser I & Holecek M (2008). Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation. *International journal of experimental pathology* **89**, 64-71.
- Ogata T, Oishi Y, Higuchi M & Muraoka I (2010). Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 136-140.
- Ogura Y, Naito H, Kakigi R, Akema T, Sugiura T, Katamoto S & Aoki J (2009). Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training in rat skeletal muscles. *Acta. Physiol. (Oxf)* **196**, 341-349.

- Ogura Y, Naito H, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Kurosaka M & Katamoto S (2008). Alpha-actinin-3 levels increase concomitantly with fast fibers in rat soleus muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 584-588.
- Staron RS, Hikida RS, Hagerman FC, Dudley GA & Murray TF (1984). Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. *J. Histochem. Cytochem.* **32**, 146-152.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T & Kominami E (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91.
- Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y & Kominami E (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1367-1379.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T & Kominami E (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem* **276**, 1701-1706.
- Tanida I, Ueno T & Kominami E (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **445**, 77-88.
- van Wessel T, de Haan A, van der Laarse WJ & Jaspers RT (2010). The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur J Appl Physiol* **110**, 665-694.
- Wang K & Klionsky DJ (2011). Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* **7**.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**, 472-483.

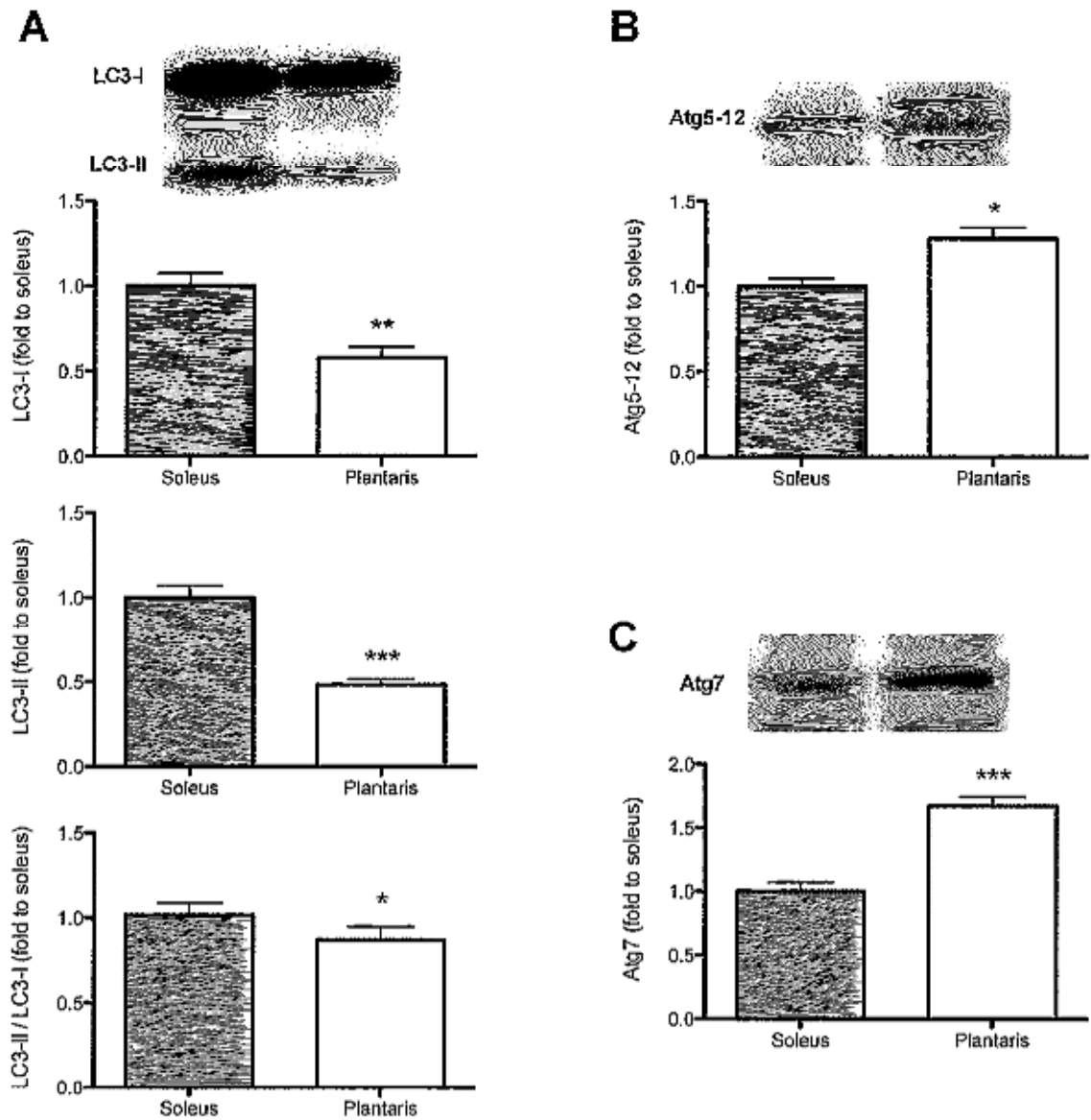


図1 ひらめ筋 (Soleus) および足底筋 (Plantaris) における LC3(A)、Atg5-12(B)および Atg7(C)タンパク発現量。データは平均値±標準誤差で示してある。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs. soleus。

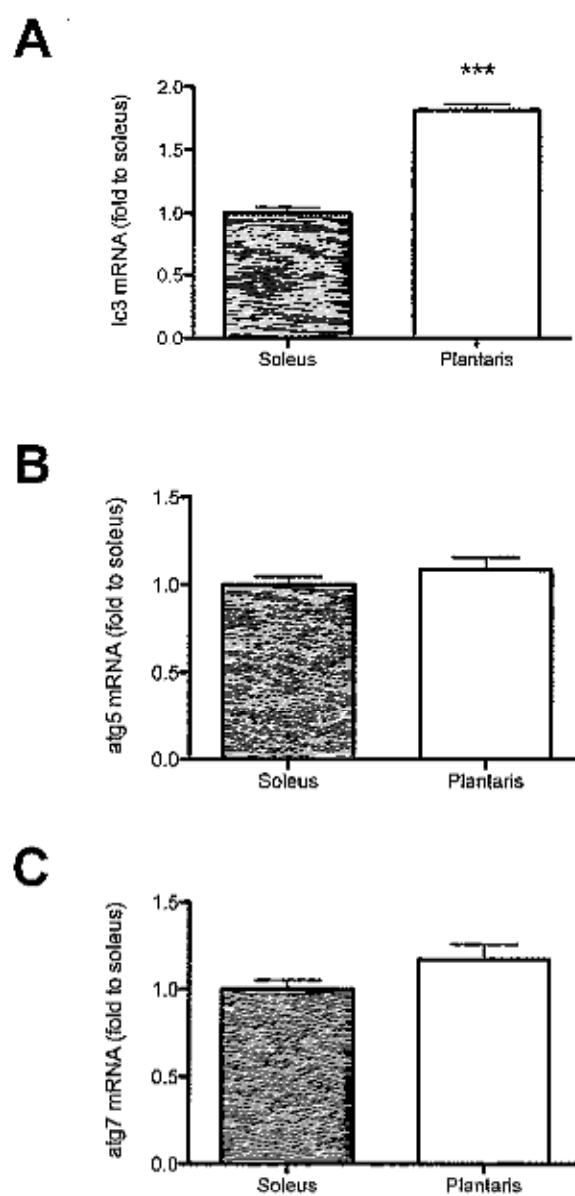


図2 ひらめ筋 (Soleus) および足底筋 (Plantaris) における LC3(A)、Atg5(B)および Atg7(C)遺伝子発現量。データは平均値±標準誤差で示してある。*** $P < 0.001$ vs. soleus。