

筋の肥大・萎縮と熱ショックタンパク質 およびカルシニューリンの関連

熊本大学 大石康晴

Relationship of Heat Shock Protein and Calcineurin to Muscle Hypertrophy and Atrophy

by

Yasuharu Oishi

*Laboratory of Muscle Physiology, Faculty of Education,
Kumamoto University*

ABSTRACT

Recently many studies have reported the relationship between muscle fiber phenotype or size and heat shock protein (HSP) 72 or calcineurin (CaN) in mammalian skeletal muscles. In this study, changes of the expression levels of HSP72 and CaN proteins were analyzed in atrophied soleus and hypertrophied plantaris muscles. Male Wistar rats were used for two models of experiment: 1) left hindlimb was immobilized for two weeks, and 2) synergistic soleus and gastrocnemius were ablated and the remained plantaris was hypertrophied for two weeks. In atrophied soleus muscle, the phenotype of myosin heavy chain (MHC) isoform was shifted toward fast type, and the contents of HSP72 and CaN proteins were decreased. In contrast, MHC isoforms were shifted toward slower phenotype and the protein levels of HSP72 and CaN were increased in hypertrophied plantaris muscle. These results may suggest the contribution of HSP72 and CaN to the changes of muscle size and/or fiber phenotype, although additional studies are needed to clarify the roles of these proteins.

要 旨

[目的] 筋のサイズや筋線維発現型と熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) あるいはカルシニューリン (calcineurin, CaN) との関連については不明な点が多い。本研究は、ラット骨格筋が肥大または萎縮する際の HSP72, CaN の変化を分析し、両者の関連を検討した。[方法] Wistar 系ラットを用い、1) 下肢固定により萎縮したヒラメ筋、および2) 共同筋切除により肥大した足底筋について、HSP72とCaNタンパク質発現量をWestern blottingにより分析した。[結果] 筋の萎縮がみられたヒラメ筋ではHSP72, CaNともに発現量は減少した。逆に肥大した足底筋ではともに増加した。ミオシン重鎖成分は、萎縮ヒラメ筋では速筋型が増加し、肥大足底筋では遅筋型が増加した。[まとめ] 筋サイズとHSP72, CaNの変化がパラレルであることから、両者がサイズの変化と関連する可能性が示唆されるが、更なる検討が必要と考えられる。一方、筋線維の発現型との関連についてはHSP72, CaNともに遅筋タイプの発現型に關与する可能性が示唆された。

緒 言

運動やトレーニングによる筋の収縮活動の増加、あるいは逆に運動不足やギプス固定による活動量の減少に対して、骨格筋はそのサイズ (筋重量や筋線維の横断面積) や収縮特性 [収縮・弛緩速度、各種の酵素活性、筋線維タイプ発現、ミオシン重鎖成分 (myosin heavy chain; MHC) など] がダイナミックに変化する。最近の研究では、このような筋線維タイプの発現型やそのサイズの変化に、タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (calcineurin; CaN) が密接に関連することが多くの研究者により報告されている^{11, 12, 19, 21)}。たとえば、活性型CaNを持ったトランスジェニックマウス骨格筋では、slowタイプの筋線維やミ

オグロビン、トロポニンの発現量が増大すること¹²⁾、さらに活性型CaNを導入した培養細胞において、slow MHCの割合が顕著に増加し、逆にCaN抑制剤の投与によりその増加が抑制されたこと²¹⁾などの報告がみられ、CaNがslowタイプの発現型に關与している可能性が示唆されている。一方、サイズとの関連について、Musaro et al.¹¹⁾ や Semsarian et al.¹⁹⁾ は、インスリン様成長因子 (IGF-1) による筋管細胞の肥大には活性型CaNが關与することを報告している。しかしながら、その一方ではCaNが筋線維の成長・発育には關与しないといった報告^{3, 20)} やCaN以外のシグナル伝達経路が筋の肥大に關与するとの報告⁴⁾ もみられ、一致した見解は得られていない。

あらゆる細胞や組織は、外界からのさまざまなストレスに対してストレスタンパク質、あるいは熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) と呼ばれる一連のタンパク質を発現することにより、その機能を保持している^{7, 9, 22)}。哺乳類の下肢骨格筋では、いわゆる遅筋のヒラメ筋でHSP、特に分子量72kDaのHSP72の発現が多くみられ、速筋の足底筋では発現量は少ない。Locke et al.⁸⁾ は、HSP72の発現量が遅筋型のtype I MHCと關連することを報告している。我々もこれまでにHSP72の発現量が、肥大骨格筋で増加すること¹⁸⁾ や、萎縮筋では逆に減少すること¹⁵⁾、筋線維のタイプ (組成) 変化に關連していること¹³⁾などを報告している。Ogata et al.¹³⁾ は、胎児期および成熟期のラット骨格筋で、HSP72が遅筋型のtype I MHCを発現している遅筋線維 (type I fiber) に特異的に発現することを、免疫組織化学的に明らかにしている。しかしながら、このような筋線維特異性がみられる一方で、一時的な筋温の上昇や一過性の運動 (ランニング) により、筋線維のタイプ変化が生じない場合でもHSP72の一時的増加がみられる^{5, 16, 17)}。また、HSP72の発現量と筋線維サイズの關連については、明確ではない。

本研究は、筋線維の肥大あるいは萎縮と HSP72 および CaN の関連を検討することを目的にラットを用いて研究を行った。

1. 研究方法

1. 1 実験方法

実験には Wistar 系雄ラットを用い筋の萎縮と肥大の両方の観点から、以下の2種類の実験を行った。1) 実験1 下肢固定実験 (12-week-old, n=10, initial mean body weight 387g) ; ラットの左脚を足関節・膝関節が約90度の角度で石膏を用いてギプス固定しこれを固定脚, 右脚を対照脚として, 2週間の実験期間の後, 両脚よりヒラメ筋 (soleus) を摘出し筋重量を測定した後, HSP72 発現量を測定した。2) 実験2 共同筋切除実験 (3-week-old, n=16, initial mean body weight 52.4g) ; ラットの左右両脚を用いて, 共同筋であるヒラメ筋 (soleus) とヒフク筋 (gastrocnemius) をアキレス腱部位から5mm程度の長さで切除し, その結果残された足底筋 (plantaris) を代償的に肥大させた。2週間の切除実験後, 実験群と対照 (コントロール) 群よりそれぞれ足底筋を摘出し, HSP72 および CaN 発現量について分析した。

1. 2 生化学的分析

筋重量の10倍量のトリス溶液 (10 mM Tris/HCl, pH7.6, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 15mM mercaptoethanol) によりそれぞれの筋をホモジナイズし, Bradford¹⁾ の方法によりタンパク量を定量した後, 電気泳動およびウェスタンブロットを行った。

1. 3 SDS-電気泳動

Laemmli⁶⁾ の方法に従い, 10% acrylamide 分離ゲルと4% acrylamide 濃縮ゲルからなるミニゲルを用いて約50分間の通電 (30 mA constant

current/gel) によりタンパク質を分離した。分離後ゲルを速やかに取り出し, ウェスタンブロットを行った。

1. 4 ウェスタンブロット

Semidry Western Blotting Unit (Fisher Biotech FB-SDB-2020) を用いて, 約2時間の通電 (50 mA constant current/gel) によりゲル内のタンパク質をニトロセルロースペーパーに転写した。その後ニトロセルロースペーパーをブロッキング溶液 (5% non-fat milk/ TTBS; 100mM Tris-HCl, pH7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20) に1時間浸した後, TTBSにより10分間, 2度洗浄し, 室温で2~3時間一次抗体 (anti-HSP72, StressGen SPA810 or anti-CaN A, Sigma C1956) と反応させた。その後TTBSによる洗浄の後, 二次抗体 (anti-Mouse, Sigma A-9044) と反応させ, ジアミノベンジジンを基質とする過酸化水素水溶液と反応させ, 目的とするタンパク質を検出・定量した。

1. 5 ミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MHC) 成分の分析

MHC の分析には, 5~8%の acrylamide gradient のついたラージゲルを用いて電気泳動を行い (11 mA constant current/gel), 冷蔵庫内 (4℃) で約16時間の通電後, 銀染色キット (Wako 299-13841, Wako) により, MHC タンパク質を染色した。MHC の各成分の割合は, レーザースキャンデンスイター (densitograph 4.0, Mac AE-6920 MF, ATTO) により算出した。

1. 6 統計処理

得られた結果は, 平均値±標準誤差で示した。2群間あるいは左右の筋間の平均値の差の検定には unpaired Student t-test または paired Student t-test を用い危険率5%未満 ($p<0.05$) を有意とした。

2. 研究結果

2. 1 筋重量の変化

図1には、固定実験のヒラメ筋 (soleus) と共同筋切除実験の足底筋 (plantaris) の筋重量を、体重に対する相対値で示した。ヒラメ筋では固定により約41%筋重量の低下がみられ、逆に共同筋切除により足底筋では約72%の筋重量の増加が認められた。

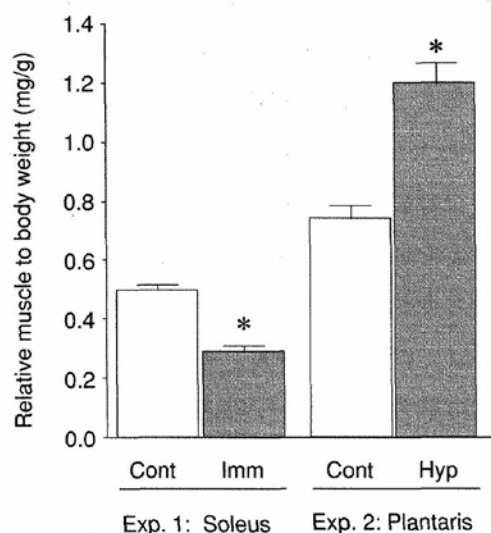


図1 Relative muscle weight to body weight in the soleus and plantaris muscles. Cont, control; Imm, immobilization; Hyp, hypertrophy. * $p < 0.05$ vs. Cont.

2. 2 HSP72発現量の変化

固定群ヒラメ筋のHSP72発現量は対照群に比べ約30%の低下がみられた (図2)。一方、共同筋切除により肥大がみられた足底筋では、対照群に比べHSP72発現量が3.6倍に増加した (図2)。

2. 3 CaN発現量の変化

固定群のヒラメ筋では対照群に比べCaN発現量が22%減少した (図3)。これに対し、共同筋切除を施した足底筋では、対照群に比べCaN発現量が2.4倍に増加した (図3)。

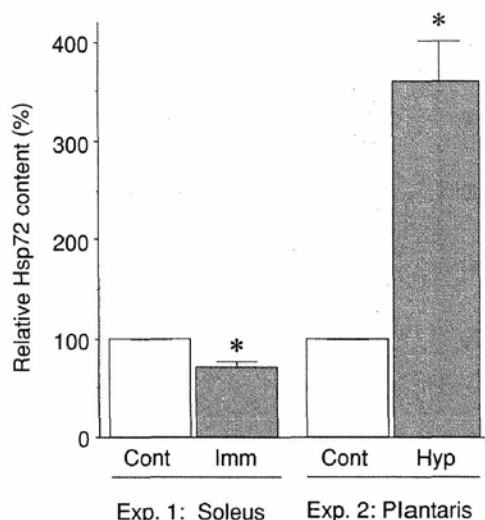


図2 Relative content of HSP72 in atrophied soleus and hypertrophied plantaris muscles to control value. Cont, control; Imm, immobilization; Hyp, hypertrophy. * $p < 0.05$ vs. Cont.

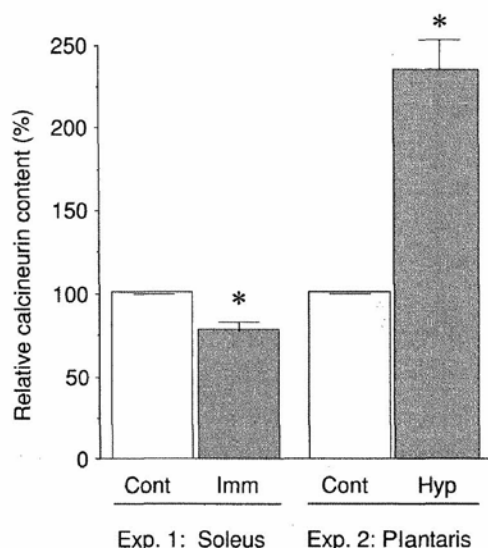


図2 Relative content of calcineurin in atrophied soleus and hypertrophied plantaris muscles to control value. Cont, control; Imm, immobilization; Hyp, hypertrophy. * $p < 0.05$ vs. Cont.

2. 4 MHC成分の変化

実験1の対照群ヒラメ筋では遅筋型の type I MHCと速筋型の type IIa MHC がそれぞれ92%, 8%みられた (図4 A)。これに対し、固定群のヒラメ筋では、type I MHCの割合が減少し、新たに速筋型の type IIx MHCの発現がみられた。実験2の対照群足底筋では (図4 B), 4種類のMHCアイソフォーム (type I, type IIa, type IIx,

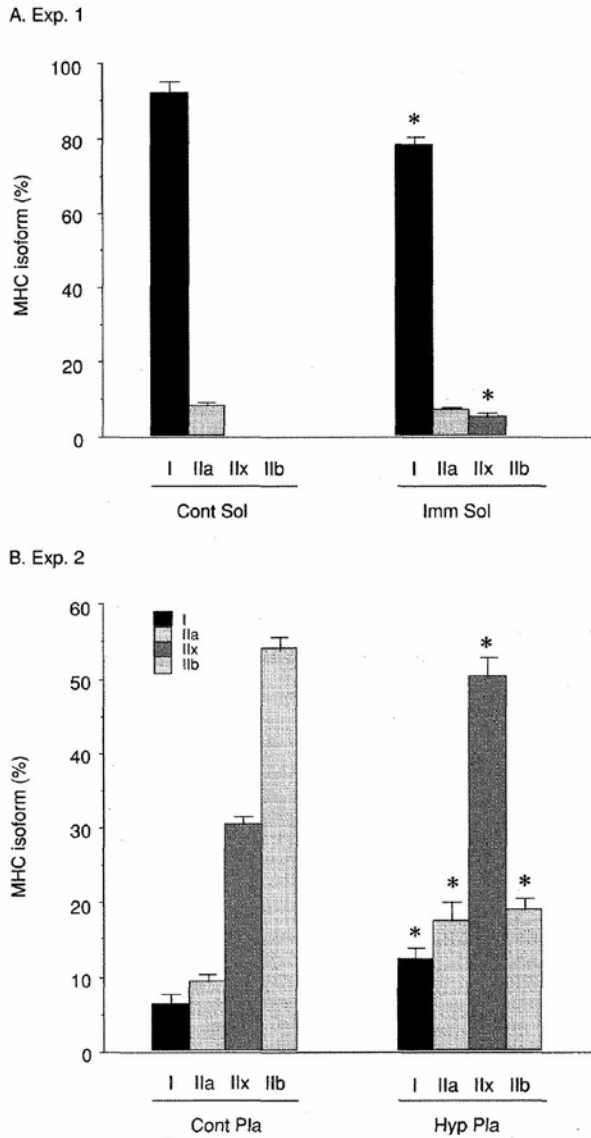


図4 Changes of MHC isoforms in the soleus (Sol) and plantaris (Pla) muscles. Cont, control; Imm, immobilization; Hyp, hypertrophy. * $p < 0.05$ vs. Cont.

type IIb) が発現しており、共同筋切除により速筋型 type IIb MHC の有意な減少とその他のアイソフォームの増加が認められた。

3. 考察

本研究は、筋が萎縮した場合と逆に肥大した際の HSP72 および CaN の応答を分析し、筋線維のサイズや発現型との関連を検討した。固定群ヒラメ筋では、筋重量、HSP72、CaN 発現量ともに対照群と比較して低下した。また遅筋型の type I MHC の割合の減少が見られた。一方、代償的に肥大がみられた足底筋では、筋重量、HSP72、

CaN 発現量ともに増加し、速筋型の type IIb MHC の割合が減少した。

筋のサイズと HSP72 および CaN の関連をみると (図1~3) 固定により萎縮したヒラメ筋では、HSP72、CaN ともにタンパク質発現量が減少し、逆に代償的に肥大した足底筋では両者ともに発現量は増加している。この結果からのみから判断すると、筋のサイズと HSP72、CaN の間には何らかの関連がありそうである。しかしながら、われわれは、最近、クレンジテロールにより肥大したラットの下肢骨格筋で、HSP72 発現量が有意に減少すること、逆に CaN は増加することを報告している¹⁴⁾。したがって、これらの結果から、HSP72 は単純に筋のサイズの変化と関連しているとは言えないようである。一方、CaN タンパク質発現量の変化は、筋のサイズの変化と常に平行であり、サイズの増減 (肥大または萎縮) に関連する可能性が高いようであるが、これに関しては今後より精度の高い分析が必要と思われる。

筋線維タイプの発現型との関連をみると、slow type I MHC の割合の減少がみられたヒラメ筋で HSP72、CaN ともに減少し、fast-to-slow 方向への MHC isoform の変換が生じた肥大足底筋では両者ともに増加している。本結果は、HSP72、CaN ともに slow fiber 発現型に関与するというこれまでの多くの報告^{2, 8, 10, 12, 13)} を支持するものである。

4. まとめ

本研究は、筋の萎縮あるいは肥大といったサイズの変化と HSP72、CaN の関連を検討するため、下肢固定により萎縮したヒラメ筋と代償的に肥大した足底筋について分析した。その結果、HSP72、CaN の変化はともに筋サイズの増加あるいは減少と平行なものであった。このことから、HSP72、CaN ともに筋サイズと関連する可能性が示唆されるものの、先行研究と一致しない点もあり、更なる検討が必要である。筋線維の発現

型との関連では, slow MHC isoform の増加あるいは減少にともない, HSP72, CaN もパラレルに変化し, この結果はこれまでの報告を支持するものであり, HSP72, CaN とともに遅筋タイプの発現型と密接に関与すると考えられる.

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 研究助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学財団に心より感謝申し上げます.

文 献

- 1) Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- 2) Dunn S.E., Burns J.L., and Michel R.N., Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 274: 21908-21912 (1999)
- 3) Dunn S.E., Chin E.R., and Michel R.N., Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth. *J. Cell Biol.* 151: 663-672 (2000)
- 4) Glass D.J., Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell. Biol.* 5: 87-90 (2003)
- 5) Hernando R. and Manso R., Muscle fiber stress in response to exercise. Synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* 243: 460-467 (1997)
- 6) Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- 7) Liu Y. and Steinacker J. M., Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci.* 6: 12-25 (2001)
- 8) Locke M., Atkinson B.G., Tanguay R.M., and Noble E.G., Shift in type I fiber proportion in rat hindlimb muscle are accompanied by changes in HSP72 content. *Am. J. Physiol.* 266: C1240-1246 (1994)
- 9) Locke M. and Noble E.G., Stress proteins: the exercise response. *Can. J. Appl. Physiol.* 20: 155-167 (1995)
- 10) Meissner J.D., Gros G., Scheibe R.J., Scholz M., and Kubis H.P., Calcineurin regulates slow myosin, but not fast myosin or metabolic enzymes, during fast-to-slow transformation in rabbit skeletal muscle cell culture. *J. Physiol.* 533: 215-226 (2001)
- 11) Musaro A., McCullagh K.J.A., Naya F.J., Olson E.N., and Rosenthal N., IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400: 581-585 (1999)
- 12) Naya F.J., Mercer B., Shelton J., Richardson J.A., Williams S., and Olson E.N., Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J. Biol. Chem.* 275: 4545-4548 (2000)
- 13) Ogata T., Oishi Y., Roy R.R., and Ohmori H., Endogenous expression and developmental changes of HSP72 in rat skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 95: 1279-1286 (2003)
- 14) Oishi Y., Imoto K., Ogata T., Taniguchi K., Matsumoto H., Fukuoka Y., and Roy R.R., Calcineurin and heat-shock proteins modulation in clenbuterol-induced hypertrophied rat skeletal muscles. *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.* 448: 114-122 (2004)
- 15) Oishi Y., Ishihara A., Talmadge R.J., Ohira Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Roy R.R., and Edgerton V.R., Expression of HSP72 in atrophied rat skeletal muscles. *Acta Physiol. Scand.* 172: 123-130 (2001)
- 16) Oishi Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Ishihara A., Ohira Y., and Roy R.R., Differential responses of HSPs to heat stress in slow and fast regions of rat gastrocnemius muscle. *Muscle & Nerve* 28: 587-594 (2003)
- 17) Oishi Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Ishihara A., Ohira Y., and Roy R.R., Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *J. Appl. Physiol.* 92: 1097-1103 (2002)
- 18) Oishi Y., Taniguchi K., Matsumoto H., Kawano F., Ishihara A., and Ohira Y., Enhancement of HSP72 in reloading rat soleus muscle after prolonged hindlimb unloading. *Jpn. J. Physiol.*, 53: 281-286 (2003)
- 19) Semsarian C., Wu M.J., Ju Y.K., Marciniak T., Yeoh T., Allen D.G., Harvey R.P., and Graham R.M., Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signaling pathway. *Nature*

- 400: 576-581 (1999)
- 20) Serrano A.L., Murgia M., Pallafacchina G., Calabria E., Coniglio P., Lomo T., and Schiaffino S., Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13108-13113 (2001)
- 21) Torgan C.E. and Daniels M.P., Regulation of myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle development in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 12: 1499-1508 (2001)
- 22) Welch W.J., Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 72: 1063-1081 (1992)