

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500560
 研究課題名（和文）骨格筋活動を見る：運動感受性遺伝子のプロモーターを用いた運動レポーター動物の作出
 研究課題名（英文）A novel transgenic animal to visualize muscular activity upon physical exercise.
 研究代表者
 人見 嘉哲（HITOMI YOSHIAKI）
 金沢大学・医学系・准教授
 研究者番号：70231545

研究成果の概要：

運動における骨格筋の役割や相互の関係を調べるために、運動感受性遺伝子 Rcan1 遺伝子のプロモーターを用いた遺伝子改変動物の作出を行った。その結果、短半減期レポーター遺伝子が組み込まれた 9 系統の動物ファウンダーが得られ、7 系統を維持することに成功した。これらの動物では、Rcan1 プロモーター制御下に短半減期レポーターの発現が観察された。今後、運動、姿勢制御における骨格筋の視覚的、定量的解析に寄与することが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：スポーツ科学、運動生化学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ スポーツ科学

キーワード：遺伝子組換え動物、運動、姿勢保持、骨格筋、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

我々の日常生活は、400 を超える骨格筋の活動に支えられている。骨格筋は、作用の似た複数の骨格筋がグループを作る。例えば、足関節の伸筋群、屈筋群は、それぞれ 7 つと 6 つの骨格筋で構成されている。これまでに、動作の主動筋となる大きな骨格筋の作用は明らかにされてきたが、より小さな骨格筋がどのように動員され協調するのか良く分かっていない。

骨格筋を構成する筋線維は、収縮速度や代謝能力の異なる遅筋線維 (Type I) と速筋線維 (Type II) に大別される。遅筋線維は、酸化

的リン酸化能や疲労に対する抵抗性が高く、基本的な姿勢の保持や筋持久力にとって非常に重要である。齧歯類の全骨格筋における遅筋線維の分布を検索したところ、遅筋線維の割合は、7 つの下肢骨格筋で非常に高く、50% 以上であることが分かった (人見ら, 2004)。他の骨格筋での遅筋線維の割合は 20% 以下である。7 つの骨格筋は、非常に小さく、従来その役割は不明であった。興味深いことに 7 つの骨格筋の作用と部位を検討すると、安静時の姿勢保持に重要な役割を担う可能性が推察された。しかし、これらの小さな骨格筋の役割を明らかにするためには、

直接、骨格筋の活動状態を観察する必要があると考えられた。

近年、Ca²⁺依存性のタンパク質・脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが筋線維の発達や維持に大きな役割を担うことが明らかにされてきた。カルシニューリンは、細胞内 Ca²⁺刺激によって活性化され、転写因子 NFAT を介して、筋線維に特異的な遺伝子群の発現を誘導する (Chin ら, 1998; Crabtree ら, 1999; Olson ら, 2000)。これまでに、我々は、急性運動によるカルシニューリン情報伝達系の活性化を研究してきた (人見ら, 2003)。その結果、カルシニューリンの活性制御因子である Regulator of calcineurin 1 (Rcan1) 遺伝子の mRNA 発現が運動刺激によって強く誘導されることを見いだした。Rcan 1 遺伝子の発現制御を検討したところ、プロモーターの NFAT 結合配列を介してカルシニューリン情報伝達系によって制御されていた。さらに、急性運動による Rcan mRNA の発現誘導は、一過性に運動後 4 時間で強く誘導されること、非常に低強度の運動によって発現が誘導されること、発現レベルが運動強度と良く相関すること、筋線維タイプの割合に関わらず全ての骨格筋で発現誘導されることが分かった。実際に、骨格筋にレポーター遺伝子を一過性に導入して Rcan 1 プロモーター活性を測定したところ、急性運動によって活性化を受けることが証明された。これらの結果は、Rcan プロモーターが骨格筋活動を反映するバイオマーカーになり得ることを示唆していた。

2. 研究の目的

運動における骨格筋の役割や相互の関係、特に主動筋に対して補助的な役割を果たす小さな骨格筋の役割を調べるために、1) 骨格筋での半減期を最適化した緑蛍光タンパク質やルシフェラーゼ遺伝子の作成、2) 運動感受性遺伝子 Rcan1 遺伝子プロモーター制御による短半減期レポーター遺伝子の作成、3) Rcan1 プロモーター・レポーター遺伝子を導入した遺伝子改変動物(運動レポーターマウス)の作出を目的とした。

3. 研究の方法

1) レポーター遺伝子の改変

運動レポーターマウスでは、骨格筋で適切な半減期を持つレポーター遺伝子を発現させる必要がある。適切な半減期を持つレポーターを得るために、蛍光タンパク (EGFP, Clontech 社) やルシフェラーゼ (Promega 社) 遺伝子にタンパク質の半減期を短くする PEST 配列を挿入し、さらに PEST 配列に遺伝子変異を導入し様々な半減期を持つレポーター遺伝子を作成する。変異の導入には、PCR 法を用い、クローン化した後に塩基配

列を確認した。

2) 改変レポーターの半減期

CMV プロモーター (CMVpro) を組み込んだレポータープラスミドを一過性に培養細胞株 HEK293 へ導入し、タンパク合成を阻止するサイクロヘキシミド処理後に緑蛍光タンパクの減衰を蛍光顕微鏡で、また、ルシフェラーゼ活性の減衰を定法に従い検討した。

次に、運動感受性の Rcan1 プロモーター (Rcan1pro) をレポータープラスミドに組み込み、Ca²⁺イオノフォア処理により一過性のレポーター発現誘導を確認した。

3) in vivo での改変レポーター発現量と半減期

我々が開発してきた骨格筋遺伝子導入法 (人見ら、特願 2003-10167) を用いてマウス骨格筋で改変レポーター遺伝子を発現させて、適切な半減期を持つレポーター遺伝子を選択した。まず、CMV プロモーターに組換えられたレポーター遺伝子を ICR マウスの前頸骨筋に導入し、3 日後に骨格筋を採取して凍結切片を作成、蛍光顕微鏡下に筋線維内での蛍光量や発現量を確認した。

次に、Rcan1 プロモーター緑蛍光レポーター遺伝子を導入し、3 日後に動物用トレッドミルにて急性運動を負荷する。経時的に骨格筋を採取し、骨格筋内での蛍光タンパク発現動態を検討した。遺伝子導入のコントロールとして CMV プロモーター・ルシフェラーゼか RCAN1 プロモーター・ルシフェラーゼを共導入し、骨格筋サンプルの一部から可溶性タンパクを抽出しルシフェラーゼ活性を測定した。

4) 運動レポーターマウスの作出と繁殖

2) で選択した Rcan1 プロモーター・レポーター遺伝子 (短半減期緑蛍光タンパク遺伝子、及び、短半減期ルシフェラーゼ遺伝子) を調製し、遺伝子改変マウスの作出に供した。ホストに C57BL/J を用いた。

得られたファウンダー動物を野生型 C57BL/J と交配し、遺伝子組換え動物の系統維持と共に導入遺伝子の発現量を検討するための固体の生産を行った。

4. 研究成果

1) 短半減期レポーター遺伝子

In vivo で骨格筋活動を可視化するために短半減期レポーター遺伝子を作成した。レポーター遺伝子の基本構造を Fig1 に示す。pEGFP-C1、及び、pGL4Luc をバックボーンとしてレポーター遺伝子の上流に運動感受性 Rcan1 遺伝子エクソン 4 プロモーター配列を、レポーター遺伝子の 3' 端にインフレームでタンパク質不安定化配列 (PEST) を挿

入した。半減期を調製するため PEST 配列に種々の遺伝子変異を導入し、不安定化効率を変化させたレポータープラスミドを作成した。

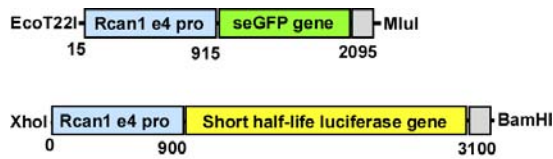


Fig. 1. Structure of the transgenes. Rcan1 promoter driven short half-life reporter genes, GFP (upper) and Luciferase (lower).

2) 改変レポーター遺伝子の選択

作成した短半減期レポーター遺伝子から Rcan1 遺伝子プロモーター活性を反映したレポータータンパク発現応答を示すクローンの選別を行った。まず、レポーターを恒常的に発現させることのできる CMV プロモーターに組換え、培養細胞に導入しサイクロヘキシミド処理によって半減期を測定した。結果より、レポーター活性の極端に短いクローンや野生型レポータータンパクと半減期が変わらないクローンを同定し、以下の実験から除外した。次に、培養細胞 Rcan1 プロモーターによる発現誘導を培養細胞株で検討した。

Rcan1 プロモーター・ルシフェラーゼ遺伝子 (Rcan1-Luc) を導入後、イオノマイシン処理 (1 時間) を行い、処理開始前、開始後 7 時間までのルシフェラーゼ活性を測定した。

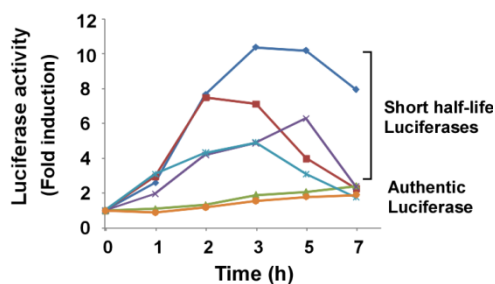


Fig. 2. Induction of luciferase activity after ionomycin treatment in culture cells transfected with the reporter plasmid

その結果、短半減期化したルシフェラーゼは、プロモーター活性に反応して活性変化することが確認できた。応答性は、クローンによって異なっており、刺激後 3~5 時間をピークとする Rcan1-Luc クローンを遺伝子改変動物の作出に用いることにした (Fig2)。

次に、Rcan1 プロモーター・緑蛍光タンパク遺伝子 (Rcan1-GFP) について同様の解析を行った。イオノマイシンで 1 時間処理した後、洗浄してメディアウム交換を行った。処理

前、処理後 2 時間、12 時間に緑蛍光タンパクの発現を観察した (Fig3)。

バックグラウンド、誘導後の蛍光強度、イオノマイシン除去後の蛍光減衰特性を比較したところ、クローン間で大きな差が認められた。Fig3 に代表的なクローンの実験結果を示す。e4EGFP/T クローンは、野生型 e4EGFP/wt に比較してバックグラウンドが十分に低く、誘導後一過性に蛍光強度が増強する。12 時間後には、十分な蛍光強度が減衰する。これに対して e4EGFP/S のように半減期が極端に短いクローンでは、十分な蛍光強度を得ることが出来なかった。

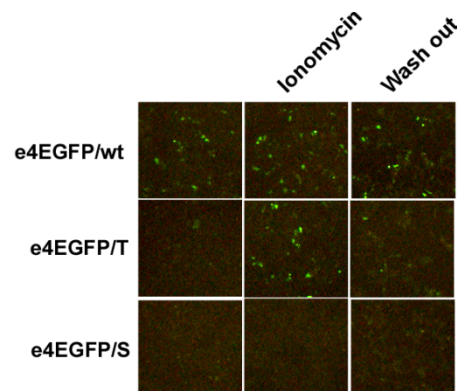


Fig. 3. Induction and elimination of short half-life derivatives of EGFP by transient ionomycin treatment (1h).

3) 運動レポーターマウス

以上の結果から遺伝子改変動物の作出に用いる短半減期レポーター遺伝子を選択し、動物の作出を行った。

	Strain	Tg(GFP)	Tg(Luc)
Microinjection (No. of eggs)		302	366
Uterine transplantation		293	354
Weaned pups		89	103
Tg genotype		2	8
Germ line transmission		1	6

Table 1. Summary of production of transgenic animals, Tg(GFP) and Tg(Luc).

その結果、2 匹の短半減期 GFP 遺伝子導入動物 (Tg(GFP)) と 8 匹の短半減期ルシフェラーゼ遺伝子導入動物 (Tg(Luc)) のファウンダーが得られた (Table1)。ファウンダー動物を元に交配を行ったところ、各 1 系統、6 系統が確立された。

繁殖した動物について、導入遺伝子 mRNA の発現を確認したところ骨格筋 (前頸骨筋 (TA)、ヒラメ筋 (S))、心筋 (H)、肝臓 (L)、大脳 (B) において mRNA の発現が確認された (Fig4)。

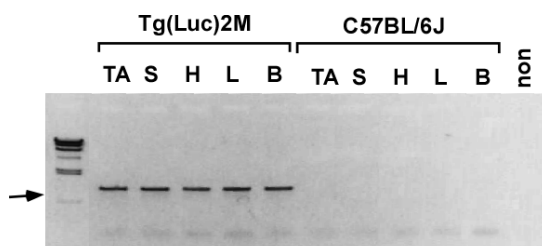


Fig. 4. Expression of transgene mRNA in a Tg(Luc)2 strain

以上より、本研究では、**Rcan1** 運動感受性プロモーター・レポーター遺伝子を導入した動物の作出に成功した。今後、系統間の交配を行い目的に合わせたレポーター発現量の得られる系統を樹立する予定である。運動や姿勢制御に動員される骨格筋群を直接、関節に見ることによって、運動科学、リハビリテーション科学、解剖生理学に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Hitomi Y, Watanabe S, Kizaki T, Ohno H (他 5 人・1 番目): Acute exercise increases expression of extracellular superoxide dismutase in skeletal muscle and the aorta. *Redox Rep.* 13:213-216 (2008) 査読有
2. Kabayashi Y, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H (他 3 人・1 番目): Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *J Clin Biochem Nutr.* 44: 46-51 (2008) 査読有
3. Kabayashi Y, Hibino Y, Hitomi Y, Nakamura H (他 5 人・1 番目): Preparation and characterization of a polyclonal antibody against brominated protein. *J Clin Biochem Nutr.* 44: 95-103 (2008) 査読有
4. Hirota R, Akimaru K, Nakamura H: In vitro toxicity evaluation of diesel exhaust particles on human eosinophilic cell. *Toxicol In Vitro.* 22(4), 988-994 (2008) 査読有
5. Hitomi Y, Kabayashi Y, Hibino Y (他 7 人・1 番目): Disposition of protein-bound 3-nitrotyrosine in rat plasma analyzed by a novel protocol for HPLC-ECD. *J Biochem.* 141:495-502 (2007) 査読有

6. Takemoto K, Hitomi Y, Kabayashi Y. (他 7 人・5 番目): Transiently, paralleled upregulation of arginase and nitric oxide synthase and the effect of both enzymes on the pathology of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293:1419-1426 (2007) 査読有
7. Takemoto K, Kabayashi Y, Hibino Y, Hitomi Y (他 5 人・6 番目): Biochemical characterization of reactive nitrogen species by eosinophil peroxidase in tyrosine nitration. *Acta Medica Okayama.* 61:17-30 (2007) 査読有
8. Nakamura H. (他 13 人・1 番目): Genotypes and haplotypes of CCR2 and CCR3 genes in Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 142:329-334 (2007) 査読有
9. Kabayashi Y, Hitomi Y (他 7 人・1 番目): Various molecular species of diacylglycerol hydroperoxide activate human neutrophils via PKC activation. *J Clin Biochem Nutr.* 41:68-75 (2007) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 人見嘉哲ら: 骨格筋に対する in vivo 遺伝子導入法による Calcineurin 制御タンパク Rcn1 発現制御の検討. 第 81 回日本生化学会大会. 2008 年 12 月 11 日, 神戸
2. 人見嘉哲ら: カルシニューリン制御タンパク Rcn1 による骨格筋活動のモニター. 文部科学省学術フロンティア研究プロジェクト「ライフステージに応じた健康増進と多様性保持」第 2 回研究会. 2007 年 12 月 22 日, 所沢
3. 神林康弘ら: 好酸球活性化マーカーである (ジ) プロモチロシンを認識する抗体の作成. 第 5 回日本予防医学会学術総会. 2007 年 11 月 23 日, 指宿
4. 神林康弘ら: 簡便な血漿総抗酸化能測定法の開発. 第 29 回日本フリーラジカル学会学術集会. 2007 年 6 月 10 日, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 嘉哲 (HITOMI YOSHIAKI)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：70231545

(2) 研究分担者

中村 裕之 (NAKAMURA HIROYUKI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：30231476

神林 康弘 (KAMBAYASHI YASUHIRO)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：20345630

日比野 由利 (HIBINO YURI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：40362008