

骨格筋におけるプロトオンコジーン及び筋特異的遺伝子の発現に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9216

骨格筋におけるプロトオンコジーンおよび筋特異的遺伝子の発現に対するカルシトニン遺伝子関連ペプチドの修飾に関する研究

金沢大学医学部医学科神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

安川善博

運動神経由来の骨格筋栄養因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide, CGRP) の筋特異的遺伝子発現における影響を検討した。ラット胎児骨格筋の初代培養細胞より全 RNA を抽出して、ノーザンブロット法にて遺伝子発現を調べた。プロトオンコジーンのうち *erbA*, *erbB*, *myb*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras*, ならびに筋特異的遺伝子としてジストロフィン (dystrophin), ミオジェニン (myogenin), ミオシン軽鎖 1 (myosin light chain 1, MLC1), ミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MHC), アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) α -サブユニットを調べた。対照として β -アクチン cDNA をプローブとして使い、それぞれの遺伝子の発現の有無, CGRP 添加による発現の変化を調べた。培養骨格筋はプロトオンコジーンの中で *erbA*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras* を自発的に発現していたが, *erbB*, *myb* の発現は認められなかった。筋特異的蛋白は全て, その発現が認められた。CGRP 添加により *K-ras* と AChR α -サブユニットの発現が増加し, 添加後少なくとも30分から8時間にわたり発現増強が維持された。CGRP は神経由来筋栄養因子として, 骨格筋細胞の蛋白発現を遺伝子レベルでコントロールしていることが示された。

Key words calcitonin gene-related peptide (CGRP), *K-ras*, nicotinic acetylcholine receptor (AChR), skeletal muscle, trophic factor

臨床神経学においては、脱神経を受けた筋肉が萎縮を起こすことは以前からよく知られた現象である。しかし、その機序については明らかではなく、骨格筋の蛋白質の発現調節に運動神経が関与している可能性が考えられてきた。これまで骨格筋に対する神経由来栄養因子としては、アセチルコリン (acetylcholine, ACh) が重要視されてきた。しかし神経終末部には ACh とともにカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide, CGRP) が共存することが知られ、その神経由来栄養因子としての役割が注目されるようになった¹⁾。CGRP は37個のアミノ酸よりなる分子量約3800のペプチドで、カルシトニン遺伝子上にコードされており、mRNA のスプライシングの過程でカルシトニンと CGRP という異なった mRNA が臓器特異的に発現する²⁾。CGRP は多様な生理的機能を持ったペプチドで血管拡張作用³⁾、腸管収縮作用⁴⁾等が知られている。骨格筋に対する作用としては、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor, AChR) 誘導増加⁵⁾や筋単収縮張力増強をもたらすことが明らかにされた⁶⁾。特に AChR 誘導増加が起こることは、CGRP が骨格筋に対する神経由来栄養因子として働くことを示していると思われる。ところで、細胞機能を調節する蛋白としてプロトオンコジーンが知られるようになった。プロトオンコジーンはウイルス癌遺伝子と同じ配列を持った細胞内に存在する遺伝子で、その産物

は細胞の生理機能に重要な役割を持っている。一部の癌の原因としてプロトオンコジーンの変異が証明されており、細胞の増殖に重要な働きをしている。著者は、CGRP が細胞の増殖という基本的な役割を持つプロトオンコジーンや筋特異的蛋白質の遺伝子発現に影響を及ぼし、骨格筋細胞の機能を維持する可能性を考え研究を行った。

材料および方法

1. 骨格筋初代培養細胞

骨格筋初代培養細胞は、Devreotes ら¹⁰⁾、Appel ら¹¹⁾の方法に従い以下のように調整した。胎生20日目のウイスター系ラット胎児下肢筋を採取し、神経、血管、結合組織を除去後、実体顕微鏡下に細切し、0.3%トリプシン (1:250) (Difco Laboratories, Detroit, USA) 処理により単細胞浮遊液を作った。これを1%ゼラチン (Difco Laboratories) 液でコーティングした直径60mm プラスチックペトリ皿 (岩城硝子, 東京) に 1×10^7 個となるように分注し、24~48時間培養した後、0.03%トリプシン処理により再度単細胞浮遊液とした。筋芽細胞と線維芽細胞の付着度の差を利用して線維芽細胞を選択的に除去するために、コーティングしていないプラスチックペトリ皿にて15~30分間培養し筋芽細胞に富んだ上清を採取した。最後にゼラチンコーティングした直径35mm プラスチックペトリ皿 (岩城硝子) に

平成8年1月30日受付, 平成8年4月2日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, nicotinic acetylcholine receptor; CGRP, calcitonin gene-related peptide; MHC, myosin heavy chain; MLC1, myosin light chain 1; PKC, protein kinase C

1×10⁶個となるように分注し、5日間筋芽細胞を発育させた。培養3日目以降は線維芽細胞の混入を防ぐため10⁻⁶Mのシトシンアラビノシド(和光純薬, 大阪)を培養液に加えた。以上の操作は全て無菌的に行い、培養液は、ダルベッコ改変イーグル培地(Gibco, Grand Island, USA)に10%牛胎児血清(Gibco), 1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(Gibco)を加えたものを用い、37℃, 5% CO₂下で培養し2~3日おきに培養液を交換した。

II. 筋芽細胞からの RNA の抽出

1. CGRP の添加

筋芽細胞をダルベッコ改変イーグル培地で5日間発育させた後、ディッシュを2群に分け、一方には10⁻⁷MのラットCGRP(Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, England)を添加し、他方を未添加群(対照)とした。CGRP添加後RNA抽出までの培養時間は、0.5時間、2時間、8時間の3種類行った。

2. RNA の抽出

全RNAの抽出はグアニジン/セシウムクロライド法により、以下のように行った。ディッシュ内の培養細胞に5倍量の5.5Mチオシアン酸グアニジン液(5.5Mチオシアン酸グアニジン, 5mMクエン酸ナトリウム, pH 7.0, 0.5%サルコシル, 0.1M 2-メルカプトエタノール)を加え溶解させた。5.7Mセシウムクロライド液(0.1M EDTAに溶解)3mlをSW 50.1ローター(Beckman, California, USA)用のポリアロマーチューブに注ぎ、その上に溶解液1~1.5mlを重層した。35,000rpm, 20℃で12時間以上遠心した後、沈殿を500μlの4Mチオシアン酸グアニジン液(5.5Mチオシアン酸グアニジン液を蒸留水で希釈したもの)に溶解した。この溶解液をエッペンドルフチューブに回収し、10,000rpmで10分間遠心して不溶物を除いた。上清を別のエッペンドルフチューブに移し、1M酢酸12.5μlとエタノール375μlを加え、-20℃で3時間以上静置した。10,000rpmで20分間遠心し、沈殿を400μlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA)に溶かした。さらにエタノール沈殿による濃縮・精製を繰り返した後、RNAの沈殿を蒸留水に溶かし、260nmの吸光度を測定しRNA濃度を求めた。

III. ノーザンプロット

ノーザンプロットはホルムアルデヒド法により行った。22.5μl(10μg)のRNAサンプルをエッペンドルフチューブにとり、5×ゲル泳動緩衝液(0.2Mモルホリンプロパンスルホン酸, pH 7.0, 50mM酢酸ナトリウム, 5mM EDTA)10μl, ホルムアルデヒド17.5μl, ホルムアミド50μlを加えよく混合させ、55℃で15分間加熱した。なお、ホルムアルデヒドはイオン交換樹脂AG501-X8(日本バイオ・ラッド, 東京)にて中和したものを用いた。さらに10×色素液(50%グリセロール, 0.25%ブROMフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノール)10μlを加え、電気泳動装置Mupid-2(アドバンス, 東京)上の1%アガロースゲルに1レーンあたり10μl(1μg)のせ、50Vにて1~1.5時間電気泳動した。泳動終了後、ゲルを5分間水に浸し、この間数回水を交換することによりホルムアルデヒドを除いた。ゲルからサイズマーカー用のレーンを切り出し、別容器内でエチジウムブロマイドで染色した。他の部分のゲルは20×SSC(3M NaCl, 0.3Mクエン酸ナトリウム)に20分間浸した後、プロット装置にのせ、その上にナイロンフィルター

Hybond-N(アマージャムジャパン, 東京)を置き、さらに3MMペーパー(Whatman, Maidstone, England)とペーパータオルを置いて重りをのせ、一晚トランスファーした。翌日ナイロンフィルターを取り出し紫外線照射してRNAを固定した。

IV. DNA プローブの調整

本実験では、プローブとして、β-アクチン, AChR α-サブユニット, プロトオンコジーンの*erbA*, *erbB*, *myb*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras*の計10個, ジストロフィン(dystrophin) cDNA, 筋細胞分化決定因子としてミオジュニン, その他の筋特異的遺伝子としてミオシン軽鎖1(myosin light chain 1, MLC1), ミオシン重鎖(myosin heavy chain, MHC)を使用した。β-アクチンプローブ¹²⁾は奈良県立医科大学上野 聡博士から, AChR α-サブユニットのプローブ¹³⁾はJ. Lindstrom博士から供与された。プロトオンコジーンのプローブは全て宝酒造の製品を用いた。ジストロフィンのプローブはL. M. Kunkel博士の了承を得て, American Type Culture Collection(Rockville, USA)より入手したcDNAの4-5a(cDMD4-5a)¹⁴⁾を使用した。MLC1, MHCはR. L. Davis博士¹⁵⁾より, ミオジュニンはW. E. Wright博士¹⁶⁾より供与を受けた。これらDNAを蒸留水で25ng/μlの濃度に調整し, その1μlをランダムプライマーDNAラベリングキット(アマージャムジャパン)を用いて, 50μCiの[α-³²P] dCTP(アマージャムジャパン)にて標識した。未反応の[α-³²P] dCTPはQIAGEN-tip(フナコシ, 東京)を用いて除去した。

V. ハイブリダイゼーション

RNAを固定したナイロンフィルターを2レーン分ずつ(CGRP添加群と対照群のペア)の大きさにカットした。ハイブリバッグ(コスモバイオ, 東京)の中にハイブリダイゼーション液(5×SSC, 5×Denhardt液(50×Denhardt液は1%ウシ血清アルブミン, 1%フィコール, 1%ポリビニールピロリドン溶液, 100μg/ml熱変性サケ精子DNA, 50%ホルムアミド, 10%SDS))を注ぎ, その中でカットしたフィルターを一晚振盪し, プレハイブリダイゼーションを行った。次にフィルターを³²P標識プローブの入ったハイブリダイゼーション液に移し, 42℃でオーバーナイト振盪した。ハイブリダイゼーション後, フィルターを2×SSCにて室温で10分間洗浄し, さらに0.1%SDSを含む2×SSCにて50℃30分間インキュベーションを行った(この操作を2回以上繰り返した)。処理後, X線フィルムX-Omat ARフィルムXAR-5(Kodak, New York, USA)を使い, -70℃でオートラジオグラフィを行った。X線フィルム上に認められたRNAの特異的バンドの濃度はスポットスキャナーCS-9000(島津製作所, 京都)により定量した。

VI. 統計処理

得られた計量的データは $\bar{x} \pm SD$ で表した。各データの有意差の検定には対応のあるt検定を用い, $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 培養筋細胞におけるプロトオンコジーンの発現とCGRP添加の影響

ラット骨格筋初代培養細胞では, 検討したプロトオンコジーンの中で*erbB*と*myb*は発現が認められなかったが, その他のプロトオンコジーンすなわち*erbA*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras*の発現が確認された(図1, 表1)。CGRPによる

修飾を添加後8時間の群で検討したところ、K-ras のみにあってその発現が約2倍に増強していた(表1)。

II. 培養筋細胞における筋特異的遺伝子および AChR α -サブユニットの発現と CGRP 添加の影響

ラット骨格筋初代培養細胞では、cDMD4-5a, ミオジュニン,

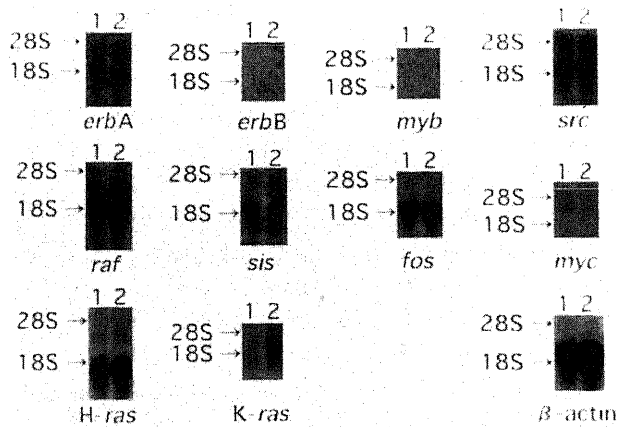


Fig. 1. Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with proto-oncogenes and β -actin. Lane 1, RNA derived from cultured muscle without CGRP; lane 2, RNA derived from cultured muscle with CGRP. Positions of ribosomal RNAs (28S, 18S) are indicated on the left side of each panel.

Table 1. Relative expression rate of proto-oncogenes mRNA after 8 hr incubation with CGRP

Proto-oncogenes	Expression rate ^{a)}
<i>erbA</i>	1.20 \pm 0.36
<i>erbB</i>	No expression
<i>myb</i>	No expression
<i>src</i>	1.16 \pm 0.31
<i>raf</i>	1.02 \pm 0.38
<i>sis</i>	1.05 \pm 0.17
<i>fos</i>	1.11 \pm 0.24
<i>myc</i>	0.97 \pm 0.28
H- <i>ras</i>	1.23 \pm 0.39
K- <i>ras</i>	1.90 \pm 0.35*

Each value indicates $\bar{x} \pm SD$ (n=4). * p<0.01 compared to control. ^{a)} Expression rate is the mRNA ratio between the myotube culture with CGRP and that without CGRP.

MLC1, MHC, β -アクチン, AChR α -サブユニットの発現が確認された。(図2, 表2)。CGRP 添加後8時間の群との比較では、AChR α -サブユニットの発現のみが有意に増加していた(表2)。

III. CGRP 添加後の経時的变化

CGRP 添加後8時間の群で発現量が増加していた K-ras と AChR α -サブユニットに関して経時的变化を検討した。すなわち、CGRP 添加後から RNA 抽出作業までの時間を0.5時間, 2時間, 8時間とした3群において、その発現量を比較した。表3に示すように、K-ras, AChR α サブユニットともに添加後0.5時間ですでに発現増強効果が認められ、K-ras と AChR α -サブユニットの発現は少なくとも8時間後まで増強効果が維持

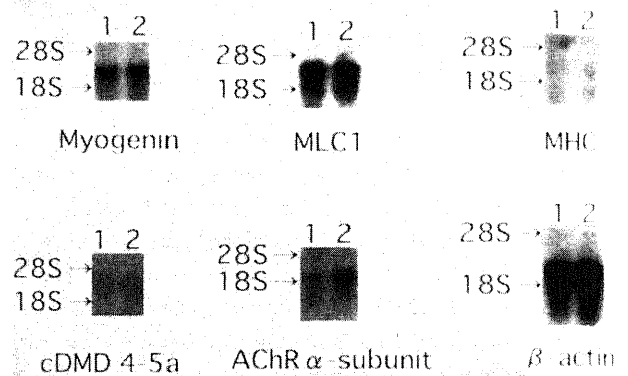


Fig. 2. Northern blot analysis of rat myotube total RNA probed with myogenin, MLC1, MHC, human AChR α -subunit and β -actin. Lane 1, RNA derived from cultured muscle without CGRP; lane 2, RNA derived from cultured muscle with CGRP. Positions of ribosomal RNAs (28S, 18S) are indicated on the left side of each panel.

Table 2. Relative expression rate of muscle specific genes mRNA after 8 hr incubation with CGRP

Muscle specific genes	Expression rate ^{a)}
cDMD4-5a	0.97 \pm 0.23
Myogenin	1.11 \pm 0.34
MLC1	1.08 \pm 0.16
MHC	0.96 \pm 0.24
AChR α -subunit	1.76 \pm 0.33*

Each value indicates $\bar{x} \pm SD$ (n=4). * p<0.01 compared to control. ^{a)} Expression rate is the mRNA ratio between the myotube culture with CGRP and that without CGRP.

Table 3. Time course of K-ras and AChR α -subunit mRNA expressions induced by CGRP

Genes	No. of samples	Expression rate ^{a)} ($\bar{x} \pm SD$)		
		Incubation time (hr) with CGRP		
		0.5	2	8
K-ras	8	1.78 \pm 0.39*	1.70 \pm 0.17*	1.90 \pm 0.35*
AChR α -subunit	4	1.53 \pm 0.23 [†]	1.71 \pm 0.23 [†]	1.76 \pm 0.33 [†]

* p<0.05, [†]p<0.01

^{a)} Expression rate is the mRNA ratio between the myotube culture with CGRP and that without CGRP.

されていることが確認された。また、K-ras と AChR α -サブユニットの経時的変化は同様であった。

考 察

AChR は神経からの興奮伝達の受容体であり、筋細胞の機能において重要な膜蛋白である。その発現量や分布は脱神経により大きく変わることが知られている。骨格筋の支配神経は、筋の性質や機能を調節することが知られているが、それは AChR のような特定の蛋白合成促進もしくは抑制によるものと考えられる。これまで筋細胞の神経由来栄養因子の候補として ACh が調べられてきたが¹⁷⁾、神経終末に神経ペプチドである CGRP が見いだされて以来¹⁸⁾、その作用が注目を集めた。神経末端から放出された CGRP は筋膜上に存在する高親和性受容体・GTP 結合蛋白質・アデニレートシクラーゼからなる情報転換ユニットを介し cAMP をセカンドメッセンジャーとして機能を発現する⁹⁾。筋細胞に対する CGRP の作用として、AChR の増加²⁰⁾、筋収縮力の増強²¹⁾が知られているが、筋収縮力増強は細胞内 cAMP 濃度増加によるものであることが示されている⁹⁾。また Cambier ら¹⁹⁾は cAMP がプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) の細胞質から核内への移行をもたらす、遺伝子発現を調節する可能性があることを示した。著者は、CGRP の細胞内セカンドシグナルである cAMP が培養筋細胞の遺伝子発現を調節している可能性を考えた。CGRP 添加による、筋膜上の AChR 増加が mRNA 転写増強を伴ったものであることは、既に報告されている²⁰⁾。今回、細胞機能を調節する働きのあるプロトオンコジーンと AChR を含む筋特異的蛋白の発現を検討した。

プロトオンコジーンはウイルス癌遺伝子と同じ配列を持った細胞内に存在する遺伝子で、それぞれが上皮成長因子レセプター、GTP 結合蛋白質、甲状腺ホルモン受容体といった細胞の活動に必須の機能を持った蛋白質をコードしている²¹⁾。筋細胞の分化に対するプロトオンコジーンの影響も報告されているが、プロトオンコジーンと細胞の組合せにより分化を誘導する場合、逆に阻害する場合があります、その機能は多様である²²⁾。本研究では、培養筋細胞中に *erbA*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras* の mRNA の発現が認められたが、この結果は Claycomb らの報告と一致した²¹⁾。これらのプロトオンコジーンは筋細胞の機能維持において、さまざまな形で関与しているものと考えられる。さらにこれらの中で *K-ras* のみが CGRP 添加による増強効果を受けることがわかった。*K-ras* は CGRP 添加後 0.5 時間から 8 時間まで、その発現増強を継続しており、この経時的変化は AChR α -サブユニットの発現と平行している (表 3)。*K-ras* 遺伝子の産物は GTP 結合蛋白質のスーパーファミリーの一つであり²³⁾、細胞のシグナル伝達機構におけるスイッチの役割を持つ²⁴⁾。本研究からは *K-ras* と AChR α -サブユニットとの直接の関わりは証明されないが、CGRP が AChR α -サブユニットの発現と平行して、*K-ras* の発現を増強した事実は重要であると考えられる。

ras 発現による骨格筋への作用は、分化、増殖の抑制であることが明らかになっている^{22,25,26)}。この抑制作用は、MyoD1 発現を抑制することによりもたらされることが知られている¹⁵⁾。そのため著者はさらに、筋特異的遺伝子の発現を調べた。特に、ミオジェニンは MyoD1 とともに筋細胞決定・分化因子として近年注目されている。また、分化過程のみならず筋細胞がそれ

自身を維持し、収縮・弛緩といった特殊な生理機能を果たすには、数多くの遺伝子の発現が何らかの因子によりの確に制御される必要があると考えられる。MyoD1 はマウス線維芽細胞株 (C3H10T1/2) から¹⁵⁾、ミオジェニンは MyoD1 類似物としてラット筋細胞株 (L6) より得られた¹⁶⁾。ともに分子の中程に癌遺伝子 *myc* ファミリーと相同性の高い領域と、それに隣接して N 末端側に高塩基性の領域を有しており、DNA 結合性蛋白質として機能する核蛋白質であることを示唆している¹⁶⁾。筋分化制御因子としてはこの他に、Myf 群^{27,28)}、MRF4²⁹⁾ が知られているが、いずれもその構造に共通性を有する DNA 結合性蛋白であることが確認されている。本研究で用いたラットの初代培養細胞ではミオジェニンの発現が認められた。筋芽細胞より筋管細胞に分化する過程では、ミオシン、アクチン、トロポニン、トロポミオシンなどの一連の収縮蛋白質や CK など筋細胞で特異的に発現する酵素群、AChR などの転写が誘導される。今回用いた培養胎児筋細胞では MLC1, MHC, cDMD4-5a の発現が確認された。しかし、CGRP 添加によるこれらの遺伝子発現には変化はなく、神経由来栄養因子よりもミオジェニンに代表される内因性の筋分化因子により、発現が調節されているものと考えられた。

他の因子による *K-ras* の発現調節については、肝癌細胞である Reuber H35 において報告されている³⁰⁾。彼等は、グルカゴンが *Ki-ras* 発現を生理的濃度では増強することを見出し、そこに PKC 活性化が介在している可能性を示した。彼等の系と、今回示した CGRP の作用が全く同じとは考えられないが、*K-ras* 発現調節が他の系においてもなされることは、*K-ras* の細胞における機能を考える上で興味深い事実である。

今回、CGRP を添加する時期は、ほとんどの培養筋芽細胞が筋管細胞へと分化している頃であることから、CGRP が生体の分化した筋細胞の維持に栄養因子として働いている可能性が考えられた。CGRP の筋蛋白発現に影響を及ぼす作用が明らかになったことより、未だ原因が不明である運動神経疾患、末梢神経疾患において、病因、病態への関与、さらには治療を含めて神経由来栄養因子の働きを調べていく必要があると考えられる。

結 論

ラット骨格筋初代培養細胞におけるプロトオンコジーン、筋特異的遺伝子、AChR α -サブユニットの mRNA の発現とその発現に対する CGRP 添加の影響を検討して以下の結果を得た。

1. 培養骨格筋細胞には、*erbA*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras* と今回検討したものだけでも 8 種類のプロトオンコジーンが発現しており、これらは筋細胞の増殖分裂、分化、機能維持に関与している可能性が考えられた。

2. プロトオンコジーンの中で *K-ras* のみが CGRP 添加の影響を受けその発現量は約 2 倍に増強していた。CGRP 添加後の経時的変化は、AChR α -サブユニットのそれと類似しており、両者の発現が共通の機序により調節されている可能性が示唆された。

3. 上記以外の筋特異的遺伝子、すなわちミオジェニン、MLC1, MHC, cDMD4-5a は発現が確認されたが、CGRP の修飾は認められなかった。

4. 本研究において CGRP を添加する時期は、ほとんどの培養筋芽細胞が筋管細胞へと分化している頃であることから、

CGRP が生体の分化した筋細胞の維持に栄養因子として働いている可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接の御指導・御教示を賜りました吉川弘明博士ならびに金沢大学がん研究所分子生物学教室飯田克平助教授に深く感謝致します。また、統計処理につきご指導いただきました衛生学教室橋本和夫名誉教授に感謝いたします。

なお、本研究の一部は、厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーおよび関連疾患の成因と治療法開発に関する研究（荒木班）平成3年度班会議（1991，東京）および第32回日本神経学会総会（1991，東京）で発表した。

文 献

- 1) Takami, K., Kawai, Y., Shirokawa, S., Lee, Y., Girgis, S., Hillyard, C. J., Macintyre, I., Emson, P. C. & Tohyama, M.: Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and choline acetyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei. *Brain Res.*, **328**, 386-389 (1985).
- 2) Fontaine, B., Klasfeld, A., Hokfelt, T. & Changeux, J. P.: Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. *Neurosci. Lett.*, **71**, 59-65 (1986).
- 3) Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S. & Evans, R. M.: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, **298**, 240-244 (1982).
- 4) Rosenfeld, M. G., Mermod, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. & Evans, R. M.: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, **304**, 129-135 (1983).
- 5) Brain, S. D., Williams, T. J., Tippins, J. R., Morris, H. R. & MacIntyre, I.: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, **313**, 54-56 (1985).
- 6) Tippins, J. R., Morris, H. R., Panico, M., Etienne, T., Bevis, P., Girgis, S., MacIntyre, I., Azria, M. & Attinger, M.: The myotropic and plasma-calcium modulating effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Neuropeptides*, **4**, 425-434 (1984).
- 7) New, H. V. & Mudge, A. W.: Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature*, **323**, 809-811 (1986).
- 8) Takami, K., Kawai, Y., Uchida, S., Tohyama, M., Shiotani, Y., Yoshida, H., Emson, P. C., Girgis, S., Hillyard, C. J. & Macintyre, I.: Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. *Neurosci. Lett.*, **60**, 227-230 (1985).
- 9) Takamori, M. & Yoshikawa, H.: Effect of calcitonin gene-related peptide on skeletal muscle via specific binding site and G protein. *J. Neurol. Sci.*, **90**, 99-109 (1989).
- 10) Devreotes, P. N. & Fambrough, D. M.: Acetylcholine receptor turnover in membrane of developing muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **65**, 335-358 (1975).
- 11) Appel, S. H., Anwyl, R., McAdams, M. W. & Elias, S.: Accelerated degradation of acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2130-2134 (1977).
- 12) Nakajima-Iijima, S., Hamada, H., Reddy, P. & Kakunaga, Y.: Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6133-6137 (1985).
- 13) Schoepfer, R., Luther, M. & Lindstrom, J.: The human medulloblastoma cell line TE671 expresses a muscle-like acetylcholine receptor. Cloning of the α -subunit cDNA. *FEBS letter*, **226**, 235-240 (1988).
- 14) Hoffman, E. P. & Kunkel, L. M.: Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron*, **2**, 1019-1029 (1989).
- 15) Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B.: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, **51**, 987-1000 (1987).
- 16) Wright, W. E., Sassoon, D. A. & Lin, V. K.: Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, **56**, 607-617 (1989).
- 17) Pestronk, A., Drachman, D. B., Stanley, E. F., Price, D. L. & Griffin, J. W.: Cholinergic transmission regulates extrajunctional acetylcholine receptors. *Exp. Neurol.*, **70**, 690-696 (1980).
- 18) Fleming, N. W., Lewis, B. K., White, D. A. & Dretchen, K. L.: Acute effects of calcitonin gene-related peptide on the mechanical and electrical responses of the rat hemidiaphragm. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **265**, 1199-1204 (1993).
- 19) Cambier, J. C., Newell, M. K., Justement, L. B., McGuire, J. C., Leach, K. L. & Chen, Z. Z.: Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature*, **327**, 629-632 (1987).
- 20) Fontaine, B., Klasfeld, A. & Changeux, J. P.: Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor α -subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.*, **105**, 1337-1342 (1987).
- 21) Claycomb, W. C. & Lanson Jr., N. A.: Proto-oncogene expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle. *Biochem. J.*, **247**, 701-706 (1987).
- 22) Lassar, A. B., Thayer, M. J., Overell, R. W. & Weintraub, H.: Transformation by activated *ras* or *fos* prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1. *Cell*, **58**, 659-667 (1989).
- 23) Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F.: The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127 (1991).
- 24) Downward, J., Graves, J. D., Warne, P. H., Rayter, S. & Cantrell, D. A.: Stimulation of p21ras upon T-cell

activation. *Nature*, **346**, 719-723 (1990).

25) Payne, P. A., Olson, E. N., Hsiau, P., Roberts, R., Perryman, M. B. & Schneider, M. D.: An activated *c-Ha ras* allele blocks the induction of muscle-specific genes whose expression is contingent on mitogen withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8956-8960 (1987).

26) Olson, E. N., Spizz, G. & Tainsky, M. A.: The oncogenic forms of *N-ras* or *H-ras* prevent skeletal myoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2104-2111 (1987).

27) Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. & Arnold, H. H.: A novel human muscle factor related to but distinct from *MyoD1* induces myogenic

conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.*, **8**, 701-709 (1989).

28) Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kotz, S., Grzeschik, K. H. & Arnold, H. H.: Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the *Myf* gene products. *EMBO J.*, **8**, 3617-3625 (1989).

29) Rhodes, S. J. & Konieczny, S. F.: Identification of MRF4: A new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes and Development*, **3**, 2050-2061 (1989).

30) Chan, S., Wong, S. S. & Yeung, D. C.: Regulation of *Ki-ras* expression in Reuber H35 cells. *Eur. J. Biochem.*, **193**, 681-685 (1990).

Effect of Calcitonin Gene-related Peptide on Expression of Proto-oncogenes and Skeletal Muscle Specific Genes

Yoshihiro Yasukawa, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **105**, 400—405 (1996)

Key words calcitonin gene-related peptide (CGRP), *K-ras*, nicotinic acetylcholine receptor (AChR), skeletal muscle, trophic factor

Abstract

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a potent trophic factor that is secreted by the nerve terminal of the motor neurons. The effect of CGRP on skeletal muscle was studied for the expression of proto-oncogenes and muscle specific genes. Total RNA was extracted from cultured rat embryo's myotubes by guanidinium / cesium chloride method. Northern blot analysis was performed and the expression ratio of genes was studied. The studied genes were *erbA*, *erbB*, *myb*, *src*, *raf*, *sis*, *fos*, *myc*, *H-ras*, *K-ras*, dystrophin, myogenin, myosin light chain 1 (MLC-1), myosin heavy chain (MHC) and nicotinic acetylcholine receptor (AChR) α -subunit. The expression of all genes was detected except for *erbB* and *myb*. The addition of 10^{-7} M CGRP into the culture medium increased the expression of *K-ras* and AChR α -subunit. The increased expressions of *K-ras* and AChR α -subunit were paralleled from at least 30 min. to 8 hr. after addition of CGRP. CGRP acts as a nerve derived trophic factor from the motor nerve terminal and regulates gene expressions besides increasing muscle contractility.