

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650402

研究課題名（和文）機能性 RNA を介した運動による筋萎縮抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism for suppression of myopenia by exercise through functional RNA

研究代表者

武政 徹 (TAKEMASA TOHRU)

筑波大学・体育系・教授

研究者番号：50236501

研究成果の概要（和文）：本研究では、筋萎縮の抑制メカニズムを研究するにあたり、筋萎縮の逆反応である筋肥大に注目し、それが起こる際の分子レベルでの反応を機能性 RNA の発現にターゲットを絞り検討した。その結果、過負荷による筋肥大時には、機能性 RNA の中でもマイクロ RNA-21 が重要な働きを持つ可能性を示唆する実験結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on functional RNA expression in muscle during mechanical overload to explain a part of mechanisms of muscle hypertrophy. As a result, we got some data suggesting that mi-21 (micro-RNA) could be an important functional RNA to induce muscle hypertrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：骨格筋の分子運動生理学

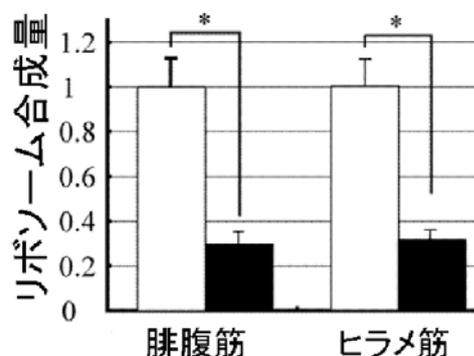
科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学／スポーツ科学

キーワード：運動生理学、分子生物学、筋萎縮、筋肥大、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に直面し、医療費の増大が重要課題となっている今、運動により筋萎縮を抑制する方法論の確立は急務である。本研究では、筋萎縮の分子機構の解明とそれに対する運動の効果を明らかにすることを通して、運動による効果的な筋萎縮の抑制法の確立を目指している。これまで、筋萎縮時にはリボソーム合成量が通常時の 30% 程度まで低下していたことを報告した (図 1: J Cell Physiol., 227: 1569-1576, 2012)。

そこで本研究では初めに、リボソームの合成低下が筋萎縮時に普遍的に引き起こされる現象であることを確認した後、筋萎縮時におけるリボソームの合成低下の分子機構を解明しようと考えた。その後、運動がこの低下機構に与える影響を検討し、筋萎縮の根本



となる分子機構と運動の関与を明らかにすることで、運動による効果的な筋萎縮抑制法の確立に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

筋萎縮時に活性化されるシグナルと、筋肥大時に活性化されるシグナルは、例えば図 2 に示してある FOXO という分子がクロストークすることにより、密接に関連（干渉）していることが知られている。

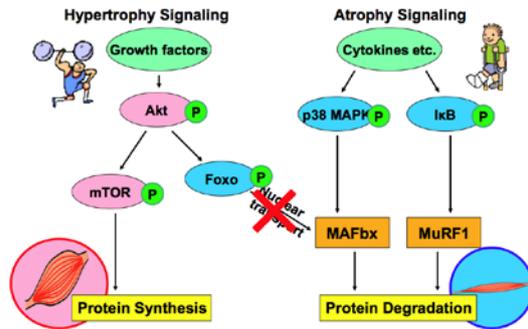


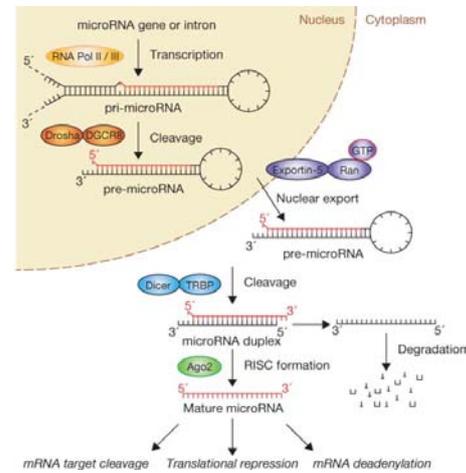
図 2 筋肥大と筋萎縮に関わるシグナルカスケードとそのクロストーク

すなわち、筋萎縮を抑制する因子を見つけるにあたって、有効と思われる方法の 1 つが筋肥大時に活性化される機能性 RNA を調べることであったと考えた。

マイクロ RNA(以降 miRNA と略記、個々の miRNA については miR-# と記述する)は 20~25 ヌクレオチドの極小さな RNA であり、タンパク質をコードしているメッセンジャー RNA(以降 mRNA と略記)とは異なる、いわゆる Non-coding RNA の一種である。

miRNA の元になる DNA 配列は miRNA より長く、miRNA の配列と、それにほぼ相補的な逆向きの配列を含む。この DNA 配列が 1 本鎖 RNA に転写されると、miRNA 配列とその逆相補配列は相補的に結合して 2 本鎖になり、全体としてはヘアピンループ構造 (tRNA に似た形) をとる。これを primary miRNA (pri-miRNA) という。通常、ヘアピンループ構造をとる部分以外にもミスマッチが含まれており、スターフォームとよばれる。核内にある Drosha と呼ばれる酵素がこの pri-miRNA 分子の一部を切断して pre-miRNA (miRNA の直接の前駆体) を作る。次いで pre-miRNA 分子は Exportin-5 と呼ばれるキャリアタンパク質によって核外に輸送され、これからダイサー (Dicer) により 20-25 塩基の成熟 miRNA(mature-miRNA) が切り出される。miRNA の機能は遺伝子発現の抑制にあると

考えられる。miRNA は一部の mRNA に相補的な配列を有する。この mRNA と miRNA との結合により、翻訳が阻害される場合と RNAi のように mRNA の分解を引き起こす



場合がある (図 3)。

図 3 micro-RNA (mi-RNA) の生成と機能

心筋や骨格筋では miRNA-1、miRNA-13a、miRNA-13b、miRNA-206、miRNA-208、miRNA-208b、miRNA-49 などの miRNA の存在が確認されており、発生段階の各ステージで様々な遺伝子発現の制御をしていると予想されているが、詳細はわかっていない。例えば、骨格筋では筋芽細胞が分化して融合する際、miR-1 と miR-206 がギャップジャンクション(細胞境界)に存在するコネキシン 43 という蛋白質の発現を抑え、融合を促進することがわかっている程度で、他の miRNA の機能については不明である。我々はレジスタンス運動による骨格筋の肥大時にも miRNA が関与すると予想し、以下の実験を計画した。

3. 研究の方法

筋肥大時に働く機能性 RNA の一種、miRNA を網羅的に解析する方法として、マイクロアレイ解析をマウスの代償性過負荷による筋肥大モデルに適用し、筋肥大時に変化を起こす miRNA を解析した。

4. 研究成果

まず、協働筋切除により確実に筋肥大が起きている事を確認できた (図 4)。

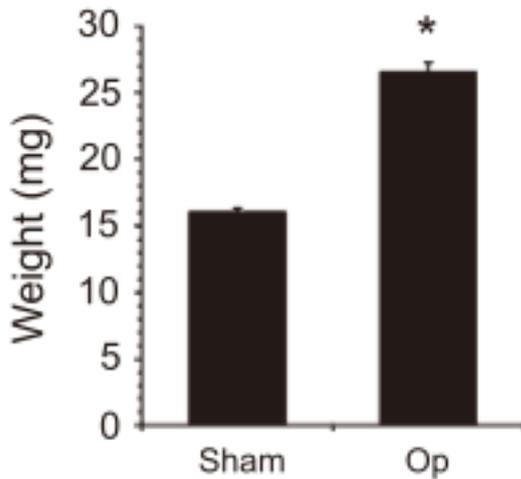


図 4 疑似手術群に対して、協働筋切除を行った群では代償性過負荷を受けた骨格筋(足底筋)の肥大がみられた。

miRNA のマイクロアレイ解析の結果を表 1 に示す。

表 1 筋肥大時に大きく発現量が変化する miRNA

A Increased miRNAs

miRNA	Cy3 signal (Sham)	Cy5 signal (Op)	Cy5/Cy3
miR-1	7,866	13,177	1.68
miR-16	4,640	11,012	2.37
miR-21	832	6,373	7.66
miR-29a	2,046	3,491	1.71
miR-29b	779	2,375	3.05
miR-29c	757	1,141	1.51
miR-125a	844	2,122	2.51
miR-125b	4,612	10,273	2.23
miR-199a	1,292	6,881	5.33
miR-199a*	2,350	9,807	4.17

B Decreased miRNAs

miRNA	Cy3 signal (Sham)	Cy5 signal (Op)	Cy5/Cy3
miR-133a	46,165	21,819	0.47
miR-133a*	4,020	1,192	0.30
miR-422a	5,990	830	0.14
miR-422b	24,845	7,064	0.28
miR-663	9,939	4,799	0.48

マイクロアレイの解析結果を踏まえ、実際に筋肥大時の miR-21 の発現量を RealTime PCR 法により定量したところ、miR-21 の発現量が有意に上昇することを突き止めた (図 5)。

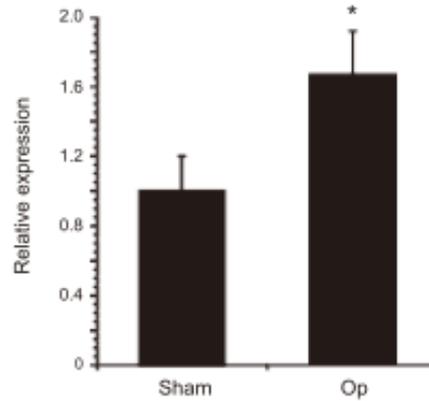


図 5 筋肥大時の miR-21 の発現増加

miR-21 は PDCD4、PTEN、SPRY2 などの癌抑制遺伝子をターゲットとしていることが、ターゲット予想プログラムにより予想され、実際肥大を起こしている骨格筋ではこれら PDCD4、PTEN、SPRY2 などの癌抑制遺伝子が抑制され、結果的に肥大が起きていることが確認できた (図 6)。

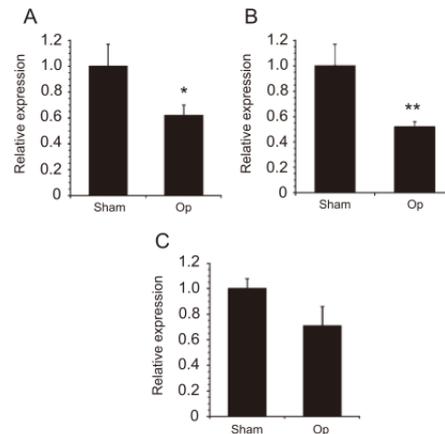


図 6 miR-21 のターゲット遺伝子として予想された PDCD4 (A)、PTEN (B)、SPRY2 (C) の発現量がそれぞれ疑似手術群より低下していることが確認された。

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 2 件)

- ① Masanao Machida, Kohei Takeda, Hiroyuki Yokono, Sachiko Ikemune, Yuka

Taniguchi, Hidenori Kiyosawa, and Tohru Takemasa: Reduction of ribosome biogenesis with activation of the mTOR pathway in denervated atrophic muscle. *J Cell Physiol.*, 227: 1569-1576, 2012 (査読有)

- ② Tohru Takemasa, Yousuke Abe, Chiaki Kumagai, Hidenori Kiyosawa: Possible involvement of microRNA-21 in skeletal muscle hypertrophy. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, 18: 5-15, 2012 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 福田麦穂, 武政徹: シトルリン摂取による廃用性筋萎縮の抑制効果の検討. **第157回日本体力医学会関東地方会**, 東京, 2013. 3.30
- ② Shin Fujimaki, Masanao Machida, Kohei Takeda, Tohru Takemasa: High-Frequency Acupuncture Represses the Atrophy of Fast-Fiber Rich Skeletal Muscle. 59th Annual Meeting of American College of Sports Medicine in San Francisco, California, USA, 2012.6.1
- ③ 町田正直, 武田紘平, 横野裕行, 武政徹: 筋萎縮時におけるリボソームRNAの合成とmTOR経路の変化. **2012年生体運動研究合同班会議**, 茨城, 2012.1.6
- ④ 藤巻慎, 町田正直, 武田紘平, 武政徹: 除神経モデルを用いた鍼通電刺激の筋萎縮抑制効果の検討. **第66回日本体力医学会大会**, 山口, 2011.9.17
- ⑤ 町田正直, 武田紘平, 横野裕行, 池宗佐知子, 北岡祐, 大野秀樹, 武政徹: 筋萎縮時におけるリボソームRNA合成低下を引き起こす因子の検討. **第66回日本体力医学会大会**, 山口, 2011.9.17

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武政 徹 (TAKEMASA TOHRU)

筑波大学・体育系・教授

研究者番号: 50236501