

氏名	つかもと よしゆき 塚本善之
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	甲第43号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Arpp, a new homolog of Carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation (Carp の新規ホモログ Arpp は1型筋線維に優位に発現し、除神経により著しく誘導される)
学位論文審査委員	(主査) 林 眞一 (副査) 井藤久雄 佐藤建三

学位論文の内容の要旨

これまでにヒトの骨格筋及び心筋で高く発現する新規遺伝子として *Arpp* (a protein that has Ankyrin Repeats, PEST motif, and Proline-rich region) が単離された。この ARPP 蛋白質は 333 アミノ酸からなり、中央に 4 つのアンキリンリピートを持つ。ARPP は心肥大で誘導される蛋白質 CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein) と類似したドメイン構造を持つことから、これら 2 つの蛋白質は類似した機能を持つことが予想された。CARP は心筋で発現が高く、骨格筋ではほとんど発現していない。また、マウスを用いた心肥大のモデル実験で発現誘導が確認されたため、CARP は心肥大のマーカーとして提唱されている。

本研究では新規に単離された ARPP 蛋白質の機能を明らかにするため、マウスでのモデル実験により詳細な発現解析を行った。

材料と方法

マウス骨格筋 cDNA ライブラリーの作製及びスクリーニング：マウス骨格筋 mRNA よりラムダ ZAP cDNA Cloning kit を用いて cDNA ライブラリーを作製し、ヒト ARPP cDNA をプローブとし、マウス ARPP cDNA を単離した。

マウスゲノムライブラリーのスクリーニング：ヒト ARPP cDNA をプローブとし、ストラタジーン社のマウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、マウス *Arpp* 遺伝子を単離した。

組織化学染色(NADH-TR)：1型筋線維を決定するため、組織化学的に筋線維の NADH-TR 活性を調べた。風乾したマウス骨格筋の凍結切片を NBT(ニトロブルーテトラゾリウム)と β NADH(ニ

コチンアミドアデニンジヌクレオチド)と反応後、アセトンで脱染し、封入した。

除神経モデル：C57BL/6 系統のマウスの左脚坐骨神経を切断するとその支配筋である左脚下腿屈筋が除神経された状態になり、萎縮する。除神経されていない右脚下腿屈筋を対照標準とし、術後、1、2、3、4 週間に左右の下腿屈筋を切除し、蛋白質を抽出してウェスタンブロット解析を行った。あるいはホルマリン固定後、免疫組織化学に供した。

結 果

完全長のマウス ARPP cDNA 及びマウス *Arpp* 遺伝子を単離し、配列を決定した。抗 ARPP 抗体を用いたウェスタンブロット解析によりマウスにおける ARPP 蛋白質の発現分布を調べたところ、ヒトとは異なり骨格筋でのみ高い発現が確認され、心筋を含めたその他の臓器ではほとんど発現が確認されなかった。骨格筋における ARPP 蛋白質の発現分布を免疫組織化学により調べたところ、ARPP 陽性筋線維と陰性筋線維が混在していることがわかった。ARPP 陽性筋線維がどのような性質を持つのか調べるため、骨格筋の連続横断切片を作製し、抗 ARPP 抗体を用いた免疫組織化学と各筋線維の NADH-TR 活性を調べた。その結果、ARPP は NADH-TR 活性の高い 1 型筋線維で発現が高いことがわかった。また、ARPP の筋線維内での局在を免疫電子顕微鏡で調べたところ、ARPP は筋線維内においてサルコメアの I 帯に局在することがわかった。

除神経された骨格筋で筋の形態形成に重要ないくつかの遺伝子の発現が亢進することが知られている。そこで ARPP も除神経された骨格筋で発現が誘導されるか否か調べた。その結果、除神経後 1 週間で ARPP の発現誘導が確認され、その発現量は CARP が一過性であるのに対し、ARPP は少なくとも 4 週間は維持されることがわかった。また、免疫組織化学的に除神経された骨格筋を解析したところ、正常では ARPP 陰性筋線維の優位なヒフク筋で陽性筋線維の割合が高くなっていることがわかった。このことから、除神経により ARPP 陰性筋線維だったものが、陽性化したことが考えられた。

考 察

今回単離したマウス *Arpp* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列はヒトと 88.9% の相同性があり、構造もよく一致していることから、機能的にも保存されていると考えられる。この蛋白質は骨格筋の 1 型筋線維で発現が高いことから、1 型筋線維特異的な機能を持つことが示唆された。また ARPP が I 帯に局在し、核にも局在することは、心筋における CARP と類似し、筋線維の構造維持に関わっていることが示唆された。除神経後の骨格筋における ARPP の発現上昇は ARPP が萎縮骨格筋で形態維持に関わる機能を持っている可能性を示した。

結 論

本研究で単離された新規 ARPP 蛋白質は CARP と同様に筋線維の維持や萎縮骨格筋の形態維持に関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は心筋特異的アンキリンリピートタンパク質 CARP の新規ホモログである ARPP の機能を明らかにするため、マウスにおける ARPP の発現を CARP と比較検討したものである。その結果、ARPP は CARP と類似した構造を持っているだけでなく、細胞内局在も一致しており、よく似た機能を持つことが推測された。また、除神経後の骨格筋で共に発現が誘導されることを発見した。しかし、CARP は心筋特異的に発現するが、ARPP は骨格筋の 1 型筋線維特異的に発現していた。以上の知見は、ARPP が骨格筋の 1 型筋線維や除神経後の萎縮骨格筋において、筋の形態維持に関与していることを示唆している。本論文の内容は筋の形態維持機構を解明する手がかりになると考えられ、明らかに学術水準を高めたものと認められる。