
骨格筋のタンパク質代謝における atrogin-1 の役割

神戸大学大学院農学研究科・助教 實安 隆興

■ 目的

Atrogin-1 は筋特異的ユビキチンリガーゼであり、筋タンパク質分解の中心的役割を担っている。最近、ゼブラフィッシュの胚や、心筋特異的に atrogin-1 をノックアウトしたマウスを用いた研究により、atrogin-1 がオートファジー・リソソーム系にも関与していることが報告されている。本研究では、哺乳類や鳥類の骨格筋細胞のオートファジー・リソソーム系における atrogin-1 の役割を明らかにする目的で、C2C12 筋管細胞、及びニワトリ筋管細胞を用いて、siRNA による atrogin-1 のノックダウンがオートファジー・リソソーム系のマーカーとして用いられる LC3-II タンパク質量に及ぼす影響を調べた。

■ 方法

定法にしたがって C2C12 筋管細胞、及びニワトリ胚由来の筋管細胞を形成させて実験に用いた。C2C12 筋管細胞には市販の atrogin-1 siRNA(ホライゾン・ディスカバリー株式会社)を、ニワトリ筋管細胞には siDESIGN Center(ホライゾン・ディスカバリー株式会社)で設計した siRNA を用いた。また、コントロールとして、ON-TARGET plus non-targeting siRNA #1(ホライゾン・ディスカバリー株式会社)を用いた。筋管細胞を、siRNA を添加して培地で 2 日間培養後、siRNA を含まない培地でさらに 1 日培養し、細胞中の総 RNA、及びタンパク質を抽出した。栄養飢餓を誘導する場合、タンパク質を回収する前に培地を PBS に交換して 8 時間培養した。抽出した総 RNA、及びタンパク質を用いて、atrogin-1 の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により、atrogin-1 及び LC3-II のタンパク質量をウェスタンブロット法により解析した。

■ 結果および考察

C2C12 筋管細胞において、siRNA により atrogin-1 のタンパク質量は有意に減少した。ニワトリ筋管細胞においては、atrogin-1 mRNA 量は有意に減少したが、タンパク質量に有意な差は認められなかった。そのため、以降の実験は C2C12 筋管細胞においてのみ行った。

栄養飢餓条件下の C2C12 筋管細胞において、LC3-II のタンパク質量は siRNA により減少傾向を示した。したがって、C2C12 筋管細胞において、atrogin-1 はオートファジー・リソソーム系に影響を及ぼす可能性が示唆された。

■ 結語

哺乳類の骨格筋の細胞においても、atrogin-1 はユビキチン・プロテアソーム系だけでなく、オートファジー・リソソーム系のタンパク質分解にも関与している可能性がある。