

微小重力による筋萎縮関連遺伝子Cbl-bの発現と その大豆ペプチド群による抑制の試み

二川 健*・中尾玲子・上西千晶・平坂勝也・岸 恭一

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Unloading-mediated Expression of a Muscle Atrophy-related Gene, Cbl-b and Its Regulation by Soy-protein-derived Peptides

Takeshi NIKAWA, Reiko NAKAO, Chiaki UENISHI, Katsuya HIRASAKA and Kyoichi KISHI

Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

The ubiquitin-proteasome pathway is a primary regulator of muscle protein turnover, providing a mechanism for selective degradation of regulatory and structural proteins. This pathway is constitutively active in muscle fibers and mediates both intracellular signaling events and normal muscle protein turnover. However, conditions of decreased muscle use, so called unloading, remarkably stimulate activity of this pathway, resulting in loss of muscle protein. In fact, we previously reported that expression of several ubiquitin ligase genes, such as MuRF-1, Cbl-b, and Siah-1A, which are rate-limiting enzymes of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, are significantly up-regulated in rat skeletal muscle during spaceflight. Moreover, we found that Cbl-b-mediated ubiquitination and degradation of IRS-1, an important intermediate of IGF-1 signal transduction, contributes to muscle atrophy during unloading. Therefore, we hypothesized that inhibition of Cbl-b-mediated ubiquitination and degradation of IRS-1 leads to prevention of muscle atrophy during unloading. In this study, we aimed to evaluate oligopeptide as an inhibitor against ubiquitination of IRS-1 by Cbl-b. We synthesized various oligopeptides that may competitively inhibit the binding of Cbl-b to IRS-1 on the basis of their structures and screened inhibitory effects of these synthesized oligopeptides on Cbl-b-mediated ubiquitination of IRS-1 using *in vitro* ubiquitination systems. We found that two synthetic oligopeptides with specific amino acid sequences effectively inhibited interaction with Cbl-b and IRS-1, resulting in decreased ubiquitination and degradation of IRS-1 (Patent pending). In contrast, we also found inhibitory activity

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

against Cbl-b-mediated ubiquitination of IRS-1 in soy protein-derived oligopeptides, whereas its inhibitory effect was weaker than those of synthetic oligopeptides. Our results suggest that specific oligopeptides may be available as a functional food against the muscle atrophy, especially through downregulation of the Cbl-b-mediated IRS-1 degradation. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 96-104, 2007.

Key words: muscle atrophy, ubiquitin ligase inhibitor, soy-derived peptides

寝たきり患者や宇宙飛行士にとって、Unloadingによる骨格筋の萎縮は深刻な問題であり、そのメカニズムの解明と治療法の開発が急務である。一般的に筋萎縮はたん白質合成と分解のインバランスにより起こると考えられている¹⁻⁵⁾。私達は、骨格筋における3つの主要な分解系（ユビキチン-プロテアソーム系、カルシウム-カルパイン系、リソソーム系）の中でも、ユビキチン-プロテアソーム依存性筋たん白質分解経路が、Unloadingによる筋萎縮で重要な働きをしているということを示してきた⁶⁾。

ユビキチン-プロテアソーム依存性たん白質分解経路は、分子量8,600のペプチドであるユビキチンがユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) を介し、基質分子に結合すること（ポリユビキチン化）から開始される⁷⁻¹⁰⁾。このシステムの律速酵素であるユビキチンリガーゼ群の中で、私達の研究グループはCbl-bが廃用性筋萎縮の原因因子の1つであることを明らかにした（論文投稿中）。Cbl-bは、中央にユビキチンリガーゼとしての機能特徴づけるRINGフィンガードメインを、N末端にリン酸化したチロシンとの結合ドメインを有し、受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達を負に調節する働きを持つことが知られている。Unloading環境に曝露した骨格筋では、このCbl-bの発現が上昇し、骨格筋の増殖分化を司るIGF-1のシグナル分子IRS-1の分解を亢進した。その結果、骨格筋細胞はIGF-1に抵抗性を示し、Unloadingによる筋萎縮が誘導された。

以上のように、Cbl-bの筋萎縮原因遺伝子としての機能が解明される一方、その発現調節機構については未だ不明のままである。どのようにUnloadingストレスがCbl-b遺伝子の発現を上昇させるのかを解明し、その発現や活性を抑制することは、骨格筋のUnloadingによる筋萎縮のメカニズムを解明するだけでなく、その治療法の開発に通じる。

方 法

活性酸素種の検出

ラット横紋筋芽細胞L6細胞を37℃、5%CO₂の条件

下で、増殖培地 [10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] を用いて24時間培養した。培地をHanks' Balanced Salt Solution (4 mM NaHCO₃, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.3 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂; HBSS) に換え、10 μ Mの酸化ストレス検出薬5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂ DCFDA) mixed isomers (Molecular Probes)と等量のDCFDA排出阻害剤Pluronic® F-127 (Invitrogen) を添加し、37℃、20分間反応した。培地をHBSSに換え3D-clinorotation（後述）刺激後、蛍光顕微鏡で観察した。5 mM N-Acetyl-L-cysteine (NAC) はcarboxy-H₂ DCFDAと同時に添加しHBSS交換時に新たなものに交換した。

プラスミド作成とルシフェラーゼアッセイ

ヒトゲノムライブラリよりプライマー；5'-CACCACCCTGGTTGTCCACAGG-3'と5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA-3'を用いてCbl-b遺伝子の上流-2,072 bpから+249 bpをpGL3-Basic Vector (Promega)に組み込みプラスミドを作成した。同様に5'-CACCGAGCTCGGCATTGGCTCA-3'と5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA-3'を用いて上流-111 bpから+249 bpまでのcDNAを、5'-CACCGGTACCCCTGGGTCCCTGT-3'と5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA-3'を用いて上流-59 bpから+249 bpまでのcDNAを合成し、プラスミドにsubclone化した。制限酵素Sma I /Xho I フラグメント（-292 bpから+249 bpまでのcDNA）と、Mlu I /Xho I フラグメント（+217 bpから+249 bpまでのcDNA）をそれぞれpGL3-Basic Vectorに組み込んだ。

アカゲザル腎細胞COS7細胞を37℃、5%CO₂の条件下で、100 μ g/mLストレプトマイシン、100 IU/mLペニシリンGを含む増殖培地を用いて24時間培養した。無血清の増殖培地に替え、FuGENE6 (Roche) を用いて上述のベクターをトランスフェクションした。4時間後、10 μ M過酸化水素下で24時間培養し、lysis buffer (Promega) 200 μ Lで細胞を回収した。細胞破碎後、4℃、12,000 g、2分間の条件で遠心した上清

10 μ LとLuciferase Assay Reagent (Promega) 20 μ Lを混合し、ルミノメーターで測定した。

ゲルシフトアッセイ

COS7細胞を10 μ M H₂O₂またはPBSで3時間処理し、130 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 0.5 mM DTTを含む10 mM Tris-HCl (washing buffer) で細胞を回収した。遠心後、5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTTを含む20 mM HEPES-KOH (hypotonic buffer) で細胞を破碎した。さらに、遠心後の沈殿物を500 mM NaOH, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA-NaOH, 25% Glycerol, 0.5 mM DTTを含む20 mM HEPES-KOH (extraction buffer) で4℃, 1時間攪拌した。遠心後、上清を0.5 mM EDTA-NaOH, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 0.5 mM DTTを含む20 mM HEPES-KOH (binding buffer) で透析し、核たん白抽出液とした。75 pmolの合成oligo nucleotideをT4 kinase (NIPPON GENE) を用いて γ -[³²P]ATP (Amersham biosciences) で標識し、Probeを作成した。核たん白抽出液とそれぞれのProbeをbinding solution (5 mM MgCl₂, 2.5% Glycerol, 1 mg BSA, 1% NP-40, 50 mM KCl) 中で30分混和し、6%アクリルアミドゲルで140 V, 1.5時間泳動した。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィで解析を行った。

3D-clinorotation (三次元培養法)

L6細胞を37℃, 5%CO₂の条件下で、100 μ g/mLストレプトマイシン, 100 IU/mLペニシリンGを含む増殖培地を用いて、ほぼ100%コンフルエントまで静置培養した。ウェル内を培地で満たし密閉後、小型クリノスタットPMS-VIの試料台に固定した。X軸11.0 rpm, Y軸13.0 rpmの条件で回転培養した。コントロールとして、他の条件はそのまま静置培養したものを用いた。一部の実験では10 μ Mのmitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路阻害剤 (Calbiochem) を1時間前処理した。

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

総RNAに終濃度1 μ M oligo-dT primer, 10 μ M random primer, 0.5 mM dNTPs (Promega), 100 U M-MLV reverse transcriptase (Promega) を加え42℃, 60分間, 95℃, 5分間逆転写反応を行い、cDNAを合成した。合成したcDNAにPower SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) とプライマーを加え、PCR反応を行った。用いたプライマー配列をTable 1に示す。内部標準としてglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。PCR反応は、まず50℃, 2分間プレヒートし、95℃, 10分

間でタックポリメラーゼを活性化させた。その後、95℃, 15秒間の熱変性, 60℃, 1分間のプライマーとの結合, cDNA伸長反応を40サイクル繰り返した。

ウェスタンブロット法

たん白質 (30 μ g) をSDS化後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のたん白質をセミドライブロットティング装置 (ATTO) を用いてPolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写後、PVDF膜を4%精製ミルクカゼインで1時間ブロッキングし、0.05%, Tween-20を含むPBS (PBS-T) で洗浄した。次に、膜を一次抗体 [抗Egr抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗Cbl-b抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗MAPK抗体 (Cell Signaling)] と37℃で1時間反応させた。洗浄後、さらに二次抗体 [抗ウサギ IgG抗体 (Amersham), または抗マウス IgG抗体 (Amersham)] と37℃で1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence検出システム (Amersham) を用いて抗体と反応したたん白質を検出した。

RNA干渉法による遺伝子のノックダウン

L6細胞を37℃, 5%CO₂の条件下で、増殖培地を用いて24時間培養した。培地をOpti-MEM (GIBCO) に換え、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて100 nMの合成Egr-1, Egr-2, Egr-3 siRNA (B-Bridge International, Inc., Table 2に示す) をトランスフェクションした。72時間後、Fig. 7に示した時間3D-clinorotation培養した。その後グアニジンイソチアシン酸-フェノール-クロロホルム混合溶液 (ニッポンジーン) により総mRNAを抽出した。

無細胞系ユビキチネーションアッセイ

ユビキチン化反応には、精製したCbl-b, IRS-1, および0.5 mg/mL E1, 1.8 mg/mL UbcH7 (E2), 8.0 mg/mL GST-Ubを含むbuffer II (0.5 M NaPB, 0.1 M Mg-ATP, ERS, 50 mg/mL Ubc-CHO, PPIS-II, 50 mM peptide) を用いた。これらを全て混合し、37℃で4時間反応させた。反応産物はSDS-PAGEゲルで分離し、続けて抗IRS-1抗体によるウェスタンブロットに供した。

結 果

酸化ストレスによるCbl-b発現の誘導

酸化ストレスによるCbl-b mRNAの発現量を検討した。L6筋芽細胞において、100 μ Mと250 μ MのH₂O₂処理をしたところ、それぞれ6時間と12時間をピークとするCbl-b mRNAの増大を確認した (Fig. 1)。

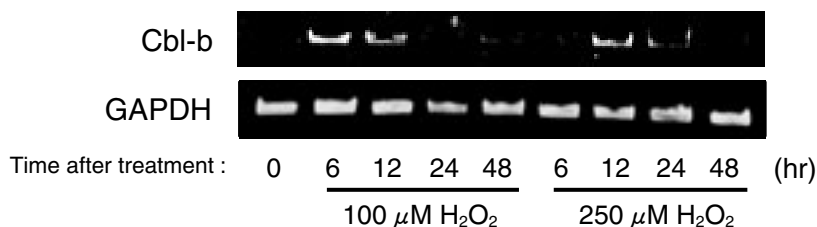


Fig. 1. Oxidative stress-mediated expression of Cbl-b. L6 myoblastic cells were treated with hydrogen peroxide for the indicated times. Amounts of Cbl-b and GAPDH transcripts were measured by semi-quantitative RT-PCR.

模擬微小重力 (3D-clinorotation) による酸化ストレスの誘導

酸化ストレス感知試薬 (carboxy- H_2 DCFDA) を前処理したL6筋芽細胞を3D-clinorotationに曝露させ、細胞内の蛍光強度を観察した。コントロール (Vehicle処理) では蛍光を発する細胞は見られなかった (Dataを示さず)。一方、3D-clinorotationに供したL6細胞は、 H_2O_2 処理した細胞と同程度の酸化ストレスの蓄積が観察された。N-Acetyl-L-cysteineの前処理によりこの蛍光は消失した。

ヒトCbl-bプロモーター解析

ヒトCbl-b遺伝子の酸化ストレス応答領域をルシフェラーゼアッセイにより解析した。Cbl-b遺伝子の上流-2,072 bpを含むルシフェラーゼベクターは、 H_2O_2 処理にตอบสนองしてルシフェラーゼ活性を増加させた (Dataを示さず)。上流-292 bpおよび-111 bpを含むルシフェラーゼベクターも同様に H_2O_2 にตอบสนองしたが、上流-59 bpおよび+217 bpを含むルシフェラーゼベクターは、 H_2O_2 にตอบสนองしなかった。この知見により、Cbl-b上流遺伝子の酸化ストレス応答領域は上流-111 bpから-60 bpに存在することがわかった。

そこでこの領域を3つのプロンプに分け、ゲルシフトアッセイを行った。 H_2O_2 処理後のL6細胞の核抽出たん白質に、Probe 1およびProbe 2に結合するものはなかったが、Egr-1やSp1のコンセンサス配列を有するProbe 3は H_2O_2 に反応する核たん白質の結合をとらえることができた。

UnloadingストレスによるEgrおよびCbl-bの発現

L6筋芽細胞の3D-clinorotationによるEgrおよびCbl-b mRNAの発現パターンを検討した。興味深いことに、3D-clinorotation後1.5時間でEgrの発現量がピークに達し、そのさらに1.5時間後にCbl-b mRNAの発現量が増大した (Fig. 2A)。これらの3D-clinorotationによる誘導はたん白質レベルでも確認できた (Fig. 2B)。

Egr遺伝子ノックダウンによるCbl-b mRNA発現への影響

Unloadingストレスにより活性化するEgr群のうち、どのEgrが最も重要な働きをしているのかを検討するため、Egr-1, Egr-2, Egr-3のsiRNAを用いてCbl-b mRNA発現に対する影響を解析した。まず初めに、それぞれのsiRNAの特異性を確認した。それぞれのsiRNAは標的遺伝子の発現量を特異的に約30%まで抑制した (Fig. 3A, B and C)。しかしながら、Egr-1, Egr-2, Egr-3それぞれのsiRNA処理では3D-clinorotationによるCbl-b mRNAの発現上昇を抑制できなかった。次に、すべてのsiRNAを同時に処理するとCbl-b mRNAの発現上昇が著明に抑制された (Fig. 3D)。以上の結果から、Egr-1, Egr-2, Egr-3はUnloadingストレスによるCbl-b発現の主要な転写調節因子であり、それぞれは互いに代償できることが示唆された。

大豆ペプチドによるEgr発現の抑制

Cbl-bの主要な転写調節因子であるEgrへの大豆ペプチドの効果を解析した。グリシニン由来の大豆ペプチド群がclinorotationによるEgr-1とEgr-3の発現上昇を有意に抑制した (Dataを示さず)。Egr-2の発現にはほとんど効果がなかった。

IRS-1のユビキチン化に対する大豆たん白質由来ペプチドの効果

大豆たん白質は、pHを変化させることでグリシニン (11S)、 β -コングリシニン (7S)、リボプロテインの3分画を得ることができる。各分画由来のペプチド、およびこれらの混合物である全大豆たん白質由来のペプチド (SPI: soy protein isolate) を用いて、Cell-freeユビキチネーションアッセイを行った (Fig. 4)。図に示すように、11S画分を添加した場合、IRS-1のユビキチン化は著しく抑制された (Lane 6)。しかしSPI, LPを添加してもIRS-1のユビキチン化はほとんど抑制されなかった (lanes 3, 4)。

培養細胞における、ペプチド群のIRS-1ユビキチン化阻害効果

COS7細胞にCbl-b, IRS-1, ユビキチンを強発現すると, IRS-1のユビキチン化が起こる (Fig. 5, upper panel). このメディウム中に, Cell-free系ユビキチネーションアッセイでCbl-b阻害活性が確認された大豆たん白質由来11S画分を添加し, その効果を比較した. どちらのペプチドもIRS-1のユビキチン化を抑制した (Fig. 5). また, 抗IRS-1抗体で免疫沈降を行った

(Fig. 5, middle panel). ペプチドを添加するとIRS-1とCbl-bの結合も弱くなっており, ペプチド群のユビキチンリガーゼ阻害効果を確認できた.

考 察

微小重力環境に長期間滞在すると, 骨格筋は萎縮することが知られているが, これは骨格筋が微小重力という環境に, 遺伝子変動を介して適合した結果である.

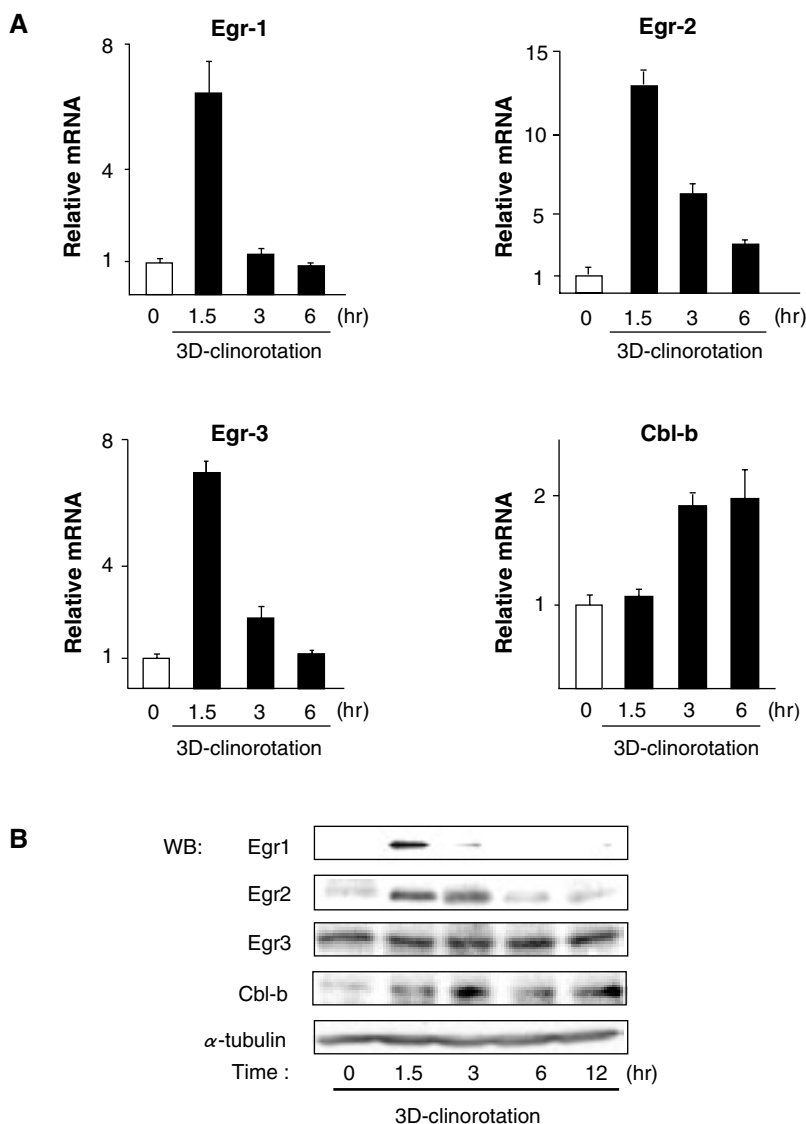


Fig. 2. Increase in Egrs and Cbl-b expression caused by 3D-clinorotation. A: Amounts of Egrs, Cbl-b and GAPDH transcripts were measured by real-time RT-PCR. The amount of an interest gene was shown as its ratio to the amount of GAPDH (n=3 per group). B: Western blotting. Proteins (30 mg/lane) were subjected to SDS-PAGE.

この遺伝子発現の変動をDNAマイクロアレイによって網羅的に解析したデータから、細胞骨格関連遺伝子の顕著な発現減少、ミトコンドリア遺伝子のインバランスな発現、そしてユビキチンプロテアソーム関連遺伝子の発現上昇がみられた¹¹⁾。その結果をもとに、Unloading環境に曝露した骨格筋には酸化ストレスが蓄積しているのではないかと考えられている。実際、微小重力に曝された骨格筋では、酸化ストレス応答性の遺伝子である Hypoxia-inducible factor 1 β と Metallothionein-I 発現量の上昇がある¹¹⁾。また、尾部懸垂やギプス固定で萎縮した骨格筋において、過酸化脂質分解産物 (thiobarbituric acid-reactive substance,

TBARS) と酸化型グルタチオン (GSSG) の増加や還元型グルタチオン (GSH) の減少がみられる^{12, 13)}。Kondoらは、ミトコンドリアから漏出した鉄イオンがミクロソームで活性酸素を生じることを報告している¹⁴⁾。そこで本研究では、Unloadingによるユビキチンリガーゼの発現への酸化ストレスの関与を検討した。

微小重力モデルである3D-clinorotationによりH₂O₂処理と同程度の酸化ストレスがL6筋芽細胞内に蓄積することを証明した。さらに、酸化ストレス (H₂O₂) 自身もCbl-bの発現を誘導することがわかった。そこで、酸化ストレスを介したUnloadingによるユビキチンリガーゼの発現調節機序を分子レベルで明らかにするた

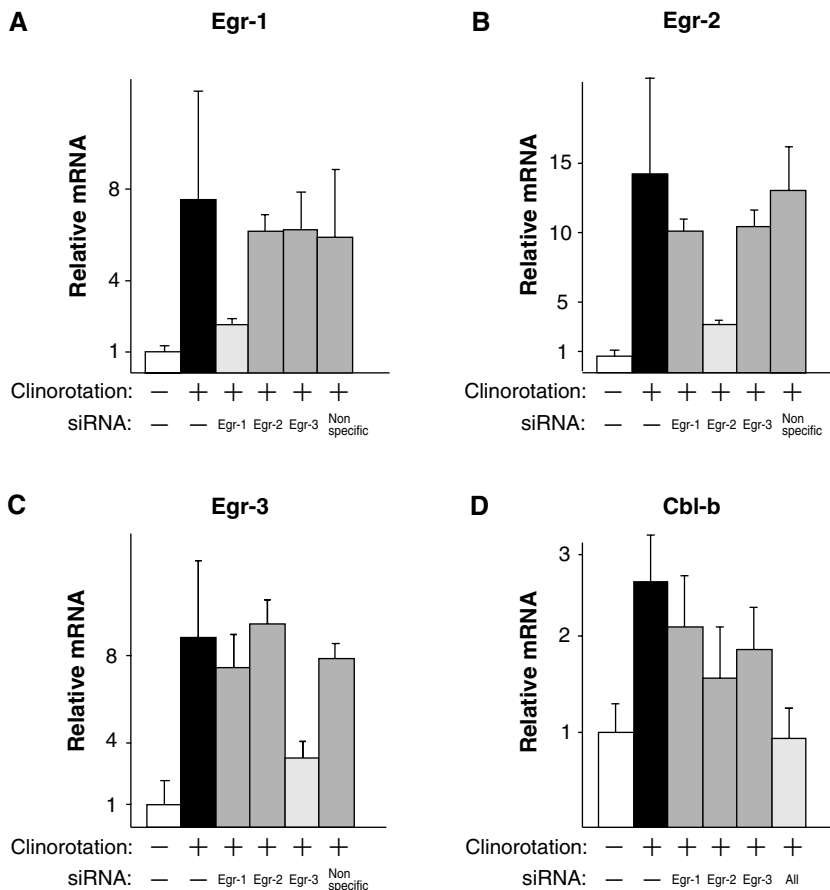


Fig. 3. Effect of Egr siRNA on Cbl-b expression. A, B, C: Egr knock-down. L6 cells were pretreated with 100 nM Egr-1, Egr-2, or Egr-3 siRNA for 72 hr. Then, they were subjected to 3D-clinorotation for 1.5 hr. Amounts of Egrs and GAPDH transcripts were measured by real-time RT-PCR. The amount of an interest gene was shown as its ratio to the amount of GAPDH (n=3 per group). D: Effect of Egr knock-down on Cbl-b expression. L6 cells were pretreated with 100 nM Egr-1, Egr-2, or Egr-3 siRNA for 72 hr. Then, they were subjected to 3D-clinorotation for 3 hr. Amounts of Cbl-b and GAPDH transcripts were measured by real-time RT-PCR. The amount of Cbl-b gene was shown as its ratio to the amount of GAPDH (n=3 per group). Non specific; negative control siRNA, All; all treatment with Egr-1, Egr-2, Egr-3 siRNA.

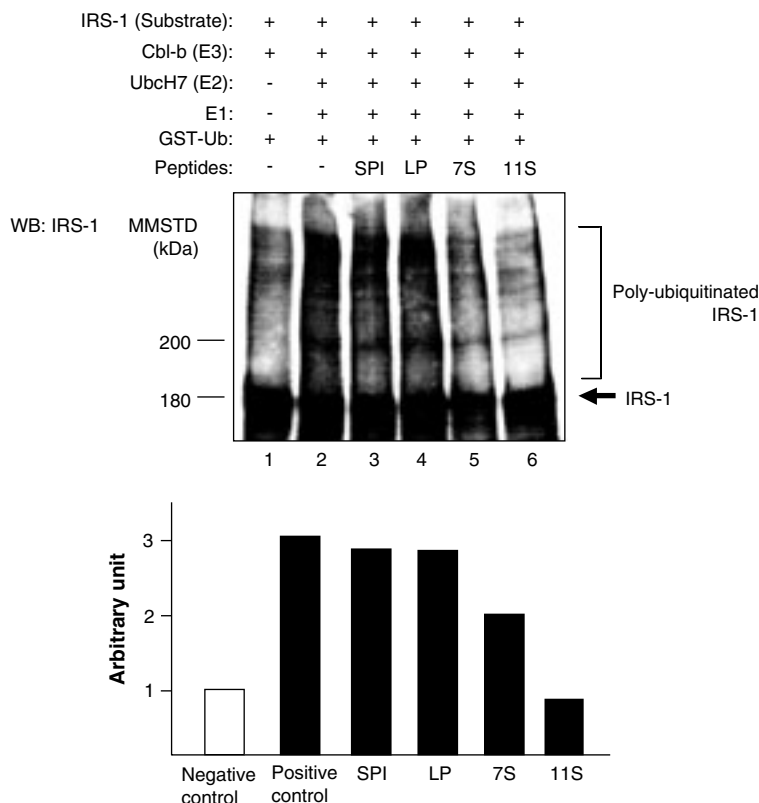


Fig. 4. Effects of soy-protein derived peptides on IRS-1 ubiquitination in cell-free ubiquitination system.

め、ヒトCbl-b遺伝子のプロモーター解析を行った。そして、ヒトCbl-b遺伝子の転写開始点から上流-70 bp付近に酸化ストレス応答領域が存在することを明らかにした。さらに、その酸化ストレス応答領域には転写調節因子Egr-1, Egr-2, Egr-3が結合することから、これらEgr群がUnloadingストレスの重要な感知分子の一つであることが示唆された。EgrはZnフィンガードメインを有し¹⁵⁾、増殖刺激だけでなく分化刺激や細胞死を誘導する刺激など、さまざまな刺激で誘導される初期応答遺伝子である¹⁶⁻¹⁹⁾。Egr-2またはEgr-3遺伝子欠損マウスのT細胞において、Cbl-bの発現が抑制されるという興味深い報告も私達の仮説を支持する²⁰⁾。

大豆たん白質由来ペプチドのグリシニン画分が、Egrの発現を抑制すると共にIRS-1のユビキチン化を著明に阻害することを見出した。この後者の特性は現在特許出願中である（特許出願番号 2006-185089）。しかしながら、グリシニン由来ペプチドは様々なペプチドの混合物であるので、その発現抑制効果やユビキチン化阻害効果は弱い。グリシニン画分の有効成分の同定が急務である。

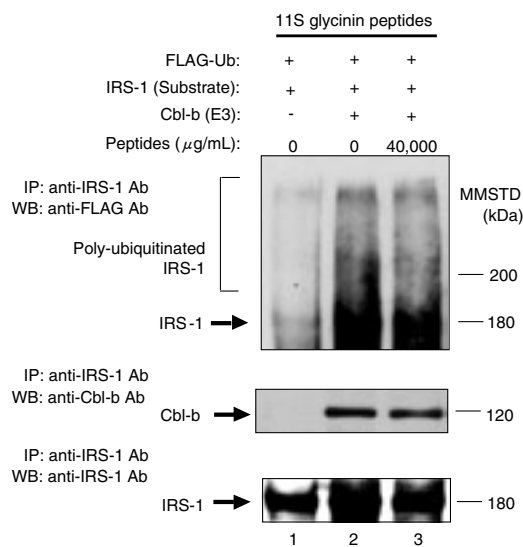


Fig. 5. Inhibitory effects of peptides on IRS-1 ubiquitination in COS7 cells.

要 約

これまでの研究で、我々はユビキチンリガーゼCbl-bが寝たきりによる筋萎縮の原因遺伝子の一つであることを明らかにしてきた。そこで、この筋萎縮原因遺伝子Cbl-bのUnloadingストレスによる発現調節機構を明らかにしそれを抑制すれば、Unloadingによる筋萎縮が抑制できるのではないかと考えた。まず、宇宙フライトラットの骨格筋におけるCbl-b mRNAの発現上昇と酸化ストレスの蓄積を見出した。この酸化ストレスは、模擬微小重力環境モデルである3D-clinorotationに曝露した細胞内にも生じていることを確認した。次に、ルシフェラーゼアッセイとゲルシフトアッセイを用いてCbl-b遺伝子上流に存在する酸化ストレス応答領域を解析した。その結果、Cbl-b上流-111 bpから-60 bpの位置に酸化ストレス応答領域が存在し、その応答領域に結合する転写調節因子Egrを同定した。さらに、3D-clinorotationとH₂O₂処理に対するEgrとCbl-b遺伝子の発現パターンはよく似ており、ストレス後約1.5時間でEgr mRNAの発現が亢進し、その1.5時間後にCbl-b mRNAの発現量が増大した。次に、RNA干渉技術を用いてどのEgrがCbl-bの発現に最も重要な働きをしているのかを確認した。Egr-1, Egr-2, Egr-3それぞれのsiRNA処理では3D-clinorotationによるCbl-b mRNAの発現はほとんど変化しなかった。しかしながら、すべてのsiRNAを同時に処理するとCbl-b mRNAの発現上昇が著明に抑制された。このことから、EgrはUnloadingストレス（あるいは酸化ストレス）によるCbl-b発現の主要な転写調節因子であり、それぞれは互いに代償できることが示唆された。最後に、昨年に引き続きCbl-bのユビキチン化活性と今回の3D-clinorotationによる転写調節因子EgrとCbl-bの発現上昇が種々の大豆ペプチド群により抑制されるかどうかを試みた。大豆ペプチド群はCbl-bのユビキチン化活性を抑制するものの、その発現にはほとんど影響を与えなかった。ユビキチン化抑制実験では、高分子の大豆ペプチドを含むフラクションBに阻害活性が高かった。

文 献

- 1) Ilyina-Kakueva EI, Portugalov VV and Krivenkova NP (1976): Space flight effects on the skeletal muscles of rat. *Aviat Space Environ Med*, **47**, 700-703.
- 2) Goldspink DF, Morton AJ and Loughna P, et al (1986): The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and growth of four skeletal muscles of the rat. *Pluget Arch*, **407**, 333-340.
- 3) Thomason DB, Biggs RB and Booth FW (1989): Protein metabolism and β -myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol*, **257**, R300-R305.
- 4) Tischler ME, Rosenberg S and Satarug S, et al (1990): Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*, **39**, 756-763.
- 5) Musacchia XJ, Steffen JM and Fell RD, et al (1992): Skeletal muscle atrophy in response to 14 days of weightlessness: vastus medialis. *J Appl physiol*, **73**, 44S-50S.
- 6) Ikemoto M, Nikawa T and Takeda S, et al (2001): Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*, **15**, 1279-1281.
- 7) Hershko A, Ciechanover A and Heller H, et al (1980): Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**, 1783-1786.
- 8) Hershko A and Heller H (1985): Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. *Biochem Biophys Res Commun*, **128**, 1079-1086.
- 9) Baker RT and Varshavsky A (1991): Inhibition of the N-end rule pathway in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 1090-1094.
- 10) Kwon YT, Levy F and Varshavsky A (1999): Bivalent inhibitor of the N-end rule pathway. *J Biol Chem*, **274**, 18135-18139.
- 11) Nikawa T, Ishidoh K and Hirasaka K, et al (2004):

- Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18**, 522-524.
- 12) Kondo H, Miura M and Nakagaki I, et al (1992): Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, **262**, E583-E590.
 - 13) Ikemoto M, Nikawa T and Kano M, et al (2002): Cysteine supplementation prevents unweighting-induced ubiquitination in association with redox regulation in rat skeletal muscle. *Biol Chem*, **383**, 715-721.
 - 14) Kondo H, Miura M and Nakagaki I, et al (1992): Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **262**, 583-590.
 - 15) Rauscher FJ 3rd (1993): The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J*, **7**, 896-903.
 - 16) Shamim A, Pelzer T and Grohe C, et al (1999): Induction of Egr-1 mRNA and protein by endothelin 1, angiotensin II and norepinephrine in neonatal cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem*, **195**, 11-17.
 - 17) Keeton AB, Bortoff KD and Bennett WL, et al (2003): Insulin-regulated expression of Egr-1 and Krox20: dependence on ERK1/2 and interaction with p38 and PI3-kinase pathways. *Endocrinology*, **144**, 5402-5410.
 - 18) Jones N and Agani FH (2003): Hyperoxia induces Egr-1 expression through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J Cell Physiol*, **196**, 326-333.
 - 19) Pawlinski R, Pedersen B, Kehrle B, et al (2003): Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood*, **101**, 3940-3947.
 - 20) Safford M, Collins S and Lutz MA, et al (2005): Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol*, **6**, 472-480.