

DMEM containing 10% horse serum/0.5% chick embryo extract at 37°C and 5% CO₂ for up to 72 hr, and then fixed as described previously.

Lysenin Probing and Immunostaining

To label sphingomyelin with lysenin (Sekizawa et al. 1997; Yamaji et al. 1998), cultured cells or myofibers were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS for 10 min, blocked with 2% BSA/PBS, and then incubated with 0.5 µg/ml lysenin (Peptide Institute Inc; Osaka, Japan, or Sigma) in 2% BSA/PBS for 60 min. To remove sphingomyelin from the plasma membrane, cells were pretreated with 10 mU/ml bacterial sphingomyelinase from *Bacillus cereus* (Sigma) at 37°C for 1 hr before incubation with lysenin. Where used, BrdU (10 µM) was added to the cultures for 3 hr before fixation.

For immunostaining, fixed cells were permeabilized with 0.5% TritonX-100. For BrdU detection, cells were then treated with 3 N hydrochloric acid for 10 min at room temperature. Cells were then incubated with primary antibodies (mouse monoclonal anti-MyoD clone 5.8A [Dakocytomation; Carpinteria, CA]), anti-myogenin clone F5D (a gift from Dr. W. Wright at University of Texas), anti-sarcomeric myosin heavy chain (sMyHC) clone MF20, anti-BrdU clone G3G4 and anti-PAX7 (Developmental Studies Hybridoma Bank; Iowa City, IA), hamster monoclonal anti-Bcl-2 clone 3F11 (BD Pharmingen; San Diego, CA), and rabbit polyclonal anti-lysenin (Sekizawa et al. 1996) (Peptide Institute Inc; Osaka, Japan). After washes in PBS, primary antibody binding was visualized with Alexa Fluor dye-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes; Eugene, OR) for 30 min before washing and mounting in Fluoromount fluorescent mounting medium (DakoCytomation) containing 100 ng/ml DAPI or Hoechst 33258. Myofibers were immunostained as above and mounted in Fluoromount fluorescent mounting medium (DakoCytomation) containing 100 ng/ml DAPI. Q4

Western Blotting

Cells were lysed in SDS-sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol, 0.1 mM

Figure 1 Sphingomyelin levels significantly increase in C2C12 reserve cells. When proliferating C2C12 cells were fixed, probed with lysenin, and immunostained (A,B), lysenin binding was not observed, whereas most cells contained MyoD (red). After culture in differentiation media, however, lysenin immunostaining (green) was observed in a few cells within 24 hr (C,D). After 4 days, most cells had differentiated and were MyoD-positive (red; E), with many having fused into sMyHC-containing myotubes (red; K). Reserve cells, however, retained lysenin binding (green) but generally lacked MyoD (E,F) and were undifferentiated as shown by their lack of sMyHC immunostaining (red; K). Myogenin immunostaining (red; G,H) confirmed that differentiated mononucleated cells also failed to bind lysenin (green; G,H). The low level of BrdU incorporation after 4 days in differentiation medium (red; I,J) showed that few cells were still cycling, and those that were did not bind lysenin (green; I,J). Treatment of differentiated cultures with 10 mU/ml bacterial sphingomyelinase for 1 hr at 37.5°C digests sphingomyelin in the plasma membrane, and resulted in a loss of lysenin immunostaining (L), showing that lysenin was binding specifically to sphingomyelin (compare K with L). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue) to identify all cells present. Bars: A–H: 50 µm; I–L: 100 µm.

Q5

phenylmethanesulfonylfluoride, bromophenol blue), followed by boiling for 3 min. Fifty μg of protein were analyzed by 15% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked with Odyssey Blocking Buffer (LI-COR; Lincoln, NE) and incubated for 1 hr with primary antibodies. Membranes were washed and incubated with Alexa-Fluor 680-conjugated secondary antibodies and analyzed with an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR).

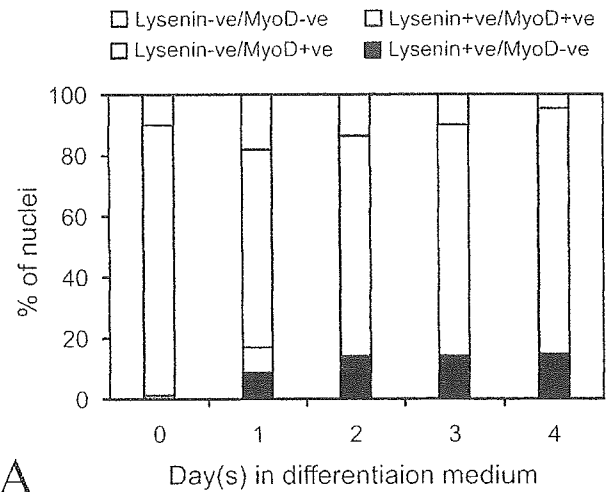
Results

To detect cell surface sphingomyelin, we used lysenin, a peptide isolated from the earthworm *Eisenia foetida* (Sekizawa et al. 1997; reviewed in Kobayashi et al. 2004), which binds specifically to sphingomyelin (Yamaji et al. 1998). We first examined the levels of sphingomyelin on the surface of proliferating C2C12 cells maintained in high-serum medium by probing fixed cells with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lysenin. Subsequent immunostaining using a specific anti-lysenin antibody (Sekizawa et al. 1996) showed that sphingomyelin on the surface of proliferating C2C12 cells was barely detectable (Figures 1A and 1B and quantified in Figure 2A).

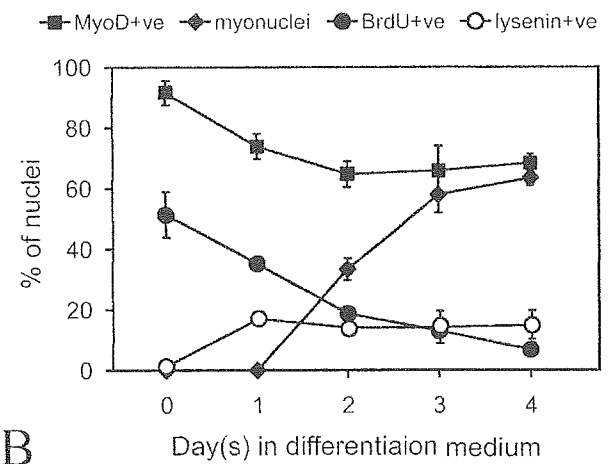
Q6

When C2C12 cells were switched to differentiation medium, lysenin+ve cells appeared within 24 hr (Figures 1C and 1D and quantified in Figure 2A). At this time, the lysenin+ve cell population contained both MyoD+ve and MyoD-ve cells (Figures 1C and 1D and quantified in Figure 2A). After 4 days however, lysenin+ve mononucleated cells invariably became MyoD-ve (Figures 1E and 1F and quantified in Figure 2A). On serum deprivation, most C2C12 cells undergo terminal differentiation (Figure 2B), but differentiated mononucleated cells identified with myogenin (Figures 1G and 1H) and multinucleated myotubes (Figures 1E, 1F, and 1K) did not label with lysenin. Differentiation, however, is not the only response to serum withdrawal. Other myogenic cells stop dividing, downregulate MyoD, and escape immediate differentiation to form mononucleated reserve cells (Yoshida et al. 1998). Because the mononucleated cells that bound lysenin after 4 days in differentiation medium were also MyoD-ve (Figures 1E and 1F and quantified in Figure 2A) and did not incorporate BrdU and so were no longer cycling (Figures 1I and 1J), these cells were identified as reserve cells. Because only $8.1 \pm 1.2\%$ (mean \pm SEM, $n=3$) lysenin+ve cells incorporated BrdU on Day 1 and virtually none did on Day 2 ($0.3 \pm 0.3\%$, mean \pm SEM, $n=3$), lysenin+ve cells rapidly exit the cell cycle after serum withdrawal to become reserve cells. This is also supported by the observation that the percentage of lysenin+ve cells did not increase after Day 1 (Figure 2B).

To ensure that lysenin was faithfully reporting sphingomyelin levels, reserve cells were treated with 100 mU/ml bacterial sphingomyelinase for 60 min at 37C to digest sphingomyelin, and then incubated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lysenin. As expected, lysenin+ve immuno-



A

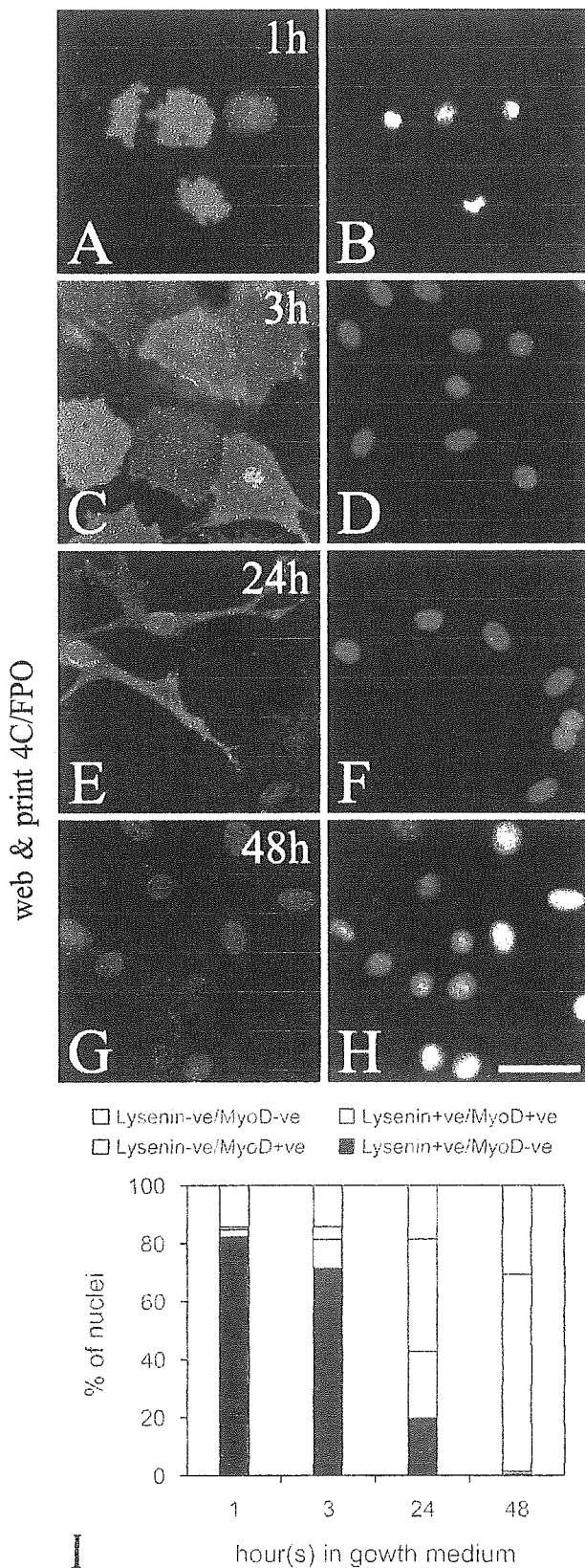


B

Figure 2 Kinetics of cell surface sphingomyelin during differentiation of C2C12 cells. (A) During culture after serum withdrawal, the percentage of lysenin-ve/MyoD-ve (white), lysenin-ve/MyoD+ve (light gray), lysenin+ve/MyoD+ve (dark gray), or lysenin+ve/MyoD-ve (black) cells was determined, and it was found that there was a significant increase in lysenin+ve/MyoD-ve cells. (B) Over the same period, the percentage of cells that fused (black diamond) or bound lysenin (white circle) significantly increased, whereas those that expressed MyoD (black square) or incorporated BrdU after a 3-hr pulse (black circle) fell. Bars indicate SEM from four independent experiments.

signals disappeared when reserve cells were pretreated with bacterial sphingomyelinase, confirming that the lysenin specifically labels sphingomyelin (Figures 1K and 1L). Thus sphingomyelin is highly expressed in reserve cells, but significantly less so in proliferating and differentiating myogenic cells.

When stimulated with serum, reserve cells reinduce MyoD expression, proliferate, and subsequently differentiate (Yoshida et al. 1998). Reserve cells were separated from differentiated cells and reseeded in fresh growth medium. Lysenin binding was still present on the surface of stimulated reserve cells after 60 min, when most of the cells remained MyoD-ve (Figures 3A



and 3B and quantified in Figure 3I), and also after 3 hr, when MyoD expression was beginning to be induced (Figures 3C and 3D and quantified in Figure 3I). By 24 hr, however, significant number of cells did not bind lysenin (Figures 3E and 3F and quantified in Figure 3I), and by 48 hr practically no cells did (Figures 3G and 3H and quantified in Figure 3I). Therefore, sphingomyelin levels in the plasma membrane of reserve cells decrease as the cells are stimulated to proliferate.

Proportion of Sphingomyelin is Higher in Reserve Cells than in Myotubes

Changes in the other components of the plasma membrane, such as glycolipids and cholesterol, can interfere with the efficient binding of lysenin to sphingomyelin (Yamaji et al. 1998, Ishitsuka et al. 2004). To ensure therefore that the differences in lysenin binding observed during reserve cell activation accurately reflects a drop in sphingomyelin levels, we directly quantified their phospholipid composition. After 4 days in serum-free differentiation medium, many myotubes were present, as identified by sMyHC content (Figure 4A) and morphology (Figure 4C), whereas reserve cells expressed Bcl-2 (Figure 4B). Cultures were partially trypsinized to separate myotubes from reserve cells (Kitzmann et al. 1998). Western blot analysis confirmed that this separation was effective with sMyHC, myogenin, and MyoD detectable in both isolated myotubes and total C2C12 cultures, whereas Bcl-2 was enriched in the reserve cell fraction as expected (Dominov et al. 1998) (Figure 4D). Analysis of separated myotube and reserve cell fractions for total phospholipid composition using thin layer chromatography showed that sphingomyelin made up 7.4 mol% of the total phospholipid content in reserve cells, but only 3.8 mol% in myotubes (Table 1). This increase in sphingomyelin content of noncycling reserve cells is consistent with the increase of sphingomyelin in the plasma membrane, as revealed by the binding of lysenin to their surface (Figures 1E and 1F).

Figure 3 The level of sphingomyelin in the plasma membrane falls as reserve cells activate. After 4–5 days in differentiation medium, mononucleated cells were passaged and reseeded into fresh growth medium. An hour after stimulation, reserve cells still bound lysenin (green), but remained MyoD-ve (A,B). Cells began to express MyoD within 3 hr, at which time majority of cells were still lysenin+ve (C,D). After 24 hr, however, immunostaining showed that the number of cells binding lysenin (green; E) had fallen, whereas those expressing MyoD (red; E) had risen, but after 48 hr, lysenin immunostaining was virtually absent (G,H). Cells were counterstained with Hoechst 33258 (blue) to identify all cells present. Bar: 50 μ m. (I) Determining the percentage of lysenin-ve/MyoD-ve (white), lysenin-ve/MyoD+ve (light gray), lysenin+ve/MyoD+ve (dark gray), or lysenin+ve/MyoD-ve (black) cells at 1, 3, 24, and 48 hr after reseeding into growth medium confirmed the loss of cells binding lysenin.

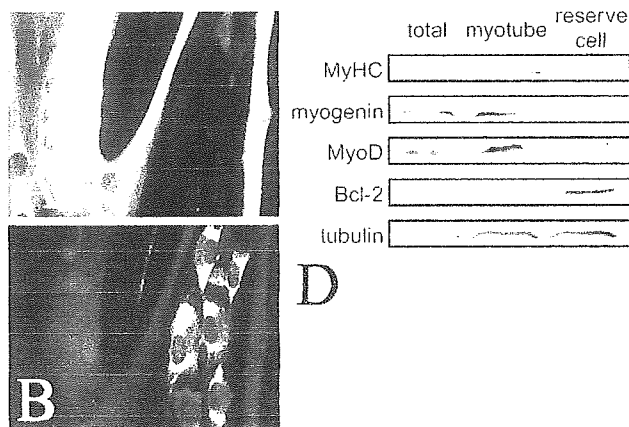


Figure 4 Reserve cells and myotubes can be effectively separated. To analyze phospholipid content (Table 1), it was first necessary to establish that reserve cells and myotubes could be separated. Immunostaining of cultures after 4 days in serum-free differentiation medium showed that myotubes containing sMyHC (A) and reserve cells expressing Bcl-2 (B) were mutually exclusive. Phase contrast image is shown in (C). Bar: 50 μ m. Mild trypsinization was used to separate myotubes and reserve cells, the purity of which was determined by Western blot analysis (D). As expected, sMyHC, myogenin, and MyoD were present in total C2C12 and the myotube fraction, whereas Bcl-2 was greatly enriched in the reserve cell fraction (D). Protein loading was assessed using α -tubulin.

High Levels of Sphingomyelin in the Plasma Membrane Are Characteristic of Quiescent Satellite Cells

Our observations on reserve cells show that sphingomyelin levels in the plasma membrane of noncycling myogenic reserve cells are high, but then fall as they activate. To see if quiescent myogenic cells *in vivo* also have high levels of sphingomyelin in their plasma mem-

Table 1 Phospholipid composition of myotubes and reserve cells

Phospholipid classes	Phospholipid composition (mol%)	
	Myotubes	Reserve cells
Phosphatidylethanolamine	34.0 \pm 0.5	25.7 \pm 0.9*
Phosphatidylinositol	7.4 \pm 0.3	7.8 \pm 1.0
Phosphatidylserine	6.7 \pm 0.3	8.9 \pm 0.4*
Phosphatidylcholine	48.1 \pm 0.6	50.1 \pm 0.9
Sphingomyelin	3.8 \pm 0.3	7.4 \pm 0.3*

Myotubes and reserve cells were separated after 4 days in serum-free differentiation medium and assayed for phospholipid content using thin layer chromatography. Values represent mean \pm SEM mol% of total phospholipids determined from five independent experiments.

*Statistically significant difference ($p < 0.01$, Student's *t*-test).

branes, adult extensor digitorum longus myofibers and their associated quiescent satellite cells were isolated, immediately fixed, and incubated in 0.5 μ g/ml lysenin. Immunostaining showed that quiescent satellite cells on the edge of the myofiber, identified by Pax7 expression (Seale et al. 2000), had strong cell surface lysenin labeling (Figures 5A–5C), showing that they too have high levels of sphingomyelin in their plasma membranes. Notably, almost all ($98.2 \pm 0.8\%$, mean \pm SEM, $n=60$ myofibers) Pax7+ve quiescent satellite cells were lysenin+ve, whereas $96.9 \pm 1.0\%$ (mean \pm SEM, $n=60$) of lysenin+ve satellite cells were Pax7+ve.

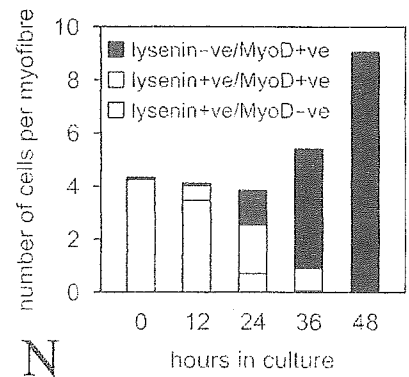
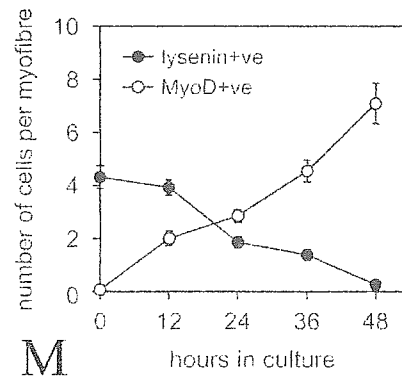
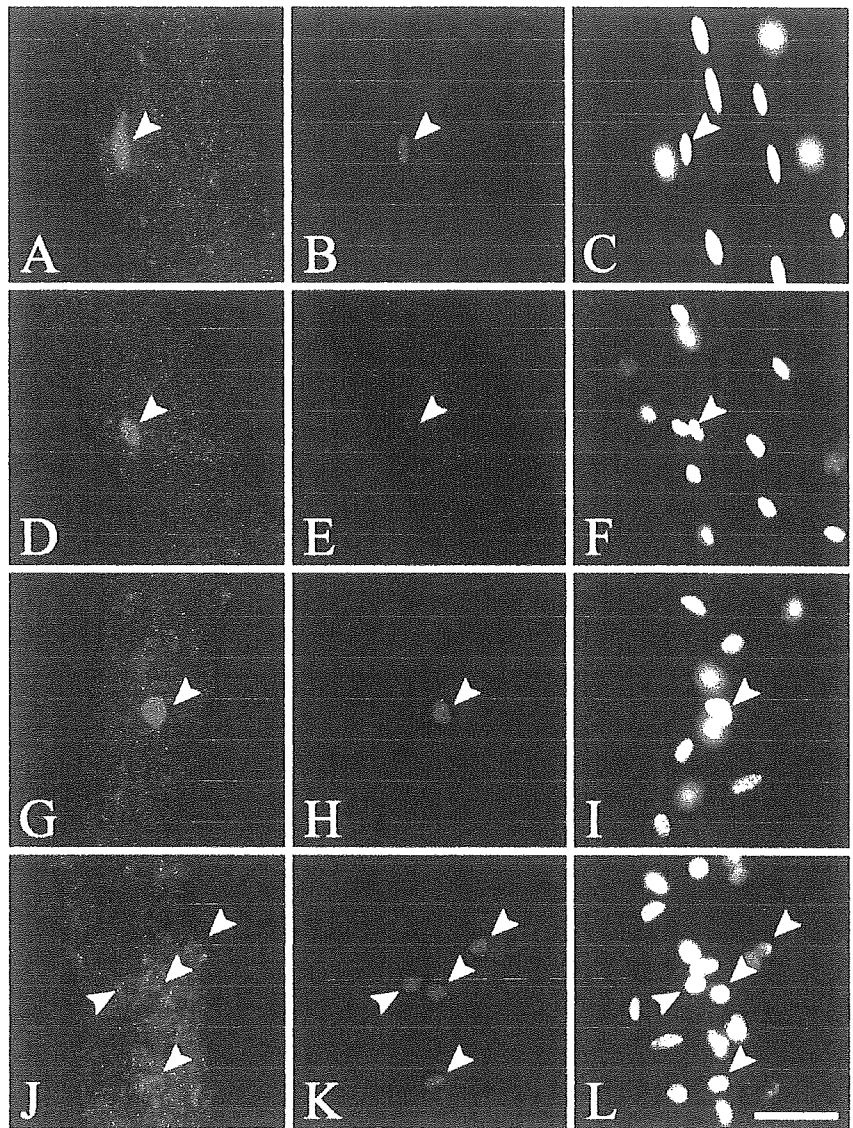
Sphingomyelin Levels Drop during Satellite Cell Activation

Next, we investigated the levels of sphingomyelin during satellite cell activation. Incubation of isolated myofibers in serum stimulates the associated satellite cells to activate, as shown by the induction of MyoD (Yablonka-Reuveni and Rivera 1994; Beauchamp et al. 2000). Coimmunostaining of quiescent satellite cells showed that the majority were lysenin+ve and MyoD-ve (Figures 5D–5F and quantified in Figures 5M and 5N), but, on stimulation, MyoD+ve satellite cells rapidly appeared, with a concomitant drop in the number of cells binding lysenin (Figures 5G–5I and quantified in Figures 5M and 5N). After 48 hr, lysenin staining was absent from virtually all activated MyoD+ve satellite cells (Figures 5J–5L and quantified in Figures 5M and 5N). Satellite cells immunostaining for lysenin and myogenin were mutually exclusive, showing that sphingomyelin levels drop significantly before the cells enter terminal differentiation (data not shown).

Some Satellite Cells Again Increase the Level of Sphingomyelin in Their Plasma Membranes

We have recently shown that when satellite cells are activated on an isolated myofiber, most are destined for differentiation. Some, however, maintain Pax7, down-regulate MyoD, and stop cycling (Zammit et al. 2004), thus reacquiring characteristics of quiescence. Although lysenin immunostaining was universally lost in activated/proliferating satellite cells (Figures 5J–5L and quantified in Figures 5M and 5N), some satellite cell progeny later reacquired lysenin binding (Figure 6). Lysenin+ve cells tended to express Pax7 (Figures 6A and 6B), but not MyoD (Figures 6C and 6D). At this time in culture, most MyoD+ve satellite cells also express myogenin (data not shown; Zammit et al. 2004) and are thus committed to differentiation. Therefore the increased levels of sphingomyelin in the plasma membrane of Pax7+ve/MyoD-ve satellite cell progeny to levels characteristic of quiescent satellite cells is further evidence that some satellite cells have returned to a quiescent-like state.

Figure 5 Sphingomyelin levels are high in the plasma membranes of quiescent, but not activated, satellite cells. Coimmunostaining of freshly isolated extensor digitorum longus myofibers demonstrates that the majority of associated Pax7+ve (red) quiescent satellite cells (arrowheads) bind lysenin (green) on their surface (A-C). Myofibers were then incubated in mitogen-rich medium that causes the satellite cells (arrowheads) to activate. Quiescent satellite cells are MyoD-ve (D-F), but as they activate, MyoD (red) is rapidly expressed (G-L); concomitantly, however, lysenin immunostaining (green) decreases, so that by 48 hr. it is practically undetectable in most satellite cells (D-L). Counterstaining with DAPI was used to identify all nuclei present on the myofiber (C,F,I,L). Bar: 50 μ m. Both counting the number of lysenin and MyoD positive satellite cells at time points up to 48 hr (mean \pm SEM of satellite cells per myofiber in each category from at least 50 myofibers from three separate experiments; M), or the number of lysenin+ve/MyoD-ve, lysenin+ve/MyoD+ve, or lysenin-ve/MyoD+ve satellite cells (mean number in each category per myofiber from at least 50 myofibers; N), confirms that lysenin binding, and therefore sphingomyelin levels, fall significantly as satellite cells activate.



Q8

web & print 4C/FPO

Discussion

In this study, we have examined the levels of sphingomyelin at the cell surface of myogenic cells using the sphingomyelin-specific binding protein lysenin (Yamaji

et al. 1998). Cycling C2C12 cells are either MyoD+ve or MyoD-ve (Yablonka-Reuveni and Rivera 1997), but do not bind lysenin, showing that proliferating myogenic cells have little sphingomyelin in their plasma

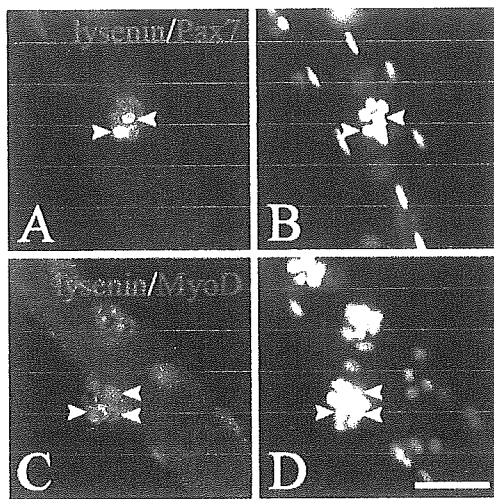


Figure 6 Some satellite cell progeny reacquire lysenin binding. Coimmunostaining of extensor digitorum longus myofibers that had been in culture for 72 hr showed Pax7+ve (red) satellite cells, some of which bound lysenin (green) on their surface (arrowheads in A,B). At this time, most satellite cells were MyoD+ve (red), and these lacked lysenin immunostaining (green) (arrowheads in C,D). Counterstaining with DAPI was used to identify all nuclei present (B,D). Bar: 50 μ m.

membranes. This remains the case in differentiated myocytes and myotubes. However, other myogenic cells respond to serum withdrawal by downregulating MyoD and escaping immediate differentiation to become reserve cells (Yoshida et al. 1998). In the course of this process, the levels of sphingomyelin in their plasma membranes of reserve cells significantly increased. Indeed, direct measurement showed that reserve cells contained almost twice as much sphingomyelin as myotubes. The differences in the level of sphingomyelin may appear smaller than expected from lysenin staining, but only $\sim 50\%$ of cellular sphingomyelin is located in the plasma membrane [reviewed in van Meer and Holthuis (2000)], with the rest in intracellular membranes. In addition, the low levels of sphingomyelin on the surface of myotubes may be below the level of detection with lysenin at the concentration used in this study. Taken together, our data suggest that quiescence is accompanied by a specific increase in sphingomyelin levels in the plasma membrane. We are examining the changes in sphingomyelin metabolism during the activation of satellite cells to determine how much breakdown or synthesis of sphingomyelin occurs during this event.

Muscle satellite cells contribute myogenic cells to growing muscle to provide new myonuclei, but then become quiescent in normal adult muscle (Schultz et al. 1978). The rapid isolation of intact myofibers allows their associated satellite cells to be examined while still quiescent (Yablonka-Reuveni and Rivera 1994; Beauchamp et al. 2000). Using this preparation, we

found that virtually all quiescent satellite cells bound lysenin, demonstrating that they too have high levels of sphingomyelin in their plasma membranes. The culture of myofibers in mitogen-rich medium stimulates their associated satellite cells to activate, proliferate, and subsequently differentiate, and this process is accompanied by a significant decrease of sphingomyelin on their cell surface. However, although lysenin is useful for identifying quiescent satellite cells on isolated myofibers, it should be noted that sphingomyelin is present to varying degrees in the membranes of all cells. Significantly, sphingomyelin levels fall rapidly on activation, whereas most other commonly used molecular markers for satellite cells, including M-cadherin, Pax7, and the Myf-5/ β -galactosidase fusion protein, persist in proliferating cells (Irintchev et al. 1994; Beauchamp et al. 2000; Seale et al. 2000).

Why is the transition from quiescence to activation in myogenic cells associated with a change in the levels of sphingomyelin in the plasma membrane? Because activation itself is rapid, the change in sphingomyelin observed in this study might be secondary to the activation. It would be important to examine the relationship between sphingomyelin and the certain stimuli known to involved in satellite cell activation such as HGF (Allen et al. 1995), mechanical stretch (Tatsumi Q9–10 et al. 2001), and nitric oxide (Anderson and Pilipowicz Q11 2002). One possible role for sphingomyelin in the Q12 plasma membrane is to act to concentrate signaling molecules. It is well established that sphingolipids, together with cholesterol and signaling molecules, are organized into lateral assemblies within cell membranes. These assemblies, including lipid rafts and caveolae, are emerging as important centers for cell signaling (reviewed in Simons and Toomre 2000) and could act as platforms to coordinate molecules needed to initiate myogenic cell activation. Alternatively, the loss of sphingomyelin may reflect its metabolism to produce bioactive lipids. It has been proposed that sphingomyelin in the plasma membrane acts as a store that can then be cleaved to generate ceramide, sphingosine, or sphingosine-1-phosphate, which have been shown to act as second messengers in a variety of cell types (Ohanian and Ohanian 2001). Ceramide, generated by agonist-induced sphingomyelin hydrolysis, has been implicated in cell differentiation, growth arrest, and apoptosis (Hannun 1996). Ceramide is further metabolized into sphingosine-1-phosphate, which is mitogenic in diverse cell types and has been shown to oppose ceramide-mediated apoptosis (Spiegel and Milstien 2003). Recent studies have revealed that sphingolipids are also active in skeletal muscle. Sphingosine controls muscle contraction by regulating calcium concentration in myofibers (Sabbadini et al. 1999), whereas ceramide has an inhibitory effect on IGF-I-induced protein Q13 synthesis in mouse myogenic C2C12 cells (Strle et al.

2004). Neutral sphingomyelinase catalyses the cleavage of sphingomyelin to produce bioactive lipid metabolites and is present in skeletal muscle (Ghosh et al. 1998); therefore, the sphingomyelin in the plasma membrane could be accessed for signaling purposes. It is then intriguing to speculate that bioactive lipids may also play a role in satellite cell activation.

When both reserve cells and satellite cells were stimulated with serum, sphingomyelin levels in their plasma membranes dropped significantly. However, at later times in culture, a limited number of satellite cell progeny reacquired lysenin binding, showing that the level of sphingomyelin in their plasma membranes had again increased. The effective response to repeated injury shows that the satellite cell pool is maintained (Sadeh et al. 1985; Luz et al. 2002), but there is debate at present about how this is achieved. It has been proposed that satellite cells may be part of a hierarchical system and merely represent a committed myogenic precursor that is restricted to providing myonuclei. In this system, the replacement of satellite cells occurs from a stem cell located within the muscle interstitium (Gussoni et al. 1999; Asakura et al. 2002) or outside muscle tissue (Fukada et al. 2002; LaBarge et al. 2002; LaBarge and Blau, 2002), but there is no evidence that this accounts for more than a very minor contribution. More likely is that satellite cells self-renew, as originally proposed by Moss and Leblond (1971). Indeed we have recently shown that satellite cell progeny maintained on isolated myofibers adopt divergent fates in culture. When they activate, satellite cells coexpress Pax7 with MyoD and most then proliferate, downregulate Pax7, and differentiate. In contrast, other proliferating cells maintain Pax7 but lose MyoD and withdraw from both the cell cycle and immediate myogenic differentiation, characteristics consistent with a quiescent state (Zammit et al. 2004). Similar observations have been made in chicken during muscle growth, showing that this may be a widespread mechanism in vertebrates (Halevy et al. 2004). The demonstration that some of these Pax7+ve/MyoD-ve cells also reacquire lysenin binding on their surface, a characteristic of quiescence in myogenic cells, is further evidence that these cells have reentered a quiescent state.

In conclusion, sphingomyelin levels are high in the plasma membrane of quiescent satellite cells and then fall as they activate and proliferate. These results implicate lipid rafts/caveolae as platforms to coordinate activation signals or the involvement of bioactive lipid metabolism in the process of activation and the subsequent return to quiescence. This increase in sphingomyelin levels on some satellite cells that appear to be reentering quiescence supports the conclusion that they are able to self-renew. Assaying the sphingomyelin level in the plasma membrane using lysenin therefore provides a positive marker of quiescence that actually

drops during activation, in contrast to most other molecular markers of satellite cells.

Acknowledgments

This work was supported by a research grant (11B-1) for Nervous and Mental Disorders and by a grant for research in Brain Science from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and by a grant from the Fugaku Trust for Medical Research. The Japan Scholarship Foundation funded Y.N., whereas P.S.Z. was supported by The Muscular Dystrophy Association and the Medical Research Council.

We thank Jon Beauchamp and Terry Partridge for invaluable discussions and their comments on the manuscript and Drs. Y. Miyagoe-Suzuki and S. Takeda (National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry) for advice on single myofiber isolation. P.S.Z. acknowledges the invaluable assistance of the late, great John Peel. The monoclonal antibodies, MF20, G3G4, and PAX7 were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, Iowa.

Literature Cited

- Anderson JE (1991) Myotube phospholipid synthesis and sarcolemmal ATPase activity in dystrophic (mdx) mouse muscle. *Biochem Cell Biol* 69:835-841
- Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA (2002) Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159:123-134
- Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, et al. (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151:1221-1234
- Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32:1171-1180
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917
- Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-238
- Dominov JA, Dunn JJ, Miller JB (1998) Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J Cell Biol* 142:537-544
- Emoto K, Umeda M (2000) An essential role for a membrane lipid in cytokinesis: regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *J Cell Biol* 149:1215-1224
- Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, et al. (2002) Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci* 115:1285-1293
- Ghosh N, Sabbadini R, Chatterjee S (1998) Identification, partial purification, and localization of a neutral sphingomyelinase in rabbit skeletal muscle: neutral sphingomyelinase in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 189:161-168
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, et al. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394
- Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, et al. (2004) Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn* 231:489-502
- Hannun YA (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274:1855-1859

Q14

Q15

Q16

- Irintchev A, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Wernig A (1994) Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn* 199:326–337
- Ishitsuka R, Yamaji-Hasegawa A, Makino A, Hirabayashi Y, Kobayashi T (2004) A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes. *Biophys J* 86:296–307
- Kent C, Schimmel SD, Vagelos PR (1974) Lipid composition of plasma membranes from developing chick muscle cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 360:312–321
- Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJ, Fernandez A (1998) The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol* 142:1447–1459
- Kobayashi H, Ohta N, Umeda M (2004) Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Int Rev Cytol* 236:45–99
- LaBarge MA, Blau HM (2002) Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111:589–601
- Luz MA, Marques MJ, Santo Neto H (2002) Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz J Med Biol Res* 35:691–695
- Mauro A (1961) Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493–495
- Moss FP, Leblond CP (1971) Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec* 170:421–435
- Ohanian J, Ohanian V (2001) Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci* 58:2053–2068
- Pediconi MF, Politi LE, Bouzat CB, De Los Santos EB, Barrantes FJ (1992) Myogenic differentiation of the muscle clonal cell line BC3H-1 is accompanied by changes in its lipid composition. *Lipids* 27:669–675
- Pyne S, Pyne NJ (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 349:385–402
- Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA (1995) Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:773–779
- Sabbadini RA, Danieli-Betto D, Betto R (1999) The role of sphingolipids in the control of skeletal muscle function: a review. *Ital J Neurol Sci* 20:423–430
- Sadeh M, Czyewski K, Stern LZ (1985) Chronic myopathy induced by repeated bupivacaine injections. *J Neurol Sci* 67:229–238
- Schultz E, Gibson MC, Champion T (1978) Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool* 206:451–456
- Schultz E, Jarzyzak DL (1985) Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech Ageing Dev* 30:63–72
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777–786
- Sekizawa Y, Kubo T, Kobayashi H, Nakajima T, Natori S (1997) Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene* 191:97–102
- Sekizawa Y, Ohta N, Natori S, Kobayashi H (1996) Immunocytochemical localization of lysenin, a novel protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Biomed Res* 17:327–330
- Sessions A, Horwitz AF (1983) Differentiation-related differences in the plasma membrane phospholipid asymmetry of myogenic and fibrogenic cells. *Biochim Biophys Acta* 728:103–111
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31–39
- Snow MH (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing: II: an autoradiographic study. *Anat Rec* 188:201–217
- Snow MH (1978) An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 186:535–540
- Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397–407
- Strle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen WH, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, et al. (2004) Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide. *Endocrinology* 145:4592–4602
- van den Eijnde SM, van den Hoff MJ, Reutelingsperger CP, van Heerde WL, Henfling ME, Vermeij-Keers C, Schutte B, et al. (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci* 114:3631–3642
- van Meer G, Holthuis JC (2000) Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1486:145–170
- Webster C, Blau HM (1990) Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* 16:557–565
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1997) Influence of PDGF-BB on proliferation and transition through the MyoD-myogenin-MEF2A expression program during myogenesis in mouse C2 myoblasts. *Growth Factors* 15:1–27
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1994) Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 164:588–603
- Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270:725–727
- Yamaji A, Sekizawa Y, Emoto K, Sakuraba H, Inoue K, Kobayashi H, Umeda M (1998) Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J Biol Chem* 273:5300–5306
- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* 111:769–779
- Zammit P, Beauchamp J (2001) The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68:193–204
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166:347–357
- Zhou X, Arthur G (1992) Improved procedures for the determination of lipid phosphorus by malachite green. *J Lipid Res* 33:1233–1236

[座談会]

遺伝子治療のアスレティックパフォーマンスへの応用、そして悪用 [前編]

2004年11月12、13日と東京大学駒場ファカルティ・ハウスで行われた国際シンポジウム『筋ジストロフィーの遺伝子・分子治療』の海外招待講演者の一人として、ペンシルバニア大学（米国）からスウィーニー教授が来日した。同教授は“遺伝子ドーピング”において、世界中のメディアに話題を提供している。特に2004年7月号Scientific American (Sweeney, 2004) の、一般向けの総説として書かれた『Gene doping (遺伝子ドーピング)』は、アテネ・オリンピックの直前ということもあり大きな話題となった。今月から2回にわたって掲載するこの記事は、忙しいスケジュールをぬって「座談会企画」に参加していただいたスウィーニー教授と、同国際シンポジウム・コーディネーターの一人である松田良一助教授に「分子・遺伝子治療や筋研究の現状」、さらにはスウィーニー教授の研究を中心に「“遺伝子ドーピング”の可能性」について伺った内容をまとめたものである。

(2004年11月12日、東京大学駒場キャンパスにて収録)

生命科学研究への興味

山内 まずは本題に入る前に、研究に取り組むまでの簡単な経緯、そして筋・遺伝子関係の研究を始めたきっかけについてお聞かせください。ちなみに、私自身は幼い頃からスポーツに没頭しており、高校時代にケガを多くしたことからスポーツ医・科学の世界に興味を持つようになりました。松田助教授は、ご実家が曹

洞宗のお寺と聞いております。宗教と相反すると思われがちな科学の世界で、なぜ筋ジストロフィー症を研究するようになったかをお聞かせください。

松田 遺伝的に寺を継ぐことは長男として宿命づけられていましたが、学生時代に骨格筋の発生・発達に興味を持ち、それから生命科学の分野を中心に生物学を学び研究し始めました。筋ジストロフィー症研究に興味を持ったのは、筋ジストロフィー症疾患の原因には筋の発生・再生と退化・変性が大きく関わっており、その疾患の理解と治療法の確立は、同時に筋の発生のメカニズム解明にもつながると考えたからです。

山内 ただ、筋の研究と治療法の確立を「同時に」しかも「共同で」進めていく

座談会出席者

山内潤一郎

松田良一

H.L.スウィーニー

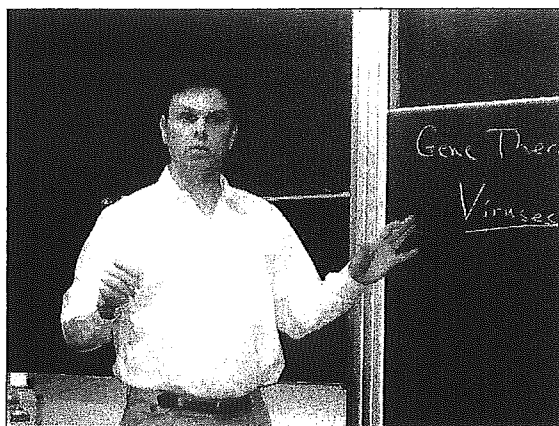
※プロフィールは86頁を参照下さい。

ことは、容易ではなかったと思いますが。

松田 科学的研究によって得られた知見を、社会により効果的に反映させるためには、ある程度異なった分野の研究を同時に共同で進めていく必要があると考えています。なぜなら、多くの視点を持つことによって1つのことをより明確に理解することが可能になるからです。たやすいことではないですが、これにより、1つの科学的研究の成果が多くのことに応用できるという可能性も高まります。

山内 スウィーニー教授も、かなり広い範囲で筋生理学あるいは健康科学を研究されていますね。また、スウィーニー教授の家系は長寿だとうかがっております。それが加齢に伴う筋機能の低下に興味を持ったきっかけの一つとうかがっていますが、その他に何か現在の研究分野に興味を持ったきっかけのようなものはあったのでしょうか。

スウィーニー (以下、H.L.S.) 事実、私の家系には106歳まで生きた人もいます。ただ、筋肉の研究というよりも筋に対する興味の発端は、大学の授業で初めて筋細胞を顕微鏡で見たときに、筋そのものを「美し



遺伝子治療についてわかりやすく教えるスウィーニー教授

い」と感じたことです。そのとき、こんなに美しい筋がどのように生体内で働くのかを理解しなければならなかったのだと思います。それから、ミオシンとアクチンという2種のタンパク質がどのように相互作用をして筋収縮を引き起こしているのか? 特に、どのようにして筋の短縮速度が決められているのかを最初の研究対象としました。そこで、まず異なったタイプのミオシンの研究を行い、さらにミオシン自体がどのように働いているのかという興味へと深まっていきました。しかし、あるとき自分の研究努力のすべてを、それほど多くの方が気にかけていないことに対し、このまま時間と労力を費やしていくべきなのだろうかと考えるようになりました。

山内 多くの科学者たちが通るジレンマですね。

H.L.S. ええ。そして自分の持っている筋生理の知識を何か社会のために役立たせるべきではないだろうかと思いはじめました。そこで、まずは骨格筋と心筋の疾患に対する理解を深めようと勉強し始めました。

そして、今から9年前のことです。筋ジストロフィー患者とその両親が一年に一度、一堂に会す研究・情報交換会に演者として呼ばれたのです。そこでは、科学者を招き、どのくらい疾患治療の研究が進んでいるかなどの情報交換が活発に行われていました。そのとき、私はとても苦い経験をしたのです。それは、筋ジストロフィー症疾患の現象について説明することはできたのですが、治療法については何一つ答えることができなかったことです。そして、次に治療法を聞かれたときは、何か一つでも治療法を教えられるようにならないと実感しました。

また、その頃祖母が93歳で亡くな

りました。89歳のときに祖母は庭仕事に脚を骨折し、その後筋力が回復することなく車椅子、寝たきりの生活になってしまいました。動けなくなったことで精神的にも生きていくことが嫌になってしまい、結局それが原因で亡くなりました。それらを機に、遺伝子治療がただの興味としてだけではなく、実際の研究課題として位置づけられるようになりました。一方で、周りからは「もっと一つのことに集中して研究なさい」と言われたこともあります。

山内 ところで、日本では医師以外の科学者が臨床的な研究をしていくのは非常に難しいという現状があります。つまり、医師免許を持っていない博士号研究者と医師免許を持っている博士号研究者の間には大きな壁があるということです。実際に医学部の博士号研究者のほとんどが医師免許を持っています。したがって、私のように医師免許を持っていない博士号研究者の生命科学研究の成果が医療の世界に入っていくと、社会への貢献度が低くなってしまっているのも事実です。その点、アメリカではそのような壁は日本に比べてかなり低いと思っていますが、H.L.S. アメリカでも多少そのような壁はありますが、それはあくまで個人的なものです。アメリカでは医学部でも医師免許を持っていない博士号研究者も多くいます。そして、彼らの多くは臨床的な研究や疾患の研究にも携わっています。私もその一人です。確かに我々は患者を治療することはできません。その分、動物実験で得た成果を、医師が患者の治療のために使ってもらうことを望んでいるのです。すべての科学者は研究で得た知識を社会に役立たせる義務があると思っています。

遺伝子治療

山内 それでは、スウィーニー教授のもとでは具体的にどのような研究プロジェクトが進められているのかについてお聞かせください。

H.L.S. 今でもミオシン分子の解明には大きな力を注いでいます。その他には筋の組織レベルにおいて、心筋と骨格筋の両方の疾患治療や、老化との関係を中心に研究しています。これらの応用として遺伝子治療法の開発、少し難しくなってしまいますが、主にDuchenne型筋ジストロフィー (DMD) の治療を目的としてmdxマウスを用いてインスリン様成長因子-I (IGF-I)、ミオスタチン、フォリスタチンなどの成長因子、もしくはその関係因子の促進・抑制による治療。さらには、ある特定の抗生物質や薬剤を用いた遺伝的欠陥の修正を目的とした治療などです。これら研究プロジェクトの多くは他の研究室と共同で行っています。

山内 このような分子生物学を応用

【用語解説】

筋ジストロフィー症とは、筋力低下などを伴う遺伝性疾患。筋ジストロフィー症では、筋細胞膜細胞骨格(ジストロフィン)タンパク質の欠損によって筋線維が破壊されやすく最終的に筋細胞は壊死に追いやられる。つまり、筋細胞は分裂(断裂)したあと、細胞として正常に働かなくなる。筋ジストロフィー症の中には筋萎縮なし(偽肥大型)の筋力低下などの機能障害を引き起こしているものもある。神経機能低下と筋萎縮の両方による加齢などの筋力低下とはその点でも異なる。

ミオシン、アクチン。筋収縮の最小単位は筋原線維であり、その中に整然と配列している太いフィラメントのミオシンタンパク質と細いフィラメントのアクチンタンパク質が相互に作用することによって収縮が起こる。また、筋の最大短縮速度は主にミオシンの種類によって決められている。

■筋の成長と再生：IGF-Iとミオスタチンの役割

サテライト細胞が成長因子などの刺激によって分裂・増殖し、もとの筋線維に融合することで筋線維の核数を増やし筋肥大が起きると考えられています(図1)。そのサテライト細胞の分裂・増殖に、IGF-I (insulin-like growth factor-I) による促進やミオスタチンによる抑制が関与していると言われています。IGF-Iが筋の増殖・肥大を促進する成長因子(写真1)であるのに対し、ミオスタチン(myostatin=GDF8)は、近年McPherron & Lee

(1997)によって発見された筋の増殖・肥大を抑制する成長因子です。ベルギー産の「ダブル・マッスル」と呼ばれる筋肉質な品種の牛BELGIAN BLUEもミオスタチン遺伝子の欠損が原因であることがわかっています(写真2)。一方、フォリストアチン(follistatin)はミオスタチンの働きを阻害します。(写真1、2はスウィーニー氏の提供)

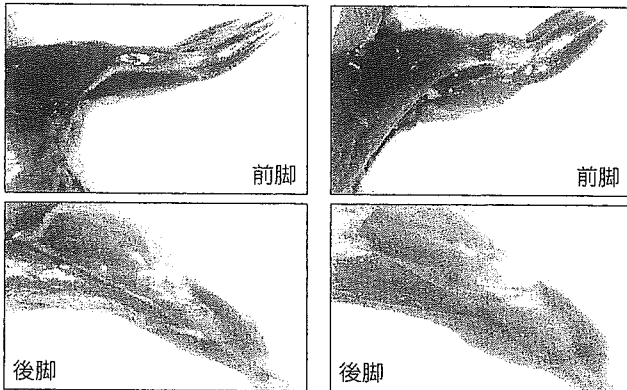


写真1 IGF-Iを過剰発現させるように先天的に遺伝子操作をしたマウス(右)と通常のマウス(左)

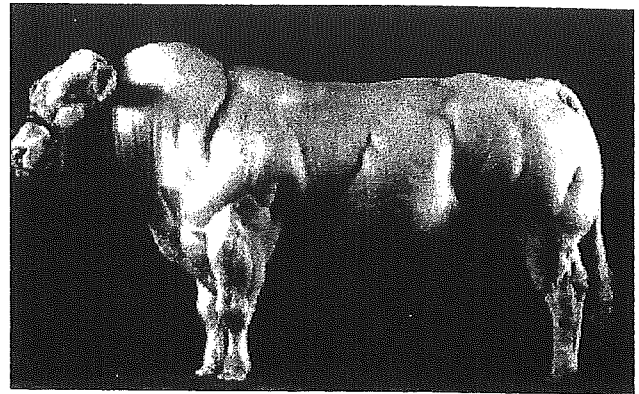


写真2 ミオスタチン欠損の牛「ダブル・マッスル」BELGIAN BLUE BULL

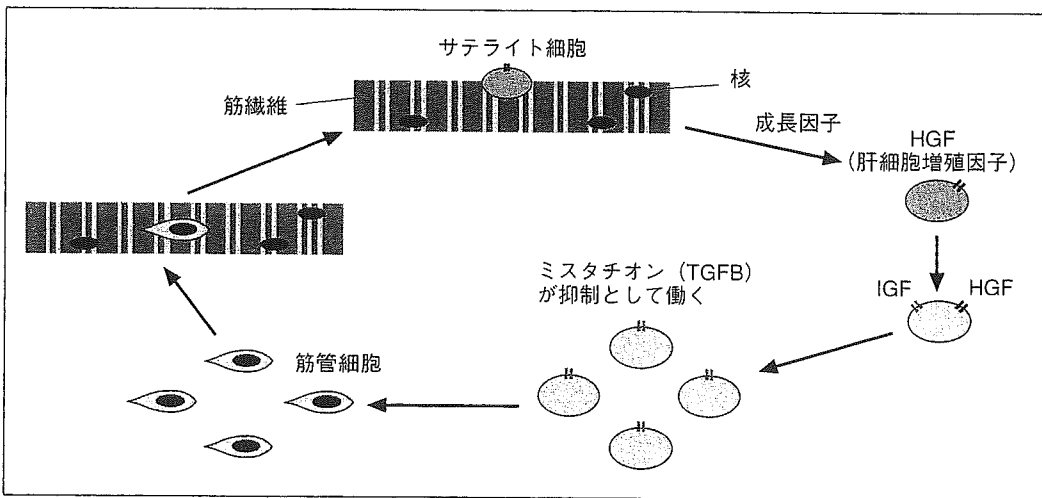


図1

した治療法の発展は遺伝的な疾患を持った患者に大きな期待と希望をもたらしていると思われます。その一方で、スポーツ界では“遺伝子ドーピング”が近年現実的な問題として取りあげられています。その直接的なきっかけとなったのは、スウィーニー教授らが1998年に発表した(Barton-Davis et al. 1998)、マウスの筋にIGF-I遺伝子を直接導入し、そのことによってトレーニングなど

をしなくても、筋肥大、筋力の増加や加齢に伴うそれらの低下を抑制した研究だと思われます。この研究論文がこれだけ衝撃的だったのはどのような理由からでしょうか？

H.L.S. 我々が、初めてある特定の遺伝子(IGF-I)を後天的に体内に導入し成果を得たからです。これは、加齢に伴う筋機能、特に筋力の低下を防ぐことが目的で、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてIGF-I遺伝子

を筋に直接組み入れ、過剰発現するようにしました。その結果、IGF-I遺伝子を導入した若いマウスは何もせずに筋量が15%、筋力が14%増加しました。また、加齢に伴う筋力低下と速筋線維の減少も防ぐことができました(図2)。IGF-Iの過剰発現による筋への効果は、筋細胞に多くの中心核が観察されることからサテライト細胞の分化・増殖の促進によるものと考えられます。さらに、

筋で発現したIGF-Iが血中に出てくることなく、心臓などの他器官へ悪影響を及ぼす副作用も認められませんでした。

山内 我々が行った下肢の筋機能の研究でも、加齢に伴って筋力は大きく低下しますが、最大動作速度はほとんど変わらないことがわかりました。筋の最大短縮速度が加齢に伴って変化するかしないかは、個体や細胞レベルでもまちまちではっきりとしたことはわかっていませんが、ただ言えることは筋力に比べて最大短縮速度はそれほど大きな影響を受けないということです。したがって、高齢者の筋力低下や筋萎縮を防ぐことはQOL（生活の質）を向上させるという点で重要な要素だと考えられ、このような遺伝子治療の方法でそれらを防ぐことができるということはかなり画期的なことと言えます。

それでは、臨床で筋ジストロフィー患者にIGF-Iの導入手法を用いた遺伝子治療の計画はどの程度進んでいるのでしょうか。また、その場合に考えられる問題点は何でしょうか。例えば、“遺伝子ドーピング”の現実的な可能性も示唆されると思われますが。

H.L.S. 元来、遺伝子治療の目的は、

先天的に欠損している遺伝子もしくは後天的に破壊されて機能不全を起こしている遺伝子（例えば筋ジストロフィー症で欠損しているジストロフィン・タンパク質）を修復して正常化させることです。しかし、筋ジストロフィー症のジストロフィン・タンパク質は分子量が大きすぎるため、現状では細胞内に運び入れることが非常に困難です。そこで、体内にすでに存在しているものを補強して、筋機能を向上させようというのがこのIGF-I（分子量が小さい）を使った遺伝子治療の考え方です。したがって、このような手法をアスリートが“遺伝子ドーピング”として使うことは、技術的には難しいことではありません。ただ、ヒトの使用における安全性の保証はまだありません。

山内 つまり段階的な研究と安全性確保が重要ということですね。

H.L.S. 現在、臨床に移行する前の段階として、マウスやラットより大きな動物であるイヌを用いた実験に取りかかっています。このような大きな動物での実験は非常に大切です。これまでマウスやラットで確認された効果が同様に大きな個体の動物でも実証でき、なおかつIGF-Iによる

免疫反応、IGF-Iが血中に出てこないことやガン発生に影響がないことなど、副作用に対する安全面を確認する必要があるからです。IGF-Iにはガン細胞の成長を促進させる効果も知られていますが、幸い筋でのガン発生は少ないためその影響は低いと考えられます。これらイヌの実験は同時に疾患のあるイヌの治療法の確立も目的としています。動物での実験がクリアになったのち、段階的に筋ジストロフィー症患者の臨床実験へと進めていきます。まず2年以内にフェーズ1トライアルを実施す

【用語解説】

Duchenne（デュシェンヌ）型筋ジストロフィー（DMD）は、筋ジストロフィー症の中で最も多くみられ、ジストロフィン・タンパク質の欠損が原因で発症する。mdxマウスとは、マウスで同様にジストロフィンの欠損している天然の動物DMDモデルのこと。

アデノ随伴ウイルス（AAV: Adeno-associated virus）とは、アデノウイルスに混在する小さなDNAウイルスで、細胞に効率よく感染するため遺伝子治療用のベクター（運び屋）として使われている。病原性は非常に低い。サテライト細胞は、骨格筋肥大や再生に重要な役割を果たしているとされる。（別掲カコミ参照）

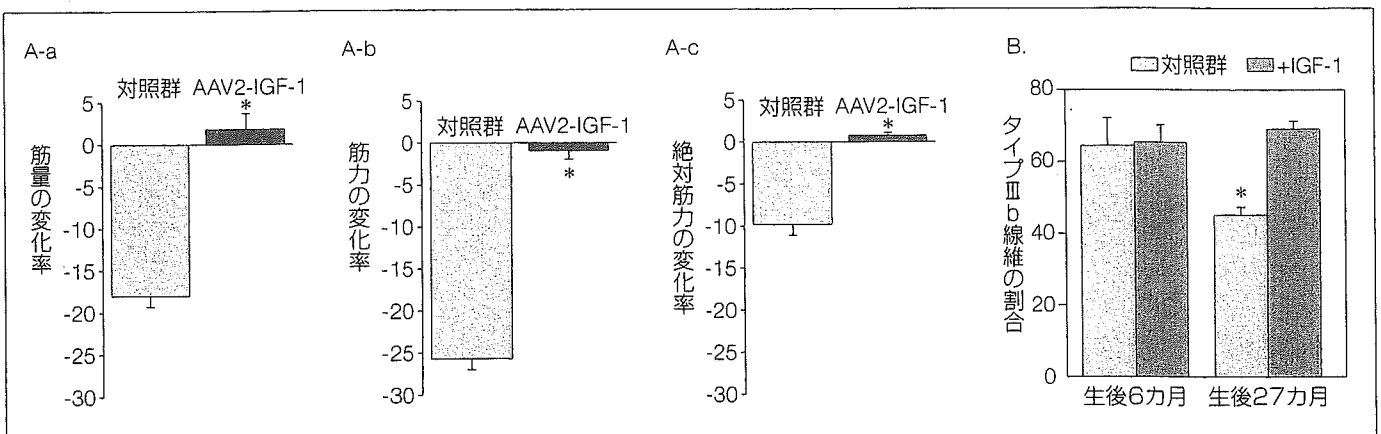


図2 IGF-I遺伝子導入の効果 (Courtesy Sweeney; Barton-Davis et al. 1998)

A 加齢に伴う筋萎縮と筋力低下をIGF-Iの遺伝子導入によって防ぐことができる。生後6カ月と27カ月のマウスの筋量 (A-a)、筋力 (A-b)、絶対筋力 (A-c) の変化率についてIGF-I遺伝子を導入した群 (右) と導入していない群で比較

B 生後6カ月と27カ月のマウスのタイプIIb線維の割合をIGF-I遺伝子を導入した群 (右) と導入していない群で比較

ると思います。これは、「1つの特定の筋にIGF-Iウィルスを注射して、免疫反応による安全性とその後バイオプシー（筋生検）でIGF-Iが筋に感染して働いているかどうかの確認」。その後4～5年を目安にフェーズ2として本格的な治療効果のトライアルに入っていきます。これは、「IGF-Iウィルスを静脈から注射し腕あるいは脚全体を感染させ、その効果を確認」。その後のフェーズ3は、どのようなものになるかはまだはつきりわかりません。ただ、心臓や横隔膜などの体幹部の治療法や安全面がいまだに確立していないため、その部位を避けた四肢の治療の発展が主になるでしょう。

ヒトへの臨床に入る前の段階でもう1つ大切なことがあります。ウィルスによって筋に組み入れたIGF-I遺伝子の発現をON/OFFできるスイッチをつくらなければなりません。これまでの実験で遺伝子の過剰発現は可能となりましたが、それを止める方法はいまだに確立されていません。つまり、IGF-Iが血中に多量に出てくるなど何かの間違いが起きたときに、遺伝子の活動を中止させるための薬もしくは方法によって安全性のメカニズムを確立しなければならないのです。

山内 論文発表後5年以上経った今も、まだヒトへ応用する前に安全面などの確認が必要なことがわかりました。ところで、この研究報告後どのような問い合わせが最も多かったでしょう。

H.L.S. 医療従事者、研究者からはこの方法は筋ジストロフィー症や神経-筋疾患の治療に有効かどうかということを中心に尋ねられました。ただ、それよりも「自分を（“遺伝子ドーピング”の）モルモットにしてほしい」というアメリカ、オースト

リア、ヨーロッパ地域のパワー系アスリートからの問い合わせが多く入るようになりました。あと少しでトップになれない、いわゆる二番手のアスリートたちからの問い合わせが主です。高校のアメリカン・フットボールチームのコーチからもチーム全体の面倒を見てほしいとの依頼がありました。日本のアスリートからはまだ連絡はありませんよ…。まだ安全性の確認がされておらず、ヒトへ応用する段階ではないと伝えているのですが、それでも試してほしいと言われました。

筋機能解明の興味から始まった研究で得られた知識を、遺伝子治療という応用で新たな成果につなげ、我々の研究が少しずつ社会に貢献し始めていると感じています。そのことによって、我々自身もより研究が楽しくなり充実した生活が送れています。このような社会に前向きな研

究成果を得られる反面、負の産物として“遺伝子ドーピング”などの問題も出てきているのも事実です。

※次号は、遺伝子治療の応用と“遺伝子ドーピング”の可能性について最新の科学的知見を交えて話を進めていきます。

（編集・企画協力／向山理・制作集団スポーツ会議ネットワーク）

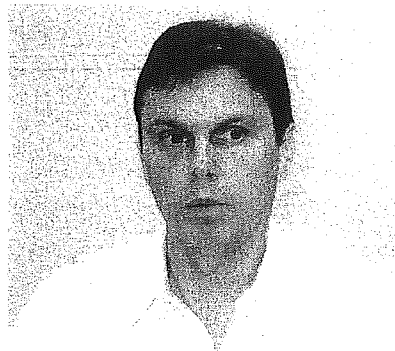
【引用・参考文献】

Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE & Sweeney HL (1999). J Clin Invest 104, 375-381.

Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N & Sweeney HL (1998). Proc Natl Acad Sci U S A 95, 15603-15607.

Musao A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL & Rosenthal N (2001). Nat Genet 27, 195-200.

Sweeney HL (2004). Sci Am 291, 62-69. McPherron AC, Lawler AM & Lee, SJ (1997). Nature 387, 83-90.



H.L.スウィーニー (H. Lee Sweeney)
ペンシルバニア大学医学部教授、生理学科長。マサチューセッツ工科大学で学士号、ハーバード大学大学院で修士号、博士号をそれぞれ取得。米国立関節炎・筋骨格疾患研究所 (NIAMD) の科学顧問など。動物におけるIGF-Iの遺伝子治療成功後には、世界アンチ・ドーピング機構 (WADA) の遺伝子ドーピング研究班の主要メンバーとして発言権を持つ。

※山内潤一郎氏のプロフィールについては、同氏の都合により次号に掲載させていただきます。



松田良一 (まつだ・りょういち)
東京大学大学院生命環境科学系助教授。曹洞宗の寺院の長男。東京都立大学在学中、三浦悌二氏（当時東京大学医学部教授）の下へ就職。千葉大学大学院で修士号取得、東京都立大学を経てカリフォルニア大学バークレー校（分子生物学）で研究を行い、そこでの研究成果をもとに博士号を取得。生体染色色素Evans Blueが、脳や筋の異常を特異的に染色することを発見する。

[座談会] 遺伝子治療のアスレティックパフォーマンスへの応用、そして悪用 [後編]

今月は、遺伝子治療の研究から派生する“遺伝子ドーピング”の今後について、さらには薬物療法の開発などについて、現実的側面から検討していく。

遺伝子治療と トレーニングの相乗効果

山内 IGF-1の遺伝子療法による筋肥大、筋力の向上が、レジスタンス・トレーニングとの併用でどの程度効果が促進されるのか気になっていましたが、スウィーニー教授は、2004年に追隨実験として、古巣テキサス大学オースティン校のファラー博士 (Dr. Farrar) と共同研究でIGF-1の遺伝子治療とレジスタンス・トレーニングとの相乗効果を発

表されました。この発表はスポーツ界により大きなインパクトを与えたと思います。この結果を踏まえて、遺伝子の操作はトレーニングなどの環境的な要因にどの程度プラスあるいはマイナスの影響を与えることができると思われますか。

H.L.S. 我々は、IGF-1過剰発現の遺伝子操作をしたラットと普通のラットに、レジスタンス・トレーニングのプログラムとして3日に1回の梯子登りを8週間課しました (写真1)。おもりを尻尾にぶら下げて1mの梯子を2分間の休息を挟みながら8セット登ります。トレーニング期間中、負荷強度は漸増的に増やしていきます。体重の1/2のおもりから始めましたが、最終的に体重の3倍以上のおもりでトレーニングができるようになりました。IGF-1過剰発現の遺伝子操作をしたラットがレジスタンス・トレーニングを併用することによって得られる効果は、それら1つだけで得られる効果に加え合わせた結果になりました (図1)。また、トレーニング終了後 (ディトレーニング) もIGF-1の遺伝子操作をしたラットの筋はトレーニング効果が持続されました。したがって、トレーニングによる筋肥大や筋力の増加はIGF-1などの遺伝子操作によって効果がさらに増すことがわかりました。これは同時に、アスリートの筋肥大

座談会出席者

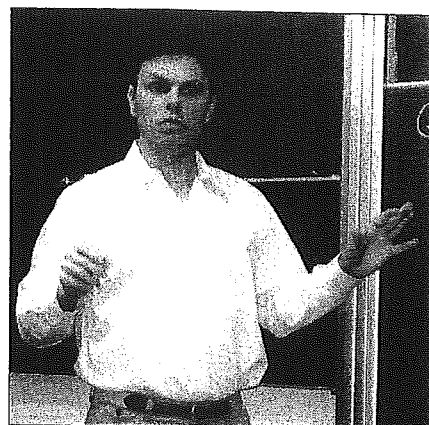
山内潤一郎

松田良一

東京大学大学院生命環境科学系助教授

H.L.スウィーニー

ペンシルバニア大学医学部教授



スウィーニー氏

や筋力増加によるアスレティックパフォーマンス向上の目的にもトレーニングとIGF-1過剰発現の遺伝子操作のコンビネーションはより有効だということがわかります。また、ケガなどによって一時的にトレーニングができなくなったときに、大きな筋力低下や筋萎縮を防ぐことも可能だと言えます。

山内 この結果からは、同じトレーニングをしていても、IGF-1過剰発現の遺伝子操作をしたアスリートと何もしていないアスリートでは筋肥大・筋力増加の効果に明らかに差が出てしまうことがわかります。これは裏を返せば、遺伝的に元々そのような「才能」を持って生まれたアス

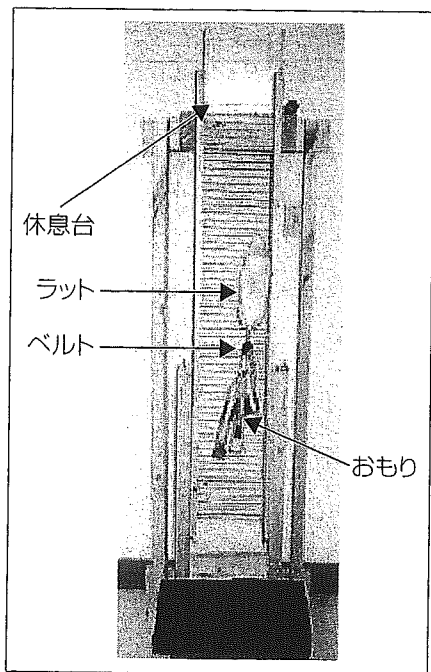


写真1 ラットのウェイト・トレーニング：梯子登り 1mに2cm間隔の梯子がついている。梯子の角度は85度 写真提供/スウィーニー氏

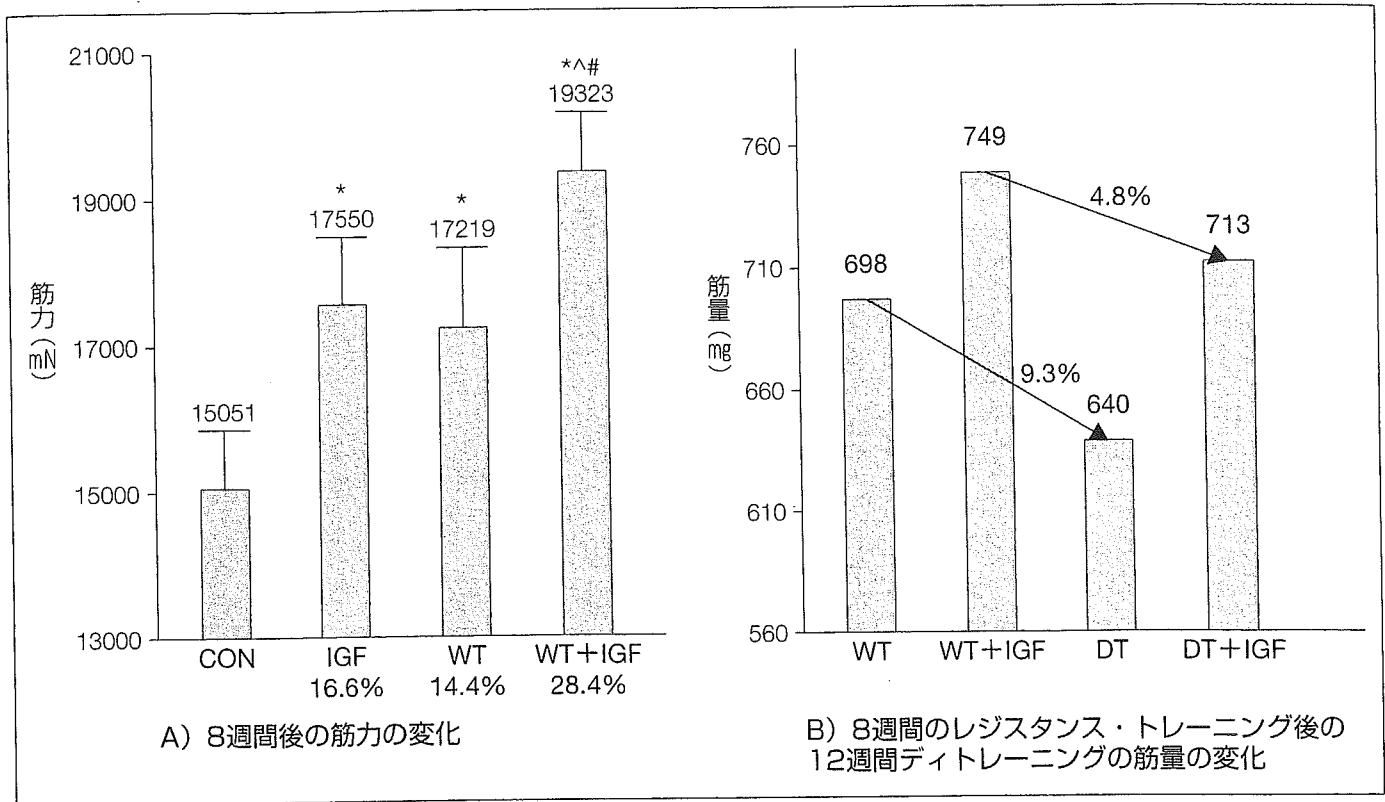
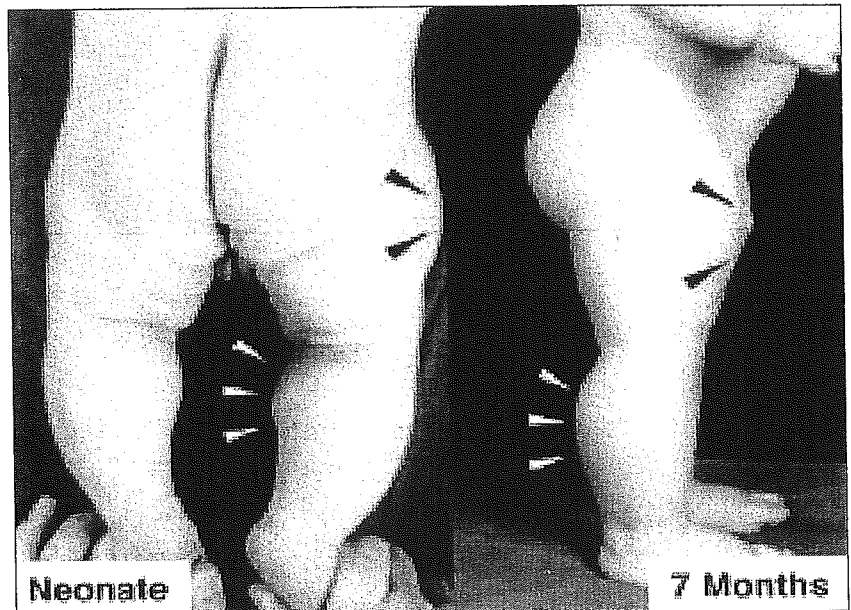


図1 IGF-I過剰発現の遺伝子操作とレジスタンス・トレーニングの併用による効果 (Courtesy Sweeney; Lee et al. 2004)

写真2 ミオスタチン欠損の子ども (Schuelke et al. 2004)

左：新生児、右：生後7カ月児
写真提供/スウィーニー氏

この男の子は4歳半時にすでに片手に3kgのダンベルをそれぞれ持って腕を伸ばした状態で水平に持ち上げることができた。論文では母親は24歳の元プロスポーツ選手で彼女の家系も記されており、それによると母親の祖父、父、兄、義兄(異母)も同様に異常に力の強い人であるとのこと。一方、父親の情報は公開されていないが、この“スーパーベイビー”はミオスタチン遺伝子変異が双方にあるホモ接合であることから、父親にも遺伝子変異があることが予測できる。



リートには、なかなか同じ努力をしてもかなわないということを示しているのかもしれない。

一方、我々が行ったヒト複合関節動作の筋機能における研究では、多くの筋の相互作用が身体パフォーマンスに重要であることがわかりました。したがって、論文で発表されたような局所的な筋肥大は、総合的な

身体の筋機能の向上に直接結びつかないと思われるかもしれませんが、そのあたりはどのようにお考えでしょうか。例えば、大腿四頭筋だけ強く大きくしても、走ったときに裏側のハムストリングが弱くては肉ばなれなどの傷害が起きやすくなってしまいます。

H.L.S. そのような問題はないでし

よう。これまで発表した論文のように目的の筋に注射をして局所的な効果を狙うこともできますが、四肢を圧迫帯で軽く縛って(250mmHg)血流を止め、静脈にIGF-Iウイルスを注射すると、およそ10分程度でその血管に支配されている筋にウイルスが感染し効果が得られることも実証済みです(図2)。つまり、下肢

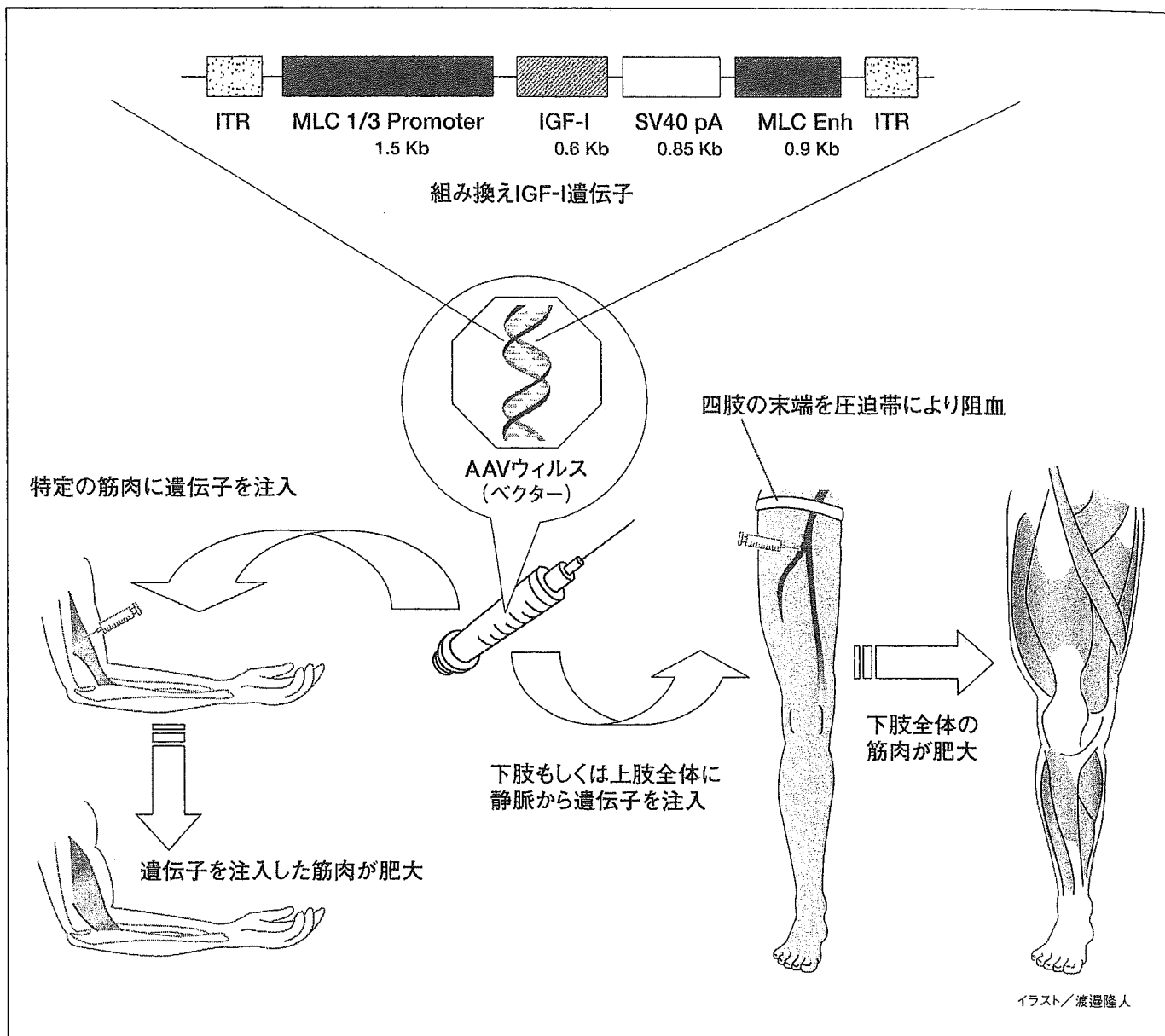


図2 組み換えIGF-I遺伝子の構造とIGF-Iウイルスを感染させる「局所的な方法」と「上肢が下肢全体を感染させる方法」 ITR：イントロン、MLC：ミオシン軽鎖、IGF-I：インシュリン様成長因子-I、Enh：エンハンサー

あるいは上肢全体をバランスよく筋肥大・筋力増加させることも可能と云うことです。

特異遺伝子のアスレチックパフォーマンスへの可能性

山内 2004年6月に、いわゆる「ミオスタチン遺伝子変異による“スーパーベイビー”（写真2）」の論文（Schuelke et al. 2004）が発表されて話題となりました。“スーパーベイビー”のように強力な筋肉ができる遺伝的変異を持って生まれた子ども

もはどのように特殊なのですか？
H.L.S. ミオスタチン変異を持って生まれた子どもは、何もしなくても普通の子どもに比べて筋力が異常に強く、そして大きく発達しているということです。それ以外はいたって正常で健康に支障はありません。また、この子の母親もミオスタチン遺伝子の変異によって突出したアスリートと報告されています。おそらく父親も遺伝子変異があるのでしょう。このように、両親が遺伝子変異である例は稀です。

山内 この“スーパーベイビー”はミオスタチンの遺伝子に変異があり、ミオスタチンが作れませんが、普通の変異と違っていて遺伝情報に必要な部分（イントロン）に変異があったことも注目を浴びた理由の一つです。このようことは前もって予測のつくことなのでしょう。H.L.S. この研究に携わったドイツの医師・研究者らは、この赤ちゃんの筋肥大に筋疾患の要因が見つからなかったために、おそらく筋の大きさを制御する遺伝子に変異があると

推測したのでしょうか。彼らはこの赤ちゃんの特別な素質の原因がミオスタチンにあると考え、ミオスタチンの研究を先駆的に行っているアメリカ、ジョンズ・ホプキンス大学の研究者らに共同研究の話を持ち込んで赤ちゃんの遺伝子分析を進めたようです。その推測が今回は的中したと言えるでしょう。もしこの赤ちゃんの筋肥大の原因がミオスタチンでなかったならば、他の可能性としてIGF-I遺伝子の変異なども考えられたのかもしれませんが。実際にIGF-Iの過剰分泌によって筋が大きく発達した赤ちゃんもいますが、IGF-Iの過剰分泌が筋肉だけでなく身体全体で起こるため、後に心臓血管系に障害を引き起こしています。

山内 この"スーパーベイビー"は今後どの程度筋肉が成長し続けると考えられますか。それともミオスタチン遺伝子以外に筋の成長を抑制する因子によって成長は止まると考えられるのでしょうか。さらには、ミオスタチン遺伝子変異のある人は将来なんらかの障害を引き起こす可能性はあるのでしょうか。

H.L.S. 筋肉がどの程度成長し続けるかどうかはまだはっきりわかっていません。現在、ミオスタチン遺伝子がない状態で、IGF-Iを過剰発現させると筋肉がどの程度大きくなるかを確認中です。おそらく、ある時点で筋細胞に十分な酸素供給が行き届かなくなるなどの代謝制御の関与によって筋の成長は止まると考えられます。

なお、ミオスタチン遺伝子変異による筋肥大が引き起こす障害があるかどうかはわかっていませんが、他の筋肥大を促す因子(c-ski)によって筋肥大した筋は年をとるとともにうまく力を発揮できなくなるなどの問題が生じました。理由はわかり

ませんが、場合によっては、筋肉が大きくなったからといって即時に筋力の増加につながるということではなさそうです。

山内 IGF-Iとミオスタチンの相反する機能をそれぞれ任意に制御し、どのような限界が現れるのかを知ることが大変興味深いです。その一方で、このような相反する機能はヒトの身体を一定に保つための恒常性機構として働いていると思われます。この相互を仲介する因子なども今後新たな研究領域として進展していくような気がします。また、筋力の増加には、筋肥大の要因に加えて、神経系の改善なども大きく関わっているため、神経-筋系の機能を全体的に解明していくこともこれから重要になっていくのかもしれませんが。ところで、過去・現在のパワー系アスリートの多くは"スーパーベイビー"のように遺伝子変異のあった可能性は高いのでしょうか。特に、黒色人種はパワー系のパフォーマンス能力が他の人種に比べて高いように思われますが、これは黒色人種にミオスタチン遺伝子変異を持って生まれてくる確率が高いなどという人種間の差があるのでしょうか？

H.L.S. あくまで推測ですが、ワールドクラスのウェイトリフターの中にはミオスタチン遺伝子がない可能性が高いと思います。実際にテストをしてみないとわからないことですが、少なくとも何人かはいると思います。同様にIGF-Iが通常の人よりも多く分泌しているアスリートもいる可能性があります。ただIGF-Iに関しては、それほど異常に多く分泌していなくても通常の2倍もあれば効果があることがわかっています。なお、遺伝子変異のある子どもが生まれる確率は人種的なものよりも、家系に大きく影響されると思います。

祖先に遺伝子変異のあった人がいたならば、その変異が子孫に引き継がれる可能性があるからです。

"遺伝子ドーピング"の可能性

山内 一卵性双生児と二卵性双生児の筋組成などを比較して、遺伝的な要因がどの程度影響しているかを検証する双生児の研究などによって、筋組成は遺伝的に決まっていることが明らかにされていますが、遺伝子の操作によってより理想的なアスリートを生み出すことは可能なのでしょうか。アテネ・オリンピック期間中の2004年8月に、持久力を左右する遺伝子、いわゆる「マラソン遺伝子」としてPPAR δ の研究結果(Wang et al. 2004)が発表されました。このような遺伝子も遺伝子操作技術によってスポーツ界に直接影響を与えていくようなことは可能なのでしょうか。

H.L.S. 我々が成功したIGF-I以外の多くの遺伝子も技術的に遺伝子操作を加えることは可能です。したがって、アスリートがどのような能力を望むかによって、その能力を高める因子を体内に取り入れることで、後天的に理想的な身体能力を手に入れることは不可能ではないでしょう。先天的に恵まれた「才能」を持っている人すらも凌駕してしまう時代がくる日もそう遠くはないと思います。山内 北京オリンピック、あるいは近い将来誰かがなんらかの方法を用いて"遺伝子ドーピング"を試す可能性はあるのでしょうか。もしそのような可能性があるとしたら、どのような具体的な方法が考えられますか。仮に"遺伝子ドーピング"が現実的に可能となった場合、"ナチュラルなスーパーアスリート"と"人工的なスーパーアスリート"を判別する方法、つまり遺伝子操作した人体を

見分けることは可能なのでしょうか。H.L.S. まだ安全面の保証はありませんが、ヒトへの応用も技術的には不可能ではありません。したがって、近い将来に誰かが遺伝子ドーピングを試す可能性は十分に考えられます。方法としては、AAV (前編参照) などのウイルスもしくは特殊なDNA (プラスミドDNA) を用いた組み換え遺伝子の体細胞導入の2つが考えられます。AAVを用いた手法のほうが数段効果は高いのですが、その分高い技術と費用がかかります。したがって、効果は低いのですが、簡単で安価なプラスミドDNAを用いた手法が使われやすいのかもしれませんが、そして、我々が成功したIGF-Iの組み換え遺伝子導入が、方法が確立しているという点で、最初に使われる可能性が高いと思われる。

このような手法による“遺伝子ド

ーピング”は、残念ながら現在行われているドーピングテスト (尿と血液からの検査) では探知することはできません。なぜなら、先ほどお話ししたように少なくとも過剰に発現したIGF-IIは血中に出てこないからです。このような“遺伝子ドーピング”を検知するためにはバイオプシーを行う必要があります。つまり、バイオプシーによって筋組織を採取して筋自体のDNA解析をする以外、今のところ方法がないと言えるでしょう。

山内 現実的にはバイオプシーをアスリートに頻繁に行うことは難しいでしょう。大会直前や期間中は当然のことながら、それ以外の実施でも競技成績に影響を与えかねません。そのように、検査が困難になると“遺伝子ドーピング”をただ単に違反として解決できない問題にな

ってきます。私自身、アスリートへの遺伝子治療の応用がすべて“悪”だとは思っていません。例えば、膝靭帯や軟骨の損傷の修復や強化、あるいは野球投手などの肘や肩まわりの腱や靭帯の補強などにも応用できるような気がします。そうしたことも踏まえ、遺伝子治療、ドーピングの存在は今後どのようにスポーツ界、アスリートの身体能力に影響して考えると考えられますか。

H.L.S. ヒトにおける遺伝子治療の方法とその安全性が確立されたならば、誰もその使用を止めることはできないと思います。「ドーピング」と「治療」の境界線をどのように引くかは今後の課題になってくるでしょう。また、“遺伝子ドーピング”の存在はすでにトップにいるアスリートよりも二番手にいるアスリートに影響を与えると考えられます。なぜならば、すでにトップで活躍しているアスリートは遺伝的に特異な才能を持って生まれている人が多いと考えられるからです。極論ではありますが、「才能」とは“スーパーベイベー”のように生まれながらにして、なんらかの遺伝子に特異的な変異のあることです。今後、この「才能」の源である遺伝子の存在が明らかになってくるでしょう。そして、将来“遺伝子ドーピング”が流用されるようになったならば、このような「才能」による選手間の差がなくなってくるのかもしれませんが。また、“遺伝子ドーピング”ではなく遺伝子治療としてアスリートに応用されることが可能になれば、ケガの予防や早期回復が可能となり、アスリートの身体能力を高めるというだけでなく、特にプロスポーツの選手生命が長くなるようなことも起きてくるのかもしれませんが。

山内 本日は大変お忙しい中、興味

■治療とドーピング

最近、大リーグの薬物問題が法廷内で論争されており、大きな話題となっている。また、アーノルド・シュワルツネッガー氏がボディビル大会で薬物の使用禁止を訴える一方、彼自身は現役選手時代に医師の処方の下で薬物を使っていたことを公に認めた。

アスリート、つまり健康者の過剰な薬物使用は健康面を損なう危険性やスポーツのフェア精神に反するなどの点でドーピングとして禁止されている。一方、このようにスポーツ界で患者扱いをされてきている薬は実際には患者への治療薬として発展してきた。現在、遺伝子治療に関する研究は飛躍的に進み、技術面、安全面 (例えば、ベクターとなるウイルスの抗原性や病原性など) の問題がまだ多くあるが、近い将来遺伝性疾患への使用が期待されている。また、一連の遺伝子治療の研究として、化学療法、つまり新たな薬による遺伝性疾患の治療も試みられている。

筋ジストロフィー症などの遺伝性疾患に薬物治療の可能性を示した重要な研究成果として、スウィーニー教授ら (Barton-

Davis et al.1999) や松田助教授ら (Arakawa et al 2003) がある種の抗生物質によって欠損しているジストロフィン遺伝子の回復を促すことを報告している。これは同時に薬によって特定の遺伝子の機能を自由にONもしくはOFFにできる可能性も示唆している。実際に、スウィーニー教授らの研究グループでは筋の成長と再生に大きな役割をしているミオスタチンの阻害剤やIGF-Iの促進剤なども開発中である。

このことはスポーツ界への新たなドーピングの悪用も想像させる。これまでの男性ホルモン (テストステロン) や成長ホルモンなどを直接体内に注入する充填療法によるドーピングに変わって、ある種の薬によって特定遺伝子の機能促進もしくは阻害を働きかけることで、パフォーマンスの向上が可能となってくるかもしれない。現在問題にされている各種ホルモン充填によるドーピングもホルモン欠損患者の治療法の一つである。

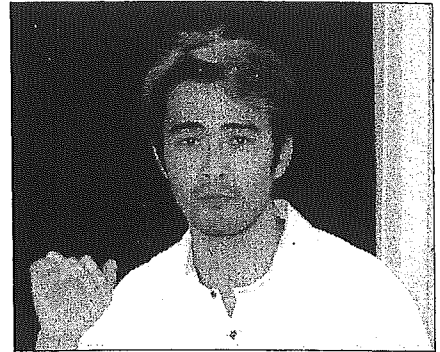
治療とドーピングの明と暗、それぞれの価値観や必然性から生まれる科学を超えた社会的な問題の一つと言える。

深いお話を伺うことができ光栄に思います。ありがとうございました。
(編集・企画協力/向山理・制作集団スポーツ会議ネットワーク)

[引用・参考文献]

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholeslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S & Matsuda R (2003). J Biochem (Tokyo) 134, 751-758.
Barton, E R. Morris, L. Musaro, A. Rosenthal, N. Sweeney, H L (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice J Cell Biol 157, 137-148.
Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE & Sweeney HL (1999). J Clin Invest 104, 375-381.

Barton-Davis, E R. Shoturma, D I. Sweeney, H L (1999). Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. Acta Physiol Scand 167, 301-305.
Lee, S. Barton, E R. Sweeney, H L. Farrar, R P (2004). Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. J Appl Physiol 96, 1097-1104.
Schuelke, M. Wagner, K R. Stolz, L E. Hubner, C. Riebel, T. Komen, W. Braun, T. Tobin, J F. Lee, S J (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med 350, 2682-2688.
Wang, Y X. Zhang, C L. Yu, R T. Cho, H K. Nelson, M C. Bayuga-Ocampo, C R. Ham, J. Kang, H. Evans, R M (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. PLoS Biol 2, e294.
山内潤一郎 (2001). トレーニング・ジャーナル 258, 76-77.



山内潤一郎(やまうち・じゅんいちろう) 神奈川県生まれ。神奈川県立生田高等学校卒業後、アメリカSanta Barbara City College (CA) でスポーツ医学、体育学、エクササイズ科学准学士号をそれぞれ取得。その後オーストラリアに渡り、University of Wollongong (NSW) で人間行動科学学士号、エクササイズ科学修士号を取得。また同時に公認マッサージ・セラピスト、公認フィットネス・トレーナー (ISSA : MFS) などの資格取得。ヒトの生理学を始めとする身体機構の持つ不思議と可能性を探求している。

パフォーマンス向上のもう一つのツール

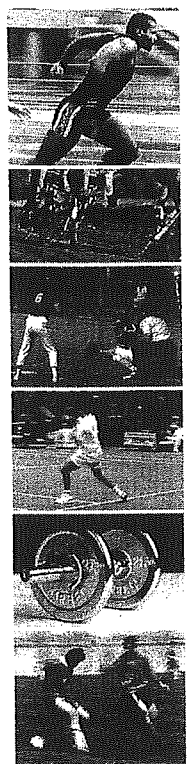
スポーツサプリメント専門店ボディプラスグループは、最も効果的なパフォーマンス向上スポーツサプリメントとフィットネス製品を日本のアスリートにお届けしています。
みなさまのご利用を心よりお待ちしております。



個人輸入部門 ボディプラスUSA
フリーダイヤル:0120-199-291 (携帯・PHSから022-792-1736)
簡単オンラインショッピング:www.bodyplususa.com
Email:order@bodyplususa.com



ジム・チーム・卸売部門
ボディプラスディストリビューション
無料カタログ問い合わせ先
電話:022-292-4650
Email: info@bpd.co.jp



サプリメントフィードバック、アドバイス、モニター&プレゼント情報はコチラ → www.bodyplusbbs.com

Synthesis and Activity of Tyropeptin A Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of Mammalian 20S Proteasome

Isao MOMOSE,^{1,†} Yoji UMEZAWA,² Sehei HIROSAWA,³ Masatomi IJIMA,¹ Hironobu INUMA,² and Daishiro IKEDA¹

¹Numazu Bio-Medical Research Institute, Microbial Chemistry Research Center, 18-24 Miyamoto, Numazu city, Shizuoka 410-0301, Japan

²Microbial Chemistry Research Center, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan

³Hiyoshi Medicinal Chemistry Research Institute, Microbial Chemistry Research Center, 3-34-17 Ida, Nakahara-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 211-0035, Japan

Received April 12, 2005; Accepted June 1, 2005

Tyropeptin A, a potent proteasome inhibitor, was isolated from the culture broth of *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. We synthesized the derivatives of tyropeptin A to enhance its inhibitory potency. Among the synthesized derivatives, the most potent compound, TP-104, exhibited a 20-fold inhibitory potency enhancement for chymotrypsin-like activity of 20S proteasome compared to tyropeptin A. Additionally, TP-110 specifically inhibited the chymotrypsin-like activity, but did not inhibit the post-glutamyl-peptide hydrolyzing (PGPH) and the trypsin-like activities of 20S proteasome. *In vitro* TP-110 strongly inhibited the growth of various cell lines.

Key words: proteasome inhibitor; tyropeptin A derivative

The 26S proteasome consists of a central catalytic 20S proteasome and two terminal regulatory complexes, termed PA700 (also known as the 19S regulatory complex), which are attached to both ends of the central portion.^{1,2)} The 20S proteasome is a large cylindrically-shaped complex composed of two copies each of seven distinct α - and seven distinct β -type subunits. The 20S proteasome possesses at least three distinctive protease activities: PGPH, trypsin-like and chymotrypsin-like.

The ubiquitin-proteasome pathway is involved in many biological processes. In particular, numerous regulatory proteins, which are critical to tumor growth, are degraded by this pathway.^{3–6)} Proteasome inhibitors can stabilize these regulatory proteins, and cause cell cycle arrest and apoptosis, and, as a result, can limit tumor development. Therefore, proteasome inhibitors can be useful for cancer treatment. The dipeptide boronic acid proteasome inhibitor, PS-341,^{7,8)} has already been approved as a therapeutic agent for multiple myeloma

patients.

We have previously found a new proteasome inhibitor, tyropeptin A, which was produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2.^{9–11)} The structure of tyropeptin A is isovaleryl-L-tyrosyl-L-valyl-DL-tyrosinal. To enhance its inhibitory potency, we constructed a structural model of tyropeptin A bound to the site responsible for the chymotrypsin-like activity of mammalian 20S proteasome.¹²⁾ Based on these modeling experiments, we designed several derivatives of tyropeptin A. We report here the synthesis and activity of a series of tyropeptin A derivatives in detail.

Results and Discussion

The structural model for tyropeptin A bound to the site responsible for the chymotrypsin-like activity of 20S proteasome suggested the presence of an open space in the vicinity of its *N*-terminal.¹²⁾ We thought that the compound that was able to fill the open space might exhibit enhanced inhibitory activity against the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome. Since the isovaleryl moiety in tyropeptin A only partially filled this area, therefore, we designed tyropeptin A derivatives having a bulky *N*-terminal moiety. Tyropeptin A derivatives modified at the *N*-terminal moiety of tyropeptin A were synthesized as shown in Scheme 1. The Boc group of **1**¹⁰⁾ was removed with TFA, and the resulting free amine was coupled to a variety of acids (R-CH₂COOH). Resulting **2** was hydrogenolyzed with palladium on charcoal to give **3**. Oxidation of the primary alcohol of **3** with sulfur trioxide in DMSO gave a tyropeptin A derivative modified at the *N*-terminal moiety (TP-101, TP-102, TP-105 and TP-111) as an epimeric mixture (approximately 1:1). The naphthyl-derivatives (TP-103 and TP-104) were prepared from

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-55-922-6888; E-mail: imomose@bikaken.or.jp
Abbreviations: PGPH, post-glutamyl-peptide-hydrolyzing; Tyral, Tyrosinal; Tyrol, Tyrosinol