

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01847

研究課題名(和文)筋萎縮予防に有益な健康食品成分の探索に向けたBirA酵素標識法の応用

研究課題名(英文) Application of BirA enzyme-labeling methods for the discovery of health food ingredients to prevent muscle atrophy

研究代表者

上田 修司 (Ueda, Shuji)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：50379400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、大腸菌ビオチン修飾酵素のビオチンリガーゼ変異体(BirA)を用いたBioID酵素標識法技術を基盤に、ヒートショック蛋白質(HSPBs)を介した筋肉増減に関わる重要分子の探索を行った。その結果、小胞体ストレスによる筋萎縮の抑制に有益なHSPBsの細胞保護機能に関する複数の分子の同定に成功し、筋細胞の小胞体ストレス応答において、Polo like kinase2(PLK2)/HSPB5経路を介した細胞ストレス保護機能の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者では、筋力及び筋肉量が低下し、持続的な運動負荷により改善が期待される。しかし、高齢者の効果的な筋萎縮予防の実践には、過度な運動負荷による身体への負担が懸念される。本研究では、HSPBsに着目し、筋萎縮の抑制に効果的なHSPBsの機能を明らかにした。今後、HSPBsの発現増加に着目した栄養成分を探索することで、過度な運動負荷に頼らない予防法の考案に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, based on the BioID enzyme labeling technique using a biotin ligase mutant (BirA), we searched for essential molecules involved in muscle atrophy via heat shock proteins (HSPBs). As a result, we succeeded in identifying several molecules that are included in the cytoprotective function of HSPBs to suppress muscle atrophy caused by endoplasmic reticulum stress. This result suggested cellular stress protection via the Polo-like kinase 2 (PLK2)/HSPB5 pathway in the endoplasmic reticulum stress response of muscle cells.

研究分野：動物資源利用学

キーワード：筋肉 ヒートショック蛋白質 BIOID2 老化 運動 健康機能性食品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者の骨格筋では、筋原線維蛋白質の変性、蛋白質の異化促進、運動神経の脱落を受け、筋線維タイプの遷移異常、筋分化能力の低下が起こり、筋力及び筋肉量が低下する。運動負荷は、高齢者であっても蛋白質の同化を促進し、筋力・筋肉量の改善が期待される。しかし、厚生労働省の「国民健康・栄養調査」(H25年)によると、70歳以上の高齢者では低栄養の傾向があり、高齢者の筋力低下の予防には、持続的な筋力トレーニング(運動負荷)に加え、栄養面での改善が求められている。

2. 研究の目的

我々は、大腸菌ビオチン修飾酵素の BirA(Roux et al. J Cell Biol 196:801, 2012)を用いた BirA 酵素標識法を導入し、ヒートショック蛋白質(HSP)の結合蛋白質の探索を進めている(図 1. A & B)。

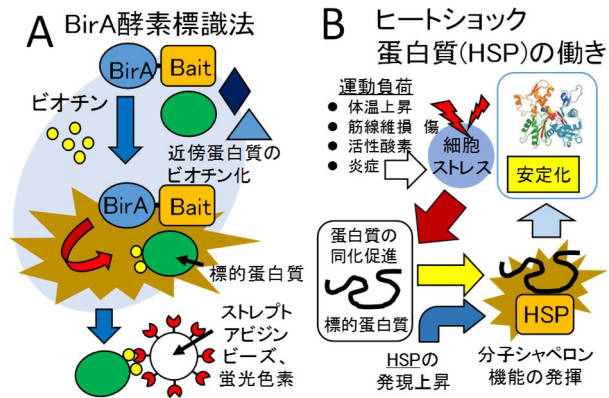


図 1. BioID 法の原理

本課題では、加齢に伴う骨格筋の小胞体ストレスの増加に着目し、小胞体ストレスの抑制に関わる低分子量ヒートショック蛋白質(HSPB)の結合蛋白質の探索と、その結合蛋白質の機能解析を通して、筋萎縮の予防に繋がる分子機序の解明を図った。また、HSPBに着目した有益な栄養成分の探索を行った。

3. 研究の方法

BirA 融合蛋白質として、改変型 BioID2(Kim et al. MBoC 27:1188, 2016)を融合した HSPB1 及び HSPB5 の発現プラスミドを作成した。蛋白質のビオチン標識は、BirA 融合蛋白質発現ベクターを遺伝子導入後、培養培地にビオチンを添加し、16 時間培養することで行った(図 2. A, B & C)。ビオチン化蛋白質は、HRP 標識ストレプトアビジンを用いたウエスタンブロッティングによって検出した。ビオチン化蛋白質の同定は、トリプシン消化によるペプチド断片化後、Tamavidin 2-REV 磁性ビーズでビオチン化ペプチドを回収し、穏やかな条件で溶出後、ナノ高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (nanoLC/MS/MS) を用いて行った。

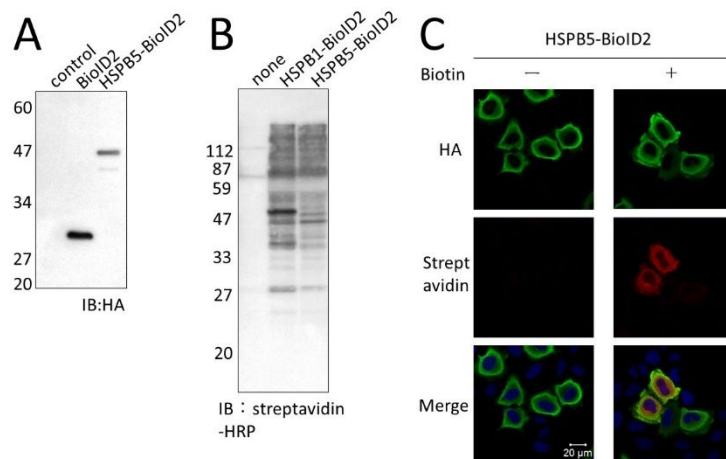


図 2. HSPBs-BioID2 の発現及び BioID 活性確認

4. 研究成果

1) HSPBs の網羅的な結合蛋白質の探索

HSPB5-BioID2 発現プラスミドを 293T 細胞に遺伝子導入し、プロテオーム阻害剤(MG132)による小胞体ストレス刺激後、ビオチン化の比較を行った。MG132 未処理の細胞に比べ、MG132 刺激後の細胞では、多くのビオチン化蛋白質のバンドが検出された。ビオチン化蛋白質を質量分析で解析した結果、310 個の蛋白質が同定された。これらの蛋白質のパスウェイ解析の結果を図 3 に示す。

小胞体ストレス条件下における HSPB5 の結合蛋白質は、アルツハイマー病やハンチントン病など神経変性疾患関連蛋白質、細胞骨格関連蛋白質、ユビキチン・プロテアソーム関連蛋白質が多く検出された。

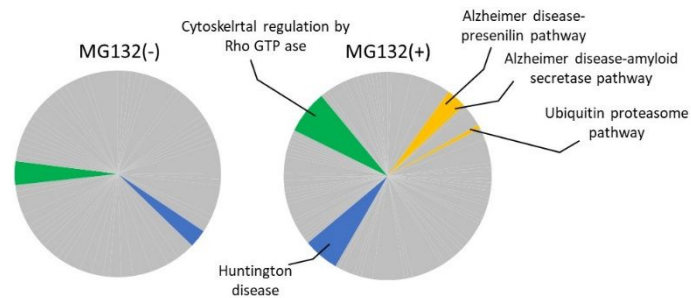


図 3. 同定された蛋白質の分類

小胞体ストレス下において、HSPB5 は、これらの蛋白質のシャペロン分子として機能し、蛋白質の凝集抑制などに機能していることが示唆された。

HSPB5 のシャペロン機能の調節機構に関する研究として、HSPB はリン酸化修飾によって機能制御されているため、蛋白質のリン酸化酵素で且つ、質量分析のスコアが最も高かった Polo like-kinase 2 (PLK2)に着目し、HSPB5 の新規の結合蛋白質として研究を行った。PLK2 は、キナーゼ触媒ドメインと PB ドメインを有し、N 末のリジン残基の 91 番目、95 番目、115 番目が BioID2 によってビオチン化されていることが質量分析の結果から確認された(図 4)。

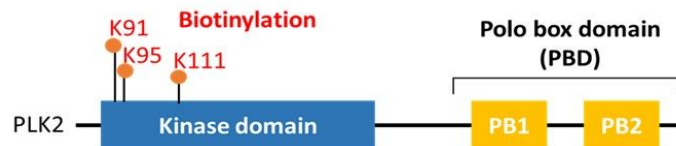


図 4. PLK2 のビオチン化部位

PLK2 は、細胞増殖や DNA 損傷応答などで機能する PLK ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、癌などの疾患などにも関与していることが知られているが、そのリン酸化の基質となる蛋白質は殆ど知られていない。

まず、筋管に分化誘導後の L6 細胞において、小胞体ストレス応答を検討した。MG132 刺激後、HSPB5 及び PLK2 蛋白質は、小胞体ストレスのマーカーである CHOP、PDI と共に、有意な発現増加が確認された。次に、HSPB5 と PLK2 の結合を免疫沈降法で確認したところ、MG132 刺激依存的に結合が認められ、HSPB5 は MG132 依存的に細胞質から小胞体付近に移行し、PLK2 と共局在することが共焦点顕微鏡による観察から確認された。また、PLK2 キナーゼ活性阻害剤 (BI2536) の添加により、HSPB5 の MG132 刺激依存的な小胞体付近への移行が抑制され、HSPB5 のシャペロン機能に関するセリン 19、セリン 45、セリン 59 番目の 3 つのリン酸化が抑制された。以上の結果より、PLK2 は、HSPB5 をリン酸化し、小胞体ストレスの制御を担っていることが考えられる。

2) HSPBs を標的とした栄養成分の探索

食物に含まれるジペプチドは、多様な生理機能を有する。例えば、アラニンとヒスチジンから成るジペプチドである L-カルノシンは、ヒートショック蛋白質の発現を誘導することが報告されている。本課題では、ジペプチドや、薬剤などを用いて HSPB 蛋白質の発現誘導を検討した。その結果、L6 筋細胞において、HSPB を発現誘導する複数の成分を同定した。本研究については、R02-05 年採択の基盤研究(C)「PL 標識法による筋線維芽細胞の力伝達に関わる新機能探索と筋力低下予防への応用」で、引き続き検討する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda S, Iwamoto E, Kato Y, Shinohara M, Shirai Y, Yamanoue M.	4. 巻 83
2. 論文標題 Comparative metabolomics of Japanese Black cattle beef and other meats using gas chromatography-mass spectrometry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 137-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2018.1528139.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 上田修司	4. 巻 2
2. 論文標題 機能性成分の探索に向けたBirA酵素標識法の応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 99-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 上田修司・吉野健一・山田聡一郎	4. 巻 86
2. 論文標題 タマビジンピーズのBirA酵素標識法への活用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 和光純薬時報	6. 最初と最後の頁 6-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 上田修司、吉野健一、山田聡一郎	4. 巻 vol. 86, No.1
2. 論文標題 Tamavidin-REVを用いたタンパク質間相互作用の網羅的解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 和光純薬時報	6. 最初と最後の頁 p. 6 - 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 榑谷晃帆, 上田修司, 前田愛実, 加藤良毅, 吉野健一, 竹内敦子, 山之上稔, 白井康仁
2. 発表標題 RhoA結合蛋白質として同定されたSTE20 like kinaseの筋細胞の肥大化における役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuji Ueda, Eiji Iwamoto, Yoshiki Kato, Masakazu Shinohara, Yasuhito Shirai, Minoru Yamanoue
2. 発表標題 Comparative metabolomics of skeletal muscle of livestock using gas chromatography mass spectrometry
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2018 ASCB/IFCB Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 修司、岩本 英治、白井 康仁、山之上 稔
2. 発表標題 質量分析計による黒毛和種牛肉の栄養成分のノンターゲット分析による検討
3. 学会等名 日本畜産学会第123回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshiki Kato, Yoshito Kokaji, Ken-ichi Yoshino, Atsuko Takeuchi, Minoru Yamanoue, Yasuhito Shirai, Shuji Ueda
2. 発表標題 HSPB1 protein increases actomyosin ATPase activity of myofibrils fraction
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2017 ASCB/IFCB Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akiho Kushiya, Soichiro Yamada, Yoshino Ken-ichi, Yoshiki Kato, Atsuko Takeuchi, Luc A Sabourin, Andrey V. Cybulsky, Minoru Yamanoue, Yasuhito Shirai, Shuji Ueda
2. 発表標題 Investigation of RhoA binding proteins using BioID system
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2017 ASCB/IFCB Meeting
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考