

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19219

研究課題名（和文）筋肥大シグナルを受容する新規筋収縮センサータンパク質の探索

研究課題名（英文）Analysis of sensor proteins which receive signals of muscle contraction

研究代表者

清水 誠（Shimizu, Makoto）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授

研究者番号：40409008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我が国を含め高齢者人口は劇的に増加し続けている。寝たきり・要介護状態の高齢者が増加は医療・介護費が膨大化に繋がる。骨格筋は人体最大の組織であり、体を支持する重要な運動器である。寝たきりの主な要因は、加齢に伴う筋量・筋力の低下（サルコペニア）である。これらの背景からサルコペニアをいかに予防・軽減するかが喫緊の課題である。骨格筋運動により生じる適度な酸化ストレスは骨格筋肥大に重要であることが報告されている。しかしながら、筋肥大における酸化ストレスの分子機序は殆ど分かっていない。本研究では酸化ストレスによるタンパク質修飾に着目し、酸化ストレスシグナルの基礎研究、及び食品研究への展開を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は超高齢社会であり、寝たきり・要介護の繋がるサルコペニアをいかに予防・軽減するかが喫緊の課題である。骨格筋量の制御に関しては、タンパク質分解酵素やIGF1による研究が多数報告されている。本研究では、これまであまり着目されていない酸化修飾について研究を進めることで、サルコペニア予防の多角化に繋がることを期待される。また、in vitroで骨格筋収縮実験系を用いて、筋収縮に应答する酸化修飾タンパク質の候補分子を見出した。本研究をさらに継続することで、サルコペニア予防の選択肢が広がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In several countries, aging society is a serious problem. Increase of elder people who need care leads to an enlargement of costs of medical and nursing cares. Sarcopenia, an age-related muscle loss, is a major cause of bedridden, suggesting that prevention of sarcopenia is a urgent issue. An appropriate oxidative stress derived from exercise is important for skeletal muscle hypertrophy. However, a mechanism how oxidative stress regulates hypertrophy is unknown. In this study, we investigate a role of oxidative stress signaling based on a protein modification, and attempted an application of food chemistry.

研究分野：食品科学

キーワード：骨格筋 酸化修飾 電気刺激 C2C12

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 高齢化社会と骨格筋

我が国を含め高齢者人口は世界レベルで増加し続けている。寝たきり・要介護状態の高齢者の増加は医療・介護費が膨大化に繋がる。骨格筋は人体最大の組織であり、体を支持する重要な運動器である。寝たきりの主な要因は、加齢に伴う筋量・筋力の低下(サルコペニア)である。これらの背景からサルコペニアをいかに予防・軽減するかが喫緊の課題である。

#### (2) 高齢者と筋肥大

レジスタンス運動など高強度の骨格筋動作を行うことにより、筋量・筋力の低下は予防可能である。しかし、高強度運動の継続は高齢者にとって必ずしも容易ではない。このことから、骨格筋量の制御メカニズムの全容を明らかにし、効率的なサルコペニア予防法を提案することが重要と考えられる。

#### (3) 筋肥大と酸化ストレス

これまで酸化ストレスは細胞・生体毒性を有する有害物として考えられてきた。しかし近年、酸化ストレスは生体に必須の生体内シグナルとして重要な機能を有することが報告されている。骨格筋においても、過剰な酸化ストレスは骨格筋量を低下するが、軽～中程度の運動で発生する適度な酸化ストレスはむしろ骨格筋の抗酸化能の亢進や筋肥大効果を有することが報告されている。筋肥大効果における酸化ストレスの作用機序等は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

#### (1) 筋収縮由来の酸化ストレス検出系の構築

運動は、骨格筋を含む複数の組織が連動する複雑な身体活動である。骨格筋収縮による応答シグナルを高感度に検出するため、電気パルス刺激 (EPS; electrical pulse stimulation) を用いた培養細胞及び動物の実験系を使用する。電気パルス刺激による筋収縮マーカー遺伝子を確認した上で、酸化ストレスシグナル(遺伝子発現、活性酸素種など)の検出を試みる。

#### (2) 骨格筋収縮による酸化修飾タンパク質の探索

酸化ストレスは、タンパク質や脂質など様々な分子を修飾することが知られている。このことより、筋収縮に応答する酸化修飾タンパク質の同定及び機能解析を目的とした。酸化修飾(グルタチオン化)を惹起することが知られている。上記の筋収縮実験系を用いて、骨格筋により酸化修飾を受けるタンパク質の同定を目指す。同定された場合、修飾部位の同定、修飾によるタンパク質の機能解析を行う。本研究で同定されたタンパク質は筋収縮シグナルを受容する新たなセンサータンパク質であると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 筋収縮由来の酸化ストレス検出系の構築

骨格筋収縮を再現するため、電気パルス刺激 (EPS; electrical pulse stimulation) を用いて培養細胞及び実験動物の骨格筋に筋収縮刺激を与えた。培養細胞への EPS は ion optix 社の機器を用いて、1Hz, 2msec, 10~40V の条件で行った。実験動物(ラット)に対しては竹井機器(ラットトルク測定器)及び日本光電社製の機器を用いて、main interval 10sec, interval 10msec, duration 4msec, train 300 の条件を 10 セット行った。細胞内の活性酸素種の検出は細胞浸透性蛍光プローブである DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) を使用した。筋収縮による酸化ストレスの検出は困難である可能性があるため、過酸化水素など強力な酸化ストレス誘導材をコントロールとして実験を実施した。

#### (2) 骨格筋細胞の培養

マウス C2C12 細胞は DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) に 10%ウシ血清及び抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン)を添加した培地で培養した。骨格筋細胞への分化は 2%ウマ血清を含む D-MEM 培地で実施した。

#### (3) 動物実験

日本クレア社より雄性 SD ラット(10週齢)もしくは雄性 C57Bl/6 マウス(7週齢)を購入し、固形飼料(NOSAN)と滅菌蒸留水を自由摂取させ、12時間の明暗サイクル下でケージにて飼育し

た。1週間の順化の後、動物実験に供した。

#### (4) 修飾タンパク質の解析

骨格筋細胞に分化させた C2C12 細胞にグルタチオンアナログである BioGEE (Biotinylated glutathione ethyl ester) を添加し、その後電気パルス刺激などを行い、タンパク質抽出液を調製した。BioGEE を用いたグルタチオン化は、HRP 標識されたストレプトアビジンを用いて検出した。また一部の実験ではグルタチオン抗体を用いたウェスタンブロットを実施した。

#### (5) 骨格筋への遺伝子導入実験

各遺伝子の発現プラスミドもしくは siRNA を、以前に我々が構築した *in vivo* エレクトロポレーション法を用いてマウス骨格筋へ導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) 筋収縮由来の酸化ストレス検出系の構築

分化させたマウスの培養骨格筋細胞 (C2C12 細胞) に電気パルス刺激を与え、16 時間収縮させた後に細胞を回収し、タンパク質解析を行った。電気パルス刺激により、骨格筋細胞の収縮が視認され、運動に応じて骨格筋細胞より分泌されるマイオカイン (IL-6 など) の発現亢進が確認された。遺伝子発現解析の結果、酸化ストレスで活性化される転写因子 NRF2 の標的遺伝子 HO-1 (heme oxygenase-1) の発現が電気パルス刺激により増加することが示された。蛍光プローブ DCFH-DA を用いた実験の結果、筋収縮による活性酸素種の増加が確認された。以上の結果から、骨格筋収縮由来の酸化ストレスシグナルの実験系の構築に成功した。

#### (2) 骨格筋収縮による酸化修飾タンパク質の探索

グルタチオンアナログ BioGEE を用いて、筋収縮による酸化修飾タンパク質の探索を試みた。骨格筋培養細胞 C2C12 細胞に BioGEE を添加し、電気パルス刺激を与えた。ウェスタンブロットの結果、筋収縮に応じて変動する複数のバンドが確認できた。電気パルス刺激によりグルタチオン修飾タンパク質の増加を予測していたが、減少しているタンパク質が数多く確認された。

次に、免疫沈降法もしくはプルダウン法による酸化修飾タンパク質の精製及び同定を試みた。グルタチオン抗体を用いた免疫沈降では明瞭なバンドを得ることができなかった。プルダウン法を採用した結果、複数のタンパク質バンドを得ることができた。様々な検討実験の結果、いくつかのタンパク質は骨格筋の主要なタンパク質である可能性が示された。各タンパク質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットの結果、電気パルス刺激による変動が認められた。

培養細胞の実験結果が組織レベルでも再現できるか、ラットを用いた動物実験により検証した。ラットの腓腹筋に電気パルス刺激を与えた結果、筋収縮を視認でき、且つタンパク質解析の結果、収縮に応答するシグナル分子の活性化が確認された。動物実験では多量の BioGEE が必要であるため、免疫沈降による実験を試みた。その結果、2 つタンパク質 (タンパク質 A、タンパク質 B) では培養細胞と同様の結果を得ることができた。

これらのタンパク質の機能解析のため、発現プラスミドを構築し、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いたマウス骨格筋での強制発現実験を行った。筋重量など様々な骨格筋機能のパラメーターの検討を行ったが、センサータンパク質による顕著な変動は認められなかった。siRNA の導入に関しては技術的に困難であったため、現在他の方法による *in vivo* ノックダウン実験を試みている。引き続き研究を継続し、センサータンパク質による筋肥大効果や食品成分のスクリーニング実験を実施する予定である。

#### < 引用文献 >

Orange peel extract reduces the inflammatory state of skeletal muscle after downhill running via an increase in IL-1RA. Suzuki T, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. Biosci Biotechnol Biochem. in press.

Polymethoxyflavones in orange peel extract prevent skeletal muscle damage induced by eccentric exercise in rats. Suzuki T, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. Biosci Biotechnol Biochem. 2021 Feb 18;85(2):440-446.

Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose-intolerant mice. Sasaki T, Watanabe Y, Kuboyama A, Oikawa A, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. J Biol Chem. 2020 Dec 1;296:100131.

Functional effect of nobiletin as a food-derived allosteric modulator of mouse CRFR2 in skeletal muscle. Chikazawa M, Moriwaki Y, Uramoto M, Yamauchi Y, Shimizu M, Shimizu K, Sato R. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Aug 20;529(2):328-334.

Ring finger protein 5 activates sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) to promote cholesterol biosynthesis via inducing polyubiquitination of SREBP chaperone SCAP. Kuan YC, Takahashi Y, Maruyama T, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. *J Biol Chem*. 2020 Mar 20;295(12):3918-3928.

Bridging molecules are secreted from the skeletal muscle and potentially regulate muscle differentiation. Chikazawa M, Shimizu M, Yamauchi Y, Sato R. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Jan 29;522(1):113-120.8

Chrysin reduces the activity and protein level of mature forms of sterol regulatory element-binding proteins. Iwase M, Watanabe K, Shimizu M, Suzuki T, Yamamoto Y, Inoue J, Sato R. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2019 Sep;83(9):1740-1746.

FGF21 Alleviates Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress under Physiological Conditions. Maruyama R, Shimizu M, Hashidume T, Inoue J, Itoh N, Sato R. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2018;64(3):200-208.

Isoxanthohumol stimulates ubiquitin-proteasome-dependent degradation of precursor forms of sterol regulatory element-binding proteins. Inoue J, Miyata S, Shimizu M, Sato R. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018 Sep;82(9):1591-1598.

The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, Murata S, Shimizu M, Inoue J, Mori K, Sato R. *J Biol Chem*. 2018 Jun 29;293(26):10322-10332.

The expression of Transmembrane Protein 100 is regulated by alterations in calcium signaling rather than endoplasmic reticulum stress. Kuboyama A, Sasaki T, Shimizu M, Inoue J, Sato R. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018 Aug;82(8):1377-1383.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Toshihide, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Polymethoxyflavones in orange peel extract prevent skeletal muscle damage induced by eccentric exercise in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 440 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbba036	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 Sasaki Takashi, Watanabe Yuichi, Kuboyama Ayane, Oikawa Akira, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 296
2. 論文標題 Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose-intolerant mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100131 ~ 100131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.016203	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 Chikazawa Miho, Moriwaki Yoshitaka, Uramoto Mari, Yamauchi Yoshio, Shimizu Makoto, Shimizu Kentaro, Sato Ryuichiro	4. 巻 529
2. 論文標題 Functional effect of nobiletin as a food-derived allosteric modulator of mouse CRFR2 in skeletal muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 328 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.189	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 Kuan Yen-Chou, Takahashi Yu, Maruyama Takashi, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 295
2. 論文標題 Ring finger protein 5 activates sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) to promote cholesterol biosynthesis via inducing polyubiquitination of SREBP chaperone SCAP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3918 ~ 3928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011849	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 Chikazawa Miho, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 522
2. 論文標題 Bridging molecules are secreted from the skeletal muscle and potentially regulate muscle differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 113 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.010	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 Iwase Masamori, Watanabe Kyoko, Shimizu Makoto, Suzuki Tsukasa, Yamamoto Yuji, Inoue Jun, Sato Ryuichiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Chrysin reduces the activity and protein level of mature forms of sterol regulatory element-binding proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1740 ~ 1746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1608806	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 MARUYAMA Ryuto, SHIMIZU Makoto, HASHIDUME Tsutomu, INOUE Jun, ITOH Nobuyuki, SATO Ryuichiro	4. 巻 64
2. 論文標題 FGF21 Alleviates Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress under Physiological Conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 200 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.64.200	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 Inoue Jun, Miyata Shingo, Shimizu Makoto, Sato Ryuichiro	4. 巻 82
2. 論文標題 Isoxanthohumol stimulates ubiquitin-proteasome-dependent degradation of precursor forms of sterol regulatory element-binding proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1591 ~ 1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1478715	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 Sasaki Takashi, Kuboyama Ayane, Mita Moeko, Murata Shotaro, Shimizu Makoto, Inoue Jun, Mori Kazutoshi, Sato Ryuichiro	4. 巻 293
2. 論文標題 The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10322 ~ 10332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002733	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 Kuboyama Ayane, Sasaki Takashi, Shimizu Makoto, Inoue Jun, Sato Ryuichiro	4. 巻 82
2. 論文標題 The expression of Transmembrane Protein 100 is regulated by alterations in calcium signaling rather than endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1377 ~ 1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1464899	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
連携研究者	佐藤 隆一郎  (Sato Ryuichiro)  (50187259)	東京大学大学院・農学生命科学研究科・教授   (12601)	
連携研究者	柴田 貴広  (Shibata Takahiro)  (80447838)	名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授   (13901)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------