

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：31104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11554

研究課題名(和文)骨格筋における機械的刺激によるエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) A possible mechanism of the regulation of energy metabolism by mechanical stimulation of skeletal muscle

研究代表者

宇田 宗弘 (Munehiro, Uda)

弘前学院大学・看護学部・准教授

研究者番号：80549262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋への機械的刺激や荷重負荷によるエネルギー代謝調節機構に関与する分子の一つとして神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)を想定し、ラットの尾部を懸垂し、後肢筋への荷重負荷を減少させた筋において、nNOSおよびミトファジー関連タンパク質を含むnNOSと相互作用する種々のタンパク質発現の変化を検討した。その結果、NOを合成するnNOSや、nNOSと結合してNOの合成に関わるHSP90、ミトコンドリアのタンパク質分解に関わるParkinが機械的刺激や荷重負荷によるエネルギー代謝の調節に関与している可能性が考えられた。しかしながら、詳細なメカニズムについてはさらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の不活動は筋の萎縮を生じさせるとともに、ミトコンドリアの機能を変化させたり、インスリン抵抗性を生じさせたりして、エネルギー代謝にも影響する。筋萎縮に伴うこれらの変化には一酸化窒素および一酸化窒素合成酵素が関係する可能性が示されているが、そのメカニズムは不明な部分も多い。本研究では骨格筋における神経型一酸化窒素合成酵素とミトコンドリアのタンパク質分解に関わるタンパク質が、筋の不活動時のエネルギー代謝の調節に関与する可能性を検討した。本研究の成果は、筋萎縮のみならず、生活習慣病の治療や予防方法の開発などに貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle disuse induces muscle atrophy and insulin resistance that affects energy metabolism. Although both nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (nNOS) may be involved in these changes associated with muscle atrophy, the mechanism remains unclear. We thus investigated the changes in nNOS expression and the proteins that interact with nNOS in hindlimb muscles after unloading. Furthermore, we investigated the alteration of PINK1 and Parkin expression, which are involved in mitochondrial proteolysis. The rats were randomly assigned to control and hindlimb unloading groups. Hindlimb unloading group was exposed to tail suspension for 14 days. Our results suggest that NO production in atrophied muscles may be reduced by hindlimb unloading. In addition, Parkin activity may be downregulated. Therefore, nNOS and its interacting proteins as well as Parkin could be related to the regulation of energy metabolism in the unloaded muscle. But additional studies are required.

研究分野：運動生理学

キーワード：筋萎縮 ミトコンドリア 神経型一酸化窒素合成酵素

1. 研究開始当初の背景

日常生活における身体活動量の低下、何らかの疾病によって入院した場合のベッド上での安静(ベッドレスト)、骨折した時に行うキプス固定など、骨格筋の不活動は筋の萎縮を生じさせるとともに、ミトコンドリアの機能を変化させたり、インスリン抵抗性を生じさせたりして、エネルギー代謝にも影響することが明らかにされている。しかしながら、筋の不活動、筋への機械的刺激や荷重負荷の減少とエネルギー代謝の関連についての詳細なメカニズムは未だ不明な部分も多い。このメカニズムを明らかにすることで、入院中または在宅での看護やリハビリテーション、介護の方法の開発、さらにインスリン抵抗性や2型糖尿病などの生活習慣病の治療薬や予防方法の開発など、健康管理や医療、介護などの広い分野に貢献することが期待できる。

一酸化窒素(NO)やNOを合成する一酸化窒素合成酵素(nNOS)は、筋萎縮やインスリン抵抗性、ミトコンドリアによるエネルギー産生に関わる可能性がある。筋細胞におけるNOは、筋細胞膜に局在するnNOSにより合成される。これまでの先行研究では、マウスやラットの尾部を懸垂し、後肢筋への荷重負荷を減少させると、骨格筋におけるnNOSの局在が変化し、この局在の変化が筋萎縮に関与する可能性が報告されている。またNOは骨格筋細胞におけるインスリンシグナル伝達経路とインスリンの感受性の変化に関与する。2型糖尿病患者ではnNOSの活性が低下していることが明らかにされており、また動物実験において、nNOSの機能を阻害することにより、筋細胞へのインスリン刺激による糖取り込みが減少することが報告されている。さらにnNOSおよびそれと相互作用するタンパク質が、ミトコンドリアの分解(マイトファジー)に関わるタンパク質であるPINK1やParkinの機能を制御することも報告されている。したがって、筋細胞におけるNOの産生やnNOSの局在の変化、さらにはnNOSと相互作用するタンパク質が、筋への荷重負荷の減少によって生じる筋萎縮やインスリン抵抗性およびミトコンドリア機能不全に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、骨格筋への機械的刺激や荷重負荷によるエネルギー代謝調節機構に関与する分子の一つとしてnNOSを想定し、ラットの尾部を懸垂し、後肢筋への荷重負荷を減少させた筋において、nNOSのリン酸化と、マイトファジー関連タンパク質を含むnNOSと相互作用する種々のタンパク質発現の変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では15週齢の雄のF344ラットを使用した。ラットを尾部懸垂(HU)群(6匹)と対照(CON)群(6匹)に分け、HU群は2週間の尾部懸垂を行った。2週間の尾部懸垂期間が終了したのち、すべてのラットのヒラメ筋と足底筋を採取した。採取したヒラメ筋と足底筋からタンパク質を抽出したのち、ウエスタンブロット法でnNOS、活性化したnNOS(p-nNOS(S1446))、nNOSがNOを合成する際に必要となるタンパク質であるHSP90、PINK1、Parkin、Parkinが働く際に必要となるHSP70の発現を分析した。また活性酸素の産生などによる酸化ストレスの指標となるMDA、活性酸素とNOが反応することにより生成されるニトロトリプトファン(6-NO₂-Trp)含有タンパク質、NOによる翻訳後修飾であるニトロシル(SNO)化タンパク質についても検討した。Parkinは標的タンパク質をユビキチン化し、標的タンパク質の分解を促進する。したがって、Parkin活性の指標として、Parkinの標的タンパク質であるミトフシン2(MFN2)のユビキチン化を分析した。MFN2のユビキチン化の検討は、抗MFN2抗体で免疫沈降してMFN2を回収し、ウエスタンブロット法でMFN2のユビキチン化を分析した。

4. 研究成果

ヒラメ筋の筋重量はCON群に比して、HU群において約40%の減少を示した。また体重当たりのヒラメ筋相対重量もHU群が約20%減少した。

nNOS、p-nNOS(S1446)発現はCON群に比べ、HU群において有意な増加を示した(図1A)。nNOSが機能する際に必要となるHSP90発現はHU群で有意に減少した(図1B)。活性酸素の産生増加などによって生成するMDAは、HU群で有意な増加を示した一方で(図1C)、活性酸素とNOの反応によって生じる6-NO₂-Trp含有タンパク質は有意に減少した(図1D)。したがって、萎縮したヒラメ筋では活性化したnNOSは増加しているものの、nNOSが機能する際に必要となるHSP90が減少し、また活性酸素とNOから生じる6-NO₂-Trp含有タンパク質も減少しており、NOの産生は低下している可能性が示唆された。

ミトコンドリアの分解に関わるPINK1(図2A)とParkin(図2B)の発現は、HUにより変化しなかった。しかしながら、Parkinが働く際に必要となるHSP70の発現はHU群で低下しており(図2C)、またMFN2のユビキチン化は有意な減少を示した(図2D)。これらの結果から、萎縮したヒラメ筋ではParkinの機能が低下している可能性が示唆された。

次に足底筋の分析結果を示す。足底筋の筋重量はCON群に比して、HU群において約26%

の減少を示したが、体重当たりのヒラメ筋相対重量はHU群が約4%の減少であった。

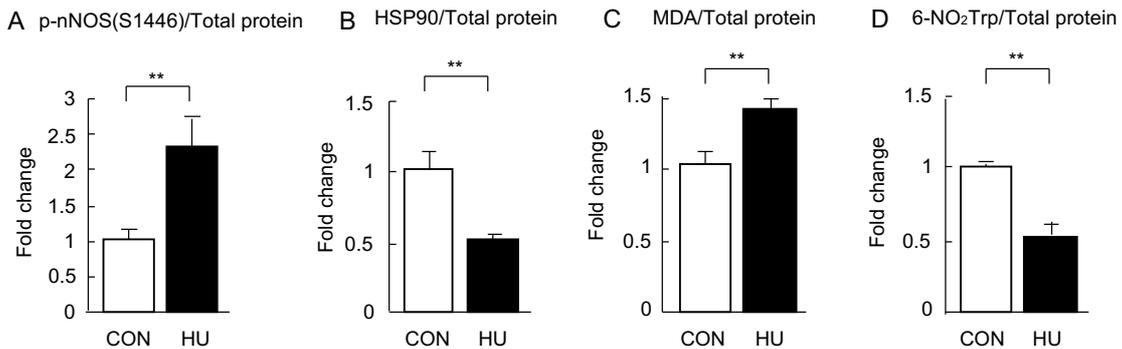


図1 対照(CON)群と尾部懸垂(HU)群におけるp-nNOS(S1446)(A), HSP90(B), MDA(C), 6-NO₂Trp(D)発現の比較

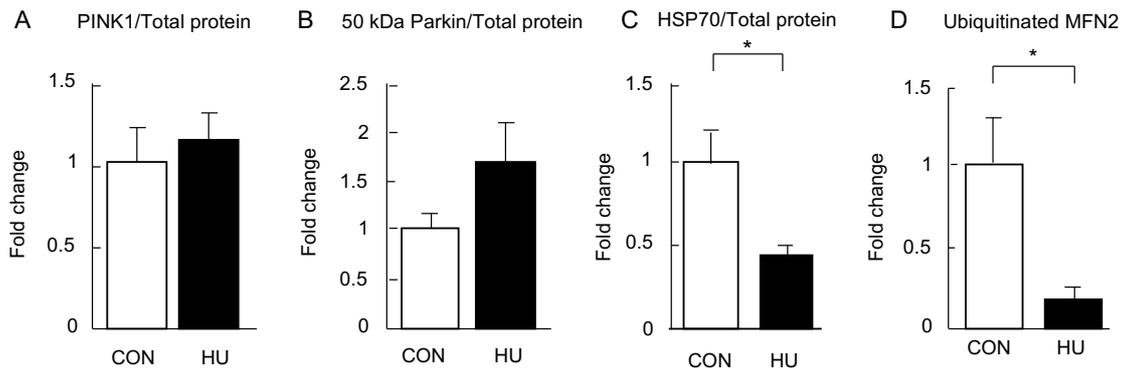


図2 対照(CON)群と尾部懸垂(HU)群におけるPINK1(A), Parkin(B), HSP70(C), ユビキチン化されたMFN2(D)発現の比較

nNOS, p-nNOS (S1446), MDA の発現はHU による変化が認められなかった (図 3)。しかし HSP90 の発現はHU により減少する傾向が認められた (図 3)。また NO による翻訳後修飾である SNO 化タンパク質は CON 群に比して, HU 群において有意に減少した (図 3)。さらに PINK1 はHU により減少する傾向を示し, また Parkin の発現は HU 群で有意な減少を示した (図 3)。これらの結果から, 足底筋においても, 荷重負荷の減少により, NO の合成が低下し, またミトコンドリアのタンパク質の分解に関わる PINK1 と Parkin の機能が低下している可能性が示唆された。

本研究では, ラットの尾部を懸垂し, 後肢筋への荷重負荷を減少させて萎縮したヒラメ筋と足底筋において, NO の産生が低下している可能性が示唆された。また萎縮したヒラメ筋と足底筋では, ミトコンドリアのタンパク質の分解に関わる Parkin の機能が低下している可能性が示唆された。これらのことから, NO を合成する nNOS や, nNOS と結合して NO の合成に関わる HSP90, Parkin が機械的的刺激や荷重負荷によるエネルギー代謝の調節に関係している可能性が考えられる。しかしながら詳細なメカニズムについてはさらなる研究が必要である。

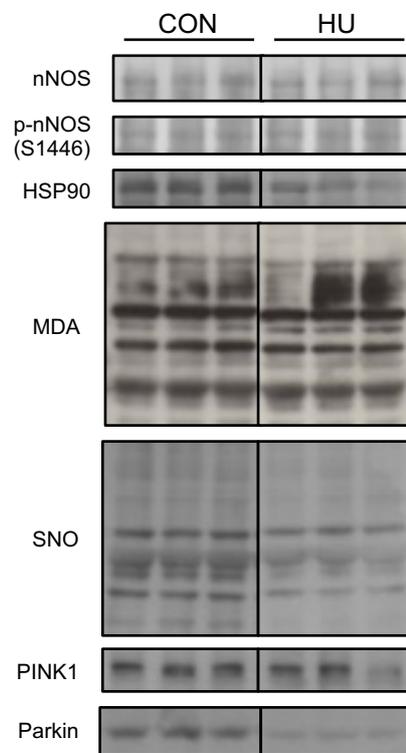


図3 対照(CON)群と尾部懸垂(HU)群におけるnNOS, p-nNOS(S1446), HSP90, MDA, SNO, PINK1, Parkin発現の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uda Munehiro, Yoshihara Toshinori, Ichinoseki-Sekine Noriko, Baba Takeshi, Yoshioka Toshitada	4. 巻 15
2. 論文標題 Potential roles of neuronal nitric oxide synthase and the PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin pathway for mitochondrial protein degradation in disuse-induced soleus muscle atrophy in adult rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0243660	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇田宗弘, 吉原利典, 関根紀子, 馬場猛, 吉岡利忠
2. 発表標題 ラットの足底筋におけるPINK1/Parkin経路とその標的タンパク質発現に対する尾部懸垂の影響
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会（三重県, オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田宗弘, 吉原利典, 関根紀子, 馬場猛, 吉岡利忠
2. 発表標題 廃用性筋萎縮に関わる可能性があるミトファジー経路
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会（鹿児島県, WEB開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇田宗弘, 吉原利典, 関根紀子, 馬場猛, 吉岡利忠
2. 発表標題 不活動による筋萎縮への活性窒素種の関与
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（茨城県）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------