

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：32616

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19478

研究課題名（和文）骨格筋細胞におけるアミノ酸エコシステムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Amino Acid Ecosystem in Skeletal Muscle Cells

研究代表者

長名 シオン（Osana, Shion）

国土舘大学・体育学部・講師

研究者番号：60868131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンパク質分解機構であるユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解産物であるアミノ酸が筋細胞内においてどのように再利用されるのかを明らかにすることを目的とし、標識アミノ酸を用いた検証に取り組んだ。その結果、仮説とは異なり分解由来アミノ酸は新規タンパク質合成の材料として再利用されておらず、エネルギー源として利用される可能性が明らかとなった。このことからタンパク質分解産物の使い分けの可能性や、ペプチド分解酵素による分子制御機構の可能性といった新しい生理現象を発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えている日本において加齢に伴う筋萎縮サルコペニア患者の増加が大きな健康課題となっている。筋萎縮・筋量低下は日常の運動量の低下をもたらす、さらにはQOLやADLの低下を加速させていくことから解決すべき喫緊の健康課題であると考えられる。本研究の筋細胞における新たなタンパク質代謝機構の解明という成果は、サルコペニア予防に向けた栄養学指導や運動指導法に対して新たなエビデンスを提供するとともに、タンパク質分解の制御分子を標的とした新しい筋萎縮治療法の確立に向けて貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify how amino acids, which are the products of proteolysis by the ubiquitin-proteasome system, are reused in muscle cells. The results suggested that, contrary to our hypothesis, the degradation-derived amino acids are not reused as a resource for the synthesis of new proteins, but may be used as an energy source. This finding led to the discovery of new physiological phenomena, such as the possibility of the usage of proteolytic degradation products and the possibility of molecular control mechanisms by peptidases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨格筋 プロテアソーム アミノ酸 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

骨格筋を維持することは日常生活の質を保つために重要な要因の一つであり、その骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスにより制御されている。これまでの研究成果により、タンパク質分解系であるプロテアソームの機能不全は骨格筋の機能・量を低下させることが明らかになっている。このことは、骨格筋を維持するためにはプロテアソームによる適切なタンパク質分解が重要であると考えられる。プロテアソームは分解標的となったタンパク質を 2~10 残基のペプチドに分解し、最終的にペプチド分解酵素であるアミノペプチダーゼによりアミノ酸にまで分解される(Saric T *et al.*, *J Biol Chem* 2004)。加えて、培養細胞においてプロテアソーム阻害によるタンパク質分解の抑制は細胞内アミノ酸量の減少やタンパク質合成の抑制を引き起こすことが報告されている(Surawear A *et al.* *Mol Cell* 2012)。これらの背景から、プロテアソームにはタンパク質分解を介して新たなタンパク質合成の材料となるアミノ酸を供給するアミノ酸リサイクルの役割が存在すると考えられている。しかしながら、これまでにタンパク質分解由来のアミノ酸を可視化・追跡した例は存在せず、プロテアソームによるアミノ酸リサイクルの多くは依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、プロテアソームによるタンパク質分解由来のアミノ酸が新規タンパク質合成に利用されるのか、また、どのように制御されるのかを明らかにすることを目的とし、骨格筋細胞におけるアミノ酸リサイクルシステムの実証とその分子制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

プロテアソーム依存的に分解されるタンパク質としてオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)に着目し、分解後のアミノ酸をトラッキングするために安定同位体標識アミノ酸であるリジンおよびアルギニンを導入した安定同位体標識 ODC(Iso-ODC)を作出した。プロテイントランスフェクション試薬 Xfect を用い、マウス筋芽細胞株 C2C12 に導入・分解させ、質量分析(LC-MS/MS)で安定同位体標識リジン・アルギニンを含むペプチドを検出し、Iso-ODC 以外のタンパク質合成に分解由来アミノ酸が再利用されているかを評価することでアミノ酸リサイクルを検証した(図 1)。



図1. アミノ酸リサイクル検証スキーム

4. 研究成果

Xfect 試薬により C2C12 に対して ODC を導入することが確認できた(図 2)。さらに導入後 30 分、3 時間時点でプロテアソーム依存的に ODC が分解されることも確認できたため(図 3)、C2C12

に対して Iso-ODC を導入・分解したサンプルを作成し、質量分析(LC-MS/MS)で安定同位体標識アミノ酸が含まれるタンパク質を検出した。その結果、予想に反して、Iso-ODC 分解由来の安定同位体標識リジン・アルギニンは新たなタンパク質合成の材料として再利用されていなかった(図 4)。

アミノ酸はタンパク質合成の材料であること以外に、アミノ酸代謝を介したエネルギー産生の材料としても利用される。このことを踏まえ、C2C12 におけるプロテアソーム阻害およびペプチド分解酵

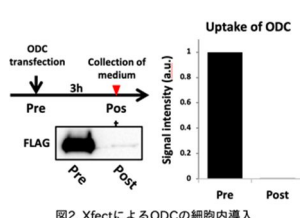


図2. XfectによるODCの細胞内導入

に対して Iso-ODC を導入・分解したサンプルを作成し、質量分析(LC-MS/MS)で安定同位体標識アミノ酸が含まれるタンパク質を検出した。その結果、予想に反して、Iso-ODC 分解由来の安定同位体標識リジン・アルギニンは新たなタンパク質合成の材料として

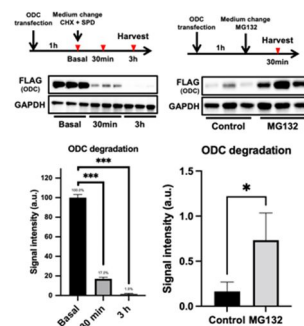


図3. 細胞内導入ODCのプロテアソーム依存分解の検証

素アミノペプチダーゼ阻害が細胞内 ATP 量に与える影響を検証した。その結果, C2C12 に対してプロテアソーム阻害剤である MG132 を曝露させると細胞内 ATP 量が有意に減少することが明らかとなり, さらにプロテアソームによるタンパク質分解の下流に当たるペプチド分解酵素アミノペプチダーゼを膜透過性ベスタチン(Bes-ME)で曝露すると同様に細胞内 ATP 量が有意に減少した(図 5)。

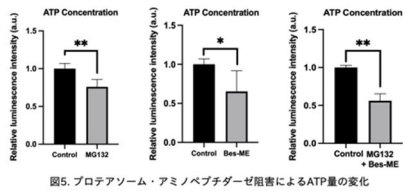


図5. プロテアソーム・アミノペプチダーゼ阻害によるATP量の変化

これらの結果から, プロテアソームによるタンパク質分解により産生したアミノ酸は新規タンパク質合成の材料としてではなく, アミノ酸代謝を介したエネルギー産生に寄与する可能性が示唆された。このようなタンパク質分解由来アミノ酸の使い分けの可能性を明らかにしたことは本研究の大きな成果であると考えている。しかしながら, 実際にタンパク質分解由来のアミノ酸が代謝されるのかについて検証することができていないことや, 本実験におけるアミノ酸リサイクル検証の条件は非生理的な細胞内環境であることに留意しなければならない。今後もタンパク質分解産物の再利用性や新しい制御機構について解明していきたいと考えている。

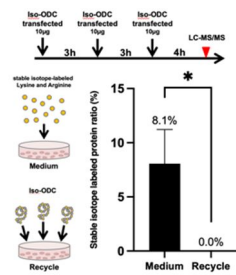


図4. アミノ酸リサイクルの検証

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 10件）

1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Naoki Suzuki, Murayama Kazutaka, Takada Hiroaki, Tabuchi Ayaka, Kano Yutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 238
2. 論文標題 The aminopeptidase LAP3 suppression accelerates myogenic differentiation via the AKT TFE3 pathway in C2C12 myoblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 2103 ~ 2119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.31070	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 -
1. 著者名 Xu Yidan, Kusuyama Joji, Osana Shion, Matsuhashi Satayuki, Li Longfei, Takada Hiroaki, Inada Hitoshi, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 299
2. 論文標題 Lactate promotes neuronal differentiation of SH-SY5Y cells by lactate-responsive gene sets through NDRG3-dependent and -independent manners	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104802 ~ 104802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104802	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 -
1. 著者名 Takagi Ryo, Tabuchi Ayaka, Hayakawa Kosei, Osana Shion, Yabuta Hiroya, Hoshino Daisuke, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 325
2. 論文標題 Chronic repetitive cooling and caffeine-induced intracellular Ca ²⁺ elevation differentially impact adaptations in slow- and fast-twitch rat skeletal muscles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R172 ~ R180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00063.2023	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 -
1. 著者名 MaruYama Takashi, Miyazaki Hirofumi, Komori Taishi, Osana Shion, Shibata Hiroyuki, Owada Yuji, Kobayashi Shuhei	4. 巻 174
2. 論文標題 Curcumin analog G0-Y030 inhibits tumor metastasis and glycolysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 511 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad066	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 -

1. 著者名 Takagi Ryo, Takegaki Junya, Osana Shion, Kano Yutaka, Konishi Satoshi, Fujita Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cooling promoted myogenic differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells through TRPM8 activation in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15855	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 -

1. 著者名 Shion Osana, Yasuo Kitajima, Suzuki Naoki, Hiroaki Takada, Kazutaka Murayama, Yutaka Kano, Ryoichi Nagatomi	4. 巻 634
2. 論文標題 Little involvement of recycled-amino acids from proteasomal proteolysis in de novo protein synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.113	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 -

1. 著者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shirota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Osana S, Nakagawa T, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M	4. 巻 16
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1527 ~ 1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.04.021	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 -

1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Takada Hiroaki, Kubota Takahiro, Murayama Kazutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 236
2. 論文標題 Puromycin sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 5293 ~ 5305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30237	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 -

1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Xu Yidan, Murayama Kazutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 397
2. 論文標題 siRNA knockdown of alanine aminopeptidase impairs myoblast proliferation and differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112337 ~ 112337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112337	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 -

1. 著者名 長名シオン, 永富良一	4. 巻 70
2. 論文標題 タンパク質分解経路が筋芽細胞の増殖と分化に与える影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 体力科学	6. 最初と最後の頁 60-60
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 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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 LAP3の発現抑制はC2C12の筋分化を促進する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 アミノペプチダーゼによる筋分化制御メカニズムの解明
3. 学会等名 日本筋学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 ペプチド分解酵素による筋分化制御機構の解明
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長名シオン, 永富良一
2. 発表標題 ペプチド分解酵素アミノペプチダーゼによる筋芽細胞の分化制御
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 Puromycin-sensitive aminopeptidase is involved in myogenic differentiation through cell polarity regulation
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長名シオン, 永富良一
2. 発表標題 タンパク質分解経路が筋芽細胞の増殖と分化に与える影響
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるアミノペプチダーゼの役割
3. 学会等名 骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shion Osana, Kazutaka Murayama, Naoki Suzuki, Hiroaki Takada, Takahiro Kubota, Ryoichi Nagatomi
2. 発表標題 Inhibition of leucine aminopeptidase affects myocyte proliferation and differentiation
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 荷重センサおよび荷重検出装置	発明者 成田史生, 井上久美, 栗田大樹, 長名シオン 他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PTT2100512	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>PHOX2Bの発現低下がTARDBP遺伝子変異による運動ニューロン突起長短縮につながる http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/cgi-bin/uptodate/webdir/277.html 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新しい病態関連候補因子を発見 https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20210525_01web_als.pdf 筋肉形成におけるペプチド分解酵素の新たな役割を発見 - 筋細胞の増殖・分化制御の理解への貢献が期待- https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/01/press20210118-01-psa.html</p>

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