

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500632

研究課題名（和文）

運動不足による筋量減少の分子機構：筋量決定サイトカインの新規活性化酵素の発見

研究課題名（英文）

Molecular mechanisms of muscle mass regulation: Identification of a novel protease involved in myostatin activation.

研究代表者

奥村 裕司 (OKUMURA YUUSHI)

徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70294725

研究成果の概要（和文）：

運動不足による筋量減少には、筋量決定サイトカイン（ミオスタチン）分子の酵素（プロテアーゼ）による活性化が必須と考えられている。このミオスタチン活性化酵素として、新規酵素（MSPL）を発見した。本研究では、MSPL の機能を詳細に解析することで、筋量減少の分子メカニズム解明を目指した。培養細胞株を用いた実験では、ミオスタチン活性の制御は MSPL 活性で制御しうることが証明された。MSPL 遺伝子欠損マウスを用いた実験では、当初、筋萎縮に抵抗性を示すと考えたが、筋湿重量の変化では、野生型マウスに比べ有意な差は見られなかった。現在、個体数を増やして再現性を確認するとともに、ミオスタチンタンパク質の発現変化と活性化状態の解析を続けている。

研究成果の概要（英文）：

Muscle mass was decreased by disuse and this condition was thought to regulate by myostatin. Myostatin, a member of TGF- β superfamily, has been well characterized as a negative regulator of muscle growth and development. Myostatin is synthesized as a precursor protein and activated by cellular proteases on the cell surface. In this study, as candidate processing proteases for myostatin activation, we could identify a novel protease, MSPL (type II transmembrane serine protease). Interestingly, treatment with MSPL inhibitor to the cells expressing myostatin revealed that a part of it could start differentiation. This result suggested that myostatin activation was regulated by the regulation of MSPL enzymatic activity. To confirm the involvement of MSPL for myostatin activation *in vivo*, we generated MSPL deficient (MSPL^{-/-}) mice. Unfortunately, from the studies of MSPL^{-/-} mice in unloading condition, no significant differences were observed in the wet weight muscle volume in MSPL^{-/-} mouse compared than in MSPL^{+/+} (Wild-type) mouse (n=1). However, we need to confirm this result by repeating experiments (at least n >3). The expression and activation of myostatin in MSPL^{-/-} mice are currently being investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康、スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：筋量決定サイトカイン、膜結合型プロテアーゼ、筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

運動(トレーニング)による筋負荷活動は、成長ホルモンやインスリン様成長因子(IGF-1)など様々な生理活性物質の働きを促し、筋原線維を増殖・成長させている。これに対し、抗重力活動の減少、低活動状態の持続は、筋萎縮(筋量減少)とそれに伴う筋力、持久力の低下を引き起こす。双方の事象とも、筋細胞には機械的ストレスとして作用し、細胞はそれに応答して自らの機能を制御していると考えられる。しかしながら、増殖を促す生理活性物質の作用機序に比べ、筋量減少の分子機構の詳細は未だ解明されていない。そこで、筋量決定サイトカインとして知られるミオスタチンの身体活動レベルに応じた変動を調べた。ミオスタチンは細胞内で不活性型前駆体として合成された後、プロテアーゼによる切断(プロセッシング)を受け、活性型に変換される。またこの変換は、細胞膜局在のプロテアーゼによって起こることが強く示唆されている。そこで、細胞膜局在のプロテアーゼ群でかつミオスタチンの活性化に関与する分子を網羅的に調べた。画期的な結果として、膜結合型セリンプロテアーゼに属するMSPL(mosaic serine protease long form)が、細胞膜上でミオスタチンを活性化する新規酵素として同定できた。つまり、細胞膜上に不活性型前駆体として停滞するミオスタチンが、筋肉の低活動状態の持続に応答したMSPLによって活性化・放出されることで、自己または周囲の細胞の増殖・分化を負に制御することが示唆された。以上の知見から、本研究では、筋細胞膜に局在した膜結合型セリンプロテアーゼが、運動不足や寝たきりなどの筋活動の低下を感知し、さらにはその周辺の筋量をも決定する分子機構の詳細を明らかにする。MSPLの活性や発現量の変化を指標に、機械的ストレスに対する筋細胞の応答変化(増殖・分化)を明らかにすることができれば、効果的な運動療法やトレーニングの開発に通じる。加えて、MSPLの選択的かつ効果的阻害物質は、現段階では薬物療法による回復が困難とされる廃用性筋萎縮の予防・治療に応用されるものと信じる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出した細胞膜局在の新規プロテアーゼMSPLが、運動不足や寝たきりなどの筋活動の低下を感知し、その周囲の筋量を決定する分子機構の詳細、およびその過程で見られるMSPL活性化や立体構造の変化の詳細を明らかにする。具体的に

は、(1) MSPL およびミオスタチン安定発現細胞株を用い、機械的ストレスに対する応答性の変化を、MSPL 活性や発現量および活性型ミオスタチン量を指標に解析する。(2) 筋活動により MSPL と細胞外マトリックス間に生み出される「ずり応力」と活性型 MSPL 量の変化を構造変化とともに明らかにする。(3) MSPL ノックアウトマウスが筋萎縮に抵抗性を示すことを実証する。

3. 研究の方法

(1) 安定発現細胞株を用いた解析：

解析に先立ち、既に様々な培養細胞株における MSPL の遺伝子発現量を RT-PCR 法で解析し、MSPL 遺伝子発現が認められない細胞(ECV304 細胞：血管内皮細胞の一種)を見出した。そこで、本細胞における MSPL 安定発現細胞株の樹立に取り組み、これに成功した。野生株を比較対照に、この MSPL 安定発現 ECV304 細胞を模擬微重力環境で培養し、プロセッシングされたミオスタチン量を検討するとともに、細胞の増殖様式の変化を評価する。また、申請者らはミオスタチン安定発現 C2C12 筋芽細胞の樹立にも成功している。このミオスタチン安定発現細胞は分化誘導しても野生株に比べほとんど分化しない。この細胞を模擬微重力環境に暴露し、重力ストレスによって変化した活性型 MSPL 量の変化がミオスタチンのプロセッシングにどのような影響を与えるのかを検討する。また、このモデル系を用いて MSPL 活性阻害剤の効果も評価し、より特異性の高い阻害剤を検索する。

(2) 筋活動に応じた新たな膜プロテアーゼ活性化機構の提唱：

MSPL 活性化機構を実証するため、コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンなど種々の細胞外マトリックス存在下で培養した MSPL 安定発現培養株に機械的ストレス(模擬微重力環境)を与え、MSPL の酵素活性がどのように変化するかを解析する。その際、酵素活性に見られる変化が構造変化によるものか否かを電子顕微鏡観察等で検討する。

(3) ノックアウトマウスの機能解析：

MSPL 遺伝子のノックアウトマウスを用い、酵素欠損が骨格筋に与える影響から、機械的ストレスへの応答における MSPL の重要性を *in vivo* で実証する。9 週齢の野生型 C57BL/6J マウスおよび MSPL ノックアウトマウスを坐骨神経切除術に供し、模擬微小重力環境を後肢筋で再現する。その際、骨格筋組織の応答性(筋湿重量の変化)や筋萎縮関連遺伝子およびタンパク質の発現変動を経時的に評価

した。

4. 研究成果

(1) 安定発現細胞株を用いた解析：

ミオスタチン活性化酵素は、ミオスタチン分子内のプロセッシング部位(-RSRR-配列)を特異的に認識できる酵素であることが必須である。ミオスタチン活性化候補酵素遺伝子をミオスタチン発現細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をウエスタンブロッティング法で解析した結果、膜結合型セリンプロテアーゼである MSPL および PC ファミリーメンバーである Furin によって、活性型ミオスタチン産生を認めた (図 1)。

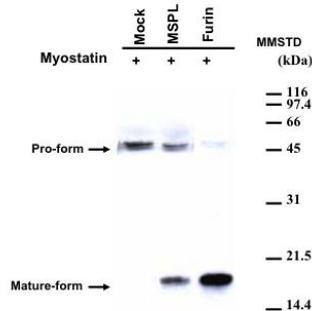


図 1. プロテアーゼによるミオスタチンの活性化

MMSTD; 分子量基準。矢印(→)は、Pro-form; ミオスタチン不活性前駆体、Mature-form; 活性型ミオスタチンを示す。

次に、模擬微小重力環境下(3D-Clinorotation)に暴露した際の応答として、ミオスタチン活性化酵素の mRNA 発現変化を検討した。コントロールには、静置培養を同時行なったものを用いた。結果、無重力ストレス応答による MSPL mRNA 発現量の変化に有意差は認められなかった(図 2)。

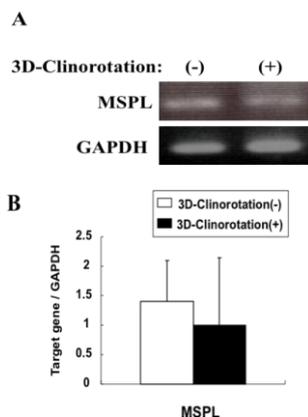


図 2. 模擬微小重力環境下におけるミオスタチン活性化酵素遺伝子の発現量変化

PCR 法(A) 及び Real-time PCR 法(B)により、酵素遺伝子発現量を解析した。内部標準として GAPDH 量で補正し比較した。

この結果から、模擬微小重力環境で見られる活性型ミオスタチンタンパク質の増大は、

無重力ストレスに応答した mRNA 合成の増大に依存した結果ではなく、既存するミオスタチン前駆体の活性化酵素によるプロセッシング自体が増大したことによると考えられた。

次に、ミオスタチン安定発現筋細胞株に対し、MSPL 阻害剤を一定濃度で添加し、細胞増殖・分化への影響を検討した。ミオスタチン安定発現筋細胞株は分化誘導に応じないが、興味深いことに、MSPL 阻害剤添加群では細胞に分化(筋管形成)がみられた(図 3)。これは、ミオスタチンの活性化が MSPL 阻害剤によって阻害されたため、ミオスタチンによる分化抑制が解除されたことを初めて示した結果である。つまり、ミオスタチン活性の制御は MSPL 活性で制御しうることが明らかとなった。

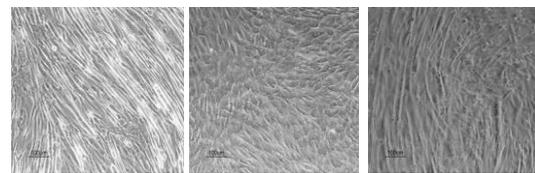


図 3. ミオスタチン活性化酵素阻害剤による細胞増殖・分化への影響

(2) 筋活動に応じた新たな膜プロテアーゼ活性化機構の提唱：

種々の細胞外マトリックス存在下で培養した MSPL 安定発現培養株に機械的ストレス(模擬微小重力環境)を与えたが、明らかな MSPL 酵素活性の変化を確認するにはいたらなかった。そのため、より特異的性の高い阻害剤の検索を目的とした、MSPL の結晶構造解析を現在進めている。

(3) ノックアウトマウスの機能解析

MSPL ノックアウトマウスを坐骨神経切除術に供し、模擬微小重力環境を後肢筋で再現し、Extensor digitorum longus (長趾伸筋)、Tibialis anterior (前脛骨筋)、Gastrocnemius (腓腹筋)および Soleus (ヒラメ筋)における筋湿重量の変化を経時的に測定した。結果、野生型マウスと比べ有意な差は見られなかった。当初、MSPL ノックアウトマウスでは、ミオスタチンの活性化が起こらず、筋萎縮に抵抗性を示すことを考えたが、残念ながら筋湿重量の変化では、有意差を得るにはいたらなかった。しかしながら、検討した個体数はわずかに n=1 であり、現在、個

体数を増やして再現性を確認している。

ミオスタチンおよび筋萎縮関連遺伝子の発現変化：野生型マウスに坐骨神経切除を行った際の myostatin の遺伝子発現の変化は、1-3 日目の増大の後、0 日目（神経切除前レベル）を下回る発現抑制が見られた。また、ミオスタチンタンパク質の発現変化は、遺伝子発現の変化と同様、1-3 日目で増大する傾向を示したが、Mature-form（活性体）に対し、Pro-form（前駆体）は 7 日目より減少、10-14 日目では感度以下の発現まで減少した。MSPL ノックアウトマウスにおけるミオスタチンタンパク質の発現変化と活性化状態に関しては、現在解析中である。今回の実験で得られた遺伝子発現や、タンパク質発現の変動に対しても、個体数を増やして再現性を確認するとともに、ミオスタチン活性（シグナル伝達タンパク質（Smad2, 4）のリン酸化量）の変化についても解析し、*in vivo* におけるミオスタチン活性化への MSPL の寄与を結論付けたい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Kido H, Okumura Y, Takahashi E (他 6 名, 2 番目) Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta*, 査読有、1824(1), 2012, 186-194, doi:10.1016/j.bbapap.2011.07.001.
- ② Kohno S, Okumura Y, Nikawa T (他 10 名, 12 番目) RANTES Secreted from Macrophages Disturbed Skeletal Muscle Regeneration after Cardiotoxin Injection in Cbl-b-Deficient Mice. *Muscle & Nerve*, 査読有、43(2), 2011, 223-229, doi: 10.1002/mus.21829.
- ③ Matsugaki T, Nikawa T, Okumura Y (他 7 名, 6 番目) “Hybrid Exercise” prevents muscle atrophy in association with a distinct gene expression pattern. *Kurume Medical Journal*, 査読有、57(4), 2010, 1-8, <http://dx.doi.org/10.2739/kurumemedj.57.101>
- ④ Okumura Y, Takahashi E, Kido H (他 7 名, 1 番目) Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, proteolytically activate membrane fusion activity of hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce

their multicycle replication. *Journal of Virology*, 査読有、84(10), 2010, 5089-5096, doi: 10.1128/JVI.02605-09

- ⑤ Nakao R, Okumura Y, Nikawa T (他 15 名, 7 番目) Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Molecular and Cellular Biology*, 査読有、29(17), 2009, 4798-4811, doi: 10.1128/MCB.01347-08
- ⑥ Kam YW, Okumura Y, Kido H (他 3 名, 2 番目) Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro. *PLoS One*, 査読有、4(11), 2009, e7870(1-10), <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007870>

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① Yuushi Okumura et al. TYPE II TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASES MSPL AND TMPRSS13 PROTEOLYTICALLY ACTIVATE MEMBRANE FUSION ACTIVITY OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS AND INDUCE THEIR MULTICYCLE REPLICATION. 7th General Meeting of the International Proteolysis Society. 2011. 10. 16-20, San Diego, CA, USA
- ② 奥村 裕司 他. 高病原性鳥インフルエンザウイルスヘマグルチニンの新規活性化酵素、II 型膜結合型 セリンプロテアーゼの MSPL/TMPRSS13 の性状解析。日本生化学会、2011. 9. 21-24、京都国際会議場(京都府)
- ③ 奥村 裕司 他. Unloading ストレス下における筋固有の生体反応機構：オステオアクチビンの発現調節と作用機序について。日本栄養・食糧学会、2011. 5. 13-15、御茶の水女子大(東京都)
- ④ 二川 健 他、Sensing mechanism of unloading stress in skeletal muscle: Regulation of ubiquitin ligase, Cbl-b, expression. 日本分子生物学会、2010. 12. 7-10、神戸国際会議場(兵庫県)
- ⑤ Yuushi Okumura et al. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, proteolytically activate membrane fusion activity of hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *Cell Symposia, Influenza: translating basic insights*. 2010. 12. 2-4, Washington Marriott Hotel, Washington

- D. C., USA
- ⑥ 奥村 裕司 他、高病原性鳥インフルエンザウイルスはII型膜結合型セリンプロテアーゼのMSPL/TMPRSS13によってヘマグルチニンが切断され、膜融合が活性化される。日本ウイルス学会 2010. 11. 7-9、あわぎんホール (徳島県)
- ⑦ 奥村 裕司 他II型膜結合型セリンプロテアーゼ、MSPL/TMPRSS13による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染活性化と、その阻害剤の検討。日本病態プロテアーゼ学会、2010. 8. 20-21、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ⑧ 奥村 裕司 他、骨格筋における無重力感知の分子機構:ユビキチンリガーゼCbl-bの発現調節について。日本栄養・食糧学会、2010. 5. 21-23、アスティとくしま (徳島県)
- ⑨ 二川 健 他、骨格筋のUnloadingストレス感知としての細胞膜上蛋白質分解日本分子生物学会、2009. 12. 9-12、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑩ Yuushi Okumura. Role of the host cellular processing proteases in influenza virus infection. 6th General Meeting of the International Proteolysis Society, 2009. 10. 26-30, Surfers Paradise Marriott Resort (Australia)
- ⑪ 奥村 裕司 他、高病原性鳥インフルエンザウイルスはII型膜結合型セリンプロテアーゼ、MSPL/TMPRSS13により活性化され、その膜融合活性はインヒビターによって低下する。日本生化学会、2009. 10. 21-24、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑫ 奥村 裕司 他、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染活性化酵素として新たに見出されたII型膜結合型セリンプロテアーゼ、MSPL/TMPRSS13による膜融合活性の証明。日本病態プロテアーゼ学会、2009. 8. 21-22、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ⑬ 奥村 裕司 他、寝たきりにおける筋固有の応答機構:オステオアクチビンの発現調節と活性化、作用機構について。日本栄養・食糧学会、2009. 5. 20-24、ブリックホール (長崎県)

[図書] (計3件)

- ① Yuushi Okumura, and Takeshi Nikawa, Springer 社、Mechanobiology in Space: Mechanosensing Biology (Ed M. Noda)、2011, 8ページ
- ② 奥村 裕司、二川 健; メディカルレビュー社、Surgery Frontier -蛋白質の構造、性質、分類-, 2011, 3ページ
- ③ 奥村 裕司、二川 健; メディカルレビュー

ー社、Surgery Frontier -蛋白質の合成と分解-, 2011, 3ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 裕司 (OKUMURA YUUSHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
准教授
研究者番号: 70294725

(2) 研究分担者

二川 健 (NIKAWA TAKESHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
教授
研究者番号: 20263824

中屋 豊 (NAKAYA YUTAKA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・
教授
研究者番号: 50136222

(3) 連携研究者