

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04857

研究課題名（和文）アミノペプチダーゼによる骨格筋量制御機構の解明

研究課題名（英文）The role of post-proteolytic aminopeptidases in skeletal muscle homeostasis

研究代表者

永富 良一（Nagatomi, Ryoichi）

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：20208028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,500,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋量維持・増加に不可欠な筋衛星細胞は代謝的に不活発だが、蛋白質分解を行うプロテアソーム機能を阻害すると細胞死によって失われる。活性化衛星細胞が筋芽細胞として増殖する時にプロテアソーム阻害は細胞周期や分化に影響する。本研究はプロテアソーム分解産物オリゴペプチドの細胞内処理を行う種々のアミノペプチダーゼに細胞周期や筋分化における形態形成に重要な役割があることを明らかにした。特にロイシンアミノペプチダーゼ阻害が筋芽細胞分化を開始させることが明らかになり、欠失マウスでは個体の成長への影響があることを突き止めた。骨格筋にとって蛋白分解も合成同様に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物質やエネルギーの代謝には必ず合成と分解があるように骨格筋組織にも合成と分解がある。骨格筋量維持・増量に蛋白質合成の重要性が着目されてきたが、分解も同様に重要である。しかし分解後の分解産物の運命についてはほとんど明らかになっていなかった。本研究では骨格筋の成長に重要な筋芽細胞において蛋白分解産物であるオリゴペプチドの処理に種々のアミノペプチダーゼが関与すること、またそれぞれを欠失させると筋芽細胞の増殖・分化して筋細胞として構造を形成する過程に大きく影響することが明らかになった。骨格筋にとって蛋白質合成は重要であるが、蛋白質分解が健全に行われることもそれ以上に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle satellite cells, essential for maintaining and increasing muscle mass, are metabolically inactive but are lost through cell death when proteasome function, which performs protein degradation, is inhibited. Proteasome inhibition also affects the cell cycle and differentiation when satellite cells are activated and transformed into myoblasts. This study revealed that various aminopeptidases that process the degradation products of proteasomes in the form of oligopeptides play an important role in the cell cycle and muscle differentiation such as the fusion of myoblasts, and morphogenesis depending on the polarity of the myoblasts. Specifically, it was found that inhibition of leucine aminopeptidase 3 initiated myoblast differentiation without other treatment required for differentiation, and the deletion mice showed growth impairment. It was clarified that protein degradation is as important as synthesis for skeletal muscle tissue.

研究分野：健康科学・体力科学・スポーツ科学

キーワード：骨格筋 タンパク分解 アミノペプチダーゼ 分化 オリゴペプチド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日常生活において不自由なく身体を動かすためには骨格筋の量・機能を維持することが不可欠である。骨格筋量を維持するために必要なタンパク質摂取量は1日あたりに1.2~2.0g/kg(体重)と提言されており、体重70kgの成人では1日あたり140gのタンパク質を摂取することが必要となる。一方で、1日あたりのタンパク質代謝量は300~400gとされており、大きな差分がある。我々はこれまでに、細胞内タンパク質を分解するプロテアソームがタンパク質分解産物としてオリゴペプチドやアミノ酸を供給することでこの差分を補う可能性を示唆してきた。しかし、予想に反し筋芽細胞ではタンパク質分解由来アミノ酸が新規タンパク質合成にはほとんど再利用されない可能性やペプチド分解酵素であるアミノペプチダーゼに細胞周期や分化制御など様々な生理的機能が存在する可能性が明らかになってきた。これらの成果から、骨格筋量の維持はタンパク質摂取量や分解量の差し引きだけでは説明できず、タンパク質分解経路であるプロテアソーム・アミノペプチダーゼによる複雑な制御機構の存在がみえてきた。そこで本研究では、プロテアソームによるタンパク質分解後に活躍するアミノペプチダーゼ群の骨格筋筋芽細胞の増殖・分化における役割の解明を行うことにより、骨格筋におけるタンパク質分解の重要性を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨格筋におけるタンパク質分解経路に関わるアミノペプチダーゼ群の骨格筋の発達や成長における役割とそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。培養筋芽細胞において筋分化に関わる細胞内経路とアミノペプチダーゼ群の欠失あるいは過剰発現系を用いてその関連性を明らかにする。さらにアミノペプチダーゼのうちが特に影響が顕著なアミノペプチダーゼ欠失マウスを作出し、その役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 培養筋芽細胞におけるアミノペプチダーゼ群の増殖・分化における役割

マウス筋芽細胞株 C2C12 に対して細胞内に局在するアミノペプチダーゼ(APP1, DNPEP, ERAP1, LAP3, LNPEP, METAP1, METAP2, PSA, RNPEP, RNPEPL1)を siRNA により遺伝子発現抑制することで筋分化にどのような影響があるかを評価した。さらに評価結果から同定された LAP3 の筋細胞分化への寄与を明らかにするために、マウス筋芽細胞株 C2C12 に対して siRNA による LAP3 の遺伝子発現抑制実験やプラスミドベクターによる LAP3 の過剰発現実験を実施した。LAP3 の細胞内局在とその変化についての検討も行った。LAP3 の細胞内局在変化については GLUT4 の細胞内・細胞膜局在の共焦点レーザーによる観察あるいはマウスより単離した骨格筋線維に導入した蛍光 LAP3 のライブイメージング解析を行った。

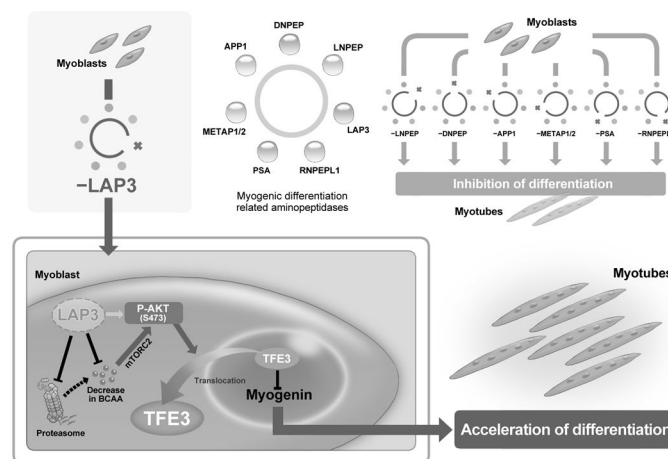
#### アミノペプチダーゼ LAP3 欠失の *in vivo* における骨格筋に対する影響

培養筋芽細胞において他のアミノペプチダーゼと異なり、欠失させることによりむしろ分化が促進することが明らかになった LAP3 の生体での役割を明らかにするために、LAP3 遺伝子全身欠損モデルマウスを作出し表現型の解析を行った。

### 4. 研究成果

## 培養筋芽細胞におけるアミノペプチダーゼ群の増殖・分化における役割

siRNAにより各アミノペプチダーゼの遺伝子・タンパク質発現が抑制された。同条件下において筋分化を誘導することでアミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制がC2C12の筋分化に与える影響を評価した。その結果、筋分化が抑制される遺伝子として、APP1, DNPEP, LNPEP, METAP1, METAP2, RNPEPL1が同定された。一方で、筋分化が促進する遺伝子としてLAP3が同定された。ERAP1とRNPEPは筋分化に影響は与えなかった。siRNAによるLAP3の遺伝子発現抑制がC2C12の筋分化が促進したことから、その分子機序の解明に取り組んだ。C2C12におけるLAP3遺伝子発現抑制は筋分化の制御因子であるMyogeninの発現を増加させることがわかった。RNA-seq解析による詳細なシグナル経路を探索した結果、PI3K-AKT経路が候補として同定された。ウエスタンブロット解析によりLAP3遺伝子発現抑制によりAKTのリン酸化(S473)が増加することが明らかになった。さらにAKTの標的分子であり、Myogeninの転写調節因子であるTFE3の局在変化を確認したところ、LAP3遺伝子発現抑制によりTFE3の核内から細胞質への局在変化が亢進することがわかった。さらに、LAP3遺伝子発現抑制はプロテアソームによるタンパク質分解を抑制することで、タンパク質分解由来の細胞内BCAA量(バリン・ロイシン・イソロイシン)を低下させる可能性も明らかにした。BCAA量の低下が栄養飢餓応答を引き起こすことでmTORC2によるAKTのリン酸化(S473)を亢進させるという分子機序が示唆された。他のアミノペプチダーゼの発現抑制は細胞周期の異常、異常な形態形成など筋分化に対して抑制的であることが明らかになった。しかしそれらとは異なり唯一LAP3の発現抑制は筋芽細胞の正常な筋分化を始動させることが明らかになった。LAP3は普段筋衛星細胞の分化・筋形成開始を抑制しており、何らかのきっかけでLAP3が機能しなくなるあるいは細胞内局在の変化が起こることが筋衛星細胞の活性化メカニズム(分



化の始動)に関与していることを強く示唆するものである(図)。これまで培養筋芽細胞の分化は培地中の血清を減じることにより誘導されていた。増殖因子(IGFなど)の減少による細胞周期からの逸脱がその理由として考えられていたが、その機構は明らかになっていなかった。LAP3の欠損が血清を減じた培養条件にしなくても筋分化が始動したことは、筋芽細胞が筋量制御に関わるメカニズムにおける重要な段階を発見したものと考えている。以上の研究成果は *J Cell Physiol* 誌に掲載された。

The aminopeptidase LAP3 suppression accelerates myogenic differentiation via the AKT-TFE3 pathway in C2C12 myoblasts. Osana S, Kitajima Y, Naoki S, Murayama K, Takada H, Tabuchi A, Kano Y, Nagatomi R. *J Cell Physiol*. 10.1002/jcp.31070, 2023.

また好中球の筋膜による接触が糖輸送体の膜局在を変化させる事をライブイメージング解析を

中心に明らかにしたAm J Physiol Endocrinol Metab誌に掲載された研究手法をLAP3の局在検討に利用し(研究方法に記載)筋芽細胞におけるLAP3の局在変化が培地の栄養条件などにより可逆的に変化することを突き止めた(未発表)。

Nyasha MR, Chen W, Wang H, Yaoita F, Aoki M, **Nagatomi R**, **Kanzaki M**. Effects of CX3CR1 and CXCR2 antagonists on running-dependent intramuscular neutrophil recruitments and myokine upregulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2023;10.1152/ajpendo.00196.2022

### アミノペプチダーゼ LAP3 欠失の in vivo における骨格筋に対する影響

全身性 LAP3 遺伝子欠損マウスの表現系解析のために作出した LAP3 欠損マウスは-/-において心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋いずれにおいても LAP3 の完全欠損が認められ、-/w のヘテロマウスではいずれの臓器においても部分欠損であり、LAP3 の量反応関係を検討することが可能であることがわかった。また LAP3 欠損マウスは体重量が有意に少ないことがわかった。骨格筋以外の臓器重量におよぼす影響は認められず、オスでは筋組織においても LAP3 欠損の筋重量への影響は認められなかった。しかしメスにおいては腓腹筋、前脛骨筋などの速筋線維優位な筋重量は LAP3 欠損マウスで有意に小さいことがわかった。骨格筋の成長遅延は全体的にみられ、腓腹筋などの混合型の抗重力筋は特に成長が遅延していた。当初筋分化促進により筋の異常発育がみられる可能性も考えていたが、むしろ十分に筋芽細胞が増殖しないまま筋分化が進行してしまう可能性を考えている。メスの腓腹筋においてタンパク合成/分解経路の状態をタンパクレベルで確認したところ、合成系の活性を反映する合成経路のリン酸化状態に変化はなく、分解系のオートファジー系への影響は認められなかった一方ユビキチンリガーゼ、ユビキチンの減少が認められた(未発表)。

LAP3 が欠失していても骨格筋の状態は野生型と大きな違いはなく、LAP3 の欠損は筋発生には影響していないことが明らかになった。また培養筋芽細胞でみられたような分化促進によると思われる表現型の違いはみられなかった。しかし LAP3 欠失マウスにおいてユビキチンリガーゼ、ユビキチンの変化が認められたことは、LAP3 がプロテアソームの活動と連動して衛星細胞による筋量制御に関与していることを示唆するものであり、引き続き課題修了後もこのマウスを利用してタンパク質分解後経路(post-proteolytic pathway)による骨格筋量制御の全容の解明を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3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 Nyasha Mazvita R., Chen Weijian, Wang Haopeng, Yaoita Fukie, Aoki Masashi, Nagatomi Ryoichi, Kanzaki Makoto	4. 巻 324
2. 論文標題 Effects of CX3CR1 and CXCR2 antagonists on running-dependent intramuscular neutrophil recruitments and myokine upregulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E375 ~ E389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpendo.00196.2022	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 神崎 展	4. 巻 42
2. 論文標題 腫瘍組織内好中球の免疫代謝リワイヤリングとガン免疫	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 54-55
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 神崎 展	4. 巻 87
2. 論文標題 運動骨格筋内の好中球集積微小領域と筋機能の保持	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 309- 315
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 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Naoki Suzuki, Takada Hiroaki, Murayama Kazutaka, Kano Yutaka, Nagatomi Ryoichi	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 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 ロイシンアミノペプチダーゼLAP3の発現抑制は筋分化を促進する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nyasha, MR., Tachikawa, J., Chen, W., and Kanzaki, M
2. 発表標題 Investigation of Roles of CEFIP in Physical Fitness and Glucose Metabolism using Knockout Mice; a Running Model Study.
3. 学会等名 Interface Summer Seminar 2023, The 18th International Workshop on Biomaterials in Interface Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chen,W., Komatsuzaki, H., and Kanzaki, M
2. 発表標題 The Interface Between Muscular Microvasculature and Post-Exercise Myofibers That Primes Insulin-Responsive Local GLUT4 Translocation: Multi-photon Microscopy Analysis.
3. 学会等名 Interface Summer Seminar 2023, The 18th International Workshop on Biomaterials in Interface Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福島英得, 佐藤 遼, 神崎 展
2. 発表標題 2分割発光酵素手法を用いたACE2とB0AT1複合体の即時発光計測
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shion Osana, Yasuo Kitajima, Suzuki Naoki, Hiroaki Takada, Kazutaka Murayama, Yutaka Kano, Ryoichi Nagatomi.
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 第8回日本筋学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長名シオン, 北嶋康雄, 鈴木直輝, 村山和隆, 永富良一, 狩野豊
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 第77回日本体力医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長名シオン, 北嶋康雄, 鈴木直輝, 高田拓明, 村山和隆, 狩野豊, 永富良一
2. 発表標題 ペプチド分解酵素LAP3による筋量調節機構の解明
3. 学会等名 第9回骨格筋生物学研究会
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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>

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
研究分担者	神崎 展  (Kanzaki Makoto)  (10272262)	東北大学・医工学研究科・教授   (11301)	
研究分担者	村山 和隆  (Murayama Kazutaka)  (40400452)	東北大学・医工学研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	鈴木 直輝  (Suzuki Naoki)  (70451599)	東北大学・大学病院・助教   (11301)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	長名 シオン  (Osana Shion)  (60868131)	国土館大学・体育学部・講師     (32616)	

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