

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500868

研究課題名(和文)筋萎縮におけるミトコンドリア質的制御の役割

研究課題名(英文)The role of mitochondrial quality control in skeletal muscle atrophy

研究代表者

古屋 徳彦(Furuya, Norihiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50401188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮は細胞内蛋白質分解が活性化することにより起こると考えられている。研究代表者らは、遅筋(ヒラメ筋)の除神経萎縮にミトコンドリアの品質管理機構として働くParkin介在性マイトファジーが関わっていることを見出した。除神経手術を施したオートファジー不能マウスやParkin欠損マウスの遅筋では、筋萎縮の遅延、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスの亢進が認められた。またこれらのマウスの除神経遅筋ではポリユビキチン化蛋白質の蓄積が起こっており、野生型マウス遅筋で認められる除神経による転写因子NFE2L1の核移行を介したプロテアソーム活性化が認められないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle atrophy is thought to result from hyperactivation of intracellular protein degradation pathways, including autophagy and the ubiquitin-proteasome system. However, the precise contributions of these pathways to muscle atrophy are unclear. Here, we found that Parkin-mediated mitochondrial autophagy (mitophagy) deficiency in denervated slow-twitch soleus muscles delayed skeletal muscle atrophy, reduced mitochondrial activity, and induced oxidative stress. In both autophagy-deficient and Parkin KO soleus muscles, denervation caused the accumulation of polyubiquitinated proteins. Denervation induced proteasomal activation via NFE2L1 nuclear translocation in control mice, whereas it had little effect in autophagy-deficient and Parkin KO mice. These results suggest that Parkin-mediated mitophagy plays an essential role in the activation of proteasomes during denervation atrophy in slow-twitch muscles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：筋萎縮 遅筋 Parkin介在性マイトファジー ミトコンドリア プロテアソーム 酸化ストレス NFE2L1

1. 研究開始当初の背景

骨折などにより四肢をギブス固定すると、ギブスで固定された部位の骨格筋が萎縮し、故障前の状態まで回復するのに長い時間を要する。同様に、寝たきり状態、宇宙空間に滞在するなど、負荷がかかりにくい状態におかれると、骨格筋は萎縮を起こす。骨格筋量は筋タンパク質の同化と異化の平衡により維持されているが、筋萎縮の状態ではタンパク質合成が低下し、分解が亢進する。細胞内のタンパク質分解経路にはユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系の二種類が大きく寄与している。ユビキチン-プロテアソーム系は3種の酵素、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチン転移酵素(E3)の働きによってポリユビキチン化されたタンパク質をプロテアソーム複合体であるプロテアソームが特異的に分解する経路である。一方のオートファジー-リソソーム系は、隔離膜と呼ばれる膜が細胞膜成分、ミトコンドリアなどのオルガネラを取り囲み、オートファゴソームという二重膜構造を形成することで始まり、オートファゴソームがリソソームと融合することで、取り込まれた内部の分子やオルガネラを分解する経路である。一部例外はあるが、ユビキチン-プロテアソーム系はより選択的な分解経路であり、オートファジー-リソソーム系はより非選択的な分解経路である。筋萎縮状態の筋肉では、筋肉特異的ユビキチン転移酵素(E3)である atrogenin-1/MAFbx、MuRF1 の発現が亢進する。またこれらの E3 のノックアウトマウスは筋萎縮に対して完全ではないが、部分的に耐性を示すことが報告されている。

研究代表者は、座骨神経切除手術を施したマウスを筋萎縮のモデルとして、後肢の筋萎縮におけるオートファジーの寄与について解析している。その過程で、対照群のヒラメ筋で有意に筋萎縮が認められる除神経後7日目において、筋肉特異的オートファジー不能マウスのヒラメ筋では萎縮が寛解することを見出した。研究代表者は、萎縮が寛解している除神経したオートファジー不能マウスのヒラメ筋において、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III 活性の低下、活性酸素種の蓄積、さらにミトコンドリアに Parkin が蓄積することを見出した。Parkin は若年性 Parkin ソン病原因遺伝子 Park2 にコードされており、膜電位を失った異常ミトコンドリアに局在し、選択的ミトコンドリアオートファジー(マイトファジー)に関わる。Parkin 欠損マウスにおいても、オートファジー不能マウスの結果と同様に除神経ヒラメ筋の萎縮寛解が認められたことから、ヒラメ筋の除神経萎縮にはオートファジーそのものというよりも Parkin 介在性マイトファジーが関わっていることが示唆される。以上のことから、研究代表者はミトコンドリアの質的制御が筋

萎縮に密接に関わっていると考えており、その分子機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

Parkin 介在性マイトファジーは、ミトコンドリアの質的制御に重要だと考えられている機構なので、骨格筋特異的オートファジー不能マウスのヒラメ筋の除神経萎縮過程において観察される Parkin の局在したミトコンドリアは、質の低下したものだと考えられる。また、除神経手術を施していないオートファジー不能マウスや Parkin 欠損マウスのヒラメ筋において、筋肥大の表現形は見られないことから、除神経によって、質の低下したミトコンドリアの出現が惹起されている事が示唆される。では「筋萎縮過程ではどのようにしてミトコンドリアの質の低下が起こるのか？」また「質の低下したミトコンドリアが蓄積すると何故筋萎縮が起こらないのか？」これらの疑問に答えを出すために、これらの現象の分子メカニズムを明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス

条件付き Atg7 欠損 (Atg7^{Flox/Flox}) マウスと Tamoxifen 誘導型骨格筋特異的 Cre (HSA-Cre-ERT2) トランスジェニックマウスをかけ合わせ、骨格筋特異的オートファジー不能 (Atg7^{Flox/Flox}: HSA-Cre-ERT2) マウスを作成した。このマウスは Tamoxifen を注射することで、骨格筋特異的にオートファジー経路に必須な遺伝子 Atg7 を欠損させることが出来る。骨格筋特異的オートファジー不能マウス、Parkin 欠損マウスおよび野生型マウスの左下肢の座骨神経切除手術を行い、脛脛の筋肉の萎縮を解析した。

(2) 形態学的、組織化学的解析

除神経したマウスより脛脛の筋肉をサンプリングし、凍結切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色、チトクローム c 酸化酵素 (Cox) 染色、および各種免疫染色に供した。

また、ヒラメ筋の電子顕微鏡写真撮影は花市電子顕微鏡技術研究所に依頼した。

(3) 生化学的解析

各筋肉をホモジナイズし、SDS-PAGE および各種抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。また、ミトコンドリア画分および核抽出画分を調整し、同様にウェスタンブロッティングを行った。また筋ホモジネートを蛍光基質を用いた *in vitro* におけるプロテアソーム活性測定に供した。

(4) 定量 PCR

ヒラメ筋から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を調整した。各種遺伝子に特異的なプライマーを用いて、定量的リアルタイム PCR に供し、それらの発現レベルを測定した。また、

ヒラメ筋から DNA を調整し、ミトコンドリア DNA に特異的なプライマーを用いて、ミトコンドリア DNA のコピー数を測定した。

(5) 培養細胞

マウス筋芽細胞セルラインである C2C12 細胞をミトコンドリア呼吸鎖阻害剤、酸化ストレス条件下で培養した。セルライゼットおよび核抽出画分を調整し、ウェスタンブロッティングに供すとともに RNA を調整し定量 PCR に供した。

4. 研究成果

野生型マウスと比較して除神経による萎縮が遅延しているオートファジー不能マウスおよび Parkin 欠損マウスの除神経ヒラメ筋では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性の低下および酸化ストレスマーカーの亢進が認められることから、筋肉中に異常ミトコンドリアが蓄積していることが示唆された。異常ミトコンドリアの蓄積が筋萎縮抑制機構を明らかにするために、筋肥大に関わる分子ミオスタチンおよびミオスタチンレセプターの発現量、タンパク質合成に関わる分子の活性化、筋萎縮に関わるユビキチンリガーゼ Atrogin-1、MuRF-1 の発現について野生型マウスと両ノックアウトマウスの除神経ヒラメ筋において検討を行ったが、有意な差は見いだせなかった。しかしながら、除神経したオートファジー不能マウスおよび Parkin 欠損マウスのヒラメ筋においてポリユビキチン化タンパク質の蓄積が野生型マウスに較べ有意に亢進していることが分かった。ヒラメ筋ホモジネートを用い、invitro におけるプロテアソーム活性を測定したところ、野生型マウスでは除神経によってプロテアソーム活性の上昇が認められるのに対し、ノックアウトマウスのヒラメ筋では同様の活性上昇は認められなかった。

プロテアソームを構成するサブユニット群の発現を検討したところ、20S プロテアソームのサブユニットが野生型マウスヒラメ筋において KO マウスと較べて有意に mRNA レベルおよびタンパク質レベルで発現上昇していることが明らかとなった。プロテアソーム阻害剤 Bortezomib の投与により、野生型マウスにおいて、有意に除神経によるヒラメ筋萎縮が抑制された。またノックアウトマウスのヒラメ筋では Bortezomib の効果は認められなかった。プロテアソームサブユニットの発現には転写因子 NFE2L1 の関与が報告されている。NFE2L1 は、通常小胞体膜タンパク質として存在し、絶えず ERAD を介してプロテアソームによる分解を受けている。プロテアソーム活性が抑制される条件下などにおいて、NFE2L1 は核内に移行しプロテアソームサブユニット群を含む標的遺伝子の転写を亢進する。ヒラメ筋核抽出画分において、核内 NFE2L1 レベルを検討したところ、野生型マウスヒラメ筋においては、除神経によって

核内 NFE2L1 レベルの上昇が観察されたが、ノックアウトマウスでは除神経による NFE2L1 レベルに変化は認められなかった。

MG-132 処理により NFE2L1 を介したプロテアソームサブユニットの発現を亢進させた C2C12 マウス筋芽細胞に、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP を添加したところ、有意にプロテアソームサブユニットの発現が抑制され、NFE2L1 の核移行の抑制が認められた。また電子伝達系の複合体 I 阻害剤であるロテノン、複合体 III の阻害剤であるアンチマイシン処理によっても同様に NFE2L1 の核移行およびプロテアソームサブユニットの発現の抑制が認められた。ロテノンおよびアンチマイシン処理は活性酸素種の産生を増加させることが知られているため、抗酸化剤である N-アセチルシステイン処理を行ったところ、CCCP、ロテノン、アンチマイシンによる阻害効果を打ち消す作用が認められた。さらに過酸化水素処理によっても NFE2L1 の核移行およびプロテアソームサブユニットの発現の抑制が認められたことから、異常ミトコンドリアの産生する活性酸素種によって NFE2L1 の核移行が阻害されることが明らかとなった。

上記の結果から、除神経によって出現する異常ミトコンドリアとはミトコンドリア膜電位の低下したミトコンドリアであることが示唆される。そこで、ミトコンドリア膜電位への関与が報告されている分子について除神経による発現変動が見られるかどうか検討した。呼吸鎖複合体のサブユニット群の発現、骨格筋ミトコンドリア膜電位へ影響を与える UCP-2、UCP-3、MitoNEET の発現について除神経による有意な変化は認められなかった。

以上のことから、除神経ヒラメ筋では、未知の経路を介したミトコンドリア膜電位の低下が起こる。野生型マウスではそのような異常ミトコンドリアは Parkin 介在性マイトファジーによって速やかに分解されるが、Parkin 介在性マイトファジーを起こせないオートファジー不能マウス、Parkin 欠損マウスのヒラメ筋では異常ミトコンドリアの蓄積が起こり、活性酸素種が産生される。除神経はまた NFE2L1 の核移行を介したプロテアソーム活性化を引き起こすが、Parkin 介在性マイトファジーを行えないオートファジー不能マウスおよび Parkin 欠損マウスヒラメ筋においては活性酸素種によって NFE2L1 の核移行が阻害され、プロテアソームの活性化が起こらず、萎縮の遅延が起これば考えられる。

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. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study., Funayama, M., Ohe, K., Amo, T., Furuya, N., Yamaguchi, J., Saiki, S., Li, Y., Ogaki, K., Ando, M., Yoshino, H., Tomiyama, H., Nishioka, K., Hasegawa, K., Saiki, H., Satake, W., Mogushi, K., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Toda, T., Mizuno, Y., Uchiyama, Y., Ohno, K., Hattori, N., *Lancet Neurol.* 2015 Mar;14(3):274-82. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70266-2. 査読有

2. A treadmill exercise reactivates the signaling of the mammalian target of rapamycin (mTor) in the skeletal muscles of starved mice., Zheng, D.M., Bian, Z., Furuya, N., Oliva Trejo, J.A., Takeda-Ezaki, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Mineki, R., Taka, H., Ikeda, S., Komatsu, M., Fujimura, T., Ueno, T., Ezaki, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015 Jan 2;456(1):519-26. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.118. 査読有

3. P150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway., Ishikawa, K., Saiki, S., Furuya, N., Yamada, D., Imamichi, Y., Li, Y., Kawajiri, S., Sasaki, H., Koike, M., Tsuboi, Y., Hattori, N., *PLoS One.* 2014 Apr 10;9(4):e94645. doi: 10.1371/journal.pone.0094645. 査読有

4. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation., Furuya, N., Ikeda, S., Sato, S., Soma, S., Ezaki, J., Oliva Trejo, J.A., Takeda-Ezaki, M., Fujimura, T., Arikawa-Hirasawa, E., Tada, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kominami, E., Hattori, N., Ueno, T., *Autophagy.* 2014 Apr;10(4):631-41. doi: 10.4161/auto.27785. 査読有

5. Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation., Takahashi, Y., Shinoda, A., Furuya, N., Harada, E., Arimura, N., Ichi, I., Fujiwara, Y., Inoue, J., Sato, R., *PLoS One.* 2013 May 29;8(5):e64605. doi: 10.1371/journal.pone.0064605. 査読有

6. Ferulic acid induces mammalian target of rapamycin inactivation in cultured mammalian cells. Bian, Z., Furuya, N.,

Zheng, D.M., Oliva Trejo, J.A., Tada, N., Ezaki, J., Ueno, T., *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(1):120-4. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. “Parkin-mediated mitophagy in slow-twitch skeletal muscle atrophy.” Norihiko Furuya, The 6th International Symposium on Autophagy 2012 (招待講演) October 28th-November 1st, 2012, Bankoku Shinryokan, Okinawa, Japan

2. 遅筋萎縮におけるミトコンドリア品質管理機構の役割 古屋徳彦, 精神・神経疾患開発費 23-5 「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」班会議、2012年12月7日～12月8日、JALビルカンファレンスホール、東京

3. 遅筋萎縮における Parkin 介在性マイトファジーの役割 古屋徳彦, 第7回オートファジー研究会 兼 新学術領域「オートファジー」第1回班会議、2013年12月19日～12月21日、ヤマハリゾートつま恋、静岡県掛川市

4. “Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to the proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation”, Norihiko Furuya, Shin-Ichi Ikeda, Shigeto Sato, Sanae Soma, Junji Ezaki, Juan Alejandro Oliva Trejo, Mitsue Takeda-Ezaki, Tsutomu Fujimura, Eri Arikawa-Hirasawa, Norihiro Tada, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Eiki Kominami, Nobutaka Hattori, Takashi Ueno, Gordon Research Conference “Autophagy in Stress, Development & Disease”, March 16th-20th, 2014, Renaissance Tuscany II Ciocco Resort, Lucca (Barga), Italy

5. Parkin 介在性マイトファジーにおける CALCO2/NDP52 の役割、古屋徳彦、住吉克彦、安藤真矢、服部信孝、第8回オートファジー研究会・第2回新学術領域「オートファジー」班会議、2014年11月10日～11月11日、シャトレーゼガトーキングダムサッポロ、北海道札幌市

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 徳彦 (FURUYA NORIHIKO)

順天堂大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号：50401188