

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750368

研究課題名(和文) 老化制御シグナルによるタウリン欠乏センシング機構とサルコペニアにおける役割の解明

研究課題名(英文) The role of taurine-sensing mechanism by the aging-related signaling pathway on sarcopenia

研究代表者

伊藤 崇志 (Ito, Takashi)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：80423119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タウリン欠乏により骨格筋老化が促進されること、その際に老化への関与が示されているmTORの下流蛋白のリボソームS6蛋白(RPS6)のリン酸化が促進されることから、本研究では骨格筋老化にかかわるシグナル伝達経路を明らかにする目的で、タウリン欠乏によるRPS6のリン酸化にかかわる分子の探索を試みた。その結果、タウリン欠乏マウス骨格筋においては小胞体ストレスが亢進していることを明らかにした。さらに、骨格筋細胞において小胞体ストレス刺激によってRPS6のリン酸化亢進を見出した。このことからタウリン欠乏による小胞体ストレスの亢進がRPS6のリン酸化亢進を介して骨格筋老化に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that tissue taurine depletion accelerates skeletal muscle aging accompanied with enhancement of the phosphorylation of ribosomal protein S6 subunit (RPS6), which is a downstream target of mTOR, an aging-related signal protein. In the present study, we investigated the signaling pathway involved in RPS6 phosphorylation to reveal the mechanism of aging acceleration. We identified that signaling pathway responsible for unfolded protein response are activated in taurine-depleted mouse, suggesting the accumulation of endoplasmic reticulum stress by tissue taurine depletion. Moreover, we found that endoplasmic reticulum stress induces the phosphorylation of RPS6 in skeletal muscle cells. These results suggest that taurine depletion causes RPS6 phosphorylation through ER stress accumulation and then accelerates skeletal muscle aging.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：サルコペニア 筋肉 タウリン

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアとは老化に伴って起こる筋力、筋肉量の低下を指し、高齢者の自立的生活を妨げるものである。サルコペニアの原因として酸化ストレス、ホルモン、栄養状態などの環境変化と筋幹細胞の老化があげられる。これらの要因は筋肉におけるタンパク合成—分解のバランス不良を引き起こし、筋肉量の低下に結びつく。また、細胞老化による筋肉再生能力の低下も骨格筋の老化に重要な要素であることが明らかにされてきた。近年、超高齢化が進み、健康寿命を延ばすことが社会的ニーズとして大きくなっており、サルコペニアや細胞老化の予防を目的とした戦略の開発・研究が盛んになっている。

タウリンは生体内に広範囲且つ高濃度に存在し、カルシウムハンドリングや浸透圧調節などの多様な生理作用を持ち、組織保護効果を発揮する。骨格筋中のタウリンは加齢とともに減少することが知られているが、骨格筋老化との関連性は明らかでなかった。最近の研究代表者の研究から、我々のグループはこれまでにタウリントランスポーターの遺伝子欠損マウスを作製してタウリン欠乏による生体への影響を検討してきた。このマウスでは多くの組織でタウリン含量が低下する。その中でもタウリン合成能が極めて低い心臓や骨格筋においてタウリンの欠乏に伴って機能低下や形態学的異常を引き起こす。また、この TauTKO マウスは野生型マウスと比較して、寿命が短命であることから、タウリン欠乏と老化との関連についてさらに検討を進めた。その結果、18ヶ月齢では TauTKO マウスにおいて骨格筋の老化が進んでいることが分かった。具体的には、老化マーカー遺伝子として知られるサイクリンキナーゼインヒビタータンパク CDKN2A (p16INK4aとも呼ばれる)の顕著な発現亢進、中心核を持つ筋繊維の増加、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I の活性低下が加齢に伴って顕著にみられた。したがって、タウリンは骨格筋組織中で抗老化に関与する物質として機能していることが考えられた。

さらに、細胞老化を制御するシグナル経路についてタウリン欠乏モデルにおける活性を検討し、リボソーム蛋白 S6 (RPS6) がタウリン欠乏骨格筋において特異的に活性亢進することが認められ、老化促進との関連性が示唆された。タウリン欠乏骨格筋の RPS6 の活性制御において未知のシグナル経路の関与が示唆された。

### 2. 研究の目的

以上の背景から、骨格筋の老化が進行する過程において、タウリン欠乏が何らかの形で感知されて S6 蛋白のリン酸化を亢進し、細胞老化に直結していると考えられたことから、本研究では、関連するシグナル経路を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) In vivo における RNA、タンパク発現の解析: タウリントランスポーター欠損マウス (以下、TauTKO マウス) において、骨格筋を単離し、RNA やタンパク質の発現変動をマイクロアレイ法、Real time-PCR 法、Western blot 法により解析した。

(2) In vitro における RNA、タンパク発現の解析: マウス筋芽細胞 C2C12 を分化条件にて骨格筋細胞に分化させたのち、ER ストレス誘導剤である Thapsigargin、Tunicamycin、Dithiothreitol 及び阻害剤などを処置した後、細胞を回収した。RNA やタンパク質の変動は Real time-PCR 法、Western blot 法によりそれぞれ解析した。

(3) RPS6 相互作用タンパク同定の試み: まず、GST タンパクと RPS6 のリン酸化部位周辺配列の融合タンパクを発現するプラスミドを構築し、大腸菌を用いて融合タンパクを作製し、精製した。精製したタンパクをマウス骨格筋のホモジネートと反応させたのち、融合タンパクを沈降させ、サンプルを電気泳動することにより融合タンパクと相互作用するタンパク質の有無を確認した。また、クロスリンク試薬である Dithiobis(succinimidyl propionate) や Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) をホモジネートの反応液に加え、同様の解析を実施した。

### 4. 研究成果

(1) タウリン欠乏による Unfolding protein response の活性化と RPS6 リン酸化への関与: TauTKO マウスの骨格筋から抽出した mRNA をマイクロアレイ法により解析した。TauTKO マウスにおいて野生型と比較して約 400 遺伝子の発現が 2 倍以上変動していた。その後、Ingenuity pathway analysis を用いて、発現変動がみられた遺伝子のパスウェイ解析を行った結果、アミノ酸代謝や蛋白フォールディングに係る遺伝子の発現増加が認められた。

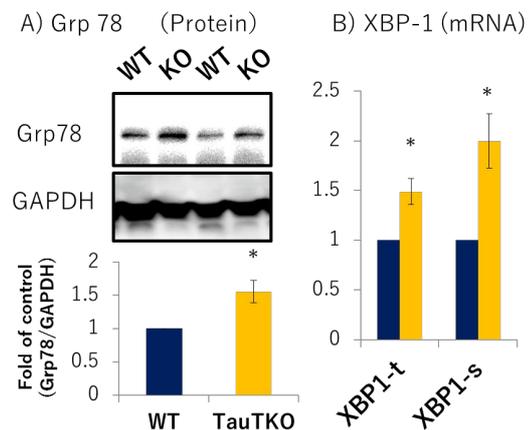
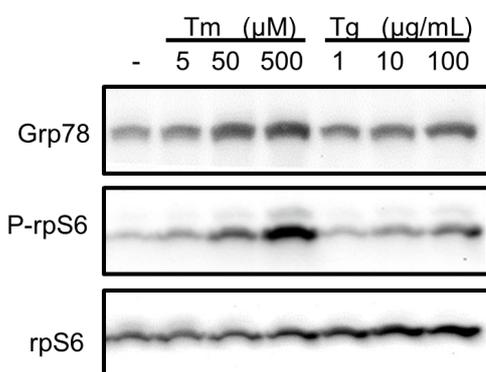


図1 TauTKO マウス骨格筋における Grp78 (A) と XBP-1(B)の発現亢進

さらに解析を進めた結果、Western blot により Unfolding protein response (UPR) に係る Grp78 や XBP1 の増加が確認された(図 1)。したがって、タウリン欠乏組織において Unfolding 蛋白の蓄積が起こる可能性が考えられた。また、それに伴って UPR にかかわるシグナル伝達経路の活性化が示唆された。

これらの結果から RPS6 のリン酸化には Unfolding 蛋白の蓄積が関与する可能性が考えられたことから、次に、マウス由来骨格筋芽細胞 C2C12 から分化させた筋管細胞を用いて、ER ストレスの RPS6 リン酸化に与える影響を解析した。その結果、ER ストレス誘導剤である Thapsigargin や Tunicamycin、Dithiothreitol の処置は、C2C12 細胞において RPS6 のリン酸化を亢進した(図 2)。したがって、ER ストレスによる UPR の活性化はリボソーム S6 のリン酸化を亢進することが明らかになった。



**図 2 培養骨格筋細胞 C2C12 における Tunicamycin(Tm)、Thapsigargin(Tg) 処置の RPS6 リン酸化促進効果**

一方で、ER ストレスは RPS6 の上流である mTOR や p70S6 キナーゼ(S6K1)、p90S6 キナーゼ (RSK) のリン酸化は亢進しなかったことから、ER ストレスはこれらの経路とは独立して RPS6 のリン酸化を促進することが分かった。TauTKO マウスにおいても、RPS6 のリン酸化亢進は、mTOR や S6K1 のリン酸化亢進を伴わないことから、ER ストレス下の培養細胞で観察された現象と一致するものであった。

しかしながら、ER ストレスによる RPS6 のリン酸化は、mTOR 阻害剤のラパマイシンや S6K1 阻害剤によって顕著に抑制された。したがって、ER ストレス下においても RPS6 のリン酸化状態の維持にはこの経路が必須であることが分かった。

以上の結果から、TauTKO マウス骨格筋における RPS6 のリン酸化には ER ストレスの増加に伴うシグナル経路の活性化が関与することが示唆された。

## (2) RPS6 リン酸化にかかわるタンパク質

### 同定への試み

TauTKO マウス骨格筋において RPS6 のリン酸化に関与するタンパク質の同定を試みた。RPS6 はリボソームを構成するタンパク質の一つであり、多くのタンパク質と相互作用することが考えられた。リン酸化部位に作用するタンパク質を同定するために、リン酸化部位周辺のアミノ酸配列を GST タグに連結した組換えタンパク質を作成し、相互作用するタンパク質の同定を試みることにした。まず、マウス骨格筋ホモジネートとこの GST 融合タンパク質を反応させたところ、TauTKO マウス骨格筋のホモジネートでは GST 融合タンパク質のリン酸化の亢進がみられた。このことから、この GST 融合タンパク質は、リン酸化においては RPS6 と同様の挙動を示すと考えられた。

次に、この融合タンパク質に相互作用するキナーゼの単離を試みた。GST プルダウン法や抗 GST 抗体を用いた免疫沈降法により融合タンパク質を精製した後、サンプルを SDS-PAGE により電気泳動し、銀染色を行ってタンパク質を可視化して、沈降するタンパク質の解析を行った。TauTKO マウス骨格筋のホモジネートにおいて野生型マウス骨格筋のホモジネートよりも多く発現するタンパク質を探索したが、そのようなものは見つけられなかった。

融合タンパク質と同定しようとするキナーゼの相互作用が一過性でありそのままではすぐに離れてしまうことが原因であると考へ、結合タンパクをクロスリンクする試薬である Dithiobis(succinimidyl propionate) や Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) を反応液に添加して同様の実験を行った。多くのタンパク質との相互作用がみられたが、TauTKO マウス骨格筋のホモジネートに多く見られるタンパク質は見つけることができなかった。

以上、本実験においては、RPS6 リン酸化亢進にかかわるタンパク質を同定するためのツールはできたと考えられる。

### (3) まとめ

本検討では、TauTKO マウス骨格筋における老化促進にかかわるシグナル経路を見出すことを目的に、RPS6 のリン酸化亢進にかかわる経路の同定を試みた。マイクロアレイ解析の結果から、TauTKO マウスではタウリン欠乏によって Unfolded protein response のシグナル経路が活性化することが明らかになり、さらに、この経路は RPS6 のリン酸化を亢進することが明らかになった。したがって、タウリン欠乏による Unfolded protein response の活性化が、RPS6 のリン酸化に寄与すること、さらには、骨格筋の老化に寄与することが示唆された。

一方で、RPS6 のリン酸化亢進に直接かかわるキナーゼの同定を試みたが、本検討期間中にはツールの作製にとどまり、キナーゼの

同定には至らなかった。今後、クロスリンクの方法やプルダウンの方法を見直し、キナーゼの同定につなげたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Stephen W. Schaffer, Kayoko Shimada-Takaura, Chian Ju Jong, Takashi Ito, Kyoko Takahashi. Impaired energy metabolism of the taurine-deficient heart. *Amino Acids*. Feb;48(2):549-558. (2016) doi: 10.1007/s00726-015-2110-2. 査読有り

Chian Ju Jong, Takashi Ito, Stephen W. Schaffer. The ubiquitin-proteasome system and autophagy are defective in the taurine deficient heart. *Amino Acids*. 47, 2609-2622 (2015) doi: 10.1007/s00726-015-2053-7. 査読有り

Takashi Ito, Stephen W. Schaffer. Impact of taurine depletion on glucose control and insulin secretion in mice. *J Pharmacol Sci*. 129, 59-64 (2015) doi: 10.1016/j.jphs.2015.08.007. 査読有り

KC Ramila, Chian Ju Jong, Victor Pastukh, Takashi Ito, Junichi Azuma, Stephen W. Schaffer. Role of protein phosphorylation in excitation-contraction coupling in taurine deficient hearts. *Am J Physiol*. 308, H232-239 (2015) doi: 10.1152/ajpheart.00497.2014. 査読有り

Xiaobin Han, Patters AB, Takashi Ito, Junichi Azuma, Stephen W. Schaffer, Russel W. Chesney. Knockout of the TauT gene predisposes C57BL/6 mice to streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *PLoS One*. 10(1), e0117718 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0117718. 査読有り

Xiaobin Han, Takashi Ito, Junichi Azuma, Stephen W. Schaffer, Russel W. Chesney. The quest for an animal model of diabetic nephropathy and the role of taurine deficiency. *Adv Exp Med Biol*. 803, 217-226 (2015) doi: 10.1007/978-3-319-15126-7\_19. 査読有り

Takashi Ito, Natsuko Miyazaki, Stephen W. Schaffer, Junichi Azuma. Potential Anti-aging Role of Taurine via Proper Protein Folding: A Study from Taurine Transporter Knockout Mouse. *Adv Exp Med Biol*. 803, 481-487 (2015) doi: 10.1007/978-3-319-15126-7\_38. 査読有り

Stephen W. Schaffer, Ramila KC, Chian Ju Jong, Shetewy A, Kayoko Shimada, Takashi Ito, Junichi Azuma, Cioffi E. Does taurine prolong lifespan by improving heart function? *Adv Exp Med Biol*. 803, 555-570 (2015) doi: 10.1007/978-3-319-15126-7\_45. 査読有り

Chian Ju Jong, Takashi Ito, Junichi Azuma, Stephen W. Schaffer. Taurine Depletion Decreases GRP78 Expression and Downregulates Perk-Dependent Activation of the Unfolded Protein Response. *Adv Exp Med Biol*. 803, 571-579 (2015) doi: 10.1007/978-3-319-15126-7\_46. 査読有り

伊藤崇志; 心筋、骨格筋において組織タウ

リンと寿命に関連はあるか? タウリンリサーチ, 1:9-11 (2015) 査読無し

Takashi Ito, Natsumi Yoshikawa, Stephen W. Schaffer, Junichi Azuma. Tissue taurine depletion alters metabolic response to exercise and reduces running capacity in mice. *J Amino Acids*. 2014:964680 (2014) doi: 10.1155/2014/964680. 査読有り

Takashi Ito, Natsumi Yoshikawa, Takaaki Inui, Natsuko Miyazaki, Stephen W. Schaffer, Junichi Azuma. Tissue depletion of taurine accelerates skeletal muscle senescence and leads to early death in mice. *PLoS One*. 9, e107409 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0107409. 査読有り

〔学会発表〕(計 20 件)

伊藤崇志; タウリン欠乏マウスの解析から分かったこと. 農芸化学会 2016 年度会, 2016 年 3 月 28 日~30 日、札幌コンベンションセンター・札幌産業センター(北海道札幌市)

田上裕美、山本直、松島有希、仲西有希子、山地敬子、伊藤崇志; 老化骨格筋における GDF15 発現の亢進. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日~29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松島有希、山本直、田上裕美、仲西有希子、山地敬子、伊藤崇志; 組織タウリン欠乏による骨格筋老化促進に関与する分泌因子の探索. 第 2 回国際タウリン研究会日本部会, 2016 年 3 月 5 日~6 日、アオッサ福井(福井県福井市)

伊藤崇志; タウリン欠乏と骨格筋老化との関連. 第 2 回国際タウリン研究会日本部会, 2016 年 3 月 5 日~6 日、アオッサ福井(福井県福井市)

本津美樹、篠原弓佳、諏訪由利香、十川依子、伊藤崇志; 骨格筋におけるタウリンの mTOR への影響. 日本薬学会第 135 回年会, 2015 年 3 月 25 - 28 日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

山本直、仲島慎太郎、伊藤崇志; タウリン欠乏マウスの骨格筋老化促進に関わる分子のトランスクリプトーム解析. 日本薬学会第 135 回年会, 2015 年 3 月 25 - 28 日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

伊藤崇志、花畑友規、岩破利博、廣谷信一、増山理、辻野健; Mechanisms for the acceleration of aging-dependent cardiac fibrosis by tissue taurine depletion. 第 88 回薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 - 20 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

伊藤崇志; 心筋、骨格筋において組織タウリンと老化に関連はあるか? 第 1 回国際タウリン研究会日本部会, 2015 年 2 月 21 - 22 日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

山本直、仲島慎太郎、伊藤崇志; 組織タウリン欠乏による骨格筋老化促進に関わるメカニズムのトランスクリプトーム解析. 第 1 回国際タウリン研究会日本部会, 2015 年 2 月 21 - 22 日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

伊藤崇志、篠原弓佳、諏訪由利香、仲島慎太郎、山本直；組織タウリン欠乏による拡張型心筋症発症に関わるメカニズムのトランスクリプトーム解析．第1回国際タウリン研究会日本部会 2015年2月21-22日、兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

仲島慎太郎、谷絵理奈、十川依子、伊藤崇志；骨格筋におけるタウリン欠乏によるリボソーム S6 リン酸化に関わるシグナルの解析．第1回国際タウリン研究会日本部会 2015年2月21-22日、兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

山本直、伊藤崇志、東純一；トランスクリプトーム - パスウェイ解析を用いたタウリン欠乏マウスの骨格筋老化促進に関わる分子の網羅的解析．次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014、2014年8月30日、近畿大学東大阪キャンパス（大阪府東大阪市）

十川 依子、伊藤崇志、東 純一；骨格筋における小胞体ストレスの mTOR/S6K1/リボソーム S6 蛋白経路への影響．次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014、2014年8月30日、近畿大学東大阪キャンパス（大阪府東大阪市）

伊藤崇志、東純一；タウリン欠乏マウスにおける加齢依存的な心繊維化の亢進．第37回日本基礎老化学会大会、2014年6月26-27日あいち健康プラザ健康科学館（愛知県知多郡）

Takashi Ito, Stephen W. Schaffer, Junichi Azuma. Tissue taurine deficiency accelerates skeletal muscle aging in mice. The 19th International Taurine Meeting, May 21-24, 2014 (Krakow, Poland)

十川 依子、伊藤崇志、東 純一；骨格筋における小胞体ストレスの mTOR/S6K1/リボソーム S6 蛋白経路への影響．日本薬学会 134年会、2014年3月27-30日、熊本大学（熊本県熊本市）

黒田 沙彩、伊藤崇志、板床 真沙美、十川依子、東 純一；骨格筋細胞におけるリボソーム S6 蛋白リン酸化の翻訳調節への影響．日本薬学会 134年会、2014年3月27-30日、熊本大学（熊本県熊本市）

伊藤崇志、東 純一；The impact of tissue taurine deficiency on senescence-related cell signaling pathway. 第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日～21日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

伊藤崇志、東 純一；組織内タウリン欠乏の組織老化に対する影響．次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013、2013年8月31日、熊本大学（熊本県熊本市）

伊藤崇志、乾 剛彰、上田 緑、東 純一；組織内タウリンの欠乏による寿命及び組織老化への影響．第36回日本基礎老化学会、2013年6月4-6日、大阪大学中之島センター（大阪府大阪市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.huhs.ac.jp/~h090018t/rinsyogenomu/index.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 崇志 (Ito Takashi)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：80423119