

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03080

研究課題名(和文)オートファジー関連タンパクの生体防御センサー制御による骨格筋萎縮予防機構の解明

研究課題名(英文) autophagy protein protects skeletal muscle atrophy

研究代表者

奥津 光晴 (okutsu, Mitsuharu)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・講師

研究者番号：80409755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動が抗酸化酵素を産生する分子メカニズムを解明し、筋萎縮を軽減する効果的な方法の確立と応用を目的に研究を実施した。実験では、オートファジーを調節するタンパクによる抗酸化酵素の産生制御に着目し、着目したタンパクの骨格筋における役割を培養細胞とマウス個体を用い立証した。さらに、このタンパクを筋特異的に欠損したマウスを作成し、運動による抗酸化酵素の産生に対する役割を立証した。その結果、運動による抗酸化酵素の増加には、オートファジーを制御するタンパクの活性が重要な役割を果たすことを立証した。今後、このタンパクを効果的に調節する運動方法を確立することで筋萎縮への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used 3 complementary studies: i) C2C12 myotubes were subjected to uniaxial stretch to assess whether stretching regulates p62 expression; ii) C57BL/6 mice were assigned to either voluntary running or no exercise to examine whether exercise training regulates p62 protein; and iii) muscle-specific p62 knockout and wild-type littermate mice were assigned to either exercise training or sedentary groups, and the muscle content of antioxidants was determined after exercise training. Our results demonstrated that p62 mRNA levels were significantly increased by mechanical stretch in C2C12 myotubes. Voluntary running in C57BL/6 mice increased p62 protein and p62 phosphorylation in skeletal muscle. Loss of p62 in skeletal muscle also blunted the exercise training-mediated increase in antioxidants in skeletal muscle. These findings indicate that p62 is required for exercise training-mediated increase of antioxidants in skeletal muscle.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：骨格筋 運動 抗酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、タンパクの合成と分解のバランスを保つことで形態や機能を維持している。心臓疾患、癌、糖尿病などの慢性疾患や加齢は、悪液質（カヘキシー）の増大によりそのバランスが不均衡になり全身の衰弱状態による骨格筋量の減少（筋萎縮）を引き起こす。筋萎縮は、単なる筋量の減少という形態学的変化のみならず、筋肉の代謝機能や筋力低下が活動範囲を制限し生活の質を低下することから、筋萎縮の分子メカニズムを解明し筋萎縮の予防に応用することは重要な課題である。慢性疾患や加齢による筋萎縮は、活性酸素種や炎症性サイトカインによる酸化ストレスの増大が主たる原因と考えられており、これらの働きを抑制することで筋萎縮の予防や軽減が期待できる。

運動トレーニングは慢性疾患や加齢による筋萎縮を予防する。この分子メカニズムは、peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 (PGC-1) の活性化による骨格筋線維タイプの遅筋化や抗酸化物質の増加が要因と考えられている。しかしながら申請者らは、筋特異的に PGC-1 を欠損したマウスに運動トレーニングを行わせても、野生型マウスと同様に骨格筋の遅筋化や抗酸化物質の増加が見られることを報告している（参考文献 1）。この結果は、PGC-1 は運動による骨格筋の適応に重要であるが、運動が骨格筋の抗酸化物質を増加する分子メカニズムは、PGC-1 を介さない未知の経路が存在する可能性を示唆している。運動が抗酸化物質の産生を調節する新たな細胞内情報伝達経路を解明できれば、筋萎縮の予防を目的とした効果的な運動プログラムの開発やロコモティブシンドローム予防への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

定期的な運動は慢性疾患や加齢による筋萎縮を予防する。酸化ストレスは筋萎縮を引き起こすことから、酸化ストレスの軽減は筋萎縮を予防する効果的な方法として期待されている。これまで、運動による抗酸化機能の改善は、転写補助因子である PGC-1 を介した抗酸化物質の増加が中心的な役割を果たすと考えられてきた。しかしながら、遺伝子改変動物を用いた近年の報告は、PGC-1 を介さない未知の経路が存在する可能性を示唆している（参考文献 1）。本研究では、オートファジー関連タンパクである p62 による骨格筋の抗酸化物質の新たな産生機構を解明し、筋萎縮の予防を目的とした効果的な運動プログラムの開発やロコモティブシンドローム予防への貢献を目的とする。

3. 研究の方法

実験には C2C12 筋管細胞、野生型マウス (C57BL/6) と筋特異的 p62 欠損マウスを使

用した。骨格筋の力学的刺激による影響を検討するため、C2C12 筋管細胞に機械的伸展刺激を負荷し、伸展刺激終了後に回収した細胞の p62 の mRNA、タンパクおよびリン酸化を評価した。mRNA の評価には RT-PCR、タンパクとリン酸化の評価にはウェスタンブロットを使用した。次に生体における変動を検討するため、C57BL/6 マウスに 4 週間の自発運動を実施させ、運動期間終了 24 時間後に回収した遅筋優位なヒラメ筋と速筋優位な白色広筋の p62、p62 のリン酸化や抗酸化物質の変動をウェスタンブロットを用いて評価した。さらに、抗酸化物質の産生に対する p62 の役割を立証するため、筋特異的 p62 欠損マウスを作成した。作成には Cre-loxP システムを使用し、筋特異的に p62 タンパクが消失するよう作成した。作成した p62 欠損マウスと同腹子の野生型マウスは、C57BL/6 マウス同様 4 週間の自発運動を実施させ、運動期間終了 24 時間後に回収したヒラメ筋と白色広筋の抗酸化物質の変動をウェスタンブロットを用いて評価した。

4. 研究成果

C2C12 筋管細胞を伸展刺激し p62 の変動を評価した。その結果、p62 の mRNA の発現は伸展刺激開始 1 時間後から増加し、6 時間後には有意に増加した。p62 のタンパクの発現は伸展刺激開始 24 時間後に有意に増加し、p62 のリン酸化も伸展刺激開始 24 時間後に有意に増加した。生体における変動を検討するため、C57BL/6 マウスに 4 週間の自発運動を実施し骨格筋の p62 や抗酸化物質の変動を評価した。その結果、抗酸化物質は、遅筋、速筋ともに安静群に比べ運動群が有意に高かった。p62 の発現は、速筋では安静群に比べ運動群が有意に高かったが、遅筋では速筋のような違いは観察されなかった。p62 のリン酸化は、遅筋、速筋ともに安静群に比べ運動群が有意に高かった。さらに、抗酸化物質の産生に対する p62 の役割を立証するため、筋特異的 p62 欠損マウスを作成し、抗酸化物質の変動と 4 週間の自発運動による抗酸化物質の変動を評価した。その結果、p62 欠損マウスは野生型マウスに比べて一部の抗酸化物質の発現が有意に抑制された。また、野生型マウスでは運動により増加した抗酸化物質のうち、一部の抗酸化物質は p62 欠損マウスでは運動を実施しても増加しなかった。

以上のことから、運動による抗酸化物質の増加には p62 の活性化が関与する可能性が示唆された。今後、p62 の発現を効率よく調節できる運動プログラムなどを開発することで、効果的な筋萎縮予防方法の確立への貢献が期待できる。

参考文献

- Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, Yan Z. PGC-1 alpha plays a functional role in exercise-induced

mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298(3):C572-9, 2010.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

奥津光晴, 山田麻未. 骨格筋の恒常性維持に関する最新知見. *体力科学* 67(3):245-249, 2017.

Mami Yamada, Chihiro Hokazono, Mitsuharu Okutsu. Maternal exercise training attenuates endotoxin-induced sepsis in mice offspring. *Biochem Biophys Rep.* (in press)

[学会発表](計16件)

Mami Yamada, Masahiro Iwata, Mitsuharu Okutsu. p62/SQSTM1 is required for exercise training-mediated regulation of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Experimental Biology* 2018, April 2018, San Diego.

Mitsuharu Okutsu, Mami Yamada, Masahiro Iwata. The role of Nrf2 in exercise training-mediated regulation of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Experimental Biology* 2018, April 2018, San Diego.

奥津光晴. シンポジウム「運動・栄養科学の可能性を探る」: 運動が骨格筋の恒常性を維持する分子メカニズム骨格筋の恒常性維持に対する細胞ストレスセンサーの役割. 第22回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2018年3月, 名古屋.

Mami Yamada, Mitsuharu Okutsu. p62/SQSTM1 is required for muscle contractile activity-mediated regulation of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *NCU Global Young Investigator Forum* 2018, March 2018, Nagoya.

奥津光晴, 山田麻未, 岩田全広. 骨格筋の Nrf2 は抗酸化酵素の発現を調節する. 第6回骨格筋生物学研究会 2018年3月, 札幌.

山田麻未, 岩田全広, 奥津光晴. 骨格筋の p62 は抗酸化酵素の発現を調節する. 第6回骨格筋生物学研究会 2018年3月, 札幌.

奥津光晴, 山田麻未. ワークショップ「Experimental Tips ～分子生物学的手法における再現性・妥当性を求めて～」: ウェスタンブロットの注意点と成功するためのコツ. 第72回日本体力医学会学術集会, 2017年9月, 松山.

奥津光晴, 山田麻未, 岩田全広. 骨格筋の恒常性維持に対する細胞ストレスセンサーの役割. 第72回日本体力医学会学術

集会, 2017年9月, 松山.

山田麻未, 岩田全広, 奥津光晴. オートファジー基質が骨格筋の抗酸化酵素を産生する新規分子基盤. 第72回日本体力医学会学術集会, 2017年9月, 松山.

Mami Yamada Chihiro Hokazono, Ken Tokizawa, Syuri Marui, Masahiro Iwata, Katsuhiko Suzuki, Shinji Miura, Kei Nagashima, Mitsuharu Okutsu. Muscle contractile activity regulates SDF-1 /CXCL12 expression in skeletal muscle. *Experimental Biology* 2017, April 2017, Chicago.

山田麻未, 岩田全広, 奥津光晴. 運動が骨格筋の恒常性を調節する新規分子経路. 第21回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2017年3月, 名古屋.

奥津光晴, 山田麻未, 岩田全広. 骨格筋の恒常性維持に対する細胞ストレスセンサーの役割. 第21回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2017年3月, 名古屋.

山田麻未, 奥津光晴. 骨格筋における p62 の役割. 第5回骨格筋生物学研究会, 2017年3月, 東京.

奥津光晴, 山田麻未. 骨格筋における Nrf2 の役割. 第5回骨格筋生物学研究会, 2017年3月, 東京.

山田麻未, 外園千紘, 栗栖豊昌, 岩田全広, 奥津光晴. 骨格筋細胞の収縮刺激による SDF-1 /CXCL12 の発現変化. 第71回日本体力医学会学術集会, 2016年9月, 盛岡.

奥津光晴, 栗栖豊昌, 山田麻未, 岩田全広. 一酸化窒素による抗酸化酵素の発現制御. 第71回日本体力医学会学術集会, 2016年9月, 盛岡.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

受賞

第21回日本体力医学会東海地方会学術集会奨励賞(山田麻未, 岩田全広, 奥津光晴. 運動が骨格筋の恒常性を調節する新規分子経路), 2017年3月.

ホームページ

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~okutsu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥津 光晴 (OKUTSU, Mitsuharu)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・講師

研究者番号: 80409755

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究

永富 良一 (NAGATOMI Ryoichi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20208028
岩田 全広 (IWATA Masahiro)
日本福祉大学・健康科学部・准教授
研究者番号：60448264

(4)研究協力者

なし