

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350817

研究課題名(和文)筋収縮により分泌が調節されている新規マイオカインの発見とその機能解析

研究課題名(英文)Discovery and physiological analysis of the novel myokine secreted by the muscle contraction

研究代表者

眞鍋 康子 (Manabe, Yasuko)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号：60467412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋収縮により分泌が調節される新規マイオカインを探索することを目的とした。定量プロテオーム解析法により、骨格筋細胞を収縮させることにより分泌が増加した12分子、減少した2分子をマイオカイン候補分子として選択した。その中から市販抗体が利用できる10分子に対して、骨格筋での発現と分泌を検証したところ、候補とした分子の全てが骨格筋で発現していることが明らかになった。また8分子に関しては培養上清中に分泌されていることが確認された。しかし、いずれの分子も収縮による調節性の分泌は確認できなかった。従って、これらは構成性に分泌されるマイオカインに分類されると推測される。

研究成果の概要(英文)：Recent research suggests that myokines, secreted proteins derived from skeletal muscle, play an important role in mediating the exercise benefit. The goal of this study is to discover novel myokines whose secretion is regulated by muscle contraction. The quantitative proteome analysis identified 14 proteins. Of those, secretion of 12 proteins was up-regulated and 2 proteins were down-regulated by muscle contraction. Ten proteins for which commercially available antibodies can be used were selected and investigated the expression in the skeletal muscle cells and secretion from the skeletal muscle cells. All of the 10 proteins were expressed in the skeletal muscle cells, while 8 of 10 proteins were secreted to the cultured medium. Contrary to the proteome result, secretion of any proteins was not regulated by muscle contraction in the western blotting or ELISA. In conclusion, eight novel myokines which are constitutively secreted from skeletal muscle were found in this study.

研究分野：運動分子生物学

キーワード：マイオカイン 骨格筋 分泌 収縮

### 1. 研究開始当初の背景

これまで動きを生むための器官としか見なされていなかった骨格筋から、様々な生理活性物質(総称して「マイオカイン」と呼ばれる)が分泌されるとの報告がされるようになってきた。マイオカインの分泌は運動により増加するとされており、マイオカインは骨格筋と他臓器とのコミュニケーションを司ることによって、運動による健康の増進効果の一端を担っていると考えられている。しかし、報告されているマイオカインのほとんどは、筋収縮が分泌のトリガーとなるかの直接的な証明がされていない。また、それらは本当に骨格筋細胞由来なのか、その周辺細胞由来なのかの明確な証拠がないまま、「筋収縮によりマイオカインが分泌されることが健康を増進させる」との仮説が先行している。

申請者は、これまでに、培養骨格筋細胞を分化させ、電気刺激を与えることで、筋細胞を収縮させることに成功した。この筋細胞収縮モデルを用い、収縮させた細胞の培養上清を定量性のないショットガンプロテオーム法で解析し、骨格筋から多数のマイオカインが分泌されることを発見した。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の系を応用し、定量性のあるプロテオーム解析により筋収縮によって分泌が調節される新規マイオカインを発見することを目的とした。これにより、実際にマイオカインが筋収縮により分泌するか、あるいは、筋収縮に関係なく分泌されるかを明確にすることができる。

### 3. 研究の方法

(1) 筋収縮によって分泌が調節されるマイオカインの同定

培養骨格筋細胞(C2C12細胞)を成熟した筋管になるまで分化させた。分化5日目に、収縮を与えずに1時間静置させた細胞の培養上清、電気刺激により収縮させた細胞の培養上清をそれぞれ回収し、遠心濃縮した。これらのサンプルは、定量プロテオーム解析用にラベルし(iTRAQ法)、高感度のフーリエ変換型質量分析計Orbitrapにより解析した。

(2) バイオインフォマティクスの手法を用いたマイオカインの選定

プロテオーム解析により収縮で分泌が調節されると判断された分子をバイオインフォマティクスによる構造解析に供し、シグナル・ペプチドを有し、膜貫通領域(疎水領域/ $\alpha$ ヘリックス構造)が1カ所以下で、核・ミトコンドリア・小胞体への局在配列を持たない分子を選定し、収縮により分泌が調節されるマイオカインとした。

(3) 細胞を用いた発現の確認

プロテオーム解析とバイオインフォマティクス解析によって選択されたタンパク質が、実際に収縮刺激によって骨格筋細胞から分泌されるかを明らかにするために、分化さ

せたC2C12細胞を電氣的に収縮させた細胞上清ならびに、lysateを回収した。培養上清は遠心濃縮法により約7倍に濃縮した。Lysateは超音波破碎の後、13,000 xgで遠心分離し、上清をサンプルとした。骨格筋での発現、または培養上清中への分泌は、ウェスタンブロット法または、ELISA法により検証した。

### 4. 研究成果

(1) 定量プロテオーム法を用いたマイオカインの同定

定量プロテオーム解析の結果、1173分子が培養上清中に検出された。そのうち収縮により分泌が1.2倍以上増加したタンパク質は124分子、0.6倍以下に減少したものは24分子であった。これら選定したタンパク質の中から、実際に分泌される構造を有しているものを選定するため、バイオインフォマティクスによる構造解析(Signal P, TMHMM, Target P)に供した。その結果、1.2倍以上増加したタンパク質は14分子、0.6倍以下に減少したものは2分子であった(図1)。

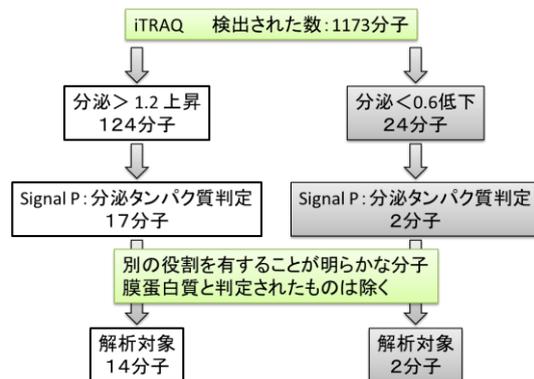


図1 解析対象の分子選択の流れ

(2) C2C12細胞を用いた発現と分泌の確認

選択されたマイオカイン候補の中から、市販抗体が入手できるものを本研究の解析対象とした。解析対象は1.2倍以上増加したもので10分子、0.6倍以下に減少したものは1分子となった(表1)。選択された分子はこれまでに骨格筋で発現していることの報告はない。これらのタンパク質が実際に骨格筋細胞で発現しているかについては、C2C12細胞のlysateを用いて検証した。その結果、対象とした10分子は全て骨格筋細胞に発現していることが明らかになった(表1, 図2)。1分子については、ウェスタンブロットングにより、検出することができなかった。分子量が他の分子と比べて小さいため(5-6K)、電気泳動のゲルのボトム付近になりバンドが乱れてしまったためと考えられた。この分子は、市販のELISAキットが利用できることから、ELISA法により測定したところ、現在、予備検討の段階ではあるものの、発現が確認された(図2B)。

表1 プロテオーム解析から得られたマイオカイン候補分子

>1.2up	ID#	市販抗体の有無	今回の対象	ratio	骨格筋における発現	培養上清中の分泌
	P57759	○	○	2.198	○	○
	P09535	○	○	1.684	○	○
	P47877	○	○	1.538	○	○
	E9Q414	○	○	1.446	○	○
	Q62009	○	○	1.416	○	○
	Q9QZJ6	×	×	1.370	-	-
	Q8CG19	○	○	1.365	○	○
	Q9ET80	○	○	1.311	○	×
	P00755	×	×	1.286	-	-
	Q9CQ45	○	○	1.269	○	×
	Q6PE55	○	○	1.258	○	○
	Q6P9S7	-	×	1.244	-	-
	P47880	○	○	1.243	○	○
	Q9QUJ7	-	×	1.230	-	-
<0.6down						
	P01325	○	○	0.583	○	?
	Q9D6X6	×	×	0.511	-	-

骨格筋で発現が確認された分子が実際に分泌されるか、また分泌が収縮によって調節されるかの検証を行った。解析対象 10 分子のうち 8 分子は培養上清中に検出され、分泌されていることが確認された (図 3)。また、lysate のサンプルで ELISA 法により発現が確認された P01325 は培養上清中でも存在が確認できた (図 2B)。対象とした分子のうち 2 分子に関しては、培養上清中では確認ができなかった。2 分子とも lysate では目的のバンドが検出されている。したがって、これらは分泌されない可能性、あるいは、上清中に分泌されるが分泌量が少ない (または抗体の力価が悪い) ため、ウェスタンブロットでの検出が難しかったと考えられる。

今回、解析対象の分子は、iTRAQ 法では骨格筋細胞の収縮により分泌が上昇する分子、あるいは低下する分子として検出されてきた。しかし、いずれの分子においても、ウェスタンブロット法では収縮による分泌の調節は観察されなかった。定量プロテオーム解析で差が得られても他の手法を用いて定量すると、差が得られないことは頻りに観察されている。この理由として、ウェスタンブロットの検出感度では、分泌されたマイオカインのわずかな量の差を見分けることができなかつた可能性、あるいは、分泌されているが筋収縮による調節性の分泌ではない可能性が考えられる。後者の可能性は、これまでのマイオカインの研究からも矛盾してない。先行研究では収縮させていない骨格筋細胞の培養上清から多量のタンパク質が分泌されることがショットガン法を用いたプロテオーム解析、ならびにウェスタンブロット法で明らかになっている。これら

の分子は、収縮させても分泌の調節が観察されておらず、構成性に分泌されるマイオカインであるとされている。本研究の結果と合わせると、マイオカインは特に刺激がなくとも構成性に分泌される種類が多く、調節性分泌されるものは少ないのかもしれない。運動により適切な筋量を維持しておくことが構成性マイオカインの分泌量の維持に結びつくなら、「調節性」でなくても「構成性」であることがマイオカインとして重要な意味を有している可能性がある。収縮により分泌が減少するものに関しては、この仮説は当てはまらないが、運動により発現量を減少させることで循環血液中の量を調節していることも考えられる。収縮で分泌が低下するものとして発見された P01325 に関しては、今後、別の研究費を申請することで引き続きマイオカインの研究を進める予定である。

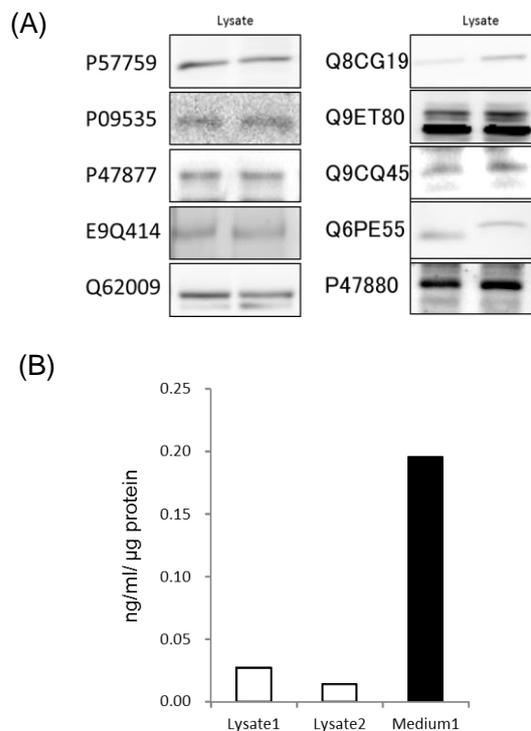
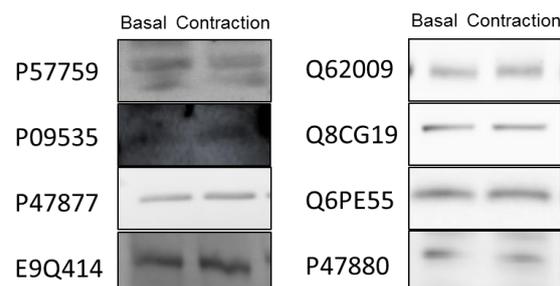


図2 (A) C2C12 細胞の lysate を用いたウェスタンブロッティング。対象となる 10 分子について検証し、骨格筋細胞に発現していることを確認された。(B) ELISA 法によって P01325 分子の発現は確認された。

図3 培養上清における分泌の検証



## 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 20 件)

- ①Tamura K, Furuichi Y, Manabe Y, Fujii NL: Role of satellite cells in skeletal muscle plasticity, beyond muscle regeneration. *J Phys Fitness Sports Med.* 6, 89-93, 2017, doi: 10.7600/jpfsm.6.89
- ②Manabe Y, Fujii NL: Experimental models research on skeletal muscle contraction, *J Phys Fit Sport Med*, 5, 373-377, 2016, doi: 10.7600/jpfsm.5.373
- ③Inagaki A, Maruo K, Furuichi Y, Miyatake S, Tamura K, Fujii NL, Manabe Y: An improved glucose transport assay system for isolated mouse skeletal muscle tissues, *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 2224-2230, 2016, doi: 10.1080/09168451.2016.1210503
- ④Goto-Inoue N, Tamura K, Motai F, Ito M, Miyata K, Manabe Y, Fujii NL: A fragmented form of annexin A1 is secreted from C2C12 myotubes by electric pulse-induced contraction, *Mol Cell Biochem*, 411, 173-180, 2016, doi: 10.1007/s11010-015-2579-8.
- ⑤Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: Evaluation of an in vitro muscle contraction model in mouse primary cultured myotubes. *Anal Biochem*, 497, 36-38, 2016, doi: 10.1016/j.ab.2015.10.010.
- ⑥Furuichi Y, Goto-Inoue N, Manabe Y, Setou M, Masuda K, Fujii NL: Imaging mass spectrometry reveals fiber-specific distribution of acetylcarnitine and contraction-induced carnitine dynamics in rat skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta* 1837, 1699-1706, 2014, doi:10.1016/j.bbabi.2014.05.356.
- ⑦Manabe Y, Takagi M, Nakamura-Yamada M, Goto-Inoue N, Taoka M, Isobe T, Fujii NL: Redox proteins are constitutively secreted by skeletal muscle. *J Physiol Sci* 64: 401-409, 2014, doi:10.1007/s12576-014-0334-7.

[学会発表] (計 24 件)

- ①眞鍋康子: マイオカインは運動模倣薬となるか? 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 仙台
- ②眞鍋康子, 武藤敬正, 山田健一郎, 片倉健悟, 青木友那, 古市泰郎, 坂井貴臣, 藤井宣晴: ショウジョウバエを用いたマイオカインの生理的機能スクリーニング, 第 5 回骨格筋生物学研究会, 2017 年 3 月 3 日, 東京
- ③眞鍋康子, 武藤敬正, 山田健一郎, 片

倉健悟, 青木友那, 古市泰郎, 坂井貴臣, 藤井宣晴: 新規マイオカイン Peroxiredoxin6 の分泌様式と生理的意義の検証. 第 71 回日本体力医学会大会, 2016 年 9 月 25 日, 盛岡.

- ④Manabe Y, Inagaki A, Maruo K, Tamura K, Furuichi Y, Fujii N: Development of a new in vitro skeletal muscle contraction system. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 15 日, 横浜.
- ⑤眞鍋康子, 荻野慎也, 高木麻由美, 井上(後藤)菜穂子, 山田美緒, 小野悠介, 古市泰郎, 藤井宣晴: 骨格筋初代培養細胞と C2C12 細胞株の細胞特性の検証. 第 67 回日本細胞生物学会, 2015 年 6 月 30 日, 東京.

[図書] (計 3 件)

- ①眞鍋康子, 古市泰郎: 7 章-1 身体運動に伴う生体機能適応を支える分子機構. エビデンスに基づく身体活動の科学 (熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴 編集), 杏林書院, 163-170, 2016.
- ②Manabe Y: Mechanism of skeletal muscle contraction: Intracellular signaling in skeletal muscle contraction. In *Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus*, Springer, 139-153, 2016. DOI: 10.1007/978-4-431-55720-3\_10
- ③眞鍋康子, 藤井宣晴: 運動による血糖降下のメカニズム. In *糖尿病治療のニューパラダイム* 第 1 巻, 医薬ジャーナル社, 186-190, 2014

[その他]

雑誌の取材等

- ①眞鍋康子, 藤井宣晴: 筋を鍛える 5 つの理由. *Tarzan*, 32 (21): 47-49, 2016.).
- ②眞鍋康子, 藤井宣晴: 寝たきりを遠ざける運動と栄養. *ロハス・メディカル*, 117: 14-17, 2015. *ロハスメディア*, 東京.
- ③眞鍋康子, 藤井宣晴: 魔法の“ゆる”ストレッチ. *日経ヘルス*, 10: 51, 2015. *日経 BP 社*, 東京.

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/Kenkyuugaiyou.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞鍋 康子 (MANABE, Yasuko)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号: 60467412

(2) 連携研究者

井上 菜穂子 (INOUE, Naoko)

日本大学・生物資源科学部・専任講師

研究者番号: 00509515