

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350889

研究課題名(和文) BirA酵素標識法による運動時のHSPBsの標的分子の網羅的解析とその応用

研究課題名(英文) The comprehensive analysis of target molecules of HSPBs in muscle exercise by the BirA labeling method.

研究代表者

上田 修司 (Shuji, Ueda)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：50379400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BirA酵素標識法による低分子量ヒートショック蛋白質 HSPB1の結合蛋白質の網羅的な解析に成功することができた。また、IGF-1によるC2C12筋細胞株の肥大化モデルにおいて、RhoA-SLKのシグナルの関与を明らかにした。今後、BirA酵素標識法による分子シャペロンの活性化を定量的に測定する実験法に発展させると共に、高齢者の筋萎縮の予防に繋がる食品成分の開発に用いる研究ツールとして応用する計画である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in carrying out the comprehensive analysis of the binding protein of low molecular weight heat shock protein HSPB1 by the BirA enzyme-labeling method. Moreover, we revealed the involvement of RhoA-SLK signal in the enhancement of C2C12 myotube by IGF-1. In the future, we plan to develop BirA enzyme-labeling method into a quantitative experimental method to measure the molecular chaperone activity of HSPBs, and apply this methods as a research tool for screening functional ingredients to prevent muscular atrophy in the elderly.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒートショック蛋白質 RhoA 運動 筋肉 BirA 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

高齢者の骨格筋では、筋原線維の蛋白質変性、異化の促進、運動神経の脱落による筋線維タイプの遷移、筋分化能の低下が蓄積し、延いては筋力と筋肉量の低下が生じる。一方、筋力トレーニング(運動負荷)は、年齢にかかわらず、蛋白質の同化を促進し、高齢者であっても筋力と筋肉量の改善が図られる。しかし、運動負荷の効果的な継続は難しく、過剰な運動負荷は、反って高齢者の身体への負担が懸念される。

低分子量ヒートショック蛋白質である HSPBs は、細胞ストレスによって発現誘導される分子量 20kDa 前後の分子シャペロンであり、様々な蛋白質と複合体を形成することで、蛋白質の変性を抑え、細胞ストレスに対する細胞防御反応に関わると考えられている(図 1)。

HSPBs は、骨格筋で HSPB1、HSPB2、HSPB3、HSPB5、HSPB6、HSPB7 の 6 種類が発現しており(Golenhofen. *et al.* 2004)、加齢において HSPBs の発現が増加することが報告されている(Doran. *et al.* 2009)。また、HSPBs は、運動負荷においても発現が誘導される(Paulsen. *et al.* 2011)、HSPB1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、後肢懸垂に伴う廃用性筋萎縮からの筋肉量の回復が見込まれることより(Stephen. *et al.* 2009)、加齢性筋萎縮症や運動負荷後の筋肉において、HSPBs が何らかの蛋白質の安定化を介して、筋力と筋肉量の維持に関わると考

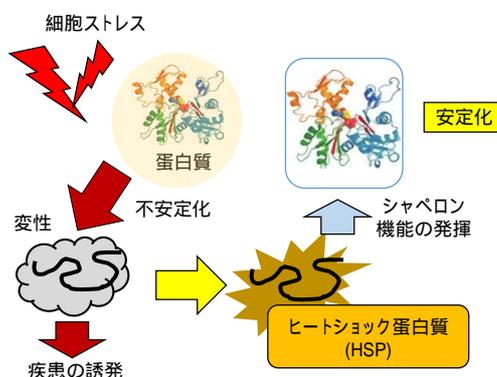


図1 ヒートショックタンパク質のはたらき

えられる。

低分子量 G 蛋白質の RhoA は、筋細胞の増殖・分化に不可欠な細胞内シグナル伝達を制御する分子スイッチとして機能し、運動負荷後の骨格筋において、RhoA の発現が上昇する報告があり(Lamon. *et al.* J Physiol. 2009)、実際のヒトの筋力と筋肉量の維持に RhoA が深く関わる事が推測されている(Sakuma. *et al.* Acta Physiol. 2009)。

このような背景の元、運動負荷後の筋細胞では、HSPBs による分子シャペロンの機能向上、分泌された血中インスリン様増殖因子(IGF-1)の増加による IGF-1 受容体を介した RhoA の活性化とそれに伴う下流の細胞内シグナル分子の活性化によって、筋細胞の肥大化が起こると推測される。

2. 研究の目的

高齢者の筋力と筋肉量の最適な維持に向けた適切な運動負荷の実現には、細胞内で起こる種々の運動の効果を計測できる指標の開発が求められる。そこで本研究では、ビオチン標識酵素である BirA による酵素標識法を、培養細胞株を用いた *in vivo* の実験系における蛋白質間相互作用の解析に応用し、運動負荷における HSPBs の分子シャペロン機能の全容解明を最終的な目標として、HSPBs の結合蛋白質の網羅的な解析系を立ち上げた。また、運動負荷後の筋肉の増加における IGF-1/RhoA シグナル伝達機構の解明に向け、H23-25 年採択の若手研究(B)「筋肉の増加における低分子量 G 蛋白質の機能解析」に引き続き、BirA-RhoA による IGF-1/RhoA の下流シグナルの解析を進めた。

3. 研究の方法

BirA 融合蛋白質として、改変型 BirA(Roux *et al.* 2012)を融合する発現プラスミドを作成した。蛋白質のビオチン標識は、BirA 融合蛋白質発現ベクターを遺伝子導入後、培養培地に 50 μ M ビオチンを添加し、24 時間培養す

ることで行った。ビオチン化蛋白質は、Tamavidin 2-REV 磁性ビーズで回収・精製を行った。ビオチン化蛋白質は、HRP 標識ストレプトアビジンを用いたウエスタンブロッティング (WB) によって検出した。

ビオチン化蛋白質の同定は、銀染色後のゲルよりバンドを切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化物をナノ高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (nanoLC/MS/MS) に供し、マスコット解析で行った。

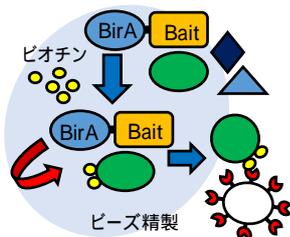
RhoA の新たに見つかった結合蛋白質 Ste20-like protein kinase (SLK) の機能解析は、マウス筋芽細胞 C2C12 細胞株を用いた IGF-1 依存的な筋肥大モデルによって評価した。RhoA と SLK の結合は、組換え RhoA 蛋白質のタグ配列を用いた免疫沈降法で検討した。SLK の活性化は、活性依存的な SLK のリン酸化部位を、特異的なリン酸化抗体を用いた WB で評価した。

4. 研究成果

1) HSPBs の網羅的な結合蛋白質の探索

培養細胞株に進展収縮刺激を加えた条件

A BirA酵素標識法



B BirA-HSPB1 と HSPB1 の細胞内局在確認と蛍光標識ストレプトアビジンによるビオチン化蛋白質の可視化

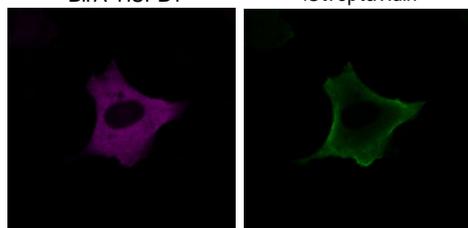


図2 BirAを用いたHSPB1標的蛋白質の可視化技術について (A) BirA酵素標識法の原理。(B) BirA-HSPB1の細胞内局在確認と蛍光標識ストレプトアビジンによるビオチン化蛋白質の可視化。

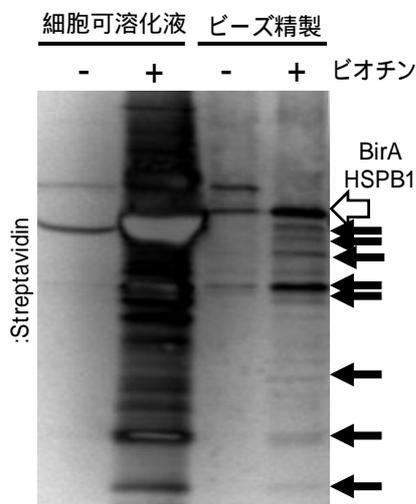


図3 BirA-HSPB1による標的蛋白質の可視化 細胞内におけるBirA-HSPB1によるシャペロン標識蛋白質の検出。矢印が示すようにBirA-HSPB1により細胞中の多数がビオチン標識されたことを示す。

で、細胞内の結合蛋白質を可視化する技術を、改変型 BirA 酵素標識法を応用することで、カリフォルニア大学 Davis 校の Dr. Yamada 氏との共同研究で開発した (Ueda. *et al.* PlosOne)。また、鶏の骨格筋を用いて、加齢に伴って発現上昇する HSPBs として、HSPB1 (別名 Hsp25/27) を同定した (Ueda. *et al.* BBB)。

そこで、BirA-HSPB1 発現プラスミドを作製し、HEK293 細胞に遺伝子導入したところ、BirA-HSPB1 と推定される分子量サイズで蛋白質の発現が確認された。また、ビオチン添加依存的に、BirA-HSPB1 による様々なビオチン化蛋白質の増加を確認した (図 2A)。HSPB1 のシャペロン活性の視覚的な検出に向け、BirA-HSPB1 を発現した細胞を蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、BirA-HSPB1 による蛋白質のビオチン化による蛍光を観察できた (図 2B)。また、BirA-HSPB1 の細胞内局在は、内在性 HSPB1 の局在と大差が無いことを確認した。

更に、BirA-HSPB1 を発現した細胞の可溶化液を調製し、磁性ストレプトアビジンビーズによって回収・精製後、ビオチン化蛋白質を検出したところ、HSPB1 のシャペロン標的分子と考えられる複数の蛋白質が確認され

た(図3)。以上の結果より、BirA 酵素標識法を用いることで HSPB1 のシャペロン活性を標的蛋白質のビオチン化として、視覚的に検討できる可能性が示唆された。

本研究については、H29-31 年採択の基盤研究(C)「筋萎縮予防に有益な健康食品成分の探索に向けた BirA 酵素標識法の応用」で、引き続き、分子シャペロンの活性化を定量的に測定する実験法として、BirA 酵素標識法を発展させると共に、高齢者の筋萎縮の予防に繋がる食品成分の開発に用いる研究ツールとして、応用する計画である。

2) IGF-1/RhoA シグナルの下流シグナルの解析

293T 細胞に BirA-RhoA (WT)、または常時活性化型変異体である BirA-RhoA (G14V) を過剰発現させ、精製したビオチン化蛋白質を nanoLC/MS/MS に供したところ、RhoA (WT) で 147 個、RhoA (G14V) で 212 個の蛋白質が同定された(図4)。RhoA の既知の結合蛋白質として、エフェクター分子 (DIAP、ROCK 等 11 個)、GEFs (ARHG2 等 3 個)、GAPs (RHG21 等 11 個) が認められた。また、これまで RhoA と相互

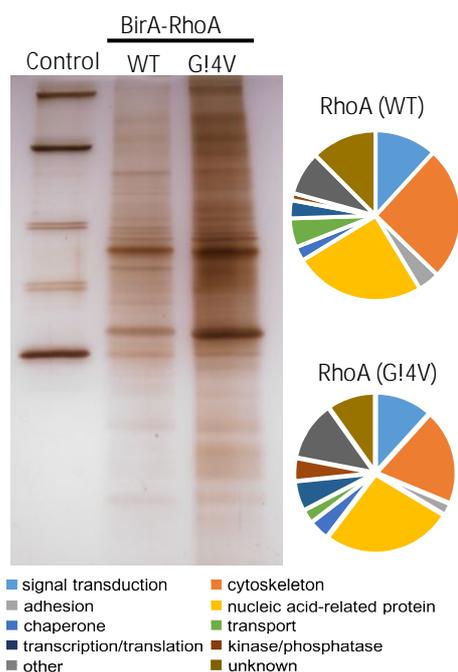


図4 BirA-RhoAのビオチン化蛋白質の同定 (A) BirA-RhoAによるビオチン化蛋白質のピース精製後の銀染色画像。(B)同定したビオチン化蛋白質の細胞機能の分類。

作用が示されていない複数の結合蛋白質 (FILA、MYH9、MYH10 等) を推測することができた。特に質量分析のスコア、emPAI 値が高く検出された SLK は、RhoA と同様に筋細胞の分化及び肥大化に関与することが期待されることから (Storbeck. *et al.* 2013)、IGF-1 の筋肥大モデルにおける SLK と RhoA の機能解析を行った。筋管に分化誘導した C2C12 細胞に IGF-1 刺激した結果、SLK と RhoA の結合は増加し、IGF-1 依存的に SLK の活性化が認められた(図5)。また、RhoA においても IGF-1 依存的な活性化が認められることから、不活性化型変異体 RhoA (T19N) を過剰発現させた RhoA の活性阻害実験を行った結果、IGF-1 刺激による SLK の活性化が抑制された。更に、SLK 阻害剤を処理した場合、IGF-1 による筋管の肥大化のマーカであるミオシン重鎖の発現増加が抑制され、筋管の最大直径の増加を有意に抑制した(図6)。以上の結果より C2C12 細胞の IGF-1 による筋肥大において、RhoA-SLK シグナルの関与が強く示唆された。

今後、運動負荷における SLK の役割について、更に検証を進める計画である。

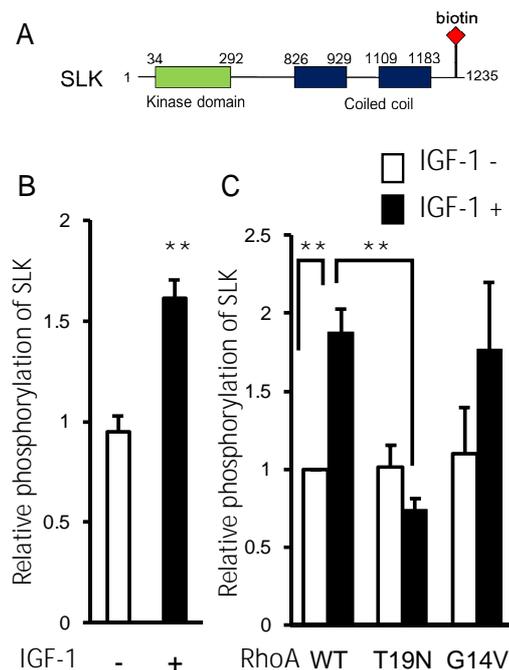


図5 IGF-1/RhoAの下流シグナルの解析 (A) SLKの構造とBirA-RhoAによるビオチン化部位。(B) IGF-1刺激によるSLKの活性化。(C) RhoAのドミナントネガティブ変異対(T19N)の過剰発現によるSLKの活性化の阻害。

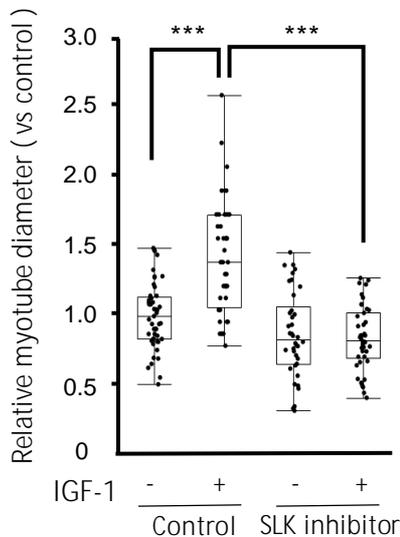


図6 SLK阻害剤によるIGF-IIによる筋肥大抑制 (A) SLK阻害剤(Erlotinib)の前処理によるIGF-I刺激による筋管の肥大の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) Ueda S, Blee AM, Macway KG, Renner DJ, Yamada S.: "Force Dependent Biotinylation of Myosin IIA by β -Catenin Tagged with a Promiscuous Biotin Ligase." PlosOne. (2015), DOI:10.1371/journal.pone.0122886
査読有

2) Ueda S, Kokaji Y, Simizu S, Honda K, Yoshino K, Kamisoyama Y, Shirai Y, Yamanoue Y: "Chicken heat shock protein HSPB1 increases and interacts with B-crystallin in aged skeletal muscle." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry (2015)79:11. 1867-1875, DOI:10.1080/09168451.2015.1061419
査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1) 小鍛冶泰斗、上田修司、吉野健一、山之上稔、白井康仁「筋細胞における低分子量ヒートショック蛋白質HSPB1の結合分子の探索とその機能解析」第 87 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館) 一般講演 2014 年 10 月 15 日

2) 櫛谷晃帆、上田修司、加藤良毅、吉野健一、竹内敦子、山之上稔、白井康仁「BioID法を用いた低分子量G蛋白質 RhoA の結合蛋白質の探索」第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 一般講演 2016 年 12 月 1 日

3) 小鍛冶泰斗、加藤良毅、櫛谷晃帆、吉野健一、竹内敦子、山之上稔、白井康仁、上田修司、「骨格筋における HSPB1 結合蛋白質の探索とそのアクトミオシンの ATPase 活性に与える影響」日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会 (第 496 回講演会)、滋賀県立大学 2016 年 9 月 17 日

4) 櫛谷晃帆、上田修司、加藤良毅、桐村悠佑、石政碧、吉野健一、竹内敦子、山之上稔、白井康仁「筋肉の増加減退に関わる RhoA の機能解析と相互作用分子の探索」第 63 回日本生化学会近畿支部例会 神戸薬科大学 2016 年 5 月 21 日

5) 上田修司、岩本英治、正木達規、渡代勝之、谷元哲則、白井康仁、山之上稔「多成分一斉解析技術による黒毛和種牛肉の食品成分の検討」日本畜産学会第 121 回大会 (日本獣医生命科学大学) 2016 年 3 月 29 日

6) 上田修司、岩本英治、吉田和利、篠原 正和、中田悠介、高杉瑠美、岩本英樹、野村郁代、小川隆文、白井康仁、山之上稔、「黒毛和種牛肉の赤身部位の各種分析技術の検討」第 122 回大会日本畜産学会 (神戸大学) 2017 年 3 月 29 日

7) Ueda S, Yamada S, Kirimura K, Kushiya A, Yamanoue M, Satoh T, Shirai Y.: A role of RhoA activation in IGF-1-induced muscular hypertrophy model. 2014 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2014,12,9). Philadelphia, (米国)

8) Ueda S, Blee AM, Macway KG, Renner DJ, Yamada S. Force dependent biotinylation of myosin IIA by β -catenin tagged with a Promiscuous Biotin Ligase. 2015 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2015,12,13). San Diego, (米国)

9) Kushiya A, Ueda S, Kirimura Y, Katoh Y, Ishimasa M, Satoh T, Yamanoue M, Shirai Y.:

Insulin-like growth factor-1 induces activation and upregulating of RhoA via PI3K/Akt/mTOR pathway in muscular hypertrophy model of C2C12 cells. 2015 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2015,12,13). San Diego, (米国)

10) Kato Y, Kokaji Y, Kushiya A, Yoshino K, Takeuchi A, Yamanoue M, Shirai Y, Ueda S. Identification of novel HSPB1 binding proteins in skeletal muscle. The American Society for Cell Biology. (2016,12,6) San Francisco, ASCB/IFCB. (米国)

11) Kushiya A, Kato Y, Yamada S, Yoshino K, Takeuchi A, Yamanoue M, Shirai Y, Ueda S. Identification of novel RhoA binding proteins by using BiOD system. The American Society for Cell Biology. (2016,12,6) San Francisco, ASCB/IFCB. (米国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 修司 (UEDA SHUJI)

神戸大学大学院農学研究科・助教

研究者番号：50379400