

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04080

研究課題名(和文) 骨格筋量維持のためのリサイクリングシステムの解明

研究課題名(英文) Contribution of protein recycling system for the maintenance of skeletal muscle mass

研究代表者

永富 良一 (Nagatomi, Ryoichi)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：20208028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソームによるタンパク質分解を抑制すると骨格筋量はむしろ減少してしまう。その原因として当初予想していたタンパク質分解産物の直接のリサイクルは元々ほとんど行われていなかった。ところがプロテアソームによるタンパク質分解後には分解産物の処理に当たる複数のアミノペプチダーゼ群が作用しており、それらが単に分解だけではなく、骨格筋の発達や修復に関わる筋幹細胞である筋芽細胞の細胞周期、筋分化開始の決定、分化に伴う形態形成や細胞極性の決定などの調節に直接関与していることが明らかになった。健全な骨格筋維持にはタンパク質分解後に働くアミノペプチダーゼ群の作用が重要であることを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の量や機能の維持は競技スポーツのみならず健康領域においても重要である。従来タンパク質分解は筋量維持に対してマイナスと捉えられていたが、むしろ筋量や機能の維持には不可欠であることがわかってきた。われわれは今回そのメカニズムとして初めてタンパク質分解経路が単純なリサイクルではなく、筋芽細胞を筋形成に向かわせるか否かや、形態の決定を行っていることなどを明らかにした。これは健全な骨格筋を保つには単にタンパク質分解指標に基づく、分解抑制や、分解で不足する材料の補充を行うだけでは不十分であること、適切な分解の状態を維持するための栄養やトレーニングなどの戦略を再考する必要性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Proteolysis has long been considered deleterious to skeletal muscle. Recent studies, however, have identified that impaired proteolytic function leads to loss instead of an increase in skeletal muscle mass. Dysfunction in the proteasome-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle induced more significant loss or impaired development than dysfunction in the autophagy pathway. Although we failed to detect the recycling of degradation derived amino acids for de-novo protein synthesis, we found the induction of various aminopeptidases linked to the proteasome-dependent proteolytic pathway. Each aminopeptidase in cultured myoblasts demonstrated essential roles, such as the regulations of ATP concentration, cell cycle and initiation of differentiation, and determination of polarity and structure of myotubes. Although further studies are required to elucidate the underlying mechanisms, we could demonstrate the essential roles of post-proteolytic aminopeptidases in developing myoblasts.

研究分野：健康科学・体力科学・スポーツ科学

キーワード：骨格筋 期 プロテアソーム アミノペプチダーゼ リサイクル アミノ酸 サルコペニア 分化 細胞周

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

運動機能を支える最も重要な臓器は骨格筋であり、スポーツや競技を行う者にとって骨格筋の量や機能は最大の関心事の一つである。また高齢要介護者のうち13.3%を占める基礎疾患が明確ではない「高齢による衰弱」では骨格筋量の減少や機能低下がみられる(H28年度国民生活基礎調査)。フレイル(虚弱)・サルコペニア(筋肉減少症)・ロコモティブシンドローム(運動器症候群)はいずれも運動機能の低下により要介護リスクが高まった状態とされ、骨格筋機能の低下への対策は高齢化が進む世界中の国々における重要な健康課題である。

骨格筋組織の維持には運動トレーニングおよび栄養が重要である。2009年に米国スポーツ医学会(American College of Sports Medicine)と米国栄養士会(ADA)が合同で競技者の栄養摂取に関するシステムティックレビューに基づく提言を発表している(1)。窒素バランス(摂取窒素量と排泄窒素量の差分)に基づく評価からはウルトラマラソンを含む持久系スポーツ競技者では体重1kg当たり1.2~1.4g/日、筋力トレーニングを必要とする競技者では1.2~1.7g/日が至適とされている。上限の1.7g/kg/日とした場合、体重70kgの競技者の一日のタンパク所要量は約120gである。一方、体重70kgの男子の一日の全身タンパク質代謝量は300~400gといわれ推奨摂取量との間に少なくとも280gの差がある。この差分についての科学的な説明は不十分であり、さまざまなタンパク質サプリメントが根拠なく利用されているのが現状である。

この差分を説明する仮説として、腸管における消化管分泌液や脱落する腸管上皮細胞に含まれるタンパク質やアミノ酸の再吸収が補っているとされているが、明確にはされていない。もう一つの重要な仮説は、タンパク質のリサイクリングである。ノーベル賞で知られるオートファジーはライソソームによる細胞内小器官の分解産物を細胞の生存にあてるタンパク質分解システムである。マウス骨格筋筋特異的にオートファジー経路をノックアウトしたマウスでは骨格筋の萎縮が起きることからオートファジーが筋量の維持に関わっていることが明らかになった(2)。オートファジー機能不全マウスは体重の増加が数%小さく、筋量も速筋線維が多い腓腹筋で10%程度減少していた。一方、われわれはもう一つの細胞内タンパク質分解システムであるプロテアソーム系に着目し、Masieroらと同様に速筋特異的にプロテアソーム機能不全を起こすマウスを作成した(3)。オートファジー不全マウスに比べて筋量減少は著しく体重は60%以上小さく、腓腹筋筋重量はプロテアソーム機能不全マウスは正常マウスの50%を下回り、オートファジーよりもプロテアソーム系の方が筋量の維持に貢献度が高いことを明らかにした。ただしこれらの実験はリサイクリングを直接証明したのではなく、単にリサイクル仮説を支持する状況証拠を得たにすぎない。したがって本研究の第一の問いはプロテアソームで分解されたタンパク質由来のアミノ酸が新たなタンパク質合成に利用されているか?である。第二の問いは、プロテアソームのタンパク質分解に伴うリサイクル効率や量がどのように調節されているか?である。

2. 研究の目的

「プロテアソームで分解されたタンパク質由来のアミノ酸がリサイクルされ新たなタンパク質の合成に利用される」という仮説を証明することを第1の目的とし、続いてプロテアソームを介するタンパク質のリサイクリングがどのように調節されているかを明らかにすることを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロテアソームにより分解されたタンパク質由来のアミノ酸が細胞内タンパク質の新規合成に再利用されていることを明らかにするために、ユビキチン非依存的にプロテアソームで分解されるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)を標識アミノ酸でラベルし、これを細胞内導入する。その後、プロテアソームにより分解された ODC 由来の標識アミノ酸が ODC とは異なるタンパク質合成に再利用されているかどうかを検証した。

(2) 予測に反してタンパク質分解由来アミノ酸がタンパク質合成の材料としてリサイクルされていない可能性が明らかになったため、分解由来アミノ酸が細胞内エネルギー産生の材料として再利用されているという仮説を新たに立てた。これを検証するため、プロテアソームによるタンパク質分解で生じたペプチドをさらにアミノ酸に分解するペプチド分解酵素アミノペプチダーゼ群の阻害が細胞内アミノ酸量やエネルギー量に相当する ATP 量に与える影響を検証した。

(3) アミノペプチダーゼによるペプチド分解が細胞内代謝の恒常性に寄与することが明らかになったため、プロテアソームとアミノペプチダーゼの相互作用による細胞機能制御機構が存在するのではないかと考えた。これを検証するために、プロテアソーム構成遺伝子 *Rpt3* 遺伝子発現を抑制した筋芽細胞に対して RNA-sequence 解析による網羅的な遺伝子発現変動を明らかにし、有意に発現量が変動するアミノペプチダーゼ遺伝子を同定した。

(4) プロテアソームと相互作用する可能性があるアミノペプチダーゼ群が同定されたため、RNA干渉法により特定のアミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が骨格筋筋芽細胞の増殖・分化にどのような影響を与えるかを検証した。

4. 研究成果

(1) HEK293T 細胞にプラスミドベクターにより FLAG タグ付き ODC を過剰発現させ、FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により ODC を単離・精製した。タンパク質トランスフェクト試薬「XFect」を使用することで筋芽細胞内へ ODC を導入することに成功した。ODC 導入細胞に対しプロテアソーム阻害剤である MG132 を作用させることで ODC 分解が有意に抑制されることが明らかになった。これは細胞内導入した ODC の分解がプロテアソームに依存すること意味している。この系において分解されたアミノ酸の新規タンパク合成への利用を検出するためのいくつかの方法を検討した。まずメチオニンアナログである Azidohomoalnine(AHA)を用いて AHA 標識 ODC を作成した。しかし、細胞導入後に AHA の検出ができなくなることが明らかとなり、AHA による検証は断念した。次に、

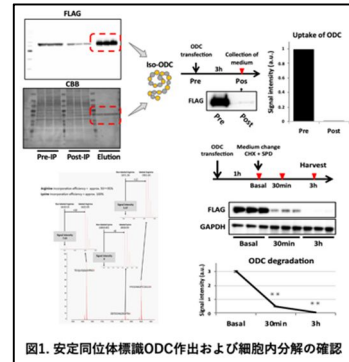


図1. 安定同位体標識ODC作出および細胞内分解の確認

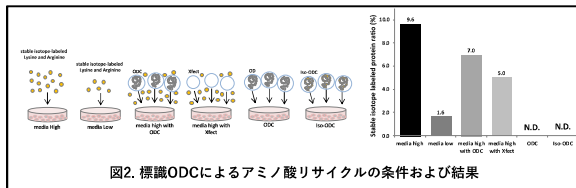


図2. 標識ODCによるアミノ酸リサイクルの条件および結果

安定同位体標識リジンおよびアルギニンを用いた検証に取り組み、同様の手順で安定同位体標識 ODC を作出した。質量分析により標識リジン・アルギニンが十分に含まれていることも確認した(図1)。この安定同位体標識 ODC を筋芽細胞に導入し、分解を確認後に質量分析によって ODC 以外のタンパク質に安定同位

体標識リジン・アルギニンが含まれているか解析したが、予想に反し、標識アミノ酸は新規合成タンパク質で検出されず、分解由来アミノ酸はタンパク質合成の材料としてほとんど利用されていないと考えざるを得ない(図2)。プロテアソーム不全マウス骨格筋のメタローム解析の結果では、筋組織中のアミノ酸量が減少するだけでなく、ATP 量も減少することが明らかとなっていた(図3)。そこで我々は生体内でのアミノ酸の役割について再考し、アミノ酸がタンパク質の材料としてだけでなく、エネルギー基質としても利用される点に注目した。そこで当初の仮説とは異なる、プロテアソームによるタンパク質分解由来のアミノ酸がエネルギー基質としてリサイクルされる可能性を明らかにするために、(2)の実験に取り組んだ。

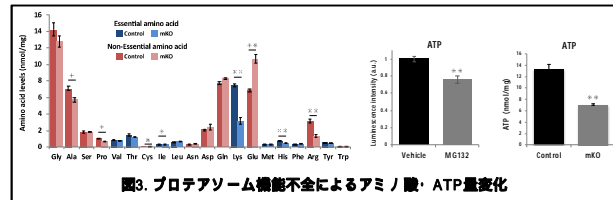


図3. プロテアソーム機能不全によるアミノ酸・ATP量変化

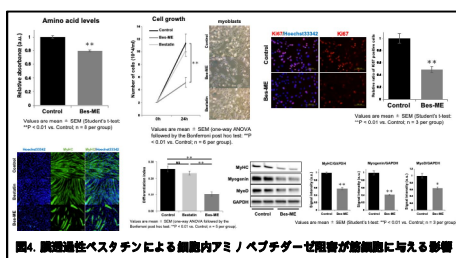


図4. 膜透過性ベスタチンによる細胞内アミノペプチダーゼ阻害が筋細胞に与える影響

(2) 筋芽細胞に対して、細胞内アミノペプチダーゼ阻害剤である「膜透過性ベスタチン」を作用させると、細胞内アミノ酸量の減少や細胞内エネルギー量が低下することが明らかとなった。また、タンパク質合成経路において中心的役割を果たす mTOR が抑制されることも明らかとなった。これらの結果から、タンパク質分解由来アミノ酸は細胞内 ATP 産生に寄与していることが示唆された。骨格筋におけるプロテアソーム機能不全マウスでは、

持久性運動能力が低下していることも明らかとなり(4)、分解由来アミノ酸がエネルギー基質として利用されている可能性が示唆された。

(3) プロテアソーム・アミノペプチダーゼによるタンパク質・オリゴペプチド分解経路は細胞内の ATP 量維持に寄与する可能性が明らかになってきたことから、プロテアソームとアミノペプチダーゼにはなんらかの相互作用が存在し、タンパク質分解や合成を制御するのではないかと考えた。プロテアソームを構成する *Rpt3* 遺伝子発現を抑制した筋芽細胞を RNA-sequence 解析することで網羅的な遺伝子発現変動を明らかにした。また、有意に変動するアミノペプチダーゼ遺伝子として、ペプチド N 末端のアラニン残基を認識・切断するアラニンペプチダーゼ(Anpep)、リジンやフェニルアラニンなど複数のアミノ酸残基を認識・切断するピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)、メチオニン残基を認識・切断するメチオニンアミノペプチダーゼ(Metap1)、ロイシン残基を認識・切断するロイシニアミノペプチダーゼ(LAP3)を同定した。

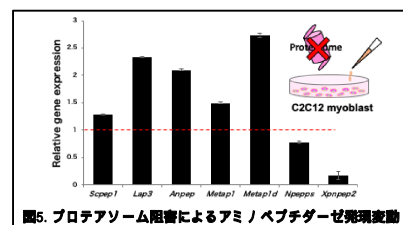


図5. プロテアソーム阻害によるアミノペプチダーゼ発現変動

(4) 筋芽細胞において *Anpep* 遺伝子の発現を抑制すると、細胞周期調節因子である Rb のリン酸化抑制に伴うアポトーシスが誘導され、増殖能力が著しく低下することが明らかになった。さら

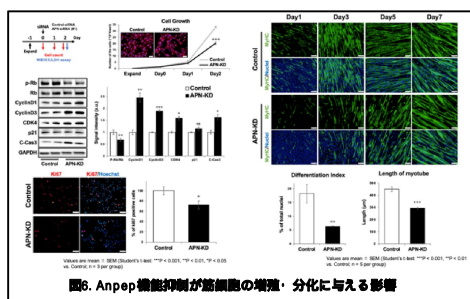


図6. *Anpep*機能抑制が筋細胞の増殖・分化に与える影響

に筋管細胞へ分化誘導すると、初期の分化が生じず筋管細胞への分化が遅延することが明らかになった(5)。同様に、*PSA* 遺伝子の発現を抑制すると、細胞周期の G2/M 期の制御に関する CyclinB1 タンパク質の発現が抑制され、G2/M 期の細胞群が蓄積することが明らかになった。また筋管細胞へ分化誘導すると、多核円形を呈する異常な筋管細胞が形成され、そのメカニズムとして、初期の段階に細胞極性を決定する中心分子である CDC42 の発現低下や、筋芽細胞同士の融合に必須となる *Minion* や *Myomaker* の遺伝子発現が増加することが明らかになった(6)。今後は、*Metap* や *LAP3* 遺伝子の発現抑制解析を進めることを考えている。

骨格筋筋芽細胞におけるプロテアソーム・アミノペプチダーゼ群によるタンパク質分解経路は単にタンパク質分解を介した細胞内の代謝制御だけでなく、細胞周期、分化、形態形成など多様な細胞の制御にそれぞれが関与していることが明らかになった。組織あるいは生体における骨格筋の質や量にも強く影響している可能性があり、今後、筋組織にとどまらず細胞や組織の構造や機能に対して Post-proteolytic pathway が担う細胞レベルのエコシステムがどのように貢献しているのか、全容解明を目指していきたい。

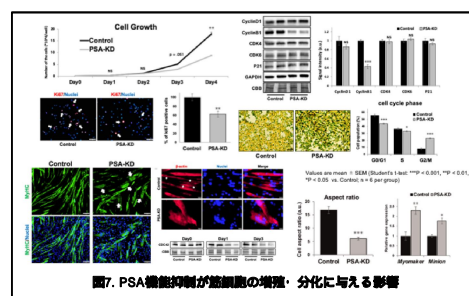


図7. *PSA*機能抑制が筋細胞の増殖・分化に与える影響

<引用文献>

1. American Dietetic Association, Dietitians of Canada, American College of Sports Medicine, Rodriguez N. R., Di Marco N. M., and Langley S. ACSM position stand. Nutrition and athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 41: 709-731, 2009.
2. Masiero E., Agatea L., Mammucari C., Blaauw B., Loro E., Komatsu M., Metzger D., Reggiani C., Schiaffino S., and Sandri M. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10: 507-515, 2009.
3. Kitajima Y., Tashiro Y., Suzuki N., Warita H., Kato M., Tateyama M., Ando R., Izumi R., Yamazaki M., Abe M., Sakimura K., Ito H., Urushitani M., Nagatomi R., Takahashi R., and Aoki M. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci* 127: 5204-5217, 2014.
4. 長名シオン, 布宮亜樹, 北嶋康雄. 骨格筋におけるタンパク質分解系が運動機能に与える影響. *デサントスポーツ科学*. 40 巻, pp275-282, 2019.
5. Shion Osana, Yasuo Kitajima, Naoki Suzuki, Aki Nunomiya, Hiroaki Takada, Takahiro Kubota, Kazutaka Murayama, Ryoichi Nagatomi. Puromycin sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation. *Journal of cellular physiology*. 236(7), pp5293-5305, 2021.
6. Shion Osana, Yasuo Kitajima, Naoki Suzuki, Yidan Xu, Kazutaka Murayama, Ryoichi Nagatomi. siRNA knockdown of alanine aminopeptidase impairs myoblast proliferation and differentiation. *Experimental cell research*. 397(1), 112337, 2020.
7. Shion Osana, Kazutaka Murayama, Ryoichi Nagatomi. The impact of intracellular aminopeptidase on C2C12 myoblast proliferation and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 524(3), pp608-613, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shion Osana, Kazutaka Murayama, Ryoichi Nagatomi	4. 巻 524 (3)
2. 論文標題 The Impact of Intracellular Aminopeptidase on C2C12 Myoblast Proliferation and Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 608-613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Osana Shion, Yoshioka Kiyoshi, Tashiro Yoshitaka, Takahashi Ryosuke, Ono Yusuke, Aoki Masashi, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1523 ~ 1538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Nunomiya Aki, Takada Hiroaki, Kubota Takahiro, Murayama Kazutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 236
2. 論文標題 Puromycin sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 5293 ~ 5305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Osana Shion, Kitajima Yasuo, Suzuki Naoki, Xu Yidan, Murayama Kazutaka, Nagatomi Ryoichi	4. 巻 397
2. 論文標題 siRNA knockdown of alanine aminopeptidase impairs myoblast proliferation and differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112337 ~ 112337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 長名シオン, 永富良一	4. 巻 70
2. 論文標題 タンパク質分解経路が筋芽細胞の増殖と分化に与える影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 体力科学	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 北嶋康雄, 鈴木直輝, 布宮亜樹, 長名シオン, 吉岡潔志, 田代善崇, 高橋良輔, 小野悠介, 青木正志, 永富良一
2. 発表標題 ユビキチン プロテアソーム系は筋幹細胞の恒常性維持に必須である
3. 学会等名 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北嶋康雄, 鈴木直輝, 布宮亜樹, 長名シオン, 吉岡潔志, 田代善崇, 高橋良輔, 小野悠介, 青木正志, 永富良一
2. 発表標題 ユビキチン-プロテアソーム系は筋幹細胞の恒常性維持に必須である
3. 学会等名 日本基礎老化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長名シオン
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるプロテアソームの役割～アミノ酸リサイクルの検証～
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長名シオン、布宮亜樹、高田拓明、鈴木直輝、青木正志、永富良一
2. 発表標題 Study of the protein synthesis in muscle cells using non-canonical amino acids
3. 学会等名 23rd annual congress of the European College of Sports Science (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北嶋 康雄、鈴木 直輝、布宮亜樹、長名シオン、田代善崇、高橋良輔、小野 悠介、青木正志、永富良一
2. 発表標題 骨格筋におけるプロテアソームの役割解明
3. 学会等名 第4回日本筋学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 布宮亜樹、丹藤由希子、長名シオン、久保田雄大、黒田尚志、高田拓明、張リーイン、芝原達規、永富良一
2. 発表標題 三次元培養筋におけるリアノジン受容体の組織化学的解析
3. 学会等名 第2回OITem研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 布宮亜樹、長名シオン、高田拓明、永富良一
2. 発表標題 Is muscle damage affected by gut bacteria elimination -an MRI study.
3. 学会等名 23rd annual congress of the European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長名シオン, 永富良一
2. 発表標題 タンパク質分解経路が筋芽細胞の増殖と分化に与える影響
3. 学会等名 日本体力医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長名シオン, 永富良一
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるアミノペプチダーゼの役割
3. 学会等名 骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shion Osana, Kazutaka Murayama, Naoki Suzuki, Hiroaki Takada, Takahiro Kubota, Ryoichi Nagatomi
2. 発表標題 Inhibition of leucine aminopeptidase affects myocyte proliferation and differentiation
3. 学会等名 Experimental Biology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>永富教授らのグループの研究の成果がStem Cell Reportsに掲載されました http://www.bme.tohoku.ac.jp/news/?news=20181221161755&ref=/news/&target=index/ 筋肉の幹細胞を正常に保つ仕組みを解明 筋肉の再生医療への応用に期待 https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2018/11/press20181109-1-kinniku.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 友浩 (Nakamura Tomohiro) (30217872)	大阪工業大学・工学部・教授 (34406)	
研究分担者	村山 和隆 (Murayama Kazutaka) (40400452)	東北大学・医工学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	鈴木 直輝 (Suzuki Naoki) (70451599)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関