

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17968

研究課題名(和文)筋萎縮に対する新規栄養学的アプローチ：鉄代謝とエネルギー産生系をつなぐ観点から

研究課題名(英文)A novel nutritional approach to muscle atrophy: Connecting iron and energy metabolism

研究代表者

内田 貴之(UCHIDA, Takayuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：00803561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリアの酵素アコニターゼに着目し、筋萎縮の進展に果たす役割を検討した。平成30～31年度の研究期間において、アコニターゼの発現低下により、遅筋型のミオシン重鎖タンパク質の減少が認められた。さらに、各種阻害剤を用いた検討から、アコニターゼノックダウンによるミオシンタンパク質の分解には、マトリックスメタロプロテアーゼが関与していることが示唆された。また、アコニターゼの発現低下は細胞内ATPレベルの低下を誘導し、ミトコンドリアによる好氣的代謝を障害して嫌氣的代謝を亢進させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はTCAサイクル上の重要な酵素であるアコニターゼの筋萎縮における役割について検証した、初めての研究成果である。さらに、エネルギー代謝と筋萎縮の関連性について新たな見地を切り開く点において学術的意義がある。これらの研究成果は、エネルギー代謝が筋量維持に重要であることを示し、ミトコンドリアを介したエネルギー代謝の賦活化が筋萎縮予防につながる可能性を示した点において社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined mitochondrial aconitase, a rate-limiting enzyme of TCA cycle, in the progression of muscle atrophy. During the research period from FY2018 to FY2018, I revealed a decrease in slow muscle type myosin heavy chain protein by knockdown of aconitase in C2C12 muscle cells. Furthermore, studies using various inhibitors suggested that matrix metalloprotease is involved in the degradation of myosin protein by aconitase knockdown. Moreover, aconitase deletion induced a decrease in intracellular ATP level, impairment aerobic metabolism by mitochondria, and enhancement of anaerobic metabolism.

研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：アコニターゼ ミトコンドリア 筋萎縮

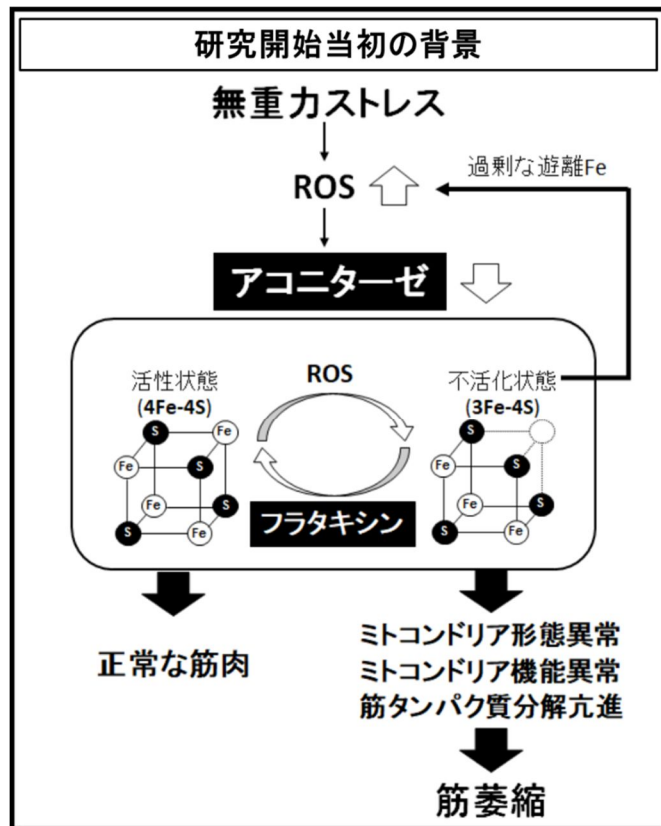
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

寝たきりなどの微小重力環境では廃用性筋萎縮が誘導される。廃用性筋萎縮では筋量・筋力の低下のほか、筋繊維タイプの変化も同様に誘導されることが明らかになっている。筋繊維タイプとエネルギー代謝は密接に関連していることから、萎縮環境下ではエネルギー産生経路が、ミトコンドリアによる好氣的経路から嫌氣的解糖系へと変化する、代謝変化が起こることが報告されている。代表者はこれまでの研究で、筋細胞が微小重力環境に置かれるとミトコンドリアに存在するアコニターゼの活性が低下すること、また、ミトコンドリアの形態・機能(エネルギー代謝)異常を引き起こされることを明らかにしてきた。

アコニターゼは2つのアイソフォームを持っており、アコニターゼ1は細胞質において鉄制御タンパク質として働き、細胞内鉄濃度が低下した際に細胞質内への鉄流入を促す機能を持つ。一方で、アコニターゼ2はTCA回路の律速酵素として、クエン酸からイソクエン酸までの反応を触媒する。いずれのアコニターゼも、その酵素活性

の中心に4Fe-4S鉄硫黄クラスターを保持しているが、酸化ストレス等によってFeが酸化されると鉄硫黄クラスターからFeが遊離し不活化状態となる。そこで本研究では、筋萎縮環境で一般的に見られるエネルギー代謝の変化や鉄代謝にアコニターゼが関与していると仮定し、検証を行った。



### 2. 研究の目的

アコニターゼ不活化による筋萎縮発生メカニズム解明と、その機能回復による筋萎縮抑制効果の検証を行う。具体的には、無重力ストレスによる筋萎縮において、アコニターゼ機能不全が重要な役割を担っていることを示す。また、アコニターゼの機能回復が筋量維持に有効であるかどうか検証する。

### 3. 研究の方法

以下のような方法で研究を遂行した。

#### (1) TCA サイクルを制御する酵素アコニターゼを介した筋萎縮誘導経路の解明

模擬微小重力装置 3D-クリノローションを用いた微小重力刺激などの力学負荷を取り除いた時の、ミトコンドリア形態の構造変化、ミオシン重鎖などの筋タンパク質の発現を生化学的手法と構造生物学的手法で解析した。並行して、siRNAを用いたアコニターゼのノックダウンを行った細胞では上記の力学負荷への応答を確認した。

#### (2) 個体レベルのアコニターゼ機能解析

筋肉特異的アコニターゼノックアウトマウスを作製に取り組んだ。また、野生型マウスを用いて、筋萎縮モデルである尾部懸垂を行い、エネルギー代謝経路を中心に解析を行った。

### 4. 研究成果

平成 30~31 年度の研究期間において、培養細胞系(C2C12 筋細胞)を用いた解析では、アコニターゼのノックダウンにより、遅筋型ミオシン重鎖タンパク質の減少が認められた。一方で、アコニターゼノックダウンはミオシン繊維の mRNA 量には影響を与えなかった。さらに、各種阻害剤を用いた検討から、アコニターゼノックダウンによるミオシンタンパク質の分解には、マトリックスメタロプロテアーゼが関与していることが示唆された。また、アコニターゼのノックダウンによって、細胞内のエネルギーセンサーである AMPK のリン酸化が亢進していた。さらに、細胞内エネルギー産生をモニタリングできるフラックスアナライザーを用いた解析においても、アコニターゼをノックダウンした細胞では、コントロール細胞と比較して特に最大酸素消費量の著大な低下と解糖系の亢進が認められた。これらの結果と一致して、アコニターゼのノックダウンは細胞内 ATP レベルの低下を誘導していた。また、筋細胞を用いたアコニターゼのノックダウンはミトコンドリアの形態異常(分裂亢進)を誘導することも明らかとなった。これらの結果は、アコニターゼの不活化は、ミトコンドリアによる好氣的代謝を障害して嫌氣的代謝を亢進させることを示唆している。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

また、マウスを用いた10日間の尾部懸垂試験では、腓腹筋およびヒラメ筋など、中間筋あるいは遅筋においてアコニターゼのタンパク質量の低下が認められた。一方で、mRNAレベルではアコニターゼの発現に変化が見られなかった。

これらの実験結果は、アコニターゼが細胞内エネルギー代謝の中心であるミトコンドリアの障害を通して、遅筋型ミオシン重鎖タンパク質の分解を誘導していることを示唆している。遅筋繊維はミトコンドリアを豊富に含むため、特にミトコンドリア障害の影響を受けやすいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 内田貴之、二川健	4. 巻 50
2. 論文標題 微小重力環境における筋萎縮発生メカニズムへの新展開	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 618-621
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 内田貴之	4. 巻 75
2. 論文標題 宇宙医学から健康長寿へ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 四国医学雑誌	6. 最初と最後の頁 11-16
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiro Yoshimura, Kanae Saitoh, Luchuan yang Sun, Yao Wang, Shigeto Taniyama, Kenichi Yamaguchi, Takayuki Uchida, Tsutomu Ohkubo, Atsushi Higashitani, Takeshi Nikawa, Katsuyasu Tachibana, Katsuya Hirasaka.	4. 巻 506
2. 論文標題 Morin suppresses cachexia-induced muscle wasting by binding to ribosomal protein S10 in carcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 773-779
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 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 Takayuki Uchida Yoshihiro Sakashita, Kanako Kitahata, et al.	4. 巻 314
2. 論文標題 Reactive oxygen species upregulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AMERICAN JOURNAL of PHYSIOLOGY Cell Physiology.	6. 最初と最後の頁 C721-C731
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内田貴之、木森有希、坂下禎宏、真板綾子、中尾玲子、平坂勝也、東谷篤志、東端晃、小林剛、曾我部正博、武田伸一、二川健
2. 発表標題 無重力による廃用性筋萎縮における酸化ストレスの重要性
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木森有希、二宮みゆき、三木裕加里、小松明生、鉄野文香、内田貴之、中尾玲子、真板綾子、近藤茂忠、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 無重力環境におけるミトコンドリアタンパク質Mitofusin2(Mfn2)の役割
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二宮みゆき、木森有希、小松明生、鉄野文香、三木裕加里、北畑香菜子、内田貴之、真板綾子、中尾玲子、松井利郎、赤間一仁、二川健
2. 発表標題 廃用性筋萎縮を防ぐ高機能米の開発
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真板綾子、真板宣夫、奥村裕司、内田貴之、中尾玲子、岸本幸治、二川健
2. 発表標題 高病原性インフルエンザ感染に関わる宿主酵素MSPLと阻害剤との複合体構造
3. 学会等名 第23回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松明生、内田貴之、北畑香菜子、真板綾子、中尾玲子、瀬川圭、武田伸一、二川健
2. 発表標題 廃用性筋萎縮を抑制するユビキチンリガーゼCbl-bの低分子阻害剤の開発
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木裕加里、内田貴之、木森有希、坂下禎宏、小松明生、真板綾子、中尾玲子、内田実佑、藤岡大樹、小林剛、東谷篤志、石原直忠、東端晃、石岡憲昭、武田伸一、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼCbl-bは無重力ストレス誘導性の酸化ストレスにより増大する
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二川健、内田貴之、真板綾子、中尾玲子、平坂勝也、小林剛、曾我部正博
2. 発表標題 Unloadingストレスに対する筋細胞の初期応答：酸化ストレスの重要性
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田貴之、真板綾子、中尾玲子、二川健
2. 発表標題 宇宙栄養学から健康長寿へ
3. 学会等名 第258回徳島医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田貴之、二川健
2. 発表標題 ミトコンドリアを介した無重力ストレス感知機構の解明
3. 学会等名 第33回日本宇宙生物科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田貴之、三木裕加里、坂下禎宏、真板 綾子、中尾玲子、平坂勝也、東谷篤志、東端晃、小林剛、曾我部正博、二川健
2. 発表標題 ミトコンドリアを介した無重力ストレス感知機構の解明
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Uchida, Takeshi Nikawa
2. 発表標題 Reactive Oxygen Species Upregulate Expression of Muscle Atrophy-Associated Ubiquitin Ligase Cbl-B in Rat L6 Skeletal Muscle Cells.
3. 学会等名 ADVANCED BIOMEDICAL ENGINEERING AND INSTRUMENTATION SUMMIT (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----