

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19500564

研究課題名(和文) 運動器固有の機械的ストレス感知機構：筋・骨萎縮遺伝子の発現調節の分子システムから

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mechanosensing in skeletal muscles: Based on regulation system of atrogen expression.

研究代表者 二川 健 (Nikawa Takeshi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20263824

研究成果の概要: Cbl-b の発現が運動器の活動状態(機械的ストレス)と相関する非常に良い指標になることがわかった。この新しい知見は、Cbl-b の発現調節機序を解明できれば機械的ストレスに対する運動器の感知機構が明らかになることを強く示唆した。そこで、本研究で、Cbl-b 遺伝子のプロモーター解析を行った結果、Egr-1 と Sp1 の転写因子が Cbl-b の発現をそれぞれ正と負に制御していることがわかった。さらに、これら転写因子の上流を解析すると、MAPK 経路とくに ERK-1/2 経路が Egr の活性を誘導していた。ERK-1/2 を活性化するものこそが、運動器の活動状態(機械的ストレス)の感知機構の重要なセンサーであることがほぼ明らかにした。申請者らは、それが膜上の蛋白質分解酵素ではないかという新たなメカニズムを提唱している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ユビキチンリガーゼ；機械的ストレスの感知；IGF-1 シグナル；運動器(筋・骨)；蛋白質分解酵素

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、長年 JAXA(宇宙航空研究開発機構)と共同で、宇宙フライトや寝たきりによる筋・骨萎縮共通の原因酵素の一つとして Cbl-b ユビキチンリガーゼ(ユビキチン依存性蛋白質分解経路の律速酵素)を発見した。この Cbl-b は IGF-1(インスリン様増殖因子)の重要な細胞内シグナル分子 IRS-1 の分解を亢進し、筋蛋白質の合成や骨形成を低下させる。興味深いことに、Cbl-b の筋・骨芽細胞での発現は寝たきりや宇宙フライトで著明に増大し、逆に運動トレーニングで減少すること

を発見した。つまり、Cbl-b の発現が運動器の活動状態(機械的ストレス)と相関する非常に良い指標になることがわかった。

## 2. 研究の目的

1) 機械的ストレスによる Cbl-b 転写の活性化メカニズムの解明

新規に開発した DNA 結合蛋白質解析法を用い(後述)、機械的ストレスによる Cbl-b 遺伝子発現の主要な転写制御因子である Egr-1 と Sp1 の相互作用を解析する。

2) 機械的ストレスの細胞内シグナル伝達経路の解明

Loading(負荷)と Unloading(負荷軽減)に対する筋・骨芽細胞の MAPK シグナル経路の応答性の違いを明らかにする。

3) 機械的ストレス高感受性および抵抗性モデル動物の Cbl-b プロモーター解析

### 3. 研究の方法

1) ルシフェラーゼ法による Cbl-b の 5' 上流遺伝子 2 kbp のプロモーター解析

2) ゲルシフトアッセイによる機械的ストレス応答領域の同定

### 4. 研究成果

1) 機械的ストレスによる Cbl-b 転写の活性化メカニズムの解明

機械的ストレスの応答領域が-111 bp から-60 bp に存在することを明らかにした(図 1A)。さらに、その応答領域には、Unloading(微小重力環境)では Egr-1 が、Loading(過重力環境)では Sp-1 が結合することがわかった(図 1B)。

図1A Cbl-bのプロモーター解析

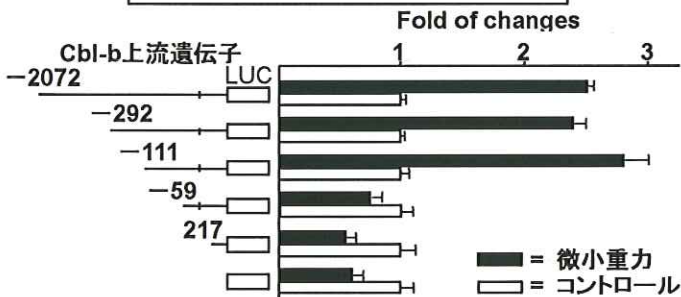
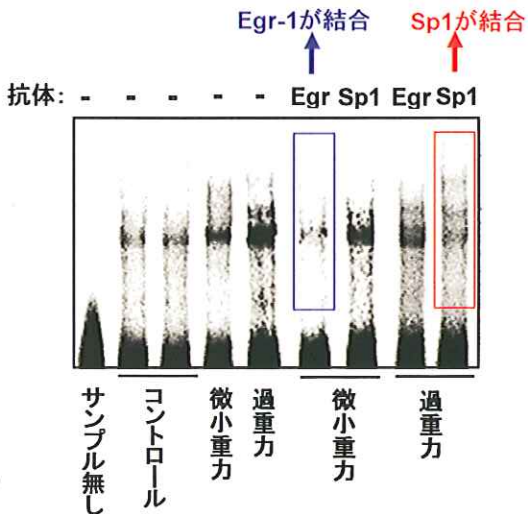


図1B Cbl-bの上流遺伝子のゲルシフトアッセイ



2) 機械的ストレスの細胞内シグナル経路 Egr-1 には Erk1/2 が Sp1 には JNK が結合することを見出した。ERK-1/2 を活性化するものこそが、運動器の活動状態(機械的ストレス)の感知機構の重要なセンサーであることがほぼ明らかにした。

### 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 17 件)

1) Sogawa M, Seura T, Kohno S, Hirasaka K, Yamaguchi Y, Takagi R, Harada A, Okumura Y, Yamamoto S, Kishi K, Nikawa T, Awa (Tokushima) lactate-fermented tea as well as green tea enhance the effect of diet restriction on obesity in rats. *J Med Invest*. 2009 56(1-2):42-48. 査読有り

2) Hemdan DII, Hirasaka K, Nakao R, Kohno S, Kagawa S, Abe T, Harada-Sukeno A, Okumura Y, Nakaya Y, Terao J, Nikawa T. Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes. *J Med Invest*. 2009 56(1-2):26-32. 査読有り

3) Mikura M, Yamaoka I, Doi M, Kawano Y, Nakayama M, Nakao R, Hirasaka K, Okumura Y, Nikawa T. Glucose infusion suppresses surgery-induced muscle protein breakdown by inhibiting ubiquitin-proteasome pathway in rats. *Anesthesiology*. 2009 Jan;110(1):81-8. 査読有り

4) Nishimura M, Mikura M, Hirasaka K, Okumura Y, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Ikeda M. Effects of Dimethyl Sulphoxide and Dexamethasone on mRNA Expression of Myogenesis- and Muscle Proteolytic System-related Genes in Mouse Myoblastic C2C12 Cells. *J Biochem*. 2008 Dec;144(6):717-724. 査読有り

5) Hirasaka K, Tokuoka K, Nakao R, Yamada C, Oarada M, Imagawa T, Ishidoh K, Okumura Y, Kishi K, Nikawa T. Cathepsin C propeptide interacts with intestinal alkaline phosphatase and heat shock cognate protein 70 in human Caco-2 cells. *J Physiol Sci*. 2008 Apr;58(2):105-11. 査読有り

6) Nakae Y, Hirasaka K, Goto J, Nikawa T, Shono M, Yoshida M, Stoward PJ. Subcutaneous injection, from birth, of epigallocatechin-3-gallate, a component of green tea, limits the onset of muscular dystrophy in mdx mice: a quantitative histological, immunohistochemical and electrophysiological study. *Histochem*

Cell Biol. 2008 129(4):489-501. 査読有り  
7) Oarada M, Tsuzuki T, Gono T, Igarashi M, Kamei K, Nikawa T, Hirasaka K, Ogawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Kurita N Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triacylglycerol levels in psychologically stressed mice. Nutrition. 2008 24(1):67-75. 査読有り  
8) Masuhiro Nishimura M, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Muneharu Ikeda M Effects of Dimethyl Sulfoxide and Dexamethasone on mRNA Expression of Housekeeping Genes in Cultures of C2C12 Myotubes. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Mar 14;367(3):603-8. 査読有り  
9) Oarada M, Tsuzuki T, Gono T, Igarashi M, Kamei K, Nikawa T, Hirasaka K, Ogawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Kurita N Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triacylglycerol levels in psychologically stressed mice. Nutrition. 2008 Jan;24(1):67-75. 査読有り  
10) Minami Y, Kawabata K, Kubo Y, Arase S, Hirasaka K, Nikawa T, Bando N, Kawai Y, Terao J Peroxidized cholesterol-induced matrix metalloproteinase-9 activation and its suppression by dietary beta-carotene in photoaging of hairless mouse skin. J Nutr Biochem. 2008 Jul 23. 査読有り  
11) Furochi H, Tamura S, Mameoka M, Yamada C, Ogawa T, Hirasaka K, Okumura Y, Imagawa T, Oguri S, Ishidoh K, Kishi K, Higashiyama S, Nikawa T. Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts. FEBS Lett. 2007 Dec 22;581(30):5743-50. 査読有り  
12) Hirasaka K, Kohno S, Goto J, Furochi H, Mawatari K, Harada N, Hosaka T, Nakaya Y, Ishidoh K, Obata T, Ebina Y, Gu H, Takeda S, Kishi K, Nikawa T. Deficiency of Cbl-b gene enhances infiltration and activation of macrophages in adipose tissue and causes peripheral insulin resistance in mice. Diabetes. 2007 Oct;56(10):2511-22. 査読有り  
13) Nakao R, Ozaki E, Hasegawa M, Kondo A, Uezu K, Hirasaka K, Nikawa T, Kishi K. Distinct effects of anterior pyriform cortex and the lateral hypothalamus lesions on protein intake in rats. J Med Invest. 2007 Aug;54(3-4):255-60. 査読有り  
14) Furochi H, Tamura S, Takeshima K, Hirasaka K, Nakao R, Kishi K, Nikawa T. Overexpression of osteoactivin protects skeletal muscle from severe degeneration

caused by long-term denervation in mice. J Med Invest. 2007 Aug;54(3-4):248-54. 査読有り

15) Nakano S, Mishiro T, Takahara S, Yokoi H, Hamada D, Yukata K, Takata Y, Goto T, Egawa H, Yasuoka S, Furouchi H, Hirasaka K, Nikawa T, Yasui N. Nakano S, Mishiro T, Takahara S, Yokoi H, Hamada D, Yukata K, Takata Y, Goto T, Egawa H, Yasuoka S, Furouchi H, Hirasaka K, Nikawa T, Yasui N. Clin Rheumatol. 2007 Aug;26(8):1284-92. 査読有り

16) Takahashi H, Nakao R, Hirasaka K, Kishi K, Nikawa T. Effects of single administration of Rokumi-gan (TJ-87) on serum amino acid concentration of 6 healthy Japanese male volunteers. J Med Invest. 2007 Feb;54(1-2):91-8. 査読有り

17) Oarada M, Gono T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N. Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice. Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Jan;71(1):174-82. 査読有り

〔学会発表〕 (計 4 件)

1) 二川 健 Development of a functional food or drug against unloading-mediated muscle atrophy 37th COSPAR Scientific Assembly 2008 年 7 月 13-20 日 モントリオール・カナダ

2) 二川 健 Sensing mechanism of unloading stress in skeletal muscle cells 第 4 回日韓宇宙フォーラム 2008 年 10 月 2 日 東京

3) 二川 健 Unloading による筋萎縮の主要な制御因子 Unloading による筋萎縮の主要な制御因子 2007 年 12 月 13 日 横浜

4) 二川 健 宇宙における細胞培養実験の必要性と問題点 第 13 回宇宙医学研究推進分科会: 宇宙基礎医学生物学研究に用いるべき最適なモデル生物に関するワークショップ 2007 年 12 月 11 日 東京

〔図書〕 (計 3 件)

1) 二川 健, 安井夏生 (分担) 中山書店 最新整形外科学大系 (1) 運動器の生物学と生体力学 各組織の力学特性と病態-骨格筋 2008 総ページ 500

2) 松浦哲也, 二川 健 (分担) 中山書店 最新整形外科学大系 (1) 運動器の生物学と生体力学 筋・腱-構造と筋収縮の生理学 2008 総ページ 500

3) 二川 健 (分担) 建帛社 栄養・食糧学用語辞典 2007 125-126

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
<http://150.59.76.31/university/servlet/index/index?&level=4&reference=0/10002/5/30010/20032>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二川 健 (Nikawa Takeshi)  
徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・  
教授  
研究者番号 : 20263824

(2) 研究分担者

安井 夏生 (Yasui Natsuo)  
徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・  
教授  
研究者番号 : 00157984

中屋 豊 (Nakaya Yutaka)  
徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・  
教授  
研究者番号 : 50136222