

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15786

研究課題名(和文) 低栄養に起因する骨格筋萎縮を制御する新たなE3ユビキチンリガーゼの探索と機能解析

研究課題名(英文) Discovery and functional analysis of a novel E3 ubiquitin ligase that regulates skeletal muscle atrophy under low nutrient condition

研究代表者

佐々木 崇 (Sasaki, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：90771676

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)：本研究では加齢に伴う筋量低下の一端を担う「低栄養による骨格筋萎縮」に焦点を絞り、その分子基盤解明を目指した。

骨格筋量制御において、ユビキチン・プロテアソーム系は非常に重要な役割を担っている。そこで低栄養条件下で発現変動するE3ユビキチンリガーゼ(E3)を探索したところ、いくつかのE3が絶食時の骨格筋で大きく発現変動することを新たに見出した。これらのうち一部は、グルコース枯渇がトリガーとなり発現変動することが示された。また今回発見したE3と相互作用するタンパク質を質量分析により同定することに成功した。本研究成果は、低栄養による筋萎縮や代謝変動の分子機構解明の一助となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国において健康寿命の延伸は喫緊の課題であり、活力のある高齢社会の実現に向け、高齢者の筋量維持の重要性は年々高まっている。高齢者の筋機能を低下させる要因のひとつとして低栄養が挙げられるが、栄養枯渇による筋機能低下の分子機構については不明な点が多く残されていた。本研究では、先端ゲノミクスを活用した先駆的なスクリーニング法により栄養条件に応じて発現変動するE3を複数見出すことに成功した。またこれらE3の発現制御機構や相互作用タンパク質に関して興味深い成果が得られている。

これらの成果は、加齢による筋機能低下を抑制するための新たなアプローチの開発につながることを期待され

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on skeletal muscle atrophy caused by low nutrient condition, which plays a role in age-related muscle loss, and aimed to reveal its molecular mechanisms.

The ubiquitin-proteasome system plays an important role in the regulation of skeletal muscle mass. In our search for E3 ubiquitin ligases (E3) whose expression are up- or downregulated under low nutritional conditions, we found that several E3 expressions are highly altered in fasting skeletal muscle. Some of these responses were regulated in a glucose-dependent manner. The protein interacting with the E3 discovered in this study was identified by mass spectrometry. The results of this study are expected to contribute to the elucidation of the molecular mechanisms of muscle atrophy and metabolic changes caused by low nutrition condition.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 筋萎縮 ユビキチン・プロテアソーム系 低栄養

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において高齢者の筋機能低下が深刻な問題となっている。特に「加齢性サルコペニア(加齢によって生じる筋量、筋力の低下)」は転倒による骨折や寝たきりの原因となり、高齢者の生活の質を著しく低下させる。また骨格筋は運動器であると同時に主要な糖代謝器官でもあることから、筋機能の低下は糖尿病などの代謝疾患にも直結する。それゆえ、活力のある高齢社会の実現に向けて高齢者の筋量維持が益々重要な課題となっている。

骨格筋量は様々な要因により制御されるが、最も影響力の強い因子のひとつに「食」が挙げられる。食はアミノ酸やインスリン分泌を介して筋量を増大させるだけでなく、摂食に伴い急上昇する血中胆汁酸もまた筋肥大を誘導することが明らかにされている。一方、絶食などの栄養枯渇条件下ではユビキチン-プロテアソーム系を介した筋タンパク質分解が活性化し、これが骨格筋の萎縮を誘導する主要経路と考えられている。しかしその全容は未だに明らかにされていない。

高齢者においては消化機能や食欲の低下から慢性的な栄養不足に陥る可能性が高く、これが筋機能低下の一端を担うと考えられていることから、栄養枯渇条件下における筋タンパク質分解メカニズムを分子レベルで理解することは、サルコペニアや代謝疾患の予防・治療法の確立に向けた重要なプロセスとなる。

2. 研究の目的

本研究では、ユビキチン-プロテアソーム系を軸としたアプローチにより、低栄養条件下で生じる骨格筋萎縮や代謝変動の分子メカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 筋機能制御に関わる候補 E3 の選抜

筋萎縮マーカー遺伝子として知られる Atrogin-1 や MuRF1 と正または負に発現相関する E3 ユビキチンリガーゼ(E3)を選抜。絶食負荷したマウス骨格筋でこの E3 が実際に期待通りに発現変動することを確認する。

(2) 選抜 E3 の機能解析

骨格筋細胞に対し、(1)で見出した E3 をアデノウイルスにより過剰発現またはノックダウンする。その後 qPCR による mRNA 発現変動や、ウエスタンブロットティングによる主要なシグナル経路の評価を介して、その機能を明らかにする。

(3) E3 のターゲットタンパク質の同定

プルダウンアッセイと質量分析を組み合わせることで、相互作用タンパク質を同定する。ウエスタンブロットティングにより実際に相互作用するかどうかを確認し、同時に相互作用タンパク質がユビキチン化されているかどうかを確認する。

4. 研究成果

(1) 筋機能制御に関わる候補 E3 の選抜

RNA-Sequence により網羅的に遺伝子発現を解析したデータセットを用い、Atrogin-1 や MuRF1 と正に発現相関し、骨格筋における発現量が一定以上の E3 として、Hectd1 を見出した。また逆に、Atrogin-1 や MuRF1 と負の発現相関を示し、骨格筋における発現量が一定以上の E3 として、RNF122 を見出した。このような特徴から Hectd1 は、Atrogin-1 や MuRF1 が発現増大する筋萎縮条件下でこれらの遺伝子とともに発現増大し、RNF122 はこれらの遺伝子とは逆に発現低下することが推測される。そこでこれらの遺伝子が実際に絶食マウス骨格筋でどのような遺伝子発現変動を示すのかを確認したところ、期待通り Hectd1 は絶食条件下で発現増大し、RNF122 は発現低下した(図1)。これらの E3 は筋萎縮やそれに伴う代謝変動に関与する可能性が高いと考え、機能解析を試みた。

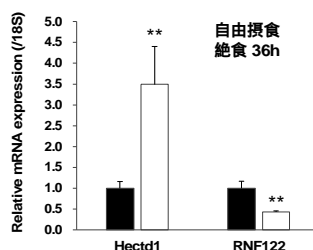


図1. 絶食後のマウス骨格筋における遺伝子発現変動

36時間の絶食を負荷したマウスより腓腹筋を採取し、qPCRによりmRNA発現を測定した(n=6)。値は平均値±標準偏差

(2) 選抜 E3 の機能解析

・ Hectd1 の機能解析

これまでの実験から、Hectd1 は栄養枯渇条件下の骨格筋で発現増大することが確認されている。まずはこの応答を培養細胞で再現するために検討を行ったところ、C2C12 筋管細胞に対してエネルギーセンサータンパク質 AMPK の活性化剤である AICAR やグルココルチコイド受容体活性化剤であるデキサメタゾン进行处理することにより Hectd1 の発現増大を模倣できることを明らかにした。そこでこの絶食模倣した C2C12 筋管細胞において Hectd1 の機能を明らかにするため、shRNA により Hectd1 をノックダウンした際にどのような変化が生じるのかを調べた。しかし qPCR やウエスタンブロッティングの結果からは、筋萎縮や糖・脂質代謝に関わる主要な遺伝子の発現に変化は認められず、その機能を明らかにすることはできなかった。

・ RNF122 の機能解析

RNF122 の機能解析にあたり、まずは RNF122 発現性のアデノウイルスを作製した。これを用いて C2C12 筋管細胞に RNF122 を過剰発現し、機能解析を行った。残念ながら、Hectd1 と同じく筋萎縮や糖・脂質代謝に関わる主要な遺伝子の発現に明確な変化は認められなかった。しかし C2C12 筋芽細胞に対し RNF122 を過剰発現し、分化誘導後に形態的な特徴を観察したところ、RNF122 発現群では筋管が効率よく形成されていることが明らかとなった。以上のデータは、RNF122 が筋細胞分化を促進する可能性を示している。

(3) E3 のターゲットタンパク質の同定

プルダウンアッセイと質量分析を組み合わせることで RNF122 のユビキチン化基質タンパク質の探索を実施し、いくつかのタンパク質が RNF122 の基質候補として選抜された。そこでこれらのタンパク質が実際に RNF122 と相互作用するかを共免疫沈降法により確認したところ、いくつかのタンパク質が実際に RNF122 と結合することが示された(図2)。またこれらのタンパク質の一部は RNF122 によりユビキチン化されていることを示唆するデータも得られている。

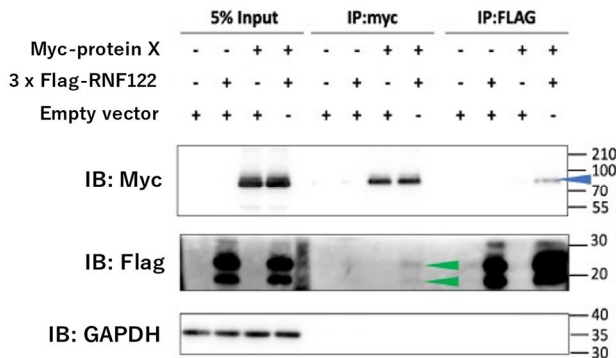


図2. RNF122とProtein Xの相互作用の検証

HEK293T細胞にMycタグを負荷したProtein Xおよび3 x Flagタグを負荷したRNF122を強制発現し、それぞれのタグでIPしたのち、得られたタンパク質溶液をウエスタンブロッティングに供した。

これらの基質候補タンパク質が RNF122 によりユビキチン化修飾を受けることでどのような機能制御を受けるのかを明らかにすることにより、RNF122 の生理的な役割や、低栄養に起因する筋萎縮・代謝変動の分子メカニズム解明に繋がるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sasaki Takashi, Watanabe Yuichi, Kuboyama Ayane, Oikawa Akira, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 296
2. 論文標題 Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose-intolerant mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100131 ~ 100131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.016203	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宋田 陸人、桑田 啓子、柴田 貴広、佐々木 崇、高橋 裕、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 E3ユビキチンリガーゼRNF122の骨格筋における発現制御機構及び機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 崇、渡邊 雄一、久保山 文音、及川 彰、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 骨格筋特異的な胆汁酸受容体TGR5の過剰発現はグルコースクリアランスを改善する
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木 悠馬、佐々木 崇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 摂食応答性骨格筋E3ユビキチンリガーゼTrim7の発現制御機構と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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