

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20500577

研究課題名 (和文) 運動により血中濃度が上昇するインターロイキン-6 が骨格筋量の維持増進に及ぼす影響

研究課題名 (英文) Effects of exercise-induced interleukin-6 secretion on protein synthesis in skeletal muscle

研究代表者

中井 直也 (NAKAI NAOYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90324508

研究成果の概要 (和文)：運動による筋収縮のモデルとして筋芽由来の培養細胞に機械的ストレッチを負荷したところインターロイキン-6 の遺伝子発現が上昇するとともにタンパク質合成促進シグナルが増強した。一方、ストレッチによるタンパク質合成促進シグナルはチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインによって完全に阻害された。種々の阻害剤を検討したところ、チロシンリン酸化によって活性化されるフォスホリパーゼ C が機械的ストレッチによるタンパク質合成促進シグナルの伝達に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Murine myoblast cell line was mechanically stretched as a model for exercise-induced muscle contraction. Mechanical stretch increased the gene expression of interleukin-6 and activated the protein translation initiation. Stretch-induced activation of the protein translation initiation was completely blocked by tyrosin kinase inhibitor, genistein. Among the cellular protein which is activated by tyrosine kinase, phospholipase C was important for the signal transduction of mechanical stretch-induced activation of protein translation initiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：機械的ストレッチ、タンパク質合成、チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年、内分泌器官と考えられていなかった骨格筋から種々のサイトカインが生成、分泌されていることが報告されている。これらは myokine と呼ばれ、interleukin-6 (IL-6)、IL-8、IL-15 等が知られている。なかでも IL-6 は、運動により骨格筋での遺伝子発現および産生・分泌が大きく上昇し、血中濃度は安静時の数十倍に増加する。IL-6 は、多様な生理活性を有するサイトカインであり免

疫調節作用、造血作用、炎症および抗炎症作用、腫瘍産生作用等を有している。さらに IL-6 が代謝調節機構に及ぼす影響についても検討されている。骨格筋由来の IL-6 は、脂肪組織における AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化を介して中性脂肪の分解を高めることや、肝臓におけるグリコーゲンの分解を高め血糖維持に関与していること、さらに、動脈硬化を抑制することなどが報告されている。一方、IL-6 がタ

ンパク質の合成や分解に及ぼす影響については十分に検討されていない。その効果について相反する報告がなされている。すなわち、マイナスの効果として IL-6 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは骨格筋量が減少することや、骨格筋への IL-6 の継続的な注入は筋萎縮を誘発する結果が報告されている。一方、プラスの効果としては筋再生や筋肥大時には骨格筋における IL-6 および IL-6 受容体の発現が上昇することや、血液透析後の腎臓病患者では血中 IL-6 濃度と骨格筋のタンパク質合成率が正の相関を示すことなどの知見が得られている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、運動による筋収縮のモデルとして培養細胞に機械的ストレッチ負荷し IL-6 遺伝子発現が上昇するか否かをまず確認する。

(2) 機械的ストレッチがタンパク質合成促進作用に及ぼす影響を検討する。

(3) 機械的ストレッチの細胞内情報伝達に関わる因子を検索する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および機械的ストレッチ

実験対象にはマウス筋芽由来の培養細胞である C2C12 細胞を用いた。C2C12 細胞をフィブロネクチンでコートしたシリコンチャンパーで培養し (10% ウシ血清を含む Dulbecco's modified Eagles medium 中)、約 90% コンフルエントの時点で実験に供した。

細胞に対して、細胞伸展装置 (ST-150, Strex, Japan) を用いて一軸方向に機械的ストレッチを負荷した。伸展方法は、伸展を維持する静的ストレッチおよび一秒に一回伸縮を繰り返す周期的伸展を用いた。阻害剤を用いた実験では、ストレッチ負荷前に培地に図中に示す濃度で添加した。

(2) RT-PCR

機械的ストレッチ負荷後、培地を除き、RNA 抽出試薬 (TRIzol reagent, Invitrogen, USA) にて、総 RNA を抽出した。逆転写反応後、特異的プライマーを用いて、目的の遺伝子を増幅した。増幅産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV ランプによって可視化した。

(3) Western blotting

機械的ストレッチ負荷後、培地を除き、リン酸バッファーでリンスし、RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa USA) で細胞抽出液を回収した。等量の細胞総タンパク質を SDS-PAGE にて泳動し、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜は 5% ウシ血清アルブミンを含

むトリス緩衝液 (TBS with 0.05% Tween 20) でブロッキングし、目的の一次抗体と一晚反応させた。目的のバンドの検出は、抗ウサギ IgG もしくは抗マウス IgG-HRP 二次抗体と反応させ、ECL-plus (GE Healthcare UK Limited, UK) で行った。各バンドの強度は NIH Image J によって数値化した。

(4) 統計処理

データは平均±標準偏差で示した。多重比較は一元配置および二元配置の分散分析を行い、各群間の比較は Scheffe's post hoc test を用いた。P < 0.05 を統計的有意差とした。

4. 研究成果

(1) 機械的ストレッチによる IL-6 遺伝子発現の誘導

運動に伴う筋収縮は骨格筋における IL-6 遺伝子の発現を上昇させることが報告されている。そこで、本研究では、運動時の筋収縮のモデルとして筋芽由来の培養細胞である C2C12 細胞をシリコン膜上で培養し、機械的ストレッチによる伸展刺激を負荷した。RT-PCR の結果、本研究で用いた機械的ストレッチは、C2C12 細胞の IL-6 遺伝子の発現を上昇させた (図 1)。以上の結果より、本研究で用いた細胞に対する機械的ストレッチは、運動による筋収縮と同様に IL-6 遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。

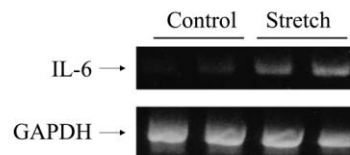


図1 機械的ストレッチによるIL-6遺伝子発現の上昇

C2C12細胞に機械的ストレッチ(10%伸展、6h)を負荷し、細胞を回収後、総RNAを抽出した。1 μg総RNAをテンプレートとして、RT-PCR法でIL-6および内部コントロールとしてGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を増幅した。得られた産物をアガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

(2) 機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の上昇

機械的ストレッチがタンパク質合成促進作用に及ぼす影響を検討するため、タンパク質翻訳開始過程に関わる p70 S6 kinase (p70S6K) およびペプチド鎖伸張過程に関わる eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) のリン酸化を解析した。p70S6K は 389 番目のスレオニン (T389) がリン酸化を受けると、その活性が上昇し、タンパク質合成促進作用の指標とされる。p70S6K の総タンパク質量は 30 分間の静的ストレッチおよび周期的ストレッチの

いずれにも影響を受けなかった (図 2 A)。一方、静的、周期的ストレッチ両者ともに p70S6K のリン酸化を上昇させた。リン酸化の程度は静的ストレッチより周期的ストレッチで大きく、伸展度は 5% よりも 15% で強くリン酸化された (図 2 A)。

eEF2 は 56 番目のスレオニン(T56)が脱リン酸化されると活性が上昇し、ペプチド鎖伸張過程亢進の指標となる。静的および周期的ストレッチは eEF2 の総タンパク量には影響を及ぼさなかったが、伸展度依存的に eEF2 の脱リン酸化を高めた (図 2 B)。以上の結果より、機械的ストレッチは伸展度依存的にタンパク質合成促進作用を活性化することが示唆された。さらに、伸展を維持する静的ストレッチよりも、伸縮を繰り返す周期的伸展の方がその作用が強いことが明らかとなった。

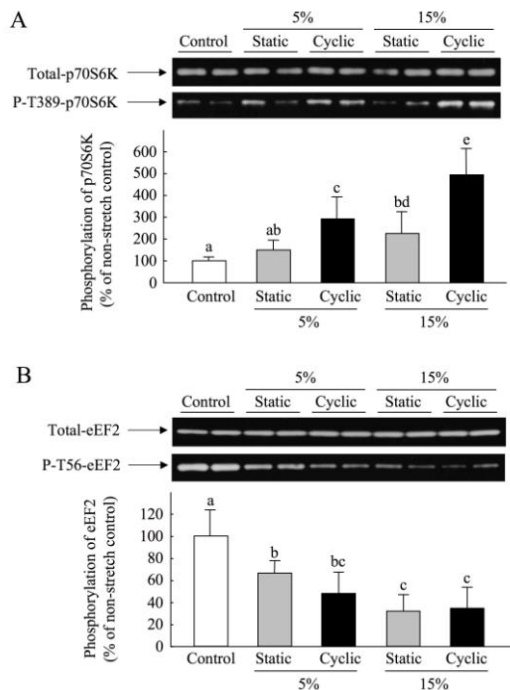


図2 機械的ストレッチによるp70S6K (A) およびeEF2 (B) の活性化

C2C12細胞に伸展を維持する静的ストレッチ (Static) もしくは伸縮を繰り返す周期的ストレッチ (Cyclic) を負荷し、p70S6K (A) および eEF2 (B) の総タンパク量およびリン酸化フォームに及ぼす影響を検討した。機械的ストレッチは伸展度5%もしくは15%で30分間行った。周期的伸展の頻度は毎分60伸縮で行った。細胞を回収後、Western blot法により解析した。図上部には典型的なバンド像を示した。T385リン酸化p70S6K (A) および T56リン酸化eEF2 (B) のバンド強度は、コントロール群を100として%で示した。データは、平均値±標準偏差 (n = 4~6) で示した。異なるアルファベットは統計的に有意である ($P < 0.05$)。

(3) 機械的ストレッチによる mitogen-regulated protein kinases (MAPKs)の活性化

MAPKs はセリン/スレオニンキナーゼであり、チロシンおよびスレオニンのリン酸化に

より活性化される。MAPK は大きく 3 つのファミリーに分類される。(i) extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、(ii) p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) および (iii) c-Jun N-terminal kinase (JNK)。30 分間の周期的ストレッチ(15%)は、ERK1/2、p38-MAPK および JNK すべての MAPKs のリン酸化を上昇させた(Data not shown)。しかしながら、それぞれの特異的阻害剤である PD98059、SB203580 および SP600125 存在下であっても、周期的ストレッチによる p70S6K および eEF2 の活性化には影響を及ぼさなかった(Data not shown)。すなわち、機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化には MAPKs の関与が低いことが示唆された。

(4) チロシンキナーゼ阻害剤が機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化に及ぼす影響

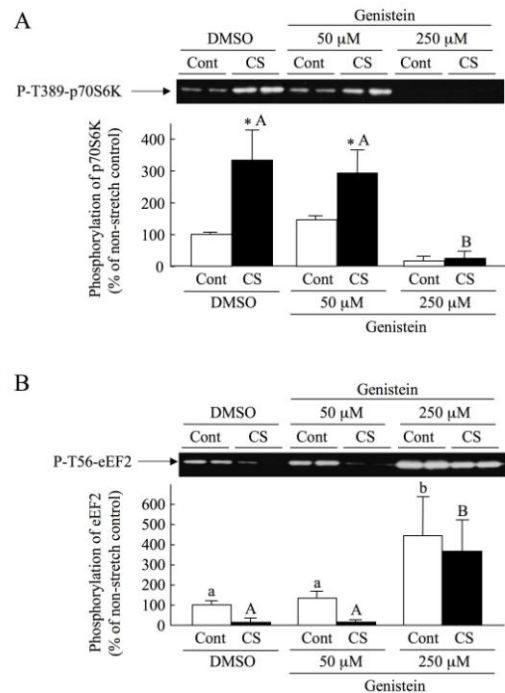


図3 チロシンリン酸化阻害剤が機械的ストレッチによる p70S6K (A) および eEF2 (B) の活性化に及ぼす影響

C2C12細胞に対して、機械的ストレッチ45分前に、非特異的チロシンリン酸化阻害剤である genistein (50もしくは250 μM/DMSO) を加えた。15%の周期的ストレッチ (CS) を30分間行ったのち、細胞を回収し、Western blot法で解析した。図上部には典型的なバンド像を示した。T389リン酸化 p70S6K (A) および T56リン酸化eEF2 (B) のバンド強度は、DMSOコントロール群を100として%で示した。データは、平均値±標準偏差 (n = 4~6) で示した。* $P < 0.05$ vs Cont in the same group. 異なるアルファベットは統計的に有意である ($P < 0.05$)。

機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の細胞内情報伝達経路を検討するため、非特異的なチロシンキナーゼの阻害剤

である genistein の影響を検討した。その結果、低濃度の genistein (50 μ M) は、機械的ストレッチの効果を抑制しなかったが、高濃度の genistein (250 μ M) 存在下では、ストレッチによる p70S6K (図 3 A) および eEF2 (図 3 B) の活性化が完全に抑制された。以上の結果より、ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化にはチロシンのリン酸化が必須であることが明らかになった。

(5) Src ファミリーチロシンキナーゼおよび Junas kinase 阻害剤が機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化に及ぼす影響

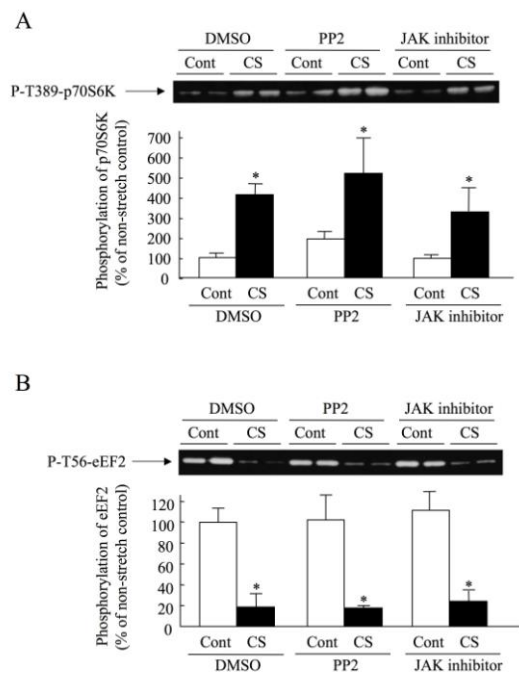


図4 Srcファミリーチロシンキナーゼ阻害剤であるPP2およびJunas kinase (JAK)阻害剤が機械的ストレッチによるp70S6K (A) および eEF2 (B)の活性化に及ぼす影響

C2C12細胞に対して、機械的ストレッチ45分前に、DMSOもしくはPP2 (50 μ M)、JAK inhibitor (20 μ M)を加えた。15%の周期的ストレッチ (CS)を30分間行ったのち、細胞を回収し、Western blot法で解析した。図上部には典型的なバンド像を示した。T389リン酸化p70S6K (A) および T56リン酸化eEF2 (B)のバンド強度は、DMSOコントロール群を100として%で示した。データは、平均値 \pm 標準偏差 (n = 4-6)で示した。* $P < 0.05$ vs Cont in the same group. 異なるアルファベットは統計的に有意である ($P < 0.05$)。

機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化には、チロシンリン酸化が必須であることが予想された。そこで、いずれのチロシンキナーゼが関与しているかを明らかにするため、Src ファミリーチロシンキナーゼの阻害剤である PP2 および、Junas kinase (JAK)の阻害剤が、機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化に及ぼす影響について検討した。その結果、い

れの阻害剤存在下においても、機械的ストレッチは、P70S6K および eEF2 の活性化を抑制しなかった。すなわち、Src キナーゼファミリーや JAK は機械的ストレッチの細胞内情報伝達には関与していないことが示唆された。

(6) Phospholipase C (PLC)の阻害剤が機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化に及ぼす影響

PLC はイノシトールリン脂質代謝においてセカンドメッセンジャー産生のエフェクター因子となる酵素である。フォスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸を分解し、2つのセカンドメッセンジャー、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DAG) を産生する。PLCは構造的に6つの型 ($\beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$) に大別される。PLC γ はチロシンのリン酸化により活性化されるため、機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の細胞内情報伝達に関与している可能性が考えられた。

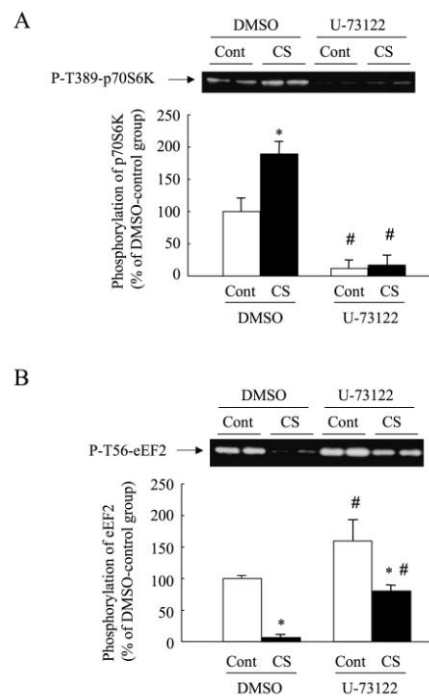


図5 Phospholipase C (PLC)の阻害が機械的ストレッチによるp70S6K (A) および eEF2 (B)の活性化に及ぼす影響

C2C12細胞に対して、機械的ストレッチ45分前に、DMSOもしくは PLCの阻害剤であるU-73122 (15 μ M)を加えた。15%の周期的ストレッチ (CS)を30分間行ったのち、細胞を回収し、Western blot法で解析した。図上部には典型的なバンド像を示した。T389リン酸化p70S6K (A) および T56リン酸化eEF2 (B) のバンド強度は、DMSOコントロール群を100として%で示した。データは、平均値 \pm 標準偏差 (n = 4-6)で示した。* $P < 0.05$ vs Cont in the same group. # $P < 0.05$ vs DMSO group.

そこで、PLCの阻害剤であるU-73122を細胞に添加し、機械的ストレッチを行った。その結果、機械的ストレッチによるp70S6Kの活性化は完全に抑制され(図5A)、eEF2の活性化もDMSOを添加したコントロール細胞に比して有意に減弱した(図5B)。以上の結果より、機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化には、PLCが関与している可能性が示唆された。

(7) 結論

運動による筋収縮のモデルとして培養細胞に機械的ストレッチを負荷するモデルを確立した。筋芽由来の培養細胞であるC2C12細胞に機械的ストレッチを負荷すると、運動時の骨格筋と同様に、IL-6遺伝子の発現誘導が認められた。また、筋収縮はmanmalian target of rapamycin (mTOR)を介して、タンパク質合成を促進することが知られているが、培養細胞においても機械的ストレッチがタンパク質合成促進作用を活性化する結果を得た。ストレッチ様式では、伸展を維持するよりも周期的に伸縮を繰り返す方がタンパク質合成促進作用が強いことが明らかとなった。

機械的ストレッチによるIL-6発現の上昇とタンパク質合成については、IL-6の主要な細胞内情報伝達タンパク質であるJAK活性を抑制してもp70S6KやeEF2の活性化が減弱しなかったことから関連が低いと考えられた。一方、非特異的チロシンキナーゼの阻害剤およびPLCの阻害剤存在下では、機械的ストレッチによるp70S6KおよびeEF2の活性化が完全に抑制された。すなわち、C2C12細胞においては機械的ストレッチによるタンパク質合成促進作用の活性化には、チロシンのリン酸化およびPLC活性が必須であることが示唆された。本研究の成果は今後、個体における筋収縮によって誘導されるタンパク質合成促進作用の調節メカニズムを明らかにしていく上で、有用な知見になると考えられた。

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6件)

- ① Ohira, Y., Matsuoka, Y., Kawano, F., Ogura, A., Higo, Y., Ohira, T., Terada, M., Oke, Y., and Nakai, N. Effects of creatine and its analog, β -guanidinopropionic acid, on the differentiation of and nucleoli in myoblasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 2011. 印刷中
- ② Nakai, N., Kawano, F., Oke, Y., Nomura, S.,

Ohira, T., Fujita, R., and Ohira, Y. Mechanical stretch activates signaling events for protein translation initiation and elongation in C2C12 myoblasts. *Mol. Cells.* 査読有 30: 513-518, 2010.

- ③ Kawano, F., Goto, K., Wang, X.D., Terada, M., Ohira, T., Nakai, N., Yoshioka, T., Ohira, Y. Role(s) of gravitational loading during developing period on the growth of rat soleus muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 査読有 108(3): 676-85, 2010.

- ④ Terada, M., Lan, Y. B., Kawano, F., Ohira, T., Higo, Y., Nakai, N., Imaizumi, K., Ogura, A., Nishimoto, N., Adachi, Y., and Ohira, Y. Myonucleus-related properties in soleus muscle fibers of mdx mice. *Cells Tissues Organs.* 査読有 191: 248-259, 2010.

- ⑤ Nakai, N., Kawano, F., Terada, M., Oke, Y., Ohira, T., and Ohira, Y. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonists on leucine-induced phosphorylation of translational targets in C2C12 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有 1780(10): 1101-1105, 2008.

- ⑥ Kawano, F., Takeno, Y., Nakai, N., Higo, Y., Terada, M., Ohira, T., Nonaka, I., and Ohira, Y. Essential role of satellite cells in the growth of rat soleus muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 査読有 295(2): C458-C467, 2008.

[学会発表] (計3件)

- ① Nakai, N., Kawano, F., Oke, Y., Nomura, S., Ohira, T., Fujita, R., and Ohira, Y. Tyrosine phosphorylation regulates mechanical stretch-induced activation of protein translation initiation in C2C12 myoblast. *Experimental Biology* 2010. April 24-28, 2010. Anaheim, California, USA.

- ② Nakai, N., Kawano, F., Oke, Y., Nomura, S., Terada, M., Ohira, T., and Ohira, Y. Mechanical stretch induces activation of eukaryotic elongation factor 2 in C2C12 myoblast. *Experimental Biology* 2009. April 18-22, 2009. New Orleans, Louisiana, USA.

- ③ Nakai, N., Kawano, F., Oke, Y., Nomura, S., Terada, M., Ohira, T., and Ohira, Y. Protein translation initiation is activated by mechanical stretch in C2C12 myoblast. 36th International Congress of Physiological Sciences, July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

〔図書〕（計1件）

① Naoya Nakai and Yoshinobu Ohira. Osaka University Press, Muscle Cell Physiology (2009), 136 page (3-14)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 直也 (NAKAI NAOYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90324508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし