

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11282

研究課題名（和文）PL標識法による筋線維芽細胞の力伝達に関わる新機能探索と筋力低下予防への応用

研究課題名（英文）Exploration and Application of Novel Functions Involved in Force Transduction in Myofibroblasts by PL Labeling Method

研究代表者

上田 修司（Ueda, Shuji）

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：50379400

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：低分子量ヒートショックタンパク質の一つであるHSPB1は、細胞ストレスによって生じる変性タンパク質を修復する分子シャペロンとして機能する。我々は、伸展装置を用いて機械ストレスを加えた筋細胞で、HSPB1と相互作用する結合タンパク質をPL標識法で探索した。その結果、機械ストレスに依存して、HSPB1が複数のミオシン軽鎖と結合することが明らかになった。また、HSPB1のリン酸化変異体を用いた結合実験などにより、HSPB1のリン酸化が、新たに発見されたミオシン軽鎖との結合に関与することが示された。以上より、HSPB1は、リン酸化によって複数のミオシン軽鎖と相互作用し、力伝達を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は、外部からの機械的なストレスを細胞内シグナル伝達に変換する。このプロセスを「力伝達」と呼び、細胞形態の維持・安定化に関わる。細胞の力伝達は、加齢に伴って低下し、高齢者の筋力減退の一因と考えられる。HSPB1の発現低下は、細胞の力伝達を低下させることから、本研究課題において、我々はHSPB1の新たな結合タンパク質とその関連シグナル伝達経路を明らかにした。この経路は、力伝達の減退予防の鍵シグナルとなる可能性が考えられる。今後、筋細胞でHSPB1のタンパク質発現を誘導する薬剤や健康機能性成分の開発が進めば、高齢者の運動機能の維持・改善に向けた新たな治療法の開発に活用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：HSPB1, a low molecular weight heat shock protein, functions as a molecular chaperone to repair denatured proteins induced by cellular stress. Using a cell extension and contraction apparatus, we subjected L6 myocytes to mechanical stress and used PL labeling to search for binding proteins that interact with HSPB1. We found that HSPB1 binds to multiple myosin light chains in a mechanical stress-dependent manner. Binding experiments using phosphorylation mutants of HSPB1 showed that the phosphorylation of HSPB1 is involved in its binding to the newly discovered myosin light chains. These results suggest that HSPB1 may interact with multiple myosin light chains through phosphorylation, which may play a role in force transduction.

研究分野：応用健康科学

キーワード：HSPB1 筋肉 筋肉減退 加齢 機械ストレス 力伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体を構成する組織や細胞は、常に圧力や張力など機械的ストレスを受けている。しかし、運動不足や座りがちな生活は、骨格筋に加わる機械的ストレスが減少し、筋力減退の要因となる。特に、加齢による筋力減退はサルコペニアと呼ばれ、70 歳以上の高齢者の 2 割以上が該当すると考えられている。サルコペニアの原因は、力伝達の低下、カロリー摂取量の減少、線維症の増加、ホルモンの変化など多岐にわたる。特に、運動機会の減少による力伝達の低下が与える影響は大きく、寝たきり状態などが長期間続くことで、骨格筋への機械的ストレスが減少する。骨格筋の筋肉減退は、更なる運動能力の低下を引き起こし、それがさらに重度の廃用性筋萎縮症を生じさせるなど、悪循環を引き起こす。超高齢社会の我が国では、健康寿命の延伸の観点から、その予防や改善法の開発が求められている。

中高年になると、我々の遺伝子には数百もの変異が蓄積し、それにより変性蛋白質が増加する。低分子量ヒートショック蛋白質 (sHsp) は、10 種類の HSPB アイソフォームより構成され、複数の sHsp が巨大なヘテロオリゴマー複合体を形成することで、分子シャペロンとして変性蛋白質の修復機能を果たす。筋細胞で発現する sHsp は、筋肉トレーニングなど運動負荷によって、発現が誘導される (Paulsen, et al. 2011)。sHsp の一つである HSPB1 (別名 Hsp27) を過剰発現させた遺伝子組換えマウスでは、後肢懸垂に伴って生じる廃用性筋萎縮が抑制されることが報告されており (Stephen, et al. 2009)、HSPB1 が筋萎縮症の抑制に有益な機能を果たすことが推測される。

理学療法の現場では、高齢者の筋肉 - 筋膜間の接合部 (筋筋膜) の張力バランスの障害が増加しており、その原因として、筋筋膜を繋ぐ筋線維芽細胞の加齢による機械的ストレスに対する力伝達の低下が上げられる。現在、高齢者の筋肉減退については、姑息的療法が主流であるが、今後、増加が予測される高齢者の筋力減退の予防的観点から、加齢による筋力低下の分子機序を明らかにし、その機能の回復に向けた研究が強く望まれている。

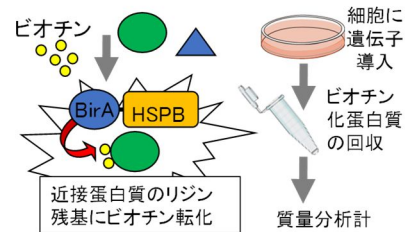


図 1. 近接依存性標識法 (PL 標識法) の原理について

### 2. 研究の目的

sHsp は、細胞ストレスに応じて発現誘導されるシャペロン分子で、筋細胞の増殖・分化の促進、細胞骨格の調節を介して、筋萎縮の予防に寄与することが推測される。本研究では、sHsp の一つで、骨格筋で多く発現する HSPB1 と細胞骨格の調節の間を結ぶ結合タンパク質について、近接依存性標識 (PL 標識法) を用いて探索し、力伝達における役割を検討した (図 1)。

### 3. 研究の方法

機械的ストレスは、自作装置による伸展刺激 (0.5Hz、細胞伸展率 20%) として、L6 筋細胞に加えた。細胞骨格の再構成は、伸展方向に対する細胞の配向割合から算出した (図 2)。伸展刺激による力伝達は、関連するシグナル伝達関連タンパク質 (FAK、ERK1/2、p38)、及び HSPB1 のリン酸化を特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティング法で検討した。HSPB1 の結合タンパク質の同定は、TurboID を利用した近位依存性ビオチン化酵素 (PL 標識法) を用いて行った。HSPB1 とミオシン軽鎖の過剰発現、siRNA の遺伝子導入は、リポフェクション法で行った。HSPB1 とミオシン軽鎖の細胞内局在は、細胞免疫染色後に、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。リン酸化による HSPB1 の細胞内局在への影響は、HSPB1 の非リン酸化変異体と擬似リン酸化変異体を共過剰発させ、共焦点レーザー顕微鏡で検討した。



図 2. 細胞に機械的ストレスを加える伸展装置

#### 4. 研究成果

伸展刺激により、L6 細胞の細胞骨格の再構成が観察された(図 3)。また、伸展刺激により、FAK、ERK1/2、p38 のリン酸化、及び HSPB1 のリン酸化の亢進が確認された。この HSPB1 のリン酸化は、伸展刺激前に ERK1/2 活性阻害剤、または FAK 活性阻害剤を添加することで抑制された。また、HSPB1 は、伸展刺激により、アクチン線維と共局在し、siRNA による HSPB1 をノックダウンすることで細胞骨格の再構成が低下した(図 4)。これらの結果から、HSPB1 は伸展刺激にตอบสนองして力伝達に関与すること示唆された。

次に HSPB1 とアクチン線維の相互作用の間を繋ぐタンパク質を調べるため、HSPB1 と結合するタンパク質を PL 標識法で検討した結果、HSPB1 と結合する新たなタンパク質として、ミオシン軽鎖が同定された。HSPB1 を過剰発現させた細胞を用いた *in vivo* の結合実験では、HSPB1 とミオシン軽鎖は、伸展刺激依存的に、アクチン線維上で共局在した。HSPB1 の非リン酸化変異体を発現した細胞を用いた比較では、伸展刺激による HSPB1 とミオシン軽鎖の共局在率は著しく低下した。また、siRNA によるミオシン軽鎖のノックダウン実験では、細胞骨格の再構成が HSPB1 のノックダウン実験同様に、低下した

以上より、HSPB1 は、リン酸化によってミオシン軽鎖と相互作用することで、力伝達を担うことが示唆された。ミオシン軽鎖は、ミオシン活性を調節し、機械的ストレスにตอบสนองし、ストレスファイバーの形成・アクチン線維の進展収縮を担う分子である。HSPB1 は、機械刺激にตอบสนองし、ミオシン軽鎖の機能を補完・強化することで、アクチン線維の安定化や機能調節に関与する可能性が考えられる(図 5)。

今回の研究で、伸展刺激により HSPB1 がリン酸化され、そのリン酸化により HSPB1 がミオシン軽鎖と結合し、細胞骨格の再構成を促進するという新たな機械ストレスに対する細胞応答が明らかになった。これらの知見は、細胞の力学的応答機構を理解するための新たな視点を提供するものである。

近年の研究より、HSPB1 は、骨格筋の様々な機能に関与することが報告されている。本研究の結果を踏まえ、高齢者の骨格筋で発現する HSPB1 のタンパク質量を適切にコントロールすることができれば、高齢者の筋肉減退の予防対策や、廃用性筋萎縮症の治療に活かすことが期待できるかもしれない。

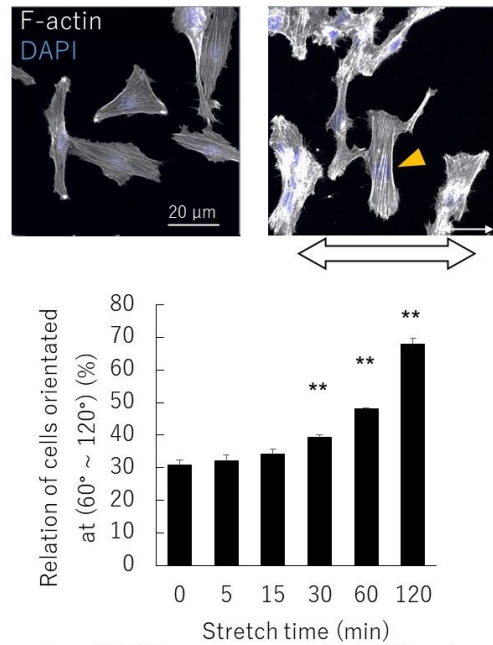


図 3. 機械的ストレスによる細胞骨格の経時的変化

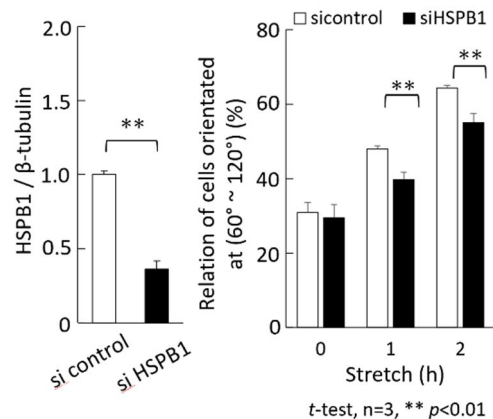


図 4. siRNAによるHSPB1ノックダウン効果

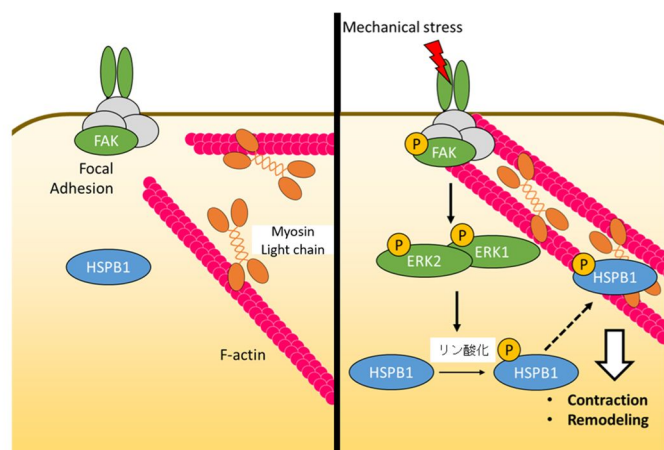


図 5. 力伝達におけるHSPB1のリン酸化経路とその機能

## 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 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Cheah JS, Jacobs KA, Lai TW, Caballelo R, Yee JL, Ueda S, Heinrich V, Yamada S.	4. 巻 32
2. 論文標題 Spatial proximity of proteins surrounding zyxin under force-bearing conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell	6. 最初と最後の頁 1221-1228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-10-0568	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 Ueda Shuji, Yamanoue Minoru, Sirai Yasuhito, Iwamoto Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploring the Characteristic Aroma of Beef from Japanese Black Cattle (Japanese Wagyu) via Sensory Evaluation and Gas Chromatography-Olfactometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 56 ~ 56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11010056	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 Ueda Shuji, Sasaki Ryo, Nakabayashi Rio, Yamanoue Minoru, Sirai Yasuhito, Iwamoto Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploring the Lipids Involved in the Formation of Characteristic Lactones in Japanese Black Cattle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 203 ~ 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11040203	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 Muroya Susumu, Ueda Shuji, Komatsu Tomohiko, Miyakawa Takuya, Ertbjerg Per	4. 巻 10
2. 論文標題 MEATabolomics: Muscle and Meat Metabolomics in Domestic Animals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 188 ~ 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo10050188	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yuuki Hioka, Shuji Ueda, Moeka Nishihara, Ken-ichi Yoshino, Soichiro Yamada, Minoru Yamanoue, Yasuhito Shirai.
2. 発表標題 Polo-like kinase 2 plays an essential role in cytoprotection in endoplasmic reticulum stress via phosphorylation of serine 19 in HSPB5.
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology Cell Bio 2021 Virtual-an Online ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuji Ueda, Kunimitu Fukushima, Ken-ichi Yoshino Soichiro Yamada, Minoru Yamanoue, Yasuhito Shirai.
2. 発表標題 Phosphorylation of HSPB1 regulates actin-myosin contraction in muscle cells via binding to the essential light chain.
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology Cell Bio 2021 Virtual-an Online ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Ito, Shuji Ueda, Nao Koizumi, Minoru Yamanoue, Yoshitaka Fujihara, Masahito Ikawa, Yasuhito Shirai.
2. 発表標題 DGK is involved in cell proliferation of mouse embryonic fibroblasts and affects fetal development.
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aika Hara, Yoshino Ken-ichi, Atsuko Takeuchi, Minoru Yamanoue, Yasuhito Shirai, Shuji Ueda
2. 発表標題 Proteomic analysis of senescence-like morphology induced by DNA damage in NIH3T3 cells
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumeno Mitani, Shuji Ueda, Ken-ichi Yoshino, Atsuko Takeuchi, Minoru Yamanoue, Yashuhito Shirai.
2. 発表標題 Small heat shock protein suppresses apoptosis caused by endoplasmic reticulum stress in L6 myocytes
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田 修司
2. 発表標題 畜産物の品質評価、付加価値の向上に向けたメタボロミクス技術の工夫と応用
3. 学会等名 日本畜産学会 企業協賛シンポ「畜産学分野におけるメタボロミクスの可能性」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島国光, 上田修司, 福田伊津子, 白井康仁
2. 発表標題 筋線維芽細胞の力伝達における低分子量ヒートショック蛋白質HSPB1の機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 火岡優希, 上田修司, 西原萌華, 福田伊津子, 白井康仁
2. 発表標題 低分子量ヒートショックタンパク質HSPB5による小胞体ストレス抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	吉野 健一  (Yoshino Ken-Ichi)  (90280792)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教   (14501)	

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