

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22609

研究課題名(和文)筋原線維タンパク質由来3-メチルヒスチジンのミオシン分解機構への影響

研究課題名(英文)The effects of 3-methylhistidine on myosin degradation in skeletal muscle

研究代表者

島元 紗希(Shimamoto, Saki)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：90875395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋細胞内の3-メチルヒスチジン(3-MeHis)が既知のタンパク質分解経路に与える影響とミオシンの重合体形成に及ぼす影響を調べ、ミオシンタンパク質の分解を惹起する機構の解明を目的とし、これまで注目されていなかった3-MeHisの生理作用の解明を目指した。骨格筋細胞への3-MeHisの添加はユビキチンプロテアソーム系およびオートファジー系タンパク質分解の促進させることにより、筋原線維タンパク質量を減少させた。加えて、3-MeHisがミオシンフィラメント形成の阻害に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はタンパク質分解機構の全容解明の一助となり、また遺伝子に暗号化されていないアミノ酸の機能の重要性を発信する研究となる。また、3メチルヒスチジンが「生体にとって不要で速やかに体外に排出される」という考え方から、「筋原線維タンパク質の分解産物である3-MeHisが連鎖的な筋原線維タンパク質の分解を惹起する」という考え方へのパラダイムシフトを提示することができ、加えて、3-MeHisは、イミダゾールジペプチドであるバレニンを構成するアミノ酸であるため、タンパク質分解に対するイミダゾールジペプチドの作用に焦点を当てた研究への波及が期待されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle mass is controlled through a delicate balance between protein synthesis and degradation. The mechanisms by which control protein synthesis and degradation are important for proper control of skeletal muscle mass. 3-methylhistidine (3-MeHis) is formed by post-translational methylation of the histidine residue involved in myosin and actin, which occupy a large part of myofibrillar proteins. Since this amino acid has been considered to be rapidly effused from skeletal muscle, its biological activity in skeletal muscles remains unclear. However, considerable amount of intercellular free 3-MeHis was actually detected in skeletal muscle. In this study, to investigate biological roles of 3-MeHis in skeletal muscle, we examined the effects of medium supplementation with 3-MeHis on myofibrillar protein levels in C2C12 myotubes. Supplementation of 3-MeHis decreased myofibrillar protein via the dual pathway of autophagy-lysosome and Ub-proteasome in C2C12 myotubes.

研究分野：動物生産科学

キーワード：骨格筋 タンパク質分解 N-メチルヒスチジン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物性タンパク質を安定的に供給するため、肉用家畜の産肉性の向上(骨格筋タンパク質蓄積の増大)が求められている。骨格筋タンパク質の蓄積は、タンパク質の合成と分解の差で表され、骨格筋におけるタンパク質の蓄積量の個体差には、合成よりも分解の差が強く関与する。骨格筋タンパク質分解を抑制し、効率的にタンパク質蓄積を増大させるためには、骨格筋タンパク質の大部分を占める筋原線維タンパク質(ミオシン・アクチン)の分解機構の全容解明が重要である。

ミオシンは骨格筋細胞において自己集合して重合体(thick filament)を形成する性質を持つ。そのため、筋原線維タンパク質の分解研究において、タンパク質分解酵素の活性のみならず、「thick filamentからのミオシン分子の脱落・遊離(脱重合)」は考慮すべき重要な段階である。しかしながら、現時点ではミオシンのthick filamentの脱重合を惹起し、ミオシン分子の分解を促進する機構は解明されていない。

ミオシン・アクチンに微量に含まれるアミノ酸として発見された3-メチルヒスチジン(3-MeHis)は、タンパク質合成に再利用されないため、速やかに体外へ排泄されると考えられてきた。一方、申請者は、これまでの研究により、肉用鶏の骨格筋量の個体差には、骨格筋のタンパク質分解速度の差と骨格筋中の遊離3-MeHis量が強く関与することを見出した。加えて、近年、thick filamentが試験管内でヒスチジン濃度依存的に脱重合する現象が発見された。申請者は、ヒスチジンのメチル化誘導体である3-MeHisにも同様の働きがあり、生体内においてミオシン分子周辺の3-MeHis濃度の局所的・一時的な変化がthick filamentの構造を緩め、重合体からのミオシン分子の脱落・遊離を促進する可能性を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋細胞内の3-MeHisによるミオシン分子のthick filamentからの脱重合に及ぼす影響と脱重合したミオシン分子の分解機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 骨格筋に対する3-MeHis添加の影響

C2C12筋管細胞を用いて、培地に3-MeHisを添加し筋原線維タンパク質に及ぼす影響を調べた。

3-2. 筋原線維タンパク質に対する3-MeHisの作用

C2C12筋管細胞への3-MeHisの添加がタンパク質の合成および分解に及ぼす影響を調べた。筋原線維タンパク質であるミオシンおよびアクチンmRNAの遺伝子発現量ならびにSUnSET法を用いてタンパク質合成に与える影響を評価した。加えて、オートファジー系、ユビキチンプロテアソーム系、カルパイン系タンパク質分解に与える影響を評価した。

3-1. 筋原線維タンパク質の存在形態に対するヒスチジンと3-MeHisの作用の検証

筋原線維タンパク質の抽出操作において、5 mMのヒスチジンを抽出液に添加すると、thick filamentを含む筋原線維タンパク質の存在形態が変化し、水溶化することを報告されている(*Animal Science Journal*, 26, 1344-3941, 2003)。ヒスチジンと似た構造を持つ3-MeHisには、ヒスチジンと同様に筋原線維タンパク質の存在形態に影響する可能性が考えられる。本実験では、ニワトリ浅胸筋からの筋原線維タンパク質の抽出操作過程における3-MeHisの添加が筋原線維タンパク質の存在形態に及ぼす影響について調べた。

4. 研究成果

4-1. 骨格筋に対する3-MeHis添加の影響

培養骨格筋細胞としてC2C12培養筋管細胞を用いて、培地中への3-MeHisの添加が濃度依存的(0、1、10、100 μM)に筋原線維タンパク質を減少させる実験モデルを構築した。濃度検討の結果より、総タンパク質量は濃度依存的に減少し、10 μMの濃度において対照区と比較して有意な減少が確認された。以後、C2C12培養筋管細胞への最適添加濃度は10 μMとした。

C2C12細胞に対する3-MeHisの添加実験を行った結果、3-MeHisの添加により、筋原線維タンパク質量が減少した。MHC-Iのタンパク質発現量に影響は与えなかったが、MHC-IIおよびα-アクチンのタンパク質発現量は有意に減少した。一方、3-MeHisの添加が骨格筋細胞毒性を検討するために、WSTアッセイを行った。その結果、3-MeHisの添加による細胞数の減少は認められなかった。これらの結果より、培養骨格筋細胞において3-MeHisはタンパク質合成の抑制もしく

は分解の促進に関与している可能性が示唆された。

4-2. 筋原線維タンパク質に対する 3-MeHis の作用

C2C12 培養筋管細胞に対する 3-MeHis の添加が筋原線維タンパク質の合成に与える影響を調べるために、これらの mRNA 発現量を分析した。その結果、ミオシン (MHC-I、MHC-IIa、MHC-IIb)、 α -アクチン、トロポニン mRNA の発現量に 3-MeHis 添加の影響は認められなかった。加えて、SUnSET 法を用いてタンパク質合成活性を測定した結果、3-MeHis の添加による影響は認められなかった。これらの結果より、3-MeHis はタンパク質合成系に影響を与えず、筋原線維タンパク質を減少させることが示唆された。

次に、3-MeHis が C2C12 培養筋管細胞におけるカルパイン系、ユビキチンプロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系タンパク質分解に及ぼす影響を調べた。その結果、ユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解の律速酵素であるユビキチンリガーゼ (Atrogi-1/MAFbx、MuRF1) の発現量を増加させ、ユビキチン化筋原線維タンパク質の発現レベルの増加も確認された。加えて、3-MeHis は、オートファジー系タンパク質分解のマーカである LC3B および Beclin mRNA の発現量に影響しなかったが、LC3BII/LC3BI の発現比および Beclin1 タンパク質の発現を増加させた。一方、m-カルパイン、カルパスタチン mRNA の発現量に 3-MeHis 添加の影響は認められなかった。

以上の結果より、3-MeHis は、ユビキチンプロテアソーム系およびオートファジー系タンパク質分解を介して筋原線維タンパク質を減少させる能性が示された。

4-3. 筋原線維タンパク質の存在形態に対するヒスチジンと 3-MeHis の作用の検証

水溶化筋原線維は無添加区 (NaCl 2.5 mM) ではほとんど検出されず、His (5mM) 区と 3-MeHis (5mM) 区において強く検出された。筋原線維に対する水溶化筋原線維の割合を求めた結果、3-MeHis を添加区は 66% の筋原線維が水溶化した。一方、ヒスチジンを添加区では 73%、無添加の抽出液では 16% であった。ミオシンは、低イオン強度溶液下では不溶性であり、高イオン強度溶液下では可溶性の性質を持つ。筋原線維タンパク質の抽出において、5 mM の His を含む低イオン強度溶液下でミオシンの 80% 以上が水溶化する事が報告されている (*Meat Science*, 82: 151–154, 2009)。また His を含む低イオン強度溶液中のミオシンロッドは、高イオン強度溶液中のミオシンロッドよりも長いことからミオシンロッドの伸長によりフィラメント形成を阻害の働きを持つことを示唆している。

以上より 3-MeHis の添加は、ヒスチジンと同様に筋原線維タンパク質を水溶化させる作用を持つことが分かり、この水溶化の現象はヒスチジンと同様にミオシンロッドの伸長によりフィラメント形成の阻害が水溶化に影響したと考えられる。

以上の結果より、3-MeHis は筋原線維タンパク質に対するフィラメント形成の阻害作用があることが示唆され、現在解明されていない筋原線維タンパク質が重合体から脱重合するメカニズムに関わると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島元紗希・石丸美樹・井尻大地・早川徹・西邑隆徳・大塚彰・藤村忍
2. 発表標題 N -メチルヒスチジンはC2C12筋管細胞のコピキチンリガーゼのmRNA発現量の増加を介して 筋原線維タンパク質量を減少させる.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
---------	---------