

平成 28 年 4 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700832

研究課題名(和文) 筋肉の増加における低分子量 G 蛋白質の機能解析

研究課題名(英文) Study of Rho family small G proteins in the increase of muscle size

研究代表者

上田 修司 (Ueda, Shuji)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・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 G 蛋白質の RhoA は骨格筋形成に不可欠な分子であるが、筋肥大におけるその役割は殆ど分かっていない。本研究では、C2C12 細胞を用いた筋細胞肥大モデルにおいて RhoA の発現量と活性調節機構について検討した。IGF-1 刺激によって RhoA の発現増加と持続的な活性化が認められた。RhoA の活性阻害実験では、IGF-1 による筋肥大の抑制が示され、更に複数の筋肉分化に関わるシグナル分子の活性低下が観察された。また、BirA 酵素標識法を本研究に導入したことで複数の RhoA 結合蛋白質の同定に成功した。本研究より、IGF-1 による筋肥大に関わる RhoA の活性調節機構の一端を明らかにすることができた。

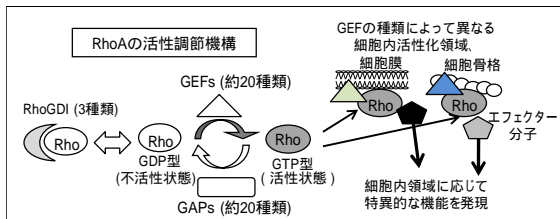
研究成果の概要(英文)：Rho family GTPase RhoA has been known to be involved in the muscular development and reconstruction. However, the role of RhoA in IGF-1-induced muscular hypertrophy remain to be revealed. To investigate the regulatory mechanism of RhoA activation, we used muscular hypertrophy model of C2C12 cells. After IGF-1 treatment, protein level of RhoA was upregulated, and activated RhoA was continuously increased in hypertrophic myotubes. RhoA dominant-negative mutant impaired prominent hypertrophy, and inhibited IGF-1-depending p38 MAPK activation and M-cadherin-shift, which are required for muscular differentiation. These results indicate that RhoA involves in multiple steps of IGF-1-induced muscular hypertrophy. To identify the key molecule in this mechanism, we designed RhoA tagged with promiscuous biotin ligase BirA and isolated several interesting RhoA binding candidate. This study clarified one end of the activation mechanism of RhoA related to muscular hypertrophy by IGF-1.

研究分野：総合領域

キーワード：加齢 老化 RhoA IGF-1 筋肉 DGK heat shock protein BirA

1. 研究開始当初の背景

低分子量G蛋白質であるRhoファミリーは、RhoA、Rac1、Cdc42、TC10など20種類が知られており、GTP結合型(活性状態)とGDP結合型(不活性状態)の二つの構造を行き来することで、細胞内シグナル伝達のON/OFFを司る分子スイッチとして機能する。その活性調節機構には、活性化促進因子(GEFs)と不活性化因子(GAPs)に加えて、活性抑制因子(RhoGDI)が存在する。



Rhoファミリーは、此までにも筋細胞の増殖・分化と関係があることは知られていたが、近年、筋肉減退症や廃用性筋萎縮症の筋組織において、RhoGDIの発現亢進、RhoA下流のシグナル分子SRFの低下することが報告されており(McCluning *et al.* J Appl Physiol, Sakuma *et al.* BBA. 2008)、また、筋力トレーニング後のヒト骨格筋でRhoAの発現が上昇することなどの報告(Lamon *et al.* J Physiol. 2009)から、特にRhoAは、生体の筋量の維持と深く関係していることが推測される。

筋肉増加を細胞レベルで考えると、筋細胞の供給源である筋芽細胞が増殖し、筋線維に分化する過程と、分化後の筋線維の肥大化過程の二つの要因が考えられる。筋肥大のメカニズムには、これまで血中に分泌されるインスリン様増殖因子(IGF-1)の作用がよく知られており、IGF-1のIGF-1受容体を介した細胞内シグナル伝達の詳細が明らかに成りつつある。しかし、スポーツなどの筋肉運動後の細胞内シグナル伝達、特にRhoファミリーが関わりと推測される細胞内分子機序については、研究開始当時は殆ど分かっていなかった。このような背景の元、本研究は進められた。

2. 研究の目的

RhoファミリーであるRhoA、Rac1、Cdc42、TC10は、細胞内シグナル伝達のON/OFFを司る分子スイッチとして、筋細胞の増殖、分化、エネルギー代謝などに関与している。

本研究では、筋肉の増加におけるRhoAの活性化機構の解明を目指し、筋培養株C2C12細胞にIGF-1の添加試験を行い、RhoAの活性化と関連分子の機能解析を行った。

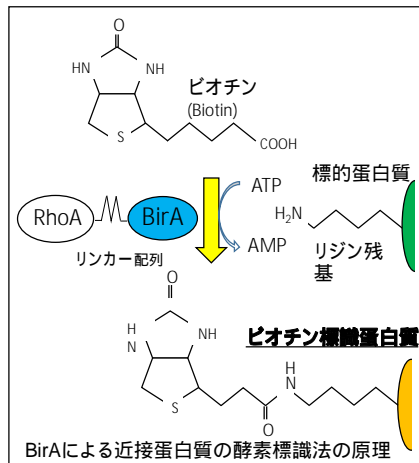
3. 研究の方法

C2C12筋芽細胞を増殖培地(10% FCS、D-MEM、P/S)で飽和状態に達するまで培養し、その後、分化誘導培地(2% FCS、D-MEM、P/S)で48時間培養し、筋管へ分化誘導した。IGF-1は、最終濃度100ng/mlになるように添加し、任意のタイムコースで培養した。IGF-1刺激による筋肥大の検証は、細胞蛍光免疫染色により行った。筋肉分化マーカーには、抗ミオシン重鎖(MHC)抗体を使用し、核染色にはDAPIを用いた。筋細胞の肥大化は、MHC陽性の筋管を選出し、その最大直径と1筋管あたりの核数から評価した。

IGF-1刺激によるRhoA発現量の変化は、RhoA抗体によるウエスタンブロット法とRT-PCR法を用いて評価した。RhoAの活性化については、組換えmDiaタンパク質を用いたブルダウンアッセイ法により、活性型RhoAを回収し、ウエスタンブロット法により評価した。各種遺伝子発現ベクターの細胞への導入は、リポフェクトアミン2000を使用した。RhoA抗体は、主にBD社を使用し、その他のシグナル伝達分子については、BD社、Cell Signaling社、Santa Cruz社、Sigma社を用いた。

BirA融合RhoAは、(Roux *et al.* J Cell Biol 196:801)を参考に、組換え蛋白質発現プラスミドを作成した。タンパク質のビオチン標識は、BirA-RhoA発現ベクターを遺伝子導入後、培養培地に50μMビオチンを添加し、24時間培養することで行った。ビオチン化タ

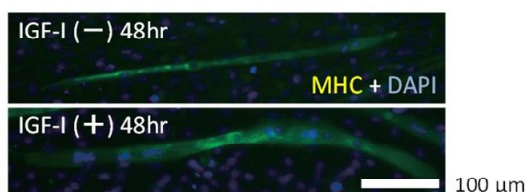
ンパク質の回収は、ストレプトアビジンよりも高い選択性を有するとされる Tamavidin 2-REV の磁性ビーズを使用した。得られたサンプルは、SDS-PAGE で分離後、銀染色法により結合タンパク質を可視化した。



4. 研究成果

1) C2C12細胞を用いた筋肥大モデルにおける RhoA の機能解析

本研究では、C2C12 筋細胞株を用いた筋肥大モデルにおいて IGF-1 による RhoA の発現量と活性調節機構について検討した。C2C12 筋管に 100ng/ml IGF-1 を添加し、48 時間培養した。この細胞を蛍光免疫染色し、顕微鏡観察した結果、筋管の最大直径はコントロール群と比較して、有意に肥大化が確認された。また、1 筋管あたりの核数は、IGF-1 刺激により増加する傾向にあった。この結果から、IGF-1 は細胞融合を促進することで筋管の肥大化を誘導することが確認された(下図)。



IGF-1 刺激による RhoA の活性化について検証した結果、IGF-1 刺激後 5 分、24 時間、および 48 時間のいずれのタイムコースにおいても RhoA の有意な活性化($P < 0.05$)を検出した。また、IGF-1 刺激後の RhoA 発現量を検証したところ、刺激 24 時間後において RhoA

タンパク質の発現量が有意に増加し、IGF-1 受容体特異的キナーゼ阻害剤 (Typhostin AG1024) により、RhoA の発現増加が抑制された。これらの結果より RhoA は、IGF-1 受容体の下流で機能し、何かしらの経路で活性制御を受けていると考えられた。

RhoA の活性化の役割を検討するため、常時不活性型変異体 (RhoA-DN) を C2C12 細胞に遺伝子導入し、過剰発現による RhoA の活性阻害の影響を検証した。IGF-1 刺激 48 時間後の C2C12 筋管では、有意に MHC の発現が増加 ($P < 0.05$) し、p38 のリン酸化 ($P < 0.05$) が検出された。また、分化の進行に伴い、M-カドヘリンの発現量が減少 ($P < 0.05$) した。一方、RhoA-DN を導入した細胞では、IGF-1 刺激による MHC の増加と p38 のリン酸化が抑制され、M-カドヘリンの発現量の減少が抑制された。p38 と M-カドヘリンは、筋分化に関与することが報告されている (Charrasses *et al.* *M Cell Biol* 749-759)。

以上の結果より、RhoA の活性化は M-カドヘリンの発現と p38 のリン酸化を調節し、C2C12 細胞の分化融合を促進することで筋肥大を促進することが推測された。

2) RhoA の相互作用分子の探索

さらに、IGF-1 シグナルにおける RhoA の役割を解明するため、RhoA と相互作用する分子の同定を試みた。BirA を用いた酵素標識法は、従来法よりタンパク質間相互作用を高感度に検出できることが期待される。BirA-RhoA 変異体を細胞に過剰発現させ、RhoA と相互作用する分子をビオチン標識し、それらを Tamavidin 2-REV を用いて精製後、質量分析計に供することでタンパク質を同定した。その結果、BirA-RhoA (WT)、BirA-RhoA 常時活性型変異体 (G14V) を過剰発現させた細胞で、それぞれ多数の結合分子を同定し、更に RhoA の発現調節に関わる候補分子の同定に成功した。

今後は、これらの結合分子の IGF-1/RhoA シグナルにおける役割を解明するとともに、RhoA の骨格筋における機能の更なる解明を進め、高齢者の筋肉減退の改善に繋がる研究成果として活かしたい。

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 2 件)

1. Shinsuke Nozaki, Shuji Ueda, Tohru Kataoka, Takaya Satoh.: "Role of RalA downstream of Rac1 in insulin-dependent glucose uptake in muscle cells." *Cell Signal.* 24. 2111-2117 (2012), 査読有
2. Shuji Ueda, Becky Tu-Sekine, Minoru Yamanoue, Daniel M Raben, Yasuhito Shirai.: "The expression of diacylglycerol kinase theta during the organogenesis of mouse embryos." *BMC Developmental Biology* (2013)13:35. 査読有

[学会発表](計 14 件)

1. 上田 修司: "筋肉の代謝調節機能と低分子量 G 蛋白質の関係" 第 304 回細胞工学会研究会講演会(招待講演)、2011 年 11 月 4 日、島根大学 (島根)
2. 上田 修司: "筋肉における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の役割" 第 3 回神戸大学バイオサイエンス研究会 若手研究者交流会 特別講演(招待講演)、2011 年 9 月 6 日、神戸大学 (兵庫)
3. Ueda S et al.: "Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma" The 2011 ASCB Annual meeting. (2012,12,13)、Denver (米国)
4. 上田 修司、桐村 悠佑、山之上 稔、白井 康仁: "ジアシルグリセロールキナーゼ の機能解析" 日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学 (京都)
5. 上田 修司、小川 侑璃子、大西 一政、山之上 稔: "鶏肉の熟成に伴う筋漿中のコネクチン 20-kDa 断片増加量と筋原線維小片化の関連" 第 115 回日本畜産学会大会、2012 年 3 月 28 日、名古屋大学 (名古屋)
6. 清水 俊策、上田 修司、桐村 悠佑、本田 和久、上曾山 博、白井 康仁、山之上 稔: "食肉の日齢評価に利用可能なタンパク質マーカーの探索" 第 115 回日本畜産学会大会、2012 年 3 月 28 日、名古屋大学 (名古屋)
7. 桐村 悠佑、上田 修司、佐藤 孝哉、山之上 稔、白井 康仁: "Analysis of RhoA activity in IGF-1 induced hypertrophic myotubes of C2C12 cells" 日本薬理学会、2012 年 3 月 23 日、福岡国際会議場 (福岡)
8. 上田 修司、小鍛治 泰斗、清水 俊策、桐村 悠佑、本田 和久、上曾山 博、白井 康仁、山之上 稔: "鶏胸筋におけるヒートショックタンパク質の発現解析" 関西畜産学会大会、2012 年 3 月 23 日、ホテルアバローム紀の国 (和歌山)
9. Ueda S, Tu-Sekine B, Yamanoue M, Raben D, Shirai Y.: "The expression of diacylglycerol kinase theta during the organogenesis of mouse embryos" 日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜 (神奈川)
10. Ueda S.: "The expression of Dgk theta during the organogenesis of mouse embryos." The 6th DGK international mini symposium (招待講演)、2013 年 9 月 14 日、熱海 (静岡)
11. Ueda S.: "Regulation of Rho family small GTPase in IGF-1 signaling induced muscular hypertrophy." San Francisco Bay area Seminar (SFBAS)(招待講演). (2013年8月23日)、Davis (米国)
12. Ueda S, Shih W, Ohashi Y, Yamada S.: "Identifying force sensitive complexes using promiscuous biotin ligase BirA tagged -catenin and zyxin" 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2013,12,17). New Orleans (米国)
13. Ueda S, Yamada S, Kirimura K, Kushiya A, Yamanoue M, Satoh T, Shirai Y.: A role of RhoA activation in IGF-1-induced muscular hypertrophy model. 2014 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2014,12,9). Philadelphia, (米国)

14. Kushiya A, Ueda S, Kirimura Y, Katoh Y, Ishimasa M, Satoh T, Yamanoue M, Shirai Y.: Insulin-like growth factor-1 induces activation and upregulating of RhoA via PI3K/Akt/mTOR pathway in muscular hypertrophy model of C2C12 cells. 2015 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (2015,12,13). San Diego, (米国)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 修司 (UEDA SHUJI)

神戸大学大学院農学研究科・助教

研究者番号：50379400