

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700705

研究課題名(和文)有酸素運動によるオートファジー抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)Single bout of running exercise suppressed autophagy in the fasted state

研究代表者

鄭冬梅(ZHENG, DONGMEI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤助教

研究者番号：10420829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内分解系であるオートファジーが筋肉運動によってどのような影響を受けるかを系統的に調べた。絶食24時間後のマウスでは、血中インスリンやIGF-1が最低レベルに落ち、骨格筋(ヒラメ筋、足底筋など)のmTorシグナル経路が不活化されてオートファゴソーム形成が誘導された。このマウスをトレッドミルで走行運動させたところ、絶食下にも関わらずmTor経路が再活性化されオートファゴソーム形成は抑えられた。

Etan DIGEを用いて走行運動による筋タンパク発現変化を網羅的解析に調べ、glycogeninやgalectin-1の発現変動を認めたと、mTor系の再活性化につながる原因はまだ解っていない。

研究成果の概要(英文)：Starvation-induced decrease in insulin and serum amino acids effectively suppresses the mammalian target of rapamycin (mTor) signaling to induce autophagy, a cellular major degradative pathway, in skeletal muscles (soleus, plantaris, and gastrocnemius). I investigated effect of treadmill running exercise on mTor signaling of skeletal muscles of starved mice. I found that mTor signaling pathway on ce inactivated under starvation conditions was reactivated after treadmill running exercise (12 m/min, 2 h) as revealed by the transition of phosphorylation state of S6-kinase and ribosomal S6. In accordance with this, autophagosomes induced in the skeletal muscles of starved GFP-transgenic mice were markedly suppressed after exercise. Treadmill running exercise caused changes in the expression of glycogenin, galectin-1, etc. However, these changes do not seem to connect to the mechanism of exercise-induced mTor reactivation.

研究分野：蛋白質分解

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：Autophagy Endurance exercise LC3 muscle mTOR treadmill

1. 研究開始当初の背景

骨格筋タンパクのターンオーバーにはユビキチン・プロテアソーム系とオートファゴソーム・リソソーム系(オートファジー)の2つが、それぞれ独立に、また時には連携しながら働いている。これらの分解系はタンパク合成系とのバランスを保ちながら健全な骨格筋ホメオスタシスの維持に不可欠な役割を担っている。一方、骨格筋タンパク分解の過剰の亢進や、阻害によって、様々な病態を出来することも明らかにされてきた。

(1) 骨格筋のユビキチン・プロテアソーム系

ATP 依存にユビキチン活性化酵素(UBA, E1)によって活性化されたユビキチンは、ユビキチン結合酵素(UBC, E2)との反応を経て、ユビキチン連結酵素(E3)の働きによって標的タンパクのリシン残基に結合。この一連の反応が反復されるごとにポリユビキチン化が進み、ポリユビキチンされた基質タンパクはプロテアソームによって認識・分解され、オリゴペプチドを生成する。骨格筋を代表する E3 酵素としては atrogen-1 や Murf1 が知られ、骨格筋細胞質タンパクのプロテアソームによる分解で中枢的な役割を担う。

神経遮断によって筋収縮を起こせなくなった、いわゆる除神経筋モデルや、拘束によって強制的に収縮を抑えた骨格筋では、ユビキチン・プロテアソーム系タンパク分解が活性化され、骨格筋の萎縮が起こる(廃用性萎縮)。また、遺伝子変異による筋肉細胞構造変化に起因する筋ジストロフィーでも筋萎縮を起こすが、このときもプロテアソーム系タンパク分解が亢進する。

(2) 骨格筋のオートファジー

オートファジーは細胞質のオルガネラや可溶性タンパクを小胞体由来のユニークな二重膜小胞であるオートファゴソームに包み込み、オートファゴソームをリソソームと融合させて取り込んだ細胞質をリソソーム加水分解酵素で分解する機構である。プロテアソームと対照的に、非特異的大規模な分解系であること、タンパクのみならず脂質や多糖類をも分解することなどの特徴がある。

骨格筋のタンパク分解ではこれまでオートファジーの寄与はプロテアソームに比べて小さいと考えられてきた。細胞質の大部分を筋原線維が占め、リソソームが非常に少ないことがその理由である。しかし、オートファゴソームを可視化できる GFP-LC3 トランスジェニックマウスが作製され、これを用いて解析が進められ、栄養飢餓でオートファゴソームが効率よく形成される組織であることが明らかにされた。さらに、骨格筋特異的オートファジー不能マウスが作製され調べられた結果、骨格筋でオートファジーが起こせなくなると筋萎縮を起こすことが明らかになった。これは、オートファジーによる細胞質浄化が進まなくなり、機能低下を起こしたミトコンドリアなどが貯留するためと理

解される。実際、オートファジーを起こせなくなった骨格筋では、酸化ストレスが高まり、ミトコンドリア機能が低下していることが知られている。

(3) タンパク分解系と骨格筋エネルギー代謝

プロテアソームと異なり、オートファジーはタンパクを分解して直接アミノ酸を生成することができるので、効率よくアミノ酸を栄養代謝に転用できると考えられる。すなわち、生成されたアミノ酸は脱アミノ反応によってアラニンに変換され、アラニンは肝臓に運ばれてグルコースを生成し、このグルコースは再び骨格筋に運ばれて異化代謝に利用され、ATP を生成することができる(グルコース・アラニンサイクル)。そこで、激しい筋肉運動で ATP 要求性が高まるような条件下ではオートファジーが活性化されるはずであるという仮説が成り立つ。この仮説にたって筋肉運動とオートファジーとの関係について研究しようと思いついた。

2. 研究の目的

本研究では、マウスを使って1回のトレッドミル走行運動を負荷させ、運動後骨格筋のオートファジーが活性化されるかどうか、また活性化が起こるとすれば、結果的にどのくらいアミノ酸レベルが上昇するかを調べ、持続的筋収縮運動とオートファジー活性の関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

運動前後での筋肉のオートファジー変化をどのように定量的に評価するかが一番大きな課題である。単一の方法に拠ってこれを調べることは至難であるため、複数の異なるアプローチを採ることにした。オートファゴソームを可視化できる GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用い、骨格筋組織のオートファゴソームを GFP-LC3 のドットとして数えることでオートファゴソーム/オートリソソームレベルを半定量する。次にこれら骨格筋のオートファジー誘導に関わるシグナル伝達分子のリン酸化を生化学的に調べ、オートファジーが活性化されるか不活化されるかの指標とする。最後に骨格筋のオートファジーによって生成したアミノ酸が血中に放出されることでアミノ酸レベルの変化がどのくらい有るかを定量する。以下に詳しく述べる。

(1) マウス

C57BL/6J マウスおよび同じ系統から作製された GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用いる。すべてのマウスは SPF 環境下の動物施設で 6:00~20:00 点灯下、不断給餌で飼育されている。また、実験は当該研究機関の動物倫理委員会規程に準じた取り扱いの下に行われる。

絶食したマウスを用いる場合は、予め 24 時間絶食させたマウスに 2 時間(20:00~

22:00) 食餌を与え、満腹にさせてから再び絶食させ、24時間後のマウスを絶食マウスとする。この実験プロトコルは個々のマウスの個体差を最小に抑え、肝臓や骨格筋のオートファジーを同調させることが可能である。

(2) トレッドミル走行運動

トレッドミルを用いたマウス走行運動について検討した結果、勾配10度の上り坂を12m/分、2時間運動させることを標準プロトコルとした。これは動物にとって過剰な疲労を起ささない中程度の運動であること、また、1回限りである方が個体差を小さく抑えられるなどの理由による。

(3) マウス骨格筋組織標本

C57BL/6J マウスあるいは GFP-LC3 トランスジェニックマウスを運動させたもの、および対照として静置させておいたもののそれぞれを頸椎脱臼し、後肢の骨格筋組織を摘出し、Compound 中で素早く凍結させる。調べる対象となる骨格筋は、soleus(ヒラメ筋)、plantaris(足底筋)、gastrocnemius(腓腹筋) および EDL (extensor digitorum longus: 長趾伸筋) の4つである。ヒラメ筋は typeII に富む遅筋でミトコンドリアが多い。plantaris は typeII にくらべ typeI が多い速筋、腓腹筋も同様である。

(4) GFP-LC3 のドット算定

凍結固定した GFP-LC3 マウス筋組織を厚さ4~6 μm の凍結切片とし、オリンパス共焦点顕微鏡 (FV1000) で GFP 蛍光を観察・撮影する。GFP-LC3 のドットカウントは画像データファイルをカールツァイス社の KS-400 イメージ解析システムによって定量、それぞれの骨格筋組織面積当たりのドット数として表す。

(5) イムノプロット

本研究ではオートファジー誘導に関わる骨格筋組織のシグナル伝達分子を検出する目的でイムノプロットを行う。摘出した骨格筋組織を RIPA バッファー中でモーター駆動によるホモゲナイザーを用いてホモジェネートとする。ホモジェネートは 5000 × g, 10 分の遠心を行って沈殿と上清に分け、上清を SDS ポリアクリルアミド電気泳動によって分離。PVDF 膜に泳動転写後、1次抗体、西洋わさびペルオキシダーゼ標識2次抗体と反応させた後、サーモフィッシャー社 West Dura を基質とする化学発光によって抗原を検出する。使用した抗体はセルシグナリング、ミリポアから入手した。また、骨格筋の酸化ストレス状態を調べるために、カルボニル化タンパク検出用ウェスタンプロットキットを用いる。

(6) 二次元電気泳動を用いた包括的タンパク発現解析

GE ヘルスケア社の Ettan DIGE を用いた包括的タンパク発現解析は、トレッドミル運動をさせないグループ、運動させたグループ、それぞれのマウス2個体の骨格筋(ヒラメ筋

と足底筋)ホモジェネート(前項)を Cy2 あるいは Cy3 で標識し、等量のタンパクを混合して1次元目の等電点電気泳動、二次元目の SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、Typhoon FLA9500 によるイメージング解析から、トレッドミル運動前後で発現の減少するタンパク、上昇するタンパクのスポットを確定する。スポットに対応するゲルの銀染色陽性部分を切り出し、ゲル内消化を経て Thermo 社 LTQ OrbitrapXL ETD 質量分析計でタンパクを同定する。

(7) 血漿遊離アミノ酸定量

マウスの大静脈血を採取し、血漿を分離。50% TCA を加えて終濃度 3.3% とし、10,000 × g, 20 分の遠心を行う。上清を日立 L8500 アミノ酸分析機で分離、アミノ酸を定量する。肝臓や骨格筋組織の遊離アミノ酸測定では、組織に5倍容量の 10% トリクロロ酢酸を加えてホモゲナイズし、10,000 × g, 20 分の遠心後、上清に等量の 20 mM 塩酸を加えてアミノ酸分析機でアミノ酸定量を行う。

(8) 生化学測定法

血漿インスリンはシバヤギ社の ELISA キットにより、グルカゴンは矢内原研究所酵素抗体法キット、IGF-1 はミリポア社 Milliplex IGF-1 キットにより、それぞれ定量する。グルコース、遊離脂肪酸、トリアシルグリセロールは JEOL 社 JCA-BM8000 自動分析器によって定量する。

(9) ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

骨格筋の mTor (TORC1) 複合体解析の目的でヒラメ筋や足底筋をプロテイナーゼ阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤入りの 40 mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁し、ダウンスホモゲナイザーでホモゲナイズする。ホモジェネートを 100,000 × g, 1 時間の遠心の後、上清を Superose 6 カラム (GE Healthcare 社) を用いてゲル濾過する。

4. 研究成果

まず始めに不断給餌の GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用いてトレッドミル走行2時間を課し、オートファゴソーム/オートリソソームの変化を GFP のドットカウントで調べた。しかしながら、個体差のぶれが大きすぎて統計的な有意差を論じることができなかった。マウス個体によってオートファジー誘導に関わる栄養飢餓シグナルのパラツキが大き過ぎるためであると考えられる。そこで、「研究の方法」の(1)で述べた同調的オートファジー誘導プロトコルにしたがい、24時間絶食させたマウスにトレッドミル運動を行わせた。

(1) 24時間絶食マウス骨格筋の諸パラメーター変化とオートファジー誘導

血漿ホルモンレベルの推移

骨格筋のオートファジーに最も大きな影響を及ぼすのはインスリンや IGF-1 である。絶食によってインスリン/IGF-1 が低下すると mTor (TORC1) が不活化され、オートファジ

ーが誘導される。同調的オートファジー誘導プロトコールの下では、インスリンレベルは絶食5時間で一気に低下し、そのままのレベル (~100 pg/ml) に留まる。また、IGF-1 は絶食20時間後くらいから急速に低下し、24時間で最低レベル (25 ng/ml) に達する。

GFP-LC3 ドット数の変化

同調的オートファジー誘導プロトコールは本研究に先立って行われた肝オートファジーについての研究で確立されたものであるが、絶食24時間で骨格筋も肝と同様 LC3-II が増え、骨格筋でもオートファジーが同調して起こることが示唆された。GFP-LC3 トランスジェニックマウスでもこれが裏付けられ、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、長趾伸筋のすべてにおいて GFP-LC3 ドット数が有意に増加することを見出した。これは絶食24時間でオートファゴソーム形成が誘導されていることを表すと考えられた。

mTor (TORC1) シグナル活性の推移

から24時間絶食 GFP-LC3 トランスジェニックマウスの骨格筋では一様にオートファゴソーム形成が誘導されていると考えられた。これを裏付けるために、C57BL/6J マウスを用いて mTor シグナル関連分子である Akt、S6-kinase、ribosomeS6 のリン酸化をウェスタンブロットによって調べた。その結果、予想通り、Akt (308番目のスレオニン、473番目のセリン) は絶食前から絶食後にかけて、4つの骨格筋組織のいずれにおいてもリン酸化から脱リン酸化に移行していることが解った。また、S6-kinase (389番のスレオニン、S6 (235番/236番のセリン) もリン酸化から脱リン酸化へ移行することが確認された。GFP-LC3 のドット増加と合致して内在性 LC3-II シグナルの増加も認められた。これらのことから24時間の絶食で、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、長趾伸筋のいずれにおいてもオートファジーが誘導されることが示された。

(2) 絶食マウスオートファジーのトレッドミル走行運動による変化

走行運動で持続的に筋収縮を維持するためのエネルギー代謝では、いわゆる速筋では解糖系の貢献が大きく、遅筋では呼吸系の代謝が中枢的な役割を担う。いずれにせよ栄養供給のない絶食下で走行運動することはオートファジーで生成するアミノ酸の代謝的要求が高まると予想される。しかしながら実際はむしろその反対でオートファジーを抑制する方向に反応することが明らかとなった。次にその詳細なデータについて述べる。

GFP-LC3 トランスジェニックマウスにおけるドット数の変化

24時間絶食で有意に増加した筋組織の GFP-LC3 ドット数はトレッドミルで減少傾向を示した。少なくとも足底筋では有意に減少し、ヒラメ筋でも有意差は得られないが減少していた。腓腹筋がやや増加傾向を示した。2時間の走行運動を行

う前の状態との比較であるため、ドットの減少傾向は必ずしもオートファジー抑制と結びつくとは限らず、むしろオートファジーのフラックスが高まったためであるかも知れない。

mTor (TORC1) シグナル活性の推移

24時間の絶食で Akt、S6-kinase、ribosomeS6 のいずれも絶食前のリン酸化状態から脱リン酸化状態へ明確にシフトしていたが、トレッドミル運動後これら mTor シグナル伝達分子は再リン酸化する傾向を顕著に示した。特にヒラメ筋と足底筋でこの傾向が非常に強く現れた。これは予想と反対に走行運動が骨格筋 mTor を再活性化させることを意味する。

mTor の再活性化は足底筋やヒラメ筋のホモジェネートをゲル濾過したときのクロマトグラムからも支持された。すなわち、運動前では mTor は 670kDa の大きさを持つ複合体として振る舞うが、運動後ではこの複合体に加えて ~5000kDa のより大きな複合体に Raptor と一緒にピークを形成する。これは富栄養条件でオートファジーが抑制されているときに mTor/Raptor/ULK1 複合体が大きな複合体を形成し、栄養飢餓条件下ではこの複合体から ULK1 が離脱することでより小さな複合体に解離することと合致する応答である。

トレッドミル運動で mTor が再活性化し、オートファジーが抑制される方向に変化するという実験結果から、血液中のホルモンや成長因子などのレベルが変化している可能性が考えられる。この点について、インスリン、グルカゴン、IGF-1 を定量したが絶食24時間のレベルとほとんど同じであった。また、血漿アミノ酸のレベルを調べたところ、ロイシン、グルタミン、バリンが若干増えているもののオートファジー抑制を説明するような変化では無かった。同様にヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の遊離アミノ酸を測定したが、ヒラメ筋でグルタミン酸とグルタミンが厳守傾向を示したに過ぎなかった。

運動による骨格筋タンパク発現変化

12m/分、2時間程度の運動で骨格筋タンパクの発現がどのような影響を被るかはほとんど知られていない。ヒラメ筋と足底筋の細胞質タンパクを二次元電気泳動で分離し、Ettan DIGE による発現変化を調べたところ、足底筋で galectin-3 が運動後に増えることを見出した。galectin-3 は骨格筋が筋肉疲労などを起こしたときに発現上昇を起こすことが知られている。トレッドミルによるオートファジー抑制や mTor の再活性化に直接結びつく変化とは言えないようである。

これら一連の解析から、本研究の結論として、骨格筋収縮運動はオートファジーをむしろ抑制すると考えるのが妥当である。先行する研究はいずれも不断給餌のマウスではオートファジー関連遺伝子の転写レベルでの亢進を報告しており、絶食させたマウスでの

成績はほとんど知られていない。本研究から導き出された洞察は、持続的な収縮を行っている骨格筋では筋肉自体の質量を維持して収縮能力を喪失させないような応答が働いており、オートファジー抑制効果もその一環である可能性が高い。そのような合目的性を受け入れたとしても残る大きな謎は、どのようにして mTor の再活性化が起こるかという分子機構そのものである。現状では、ホルモンなどの血中液性因子の関与は認めがたい。そうであるならばどのようにしてこの謎を解明していくべきかが次のテーマとなる。運動による mTor 再活性化はヒラメ筋や足底筋でより明確に認められるので、これらの筋肉の収縮に特徴的な代謝的背景があるかも知れない。メタボローム解析を含めた網羅的な解析をさらに進めて行くべきと思われる。

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. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation.

Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H.

Sci Signal. (2012) 5: ra5.

2. Ferulic acid induces mammalian target of rapamycin inactivation in cultured mammalian cells.

Bian Z, Furuya N, Zheng DM, Oliva Trejo JA, Tada N, Ezaki J, Ueno T.

Biol Pharm Bull. (2013) 36:120-124.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鄭 冬梅 (Tei Toubai)

順天堂大学・医学研究科・非常勤助教

研究者番号：10420829