

<研究課題> タンパク質分解系の機能不全による筋量調節機構の解明

代表研究者 広島大学大学院医系科学研究科 助教 北嶋 康雄

【抄録】

本研究では、任意の時期に骨格筋特異的にプロテアソーム機能不全を起こすことのできるマウスを作出し、骨格筋恒常性維持機構への影響を明らかにすることを目的とした。個体成熟後の骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、プロテアソームを介したタンパク質分解が阻害され、筋萎縮と筋線維のサイズの減少を引き起こした。さらに、プロテアソーム機能不全は壊死細胞や炎症細胞の浸潤などが認められ、疾患との関連も示唆した。今後は、筋プロテアソーム機能不全と老化や疾患との関連をさらに調べていく必要がある。その解明が進むことで、骨格筋の正常な恒常性維持機構の一端を明らかにすることができると思われる。

1. 研究の目的

日本は未体験の超高齢社会に突入している。ますます進行する超高齢社会においてサルコペニア(加齢に伴う骨格筋萎縮)に伴う運動機能低下が多く、要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。2017年に60歳以上の日本人を対象とした調査では、サルコペニアの推定有病者は370万人にのぼり、毎年105万人の高齢者が新しくサルコペニアに罹患していると発表された。そのような背景の元、サルコペニアに関して未だ確固たる解決策には至っていない。

一般的に、骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスで決定されると考えられおり、遺伝子改変マウスなどにより様々な研究が推進されている。申請者は、これまでに骨格筋機能や骨格筋量を調節する機構について、タンパク質分解系の主役であるプロテアソーム系の機能不全マウスを作出し、骨格筋量維持にかかわることを証明してきた(1,2)。これまでに、骨格筋では加齢によりプロテアソーム活性が低下することが報告されており、申請者は、骨格筋でのプロテアソーム機能(タンパク質分解系)の低下のモデルを作出することができれば、サルコペニア研究が飛躍的に進むと考えた。

上記の考えの元、これまでに申請者は骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全(KO)マウスを作出し、KOマウスでは、有意なプロテアソーム活性の低下および、筋成長不全を示した。しかし、このマウスでは、発生・発育段階からのプロテアソーム機能不全になるため、そもそも個体の成長が阻害され、加齢とともに症状がでるサルコペニアモデルとは異なると考えられた。そこで、テトラサイクリン遺伝子発現調

節システムを用いて、実験者の任意のタイミングで時期特異的に遺伝子改変を起こせるモデルが作出できれば、サルコペニアモデルになると考え、本研究を計画した。本研究の目的は、任意の時期に骨格筋特異的にプロテアソーム機能不全を起こすことのできる(mKO)マウスを作出し、筋量調節機構との関わりについて明らかにすることである。

2. 研究方法と経過

2-1 実験動物

誘導型の骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全マウスを用いて、若齢マウス(8-12週齢)を対象にドキシサイクリンを飲ませることにより遺伝子欠損を誘導した。すべての実験動物は、温度、湿度が通年一定に保たれた、12時間ごとの照明管理の元で、水分、栄養を十分に与えられて飼育された。

2-2 ドキシサイクリンによるノックアウトの誘導

5%スクロース溶液にドキシサイクリン(Sigma)が最終濃度2mg/mlになるように溶解し、マウスの飲料水とした。3日ごと飲料水を調製し、マウスに3週間自発的に摂取させた。ドキシサイクリン溶液を飲水させている期間は、マウスは普通の水を飲むことはできないようにした。

2-3 体重、骨格筋重量、握力および組織学的な評価

すべての実験においてサンプリング時にマウスの体重、筋重量(速筋主体の腓腹筋、前脛骨筋および遅筋主体のひらめ筋)、握力を測定

した。単離した骨格筋は、可能な限り脂肪、結合組織、腱を取り除いた。その後、凍結組織包埋剤を用いて、液体窒素により冷却したイソペンタンにて凍結した。凍結した骨格筋はクライオスタットによって -20°C 下で $10\mu\text{m}$ の厚さにスライスし、シリコンコーティングスライドガラスに接着し、解析まで -80°C で保存した。保存切片は室温で解凍後に、4%Paraform Aldehyde (PFA) /PBS またはアセトンにより固定した。その後 5% goat serum/PBS で室温 30 分間のブロッキングを行い PBS で洗浄後、一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした。翌日 PBS で洗浄後、一次抗体に適切な二次抗体で室温 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、VECTASHIELD (Vector Labs, Peterborough, UK) により封入した。

2-4 遺伝子発現解析

Total RNA は RNeasy (Qiagen) を用いて単離した。リアルタイム PCR のために、オリゴ dT プライマーを用いて第一鎖 cDNA を合成した。選択した遺伝子の発現レベルは、マニュアルに従って Bio-Rad CFX96 システムを使用して分析し、定量 PCR 分析は、特定のプライマーを使用して実施した。

2-5 プロテアソーム活性

プロテアソーム活性試薬は、Proteasome-Glo™ Assay kit (Promega)を用いた。タンパク質の抽出には、20 mM Tris HCl (pH 7.2), 0.1 mM EDTA, 5 mM ATP, 1 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol and 0.04% Nonidet P40 の抽出液を用い、Variaskan luminometer (Thermo Scientific)により発光強度を測定した。

3. 研究の成果

3-1 体重、骨格筋量、筋機能の評価

mKO マウスの骨格筋(前脛骨筋、腓腹筋)を対象にプロテアソーム構成遺伝子(Rpt3)の遺伝子発現を調べたところ、コントロールに比べて 90%以上有意に抑制されていた。また、他のプロテアソーム構成遺伝子に関しては、mKO マウスにおいて上記とは逆に増加している遺伝子も存在し、代償的な影響が考えられた。

体重に関しては、mKO マウスとコントロールマウスの間に有意な差は認めなかった。前脛骨筋および腓腹筋の筋重量に関しては、mKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に減少していた。一方で、ひらめ筋に関しては、両者に差は認めなかった。つまり速筋線維主体の骨格筋では筋萎縮を呈し、遅筋

線維主体の骨格筋では筋萎縮が認められなかった。これはサルコペニアの現象と一致しており、今後の更なる解析が必要である。また、筋機能評価として握力を調べたところ、mKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に減少していた。

3-2 筋横断面の組織学的な評価

mKO マウスおよびコントロールマウスの筋横断面を用いて免疫染色を行った。mKO マウスにおいて、コントロールマウスと比較して、筋線維 Type2a、2b、2x いずれにおいても有意に筋横断面積が筋萎縮していた。また、HE 染色により筋横断面を観察したところ、mKO マウスのみに壊死した細胞や炎症細胞が確認された。これにより、骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、恒常的な筋の維持にプロテアソーム系が関与していることを示唆した。また、筋損傷再生時の筋細胞や炎症細胞の関与なども今後の検討課題である。

3-3 タンパク質分解系の評価

プロテアソーム活性の検討に関しては、予想に反して、mKO マウスがコントロールマウスと比較して活性の増加を呈した。上記 1 にも記述したように、mKO マウスの骨格筋ではコントロールマウスと比較してターゲット遺伝子 Rpt3 は有意に減少していたが、他のプロテアソームコンポーネントの遺伝子発現は増加していた。そのため、mKO マウスでのプロテアソーム活性の増加は、プロテアソームコンポーネントの代償的な活性化によるものである可能性が考えられた。また、mKO マウスにおいて、ユビキチン化タンパク質の蓄積も確認できたため、タンパク質分解が機能不全になっていることを示した。さらに、mKO マウスの骨格筋では、コントロールマウスと比較して、オートファジー関連の LC3 や p62 のタンパク質蓄積も起こっていた。

4. 今後の課題

本研究では、成体骨格筋におけるプロテアソーム機能不全が筋萎縮を引き起こすことを、マウスモデルで実証した。個体成熟後の骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、プロテアソームを介したタンパク質分解が阻害され、筋萎縮と筋線維のサイズの減少を引き起こした。

プロテアソーム機能不全を起こした骨格筋の組織観察では、壊死した細胞や炎症細胞の浸潤など、筋線維の変性が確認された。プロテアソーム系は、正常および異常な細胞内タ

ンパク質のほとんどを分解することが知られている(3)。特に骨格筋では、プロテアソーム系によるタンパク質分解が筋原線維タンパク質の主要な分解機構である(4)。また、骨格筋においては、プロテアソーム機能異常と筋疾患の関連性が報告されている(5)。したがって、筋プロテアソーム機能不全と疾患に関するさらなる研究が必要であり、そのために本研究で用いたマウスモデルが有用であると考えられる。

興味深いことに、mKO マウスでは、Rpt3 以外のプロテアソーム関連遺伝子の発現が上昇していた。また、プロテアソーム活性についても mKO マウスの骨格筋で上昇が認められた。これらの知見は、ミスフォールドしたタンパク質をより効率的に除去するための代償機構の存在を反映しているのかもしれない。今後は、上記の現象について老化マウスで共通する事象があるのか、さらには運動モデルでの検証などを進めることが課題である。

5. 研究成果の公表方法

これらの得られた研究結果をまとめて国内外の学会で発表する予定である。また、更なる解析を追加実験として行い、国際誌への投稿を予定している。

参考文献

[1] Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, Ando R, Izumi R, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Ito H, Urushitani M, Nagatomi R, Takahashi R, Aoki M. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci.* 127:5204-17, 2014.

[2] Kitajima Y, Suzuki N, Nunomiya A, Osana S, Yoshioka K, Tashiro Y, Takahashi R, Ono Y, Aoki M, Nagatomi R. The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle. *Stem Cell Reports.* 11(6):1523-1538,

2018.

[3] Collins GA and Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell.* 169:792-806, 2017.

[4] Attaix, D, Aurousseau E, Combaret L, Kee A, Larbaud D, Ralliere C, Souweine B, Taillandier D, Tilignac T. Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 153-165, 1998.

[5] Fratta, P, Engel W, McFerrin J, Davies K, Lin S, Askanas V. Proteasome inhibition and aggregates formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers. *Am. J. Pathol.* 167, 517-526, 2005.

以上

Elucidation of the mechanism of muscle mass regulation by dysfunction of proteolytic system

Primary Researcher: Yasuo Kitajima
Assistant Professor, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

The aim of this study is to generate mice that can undergo muscle-specific proteasome dysfunction at any given time and to elucidate its effects on skeletal muscle homeostasis mechanisms. After individual maturation, skeletal muscle proteasome dysfunction in mice inhibited proteasome-mediated proteolysis, leading to muscle atrophy and reduced myofiber size. Furthermore, proteasome dysfunction was associated with necrotic cells and inflammatory cell infiltration, suggesting a link to disease. In the future, the relationship between muscle proteasome dysfunction and aging and disease should be further investigated. We expect that further elucidation of this relationship will help to elucidate one aspect of the normal homeostatic mechanism of skeletal muscle.