

# 健康寿命の延伸へ向けた筋委縮制御機構の解明

所属：北海道大学大学院医学研究院医学専攻

助成対象者：渡部昌

## 概要

廃用性筋委縮は、筋肉細胞内の異化反応と同化反応のバランスが崩れ、筋タンパク質の分解が合成を上回った結果として表出する現象であり、筋委縮促進に必須な分子として MuRF1、MAFbx という 2 つのユビキチンリガーゼ (E3) が同定され、これら E3 による筋タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる分解が特に重要な経路であると考えられている。本研究では、我々が新規に開発した基質同定手法を用いて筋萎縮関連 E3 の標的基質の同定を試み、いくつかの E3 について複数種類の基質候補分子を得た。当該分子のさらなる解析により筋委縮時のユビキチン化修飾反応の解明が期待できる。

## abstract

Disuse muscle atrophy is a phenomenon in which muscle protein degradation exceeds synthesis due to an imbalance between catabolism and anabolism in muscle cells. Two ubiquitin ligases (E3), MuRF1 and MAFbx, have been identified as essential molecules for promoting muscle atrophy, and ubiquitination of muscle proteins by these E3s and their degradation by proteasome are considered to be particularly important pathways. In this study, we tried to identify the substrates of muscle atrophy-related E3s using our newly developed substrate identification method and obtained several candidate substrate molecules for several E3s. Further

analysis of these molecules will clarify the ubiquitination-modification reaction during muscle atrophy.

## 研究内容

### [背景]

長寿高齢化社会が到来し、健康寿命の延伸は我が国において喫緊の課題となっている。日常生活動作が自立し、健康で過ごすためには様々な要素が関係しているが、中でも加齢に伴う筋肉量の減少、すなわちサルコペニアは特に重要と言える。しかし、サルコペニアの効果的な予防または治療は未だリハビリテーション以外に無いのが実情であり、他の選択肢の確保が望まれている。サルコペニアの中でも主要な原因となっている廃用性筋萎縮について、一定の理解が進んできているが、新たな予防・治療法開発の具体的な標的を見出すために、さらに詳細なメカニズムを明らかにすることが大切である。

筋萎縮は、筋肉細胞内の異化反応と同化反応のバランスが崩れ、筋タンパク質の分解が合成を上回った結果として表出する現象である。タンパク質の分解はユビキチン・プロテアソーム系による選択的な分解経路とオートファジー系による非選択的な分解経路が司り、特に前者はユビキチンリガーゼ (E3) が選択的に基質を認識してユビキチンを付加し、プロテアソームがこれを認識することで基質を分解に導く反応系である。近年筋萎縮の促進に必須な分子として MuRF1、MAFbx という 2 つの E3 が同定され、これらユビキチンリガーゼによる筋タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる分解が特に重要な経路であると考えられてきている (1, 2)。これらの E3 が標的とする筋タンパク質は、カルシニューリンや MyoD などいくつかの候補については報告がなされているものの、筋萎縮における重要性としては疑問視されており、未だ純粋な標的筋タンパク質は明らかとなっていない。このように MuRF1 や MAFbx の標的基質の同定に注目が集まっているが、一般的にこの 2 つの E3 に限らず、E3 の基質同定は技術的に非常に困難であり中々研究が進んでこない状況であった。

### [目的]

我々はこの問題点を解決すべく、E3 酵素の純粋な基質とそのユビキチン化部位を定量的・網羅的に同定する標準手法の確立を目指し、新規手法を開発した。この新規手法を MuRF1、MAFbx を中心とした筋萎縮関連 E3 に適用することで、筋萎縮時のユビキチン化修飾反応の全体像を解き明かすことを本研究の目的とした。得られたデータから筋萎縮の進行に重要

なユビキチン化反応系を炙り出し、筋委縮抑制剤開発の基盤を確立する。

[結果]

本研究で用いる同定法は、FLAG タグ、ユビキチン高親和性人工タンパク質 (TUBE)、解析したい任意の E3 酵素の 3 つのドメインを融合したプローブを用いることに特徴がある。細胞内で E3 がユビキチン化した直後の基質をその場で捕獲し、かつユビキチン化ペプチドのみを精製し網羅的に検出することが期待できる。ユビキチン化を受けたペプチドのみを再精製するため、ユビキチン化部位の同定も同時に可能である。E3 が細胞内で実際に司る酵素反応を検出するため、偽陽性が少なく特異性が高い生理的な基質を定量的に同定できる。以下のような手順で同定を行った。①プローブを細胞に導入しプローブが捕獲するユビキチンリガーゼの基質を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、②トリプシンによって消化し、③ユビキチンレムナント抗体 (K- $\epsilon$  GG 抗体) の利用によりユビキチン化を受けたペプチドのみ再精製を行い、④Quadrupole-Orbitrap 型質量分析器にて検出を行った。

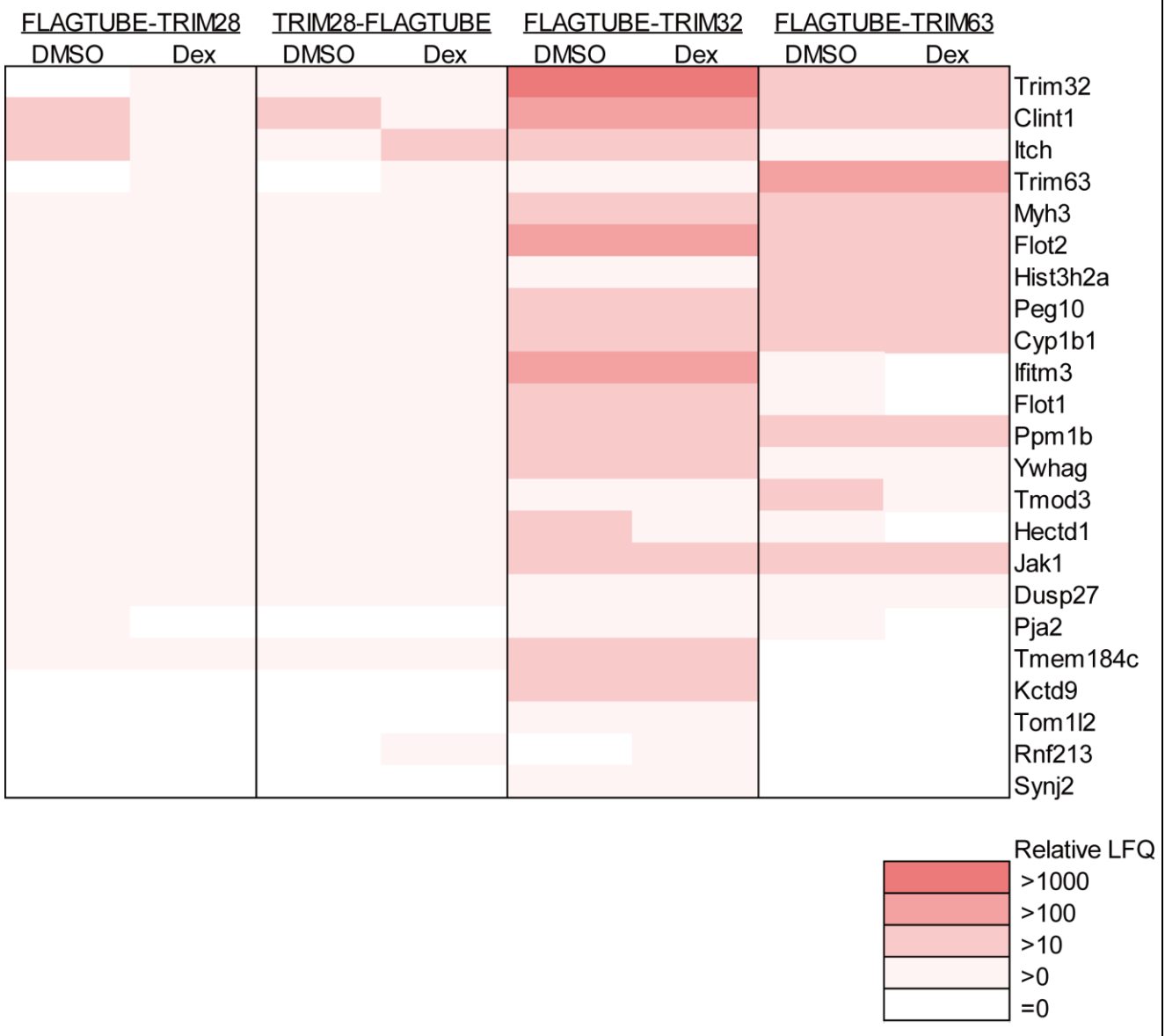
①E3 プローブの作製：まず解析する E3 遺伝子 (TRIM32、MuRF1/TRIM63、MAFbx/FBX032、FBX030、TRIM28) を入手し、基質を捕獲するための E3 プローブをレトロウイルス発現ベクター上に組み込んだ。FLAGTUBE-TRIM32、FLAGTUBE-MuRF1/TRIM63、FLAGTUBE-MAFbx/FBX032、FLAGTUBE-FBX030 の 4 種と、陰性対照として FLAGTUBE-TRIM28、TRIM28-FLAGTUBE の 2 種について作製した。

②プローブを安定に発現する細胞株の作製：上記ベクターを用いてレトロウイルスを作製し、プローブを安定に発現する細胞株を作製した。細胞株は、骨格筋由来の細胞株である C2C12 細胞を第一選択の宿主として用いた。FLAGTUBE-TRIM32、FLAGTUBE-MuRF1/TRIM63 および陰性対照の FLAGTUBE-TRIM28、TRIM28-FLAGTUBE を安定に発現する細胞株の樹立に成功した一方、FLAGTUBE-MAFbx/FBX032、FLAGTUBE-FBX030 プローブ安定発現株については樹立することができなかった。

③高感度質量分析器による網羅的解析：作製した細胞株 (FLAGTUBE-TRIM32、FLAGTUBE-MuRF1/TRIM63 および陰性対照の FLAGTUBE-TRIM28、TRIM28-FLAGTUBE) を用いてユビキチン化タンパク質を精製し高感度質量分析器にて網羅的な同定を試みた。各サンプルあたり 15 cm ディッシュ 5 枚分培養を行い、70%コンフルエントに達した後に 2%ウマ血清を含有した分化誘導培地に変更し、その後 2 日毎に培地を新鮮なものに交換し、分化誘導後 4 日目に DMSO を添加し、分化誘導 6 日目に細胞を回収した。回収した細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体アフィニティゲルを用いて免疫沈降を行い、沈降物を Benzonase 処理、トリク

ロロ酢酸沈殿、還元、アルキル化処理後、トリプシンにてペプチドに分解した。得られたペプチドに対し、抗 di-Gly 抗体アフィニティゲルを用いて再度免疫沈降を行い、ユビキチン化ペプチドのみを精製した。脱塩処理後、液体クロマトグラフ質量分析器 (Orbitrap Elite) にて解析を行った。

④筋委縮刺激下における基質の同定：特に MuRF1 と MAFbx は筋委縮を誘導する種々の刺激で発現が誘導されて筋委縮進行を制御することが知られている。作製したプローブ安定発現細胞株に適用可能な筋委縮誘導刺激として、Dexamethasone を加えて基質の同定を行った。前項のサンプルと同様の分化誘導を行い、分化誘導後 4 日目に Dexamethasone 10  $\mu$ M を添加し、分化誘導 6 日目に細胞を回収した。回収した細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体アフィニティゲルを用いて免疫沈降を行い、沈降物を Benzonase 処理、トリクロロ酢酸沈殿、還元、アルキル化処理後、トリプシンにてペプチドに分解した。得られたペプチドに対し、



抗 di-Gly 抗体アフィニティゲルを用いて再度免疫沈降を行い、ユビキチン化ペプチドのみを精製した。脱塩処理後、液体クロマトグラフ質量分析器 (Orbitrap Elite) にて解析を行った。

得られた結果を上記に示す。

FLAGTUBE-TRIM32 プローブを用いた解析では、21 種の基質候補を得た。このうち Dexamethasone 処理によって増加した候補と減少した候補がそれぞれ 1 種ずつ含まれていた。一方 FLAGTUBE-MuRF1/TRIM63 を用いた解析では、15 種の基質候補が得られ、その全てが FLAGTUBE-TRIM32 プローブで得られた基質候補に含まれていた。Dexamethasone 処理によって増加した候補と減少した候補がそれぞれ 3 種、7 種ずつ含まれていた。

[今後]

得られた基質候補について、個別に検証を行っていくことが今後の課題となる。まずユビキチン化アッセイを別途行うことで、基質であるかどうかを検証し、次に筋委縮の過程において当該基質がユビキチン化を受ける意義について検討していく。

また、樹立することができなかった FLAGTUBE-MAFbx/FBX032、FLAGTUBE-FBX030 プローブ発現株について、プローブの発現により毒性が発揮されたものと考えられたため、Doxycycline 投与時に発現が誘導される発現誘導型のプローブを改めて作製し、樹立を試みる。

引用文献

- 1) Bodine SC et al: Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science 294(5547):1704-8, 2001.
- 2) Gomes MD et al: Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(25):14440-5, 2001.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

Watanabe M, Saeki Y, Takahashi H, Ohtake F, Yoshida Y, Kasuga Y, Kondo K, Yaguchi H, Suzuki M, Ishida H, Tanaka K and Hatakeyama S: A substrate-trapping strategy to find E3 ubiquitin ligase substrates identifies Parkin and TRIM28 targets, Commun. Biol., 3, 592, 2020.

[口頭発表]

無し

[ポスター発表]

Watanabe M: A substrate-trapping strategy to find E3 ubiquitin ligase substrates.  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on the Ubiquitin Family, Cold Spring Harbor,  
New York, USA, April 27-30, 2021

渡部 昌, 畠山鎮次, TRIM28 はサイクリン A2 のユビキチン化を介し S 期への早期進行を  
抑制する, 第 94 回日本生化学会大会, 2021 年 11 月 3-5 日

渡部 昌, 畠山鎮次, 基質トラップ戦略によるユビキチンリガーゼ Parkin、TRIM28 の網羅  
的な基質同定, 第 44 回日本分子生物学会年会, 2021 年 12 月 1-3 日

[その他]

無し