

骨格筋萎縮過程における代謝物質の 網羅解析および代謝特性の解明

東 北 大 学 北 嶋 康 雄
(共同研究者) 同 永 富 良 一

Metabolome Analysis of Muscle Atrophy

by

Yasuo Kitajima, Ryoichi Nagatomi
Tohoku university

ABSTRACT

It is known that muscle mass is determined by the balance between protein synthesis and protein degradation. The ubiquitin-proteasome pathway is a major route of protein degradation. Recently, we reported that the muscle-specific deletion of a crucial proteasomal gene, Rpt3, in mice induced the muscle loss in mice. The purpose of present study was to clarify the metabolomic profile in skeletal muscle of muscle-specific proteasome dysfunction mice.

We crossed the Rpt3 floxed mice with a transgenic line expressing Cre recombinase under the control of a myosin light chain 1 fast promoter to generate muscle-specific Rpt3-knockout mice (KO mice). We evaluated the metabolomic profile in the skeletal muscle of control mice and KO mice by using the metabolome analysis.

The appearance of skeletal muscle of KO mice was distinct from those of control mice. The absolute weights of the tibialis anterior, gastrocnemius and soleus muscles were smaller in KO mice ($p < 0.05$). In the metabolome analyses of the 112 metabolites, 64 metabolites were significance in skeletal muscle of KO mice compared to control mice ($p < 0.05$). These results suggest that muscle-specific proteasome dysfunction may

induce metabolic disorders in the skeletal muscle. These findings will contribute to further clarify the molecular mechanisms of muscle atrophy.

要 旨

骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスによって決定されている。最近、筆者らは主の分解系で欠かせないプロテアソームの骨格筋特異的な欠損マウスは筋萎縮を呈したことを報告した。骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスは、分解系不全により、代謝異常を起こし、筋萎縮に至ったとの仮説を立てた。仮説検証のために、骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスの骨格筋を対象に、メタボローム解析により、筋萎縮時の代謝データを網羅的に把握することを目的とした。

骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスは、Mlc1 (myosin light chain 1) Cre とプロテアソーム必須の分子である Rpt3 floxed マウスの交配によって作出した。骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスとコントロールマウスの骨格筋を対象にメタボローム解析を行った。

骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスの腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋は、コントロールマウスのそれらと比較して、有意に小さい値を示した ($p < 0.05$)。メタボローム解析では、コントロールマウスと骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスの比較により、検出できた112個のうち64個の代謝物が有意な差を示した ($p < 0.05$)。以上のことから、骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスでは、骨格筋の代謝異常が起きている可能性が示唆された。今後は、得られた網羅データを元に個々の代謝物の検証が必要である。

諸 言

我が国は未体験の超高齢社会に突入している。ますます進行する高齢化社会において、サルコペ

ニア（加齢に伴う筋萎縮）に伴う運動機能低下が多くの要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。これにより、高齢化に伴う筋萎縮予防は喫緊の課題であり、筋萎縮の分子機構の解明が求められている。

生体内の主要なタンパク分解系としては、ユビキチンプロテアソーム系が挙げられる¹⁾。筋萎縮は分解系の亢進により起こると考えられる。例えば、ラットの筋萎縮モデルで発見されたE3ユビキチンライゲースのMAFbxを筋管細胞で過剰発現させると筋管細胞が萎縮する²⁾。プロテアソームは真核生物の細胞において細胞質および核内のいずれにも分布しており³⁾、ATPを必要とするエネルギー依存性のタンパク質分解である。プロテアソームは26Sプロテアソームとよばれ⁴⁾、66のサブユニットから構成される巨大な複合体である。26Sプロテアソームはプロテアーゼ活性を有する20Sプロテアソームの両端に19S調節因子(19S regulatory particle)が会合したものである。19Sの基部はRpt1-6とRpn1-2の8つのATPaseサブユニットで構成される⁵⁾。19Sプロテアソームの構成分子であるRpt3の全身欠損では胎生致死になるため⁶⁾、Rpt3分子は生存に必須の分子と考えられる。

最近、筆者らは、骨格筋におけるプロテアソームの役割を明らかにするために、骨格筋特異的なプロテアソーム欠損を起こすことのできる遺伝子欠損マウスによる研究を報告した⁷⁾。骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスでは、若齢時期でのプロテアソーム活性の有意な抑制を示した。驚くことに、骨格筋は分解系の抑制により筋肥大するのではなく、むしろ筋萎縮を起こした。また、筋力減少および分解系不全による異常タンパク質の

蓄積も確認した。これらの結果により、プロテアソームによる適切なタンパク分解は、むしろ筋量維持に必須であることを報告した⁷⁾。筆者らの作出した骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスは、骨格筋におけるプロテアソームの役割を詳細に検討できる有用なツールであり、これによる検討は、将来的に筋萎縮の分子機構の解明につながると考えている。

骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスでは、筋萎縮を呈した。プロテアソームは主の分解系機構のため、不要なタンパク質を分解すると同時に新たなタンパク質を作る材料を分解物から供給しているとの側面も担っていると考えられる。つまり、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスが筋萎縮したのは、分解系不全のため、骨格筋において代謝異常を起こしているとの仮説を立てた。これらの代謝物を網羅的に把握できれば筋萎縮分子機構の解明につながると考え、筆者らはメタボローム解析を計画した。メタボローム解析とは、アミノ酸などを含む代謝物質を網羅的に把握することができる手法である。代謝物を網羅的に把握することのできるメタボローム解析の手法を取り入れて、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスの筋萎縮時の代謝物を網羅的に把握する。

本研究では、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスは、骨格筋において代謝異常を起こしているとの仮説を検証する。そこで骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスを用いて、全代謝物質のメタボローム解析により、筋萎縮時の代謝データを網羅的に把握することを目的とする。これらは、筋萎縮分子機構の解明のための基礎的な情報になる。

1. 研究方法

本研究は、東北大学遺伝子組換え実験安全管理規程（課題名「筋特異的プロテアソーム欠損動物を用いた表現型の解析」）および国立大学法人東

北大学における動物実験等に関する規程（課題名「筋特異的プロテアソーム欠損動物を用いた表現型の解析」）に承認され遵守して行われた。

1. 1 実験動物

Rpt3 flox/flox (Rpt3 f/f) マウスは共同研究先の京都大学より供与された⁸⁾。Rpt3 f/f マウスとMlcl1f (myosin light chain 1 fast promoter) Cre マウス⁹⁾との交配を行い、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスを作出した⁷⁾。すべてのマウスは、東北大学動物実験指針が遵守された環境下で、東北大学動物実験施設において、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。本研究で作出したすべての実験動物は麻酔下で頸椎脱臼による安楽死を行い、腓腹筋、前脛骨筋、ひらめ筋のサンプルを用いて実験を行った。

1. 2 組織学的検討

すべての実験においてサンプリング時にマウスの腓腹筋、前脛骨筋、ひらめ筋の重量を測定した。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℃下で10μm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℃で保存した。保存切片は室温で解凍後に、4%Paraform Aldehyde (PFA) / PBS, 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 laminin (Sigma Aldrich, Poole, UK) と4℃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。染色した切片は、共焦点レーザー

顕微鏡システム C2si (Nikon, 東京) と蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) で観察した。

1. 3 骨格筋からの水溶性代謝物抽出方法

マウスから採取した骨格筋に対して、内部標準物質として $50 \mu\text{mol/L}$ のメチオニンスルホンとカンファー-10-スルホン酸 (CSA) を含むアセトニトリル $1500 \mu\text{L}$ を添加し、冷却下にて卓上型破碎装置を用いて破碎した。組織破碎後、溶液を $2300 \times g$ で5分間遠心分離し、分離した水層 $400 \mu\text{L}$ を限外ろ過フィルター (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社) 2本に添加し、遠心ろ過によりタンパク質を除去した。ろ液を減圧乾燥し、 $25 \mu\text{L}$ 超純水で再溶解した溶液で質量分析を行った。

1. 4 質量分析

抽出した陽イオン代謝物は溶融シリカキャピラリー (内径 $50 \mu\text{m}$, 全長 80cm) と市販のカチオン電気泳動バッファ (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社) を用いて電気泳動した。溶融シリカキャピラリーに陽イオン代謝物は 50mbar , 10秒をかけて注入した後 27kV の電圧を印加した。大気圧イオン化法-質量分析 (ESI-MS) により陽イオンを生成し、加熱したドライガスは 5psi 毎分の流量に制御した。その後キャピラリー電圧として 4kV を印加した。分析部では m/z 50 - 1000 の範囲をスキャンして測定データとした。

一方、抽出した陰イオン代謝物は溶融シリカキャピラリー ($50 \mu\text{M}$ 内径, 全長 80cm) と市販のアニオン電気泳動バッファ (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社) を用いて電気泳動した。溶融シリカキャピラリーに陰イオン代謝物は 50mbar , 25秒をかけて注入した後 30kV の電圧印加をしつつ 10psi の圧力で押すことで電気泳動による分離とイオン源までの泳動を補助した。大気圧イオン化法-質量分析 (ESI-MS)

により陰イオンを生成し、加熱したドライガスは 5psi 毎分の流量に制御した。その後キャピラリー電圧として 3.5kV を印加した。分析部では m/z 50 - 1000 の範囲をスキャンして測定データとした。

CE-TOFMS で得られたデータは Keio MasterHands (慶應メタボロームコンソーシアム) を用いて解析した¹⁰⁾。得られたピークは同位体分子種や付加イオン、既知代謝物由来のプロダクトイオンを含んでいるため、標準物質と一致したピークを抽出した後、抽出したピークの保持時間 (MT) をサンプルに混合したメチオニンスルホンと CSA の MT を用いて補正した。その後補正した MT と m/z を用いて全てのピークをアライメントした。最後にピークの面積値を陽イオン代謝物の解析にはメチオニンスルホンで、陰イオン代謝物の解析には CSA でそれぞれ補正した。得られた補正後の面積値をサンプル容量で補正した。CE-TOFMS で検出したピークに代謝物名を付与するための代謝物リストは、CE-TOFMS の標準物質混合液 (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社) を用い、標準物質それぞれの m/z と MT を用いて検出したピークに代謝物名を付与した。

1. 5 統計処理

データはすべて平均値 \pm 標準偏差で表した。2群間の平均値の比較には、スチューデントの t 検定を用いた。統計学的有意差は 5% 未満をもって有意とした。

2. 結果

コントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスの腓腹筋、前脛骨筋、ひらめ筋の実際の写真を図 1 に、各々の骨格筋の筋重量を図 2 に示した。腓腹筋の筋重量は、コントロールマウス ($146.0 \pm 18.8 \text{mg}$) と比較して、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスでは ($33.6 \pm$

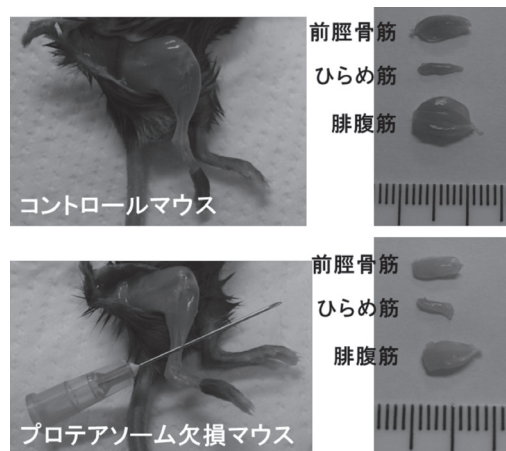


図1 骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスの骨格筋の大きさの違い

13.5mg), 有意に小さい値を示した ($p < 0.01$, 図2). また, 前脛骨筋の筋重量では, コントロールマウス ($45.3 \pm 4.4\text{mg}$) と比較して, 骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスでは ($12.7 \pm 9.1\text{mg}$), 有意に小さい値を示した ($p < 0.01$, 図2). さらに, ひらめ筋の筋重量は, コントロールマウス ($8.1 \pm 0.3\text{mg}$) と比較して, 骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスでは ($5.2 \pm 1.8\text{mg}$), 有意に小さい値を示した ($p < 0.01$, 図2). 骨格筋萎縮の組織学的な評価を行うため, laminin 抗体を用いて筋横断面の蛍光免疫組織化学染色を行った (図3). コントロールマウスと比較して, 骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスでは, 1つ1つの筋線維

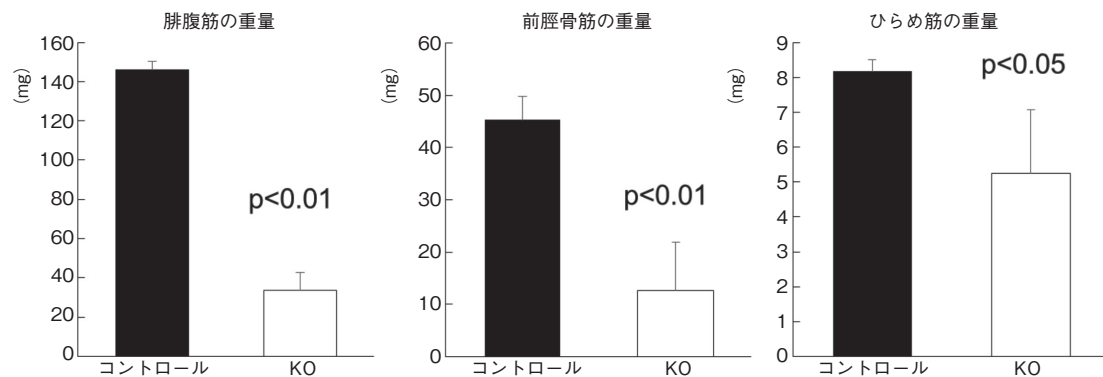


図2 コントロールマウス(コントロール)と骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウス(KO)の骨格筋の重量比較(それぞれn=4)

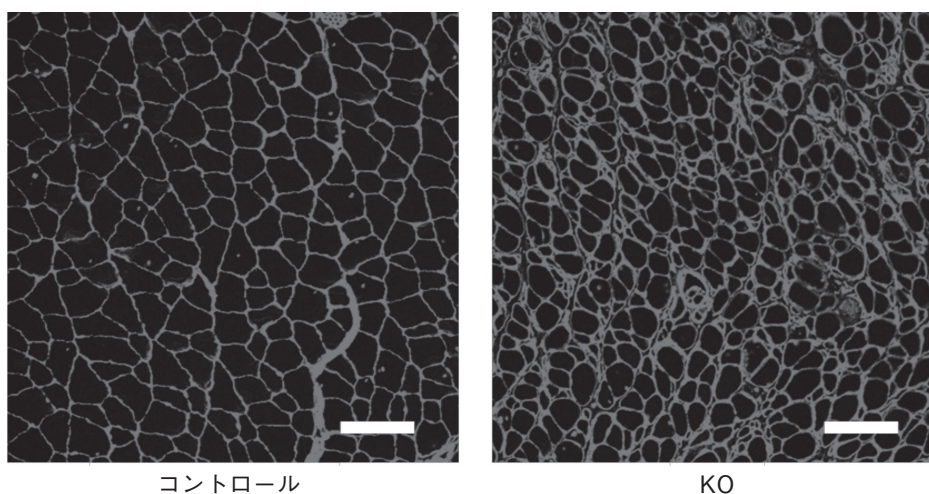


図3 コントロールマウス(コントロール)と骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウス(KO)の骨格筋の横断面を用いたlaminin抗体による免疫染色 (Bar:100 μ m)

表1 メタボローム解析による解析対象の代謝物

アニオンモード	カチオンモード
Glycolic acid	Gly
Lactic acid	Putrescine
Lactic acid_m1	beta-Ala
3-Hydroxybutyric acid	Ala
2-Hydroxybutyric acid	Ala_m1
Fumaric acid	Sarcosine
2-Oxoisovaleric acid	GABA
2-Phosphoglyceric acid	N,N-Dimethylglycine
Citric acid	Choline
Isocitric acid	Ser
Gluconic acid	Cytosine
Ribose 5-phosphate	Uracil
Glucose 6-phosphate	Creatinine
Fructose 6-phosphate	Pro
Glucose 1-phosphate	Val
6-Phosphogluconic acid	Betaine
CMP	Homoserine
UMP	Thr
cAMP	Betaine aldehyde_+H2O
Fructose 1,6-diphosphate	Cys
cGMP	Thymine
IMP	Hydroxyproline
GMP	Creatine
PRPP	Creatine_m1
dTDP	Ile
UDP	Leu
Acetyl CoA_divalent	Asn
ADP	Ornithine
CTP	Asp
ATP	Adenine
GTP	Hypoxanthine
NAD+	Anthranilic acid
NADP+	Tyramine
Succinic acid	Spermidine
Malic acid	Gln
Phosphoenolpyruvic acid	Gln_m1
Dihydroxyacetone phosphate	Lys
Glycerol 3-phosphate	Lys_m1
cis-Aconitic acid	Glu
3-Phosphoglyceric acid	Glu_m1
Sedoheptulose 7-phosphate	Met
dTMP	Guanine
AMP	His
CDP	Phe
Malonyl CoA_divalent	Arg
GDP	Arg_m1
dCTP	Citrulline
dTTP	Tyr
UTP	Spermine
dATP	Trp
Glyoxylic acid	Carnosine
Pyruvic acid	Thymidine
2-Oxoglutaric acid	Cytidine
Glyceraldehyde 3-phosphate	Uridine
Erythrose 4-phosphate	Adenosine
Ribulose 5-phosphate	Inosine
CoA_divalent	Guanosine
2-Hydroxyglutaric acid	Glutathione(GSSG)_divalent
Cysteinesulfinic acid	Glutathione(GSH)
Cysteic acid	S-Adenosylmethionine
NADH	Cysteamine
NADPH_divalent	Homocysteine
Biotin	Cys-Gly
FAD_divalent	Cystathionine
3-Indoxylsulfuric acid	Cystine
	gamma-Glu-Cys
	S-Lactoylglutathione
	S-Adenosylhomocysteine
	hmGSH

が小さかった。

メタボローム解析は、アニオンモードとカチオンモードの2つの方法で行われた。アニオンモードでは65個、カチオンモードでは69個の代謝物質の検出を行った(表1)。アニオンモードでは、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスとコントロールマウスで有意に差がでた物質は26個であり、検出限界未満のため検出不可能であった物質が15個であった(表2)。カチオンモードでは、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスとコントロールマウスで有意に差がでた物質は38個であり、検出限界未満のため検出不可能であった物質は7個であった(表2)。

表2 UV-visible absorption spectra of

	アニオンモード	カチオンモード
有意差あり (p < 0.05)	26	38
有意差なし	24	24
検出できず	15	7
合計	65	69

3. 考察

本研究は、生体内の主のタンパク分解系であるプロテアソームを骨格筋特異的に欠損させたマウスによる代謝変化を、メタボローム解析により網羅的に把握することを目的とした。これにより、筋萎縮の分子機構解明のための基礎的な情報を得ることができると考えた。メタボローム解析では、コントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスの比較により、検出できた112個のうち64個の代謝物が有意な差を示した。これにより、骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスでは、骨格筋において分解系不全のため代謝異常を起しているという可能性が示唆された。

本研究では、筆者らが報告した骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスを用いた⁷⁾。これまでの先行研究において、Rpt3の全身欠損マウスは胎生致死になることが報告されており、全身では生

存に必須の分子であると考えられる⁶⁾。例えば、これまでにパーキンソン病患者において Rpt3 のイントロン 5 の遺伝子変異が報告されており、先行研究においてもプロテアソーム構成要素である Rpt3 が特に重要であることが示唆されていた¹¹⁾。さらに近年、神経特異的な Rpt3 欠損マウスを作出した報告があり⁸⁾、これにより神経特異的な Rpt3 欠損マウスは筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と類似した表現系を示したことが明らかになった。以上により骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスの作出を試みる際に、先行研究により重要であると示唆されている Rpt3 の分子をターゲットにした骨格筋特異的な Rpt3 欠損マウスの作出によりプロテアソームの役割解明に最適だと考えた。

骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスでは、速筋線維が主であるひらめ筋に比べて、速筋線維が主である腓腹筋、前脛骨筋の方が、筋萎縮がより重度であった。これは Cre マウスに依存していると考えられる。Mlc1 は特に腓腹筋、前脛骨筋といった速筋線維割合が多い骨格筋での発現が確認されている⁹⁾。そのため本研究で作出された骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスは骨格筋の中でも特に速筋線維により構成されている前脛骨筋や腓腹筋での表現系が重度であったと考えられる。

本研究ではメタボローム解析により、骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスとコントロールマウスの代謝物を網羅的に把握できた。これは、筋萎縮過程の代謝特性理解のための基礎的情報になる。分解系の関わる筋萎縮の分子機構の解明のために、得られた網羅データを個々に検証していくことが今後の検討課題となる。

4. 結 論

本研究では、骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスを用いて、全代謝物質のメタボローム解析

により、代謝データを網羅的に把握した。これにより骨格筋特異的なプロテアソーム欠損マウスの骨格筋では代謝異常が起きている可能性を示唆した。筋萎縮分子機構の解明のためには、今後は、得られた網羅データを元に個々の代謝物の検証が必要である。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり多大なご協力を頂いた東北大学医学系研究科宇留野晃先生、松山由香先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Braun T., Gautel M., Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 12(6) :349-61(2011)
- 2) Bodine S.C., Latres E., Baumhueter S., Lai V.K., Nunez L., Clarke B.A., Poueymirou W.T., Panaro F.J., Na E., Dharmarajan K. et al., Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.*, 294 (5547) :1704-8(2001)
- 3) Peters J.M., Franke W.W., Kleinschmidt J.A., Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 269(10) :7709-18 (1994)
- 4) Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A.L., Welch W.J., Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature.*, 331 (6152) :192-4 (1988)
- 5) Glickman M.H., Rubin D.M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V.A., Finley D., A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.*, 94 (5) :615-23(1998)
- 6) Sakao Y., Kawai T., Takeuchi O., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Takeda K., Akira S.,

- Mouse proteasomal ATPases Psmc3 and Psmc4: Genomic organization and gene targeting. *Genomics.*, **67**(1) :1-7(2000)
- 7) Kitajima Y., Tashiro Y., Suzuki N., Warita H., Kato M., Tateyama M., Ando R., Izumi R., Yamazaki M., Abe M. et al., Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J. Cell. Sci.*, **127**(Pt 24) :5204-17(2014)
- 8) Tashiro Y., Urushitani M., Inoue H., Koike M., Uchiyama Y., Komatsu M., Tanaka K., Yamazaki M., Abe M., Misawa H. et al., Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.*, **287**(51) :42984-94(2012)
- 9) Bothe G.W., Haspel J.A., Smith C.L., Wiener H.H., Burden S.J., Selective expression of Cre recombinase in skeletal muscle fibers. *Genesis.*, **26**(2) :165-6(2000)
- 10) Sugimoto M., Wong D.T., Hirayama A., Soga T., Tomita M., Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics.*, **6**(1) :78-95(2010)
- 11) Marx F.P., Soehn A.S., Berg D., Melle C., Schiesling C., Lang M., Kautzmann S., Strauss K.M., Franck T., Engelender S. et al., The proteasomal subunit S6 ATPase is a novel synphilin-1 interacting protein--implications for Parkinson's disease. *FASEB J.*, **21**(8) :1759-67(2007)