骨格筋におけるタンパク質分解系が運動機能に与える影響

東　北　大　学　　長　名　シオン
（共同研究者）長　崎　大　学　　北　嶋　康　雄
東　北　大　学　　布　宮　亜　樹

The Role of Proteasome System of Skeletal Muscle in Endurance Exercise

by

Shion Osana, Aki Nunomiya
Tohoku university
Yasuo Kitajima
Yasuo Kitajima Nagasaki university

ABSTRACT

Ubiquitin-proteasome system is known as a major proteolysis in skeletal muscle. Previous studies suggested that proteasome is important to homeostasis of skeletal muscle. However, the role of proteasome during exercise has not been elucidated yet. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the role of proteasome in skeletal muscle during endurance exercise, and hypothesized that skeletal muscle specific proteasome gene knock out mice have lower ability of endurance exercise than control mice.

As a result of endurance exercise test, skeletal muscle-specific proteasome gene knock out mice showed significant decrease in running time compared with control mice. These findings suggested that proteasome in skeletal muscle might contribute to endurance exercise. The role of proteasome during endurance exercise needs to be further examined.

要　旨

骨格筋における主要なタンパク質分解としてユビキチン・プロテアソーム系が知られている．先行研究によりプロテアソームは骨格筋の恒常性を維持するために働くことが示唆されている．しかしながら運動におけるプロテアソームの役割はいまだに解明できていない．そこで本研究では，持久性運動に対する骨格筋におけるプロテアソームの役割を解明することを目的とし，骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスはコントロールマウスと比較して持久性運動能力が低下するとの仮説を立てた．

持久性運動能力テストの結果，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は有意な走行時間の低下を示した．このことから，骨格筋におけるプロテアソームは持久性運動に寄与することが示唆された．今後は持久性運動に対してプロテアソームが果たすより詳細な役割を明らかにする必要がある．

緒　言

骨格筋における主要なタンパク質分解メカニズムの一つとしてユビキチン・プロテアソーム系が知られている[1)]．プロテアソームは33種類66個のサブユニットから構成されており，約2.5MDaという巨大なタンパク質複合体であり，分解に至るプロセスは複数のプロテアソーム関連タンパク質が協調的に働くことで機能している．ユビキチンはATP依存的にユビキチン活性化酵素E1と結合した後，ユビキチン結合酵素E2に引き渡され，ユビキチンの活性化が生じる．活性化したユビキチンはユビキチンリガーゼE3に引き渡されて複合体を形成し，分解の標的タンパク質にユビキチンが受け渡され，ユビキチン化タンパク質が形成される（ユビキチン反応）．このユビキチン反応が繰り返し起こることで，ポリユビキチン化タンパク質が形成され，分解の目印形成が完了する．分解が行われる26Sプロテアソームは，プロテアーゼ活性を持つ20Sプロテアソームとその両端に存在し，標的タンパク質を分解に導く19Sプロテアソームが会合したものである．この26Sプロテアソームにポリユビキチン化タンパク質が運び込まれる事で標的タンパク質の分解が行われる[2)]．萎縮した骨格筋では骨格筋特異的に発現するユビキチンリガーゼE3であるMuRF1やatrogin1といったプロテアソーム関連タンパク質の発現が亢進することや，*atrogin1*を筋管細胞に過剰発現させると筋管細胞の萎縮が見られること，遺伝子改変技術を用いた解析により，骨格筋特異的にプロテアソームタンパク質を欠損させたマウスでは野生型マウスに比べて骨格筋の量と機能が低下することから，プロテアソームは骨格筋の恒常性を維持するために重要な働きがあることが考えられる[3-6)]．

骨格筋機能を維持・増進するためにレジスタンス運動や持久性運動といった運動療法が多く行われており，骨格筋の肥大や骨格筋機能の増大が多く報告されている[7,8)]．特に持久性運動後にはプロテアソームに関連する遺伝子発現が亢進することから持久性運動にはプロテアソームの働きが重要であることが示唆されている[9)]．しかしながら，これまでに遺伝子改変マウスを用いた解析は行われておらず，持久性運動におけるプロテアソームの役割はいまだに解明できていない．そこで本研究では，持久性運動に対する骨格筋におけるプロテアソームの役割を解明することを目的とし，骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウス（Hetero）ではコントロールマウス（Control）と比べて持久性運動能力が低下するとの仮説を立て，以下の研究を実施した．

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，これらを遵守して全ての実験を行った．

１．１　実験動物

プロテアソーム構成遺伝子の一つである *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[10)]．*Rpt3* f/f マウスと Mlc1f（myosin light chain 1 fast promoter）Cre[11)] マウスとの交配を行い，骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウス（Hetero）を作出した[6)]．

１．２　飼育条件

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．

１．３　検体採取

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，ヒラメ筋のサンプルを用いて実験を行った．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，採取した骨格筋の筋湿重量を微量重量計で素早く計測した．重量測定後，組織染色とウエスタンブロット，定量 PCR に使用した．組織染色用のサンプルは液体窒素で冷やしたメチルブタンで急速冷凍させ，薄切後に 4% パラフォルムアルデヒド溶液（PFA）で固定し使用した．ウエスタンブロット及び定量 PCR 用のサンプルは液体窒素にて急速冷凍後，ウエスタンブロット及び定量 PCR 用の溶液に懸濁し使用した．

１．４　持久性運動能力テスト

8 ～ 12 週齢のコントロールマウス（Control）と骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウス（Hetero）に小動物用トレッドミルを用いた持久性運動能力テストを実施した．トレッドミルに慣れてもらうため計測の前日に 10 m/min の速度で 10 分間走行させた．持久性運動能力テストは傾斜 10 度の条件下で 10 m/min の速度で 10 分間走行させた後，15 m/min の速度で走行させ，マウスが疲労困憊状態になるまでの走行時間を計測した[12)]．計測を終了した時点から 30 分後に１．３の手順通りに検体採取を行った．なお，テスト中にマウスに異常が発生した場合は直ちに計測実験を中止した．

１．５　免疫組織染色法

サンプルを 10 μm の厚さで薄切し，4% PFA で固定処理した．5％ヤギ血清を含む Tris Buffered Saline with Tueen 20（TBST）でブロッキングしたのち，評価するタンパク質を標識する一次抗体と反応させた．一次抗体には抗 laminin 抗体（sigma 社）を使用した．一次抗体と反応後，それぞれの一次抗体に対応した蛍光標識の二次抗体（Goat anti-Rabbit IgG）と反応させた．染色した組織は顕微鏡下で観察後に撮影し，保存した．

１．６　ウエスタンブロット法

サンプルをタンパク質抽出溶液に懸濁し，遠心分離後の可溶化タンパク質を使用した．タンパク質濃度を調整後，ポリアクリルアミドゲル（ATTO 社）で電気泳動することでタンパク質を分離した．タンパク質濃度は BCA タンパク質アッセイ法（Thermo 社）にて測定した．ポリアクリルアミドゲル濃度は標的とするタンパクの分子量に合わせ，5 ～ 20％のものを使用した．ゲルに 20 μg のタンパク質をロードしタンパク質が十分に分離されるまで泳動した．泳動後 Poly Vinylidene Di

Fluoride（PVDF）メンブレンに転写し，4% スキムミルクを含む TBST にてブロッキングした後，評価するタンパク質を標識する一次抗体と反応させた．一次抗体には，抗 Ubiquitin 抗体（CST 社）を使用した．また，内因性コントロールとして GAPDH（CST 社）を使用した．一次抗体と反応後，それぞれの一次抗体に対応した Horse radish peroxidase（HRP）標識の二次抗体とメンブレンを反応させ化学発光検出試薬にて発色しイメージアナライザー（ChemiDocMP システム，Bio-Rad 社）で観察した．

1．7　定量 PCR 法

抽出液を用いてサンプルを破砕し，核酸回収用多孔質フィルターに Total RNA を吸着させ，洗浄後に RNA を抽出した．ゲノム DNA を除去し，cDNA を合成し, 定量 PCR に使用した（QIAGEN 社）．インターカレーター法により mRNA の増幅を計測し，内因性コントロールとして β-actin を使用した（Step One Plus, Thermo 社）．プライマーは *Rpt3*: F-ACCTCAGACCAGAAGCCAGA, R-CACCACACGGATAAATGCAG, β-actin: F-CGGTTTTGCTGGAGATGATG, R-CGTGCTCAATGGGGTATTTG を用いた．

1．8　統計処理

データはすべて平均値 ± 標準誤差で表した．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．実験結果

2．1　*Rpt3* 発現およびユビキチン化タンパク質

定量 PCR 法により *Rpt3* の発現を確認したところ，コントロールマウスと比べて骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスでは *Rpt3* の発現が有意に減少していた（$p<0.01$, 図 1A）．また，ウエスタンブロット法によりユビキチン化タンパク質の蓄積を確認したところ，コントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスとの間には有意な差は認められなかった（図 1B）．

2．2　体重・筋重量

体重量，骨格筋量（腓腹筋，前脛骨筋，ヒラメ筋）はコントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスの間に有意な差は認められなかった（図 2A-D）．組織学的な評価のために laminin 抗体を用いて筋断面の蛍光免疫組織化学染色を行なった．コントロールマウスと骨格

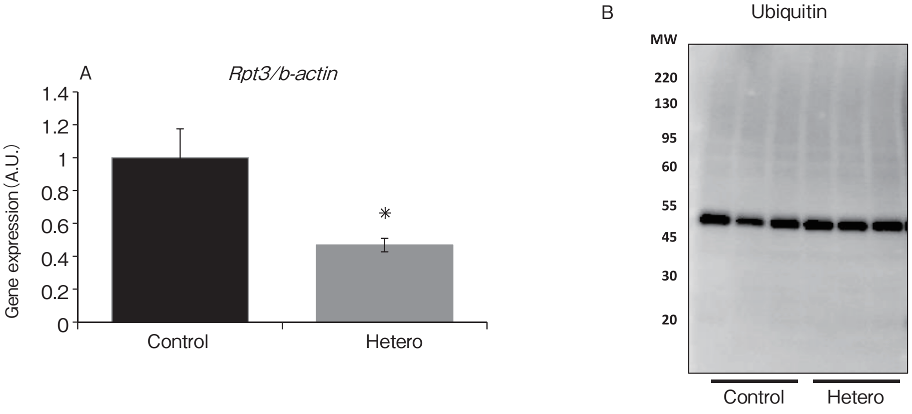

図 1　コントロールマウス（Control）およびプロテアソーム欠損マウス（Hetero）の前脛骨筋における遺伝子発現とユビキチン化タンパク質の蓄積

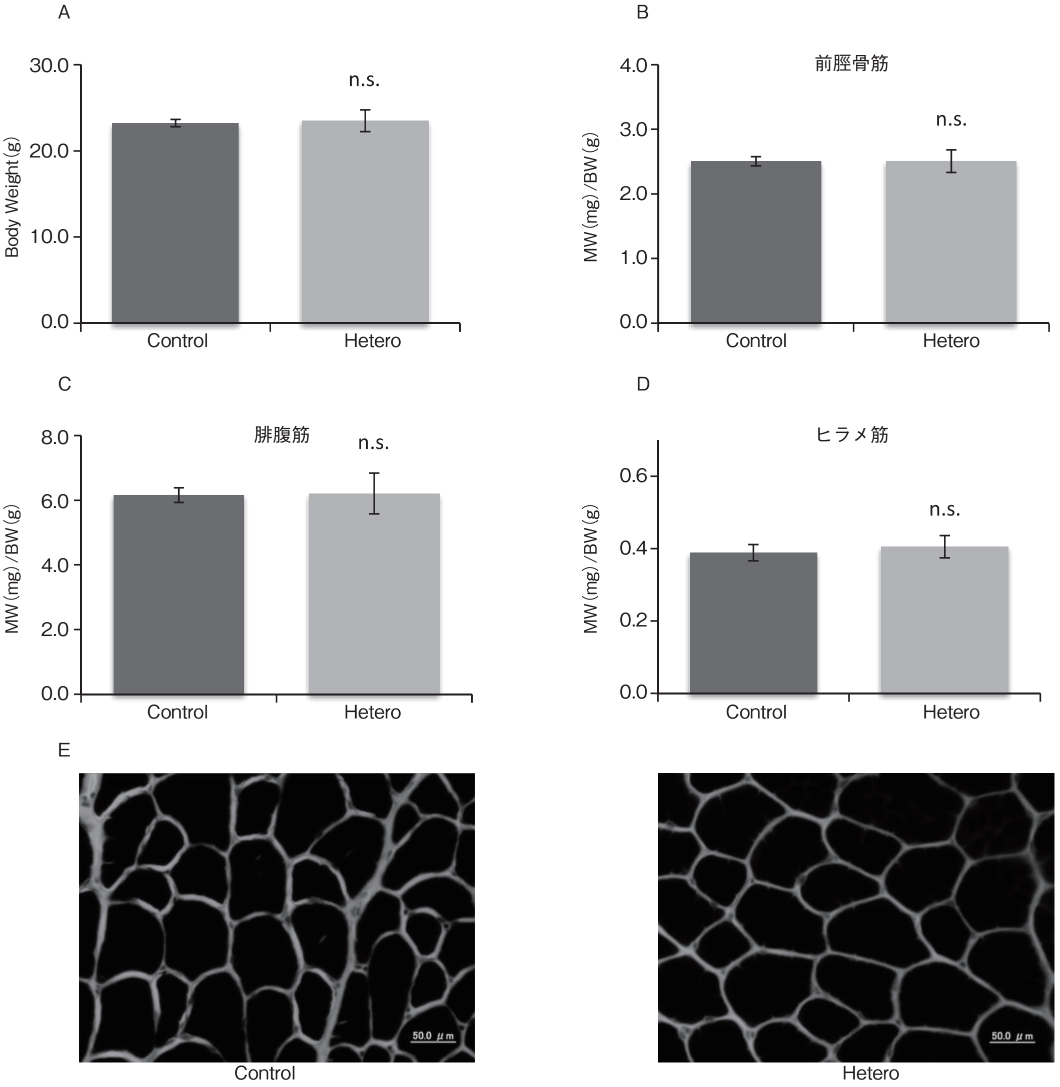

図2　コントロールマウスおよびプロテアソーム欠損マウスにおける体重と体重あたりの筋湿重量(前脛骨筋, 腓腹筋, ヒラメ筋)と染色画像(前脛骨筋)

筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスにおける筋断面積に差は認められなかった（図 2E）.

2. 3　持久性運動能力テスト

本研究では Olfert らの先行研究[12] を参考に運動試験を行い，マウスが疲労困憊になるまでの総走行時間を測定した（図 3A）. その結果，コント

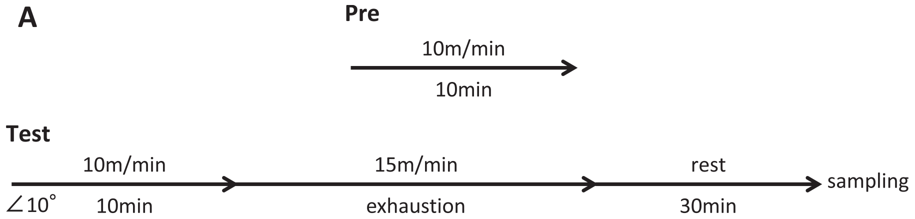

図3A　持久性運動能力テストのプロトコル

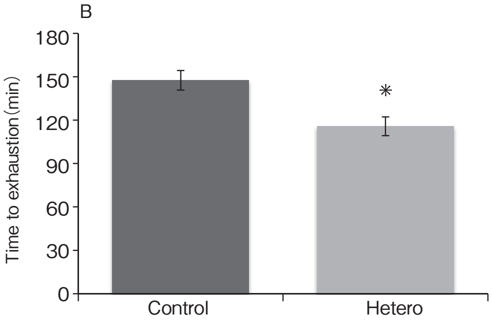

図3B　持久性運動能力テストの測定結果

ロールマウスと比べて骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスでは総走行時間が有意に減少することが認められた（$p<0.05$, 図3B）.

2. 4　持久性運動後のユビキチン化タンパク質

ウエスタンブロット法によりユビキチン化タンパク質の蓄積を確認したところ，コントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスとの間には有意な差は認められなかったが，骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスで高い値を示した（図4）.

3. 考　察

本研究では，持久性運動に対してプロテアソームが果たす役割を明らかにするために，骨格筋特異的プロテアソーム欠損マウスを用いて持久性運動能力テストを行った.

本研究で用いた骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスではプロテソーム構成遺伝子の一つである *Rpt3* 遺伝子の発現が有意に減少していたことが確認できたが，コントロールマウスと比較してユビキチン化タンパク質の蓄積は認められなかった．このことから正常飼育下では，骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスではプロテアソームによるタンパク質分解は正常に行われていることが示唆された．今後はプロテアソームによる分解機能測定などのさらなる解析が求められる.

体重量と筋湿重量はコントロールマウスと骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスの間で有意な差は認められなかった．先行研究によると骨格筋特異的 *Rpt3* 遺伝子完全欠損マウスでは重篤な筋萎縮が引き起こされ，筋組織中にはユビキチン化タンパク質が異常に蓄積していたことが報告されている[6]．本研究で用いた骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスではこのような筋萎縮は観察されておらず，ユビキチン化タンパク質の異常蓄積も観察されなかった．このことから本研究で用いた骨格筋特異的プロテアソーム遺伝

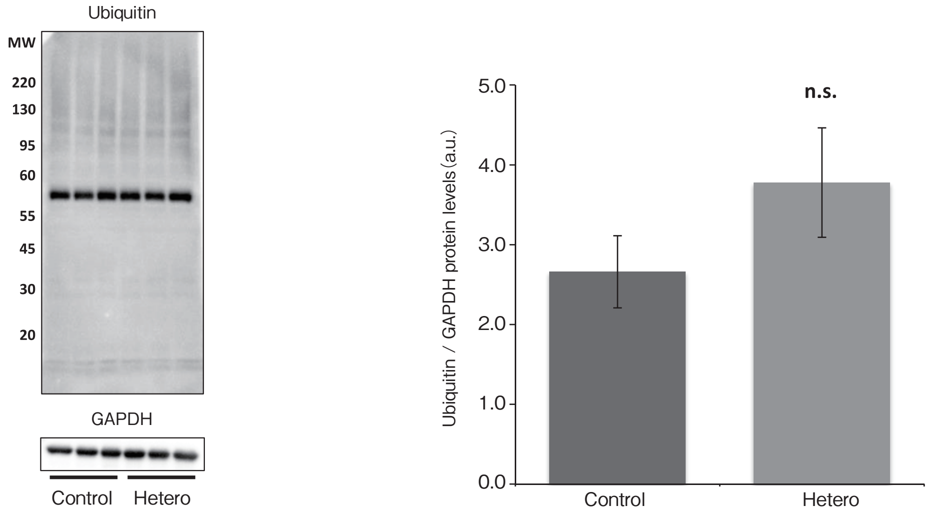

図4　持久性運動能力テスト後の前脛骨筋におけるユビキチン化タンパク質の蓄積

子欠損マウスではプロテアソーム遺伝子は抑制された状態であるが，筋組織の恒常性を維持させることが可能であり，正常飼育条件下では体重の減少や筋萎縮といった表現系を示さないことが考えられる．

持久性運動能力テストによる総走行時間は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遺伝子欠損マウスにおいて有意に減少した．先行研究では運動後のタンパク質代謝変化に適応するためにユビキチンリガーゼE3である *MuRF1* や *atrogin1* の mRNA 発現量が増加することが示唆されている [9, 13, 14]．このことから持久性運動時にはプロテアソームによる適切なタンパク質分解が必要であり，本研究で用いた骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスでは持久性運動時におけるタンパク質分解が適切に働かなかったことにより総走行時間の減少が生じたのではないかと考えられる．しかしながら，持久性運動後の骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスの筋組織ではユビキチン化タンパク質の蓄積はわずかであり，有意差は認められなかったことから，プロテアソームによるタンパク質分解異常が走行時間の減少につながったとは断定できない．本実験では持久性運動能力テスト終了後30分という１時点でのみユビキチン化タンパク質の蓄積を評価したため，今後は持久性運動時や運動後の継時的な変化を観察していくことが必要であると考えられる．一方で，持久性運動ではアミノ酸代謝によるエネルギー産生が多く行われることが示唆されていることから，アミノ酸も重要なエネルギー源であると考えられている [15, 16]．また，プロテアソームにはタンパク質分解を介したアミノ酸供給機能が示唆されている [17]．以上のことから，骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスでは持久性運動時にプロテアソームによるアミノ酸供給が減少したことによるエネルギー枯渇により総走行時間の低下が起きた可能性も考えられる．今後はプロテアソームによる分解異常だけでなく，アミノ酸などの代謝にも着目することが重要であると考えられる．

4. 結　論

本研究では，持久性運動におけるプロテアソームの役割を明らかにするために，骨格筋特異的プロテアソーム遺伝子欠損マウスを用いて持久性運動能力テストを行った．これにより骨格筋におけるプロテアソームは持久性運動に影響を与えることが示唆された．今後はより詳細なメカニズムの解明に向けた検証が必要である．

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の鈴木直輝先生に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) T. Braun, M. Gautel, “Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 6, 349-361 (2011)
2) M. Schmidt, D. Finley, “Regulation of proteasome activity in health and disease.,” *Biochim. Biophys. acta.*, **1843**, 1, 13-25 (2014)
3) D. Cai, J.D. Frantz, N.E. Tawa, P.A. Melendez, B.C. Oh, H.G.W. Lidov, P.O. Hasselgren, W.R. Frontera, J. Lee, D.J. Glass, S.E. Shoelson, “IKKβ/NF-κB activation causes severe muscle wasting in mice,” *Cell*, **119**, 2, 285-298 (2004)
4) M. Sandri, C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, “Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy,” *Cell*, **117**, 3, 399-412 (2004)
5) S.C. Bodine, V.K. Lai, L. Nunez, B.A. Clarke, “Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy,” *Science.*, **294**, 5547,

1704-1708 (2001)

6) Y. Kitajima, Y. Tashiro, N. Suzuki, H. Warita, M. Kato, M. Tateyama, R. Ando, R. Izumi, M. Yamazaki, M. Abe, K. Sakimura, H. Ito, M. Urushitani, R. Nagatomi, R. Takahashi, M. Aoki, "Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation," *J. Cell Sci.*, 127, 24, 5204-5217 (2014)

7) H.C. Dreyer, S. Fujita, J.G. Cadenas, D.L. Chinkes, E. Volpi, B.B. Rasmussen, "Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle," *J. Physiol.*, 576, 2, 613-624 (2006)

8) A.M. Jones H. Carter, "The Effect of Endurance Training on Parameters of Aerobic Fitness," *Sport. Med.*, 29, 6, 373-386 (2000)

9) R.J. Stefanetti, S. Lamon, M. Wallace, M.H. Vendelbo, A.P. Russell, K. Vissing, "Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 467, 7, 1523-1537 (2015)

10) Y. Tashiro, M. Urushitani, H. Inoue, M. Koike, Y. Uchiyama, M. Komatsu, K. Tanaka, M. Yamazaki, M. Abe, H. Misawa, K. Sakimura, H. Ito, and R. Takahashia, "Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis," *J. Biol. Chem.*, 287, 51, 42984-42994 (2012)

11) G.W. Bothe, J.A. Haspel, C.L. Smith, H.H. Wiener, S.J. Burden, "Selective expression of Cre recombinase in skeletal muscle fibers," *Genesis.*, 26, 2, 165-166 (2000)

12) I.M. Olfert, R.A. Howlett, P.D. Wagner, E.C. Breen, "Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis," AJP: Regulatory, *Integrative and Comparative Physiology.*, 299, 4. pp. R1059-R1067 (2010)

13) E.A. Lysenko, T.F. Vepkhvadze, E.M. Lednev, O.L. Vinogradova, D.V. Popov, "Branched-chain amino acids administration suppresses endurance exercise-related activation of ubiquitin proteasome signaling in trained human skeletal muscle," *J. Physiol. Sci.*, 68, 1, 43-53 (2018)

14) J.M. Dickinson, P.T. Reidy, D.M. Gundermann, M.S. Borack, D.K. Walker, A.C.D'Lugos, E. Volpi, B.B. Rasmussen, "The impact of postexercise essential amino acid ingestion on the ubiquitin proteasome and autophagosomal-lysosomal systems in skeletal muscle of older men," *J. Appl. Physiol.*, 122, 3, 620-630 (2017)

15) G. Falavigna, J.A. de Araújo Junior, M.M. Rogero, I.S. de O. Pires, R.G. Pedrosa, E. Martins Junior, I.A. de Castro, J. Tirapegui, "Effects of diets supplemented with branched-chain amino acids on the performance and fatigue mechanisms of rats submitted to prolonged physical exercise," *Nutrients.*, 4, 11, 1767-1780 (2012)

16) Y. Shimomura, H. Kobayashi, K. Mawatari, K. Akita, A. Inaguma, S. Watanabe, G. Bajotto, J. Sato, "Effects of squat exercise and branched-chain amino acid supplementation on plasma free amino acid concentrations in young women," *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 3, 288-291 (2009)

17) R.M. Vabulas F.U. Hartl, "Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function," *Science.*, 310, 5756, 1960-1963 (2005)