

飢餓ストレスによるオートファジーを利用した 骨格筋量の維持・増進策

滋賀県立大学 中井直也

Approaches for Maintaining and Enhancing of Skeletal Muscle Mass by Starvation-Induced Autophagy

by

Naoya Nakai

*Department of Nutrition, School of Human Culture,
University of Shiga Prefecture*

ABSTRACT

Effect of glucose starvation-induced proteolysis on protein translation initiation in response to glucose restoration was examined in C2C12 myotubes. C2C12 cells were cultured in differentiation medium (DMEM containing 2% horse serum and 25 mM glucose) for 4 days. Differentiated C2C12 cells were further cultured in differentiation medium (HG) or in differentiation medium without glucose (NG) for 24h. Glucose (final concentration at 5.5 mM) was added to the both groups, and cells were collected after 30 min of incubation. The phosphorylation level of p70 S6 kinase (p70S6K), which is the marker for protein translation initiation, was significantly decreased by glucose starvation for 24h. Addition of glucose markedly increased the phosphorylation of p70S6K only in NG group and this phosphorylation level was significantly greater than in HG group. Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 diminished the effect of glucose restoration on the phosphorylation of p70S6K. On the other hand, inhibition of ubiquitin-proteasome activity by MG132 did not affect the phosphorylation of p70S6K in response to glucose restoration. In conclusion, glucose starvation-induced autophagy partially account on the activation of translation initiation by glucose restoration.

要 旨

本研究では、グルコース飢餓による骨格筋細胞のタンパク質分解の亢進が、その後のグルコース再補充によるタンパク質合成の促進に及ぼす影響を検討した。分化4日目のC2C12筋管細胞をグルコース不含の分化誘導培地で24時間培養した(NG群)。通常の分化誘導培地(グルコース濃度:25.0 mM)で培養する群をコントロールとした(HG群)。24時間のグルコース飢餓により、タンパク質合成促進作用の指標となるp70 S6 kinaseのリン酸化は有意に低下した。次に、両群にグルコースを添加し(NG群の最終濃度5.5 mM)、30分後に細胞を回収すると、HG群に比してNG群でp70 S6 kinaseのリン酸化が大きく増加した。オートファジー阻害剤存在下では、グルコースの再補充効果が一部抑制された。一方、プロテアソーム阻害を行ってもグルコースの再補充効果に影響を及ぼさなかった。以上の結果より、C2C12筋管細胞に対する24時間のグルコース飢餓ストレスは、オートファジーを活性化し、その後のグルコース再補充に対してタンパク質合成シグナルの感受性を高めることが明らかとなった。

緒 言

骨格筋量の維持・増進にはタンパク質分解を抑制し、タンパク質合成を高めることが重要であると考えられてきた。しかし、タンパク質分解の異常や減弱は、種々の筋疾患を誘発することが報告されている¹⁻⁴⁾。細胞内の主要なタンパク質分解系には、オートファジー・リソソーム系とユビキチン・プロテアソーム系が存在し、それぞれ30%と70%の割合で不要なタンパク質を分解している。ヒトは1日あたり約70 gのタンパク質を摂取する必要があるが、体内では約180 gのタンパク質を合成し、同等量を分解している。このことは、多くの分解された体タンパク質由来のアミノ酸を

リサイクルしていることを示している。

オートファジー関連遺伝子であるAtg7を欠損したマウスでは、筋萎縮が起こることが示されている²⁾。また、サルコペニアの原因の一つとして筋サテライト細胞のオートファジー機能低下が報告されている³⁾。さらに、骨格筋特異的にユビキチン・プロテアソーム機能を抑制したマウスは筋の成長不全や異常タンパク質の蓄積を引き起こすことが報告されている。これらの先行研究は、適切なタンパク質分解は骨格筋の量および機能に深く関連しており、タンパク質合成を高めるにはタンパク質分解を活性化する必要がある可能性を示唆している。

必須アミノ酸^{5,6)}やグルコース^{7,8)}の枯渇による飢餓ストレスは細胞のオートファジーを活性化する。また、ユビキチン・プロテアソーム系も栄養素の制限⁹⁾によって活性化することが報告されている⁴⁾。我々もこれまでに、グルコース飢餓が骨格筋細胞のオートファジーを活性化することを報告している¹⁰⁾。さらに、グルコース飢餓後のグルコース再補充がタンパク質合成経路を活性化することを見出している。

そこで、本研究では骨格筋細胞を対象としてタンパク質合成促進経路の感受性を高める飢餓ストレス条件、特にグルコース飢餓と再補充の条件を明らかにすることを目的とした。また、飢餓によるタンパク質分解と栄養素の再補充によるタンパク質合成の活性化との関連を検討することによって、骨格筋の維持・増進に新たな提案を行うことを目指した。

1. 研究方法

1. 1 C2C12細胞の培養

マウス筋芽由来の培養細胞であるC2C12細胞を増殖用培地(DMEM, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin)で培養し、80~90%コンフルエンスの時点で、分化誘導培地(DMEM,

2% horse serum, 1% penicillin-streptomycin) に交換した。分化誘導培地で4日間培養し、実験に供した。C2C12筋管細胞を25 mMグルコースを含む分化誘導培地 (HG群) もしくはグルコースを含まない分化誘導培地 (NG群) でさらに24時間培養した。両群に異なる濃度 (2.8, 5.5, 12.0 mM) のグルコースを添加し、30分後に細胞を回収した。また、5.5 mMグルコース添加後、経時的に細胞を回収した。

タンパク質分解系の阻害剤を用いた実験では、HG群とNG群に分ける段階で、オートファジー・リソソーム系の阻害剤であるBafilomycin A1 (終濃度20 nM, Abcam) もしくはユビキチン・プロテアソーム系の阻害剤であるMG132 (終濃度20 μ M, Sigma-Aldrich) を添加した。

1. 2 ウェスタンブロッティング

C2C12筋管細胞は、氷冷 phosphate-buffered saline (PBS) でリンスし、RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology) で回収した。遠心分離 (15,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 10 min) 後の上清を回収し、可溶化した総タンパク質の濃度を測定した。等量の総タンパク質を含む上清を2 \times sample bufferと混和し、95 $^{\circ}$ Cで10分間熱処理し、10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後のゲルはPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜を5% skim milk/Tris-buffered saline containing 0.1% tween 20 (TBST) でブロッキングし、5% ウシ血清アルブミン (BSA) /TBSTで希釈した抗リン酸化p70 S6 kinase (Threonine 389, Cell Signaling Technology) 抗体と一晩4 $^{\circ}$ Cで反応させた。翌日、二次抗体 (Anti-rabbit IgG-HRP) と室温で1時間反応させ、化学発光試薬 (Millipore) を用いて目的のタンパク質を検出した (Image Quant LAS500, GE Healthcare)。検出したシグナルはImage Jを用いて数値化した。

1. 3 ATP濃度の測定

細胞内ATP濃度の測定は、96ウェルプレートで培養したC2C12筋管細胞を対象としてATP測定試薬 (東洋ビーネット) を用いて行った。

1. 4 統計処理

データは平均値 \pm 標準偏差で示した。統計処理は、一元配置の分散分析もしくは、二元配置の分散分析を行った。各群間の比較には、scheffe法を用いた。統計的有意水準は5%未満とした。

2. 結果

2. 1 24時間のグルコース飢餓がグルコース再補充によるタンパク質合成シグナルに及ぼす影響

タンパク質合成シグナルへの影響は、mammalian target of rapamycin (mTOR) の下流に存在し、タンパク質合成促進作用の指標となるp70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化 (Threonine 389) をウェスタンブロッティング法で解析した^{11,12)}。グルコース不含培地で24時間培養したNG群のp70S6Kのリン酸化は、通常の培地で培養したHG群に比して、有意に低下した (図1)。HG群にグルコースを添加してもp70S6Kのリン酸化には変化がなかったが、NG群では再補充に

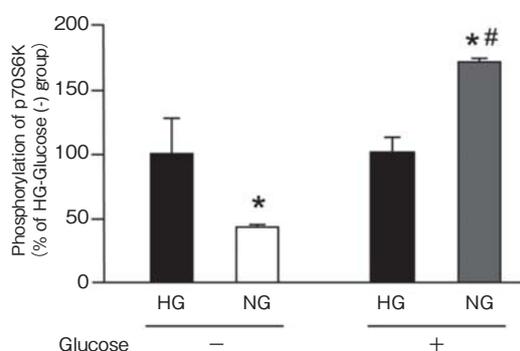


図1 24時間のグルコース飢餓がグルコース再補充によるp70S6Kのリン酸化に及ぼす影響

*P<0.05 vs HG group in same treatment, #P<0.05 vs Glucose(-)group

よりリン酸化が有意に上昇した。また、グルコース再補充後のp70S6Kのリン酸化はHG群に比してNG群で有意に高かった(図1)。

2. 2 再補充するグルコース濃度がタンパク質合成シグナルに及ぼす影響

グルコース不含培地で24時間培養したNG群に、終濃度2.8, 5.5, 12.0 mMになるようにグルコースを再補充し、30分後に細胞を回収した。グルコースを再補充しない0 mM群に比して、すべての再補充群でp70S6Kのリン酸化は有意に上昇した(図2)。また、5.5および12.0 mM群は2.8 mM群よりもp70S6Kのリン酸化は有意に高かったが、5.5 mM群と12.0 mM群の間には有意差は認められなかった。

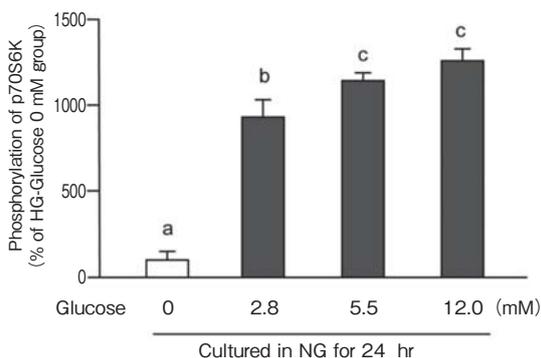


図2 再補充するグルコース濃度がp70S6Kのリン酸化に及ぼす影響
Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

2. 3 グルコース再補充によるタンパク質合成シグナルの経時的変化

グルコース不含培地で24時間培養したNG群に、終濃度5.5 mMになるようにグルコースを再補充し、0.5, 1, 2, 4時間後に細胞を回収した。p70S6Kのリン酸化は0.5時間後で最も高くなり、その後4時間後までHG群のレベルを維持した(図3, $n = 2$ のため統計解析は行っていない)。

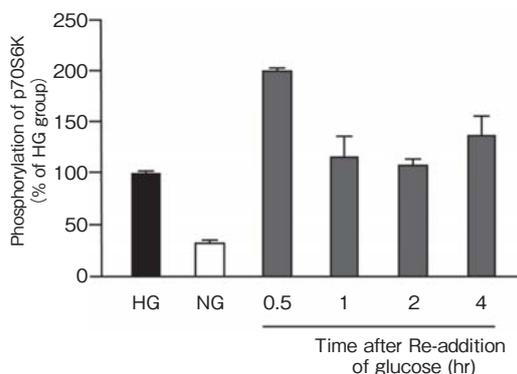


図3 グルコース再補充によるp70S6Kのリン酸化の経時的変化 ($n = 2$)

2. 4 24時間のグルコース飢餓が細胞内ATP濃度に及ぼす影響

24時間のグルコース枯渇およびグルコース再補充が細胞内ATP濃度に及ぼす影響について検討した。その結果、グルコース飢餓および再補充はいずれも細胞内のATP濃度に影響を及ぼさなかった(図4)。一方、ネガティブコントロールとして2-デオキシグルコース(2-DG)をNG群に加えた。2-DGはグルコースのアナログであり、解糖系を阻害する。2-DGの添加は細胞内ATP濃度を大きく低下させた。

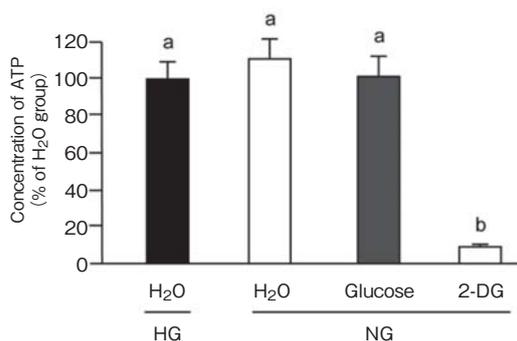


図4 24時間のグルコース飢餓が細胞内ATP濃度に及ぼす影響
Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

2. 5 プロテアソーム阻害剤がグルコース再補充効果に及ぼす影響

タンパク質分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系の阻害がグルコース再補充効果に及ぼす影響について検討した。プロテアソームの阻害剤であるMG132 (solved in DMSO, Sigma-Aldrich) をNG培地への交換時に添加し、24時間培養後、5.5 mMグルコースを再補充した。その結果、MG132はグルコース再補充によるp70S6Kのリン酸化の上昇には影響を及ぼさなかった(図5)。

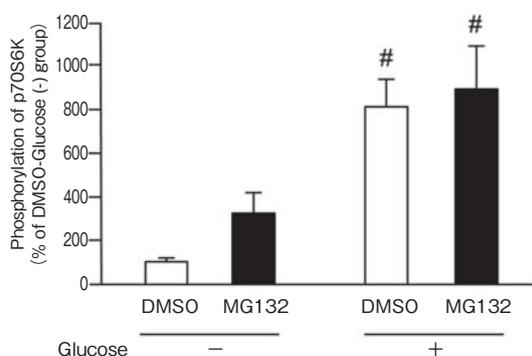


図5 プロテアソームの阻害剤MG132がグルコース再補充によるp70S6Kのリン酸化に及ぼす影響
#P<0.05 vs Glucose (-) group

2. 6 オートファジー阻害剤がグルコース再補充効果に及ぼす影響

オートファジー・リソソーム系がグルコース再補充効果に及ぼす影響について検討した。オートファジー阻害剤であるBafilomycin A1 (Baf, solved in ethanol, Abcam) をNG培地への交換時に添加し、24時間培養後、5.5 mMグルコースを再補充した。Baf存在下のNG培地中で24時間培養すると、p70S6Kのリン酸化レベルが有意に低下した(図6)。さらに、Baf存在下ではグルコース再補充によるp70S6Kのリン酸化の上昇が一部抑制された。

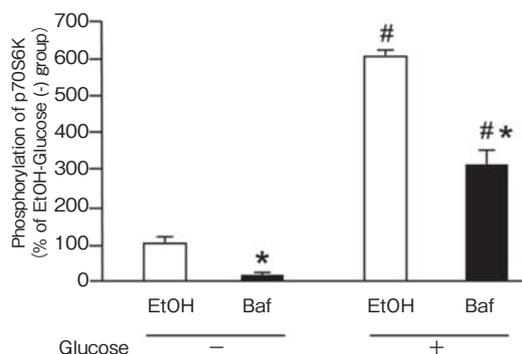


図6 オートファジーの阻害剤Bafilomycin添加がグルコース再補充によるp70S6Kのリン酸化に及ぼす影響
*P<0.05 vs EtOH group in same treatment, #P<0.05 vs Glucose (-) group

3. 考察

本研究では、24時間のグルコース飢餓とその後のグルコース再補充がタンパク質合成促進シグナルに及ぼす影響をC2C12筋管細胞を用いて検討した。その結果、24時間のグルコース飢餓はタンパク質合成促進シグナルを減弱させるが、その後のグルコース再補充に対するタンパク質合成促進シグナルの感受性を高めることが明らかとなった。

C2C12筋管細胞をグルコース不含培地で培養すると、タンパク質合成促進シグナルの指標となるp70S6Kのリン酸化が有意に低下した。このことは、タンパク質合成を促進するためには、グルコースが必要であることを示している。我々は最近、C2C12筋管細胞はグルコース依存度が高く、グルコース飢餓によりp70S6Kのリン酸化が抑制され、オートファジーが誘導されることを報告している¹⁰⁾。しかし、興味深いことに24時間のグルコース飢餓後にグルコースを再補充するとp70S6Kのリン酸化が大きく上昇し、そのレベルは非グルコース飢餓群よりも有意に高かった。今後は、最もグルコース再補充効果が高まるグルコース飢餓時間についても検討する必要がある。

グルコース飢餓後のグルコース再補充効果のメカニズムを検討するため細胞内のエネルギー状態

を測定した。先行研究では、細胞内のエネルギー状態が負になると、AMP-activated protein kinase (AMPK) がリン酸化され、p70S6Kの上流に存在するmTORを抑制することが報告されている¹³⁾。しかしながら、本研究におけるグルコース枯渇およびその後のグルコース再補充によって細胞内のATP濃度は変動しなかった。C2C12筋管細胞はグルコース以外の基質を利用することによって細胞内ATP濃度を維持する可能性が示唆された。

グルコース飢餓が細胞内のタンパク質分解を高めることから、グルコース再補充におけるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系の影響を検討した。それぞれの阻害剤存在下でグルコース飢餓ストレスを与え、グルコースの再補充効果を解析したところ、プロテアソーム阻害剤であるMG132存在下でもグルコース再補充効果は存在した。一方、オートファジー阻害剤であるBafilomycin存在下では、グルコース再補充効果が一部抑制された。先行研究では、mTORの抑制は協調的にユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジー・リソソーム系を活性化し、必須アミノ酸の供給を行うことが報告されている¹⁴⁾。本研究では、グルコース飢餓によってオートファジーが活性化し、タンパク質合成に必要なアミノ酸が供給されたことがグルコース再補充効果の一因であると考えられた。今後、グルコース飢餓時の細胞内のアミノ酸濃度を測定することによって、さらなる検討を行う。

結 論

本研究では骨格筋細胞を対象として、グルコース飢餓後のグルコース再補充がタンパク質合成促進シグナルに及ぼす影響について検討した。その結果、グルコース飢餓後のグルコース再補充はタンパク質合成促進シグナルの感受性を高めることが明らかとなった。そのメカニズムとして、グルコース飢餓によるオートファジーの活性化が一部

関与していることが示唆された。本研究の結果は、骨格筋のタンパク質合成を高めるためには、適切なタンパク質分解の活性化が重要である可能性を提示している。

謝 辞

本研究に対し、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、本研究の遂行にあたり多大なご助力をいただきました滋賀県立大学大学院の北井彩貴さんに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tisdale M.J., The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting, *J. Support. Oncol.*, **3**: 209-217 (2005)
- 2) Masiero E., Agatea L., Mammucari C., Blaauw B., Loro E., Komatsu M., Metzger D., Reggiani C., Schiaffino S., Sandri M., Autophagy is required to maintain muscle mass, *Cell. Metab.*, **10**: 507-515, doi:10.1016/j.cmet.2009.10.008 (2009)
- 3) Garcia-Prat L., Martinez-Vicente M., Perdiguero E., Ortet L., Rodriguez-Ubreva J., Rebollo E., Ruiz-Bonilla V., Gutarra S., Ballestar, E., Serrano A.L., Sandri M., Munoz-Canoves P., Autophagy maintains stemness by preventing senescence, *Nature*, **529**: 37-42, doi:10.1038/nature16187 (2016)
- 4) 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 Cells, *Stem. Cell Reports*, **11**: 1523-1538, doi:10.1016/j.stemcr.2018.10.009 (2018)
- 5) Mordier S., Deval C., Bechet D., Tassa A., Ferrara M., Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, **275**: 29900-29906, doi:10.1074/jbc.M003633200 (2000)
- 6) Yu X., Long Y.C., Autophagy modulates amino acid signaling network in myotubes: differential effects

- on mTORC1 pathway and the integrated stress response, *FASEB J.*, **29**: 394-407, doi:10.1096/fj.14-252841 (2015)
- 7) Moruno F., Perez-Jimenez E., Knecht E., Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells, *Cells*, **1**: 372-395, doi:10.3390/cells1030372 (2012)
- 8) Roberts D.J., Tan-Sah V.P., Ding E.Y., Smith J.M., Miyamoto S., Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition, *Mol. Cell*, **53**: 521-533, doi:10.1016/j.molcel.2013.12.019 (2014)
- 9) Sadiq F., Hazlerigg D.G., Lomax M.A., Amino acids and insulin act additively to regulate components of the ubiquitin-proteasome pathway in C2C12 myotubes, *BMC Mol. Biol.*, **8**: 23, doi:10.1186/1471-2199-8-23 (2007)
- 10) Nakai N., Kitai S., Iida N., Inoue S., Nakata K., Murakami T., Higashida K., Induction of autophagy and changes in cellular metabolism in glucose starved C2C12 myotubes, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, (2020) in press
- 11) Dufner A., Thomas G., Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation, *Exp. Cell Res.*, **253**: 100-109, doi:10.1006/excr.1999.4683 (1999)
- 12) Weng Q.P., Kozlowski M., Belham C., Zhang A., Comb M.J., Avruch J., Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies, *J. Biol. Chem.*, **273**: 16621-16629, doi:10.1074/jbc.273.26.16621 (1998)
- 13) Kimball S.R., Interaction between the AMP-activated protein kinase and mTOR signaling pathways, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, **38**: 1958-1964, doi:10.1249/01.mss.0000233796.16411.13 (2006)
- 14) Zhao J., Zhai B., Gygi S.P., Goldberg A.L., mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**: 15790-15797, doi:10.1073/pnas.1521919112 (2015)