

# 無重力による筋萎縮の分子メカニズムと 大豆たん白質由来オリゴペプチドによる抑制

大西ゆう子・平坂勝也・二川 健\*・後藤淳平・久田記美代・不老地治美・岸 恭一

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

## **Molecular Mechanism of Unloading-Mediated Muscle Atrophy and Its Inhibition by Treatment with Soy Protein-Derived Oligopeptide**

Yuko ONISHI, Katsuya HIRASAKA, Takeshi NIKAWA\*, Jyunpei GOTOH,  
Kimiyo HISADA, Harumi FUROCHI and Kyoichi KISHI

Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School,  
Tokushima 770-8503

### ABSTRACT

Skeletal muscle unloading during prolonged bed rest, paralysis, or spaceflight can result in debilitating skeletal muscle atrophy. Reduced muscle mass is characterized by a combination of decreased protein synthesis and increased protein degradation. Currently, there is no treatment to reverse the progression of atrophy. Here we show that Cbl-b, a RING-type member of the ubiquitin ligase family, is essential for skeletal muscle atrophy. Expression of Cbl-b *in vivo* induces significant atrophy in rat tibialis anterior muscle. In contrast, Cbl-b deficient mice are resistant to muscle atrophy and dysfunction induced during unloading by tail suspension. Upon tail suspension or zero gravity, Cbl-b interacts with and thereby degrades the skeletal muscle growth factor signaling intermediate IRS-1. Thus, Cbl-b activation appears to underlie the refractoriness of atrophic muscle tissue to growth factor stimulation by IGF/insulin and likely accounts for the overall decrease in protein synthesis observed during muscle wasting. These data suggest that Cbl-b may be a novel target for the development of therapeutics aimed at the preservation of muscle mass and function during a variety of muscle wasting diseases. In addition, soy protein-derived peptides inhibit ubiquitination and degradation of IRS-1 caused by Cbl-b in mouse myoblastic cells. Our results suggest that soy protein may contain bioactive factors for regulating proteolysis of IRS-1 in skeletal muscle. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 71-75, 2005.

Key words : ubiquitin ligase, Cbl-b, IRS-1, soy protein, skeletal muscle.

\* 〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

無重力環境は生体にさまざまな影響をあたえるが、私たちはその中でも骨格筋萎縮に注目し、研究を行ってきた。骨格筋萎縮のメカニズムを解明するため、実際に宇宙フライト (STS-90) させたラット骨格筋の遺伝子約26,000個をDNAマイクロアレイ解析した。その結果、増殖因子のレセプターやその関連たん白を特異的にユビキチン化させるユビキチンリガーゼCbl-b (Casitus B-ligeage lymphoma-b) の発現が宇宙フライトにより増大していることを発見した<sup>1)</sup>。Cbl-bは受容体アダプターたん白質をユビキチン化し分解へと導くユビキチンリガーゼとして働き、増殖因子受容体シグナル系のシグナル伝達を調整していることが報告されている<sup>2,3)</sup>。そこで、本研究ではCbl-b遺伝子欠損マウス (Cbl-b<sup>-/-</sup>マウス) を用い、Cbl-bがインスリン様増殖因子 (IGF-1) シグナル系を負に調節し、骨格筋萎縮を引き起こすメカニズムについて検討した。さらに、Cbl-bによる筋萎縮を予防するために、大豆たん白質由来のオリゴペプチドによるIRS-1のユビキチン化と分解への阻害効果を検討した。

## 方 法

### 尾部懸垂

Cbl-b<sup>-/-</sup>マウス (4週令) と野生型マウス (4週令) を5, 10, 21日間の懸垂に供した。尾部懸垂は、尾にテープを巻き、そのテープの端をゲージの上の平行に走っている棒に巻きつけた。コントロールとして、懸垂を行わないマウスを用意した。

### 筋肉採取

懸垂終了後、直ちに頸椎脱臼により屠し、後肢のヒク筋を採取した。湿重量を測定し、体重あたりの筋重量を算出した。このとき、懸垂0日目の平均筋重量を100%とした。

### ウエスタンブロット法

ヒク筋から得られた細胞質画分はLowry法を用いてたん白質量を補正した。たん白質 (40 μg) を SDS buffer (2-mercaptoethanolを含む) を加え65°Cで15分間反応させ、8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のたん白質はセミドライブロッティング装置 (ATTO) を用いてPolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写後、PVDF膜を4%精製ミルクガゼインで1時間ブロッキングし、0.05% Tween-20を含むPBS (PBS-T) で洗浄した。次に、膜を250倍希釈した抗IRS-1抗体 (Upstate Biotechnology), 抗β-actin抗体 (Oncogene Research Products, San Diego, CA) と室温で1時間反応させ、

PBS-Tで洗浄した。さらに2次抗体反応として2,500倍希釈した抗マウスIgG抗体と室温で1時間反応させ、PBS-Tで洗浄した。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence (ECL) 検出システム (Amersham, Little Chalfont, England, UK) を用いてたん白質を検出した。PVDF膜はその後CBB染色を行った。

### ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色

ヒク筋の切片 (厚さ6 μm) は、室温で2時間乾燥させた。乾燥させたヒク筋薄切切片をキシレン・アルコールで脱パラフィンし、水和した後、ヘマトキシリン液・エオジン液で染色した。染色後、流水水洗、そしてアルコールで脱水し、さらにキシレンで透徹後、マリノールで封入した。筋線維の横断面はWinRoof (version 5.0, Mitani Corp., Fukui, Japan) を用い、計測した。

### 歩行スタンプテスト

尾部懸垂後のマウスの後肢に墨汁をつけ、方眼紙の上を自由に歩かせた。その後、マウスの足跡から歩幅と足幅を測定した。

### 筋芽細胞へのオリゴペプチドの処理

Cbl-bやユビキチンを強発現させたCos7細胞に大豆たん白質由来オリゴペプチド群 (ハイニユートD3) を添加し、IRS-1のユビキチン化を検討した。

## 結 果

### 尾部懸垂による骨格筋湿重量の変動

4週齢Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスとCbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスを用い、尾部懸垂による体重あたりの骨格筋湿重量の変動を比較した (Fig. 1)。Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスの筋湿重量は徐々に減少し、21日目にはおよそ20%減少した。一方、Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスは、懸垂による筋湿重量の減少はほとんど見られなかった。両マウス間では、10日目と21日目に有意な差が見られた。

### 尾部懸垂によるヒク筋IRS-1たん白質量の変動

骨格筋萎縮がCbl-bのユビキチンリガーゼ作用によるものであるかを、Cbl-bの標的であるIRS-1のたん白質量の変動から検討した。尾部懸垂していないCbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは、成長に伴いIRS-1たん白質量は増加し、とくに5日~10日目にかけての増加が著しかった。一方、尾部懸垂したCbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは成長に伴うIRS-1たん白質量の増加はほとんど見られなかった (Fig. 2)。これに対しCbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスでは、尾部懸垂の有無に関わらずIRS-1たん白質量はほぼ同様に増加した (Fig. 2)。

### 尾部懸垂による筋萎縮の組織学的観察

Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスとCbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスの尾部懸垂による筋

断面積の変化を比較した (Fig. 3). データは懸垂後10日目のものを示した. Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは, 尾部懸垂により筋断面積は著しく減少した. これに対し, Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスは懸垂による筋断面積の変化は見られなかった.

#### 尾部懸垂後の歩行スタンプテスト

Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスとCbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスの尾部懸垂による歩行への影響を, 懸垂終了直後に検討した (Fig. 4A).

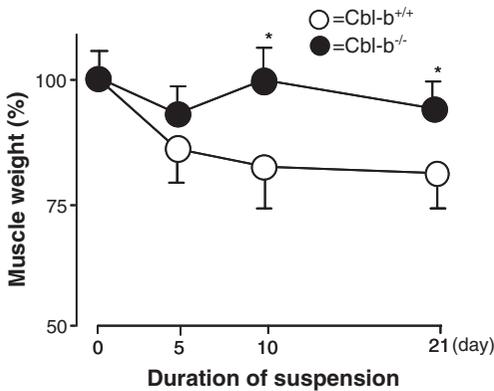


Fig. 1. Effect of tail-suspension on gastrocnemius muscle wet weight of Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice. Wild-type and Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice are subjected to unloading by tail suspension. Muscle wet weight per kg body weight in suspended animals at the indicated times is expressed as a percentage weight reduction relative to control animals. The results are representative of three independent experiments and expressed as mean  $\pm$  SD (n=5). \**P*<0.05, wild-type versus Cbl-b<sup>(-/-)</sup>.

Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは, 懸垂終了直後, コントロールに比べ歩幅が小さくなり, 足幅は広がった. これに対して, Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスは, 尾部懸垂による変化がほとんど見られなかった (Fig. 4). また, 実際のマウスの歩行の様子も, Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは歩行が困難な様子であったが, Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスは非懸垂群と同じような歩行が可能であった.

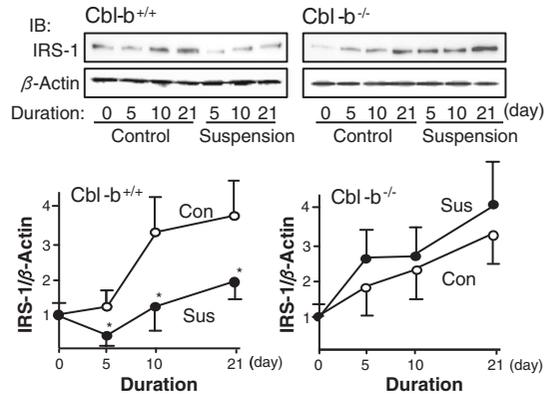


Fig. 2. Effect of tail-suspension on amount of IRS-1 in gastrocnemius muscle of Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice. Wild-type and Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice are subjected to tail suspension for the indicated times, and IRS-1 and  $\beta$ -actin proteins in gastrocnemius muscle are determined by immunoblotting. The densitometric ratio of IRS-1 to  $\beta$ -actin in wild-type and Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice is shown below. Data are mean  $\pm$  SD (n=3). \**P*<0.05, wild-type versus Cbl-b<sup>(-/-)</sup>.

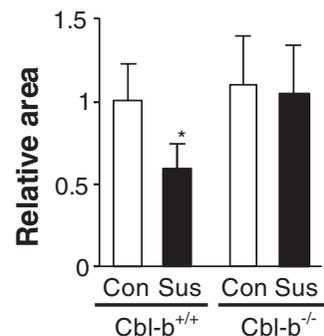
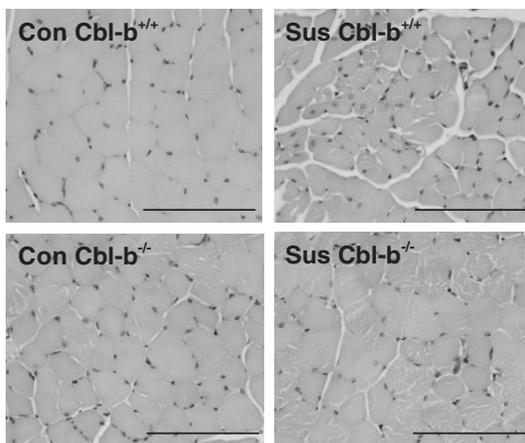


Fig. 3. Immunohistochemical analysis of gastrocnemius muscle of tail-suspended Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice. Sections (6  $\mu$ m) from gastrocnemius muscle of wild-type and Cbl-b<sup>(-/-)</sup> mice are prepared after 10 days of tail suspension and stained with hematoxylin-eosin and cross-sectional myofiber areas are determined by image analysis. Data are mean  $\pm$  SD (n=5). \**P*=0.05, wild-type versus Cbl-b<sup>(-/-)</sup>. Scale=100  $\mu$ m.

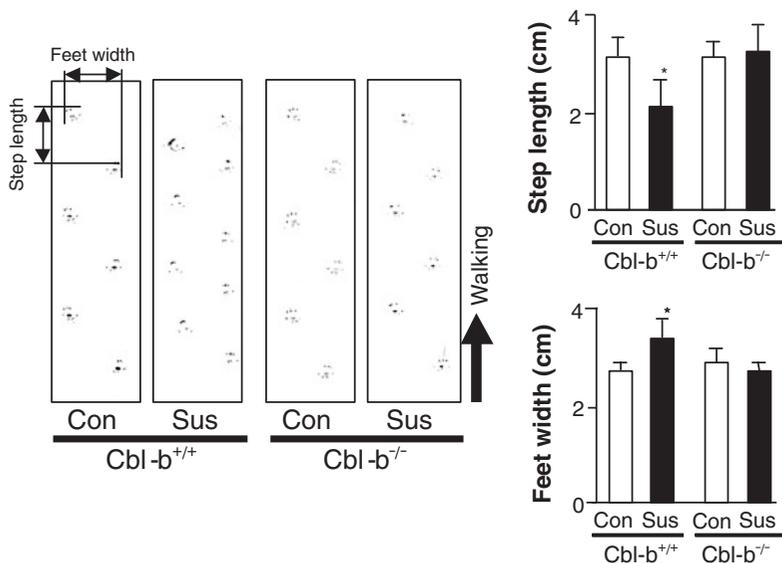


Fig. 4. Stamp-test of tail-suspended Cbl-b<sup>-/-</sup> mice. The hindlimb soles of Cbl-b<sup>+/+</sup> or Cbl-b<sup>-/-</sup> mice are painted with black ink after a 10-day-tail-suspension. Representative footprint profiles were shown. Their footprints (100 prints per mouse) are used to determine the step length and feet width of mice in the indicated groups. Date are mean ±SD (n=4). \*P<0.05, wild-type versus Cbl-b<sup>-/-</sup>.

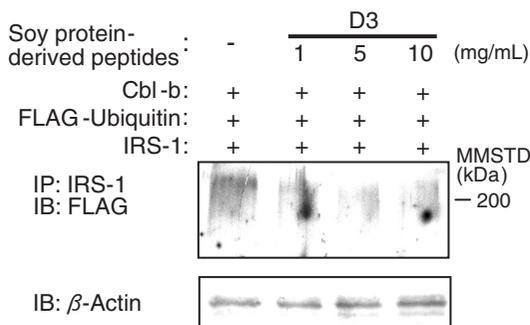


Fig. 5. Inhibitory effect of soy protein-derived oligopeptides on Cbl-b-mediated ubiquitination of IRS-1. Cos7 cells were transfected by plasmids containing Cbl-b, FLAG-ubiquitin and IRS-1, respectively and were treated with IGF-1 (10 ng/mL) 48 hr later. Soy-protein derived oligopeptides (High-Nute D3) Were added to the Cos7 cells at 3 hr prior to IGF-1 treatment. Ubiquitination of IRS-1 was analyzed by immunoprecipitation with an antibody for IRS-1 and immunoblotting with an antibody for FLAG (ubiquitin).

#### 大豆たん白質由来オリゴペプチドによるIRS-1のユビキチン化と分解の阻害

Cos7細胞にIRS-1, Cbl-bとユビキチンを強発現させるとIRS-1はユビキチン化し分解される (Fig. 5, Data

を示さず). この状態に大豆たん白質由来オリゴペプチドを添加すると, 濃度依存的にIRS-1のユビキチン化とその分解を阻害した (Fig. 5, Dataを示さず).

#### 考 察

本研究では, Cbl-bが微小重力環境での骨格筋萎縮に関与していることを, Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスを用い検討した. 微小重力モデルとして尾部懸垂を用い, 体重あたりの骨格筋湿重量 (以下, 湿重量%) の変動を検討した. その結果, Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは湿重量%が減少したのに対し, Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスはその減少が抑制された. つまり, Cbl-bが微小重力環境での骨格筋萎縮の原因遺伝子であることが示唆された. 次に, Cbl-bがこの骨格筋萎縮にどのようなメカニズムで関与しているか検討した. Hiroseらはギプス固定したラット骨格筋においてIRS-1のたん白質量が減少することを報告している<sup>4)</sup>. 私たちも, 筋細胞の増殖分化を司る最も重要な増殖因子であるIGF-1の細胞内伝達シグナルを解析した. その結果, Cbl-bを強発現させたCOS7細胞ではCbl-bとIRS-1が結合し, ユビキチン化させることを見出している (データを示さず). つまり, Cbl-bがIRS-1をターゲットとしていると考えられた. 尾部懸垂したCbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスでは懸垂によるIRS-1たん白質量の減少がほとんど見られなかった. Cbl-bは*in vivo*において

もIRS-1を標的としていることを強く示唆した。さらに、Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスの懸垂後の筋線維断面積と歩行を検討すると、Cbl-b<sup>(+/+)</sup>マウスは懸垂後に著明な筋線維断面積の減少と歩行異常が見られたが、Cbl-b<sup>(-/-)</sup>マウスではそのような異常が見られなかった。この結果から、Cbl-b遺伝子を欠損すると尾部懸垂による骨格筋萎縮が抑制されるばかりか、骨格筋の機能をも正常に保たれることがわかった。

以上の所見から、Cbl-bがIGF受容体シグナル系をネガティブにコントロールすることが、尾部懸垂による筋萎縮の主要な原因であることが示唆された。それゆえ、Cbl-bによるユビキチン-プロテアソーム依存性筋

たん白質分解の抑制に最も効果的な薬剤を見出し実用化することで、寝たきりや無重力などにより引き起こされる骨格筋萎縮を防ぎうるかもしれない。Cbl-bは基質により結合するドメインが決まっている。それゆえ、そのドメインとよく似た構造をもつペプチドはCbl-bと基質の結合を妨げる阻害剤になりうる。今回の実験で大豆たん白質由来のオリゴペプチド群にはCbl-bとIRS-1の結合やユビキチン化を阻害しうる生理活性ペプチドが存在することが明らかとなった。今後は、このオリゴペプチド群を精製し、生理活性ペプチドのシークエンスを決定したい。

## 要 約

無重力環境は生体にさまざまな影響をあたえるが、私たちはその中でも骨格筋萎縮に注目してきた。骨格筋萎縮のメカニズムを解明するため、実際に宇宙フライト (STS-90) させたラット骨格筋の遺伝子約26,000個をDNAマイクロアレイ解析した。その結果、増殖因子のレセプターやその関連たん白質を特異的にユビキチン化させるユビキチンリガーゼCbl-bの発現が宇宙フライトにより増大していることを発見した。Cbl-bは、骨格筋におけるインスリン受容体基質たん白質 (IRS-1) をユビキチン化し分解へと導き、増殖因子受容体シグナル系のシグナル伝達を調整していることがわかった。さらに、Cbl-b遺伝子欠損を用い、Cbl-bが*in vivo*においても増殖因子受容体シグナル系を負に調節し、骨格筋萎縮を引き起こす重要な遺伝子であることを証明した。そこで、無重力や寝たきりによる筋萎縮を予防する目的で、大豆たん白質ペプチドによりCbl-bのIRS-1-ユビキチン化活性の阻害を試みた。平均ペプチドが3~4の大豆たん白質由来オリゴペプチド群はIRS-1のユビキチン化を抑制できなかったが、平均ペプチドが5~6の大豆たん白質由来オリゴペプチド群により阻害できた。今後は、このペプチド群のどのようなペプチドが阻害活性を有するのかを検討していく予定である。

## 文 献

- 1) Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K and Takeda S (2004): Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18**, 522-524.
- 2) Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Sara L, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S and Yarden Y (1999): Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* **4**, 1029-1040.
- 3) Yokouchi M, Kondo T, Houghton A, Bartkiewicz M, Horne WC, Zhang H, Yoshimura A and Baron RM (1999): Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7. *J. Biol. Chem*, **274**, 31707-31712.
- 4) Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S and Martyn JA (2000): Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **279**, E1235-E1241.