

大豆セリンプロテアーゼ阻害剤による廃用性筋萎縮の治療

二川 健*・越智ありさ・矢野桃子・乙 敬宏・山 智成・

真板綾子・原田晃子・中尾玲子・奥村裕司

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Effect of Serine Protease Inhibitor on Muscle Atrophy

Takeshi NIKAWA*, Arisa OCHI, Takahiro OTO, Tomonari YAMA,
Ayako OHNO-MAITA, Akiko HARADA-SUKENO, Reiko NAKAO and
Yuushi OKUMURA

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

ABSTRACT

Skeletal muscle is the most sensitive organ to mechanical stress. However, the sensing mechanisms of mechanical stress in skeletal muscles are not completely understood. In our previous studies, we revealed that the induction and activation of ubiquitin ligase Cbl-b played an important role in skeletal muscle atrophy. We next analyzed the signaling and transcription pathway that regulates Cbl-b expression in C2C12 cells using three-dimensional(3D)-clinorotation, a simulated-model of microgravity. As the result, Cbl-b expression was regulated by oxidative stress and Egr activation through ERK dependent pathway. In addition, we revealed that this signaling pathway was activated by myostatin. Thus, in the present study, we tried to understand the molecular mechanisms of unloading stress perception, focusing on the activation mechanism of myostatin. Proteolysis activation is required for the activation of myostatin. Myostatin is processed at the cleavage site (Arg-Ser-Arg-Arg:RSRR) by proteases which selectively recognize it. As the candidate processing proteases, we proposed MSPL (the type II transmembrane serine proteases), proprotein convertase (PC) family member, Furin, PACE4, PC5/6, PC7/8. In fact, MSPL, Furin, PACE4 and PC5/6 activated myostatin in coexpression system to cells. However, the expression of these proteases was not affected by unloading stress. Therefore, the activation of myostatin might be depended on the enhancement of protease activity by unloading stress. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 133-138, 2010.

Key words : mechanosensing, unloading stress, ubiquitin ligase, Cbl-b, myostatin

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

宇宙飛行士にとって、無重力による運動器の萎縮は深刻な問題であり、そのメカニズムの解明と治療法の開発が急務である。また、筋萎縮のメカニズム解明は寝たきりの患者への治療・予防への応用が期待される。一般的に、無重力による筋萎縮はたん白質合成と分解のインバランスにより起こると考えられている¹⁻⁵⁾。これまでの研究で、骨格筋における3つの主要な分解系（ユビキチン-プロテアソーム系、カルシウム-カルパイン系、リソソーム系）の中でも、ユビキチン-プロテアソーム依存性筋たん白質分解経路が、無重力による筋萎縮で重要な働きをしていること⁶⁾、さらに、このシステムの律速酵素であるユビキチンリガーゼ群の中で、Cbl-bが廃用性筋および骨萎縮の原因因子の一つであることを明らかにした⁷⁾。無重力環境に曝露した骨格筋では、このCbl-bの発現が上昇し、骨格筋の増殖分化を司るIGF-1のシグナル分子IRS-1の分解を亢進した。その結果、骨格筋細胞はIGF-1に抵抗性を示し、無重力による筋萎縮が誘導された⁸⁾。

以上のように、Cbl-bの筋萎縮原因遺伝子としての機能が解明される一方、筋肉がどのように無重力ストレスを感知しているかは未だ不明である。細胞の無重力ストレスの感知は、長期的なストレスに対する場合と短期的なストレス曝露の場合では異なっているが、Cbl-bの無重力ストレスに対する発現上昇は非常に早く（3時間以内）短期的な無重力ストレスに応答していることから短期的な無重力ストレスに対する骨格筋固有の感知機構の解明を目指し、研究を進めた。

Cbl-b上流遺伝子のプロモーター解析により酸化ストレス応答領域と一致する無重力ストレス応答領域を発見し、転写調節因子Egr群の関与が示唆された。また無重力ストレスによるEgr発現はERKシグナル経路を介していることを明らかにした。さらに近年、TGF- β 刺激は培養細胞内にH₂O₂を発生させ、Egrの発現を誘導することが報告されている⁹⁾。これを受け、TGF- β スーパーファミリーに属し、骨格筋形成抑制因子として知られるMyostatinに着目した^{10, 11)}。模擬無重力ストレス後の培地中には活性型Myostatinが存在し、また活性型MyostatinとEgrおよびCbl-bの発現との関連性が示唆されたため、Myostatinの活性化が無重力ストレス感知のファーストステップとして有力ではないかと考えた。細胞内で不活性型前駆体として合成されたMyostatinの活性化には、Myostatinアミノ酸配列中の、Arg-Ser-Arg-Arg；RSRR配列を特異的に認識する酵素による切断が必須であり、まずこれらの酵素を同定することに焦点をあて、Myostatinの活性化がどこで、どのように、何によって起こっているの

かについて解析をすすめた。

方 法

1) ウェスタンブロット法

たん白質（20 μ g）または濃縮メデイウム（30 μ L）をSDS化後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のたん白質をセミドライプロッティング装置（ATTO）を用いてPolyvinylidene difluoride（PVDF）膜（Bio-Rad）に転写した。転写後、PVDF膜を3.5% skim milkで室温で2時間以上ブロッキングし、0.05% Tween-20を含むPBS（PBS-T）で洗浄した。次に、膜を一次抗体〔抗V5抗体（Invitrogen）〕と37℃で1時間または4℃でover night反応させた。洗浄後、さらに二次抗体〔抗マウスIgG抗体（Amersham）〕と37℃で1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence（ECL）検出システム（Amersham）を用いて抗体と反応したたん白質を検出した。

2) Real-time reverse transfection-polymerase chain reaction（RT-PCR）

Total RNAに終濃度1 μ M oligo-dT primer, 10 μ M random primer, 0.5 μ M dNTPs（Promega）、100 U M-MLV reverse transcriptase（Promega）を加えて、42℃、60分間、逆転写反応を行いcDNAを合成した。合成したcDNAにPower SYBER[®] Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）とプライマーを加え、PCR反応を行った。内部標準としてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を用いた。PCR反応は、まず50℃、2分間プレヒートし、95℃、10分間でタックポリメラーゼを活性化させた。その後、95℃、15秒間の熱変性、60℃、1分間のプライマーとの結合および伸長反応を40サイクル繰り返した。

3) 3D-clinorotation（3次元培養法）

細胞の模擬微少重力曝露モデルとして3D-Clinorotation培養法を用いた。C2C12細胞を37℃、5%CO₂の条件下で、100 μ g/mLスプレプトマイシン、100 IU/mLペニシリンGを含む増殖培地を用いて、ほぼ100%コンフルエントまで静置培養した。ウェル内を無血清培地に替え、密閉後、3次元Clinorotation装置PMS-VI（XY 2軸方向に独立して回転する装置）の試料台に固定した。X軸11.0 rpm、Y軸13.0 rpmの速度で回転した。コントロールとして、他の条件はそのまま静置培養したものを用いた。

4) Myostatin, 各種酵素の発現

HEK293T細胞を37℃、5% CO₂の条件下で、100 μ g/mLスプレプトマイシン、100 IU/mLペニシリンG

を含む増殖培地を用いて24時間培養した。Hilly Max (Dojindo) を用いてMyostatin遺伝子、各種酵素遺伝子又はLTBP3遺伝子をトランスフェクションした。トランスフェクション後は、24時間で無血清培地に替え、48時間後、培地を回収、Lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)] にてcell lysateを作成した。

5) 培地の濃縮

トランスフェクション後回収した培地は、Centrifugal filter devices (Amicon® Ultra-4, 10K, Millipore) を用いて4℃、3,500 rpmで遠心しおよそ10倍に濃縮した。

6) 酵素阻害剤添加

マウス筋芽細胞 (C2C12細胞)、およびMyostatin安定発現C2C12細胞株に対し、2% horse serumを含む分化誘導培地に酵素阻害剤; Aprotinin, BBI, dec-RVKR-cmkを添加し、筋管への分化に与える影響を観察した。

結 果

1) Myostatin活性化酵素の検討

どのような酵素がMyostatin活性化酵素としての作用を示すかを検討した。Myostatin遺伝子および各種酵素遺伝子 (新規セリンプロテアーゼ, Furin, PACE4, PC5/6, PC7/8) をHEK293T細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清およびCell lysateをウエスタンブロッティング法で解析し、Myostatin活性体の産生の有無を確認した (Fig. 1)。新規セリンプロテアーゼ, Furin, PACE4およびPC5/6の4つは活性型Myostatinが確認され、活性化酵素としての可能性が示唆された。

2) LTBP3添加によるMyostatin活性化量への影響

活性化酵素としての可能性が示唆された新規セリンプロテアーゼ, Furinに関してHEK293T細胞にMyostatin遺伝子と酵素遺伝子LTBP3遺伝子をトランスフェクションし、Myostatin活性化量への影響を比較した (Fig. 2)。FurinはLTBP3添加により培養上清中のMyostatinおよび活性型Myostatinのたん白生成が制限されていたが、新規セリンプロテアーゼについてはLTBP3発現によるMyostatin活性化量の変化はみられなかった。

3) 3D-Clinorotationによる活性化酵素のmRNA発現への影響

C2C12細胞を3D-Clinorotationにより24時間培養し、

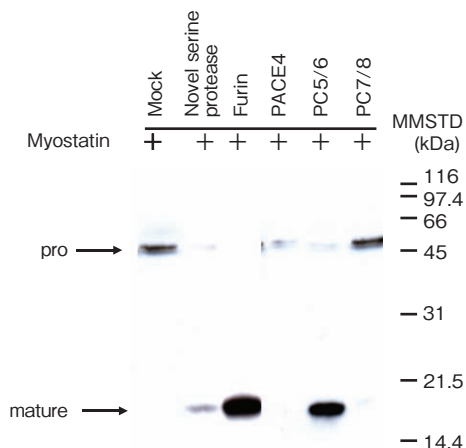


Fig. 1. Processing of myostatin by various proteases.

HEK293 cells were transfected with plasmids containing a gene of various protease (novel serine protease, Furin, PACE4, PC5/6, or PC7/8) and V5-myostatin gene. Conditioned media were subjected to Western blotting with an anti-V5 antibody. Pro, promyostatin (inactive form); mature, mature myostatin (active form); MMSTD; molecular mass standards.

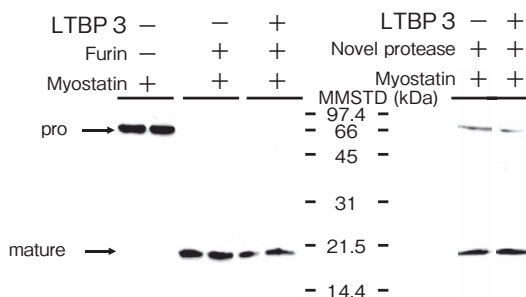


Fig. 2. Effect of LTBP3 overexpression on myostatin processing.

HEK293 cells were transfected with plasmids containing protease (novel serine protease or Furin, V5-myostatin and LTBP3 genes). Conditioned media were subjected to Western blotting with an anti-V5 antibody. Pro, promyostatin (inactive form); mature, mature myostatin (active form); MMSTD; molecular mass standards.

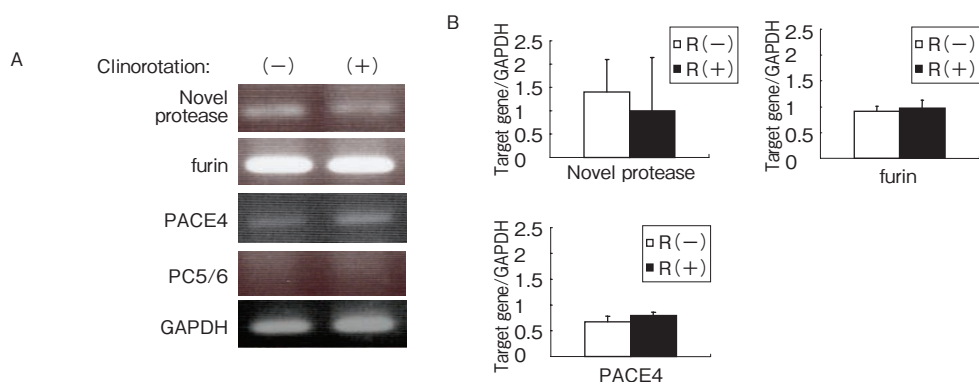


Fig. 3. Effect of 3D-clinorotation on expression of novel protease, furin and PACE4. Mouse C2C12 myoblasts were cultured with [R(+)] or without 3D-clinorotation [R(-)] for 24 hr. Total RNA was subjected to real time RT-PCR for novel protease, furin, PACE4 and GAPDH. Expression level of each protease was calculated as its relative level to GAPDH expression level.

ISOGENでtotal RNAを回収後、cDNAを作成し、PCRおよびRT-PCRにおいて活性化酵素（新規セリンプロテアーゼ、Furin、PACE4、PC5/6）のmRNA発現の変化を検討した（Fig. 3）。コントロールとして、静置培養を24時間行ったものを用いた。PC5/6に関しては、発現は感度以下であった。新規セリンプロテアーゼ、Furin、PACE4に関しては、3D-ClinorotationによるmRNA発現量の変化に有意差は認められなかった。

4) 酵素阻害剤添加による分化抑制の解除

C2C12細胞の親株とMyostatin安定発現株に対し、酵素阻害剤Aprotinin, BBI, dec-RVKR-cmkを添加し、Myostatin安定発現株の分化抑制への影響を検討した。培養細胞の一部に筋管形成がみられ、Myostatin活性化阻害による分化抑制の解除傾向がみられた。

考 察

MyostatinのRSRRの配列を認識する酵素として膜結合型セリンプロテアーゼである新規セリンプロテアーゼやPCファミリーであるFurin、PACE4、PC5/6、PC7/8についてMyostatin活性化体産生をもって活性化酵素としての検討を行ったところ、新規セリンプロテアーゼ、Furin、PACE4、PC5/6の4つの酵素はMyostatinの活性化酵素としての可能性が示唆された（Fig. 1）。どの酵素がより切断しているかということは今回のウェスタンブロッティング法による解析では明確な判断ができないため、酵素活性を定量することにより、UnloadingストレスによるMyostatin活性化量の変化を検討し、より特異的なMyostatin活性化酵素の同定を検討していく。さらに、Myostatinのシャペロンたん

白質として報告されたLTBP3¹²⁾発現によるMyostatin活性化量への影響を同様にウェスタンブロッティング法による解析で検討したが（Fig. 2）、FurinはLTBP3発現によりMyostatinおよび活性化体Myostatinのたん白生成が制限された。これは、Furinが細胞内（小胞体、ゴルジ体）に局在するため、そのプロセシングがLTBP3により遮断された結果と考えられる。他方、新規セリンプロテアーゼはLTBP3発現による影響はみられなかった。これは、新規セリンプロテアーゼが細胞膜局在の酵素であることからLTBP3による影響はみられなかったものと考えられる。しかしながら、活性化型Myostatinの産生量の増大はみられなかった。これはLTBP3がMyostatinを細胞膜上まで輸送し、結合したままのかたちで留まらせている可能性が考えられる。次に、活性化酵素として考えられる新規セリンプロテアーゼ、Furin、PACE4、PC5/6に関して、筋芽細胞にUnloadingストレスを与えた際の酵素mRNA発現量が変化するのかを検討したところ、PC5/6では感度以下であったが、他の3つの酵素はUnloadingストレスによるmRNA発現量の有意な変化はみられなかった（Fig. 3）。以前に、Myostatin mRNA発現量はUnloadingストレスにより増加しないことが確認されているが、活性化酵素に関してもUnloadingストレスによるmRNAの増加は見られなかったことより、活性化型Myostatinの増大は、Unloadingストレスに応答したmRNA合成の増大に依存した結果ではなく、既存するMyostatinの活性化酵素によるプロセシング自体が増大した結果と考えられる。今後は、上記にも述べたように、Myostatin活性化量に着目し、酵素活性に対応した活性化量測定の系を検討していく。また、より特

異的なMyostatin活性化酵素の同定には、酵素活性の定量のほか、酵素阻害剤によるMyostatinの活性化阻害が及ぼす細胞分化抑制の解除を確認する方法を検討している。思考的な段階であるが、酵素阻害剤添加時におけるマウス筋芽細胞の分化を親株とMyostatin安

定発現株で比較したところ、Myostatin安定発現株では一部ではあるが分化が認められた。今後、酵素阻害剤の濃度等検討し、Myostatinによる分化抑制がどの程度まで回復するのかを検証していく。

要 約

骨格筋は機械的ストレスに対する感受性が高い臓器のひとつであり、運動を行えば肥大し、寝たきりになれば萎縮する。しかしながら、骨格筋がどのように機械的ストレスを感知しているかについてはほとんど解明されていない。これまでの研究で、我々はユビキチンリガーゼCbl-bが寝たきりによる筋萎縮の原因遺伝子の一つであることを明らかにした。Cbl-bの短期無重力ストレスによる発現調節機構について検討した結果、酸化ストレスの発生に伴うMAPキナーゼ（ERK）経路を介したEgr活性化によるCbl-bの発現には、活性型Myostatinによる細胞内シグナル伝達の関与が示唆された。本研究では、Myostatinの活性化機構に着目し、無重力ストレス感知の分子機構の全貌解明を目指した。Myostatinは細胞内で不活性型前駆体として合成された後、プロテアーゼによる切断を受け、活性型に変換される（processing）。このMyostatinの切断部位のアミノ酸配列（Arg-Ser-Arg-Arg, RSRR）を特異的に認識する酵素としては膜結合型セリンプロテアーゼである新規セリンプロテアーゼやFurin, PACE4, PC5/6, PC7/8などのPCファミリーメンバーが考えられるため、まずこれら酵素のMyostatin活性化作用について検討した。酵素遺伝子とMyostatin遺伝子を共発現し、活性型Myostatin産生の有無を調べた結果、新規セリンプロテアーゼ、Furin, PACE4, およびPC5/6において活性型Myostatinの存在を確認できたことから、これらの酵素は、Myostatin活性化酵素としての可能性が示唆された。また、3D-Clinorotationによる模擬微小重力実験から、筋芽細胞におけるMyostatin活性化酵素のmRNA発現変動を調べた結果、PC5/6は感度以下の発現量であり、その他の酵素に関しては無重力ストレスによるmRNA発現量変化に有意な差はみられなかった。以上の知見より、Myostatinの活性化は細胞膜局在のプロテアーゼによってなされるが、プロテアーゼ遺伝子発現は無重力ストレスに応答した変動は認められず、むしろ活性型プロテアーゼ量の変動に依存することが考えられた。

文 献

- 1) Ilyina-Kakueua, E. I., Portugalov, V. V. and Krivenkova, N. P. (1976): Space flight effects on the skeletal muscles of rat. *Aviat Space Environ. med.*, **47**, 700-703.
- 2) Goldspink, D. F., Morton, A. J., Loughna, P., and Goldspink, G. (1986): The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and growth of four skeletal muscles of the rat. *Pluget Arch.*, **407**, 333-340.
- 3) Thomason, D. B., Biggs, R. B. and Booth, F. W. (1989): Protein metabolism and b-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, **257**, R300-R305.
- 4) Tischler, M. E., Rosenberg, S., Satarug, S., Henriksen, E. J., Kirby, C. R., Tome, M., and Chase, P. (1990): Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*, **39**, 756-763.
- 5) Musacchia, X. J., Steffen, J. M., Fell, R. D., Dombrowski, M. J., Oganov, V. W. and Ilyina-Kakueua, E. I. (1992): Skeletal muscle atrophy in response to 14 days of weightlessness: vastus medialis. *J. Appl. physiol.*, **73**, 44S-50S.
- 6) Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watnabe, C., Kitano, T., Baldwin, K. M., Izumi, R., Nonaka, I., Towatari, T., Teshima, S., Rokutan, K., and Kishi, K. (2001): Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-

- proteasome pathway. *FASEB J*, **15**, 1279-1281.
- 7) Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Kosaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N. (2006): Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-I signaling in osteoblasts during denervation. *J Bone Miner Res*, **21** (5), 722-734.
 - 8) 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, Takeda S. (2004): Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18**, 522-524.
 - 9) Ohba M, Shibamura M, Kuroki T, Nose K. (1994): Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol*, **126**, 1079-1088.
 - 10) McPherron AC, Lee SJ. (1997): Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 12457-12461.
 - 11) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, **387**, 83-90.
 - 12) Sarah B. Anderson, Alfred L. Goldberg, and Malcolm Whitman. (2008): Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **283**, 7027-7035.