

抗ユビキチン化ペプチドCblin (Cbl-b inhibitor) の高機能化

二川 健^{*1}・越智ありさ¹・中尾玲子³・山 智成¹・上村啓太¹・平坂勝也¹・真板綾子¹・
奥村裕司¹・長野圭介⁴・片桐彩人²・河村知志²・根本尚夫²・赤間一仁⁵

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 ¹生体栄養学分野 ²機能分子合成薬学分野

³宇宙航空研究開発機構宇宙医学生物学研究室 ⁴大塚製薬株式会社第一探索研究所 ⁵島根大学生物資源科学部

High Functionalization of Cbl-b Inhibitor, Cblin

Takeshi NIKAWA^{*1}, Arisa OCHI¹, Reiko NAKAO³, Tomonari YAMA¹,
Keita KANMURA¹, Katsuya HIRASAKA¹, Ayako MAITA¹, Yuushi OKUMURA¹, Keisuke NAGANO⁴,
Ayato KATAGIRI², Tomoyuki KAWAMURA², Hisao NEMOTO² and Kazuhito AKAMA⁵

¹Department of Nutritional Physiology,

²Department of Bioorganic Synthetic Chemistry,

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

³Space Biomedical Research Office, Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Ibaraki 305-8505,

⁴First Institute of New Drug Discovery, Otsuka Pharmaceutical Co., Tokushima 771-0192,

⁵Department of Biological Science, Faculty of Life and Environmental Science,

Shimane University, Shimane 690-0192

ABSTRACT

For bed rest patients or astronauts, muscle atrophy caused by unloading stress is a serious problem. In our previous studies, we revealed that the induction and activation of ubiquitin ligase Cbl-b played an important role in skeletal muscle atrophy. In muscle atrophy, Cbl-b interacted with and degraded the IGF-1 signaling intermediate IRS-1. In turn, loss of IRS-1 activated the FOXO3-dependent MAFbx/atrogen-1 expression. In addition, we showed that a pentapeptide mimetic of tyrosin⁶⁰⁸-phosphorylated IRS-1, DGpYMP, which we named Cblin, inhibited Cbl-b-mediated IRS-1 ubiquitination and strongly decreased the Cbl-b-mediated induction of MAFbx/atrogen-1. Interestingly, we found that a major component of soy protein, soy glycinin, contained a sequence similar to Cblin peptide (DI/FYNP). In fact, the intake of soy glycinin prevented reduction of muscle wet weight and myofiber size. In addition, the MAFbx/atrogen-1 expression was significantly decreased. On the other hand, we performed multiple Cblin-like sequences transfected to the rice glutelin, and these peptides were induced by digestion. There was inhibitory action to Cbl-b-induced IRS-1 ubiquitination. Since these inhibitors might be supplemented

* 〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

safely, they may be useful as a therapeutic source in prevention of skeletal muscle atrophy caused by unloading stress. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 53-57, 2011.

Key words : muscle atrophy, ubiquitin ligase, Cbl-b, glycinin

超高齢化社会に突入したわが国において、寝たきり患者数は増加の一途を辿っており、医療費の圧迫など大きな社会問題となっている。また、国際宇宙ステーション内の日本宇宙実験棟「きぼう」が完成し、長期宇宙滞在が可能となってきた。寝たきり患者や宇宙飛行士にとって、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は急務である。一般に、寝たきりや無重力環境では、筋たん白質合成と分解のインバランスによって、筋萎縮が起こると考えられている^{1,2)}。骨格筋には、ユビキチン・プロテアソーム系、カルパイン系、リソソーム系の、3つの主要な筋たん白質分解系が存在する。我々は、宇宙フライトを行ったラットの腓腹筋をDNAマイクロアレイ法で網羅的に解析し、無重力では、ユビキチン・プロテアソーム経路の律速酵素であるCbl-b (Casitas B-lineage lymphoma b), MuRF-1, Siah1Aなどのユビキチンリガーゼの発現が上昇していることを明らかにした³⁾。また、この中でも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⁴⁾。ユビキチンリガーゼCbl-bの基質たん白質は、筋肉の成長に重要な役割を担っているIGF-1 (insulin-like growth factor-1) シグナルの細胞内シグナル分子であるIRS-1 (insulin receptor substrate-1) である。したがって、発現が上昇したCbl-bによってIRS-1の分解が促進し、IGF-1シグナルは下流まで伝わることができず、筋萎縮が誘導される⁵⁾。

我々は、Cbl-bがIRS-1の特定の配列を認識して結合することに注目し、IRS-1のリン酸化チロシン部位をミミックしたペプタペプチド (Cblin : DGpYMP, 特願2006-145944) が、*in vitro*および*in vivo*にてCbl-bの活性を阻害することを見出した⁵⁾。このCblinと類似した配列を有する食品を検索したところ、大豆11Sグリシニンたん白質がCblinと類似した配列 (DI/FYNP) を有することがわかった。本研究では、大豆グリシニンたん白質に含まれる機能性配列に着目し、Cbl-bユビキチンリガーゼ活性抑制に対する有効性も検討した。さらに、Cblin様ペプチドはたん白質分子1つあたり1カ所程度しか存在せず、この機能性を食材として有効利用するため、イネたん白質にCblin様ペプチドをタンデムに10個程度組み込み、そのユビキチン化阻

害活性も測定した。

方 法

培養細胞を用いたユビキチン化アッセイ

ヒト胎児腎細胞由来のHEK293細胞を37℃、5%CO₂の条件下で増殖培地 [10%牛胎児血清, 100 U/mL ペニシリン, 100 μg/mLストレプトマイシンを含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] を用いて培養した。回収したたん白質は、IRS-1のタグである抗V5抗体で免疫沈降法を行った後、ウェスタン・ブロット法に供した。

動物実験

6週齢のC57BL/6jマウスに普通食を1週間自由摂取させた後、右脚に坐骨神経切除を施し、下記の3群に分け、それぞれの試験食を自由摂取させた。

Control : 20%カゼイン食

10% Glycinin : 10%グリシニン食 + 10%カゼイン食

20% Glycinin : 20%グリシニン食

総カロリーに占めるたん白質割合20%のうち、その全てがカゼイン由来であるものをcontrol食 (Control)、10%がグリシニン由来、10%がカゼイン由来であるものを10%グリシニン食 (10% Glycinin)、全てがグリシニン由来であるものを20%グリシニン食 (20% Glycinin) とした (Table 1)。

坐骨神経切除後、1, 2, 3, 3.5, 4日後に屠殺し、腓腹筋、長趾伸筋、ヒラメ筋、前脛骨筋を摘出した。

Table 1. Composition of experimental diets

Product	Control	10% Glycinin	20% Glycinin
			(g/100 g)
Casein	22.60	11.28	0
Glycinin	0	11.47	22.89
<i>α</i> -starch	44.44	44.36	44.27
Sucrose	22.23	22.19	22.15
Lard	4.23	4.22	4.21
Cellulose	2.00	1.99	1.99
Mineral mix	3.50	3.49	3.49
Vitamin mix	1.00	1.00	1.00

Cblin様ペプチドをタンデムに含むイネたん白質の作製

Cblin様ペプチド (DGYMP) のアミノ酸配列の両端を、トリプトファンとグルタミンで挟んだ配列 (QDGYMPW) を繰り返しもつ配列を作成した。この配列をコードするDNAを、アグロバクテリウムによる形質転換により、イネのグルテリン (GluB4) へ導入した。また、同様の配列を組み込んだpET32aベクターを、BL21大腸菌株に導入し、発現誘導によって得たたん白質をHis-tagカラムを用いて精製した。今回の検討では、後者で精製したたん白質を用いた。

結 果

経口摂取による11Sグリシニンの筋萎縮抑制効果

大豆グリシニンの機能性を確認するため、坐骨神経切除を施したマウスに大豆グリシニンを経口摂取させ、筋萎縮阻害効果を検討した。坐骨神経切除により減少する筋湿重量および筋横断面積は、グリシニンの摂取によって抑制することがわかった (Fig. 1)。また、IRS-1の分解とユビキチン化、MAFbx/atrogen-1とMuRF-1の発現も有意に抑制された (Fig. 2 & data not shown)。

キモトリプシン処理によるCblin様ペプチド放出の検討

Cblin様ペプチドをタンデムに組み込んだ配列が消化酵素によって分解され、目的とするCblin様ペプチドが放出されるかを検討した。大腸菌たん白質発現系で誘導発現させたたん白質を精製し、キモトリプシンを用いて消化処理を行った。除たん白質をしたサンプルをHPLCで検出したところ、キモトリプシン反応前に見られたピーク I (Fig. 3A) はキモトリプシンによる分解によって減少し、多くの分解産物のピークが現れた (Fig. 3B)。このうち、最も高いピークとして検出されたピーク II を質量分析に供したところ、目的としていたQDGYMPWの配列の分子量が検出された (data not shown)。

考 察

我々は、これまでの研究によりCbl-bとIRS-1の結合を阻害することで筋萎縮を防ぐペプチドCblin (DGpYMP) を開発した。このCblinと類似した配列を含む食材を探索したところ、大豆グリシニン前駆体のアミノ酸配列には、このペプチドと類似した配列 (DI/

FYNP) が含まれていた。坐骨神経切除マウスにグリシニンを摂取させたところ、グリシニンの摂取により筋湿重量および筋線維横断面積の減少が抑制されていた。また、Cbl-bユビキチンリガーゼ活性によって起こるIRS-1の分解とユビキチン化、およびMAFbx/atrogen-1とMuRF-1の発現も有意に抑制された。以上のことから、グリシニンは筋萎縮予防効果を持つことが示唆された。しかしながら、今回摂取させたグリシニンはたん白質の状態であり、体内で目的とするペプチドまで分解され吸収されたかどうかということは明確でない。今後、ペプチド化させた分離大豆たん白質 (SPI) による摂食試験により、より詳細な大豆由来の

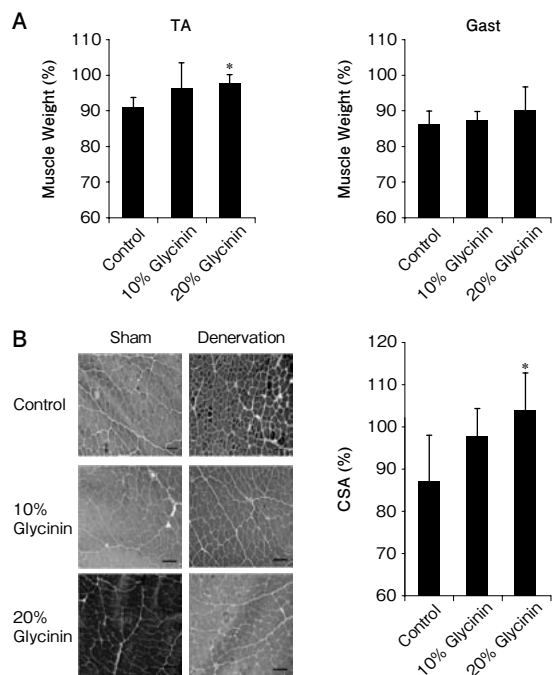


Fig. 1. Effect of dietary soy glycinin protein on denervation-induced decrease in muscle wet weight and muscle cross-sectional area. Muscles were isolated 4 days after operation. A: Wet weight of muscles was measured. Data are mean $\pm$ SD (n=5). * p <0.05, significant differences evaluated by the Shirley-Williams' multiple comparison test. Gast, gastrocnemius muscle; TA, tibialis anterior muscle. B: Sections of TA muscle were stained with H&E. Cross-sectional areas (CSA) of myofibers were measured. Scale=100 μ m. The average value in denervation and sham operation are indicated by solid line and line, respectively. Data are mean $\pm$ SD (n=5). * p <0.05, versus control diet.

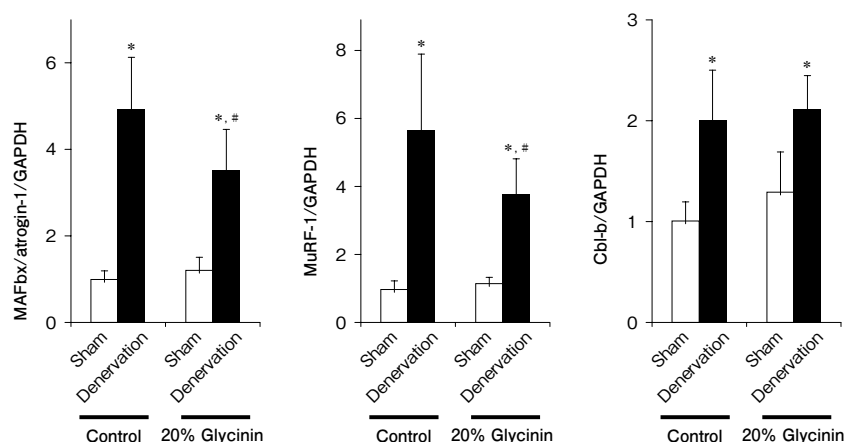


Fig. 2. Effect of dietary soy glycinin protein on atrogenes expression in denervated muscle. Total RNA was extracted from homogenates of TA muscles isolated on the indicated days after denervation. The levels of MAFbx/atrogenin-1, MuRF-1, Cbl-b mRNA in TA muscle measured by real-time RT-PCR. Data are means $\pm$ SD (n=5). * p <0.05 versus sham operation; # p <0.05 versus control diet in denervated muscle.

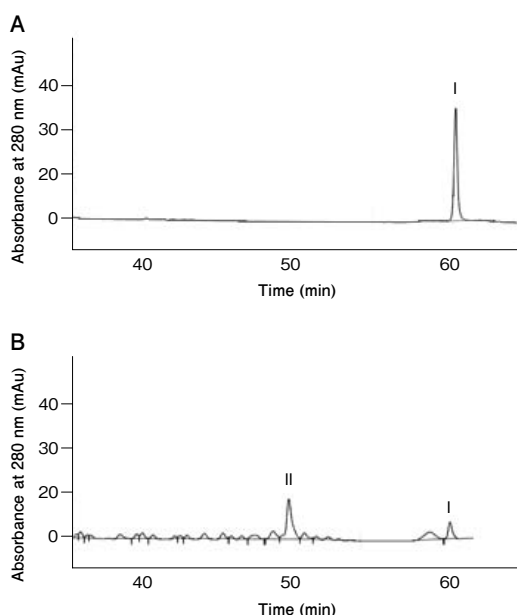


Fig. 3. Reverse-phase HPLC (RP-HPLC) profiles of the digests of protein containing Cblin-like peptide sequences by the chymotrypsin. Digestion of protein (100 μ g/mL) was performed at 37°C in 50 mM Tris/HCl buffer, pH8.0, containing 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl_2 . (A) is before digestion, (B) is after. For RP-HPLC analysis, the linear gradient was 30% to 50% acetonitrile in 40 min at a flow rate of 1.0 mL/min at room temperature.

ペプチドによる筋萎縮阻害効果を検討していく。このように、食材には筋萎縮を予防しうるアミノ酸配列が含まれることが明らかとなったが、食材本来に含まれるこのような配列はたん白質1分子あたり1ヶ所程度と極僅かであった。そこで、我々は消化によりCblin様ペプチドが多量に放出される配列を、イネのグルテリン配列に組み込むことを試みた。消化酵素であるキモトリプシンは、芳香族アミノ酸を認識し、アミノ酸配列を切断することがわかっている。この性質を利用し、Cblin様ペプチド (DGYMP) の配列をトリプトファンとグルタミンで挟んだ配列 (QDGYMPW) とし、さらにタンデムに10個程度繋げた配列をもつイネおよび大腸菌株を作成した。大腸菌たん白質発現系から精製したたん白質をキモトリプシン処理したところ、目的とするQDGYMPW配列のペプチドを確認できた。実際に、分解産物のIRS-1ユビキチン化阻害効果を培養細胞系ユビキチネーションアッセイにて検討したところ、高濃度のペプチドが必要となるが、ユビキチン化阻害効果を示した (data not shown)。今後、作成したイネを用いて摂食試験を開始していく予定である。近年、さまざまな効果をもつペプチドが発見され、特定保健用食品やスポーツ選手の間で摂取されているプロテインなどに利用されている。大豆には筋肉の酸化ストレスとの関連が報告されているBBIC (Bowman-Birk inhibitor concentrate) や骨量の維持・増加に必須の働きを持つゲニステインなどの成分も含まれ⁶⁾、その利用は廃用性筋萎縮の解決に強く結びつくことが明らかである。今後も研究を進め、寝たきりの患者や様々な神経筋変性疾患の患者のQOL向上に貢献したい。

要 約

骨格筋の萎縮は、無重力環境や寝たきりなどの様々な病態によって引き起こされ、多くの人が苦しんでいる重大な問題である。しかしながら、その効果的な治療・予防法は未だに確立されていない。そこで我々は、この筋萎縮に対する栄養学的な予防法の開発を目指している。これまでの研究で、無重力環境において発現が増大するユビキチンリガーゼCbl-bが、筋細胞の成長に重要なIGF-1シグナル経路のシグナル分子であるIRS-1 (insulin receptor substrate-1) をユビキチン化し、その分解を促進することが筋萎縮を引き起こす原因の一つであることを明らかとした。さらに、IRS-1のアミノ酸配列を基に合成したペプタド (Cblin: Cbl-b inhibitor) は、*in vitro*および*in vivo*においてCbl-bによるIRS-1のユビキチン化および分解を抑制し、筋萎縮を抑制することを見出した。本研究では、食材本来に含まれるアミノ酸配列の中に、Cblinに類似したものがないかを探索した。興味深いことに、大豆グリシニンには、このCblinに類似した配列 (DI/FYNP) が含まれていた。そこで、坐骨神経切除マウスに、グリシニンを摂食させたところ、筋萎縮が有意に抑制されることを確認した。しかしながら、一般的な食物たん白質1分子には、Cblin様ペプタドはわずか1分子しか含まれておらず、経口摂取によりCblinペプタドが筋萎縮予防効果を発揮することは非常に難しい。そこで、我々は消化により多数のCblin様ペプタドが作られるようにCblin様配列をタンデムにイネのグルテリンへ組み込んだ。そして、発現させたたん白質は、キモトリプシンによる切断を受け、抗ユビキチン化活性を有するペプタドを放出することを確認した。以上の結果から、Cblinを基にした筋萎縮の予防を試みる本研究は、宇宙食や抗老化食の開発に繋がると考えられた。

文 献

- 1) Thomason DB, Biggs RB and Booth FW (1989): Protein metabolism and β -myosin heavy chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol*, **257**, R300-R305.
- 2) Tischler ME, Rosenberg S, Satarug S, Henriksen EJ, Kirby CR, 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.
- 3) 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.
- 4) 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 and Yasui N (2006): Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-1 signaling in osteoblasts during denervation. *J Bone Miner Res*, **21**, 722-734.
- 5) Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibara A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S and Nikawa T (2009): Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol*, **29**, 4798-4811.
- 6) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.