

廃用性筋萎縮とアミノ酸

越智 ありさ, 北畑 香菜子, 二川 健

骨格筋は、絶えずタンパク質の合成と分解を行う組織である。そのバランスが壊れたとき、骨格筋量は大きく変化する。骨格筋への機械的負荷の減少が続くと、骨格筋量の減少および機能の低下を起こす。これを、廃用性筋萎縮と呼ぶ。寝たきり患者の増加に伴い、廃用性筋萎縮の予防・治療法の開発が望まれるが、その有効な方法はいまだに確立していない。本報では、これまでに報告された廃用性筋萎縮と筋タンパク質の構成物質であるアミノ酸との関連について、および我々が行ってきたペプチドによる廃用性筋萎縮の予防・治療法の開発について紹介する。

1. はじめに

廃用性筋萎縮とは、寝たきりや無重力環境下など筋肉への機械的な負荷の減少が長期にわたり続くことで引き起こされる筋萎縮のことである。超高齢化社会を迎えた我が国において、寝たきり患者は増加の一途をたどっており、患者に起こる廃用性筋萎縮は、介護問題や医療費の増大など社会的な問題となっている。しかしながら、現在行われている廃用性筋萎縮に対する予防・治療法は、レジスタントトレーニング、いわゆる筋力トレーニングのみであり、食事療法や薬物療法もいまだその効果が確立していない。また、筋萎縮は、絶食やアミノ酸飢餓によっても起こることから、骨格筋の維持にとってエネルギーやアミノ酸が必須であることは明らかである。

2. 筋タンパク質の合成と分解

筋タンパク質は、常に合成（同化）と分解（異化）を繰り返す。そのバランスが均等であることで、骨格筋量は保たれている。そのバランスに大きく関与するのが、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) シグナル経路である。IGF-

1は、成長ホルモンや運動刺激に反応して、肝臓や筋細胞、骨芽細胞で合成される^{1,2)}。IGF-1がその受容体に結合すると、内在するチロシンキナーゼが活性化され、自己リン酸化される。そのリン酸化チロシンに insulin receptor substrate-1 (IRS-1) が結合し、IRS-1 がリン酸化される。リン酸化された IRS-1 は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) に結合し活性化を起こし、活性化された PI3K はさらに、Akt-1/protein kinase B (PKB) の活性化を起こす。Akt-1/PKB の活性化により、その下流にある Forkhead box O (FOXO) 転写因子がリン酸化され、FOXO はリン酸化により、その核内移行が妨げられるため、筋萎縮関連遺伝子である Atrogin-1 や MuRF-1 の発現は抑制される。一方で、Akt-1/PKB の活性化は、タンパク質合成に重要である mammalian target of rapamycin (mTOR) の活性化を誘導し、筋肉を肥大させる (図 1)。

mTOR は、栄養を感知してタンパク質合成を促進するリン酸化シグナルカスケードの鍵となるセリン/スレオニンキナーゼであり、rapamycin 感受性やシグナル伝達が違う mTOR complex (mTORC)1 と mTOR2 の二つの複合体を形成する。このうち、Akt/PKB の経路によって活性化されるのは、mTORC1 である。mTORC1 は、raptor および G protein beta subunit-like (GβL) を含む 6 種のタンパク質からなり、その標的タンパク質として、eIF-4E binding protein (4E-BP) と S6 kinase (S6K) が報告されている。mTOR によりリン酸化された S6K は、mRNA のリボソーム 40S サブユニットへの結合を促進し、タンパク質合成を増加させる。一方で、mTORC1 によりリン酸化された 4E-BP は eIF4E から解離し、翻訳開始が活性化され、タンパク質合成が増加する (図 2)。

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野 (〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15)

Skeletal muscle atrophy and amino acid

Arisa Ochi, Kanako Kitahata and Takeshi Nikawa (Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, Tokushima University, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan)

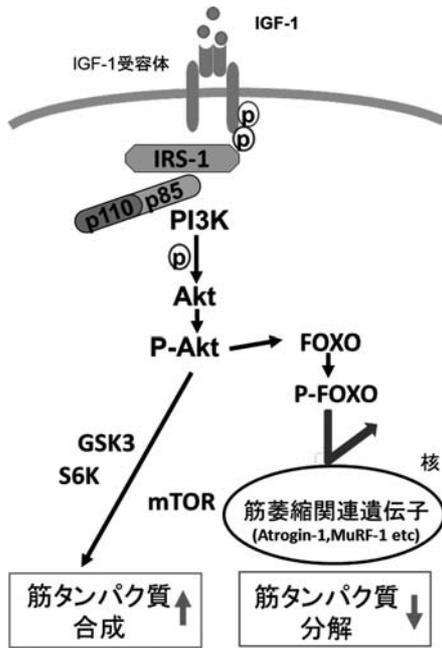


図1 IGF-1 シグナル
 ○p: リン酸. GSK3: glycogen synthase kinase 3, S6K: S6 kinase.

寝たきりや無重力下など、廃用性筋萎縮が起こる状況では、この IGF-1 シグナルの減弱や IGF-1 抵抗性が起こることにより、FOXO の核内移行増加による筋分解の亢進や、mTOR シグナル減弱による筋タンパク質合成の低下が起こり、筋萎縮が引き起こされる。

3. タンパク質合成と分岐鎖アミノ酸

食餌中のタンパク質由来アミノ酸が翻訳開始段階の活性化をもたらす、タンパク質合成を亢進させる重要な役割を担うことが、報告されている^{3,4)}。その中でも、分岐鎖アミノ酸であるロイシン、イソロイシンは、4E-BP および S6K のリン酸化の促進を介して翻訳開始を活性化し⁵⁾、ロイシンはイソロイシンよりも高い効果を示すことが明らかとなっている⁵⁾。前節で述べたように、4E-BP と S6K はともに mTOR シグナルの下流に位置し、ロイシンとイソロイシンの翻訳開始の活性化は、mTOR を介している。興味深いことに、分岐鎖アミノ酸の翻訳開始活性化は、IGF-1 シグナルを介さず行われることが、インスリン分泌不全糖尿病ラットへのロイシン投与から示されている⁶⁾。分岐鎖アミノ酸が mTOR シグナルを活性化させる経路としてあげられているのが、Ras homolog enriched in brain (Rheb) である。Rheb は、GTPase の一種であり、その強発現は、4E-BP と S6K のリン酸化を増加させることから、mTOR シグナル活性化因子と考えられている⁷⁾。近年、Rheb が mTORC1 複合体の構成タンパク質の一つである GβL と直接結合すること⁸⁾、そして、その結合がアミノ酸によって調節されること⁹⁾が報告されている。mTORC1 と Rheb の結合は、ロイシンの欠乏により低下し、再添加により回復

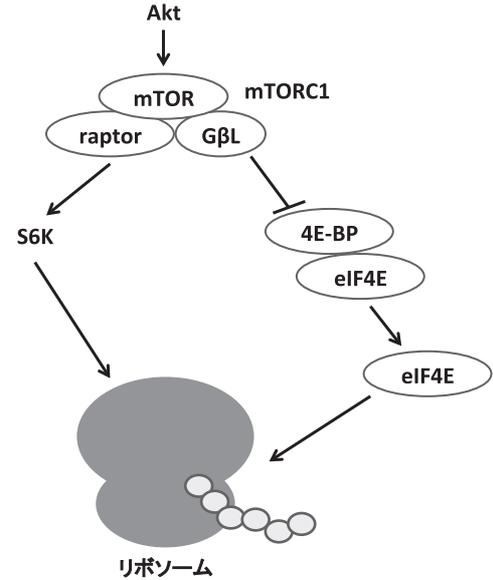


図2 mTORC1 活性化による翻訳活性化

すること⁹⁾から、分岐鎖アミノ酸によるタンパク質合成促進効果は、Rheb の経路を介することが示唆されている。しかしながら、分岐鎖アミノ酸が Rheb と mTOR の結合にどのように影響するかは、いまだ解明されていない。

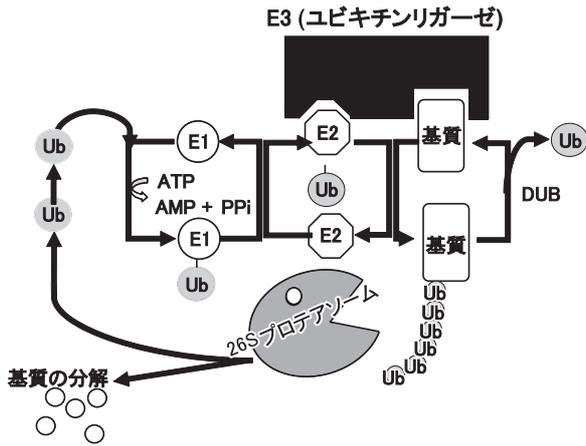
また、ロイシンには、インスリン分泌刺激作用があることが報告されており¹⁰⁾、ロイシンの経口投与は、血中のインスリン濃度を上昇させる。近年、このロイシンの作用は、glutamate dehydrogenase (GDH) の活性化を介するものであることが明らかとなった¹¹⁾。GDH は、グルタミン酸から α-ketoglutarate を産生し、NADH 比を上昇させインスリン分泌シグナルを促進する。以上のことより、ロイシンは、インスリンシグナルを増加し、翻訳開始を促進する、筋タンパク質合成を支えるアミノ酸であるといえる。

4. 廃用性筋萎縮とユビキチンリガーゼ Cbl-b

我々は、宇宙フライトを行ったラットの腓腹筋を解析し、無重力環境における筋タンパク質の分解の亢進にユビキチン・プロテアソーム系が重要な働きをしていることを明らかにした¹²⁾。また、DNA マイクロアレイ法で網羅的に検討を行ったところ、ユビキチンリガーゼである Casitas B-lineage lymphoma b (Cbl-b) の発現が顕著に上昇し、IGF-1 シグナルの重要な細胞内シグナル分子である IRS-1 の減少や Akt のリン酸化の減少を確認した¹³⁾。ユビキチンリガーゼは、筋タンパク質の主要な分解系のユビキチン・プロテアソーム系において、律速酵素として働く。ユビキチン・プロテアソーム系は、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3) から構成された複合酵素群により、分解すべきタンパク質をユビキチン鎖で標識するシステムのことである(図3)。概説すると、E1 は ATP のエネルギーを利用して、E1 分子内のシステイン残基とユビキチン C 末端のグリシン残

基との間にチオエステル結合を形成する。次に、このユビキチンのC末端カルボキシ基がE2分子のシステイン残基とイソペプチド結合し、E2にユビキチン分子が転移する。最後に、E2結合ドメインと基質タンパク質結合ドメインを有するユビキチンリガーゼ分子上で、ユビキチンは基質タンパク質のリシン残基にイソペプチド結合する。このとき、Cbl-bを含む、RING型ユビキチンリガーゼでは、RINGドメインがE2との結合部位である。これらの反応を繰り返すことにより、多数のユビキチン分子（ポリユビ

キチン鎖）がつながった基質タンパク質が形成される。ポリユビキチン鎖が結合したタンパク質を26Sプロテアソームが認識し分解する。そして、ユビキチンリガーゼCbl-bの基質タンパク質は、萎縮筋内で減少していたIRS-1である。また、Cbl-bを強発現した培養細胞においても、Cbl-bはIRS-1と結合しIRS-1のユビキチン化と分解を亢進した¹⁴⁾。さらに、ラットの前脛骨筋にCbl-bを強発現させた場合にも、Cbl-bはIRS-1のユビキチン化を促進し筋萎縮を誘導した¹⁴⁾。以上の知見から、我々はCbl-bが筋萎縮においてIRS-1のユビキチン化および分解を促進する、廃用性筋萎縮の原因酵素の一つであると考えた。



Ub: ユビキチン
DUB: 脱ユビキチン化酵素

図3 ユビキチン・プロテアソーム系

5. ペプチドによる廃用性筋萎縮阻害

先に述べたように、Cbl-bは、IRS-1をユビキチン化し分解を促進することで、IGF-1シグナルを負に制御する。そこで我々は、Cbl-bとIRS-1の結合を防ぐことが筋萎縮の予防・治療につながるのではないかと考えた。一般に、ユビキチンリガーゼは、基質の一部（ペプチド）の立体構造を認識して結合する。また、Cbl-bを含むCblファミリーは主に基質タンパク質のリン酸化チロシン残基を認識して結合することが報告されている¹⁵⁾。そこで、IRS-1のアミノ酸配列のうち、IGF-1シグナル伝達に伴って起こるリン酸化チロシン部位を中心とした五つのアミノ酸からなるペプタペプチドを作製した（図4）。このうち、[Asp-

```

      .....
MASPPD TDGF SDVRK VGYLR: KP KSMHKRFF VLRAASEAGG PARLEYEENE
KKWRHKSSAP KRSI PLES CF NIN KRADSKN KHLVALYTRD EHFAIADSE 100
AEQDSWYQAL LQLHNRAKAH HDGAGGGGCGG SCSGSSGVGE AGEDLSYDTG
PGPAFKEVWQ VILKPKGLGQ TKNLIGIYRL CLTSKTI SFV KLNSEAAAVV 200
LQLMNI RRCG HSENF FFIEV GRSAVTGPGE FWMQVDDSVV AQNMHETILE
AMRAMSDEFR PRTKSQSSSS CSNPISVPLR RHHLNPPPS QVGLTRRSRT 300
ESITATSPAS MVGGKPGSFR VRASSDGE GT MSRPASVDGS PVSPSTNRTH
AHRHRGSSRL HPPLNHSRSI PMPSSRCSPS ATSPVSLSSS STSGHGSTSD 400
CLFPRRSSAS VSGSPSDGGF ISSDEYGGSS CDFRSSFRSV TPDSLGH TPP
ARGEEELS NY ICMGGKGAST LTAPNGHYIL SRGGNGHRYI PGATMG TSPA 500
LTGDEAAGAA DLNDRFRKRT HSAGTSPTIS HQKTPSQSSV VSIEEYEMM
PAA YPPGGGS GGRLPGYRHS AFVPTHSYPE EGLEMHHLER RGGHHRPDSS 600
NLHTI DGYMP MSPGVAPVPS NRKNGDYMP MSPKSVSAPQ QIINPIRRHP
QRVDPNGYMM MSPSGCSPD IGGGSCSSSS ISAAPSGSSY GKPWTNGVGG 700
HHTHALPHAK PPVESGGGKL LPCTGDYMM SPVGDSTSS PSECYGPED
PQH KPVLSYY SLPRSFKHTQ RPGEPEEGAR HQHLRLSSSS GRLRYTATAE 800
DSSSSTSSDS LGGGYCGARP ESSVTHPHHH ALOPHLPRKV DTAAQTNSRL
ARPTRLSLGD PKASTLPRVR EQQQQQQQQQ QSSLHPPEPK SPGEYVNI EF 900
GSGQPGYLAG PATSRSSPSV RCLPQLHPAP REETGSE EYM NNDLGPGRRA
TWQESGGVEL GRVGPAPPGA ASICRPTRSV PNSRGDYMTM QIGCPRQSYV 1000
DTSPVAPVSY ADMRTGIAAE KVSLPRTTGA APPPSSTASA SASVTPQGAA
EQAAHSSLLG GPQGGGMSA FTRVNLSPNH NQSAKVIRAD TQGCRRRHSS 1100
ETFSAPTRAA NTVSFGAGAA GGGSGGGSED VKRHSSASFE NVWLRPGDLG
GASKESAPGC GAAGGLEKSL NYIDLVDKDK VKQHPQDCPS QQQSLPPPPP 1200
HQPLGSNEGS SPRRSSEDL S TYAS I NFQKQ PEDRQ
      .....
    
```

図4 IRS-1アミノ酸配列およびペプタペプチド作製部位
作製部位を点線または実線の囲みで示す。

Gly-phospho-Tyr-Met-Pro] の配列を持つペプチド (図4, 実線で囲んだ部分) が, 無細胞系ユビキチン化システムにおいて IRS-1 ユビキチン化阻害効果の検討を行ったところ, IRS-1 のユビキチン化を抑制することを確認した¹⁴⁾. さらに, 坐骨神経切除を施したマウスの腓腹筋にこのペプチドを投与したところ, IRS-1 の分解を阻害し, 筋萎縮関連遺伝子の発現を抑制することを確認した¹⁴⁾. そこで, 我々は, このペプチドを Cbl-b の IRS-1 に対するユビキチン化活性を阻害することから Cblin (Cbl-b inhibitor) と名づけた.

この Cblin を筋萎縮阻害剤として実用化させるには, 立体構造を明らかにすることが重要であると考えている. これまでに, 同じ Cbl ファミリーの中で Cbl-b と相同性の高い c-Cbl の tyrosin kinase binding (TKB) ドメインと zeta-chain associated protein kinase 70 kDa (ZAP-70) の一部 [Ser-Asp-phospho-Tyr-Thr-Pro-Glu-Pro-Ala] の複合体の構造が報告されている¹⁶⁾. TKB ドメインは, Cbl-b と c-Cbl に共通する基質認識部位である. そこで, c-Cbl の TKB ドメインと ZAP-70 の複合体構造を基に, Cbl-b の TKB ドメインと Cblin との結合をモデリングしたところ, Cblin のリン酸化チロシンが基質認識部位に深く入り込むように結合することが示唆された (図5). 実際に, 精製した Cbl-b の TKB ドメインと Cblin の複合体結晶構造解析を, NMR タイトレーション法 (安定同位体で標識したタンパク質 A に対して, リガンドを徐々に添加して, NMR 測定を行い, その NMR スペクトル変化から A と B との相互作用を調べる実験である) を用いて行った結果, モデリング同様にリン酸化チロシン残基を中心に, いくつもの相互作用で両者が結合していることが示された (論文作成中).

6. 廃用性筋萎縮に対する大豆由来ペプチドの有効性

食品に含まれるタンパク質は, 消化を受けアミノ酸またはペプチドとして吸収される. 食品由来のペプチドの中には, 構成するアミノ酸の種類や配列の違いにより, 栄養機能以外の生理活性を持つものがある. 近年, 食品由来の生

理活性ペプチドが発揮する, 生理学的作用やホルモン様作用に関する研究が活発に行われている. これらのペプチドは, 乳, 卵, 魚類などの動物性タンパク質のみならず, 大豆などの植物性タンパク質からも得られることがわかっている. 食品由来の生理活性ペプチドは, 食品中に存在するときは活性を示さず, 生体内での消化反応や, 食品加工中の酵素処理等によってペプチドの形となったとき活性が生まれる. これらは一般的に2個から20個のアミノ酸からなるペプチドであるが, 20個以上のアミノ酸からなるペプチドも存在する. それらのペプチドには, 血圧降下作用, 抗酸化作用, 腸調整効果, 血中コレステロール低下作用, 骨密度増加作用, 免疫力増強作用など多彩な機能が報告されている. また, 食品由来のペプチドであるため, 副作用が少ないという安全性も持つ. このようなペプチドは, 高い機能性から, 特定保健用食品として認可されるなど, 機能性食品の成分として注目されている.

我々は, 廃用性筋萎縮に有効な機能性ペプチドが食品中に含まれないかを探索した. 大豆タンパク質には, 運動後の筋障害の軽減に有効であるという報告や, 長期摂取が筋肉量を増加させたという報告がある¹⁷⁾. そこで, 大豆ペプチドには, 廃用性筋萎縮に有効なペプチドが含まれるのではないかと考えた. 大豆に含まれる主要なタンパク質は, β -コングリシニン, グリシニン, 膜由来タンパク質が主成分となるリポフィリックプロテイン (LP) である. この三つの成分を大豆タンパク質から分離, 酵素処理によってペプチド化した. そして, Cblin の場合と同様に, HEK293 細胞を用いた培養細胞系ユビキチン化システムを用いて, Cbl-b ユビキチンリガーゼ活性に対する阻害効果の検討を行った. その結果, グリシニン由来のペプチドが最も Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化を抑制した¹⁸⁾. ただし, グリシニンによる Cbl-b ユビキチンリガーゼ活性阻害効果は, Cblin と比較すると非常に弱いこともわかった. 興味深いことに, グリシニンのアミノ酸配列を探索したところ, Cblin とよく似た配列 [Asp-Ile/Phe-Tyr-Asn-Pro] が含まれていた¹⁸⁾. そこで, この配列のペプチドを作製し, Cblin 様大豆ペプチドとしてユビキチン化阻害活性の

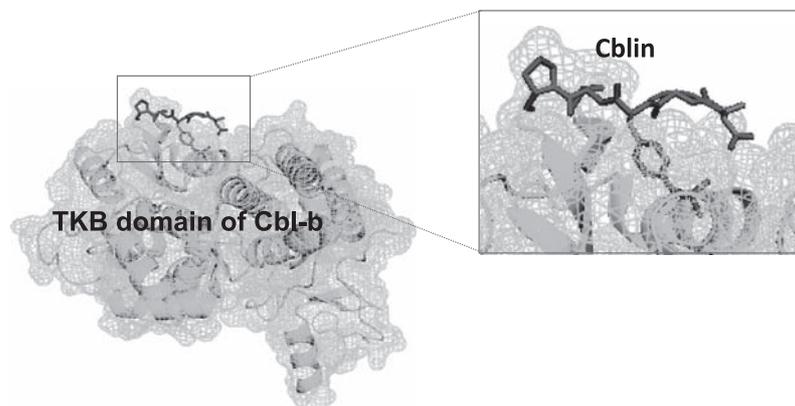


図5 立体構造モデルを用いた Cbl-b 基質認識部位 (TKB ドメイン) と Cblin の結合予測

検討を行った。その結果、Cblinと比較して、10倍の濃度を必要とするものの、Cblin様大豆ペプチドにおいても、Cbl-bによるIRS-1のユビキチン化を阻害することを確認した¹⁸⁾。大豆グリシニンタンパク質に含まれるこのペプチドが、廃用性筋萎縮に有効であるかを確認するため、坐骨神経切除マウスへの摂食実験を行った。その結果、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されることがわかった¹⁸⁾。以上の結果より、大豆に含まれるペプチドは、廃用性筋萎縮の予防・治療に有効な機能性ペプチドである可能性が考えられた。

7. おわりに

食品に含まれる分岐鎖アミノ酸やペプチドには、廃用性筋萎縮を阻害する効果がある。しかしながら、ペプチドによる廃用性筋萎縮阻害の実用化には、さらなる研究が必要である。ペプチドは、生体内で分解されてしまうため、大量の投与や分解を抑制する修飾等が必要となる。経口投与により筋萎縮の予防・治療効果が確認できれば、薬剤のような副作用の懸念が少なく、また日常の食事において長期的な摂取が可能となる。また、Cblinはユビキチンリガーゼを標的としているため、基質特異性が高い阻害も利点である。経口投与で筋萎縮を防ぐことは、寝たきりの患者に応用できるだけでなく、宇宙飛行士の限られた宇宙滞在をより有意義なものにできるだろう。

謝辞

本研究は、JAXA（宇宙航空研究開発機構）MyoLab宇宙実験のためのJAXAからの支援とJSF（日本宇宙フォーラム）による地上公募研究助成金、および農林水産省生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業からの支援により行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

著者寸描

●越智ありさ（おち ありさ）

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野 博士後期課程3年。

■略歴 1987年愛媛県に生る。2010年徳島大学医学部栄養学科卒業。

■研究テーマと抱負 廃用性筋萎縮を防ぐ薬剤および機能性食材の開発。

■ホームページ <http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/seitaieiyou/>

文 献

- 1) Sadowski, C.L., Wheeler, T.T., Wang, L.H., & Sadowski, H.B. (2001) *Endocrinology*, 142, 3890–3900.
- 2) Goldspink, G., Williams, P., & Simpson, H. (2002) *Clin. Orthop. Relat. Res.*, S146–S152.
- 3) Yoshizawa, F., Nagasawa, T., Nichizawa, N., & Funabiki, R. (1997) *J. Nutr.*, 127, 1156–1159.
- 4) Yoshizawa, F., Kimball, S.R., Vary, T.C., & Jefferson, L.S. (1998) *Am. J. Physiol.*, 275, E814–E820.
- 5) Anthony, J.C., Yoshizawa, F., Anthony, T.G., Vary, T.C., Jefferson, L.S., & Kimball, S.R. (2000) *J. Nutr.*, 130, 2413–2419.
- 6) Anthony, J.C., Lang, C.H., Crozier, S.J., Anthony, T.G., MacLean, D.A., Kimball, S.R., & Jefferson, L.S. (2002) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282, E1092–E1101.
- 7) Castro, A.F., Rebhun, J.F., Clark, G.J., & Quilliam, L.A. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 32493–32496.
- 8) Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J. (2005) *Curr. Biol.*, 15, 702–713.
- 9) Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y., & Avruch, J. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 23433–23436.
- 10) Sener, A. & Malaisse, W.J. (1981) *J. Clin. Invest.*, 11, 455.
- 11) Fahien, L.A. & Macdonald, M.J. (2011) *Diabetes*, 60, 2450–2454.
- 12) Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., Kitano, T., Baldwin, K.M., Izumi, R., Towatari, T., Teshima, S., Rokutan, K., & Kishi, K. (2001) *FASEB J.*, 15, 1279–1281.
- 13) Nikawa, T., Ishidoh, K., Hirasaka, K., Ishihara, I., Ikemoto, M., Kano, M., Kominami, E., Nonaka, I., Ogawa, T., Adams, G.R., Baldwin, K.M., Yasui, N., Kishi, K., & Takeda, S. (2004) *FASEB J.*, 18, 522–524.
- 14) Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., Yamada, C., Ohno, A., Okumura, Y., Nonaka, I., Yasutomo, K., Baldwin, K.M., Kominami, E., Higashibata, A., Nagano, K., Tanaka, K., Yasui, N., Mills, E.M., Takeda, S., & Nikawa, T. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, 29, 2798–2811.
- 15) Thien, C.B. & Langdon, W.Y. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 294–307.
- 16) Mengv, W., Sawasdikosol, S., Burakoff, S.J., & Eck, M.J. (1990) *Nature*, 398, 87–90.
- 17) Masuda, K., Maebuchi, M., Samoto, M., Ushijima, Y., Uchida, Y., Kohno, M., Ito, R., & Hirotsuka, M. (2007) 日本臨床スポーツ医学会誌, 15, 228–235.
- 18) Abe, T., Kohno, S., Yama, T., Ochi, A., Suto, T., Hirasaka, K., Ohno, A., Teshima-Kondo, S., Okumura, Y., Oarada, M., Choi, I., Mukai, R., Terao, J., & Nikawa, T. (2013) *Int. J. Endocrinol.*, 2013, 907565.