

卵白由来の新規プロテアーゼ阻害栄養素を用いた 筋萎縮予防法の開発

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授 二川 健

■ 緒 言

長期臥床や無重力状態の持続した状態では、筋肉は萎縮し、しばしば線維化を伴う筋変性がみられる。しかしながら、一度萎縮した筋肉を薬剤等で回復させることは容易ではなく、現在のところリハビリが唯一の回復手段と言われている。私達はこれまで、筋肉の活動状態によって変動し、筋サイズの決定に携わる生理活性物質(ミオスタチン)¹⁾の制御機構に着目した研究を続けてきた。ミオスタチンは細胞内で前駆体(不活性型)として合成され細胞膜上へ輸送された後、プロテアーゼによる切断を受け、活性型に変換される²⁾。つまりミオスタチンは、筋肉の低活動状態の持続に応答し、プロテアーゼによって活性化・放出されることで、自己または周囲の細胞の増殖・分化を負に制御していると考えられる。ミオスタチン活性化プロテアーゼを特定し、その阻害栄養素による制御機構を明確にすることは、ミオスタチンを介した筋量調節を制御しうるものである。酵素阻害栄養素が豊富に存在する卵白タンパク質からミオスタチン活性化酵素阻害栄養素を高効率に抽出(精製)する方法を確立し、その摂取が筋萎縮の治療に有効であることを実証することで、薬物療法による回復が困難とされる筋萎縮に対し新たな予防・治療法が開発されるものと信じる。

■ 方 法

まず、培養細胞レベルでの機能解析を主に行い、その発展系として個体レベルの解析を行う。具体的には、

(1)安定発現細胞株を用いた解析:ミオスタチン安定発現細胞株にミオスタチン活性化の候補である各種酵素遺伝子を発現させ、得られた培養上清および Cell lysate 中の活性型ミオスタチン産生の有無を評価した。また、ミオスタチン活性化プロテアーゼおよびミオスタチン安定発現細胞株を用い、この細胞を模擬微小重力環境に暴露した(重力ストレスを与えた)際、プロテアーゼ活性量や発現量および活性型ミオスタチン量の変化を解析した。さらに、ミオスタチン活性化プロテアーゼに対する阻害栄養素をミオスタチン安定発現細胞株に作用させ、細胞増殖・分化への効果を評価した。同時に、より特異性の高い阻害栄養素を探索した。

(2)阻害栄養素の化学特性:現行の精製行程を見直し、卵白からの効率の高い抽出法を検討した。ミオスタチン活性化プロテアーゼに対する阻害効果を指標に、取量ならびに化学特性を検討した。

(3)筋萎縮モデルマウスを用いた解析(個体レベルの機能解析):マウスを尾部懸垂または坐骨神経切除術に供し、細胞における模擬微小重力環境を後肢筋で再現する。その際、阻害栄養素含有食の効果を、骨格筋組織の応答性(筋萎縮への抵抗性)や萎縮関連タンパク質の発現変動により評価し、含有量、摂食期間の最適化を検討する。

■ 結 果

(1)ミオスタチン活性化酵素の特定と重力ストレス応答

ミオスタチン活性化酵素は、ミオスタチン分子内のプロセッシング部位(-RSRR- 配列)を特異的に認識できる酵素であることが必須である。各種候補酵素遺伝子を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ト法で解析した結果、膜結合型セリンプロテアーゼである MSPL³⁾および PC ファミリーメンバーである Furin によって、活性型ミオスタチン産生を認めた(図 1)。次に、模擬微小重力環境に暴露した際の活性化酵素の応答として mRNA 発現の変化も検討した。コントロールとして、静置培養を同時に行ったものを用いた。結果、MSPL、Furin に関しては、重力ストレス応答による mRNA 発現量の変化に有意差は認められなかった(図 2)。

(2)阻害栄養素添加による分化抑制の解除

ミオスタチン安定発現株に対し、酵素阻害栄養素を一定濃度で添加し、細胞増殖・分化への影響を検討した。ミオスタチン安定発現細胞は分化誘導してもほとんど分化しない。興味深いことに、阻害栄養素添加群では細胞の一部に筋管形成がみられ、ミオスタチン活性化が部分的に阻害されたために、

ミオスタチンによる分化抑制が解除されることがわかった(図 3)。

(3) 阻害栄養素の化学特性：阻害栄養素である卵白タンパク質からの高効率抽出(精製)は卵白タンパク質どうしの結合が強く単一タンパク質の精製が難しいが、今後も引き続き改良法を検討していく予定である。

(4) 筋萎縮モデルマウスを用いた解析(個体レベルの機能解析)：卵白タンパク質から阻害栄養素を大量に精製できれば、すぐにでも筋萎縮モデルマウスに食餌として投与する予定である。一方、並行して作製していたミオスタチン活性化酵素 MSPL のノックアウトマウスの樹立に成功したので、本マウスの骨格筋組織の応答性(筋萎縮への抵抗性)を現在解析中である。

■ 考 察

ミオスタチン発現細胞に種々の活性化酵素を発現させ活性型ミオスタチン産生量を測定した結果、ミオスタチン活性化酵素としてセリンプロテアーゼである MSPL と Furin を同定した。前者は膜結合型でトリプシン型セリンプロテアーゼであり、後者はサブチリシン型セリンプロテアーゼである PC (proprotein convertase)ファミリーメンバーに属する。ともに、プロセッシング部位が-RSRR- 配列であるが、若干阻害剤のスペクトラムが異なる。卵白タンパク質にはセリンプロテアーゼ阻害タンパク質が多いと考えられるので、将来的にはそれぞれに特異的な阻害タンパク質を見出したい。

以前に、ミオスタチン mRNA 発現量は重力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重力ストレスによる mRNA の増加は見られなかった。活性型ミオスタチンの増大は、重力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、既存するミオスタチン前駆体の活性化酵素によるプロセッシング自体が増大したことによると考えられた。

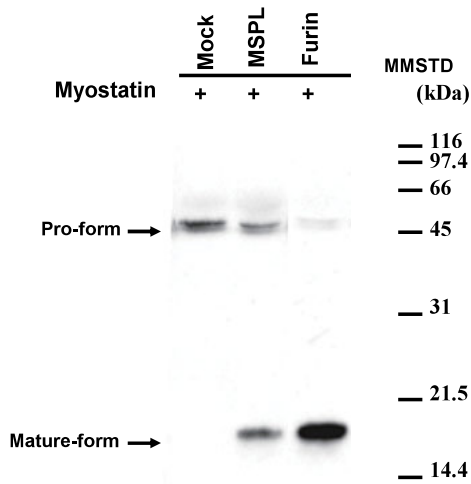
全く分化しないミオスタチン安定発現株に酵素阻害栄養素を添加すると、一部ではあるが筋管細胞への分化が認められた。これは、ミオスタチン活性化酵素を阻害すれば筋細胞の分化を促進することを初めて示した結果であり、筋量増大による廃用性筋萎縮の予防・治療への可能性が大であると考えられた。

■ 要 約

骨格筋は機械的(重力)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ストレスを感知し、萎縮するかについてはほとんど解明されていない。私達はこれまで、筋肉の活動状態によって変動し、筋サイズの決定に携わる生理活性物質(ミオスタチン)の制御機構に着目した研究を続けてきた。筋量決定分子であるミオスタチン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(プロセッシング)。本研究によって、このミオスタチンの切断は、生体内でも特異的な酵素によってなされる確証を得た。よって、この酵素の阻害栄養素は筋量の調節つまり筋萎縮の治療に有効である可能性が高い。さらに、培養細胞レベルでの機能解析から、重力変動によって変化するのはミオスタチンや活性化酵素の mRNA 発現量ではなく、むしろ活性型プロテアーゼ量の変動に依存した活性型ミオスタチン量の変化によるものであることが明らかとなった。これは、ミオスタチンの制御が、活性化酵素の阻害栄養素で制御しうることを明らかにしたものである。早急に阻害栄養素の卵白からの高効率抽出(精製)法を確立し、個体レベルの機能解析による有効性を実証したい。

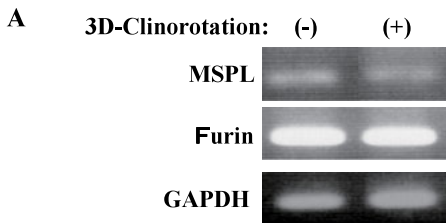
■ 文 献

1. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. (1997) *Nature*. 387: 83-90.
2. Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. (2008) *J Biol Chem*. 283: 7027-7035.
3. Kido H, Okumura Y. MSPL/TMPRSS13. (2008) *Front Biosci*. 13: 754-758.



各種酵素遺伝子 (MSPL, Furin) およびミオスタチン (Myostatin) 遺伝子をトランスフェクションした細胞の培養上清を回収し、ウエスタンブロット法により活性型ミオスタチン産生の有無を解析した。MMSTD; 分子量基準。矢印 (→) は、Pro-form; ミオスタチン不活性前駆体、Mature-form; 活性型ミオスタチンを示す。

図1 各種プロテアーゼによるミオスタチン活性化



C2C12 マウス筋芽細胞を模擬微小重力環境下 (3D-Clinorotation; R(+)) または静置 (R(-)) にて 24 時間培養した後、total RNA を抽出、cDNA を合成し、各種酵素遺伝子発現量を PCR 法 (A) 及び Real-time PCR 法 (B) により解析した。各群における酵素遺伝子発現量は内部標準として用いた GAPDH 量で補正し比較した。

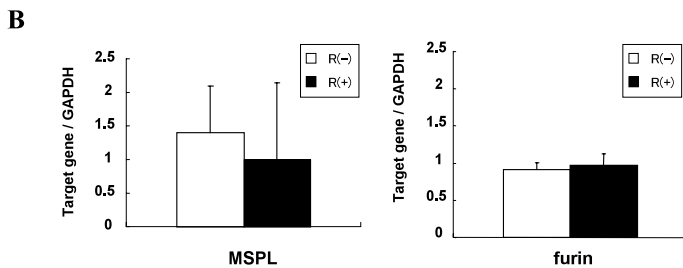
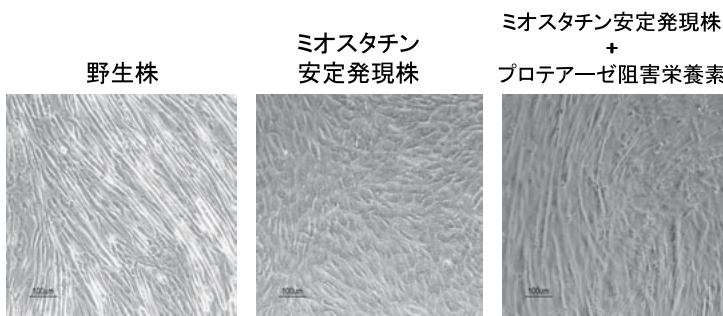


図2 模擬微小重力環境下におけるミオスタチン活性化酵素遺伝子の発現量変化



ミオスタチン安定発現株の増殖培地を、阻害栄養素を添加した 2% 馬血清を含む分化誘導培地に切り替え培養を継続した。その際の細胞増殖・分化の状態を顕微鏡下で観察した。分化誘導後 5 日目の細胞の様子を図に示す。ミオスタチン安定発現株の樹立に用いた野生株および阻害栄養素非添加の細胞株を対照とした。

図3 ミオスタチン活性化阻害栄養素による細胞増殖・分化への影響