

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 18 年度博士課程進学  
氏名 小山 傑  
指導教員名 阿部啓子

### 論文題目

筋特異的 RING-Finger タンパク質 MuRF1 による筋細胞代謝恒常性維持機構の解析

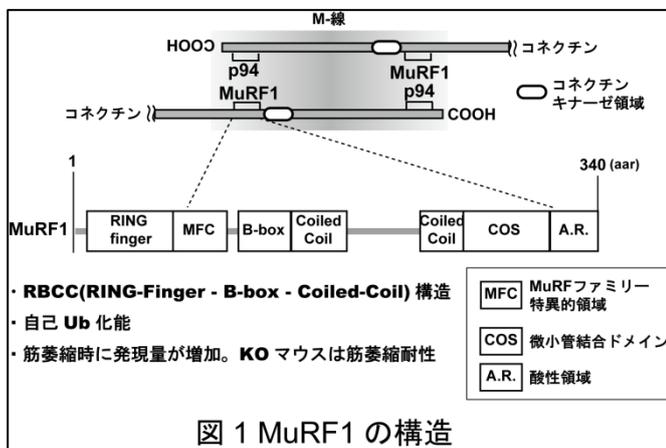
#### <背景・目的>

骨格筋は、形態維持や運動などの物理的な機能に加え、代謝調節器官としての機能も有する。骨格筋は大量の糖の消費やグリコーゲンの貯蔵により血糖値の調節に関与するとともに、膨大な量のアミノ酸貯蔵庫としても機能している。例えば、飢餓などの低栄養条件下では、骨格筋中の筋タンパク質分解量が昂進し、その結果生じたアミノ酸が血流に乗り全身に運ばれ、新たなタンパク質合成原やエネルギー源として利用されている。このように、骨格筋における筋タンパク質分解は生体の代謝恒常性維持に非常に重要である。その一方で、過剰な筋タンパク質分解は筋萎縮を引き起こす。筋萎縮は、寝たきりの生活やギブス固定、あるいは癌などの様々な病気によっても生じる、筋細胞の径の減少と筋力低下を主症状とする病態である。筋萎縮は日常生活を送る上で大きな障壁となるため、その分子メカニズムを明らかにすることは予防や治療法の開発といった観点からも非常に重要である。

筋細胞質内のタンパク質の分解には、主にユビキチン (Ub) -プロテアソーム系、オートファジー-リソソーム系、カルパイン系という三つの系が協調的に働いている。筋細胞には、その細胞質の大部分が収縮駆動装置である筋原線維という非常に密な構造体によって占められているという特徴がある。そこで、まずカルパイン系の作用により筋原線維構造が解きほぐされ、続いて Ub-プロテアソーム系、オートファジー-リソソーム系が筋原線維構成タンパク質を分解消去していると考えられている。近年、これらの分解系が筋萎縮誘導時においても重要な役割を担っていることが示されてきている。その中でも、特に MuRF1 (Muscle RING-Finger

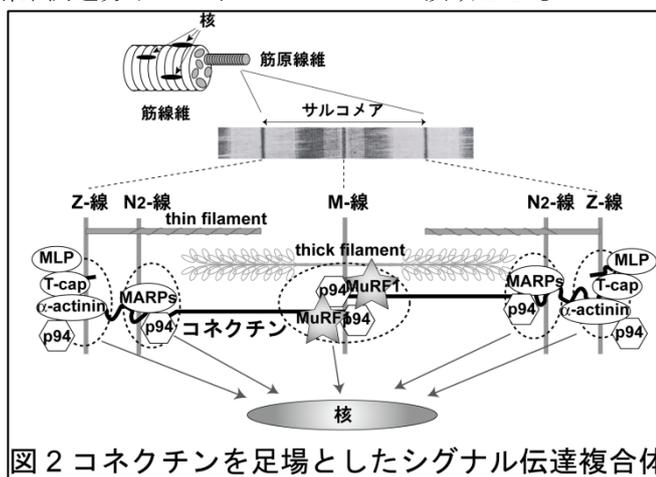
Protein-1) および atrogin-1/MAFbx (Muscle atrophy F-box) という二つの Ub リガーゼ (Ub-E3) が様々な筋萎縮誘導条件下において中心的役割を担っていることが示唆されており、その機能に注目が集まっている。

MuRF1 は、N 末端側から RING-Finger ドメイン、B-box ドメイン、Coiled-coil モチーフで構成される、RBCC タンパク質の 1 つである (図 1)。RBCC タンパク質の多くが Ub-E3 として機能しており、MuRF1 も *in vitro* において自己 Ub 化能を有することが報告されている。また、多くの筋萎縮誘導条件下において MuRF1 の発現量が増加し、その遺伝



子破壊 (KO) マウスは筋萎縮耐性を示すことから、MuRF1 は筋萎縮誘導に中心的役割を果たしていると考えられている。MuRF1 はコネクチン (筋原線維の収縮単位構造サルコメアの半分を 1 分子で結ぶ分子量約 3MDa の超巨大弾性タンパク質) のキナーゼ領域近傍に結合する (図 1)。コネクチンには多くの筋タンパク質が部位特異的に結合しており、これらがコネクチンを足場としたシグナル伝達複合体を形成していると考えられている (図 2)。MuRF1 のコネクチンへの結合部位近傍にも、骨格筋特異的カルパイン p94 が位置している (図 1、2)。そのため、M 線領域では MuRF1 と p94 という 2 つの分解系関連分子がコネクチンキナーゼ領域とともにシグナル伝達複合体を形成し、筋萎縮誘導につながるようなストレス条件下において重要な役割を担っていると考えられた。

そこで、本研究では、このシグナル伝達系の実態を明らかにする足がかりを得るため、まず MuRF1 に焦点を当て、その機能を分子レベルおよび個体レベルで解析した。



## <結果>

### 分子レベルでの解析

本研究では、まず、MuRF1 KO マウスの骨格筋抽出液に対し、大腸菌で発現、精製した GST-MuRF1 を bait にした GST Pull-down アッセイを行い、質量分析法により MuRF1 相互作用分子の同定を試みた。その結果、MuRF1 相互作用分子として、筋型クレアチンキナーゼ (M-CK) が同定された。M-CK はクレアチンと ATP の間のリン酸基の転移反応を可逆的に行う酵

素であり、筋細胞中では M 線領域においてミオシンに ATP を供給するなど、筋細胞内のエネルギー代謝の中心的機能を担っている。両者の相互作用は COS 細胞を用いた共発現系でも観察され、この結合が MuRF1 の B-box ドメインを介していること、MuRF1 が RING-Finger ドメイン依存的に M-CK に対する Ub-E3 として機能していることが明らかとなった。一方、共同研究者らは酵母 Two-Hybrid 法を用いて MuRF1 相互作用分子の同定を試みており、MuRF1 がいくつかの代謝系酵素や転写調節因子、筋原線維構成タンパク質と相互作用することを見出していた。そこで、これらの中から HIBADH (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase) と GMEB1 (glucocorticoid modulatory element binding protein-1) と呼ばれる分子に着目し、解析した。HIBADH は Val の代謝中間物 HIBA (3-hydroxyisobutyrate) の脱水素酵素であり、HIBA が高い脂質二重膜透過能を有することから、Val をその細胞内で代謝するか否かを方向付ける非常に重要な役割を担っている。一方、GMEB1 は骨格筋に対して大きな作用を持つステロイドホルモンである、グルココルチコイドによる転写制御に関与する因子である。また、GMEB1 は、カスパーゼの活性を阻害する機能があることも知られている。これらに対する MuRF1 の Ub 化能について解析したところ、COS 細胞の共発現系において、MuRF1 はこれらの分子に対しても Ub-E3 として機能し分解へと導いていることが分かった。これらの結果から、MuRF1 が Ub-E3 活性による分解を介し、筋細胞内のエネルギー代謝・アミノ酸代謝制御や転写調節、あるいはカスパーゼの活性制御に関与している可能性が示された。

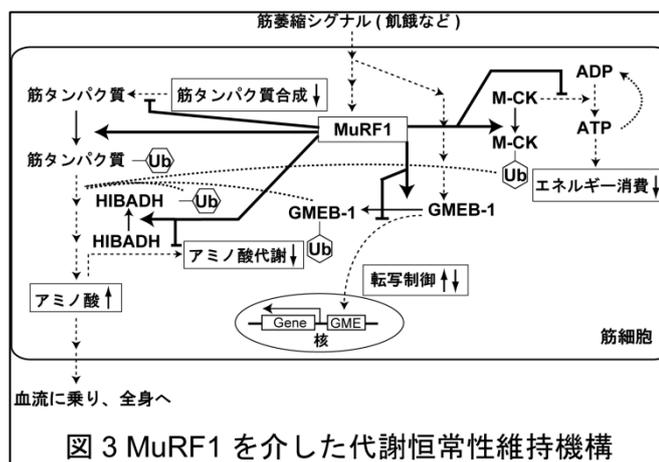
#### 個体レベルでの解析

上記のような分子レベルでの解析に加え、MuRF1 の持つ生理的意義を解析するために、MuRF1 KO マウスと野生型 (WT) マウスの比較による個体レベルでの解析を行った。他のグループの報告によれば、MuRF1 KO マウスは通常飼育時には一見正常であり、筋萎縮誘導条件下において筋萎縮耐性という表現型を示す。本研究においても、通常飼育では MuRF1 KO マウスと WT マウスの間に違いは観察されなかった。そこで、まず、MuRF1 依存的な筋萎縮誘導系の構築を試みた。一般に、筋萎縮誘導には除神経や尾部懸垂、ギブス固定など骨格筋への運動負荷を無くす手法、あるいはリポ多糖などの薬物投与による炎症反応の誘導という手法が用いられている。本研究では、骨格筋の持つ代謝調節器官としての性質に着目し、MuRF1 が生体の代謝調節、特にアミノ酸の代謝調節に重要な役割を担っているという仮説のもと、アミノ酸代謝に絞った解析を行えるアミノ酸飢餓 (-AA) による筋萎縮誘導を試みた。WT マウスと MuRF1 KO マウスを一週間、10%グルコース水と飲料水のみで飼育したところ、両者とも通常飼育群に比べ体重が 10%程度減少した。また、WT マウスでは MuRF1 の発現量が増加し、筋重量および筋細胞の径が減少していた。これに対し、MuRF1 KO マウスでは筋重量および筋細胞の径の減少が軽減されているのが観察された。このことから、アミノ酸飢餓による筋萎縮誘導も MuRF1 依存的であることが確認された。そこで、これらのマウスの骨格筋中の CK 活性を測定したところ、MuRF1 KO マウスでは WT マウスに比べ、-AA 時に CK 活性が有意に上昇しているのが観察された。骨格筋中の CK 活性は M-CK 量に相関することから、COS 細胞での系の結果と合わせる

と、*in vivo*でも MuRF1 が M-CK に対する Ub-E3 として機能していると考えられた。また、血漿中のアミノ酸量を解析したところ、-AA 時に MuRF1 KO マウスでは WT マウスに比べ分岐鎖アミノ酸量が減少していた。このことは MuRF1 KO マウスで筋タンパク質分解量が減少していることに加え、HIBADH に対する負の制御が無くなっていることを反映していると思われる。一方、筋萎縮は、筋タンパク質分解量の昂進に加え、合成量の減少によっても引き起こされる。そこで、共同研究により、-AA 時における MuRF1 KO マウスと野生型マウスの間の筋タンパク質合成量の比較解析を行った。その結果、MuRF1 KO マウスでは筋タンパク質合成量が有意に多いことが観察された。この詳細なメカニズムについては不明であるが、MuRF1 が GMEB1 を Ub 化することから、その一部は転写レベルでの制御を介していると予想される。

#### <まとめと今後の展望>

本研究では、筋萎縮誘導に中心的役割を果たしている MuRF1 に着目し、その機能を分子レベル、個体レベルで解析した。その結果、MuRF1 が代謝系酵素 M-CK および HIBADH や転写調節因子 GMEB1 を Ub 化すること、MuRF1 が血中分岐鎖アミノ酸量の維持に必要であること、MuRF1 が筋タンパク質合成を負に制御する機能を有することを見出した。MuRF1 の機能が特に顕著となる筋萎縮誘導条件は、本研究で用いたような低栄養状態、あるいは炎症誘導時など、その多くは生体がアミノ酸やエネルギー源を必要としている条件に相当する。本研究で見出した MuRF1 の個々の機能はいずれも筋細胞内でのエネルギー消費、アミノ酸消費を抑える方向に働くものであり、これらは互いに関連し合い協調的に働くことで更に大きな効果をもたらしていると思われる。このことから、筋萎縮誘導時に、MuRF1 は単に Ub-E3 活性を介して筋タンパク質分解量を増やしアミノ酸を供給しているだけでなく、むしろ筋細胞内のエネルギー代謝、アミノ酸代謝を積極的に制御することで生体の恒常性維持に寄与していると考えられた (図 3)。今後、MuRF1 の機能の更なる解析が進むことで、MuRF1 の機能を阻害するような化合物を用いた新規の抗筋萎縮薬が開発されることも期待される。



#### 参考文献

Koyama S., Hata S., Witt C.C., et al. Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) as a Connector of Muscle Energy Metabolism and Protein Synthesis. *J. Mol. Biol.* (2008) **376**, 1224-1236