

10 脱ニトロ化酵素遺伝子の同定と栄養機能的発現誘導 辰巳 隆一

【目的】 代表者はこれまでに、筋幹細胞活性化因子 HGF（肝細胞増殖因子）のチロシン残基（Y）198、250 がニトロ化されると細胞膜受容体 c-met に対する親和性を失う（不活化）こと、即ち、筋幹細胞（衛星細胞）の活性化とそれに続く増殖が抑制されることを見出し、この現象が加齢性筋萎縮・再生不全の新奇主要因であることを提起した（Elgaabari *et al.*, *Aging Cell*, 2024; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.14117>）。ニトロ化・不活化した HGF からニトロ基を除去（脱ニトロ化）できれば、HGF は生理活性を取り戻し筋本来のホメオスタシスは回復すると考えられる（筋の“若返り（リセット）”による健康寿命の延伸）。HGF の脱ニトロ化は加齢性筋萎縮・再生不全（フレイルやサルコペニアを含めて）を予防・治療するはじめての戦略となると期待されるが、脱ニトロ化酵素の存在や遺伝子（群）は未同定である。そこで本研究ではまず、脱ニトロ化酵素活性が筋組織で発現しているかどうかを調べた後、関連遺伝子（群）の同定および栄養機能的発現誘導・充進を目指して実験を行った。

【方法】 マウス後肢下腿部筋の凍結粉碎試料の PBS 抽出液をニトロ化 HGF およびニトロ化 BSA に添加し、抗ニトロチロシン抗体と抗 HGF/BSA 抗体を用いたウェスタンブロッティング（WB）、c-met 結合アッセイ（サンドイッチ ELISA 様アッセイ）、および *in vitro* 筋幹細胞活性化アッセイにより脱ニトロ化活性を可視化した。また、酵母菌などの原核生物種の報告事例から類似活性をもつ遺伝子群を抽出し、これらをリファレンスとして大規模高速演算を核とする *in silico* hybridization 法により関連酵素群を網羅的に検索した。

【結果】 若齢マウス（3 ヶ月齢）の骨格筋の PBS 抽出液をニトロ化 HGF およびニトロ化 BSA に添加すると、添加量依存的にニトロチロシン残基の脱ニトロ化反応が起こり、c-met 結合能および衛星細胞を活性化する生理活性が蘇ることを確認した。この脱ニトロ化活性の特性を調べたところ、1) 筋抽出液を加熱処理すると脱ニトロ化活性が消失すること、2) 分画分子量約 1 万の限外濾過膜を用いて低分子画分を十分に除去しても活性は維持されること、3) カルディオトキシン（CTX）の筋肉内注射により筋損傷を誘導すると筋抽出液の脱ニトロ化酵素活性が大きく増加するのに対し、老齢マウス（24 ヶ月齢）では顕著な増加は認められないこと、4) 筋損傷後 7 日目に比べて 1 日目の筋抽出液に高い活性があることなどがわかった。これらの実験結果から脱ニトロ化酵素が筋組織内に実在すると考えられ、その遺伝子を網羅的に検索した。50 を超える候補遺伝子が検索され絞り込み作業が困難となった。リファレンスの数を更に増やして再度実施することや、別の網羅的解析手法の導入が必要であると考えられた。このため、脱ニトロ化酵素発現を誘導・促進する食品成分の検索は実施できなかったが、*in vitro* で HGF のニトロ化抑制活性を持つ 2 つの機能性成分（単一化合物）を見出した。マウスに対する飲水投与実験を行い 1 つの化合物に明確な効果を認めたことから、食品機能的に HGF のニトロ化・不活化を抑制し加齢性筋萎縮・再生不全の進行を抑制できると期待された。

筋抽出液の脱ニトロ化活性の比較（Young vs. Old マウス、抗ニトロチロシン抗体による ECL-WB 像）

