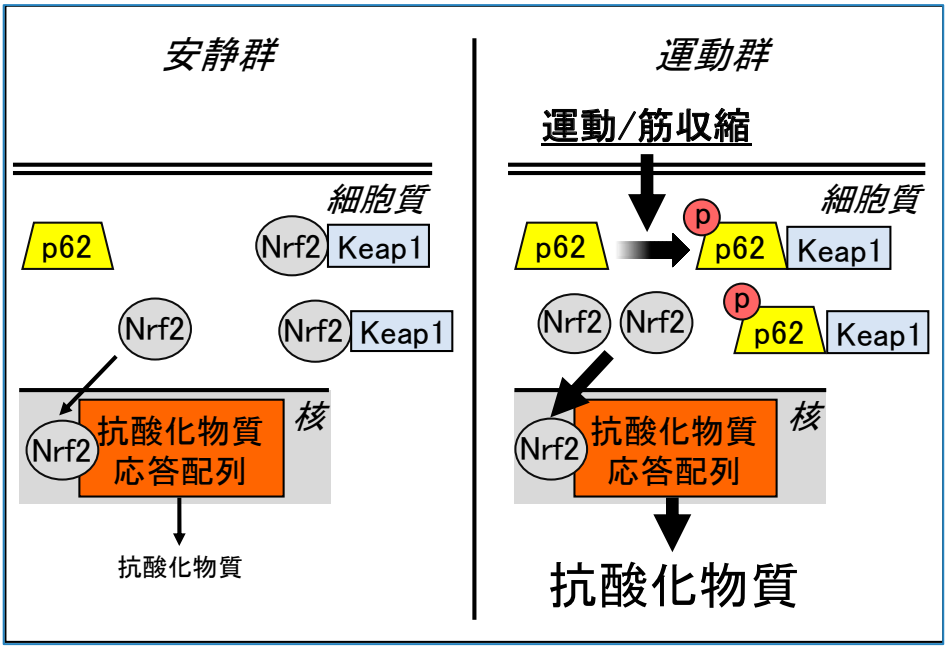
5　運動が骨格筋の恒常性を維持する分子基盤の解明	奥津　光晴

【目的】癌や糖尿病などの慢性疾患や加齢は、筋量の減少（筋萎縮）を引き起こす。筋萎縮は、疾患治療の障害やロコモティブ症候群を発症することから、筋萎縮の発症と予防の分子メカニズムを解明し、正常な骨格筋量を維持することは重要な課題である。疾患や加齢による筋萎縮は酸化ストレスの増大が要因であることから、抗酸化物質を増加することで筋萎縮の抑制が期待できる。運動は筋萎縮を抑制するが、これは筋収縮による抗酸化物質の増加が一因である。しかしながら、この分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、運動が骨格筋の抗酸化物質の産生を増加する分子メカニズムの解明を目的とした。

【方法】本研究では野生型マウスと筋特異的に *p62* を欠損したマウス（p62mKO）を使用した。野生型マウスの検討では、C57BL/6 マウスに 4 週間の自発走行運動を実施させた後に骨格筋を採取し、抗酸化物質の産生に重要な Nrf2 の発現、Nrf2 の核内移行、抗酸化物質応答配列への結合と Nrf2 の核内移行を制御する p62 の発現とリン酸化を評価した。Nrf2、p62、リン酸化 p62 と抗酸化物質はウェスタンブロット、Nrf2 の核内移行は骨格筋から抽出した核分画をウェスタンブロット、抗酸化物質応答配列への結合は TransAM キットを使用した。一方、p62mKO マウスの検討では、p62mKO マウスを cre-loxp システムを用いて作成し、4 週間の自発走行運動を実施させた後に骨格筋を採取して抗酸化物質の変動を同腹子の野生型マウスと比較した。

【結果】C57BL/6 マウスに自発走行運動を実施させると、抗酸化物質の増加、Nrf2 の増加、Nrf2 の核内移行の促進と Nrf2 の抗酸化物質応答配列への結合の増加が観察された。p62 の増加と p62 のリン酸化は運動により促進したが、この変動は遅筋では観察されるが速筋では観察されなかった。また p62mKO マウスを作成し解析すると、*Nrf2* 欠損マウスで顕著に低下する抗酸化物質である NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1（NQO1）が p62mKO マウスでも同様に低下した。さらに p62mKO マウスに自発走行運動を実施させると、野生型マウスの遅筋で増加する CuZnSOD や EcSOD は、p62mKO マウスでは増加が抑制された。以上の結果をまとめると、運動が遅筋の抗酸化物質を増加するメカニズムは、p62 のリン酸化による Nrf2 の核内移行の促進が関与することを示唆している。

運動が骨格筋の抗酸化物質を増加する分子経路



5. 運動が骨格筋の恒常性を維持する分子基盤の解明

奥津　光晴

名古屋市立大学 大学院システム自然科学研究科

Key words：抗酸化物質，速筋，遅筋，p62，Keap1/Nrf2

緒　言

癌や糖尿病などの慢性疾患や加齢は、筋量の減少（筋萎縮）を引き起こす。筋萎縮は、疾患治療の障害やロコモティブ症候群を発症することから、筋萎縮の発症と予防の分子メカニズムを解明し、正常な骨格筋量を維持することは重要な課題である。疾患や加齢による筋萎縮を誘導する原因として酸化ストレスの増加があげられる。酸化ストレスは筋細胞の機能低下や筋タンパクの合成と分解のバランスを悪化することで筋萎縮を誘導する。したがって、酸化ストレスを消去する抗酸化物質を増加することで筋萎縮の抑制が期待できる［1］。運動は筋萎縮を抑制するが、これは筋収縮による抗酸化物質の増加が一因である。しかしながら、この分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、運動が骨格筋の抗酸化物質の産生を増加する分子メカニズムとして、p62 による Nrf2 の核内移行の制御に着目し検討した。

方　法

1. 実験動物

実験には 10 週齢の雄性の C57BL/6J マウスと筋特異的 *p62* 欠損マウス（p62mKO）を用いた。マウスは室温 23℃、湿度 50%、午前 8 時から午後 8 時までを明期とした環境にて飼育した。p62mKO マウスは mlc1f-cre マウスと p62 flox マウスを交配して作成した。C57BL/6J マウスを用いた実験は飼育環境に順応させるため 1 週間の予備飼育後に開始した。餌と水は自由摂取とした。

2. 運動方法

マウスは運動群と安静群に分け、運動群は 4 週間の運動トレーニングを実施し安静群はその間通常飼育した。運動トレーニングには自発走行運動を使用した。走行距離は継時的に測定し、走行運動が十分に実施されていることを確認した。また、Nrf2 の核内移行と抗酸化物質応答配列への結合には動物用トレッドミルによる一過性の運動を用い評価した。

3. 検体採取

運動トレーニング期間あるいは一過性の運動終了後にマウスを解剖し検体を採取した。解剖はマウスを麻酔下で頚椎脱臼し安楽死させた後、遅筋優位なヒラメ筋、速筋優位な白色広筋、速筋と遅筋が混在した足底筋と腓腹筋を採取した。採取した骨格筋は、直後に液体窒素にて急速冷凍し実験に使用するまで−80℃にて冷凍保存した。

4. 評価項目と方法

測定は、抗酸化物質、Nrf2 の発現、Nrf2 の核内移行、Nrf2 の抗酸化物質応答配列への結合、Nrf2 の核内移行を制御する p62 の発現と p62 のリン酸化を評価した。Nrf2、p62、リン酸化 p62 と抗酸化物質はウェスタンブロット、Nrf2 の核内移行は骨格筋から抽出した核分画をウェスタンブロット、Nrf2 の抗酸化物質応答配列への結合は TransAM キットを使用した。

5. 統計

統計は、2 群間の比較には対応のない T 検定、運動による速筋と遅筋の比較および運動による遺伝子組換え型と野生型の比較は二元配置分散分析を使用し、$p < 0.05$ を有意とした。

結果および考察

1. 運動トレーニングによる Nrf2 の変動

定期的な持久的運動は抗酸化物質を増加する。抗酸化物質の増加は Nrf2 の核内移行が主たる要因である。しかしながら、運動による Nrf2 の核内移行を詳細に検討した報告はこれまでにない。そこで本研究では、野生型マウスの Nrf2 の発現の特徴と 4 週間の自発走行運動による骨格筋の Nrf2 の変動を評価した。まず、安静時の遅筋と速筋の Nrf2 の発現を評価した。その結果、Nrf2 の発現は遅筋優位なヒラメ筋の方が速筋優位な白色広筋よりも高かった（図 1A、B）。先行研究では、スーパーオキサイドディスミュターゼ（superoxide dismutase：SOD）などの抗酸化酵素は遅筋の方が速筋よりも高いことが報告されている［1］が、この理由は、Nrf2 の発現量の違いが関与する可能性が考えられる。次に、運動による Nrf2 の発現の変動を検討した。その結果、Nrf2 の発現は運動群の方が安静群よりも高かった（図 1C、D）。定期的な持久的運動は抗酸化物質を増加するが、この増加には Nrf2 の増加が関与する可能性が考えられる。Nrf2 が抗酸化物質を増加するためには、Nrf2 の核内移行と抗酸化物質応答配列への結合が必要である。そこで本研究では、運動群と安静群のヒラメ筋から核を抽出し Nrf2 タンパクの量を比較した。その結果、運動群の方が安静群に比べ Nrf2 タンパクが高かった（図 1E、F）。さらに、この核分画の検体を用いて Nrf2 の抗酸化物質応答配列への結合を評価したところ、運動群の方が安静群よりも高かった（図 1G）。これらの結果は、運動は Nrf2 の発現、核内移行と抗酸化物質応答配列への結合を促進することで抗酸化物質を増加する可能性を示唆している。

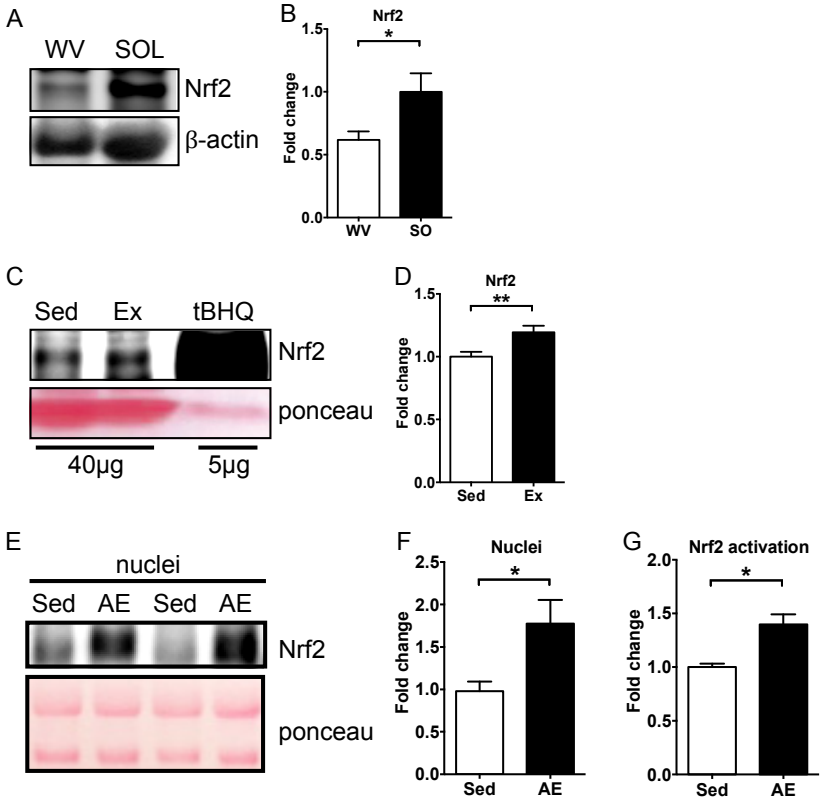


図 1. 運動による Nrf2 の変動

A, B）筋線維タイプの違いによる Nrf2 の比較、C, D）定期的な持久的運動による Nrf2 の比較、E, F）一過性の運動による核内の Nrf2 の比較、G）一過性の運動による抗酸化物質応答配列への結合の比較。Sed：安静群、Ex：運動群、SO：ヒラメ筋、WV：白色広筋、tBHQ：tertiary butylhydroquinone、AE：一過性の運動、*$p < 0.05$、**$p < 0.01$

2. 運動トレーニングによる p62 の変動

運動は Nrf2 の核内移行を促進するが、この分子メカニズムは明らかではない。そこで本研究では Nrf2 の核内移行を調節する因子として p62 に着目した。p62 はオートファジーを制御するタンパクとして知られているが、癌細胞を用いた近年の研究では、p62 はリン酸化することで Nrf2 の核内移行を促進することが報告されている［2］。そこで本研究では、自発走行運動による p62 の変動を評価した。その結果、運動群の p62 はヒラメ筋では増加するが白色広筋では増加しなかった（図 2A、B)。また、p62 のリン酸化はヒラメ筋では運動により増加するが白色広筋では増加しなかった（図 2A、B)。これらの結果は、運動による Nrf2 の核内移行の調節は遅筋では p62 が関与するが速筋では関与しない可能性が示唆された。

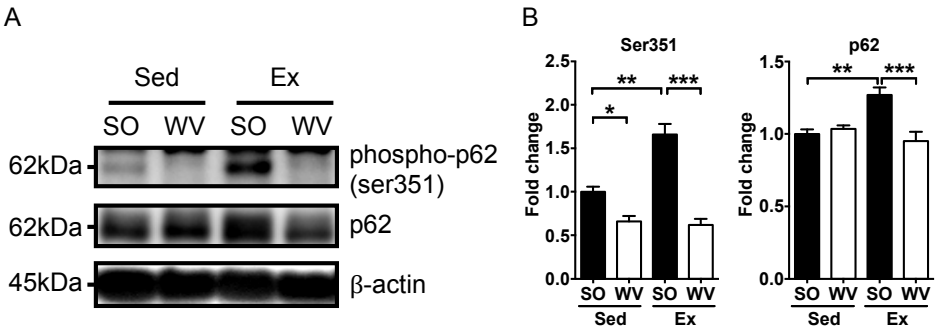


図 2. 運動による p62 の変動

A）ウェスタンブロットの代表例、B）p62 ser351 のリン酸化と p62 の変化

Sed：安静群、Ex：運動群、SO：ヒラメ筋、WV：白色広筋、*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001

3. 運動による p62mKO マウスの抗酸化物質の変動

運動による抗酸化物質の増加に p62 が直接関与するか検討するため、p62mKO マウスと同腹子の野生型マウスに 4 週間の自発走行運動を実施し、抗酸化物質の変動を評価した。その結果、野生型マウスでは増加する CuZnSOD や EcSOD などの Nrf2 により調節されると考えられる抗酸化酵素の発現は p62mKO では増加が抑制された（図 3A、B)。我々は、Nrf2mKO マウスに同様の運動を実施すると、p62mKO 同様に CuZnSOD や EcSOD の増加が抑制されることを報告している［3]。本研究結果と我々がすでに報告した Nrf2mKO マウスの成果と統合すると、運動による遅筋の抗酸化物質の増加には p62 のリン酸化による Nrf2 の核内移行の促進が極めて重要であることを示唆している。

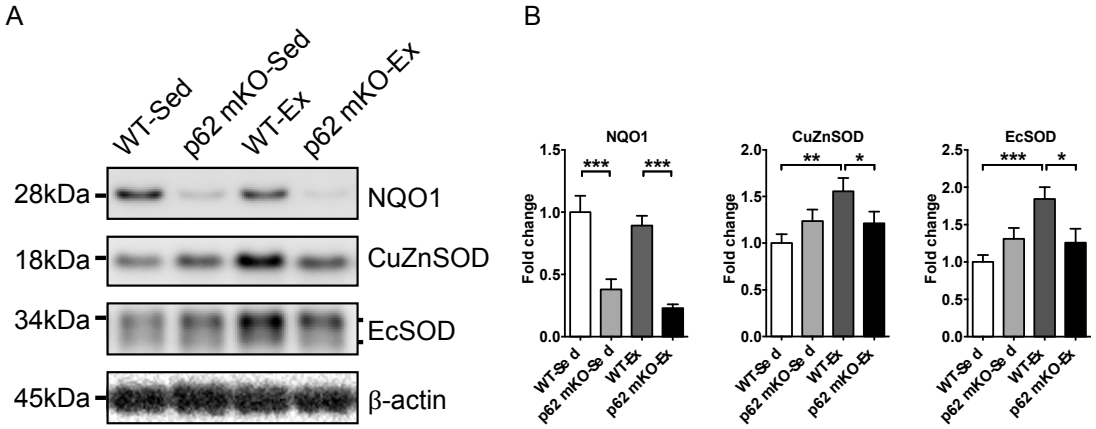


図 3. p62mKO マウスの運動による抗酸化物質の変動

A）ウェスタンブロットの代表例、B）NQO1、CuZnSOD および EcSOD の変化

WT：野生型マウス、p62mKO：筋特異的 *p62* 欠損マウス、Sed：安静群、Ex：運動群、SO：ヒラメ筋、WV：白色広筋、*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001

共同研究者・謝辞

本研究は、名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科の山田麻未大学院生、名古屋市立大学大学院医学研究科の大石久史教授、筑波大学医学医療系の蕨栄治講師、筑波大学医学医療系の柳川徹教授、New York University の Steven J. Burden 教授に協力いただき実施した。ここに記載して感謝の意を表します。

文　献

1) Okutsu M, Call JA, Lira VA, Zhang M, Donet JA, French BA, Martin KS, Peirce-Cottler SM, Rembold CM, Annex BH, Yan Z. Extracellular superoxide dismutase ameliorates skeletal muscle abnormalities, cachexia, and exercise intolerance in mice with congestive heart failure. Circ Heart Fail. 2014 May;7(3):519-30. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000841. Epub 2014 Feb 12.PMID:24523418

2) Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. FEBS J. 2015 Dec;282(24):4672-8. doi: 10.1111/febs.13540. Epub 2015 Oct 16. Review. PMID:26432171

3) Yamada M, Iwata M, Warabi E, Oishi H, Lira VA, Okutsu M. p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle. FASEB J. 2019 Mar 26:fj201900133R. doi: 10.1096/fj.201900133R. [Epub ahead of print] PMID:30913396