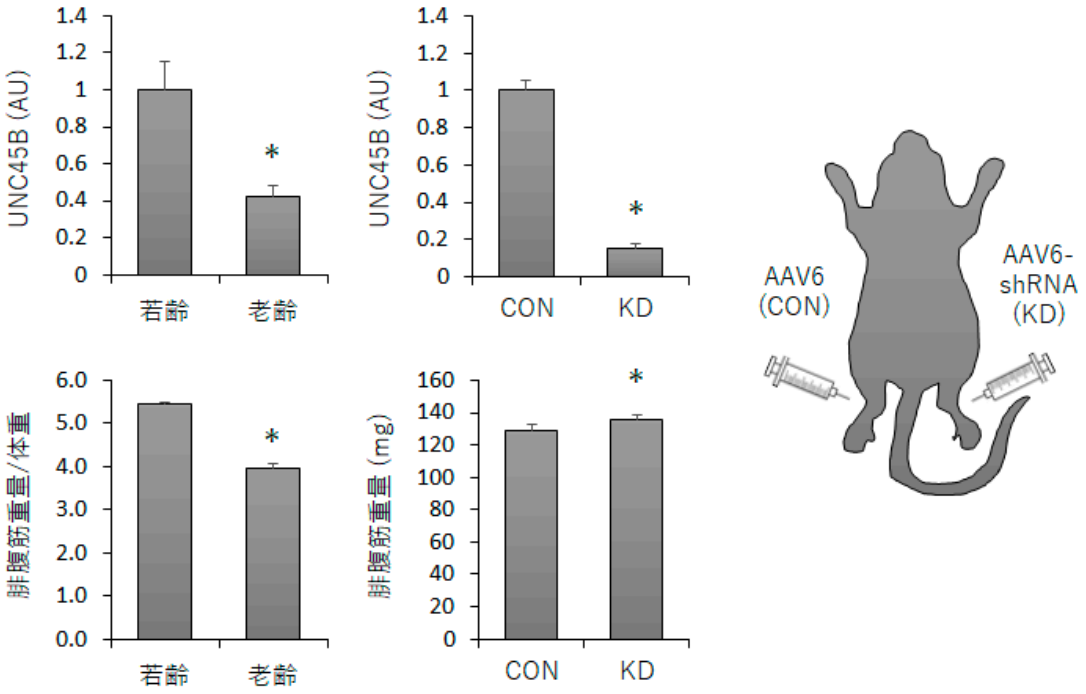
111　加齢性筋萎縮におけるミオシン分子シャペロンの役割	小笠原　理紀

【目的】骨格筋は、日常生活動作などの運動器としての役割のみならず、代謝臓器としても重要な役割を果たすことから、その量・機能の低下は我々の健康に深刻な影響を及ぼす。骨格筋量・機能は疾患の有無に関わらず加齢により低下するため、そのメカニズムの解明と予防・改善方法の開発が喫緊の課題となっている。収縮タンパク質ミオシンの分子シャペロンである UNC45B は加齢によって低下することから、この変化が加齢性筋萎縮の一要因である可能性が考えられた。本研究では、骨格筋量の調節における UNC45B の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】3 か月齢（若齢）と 24 か月齢（老齢）の雄性 C57BL/6J マウスを対象とした。UNC45B を過剰発現させる際には UNC45B の発現 AAV6 ベクターを、ノックダウンさせる際には shRNA 発現 AAV6 ベクターをそれぞれ片側の下腿三頭筋に導入した。反対側の下腿三頭筋にはコントロール AAV6 ベクターを導入した。AAV6 ベクター導入 2 週間後に下腿三頭筋を採取した。

【結果】*UNC45B* のノックダウンによって遅筋線維優位なヒラメ筋重量は変化しなかったが、速筋線維優位な腓腹筋重量が増加した。*UNC45B* の過剰発現ではヒラメ筋重量、腓腹筋重量ともに変化しなかった。*UNC45B* の過剰発現では結合パートナーである HSP70 と HSP90 の発現量に顕著な変化は観察されなかったが、ノックダウンによって腓腹筋において両タンパク質の顕著な増加が観察された。オートファジー基質である p62 やオートファゴソームマーカーである LC3 の発現量は、*UNC45B* のノックダウンや過剰発現によって変化しなかった。

UNC45B と骨格筋量：加齢とノックダウンの影響



111. 加齢性筋萎縮におけるミオシン分子シャペロンの役割

小笠原　理紀

名古屋工業大学 大学院工学研究科 生化学分野

Key words：骨格筋，UNC45B，HSP70，HSP90，AAV

緒　言

骨格筋は、日常生活動作などの運動器としての役割のみならず、代謝臓器としても重要な役割を果たすことから、その量・機能の低下は我々の健康に深刻な影響を及ぼす。骨格筋量・機能は疾患の有無に関わらず加齢により低下するため、そのメカニズムの解明と予防・改善方法の開発が喫緊の課題となっている。加齢性筋萎縮に関する研究は、一般的な骨格筋量調節の原則に則り、筋タンパク質合成・分解の速度調節に注目した研究が行われてきている。しかし、現時点で加齢性筋萎縮のメカニズムは不明な点が多い。

近年、加齢に伴う骨格筋のプロテオーム変化が明らかになってきている。Murgia らは若齢者と高齢者について、それぞれ単一筋線維レベルでのプロテオーム解析を行い、様々なタンパク質の加齢変化を報告している［1］。の中で、筋原線維タンパク質の質的調節に関わるタンパク質に加齢変化があり、特に、収縮タンパク質であるミオシンの分子シャペロンである UNC45B が速筋線維特異的に加齢に伴って減少することを報告している。UNC45B は HSP70 や HAP90 とともにミオシン分子シャペロンとして働くことが知られており、その機能の変化はミオシン量や筋機能に影響を及ぼすことがわかっている［2，3］。加齢性筋萎縮は速筋線維において遅筋線維と比べて顕著であり、加齢に伴う UNC45B の速筋特異的な減少が関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では骨格筋量調節における UNC45B の役割について明らかにすることを目的として実験を行った。

方　法

1. 実験動物

雄性の C57BL/6J を対象として実験を実施した。若齢マウスとして 3 か月齢、老齢マウスとして 24 か月齢を用いた。本実験は、名古屋工業大学遺伝子組換え実験安全部会および動物実験安全部会の承認を得て実施した。

2. 遺伝子導入

若齢マウスを対象に、*UNC45B* を過剰発現させる際には UNC45B の発現 AAV6 ベクターを、ノックダウン（KD）させる際には shRNA 発現 AAV6 ベクターをそれぞれ片側の下腿三頭筋に導入した。反対側の下腿三頭筋にはコントロール AAV6 ベクター（CON）を導入した。ベクター導入から 2 週間後に下腿三頭筋を採取した。

結果および考察

1. 加齢に伴う体組成及びミオシン分子シャペロンの変化

腓腹筋重量は 24 か月齢の老齢マウスで 3 か月齢の若齢マウスに比べて低値を示し、加齢に伴う骨格筋量の減少が観察された（図 1）。ヒラメ筋重量に有意な違いは観察されなかった。

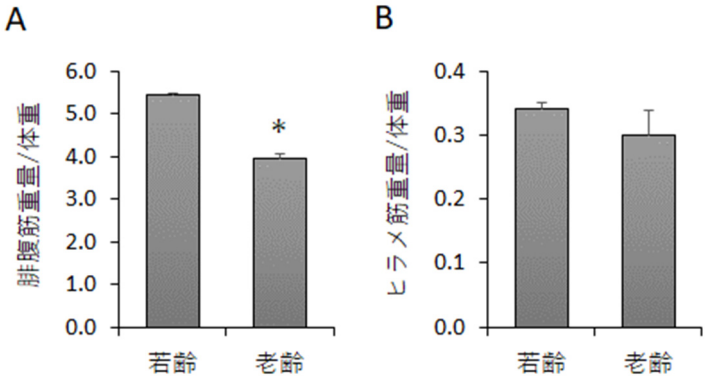


図 1. 加齢に伴う腓腹筋重量（A）とヒラメ筋重量（B）の変化

*p < 0.05 vs. 若齢マウス（t-test）。

マウスの腓腹筋における UNC45B、HSP70 および HSP90 のタンパク質発現量についてウェスタンブロッティングにて解析したところ、HSP70 は老齢マウスで若齢マウスに比べて高値を示した一方、UNC45B は老齢マウスで若齢マウスに比べ低値を示した（図 2）。UNC45B はラットにおいても加齢によって減少することが報告されており［4］、マウス、ラット、ヒトにおいて加齢によって共通して減少するものと考えられる。

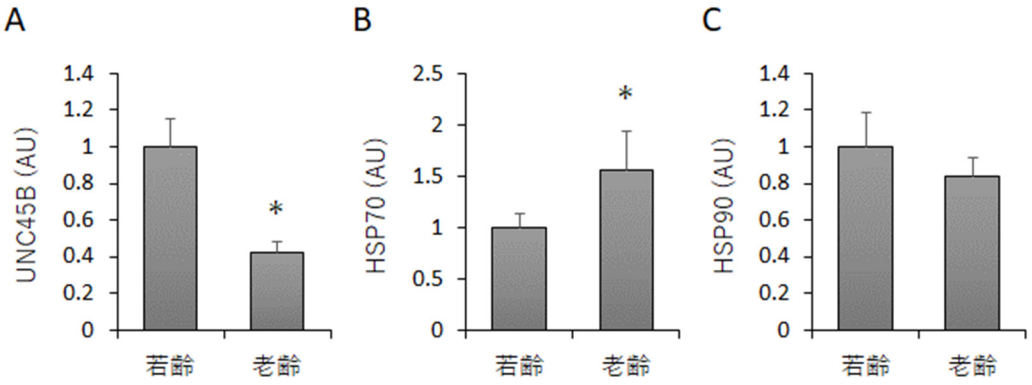


図 2. 加齢に伴うタンパク質発現量の変化

（A）UNC45B、（B）HSP70、（C）HSP90。

*p < 0.05 vs. 若齢マウス（t-test）。

ミオシン分子シャペロンに加え、オートファゴソームマーカーとして LC3 を測定したが、加齢に伴う有意な変化は観察されなかった。一方、オートファジー基質である p62 を測定したところ、老齢マウスにおいて若齢マウスに比べて高値を示した。

2. UNC45B ノックダウンの影響

若齢マウスの下腿三頭筋に対して UNC45B の shRNA 発現 AAV6 ベクターを投与したところ、2 週間後に腓腹筋、ヒラメ筋ともに顕著な UNC45B 発現量の減少を確認できた（図 3）。UNC45B の結合パートナーである HSP70 と HSP90 のタンパク質発現量について検討したところ、両タンパク質とも *UNC45B* をノックダウンした骨格筋において増加が観察された（図 3）。HSP90 については腓腹筋において特に顕著な増加が観察された。このメカニズムは現時点では不明であるが、UNC45B の減少に対してミオシン分子シャペロン機能を代償していた可能性が考えられる。

仮説とは異なり、腓腹筋重量は有意に増加した。ヒラメ筋重量に変化は観察されなかった（図 4）。

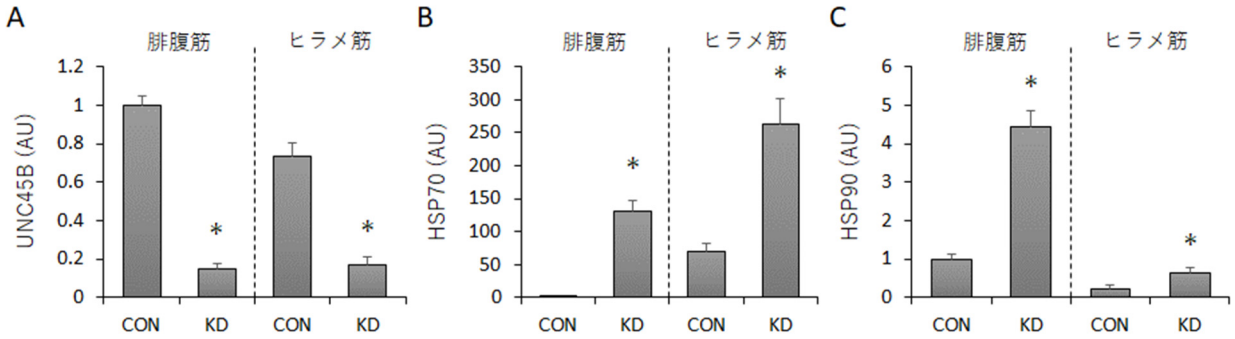


図 3. UNC45B の shRNA 発現 AAV6 ベクター投与 2 週間後におけるタンパク質発現量
（A）UNC45B、（B）HSP70、（C）HSP90。*p < 0.05 vs. CON（t-test）。

老齢マウスの骨格筋ではオートファジー基質である p62 が増加していたが、*UNC45B* のノックダウンでは変化が認められなかった。同様にオートファゴソームマーカーとして測定した LC3 においても変化は観察されなかった。

老齢マウスでは、HSP70 は若齢マウスと比べて高値を示していたものの、UNC45B と HSP90 は低値であった。本研究での HSP70 や HSP90 の UNC45B ノックダウンに対する一時的な代償反応であるのか否かは定かではないが、今後の研究では老齢マウスと同様に、HSP90 も低下する条件を検討していくことが必要である。

3. UNC45B 過剰発現の影響

若齢マウスの下腿三頭筋に対して UNC45B の発現 AAV6 ベクターを投与したところ、2 週間後に腓腹筋、ヒラメ筋ともに顕著な UNC45B 発現量の増加を確認できた（図 5）。しかし、骨格筋量は腓腹筋、ヒラメ筋ともに変化が見られなかったことから、UNC45B の増加自体は骨格筋量に影響を及ぼさないと考えられる。

興味深いことに、*UNC45B* の過剰発現によって HSP90 は変化しなかったが、HSP70 は *UNC45B* ノックダウン時と同様に増加が観察された。培養骨格筋細胞（C2C12 細胞）では、HSP90 の過剰発現によってミオシン量が増加することが報告されており、*UNC45B* ノックダウンによる腓腹筋重量の増加は、HSP90 の増加に影響を受けていた可能性が考えられる。P62 や LC3 は *UNC45B* 過剰発現によって変化しなかった。

今後は老齢マウスなど、骨格筋内のタンパク質の質的低下が生じるモデルに対して過剰発現を行うことで、UNC45B の機能解析をさらに進めていく必要がある。

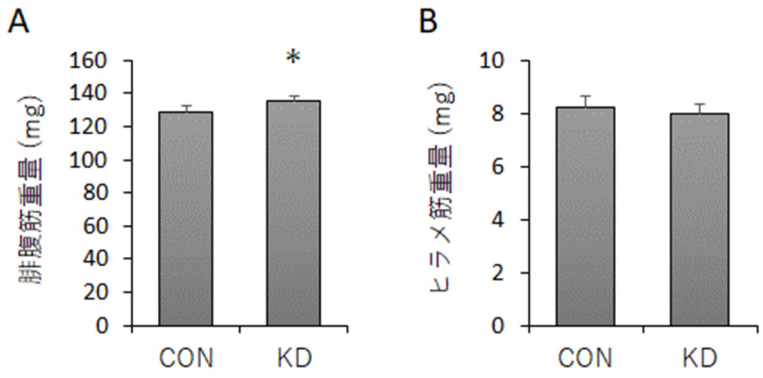


図 4. UNC45B ノックダウンによる腓腹筋重量（A）とヒラメ筋重量（B）の変化
*p < 0.05 vs. CON（t-test）。

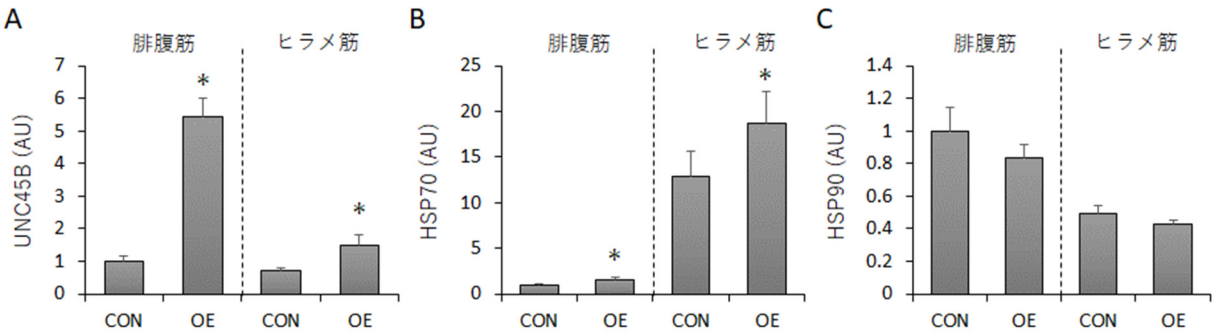


図 5. UNC45B 発現 AAV6 ベクター投与 2 週間後におけるタンパク質発現量

(A) UNC45B、(B) HSP70、(C) HSP90。*p < 0.05 vs. CON (t-test)。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、当研究室の長宗大賀氏（大学院生）である。本研究に対してご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Murgia M, Toniolo L, Nagaraj N, Ciciliot S, Vindigni V, Schiaffino S, Reggiani C, Mann M. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. Cell Rep. 2017 Jun 13;19(11):2396-2409. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.054. PMID: 28614723

2) Bernick EP, Zhang PJ, Du S. Knockdown and overexpression of Unc-45b result in defective myofibril organization in skeletal muscles of zebrafish embryos. BMC Cell Biol. 2010 Sep 17;11:70. doi: 10.1186/1471-2121-11-70. PMID: 20849610

3) Ojima K, Ichimura E, Suzuki T, Oe M, Muroya S, Nishimura T. HSP90 modulates the myosin replacement rate in myofibrils. Am J Physiol Cell Physiol. 2018 Jul 1;315(1):C104-C114. doi: 10.1152/ajpcell.00245.2017. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29561661

4) Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, Goldberg AL, Ulfhake B. Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. J Biol Chem. 2010 Dec 17;285(51):39597-608. doi: 10.1074/jbc.M110.129718. Epub 2010 Oct 12. PubMed PMID: 20940294; PubMed Central PMCID: PMC3000941.