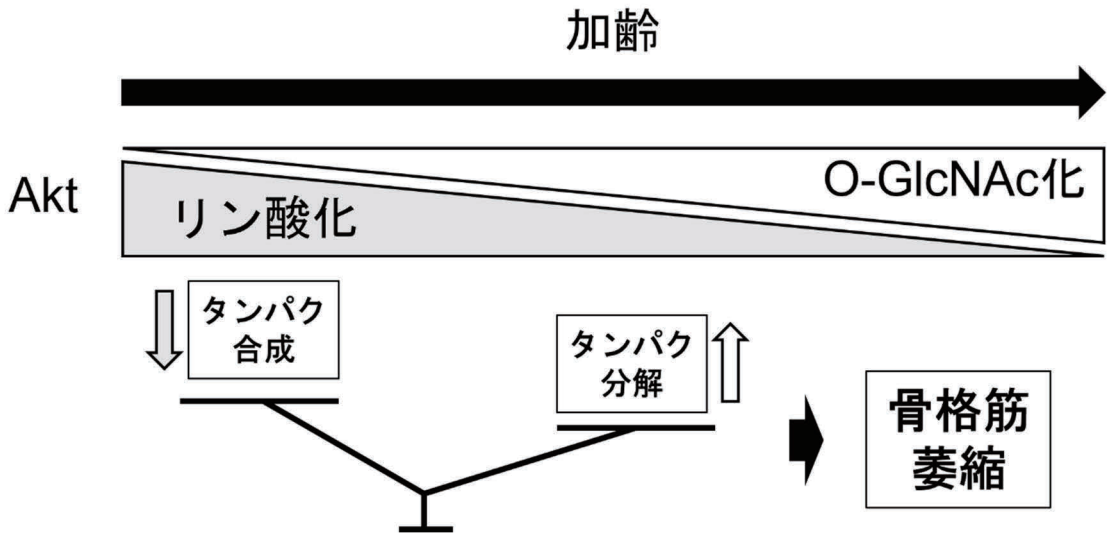
| 7　O結合グリコシル化制御によるサルコペニア治療法開発 | 絹川　真太郎 |
|---|---|

**【目的】**高齢社会において、加齢性サルコペニアの予防・治療法を開発することは極めて重要な研究課題である。サルコペニアの中心病態である骨格筋萎縮はタンパク合成と分解のバランスの破綻によってもたらされる。Akt リン酸化はタンパク合成およびタンパク分解の両者に重要な役割を果たしており、その制御方法を明らかにすることがサルコペニアへの有効な予防・治療法の開発につながると考えられる。O-GlcNAc 化はタンパク翻訳後修飾の一つであり、熱ショック、低酸素、栄養欠乏などの細胞ストレスに対して、タンパクの機能を変化させる。さらに、面白いことに O-GlcNAc 化とリン酸化の部位は同じ場所もしくは近傍で起こるため、タンパクリン酸化の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、これまでに骨格筋萎縮における O-GlcNAc 化の役割はほとんど明らかにされていない。本研究の目的は、加齢による骨格筋萎縮の進展にタンパク合成や分解に関わる種々のタンパクの O-GlcNAc 化修飾が重要な役割を果たしているかどうかを明らかにすることであった。

**【方法】**3 か月齢、6 か月齢、12 か月齢の C57BL/6J マウスから深麻酔下（ペントバルビタール 200 mg/kg の腹腔内投与）に下肢骨格筋が摘出された。重量測定後に、骨格筋組織は組織学的評価（ヘマトキシリン―エオジン染色）、ウエスタンブロットに用いられた。

**【結果】**マウスの体重は年齢とともに有意に増加したが、下肢骨格筋重量ー体重比は加齢とともに減少した（3 か月齢：14.3±0.3 mg/g、6 か月齢：13.4±0.6 mg/g、12 か月齢：12.3±0.5 mg/g、$p<0.05$）。骨格筋の組織学的評価では、12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して細胞断面積が 10%縮小した。Akt および mTOR タンパク発現は各年齢において違いがなかった。12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して Akt リン酸化レベルは 22%減少し、mTOR リン酸化レベルは 19%減少した。さらに、12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して atrogin-1 および MuRF1 タンパク発現は 43%、71%増加した。従って、タンパク合成・分解系のバランスが破綻していた。12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して、骨格筋タンパクの O-GlcNAc 化修飾は有意に増加した（$p<0.05$）。O-GlcNAc 化を制御する分子タンパクを評価したところ、glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase（GFAT）1 は有意に増加した。一方、GFAT2、O-GlcNAc transferase（OGT）や O-GlcNAcase（OGA）は有意な変化がなかった。

加齢性骨格筋萎縮の進展における O-GlcNAc 化の役割



# 7. O 結合グリコシル化制御によるサルコペニア治療法開発

絹川　真太郎

九州大学 大学院医学研究院 循環器内科学

Key words：O 結合グリコシル化，骨格筋萎縮，加齢，サルコペニア

## 緒　言

わが国をはじめ多くの国が長寿社会を迎えているが、社会の健全発展のために「健康長寿」が要請される。健康寿命と密接に関連するのが、加齢に伴う脆弱な状態と定義されるフレイルであり、要介護状態の前段階である。フレイルの病態の中核をなすのが、身体的フレイル、特に筋萎縮、筋力低下、活動性低下で診断されるサルコペニアである。サルコペニアの原因は、加齢、身体不活動、低栄養、慢性炎症などが考えられている。運動療法や栄養療法を組み合わせた予防・治療法が提唱されているが、その遂行は困難な場合が多く、効果も不十分である。一方、慢性炎症への介入法はいまだ開発されていない。したがって、高齢社会において、加齢性サルコペニアの予防・治療法を開発することは極めて重要な研究課題である。

サルコペニアの中心病態である骨格筋萎縮はタンパク合成と分解のバランスの破綻によってもたらされる［1］。タンパク合成は、Akt リン酸化、mTOR リン酸化、p70S6K リン酸化・活性化によって制御される。一方、タンパク分解は、E3 ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 および MyRF1 発現増加、ユビキチンプロテオソーム系の活性化によって制御される。Akt のリン酸化は FoxO リン酸化を制御し、E3 ユビキチンリガーゼの発現を制御することが知られている。この様に、Akt リン酸化はタンパク合成およびタンパク分解の両者に重要な役割を果たしており、その制御方法を明らかにすることがサルコペニアへの有効な予防・治療法の開発につながると考えられる。

骨格筋は主に脂肪酸と糖をエネルギー基質として用いる。加齢では、骨格筋の代謝シフト、すなわち脂肪酸酸化が障害され、解糖系に依存したエネルギー産生の割合が高くなっている。解糖系の副経路にヘキソサミン生合成経路があり、ウリジン二リン酸－N－アセチルグルコサミン（UDP-GlcNAc）が産生される。この UDP-GLcNAc を基質として、種々のタンパクのセリンおよびスレオニン残基の O-結合グリコシル（O-GlcNAc）化修飾が起こる。O-GlcNAc 化はタンパク翻訳後修飾の一つであり、熱ショック、低酸素、栄養欠乏などの細胞ストレスに対して、タンパクの機能を変化させる［2］。さらに、面白いことに O-GlcNAc 化とリン酸化の部位は同じ場所もしくは近傍で起こるため、タンパクリン酸化の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。O-GlcNAc の除去に関わる O-GlcNAcase（OGA）の特異的な抑制薬である Thiamet-G を骨格筋培養細胞 C2C12 に添加すると、タンパク O-GlcNAc 化が上昇し、Akt リン酸化が低下することが報告されている［3］。したがって、O-GlcNAc 化は骨格筋萎縮に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。しかしながら、骨格筋萎縮における O-GlcNAc 化の役割はほとんど明らかにされていない。本研究の目的は、加齢による骨格筋萎縮の進展にタンパク合成や分解に関わる種々のタンパクの O-GlcNAc 化修飾が重要な役割を果たしているかどうかを明らかにすることであった。

## 方　法

### 1. 動物モデル

2 か月齢、5 か月齢、11 か月齢の C57BL/6J マウスを購入した（日本 SLC 株式会社）。それぞれのマウスは 1 か月間 12 時間の明暗サイクル下で、標準食と水へのアクセスが自由な環境で、飼育された。すべての動物実験ならびに実験に用いたマウスの飼育保管および実験計画は九州大学動物実験委員会にて承認され、九州大学動物実験実施マニュアル

に従って実施された。

**2. 臓器重量の測定**

3 か月齢、6 か月齢、12 か月齢の時点で、それぞれのマウスから深麻酔下（ペントバルビタール 200 mg/kg の腹腔内投与）に下肢骨格筋および精巣上体脂肪が摘出された。重量測定後に、骨格筋組織は組織学的評価（ヘマトキシリン―エオジン染色）、ウエスタンブロットに用いられた。

**3. ウエスタンブロット**

骨格筋組織サンプルからのタンパク抽出、電気泳動、および免疫ブロットは一般的な方法で行われた。1 次抗体として、Akt, phospho-Akt, mTOR, phospho-mTOR, atrogin-1, O-GlcNAc, MuRF1, glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase（GFAT）1, GFAT2, O-GlcNAc transferase（OGT）, O-GlcNAcase（OGA）に対する抗体が用いられた。

**4. 統計**

結果は平均±標準偏差で示された。3 群の比較は 1 元配置分散分析で解析され、post hoc test として Tukey 法が用いられた。危険率 $p<0.05$ を有意と判定した。

## 結　果

**1.　加齢マウスは骨格筋萎縮を呈する**

マウスの体重は年齢とともに有意に増加した（3 か月齢：28±1 g、6 か月齢：28±2 g、12 か月齢：32±3 g、$p<0.05$）。体重の増加に一致して、12 か月齢マウスの脂肪重量ー体重比は 3 か月齢マウスにと比較して 93%増加した。一方、下肢骨格筋重量ー体重比は加齢とともに減少した（3 か月齢：14.3±0.3 mg/g、6 か月齢：13.4±0.6 mg/g、12 か月齢：12.3±0.5 mg/g、$p<0.05$）。骨格筋の組織学的評価では、12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して細胞断面積が 10%縮小した（図 1）。

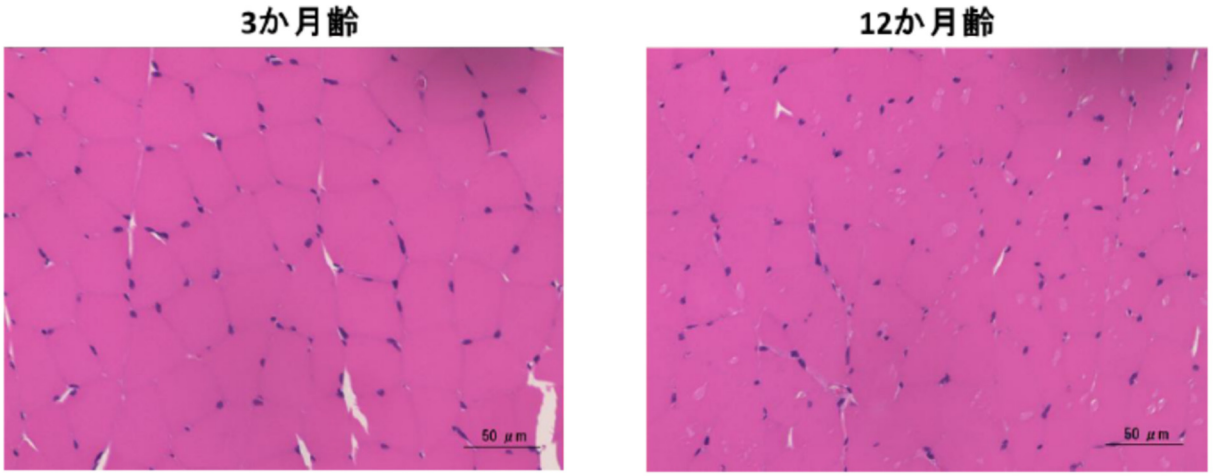



図1. マウスの下肢骨格筋のヘマトキシリン―エオジン染色
3 か月齢（左）および 12 か月齢の C57BL6/J マウスから摘出された下肢骨格筋のヘマトキシリン―エオジン染色像を示す。12 か月齢マウスの骨格筋細動断面積が縮小した。

**2. 加齢マウスの骨格筋のタンパク合成および分解系シグナル**

加齢とともに、骨格筋が萎縮することが明らかとなった。そこで、タンパク合成系および分解系に関係する分子の評価を行った。Akt および mTOR タンパク発現は各年齢において違いがなかった。12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して Akt リン酸化レベルは 22%減少し（図 2)、mTOR リン酸化レベルは 19%減少した。さらに、12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して atrogin-1 および MuRF1 タンパク発現は 43%、71%増加した。従って、タンパク合成・分解系のバランスが破綻していた。

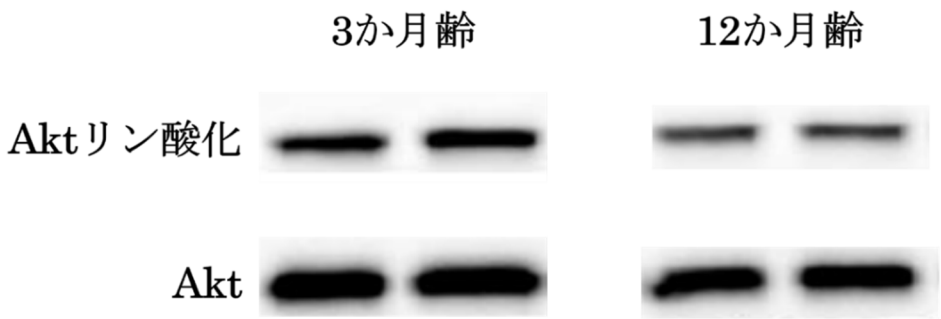



図2. 下肢骨格筋のAktリン酸化レベル
3 か月齢（左）および 12 か月齢（右）の C57BL6/J マウスの下肢骨格筋における Akt タンパク（下段）および Akt リン酸化レベル（上段）を示す。Akt タンパクレベルに違いはなかったが、12 か月齢において Akt リン酸化レベルは低下した。

**3. O-GlcNAc 化修飾の変化**

12 か月齢マウスの骨格筋において 3 か月齢マウスと比較して、骨格筋タンパクの O-GlcNAc 化修飾は有意に増加した（$p<0.05$)。O-GlcNAc 化を制御する分子タンパクを評価したところ、GFAT1 は有意に増加した。一方、GFAT2、OGT や OGA は有意な変化がなかった。

## 考　察

本研究において、加齢（12 か月齢）マウスの骨格筋萎縮が観察された。このことはタンパク合成系の減少とタンパク分解系の増加によって達成された。この時、O-GlcNAc 化修飾を受けたタンパクが増加することが明らかとなった。O-GLcNAc 化修飾の増加は GFAT1 の増加によって制御されると考えられた。

過去の報告では、同じ系統のマウスで行われた実験において、12 か月齢、24 か月齢マウスの骨格筋萎縮が観察され、その際、タンパク合成・分解バランスが破綻していた［4]。今回の我々の実験でも同様の結果が観察された。12 か月齢では有意な骨格筋減少であったが、変化の程度は小さかった。過去の報告でも 12 か月齢での変化は小さく、その後により変化が顕著となることが示されている［4]。したがって、より高齢（18 か月齢、24 か月齢）のマウスでの実験を現在行っている。

加齢に伴う骨格筋萎縮の進展とともに、骨格筋抽出タンパクの O-GlcNAc 化修飾は増加した。今回の研究では、O-GlcNAc 化修飾の増加と骨格筋萎縮との因果関係は明らかにすることができなかった。C2C12 骨格筋培養細胞をデキサメタゾンで処置すると、培養細胞萎縮が起こることが示されている［3]。この実験において、O-GlcNAc 化が増加し、Akt リン酸化の低下および Atrogin-1、MuRF1 発現が増加した［3]。この培養細胞の結果は、我々の今回の研究結果を支持している。また、圧負荷肥大心モデルにおいて、心筋における O-GlcNAc 化が増加し、このことは心肥大シグナルの鍵分子である Akt リン酸化の活性化と密接に関連していた［5]。O-GlcNAc 化とリン酸化の部位は同じ場所もしくは近傍で起こるため、タンパクのリン酸化の制御に重要な役割を果たしていると考えられる［6]。したがって、加齢に伴う骨格筋萎縮、骨格筋 Akt リン酸化低下と O-GlcNAc 化修飾が密接に関連している可能性が示唆される。今後この点の因果関係を詳細に検討する必要がある。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究院循環器内科の松島将士先生、末永知康先生である。

## 文　献

1) Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Okita K, Tsutsui H. Skeletal muscle abnormalities in heart failure. Int Heart J. 2015;56(5):475-84. PMID: 26346520 DOI: 10.1536/ihj.15-108

2) Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature.2007;446(7139):1017-22. PMID: 17460662 DOI: 10.1038/nature05815

3) Massaccesi L, Goi G, Tringali C, Barassi A, Venerando B, Papini N. Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy increases O-GlcNAcylation in C2C12 cells. J Cell Biochem. 2016;117(8):1833-42. PMID: 26728070 DOI: 10.1002/jcb.25483

4) Kadoguchi T, Shimada K, Miyazaki T, Kitamura K, Kunimoto M, Aikawa T, Sugita Y, Ouchi S, Shiozawa T, Yokoyama-Nishitani M, Fukao K, Miyosawa K, Isoda K, Daida H. Promotion of oxidative stress is associated with mitochondrial dysfunction and muscle atrophy in aging mice. Geriatr Gerontol Int. 2020;20(1):78-84. PMID: 31758637 DOI: 10.1111/ggi.13818

5) Ishikita A, Matsushima S, Ikeda S, Okabe K, Nishimura R, Tadokoro T, Enzan N, Yamamoto T, Sada M, Tsutsui Y, Miyake R, Ikeda M, Ide T, Kinugawa S, Tsutsui H. iScience. 2021;24(12):103517. PMID: 34934932 DOI: 10.1016/j.isci.2021.103517

6) Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. Biochim Biophys Acta. 2010;1800(2):96-106. PMID: 19647786 DOI:10.1016/j.bbagen.2009.07.018