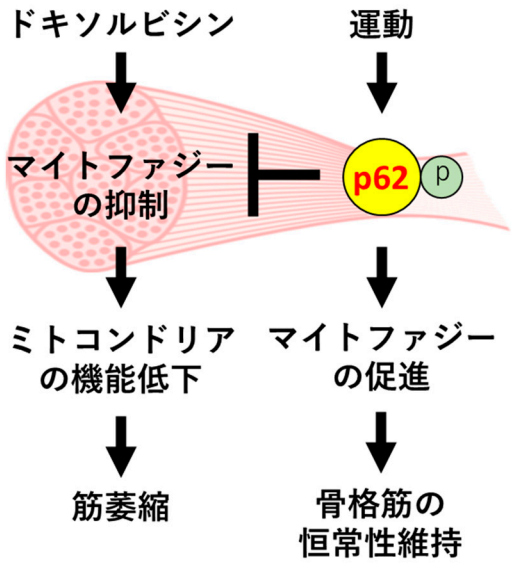
99　運動が筋ミトコンドリアの品質を向上する新規分子機構	山田　麻未

【目的】運動は、骨格筋のミトコンドリアの量や機能を向上する。ミトコンドリアは、骨格筋の恒常性維持に必要不可欠であることから、運動がミトコンドリアの量や機能を向上するメカニズムを解明することは重要な課題である。著者らは、このメカニズムとしてオートファジー基質である p62/SQSTM1 に着目した。p62 は、LC3 などのタンパクと結合しオートファジーを調節する他、さまざまな因子と相互作用することで細胞内情報伝達経路を制御することが報告されている。これまで我々は、運動が骨格筋の p62 をリン酸化することを報告しているが、運動でリン酸化した p62 はミトコンドリアの品質管理に貢献するかは明らかでない。そこで本研究では、筋特異的に p62 の発現を制御したマウスを用いて骨格筋の p62 がミトコンドリアの恒常性を維持することで骨格筋量の維持に貢献するか検証し、p62 の重要性を立証することを目的とした。

【方法】実験には、C57BL/6 マウス、筋特異的 p62 欠損マウス（p62skmKO）、筋特異的 p62 発現増強マウス（p62mTg）とそれぞれの野生型同腹子（WT）を使用した。実験 1 では、雄性 C57BL/6 マウスに 4 週間の自発走行運動を実施し、対照群は通常飼育した。各マウスには、ミトコンドリアの機能が悪化することで筋萎縮を誘導することが報告されているドキソルビシンを腹腔投与し、5 日後に最大筋力を測定した後に解剖し骨格筋を採取した。実験 2 および 3 では、雄性 p62mKO マウスおよび p62mTg マウスとそれぞれの WT マウスにドキソルビシンを腹腔投与し、5 日後に最大筋力を測定したのち解剖し骨格筋を採取した。採取した骨格筋を用いてウェスタンブロットにて p62 のリン酸化やマイトファジータンパクの発現を測定し評価した。

【結果】4 週間の自発走行運動は、ドキソルビシンによる骨格筋の最大筋力の低下を抑制し、複数の骨格筋量の減少を有意に抑制した。また、ドキソルビシンは骨格筋の p62 のリン酸化を低下しマイトファジータンパクの発現を低下したが、運動することでこれらのタンパクの発現が有意に回復した。さらに、p62skmKO マウスは WT マウスと比較してドキソルビシンによる筋萎縮を有意に促進し、p62 のリン酸化が恒常的に誘導している p62mTg マウスは WT マウスと比較してドキソルビシンによる筋萎縮を有意に抑制した。これらの結果より、運動による骨格筋の p62 のリン酸化は、ドキソルビシンによるマイトファジー不全を軽減し筋萎縮を抑制するために重要であることが示唆された。

運動によりリン酸化した p62 が筋萎縮を抑制するメカニズム



99. 運動が筋ミトコンドリアの品質を向上する新規分子機構

山田　麻未

名古屋市立大学 大学院理学研究科 分子生理学研究室

Key words：筋萎縮，運動，ミトコンドリア，p62，マイトファジー

緒　言

運動によるミトコンドリアの量や質の向上は、骨格筋の恒常性を維持するために重要な適応である。これまで著者らは、運動による p62 のリン酸化が筋萎縮の予防に貢献する可能性を報告している［1］。先行研究では、リン酸化した p62 が脂肪肝により蓄積する悪化したミトコンドリアをマイトファジーで分解することが報告されている［2］。しかしながら、筋特異的に p62 の発現を制御し、運動によりリン酸化した p62 がミトコンドリアの品質管理に貢献するか検証した報告はない。そこで著者らは、骨格筋における p62 のリン酸化の意義を立証するため、p62 のリン酸化を恒常的に誘導した筋特異的 p62 発現増強マウスを作製した。作製したマウスから骨格筋を採取して p62 で免疫沈降し、p62 に結合するタンパクをプロテオーム解析から網羅的に分析した。その結果、p62 はミトコンドリアの膜に発現するタンパクに結合する予備実験結果を得た。このタンパクは、マイトファジーを制御することでミトコンドリアの品質を制御する重要な因子であることから、p62 がミトコンドリアの機能を制御し骨格筋の恒常性維持に貢献する可能性は高い。そこで本研究では、ミトコンドリアの機能を低下させ筋萎縮を誘導することが報告されているドキソルビシンを使用し［3〜4］、骨格筋の p62 がミトコンドリアの品質を保持することで筋量の維持に貢献するか検証した。

方　法

1. 自発走行運動実施マウスへのドキソルビシン投与による検討

実験には、10〜12 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを使用した。運動は、運動効果を得ることができマウスに対するストレスが少ないランニングディッシュ（マウス用ワイヤレス運動量測定装置、Med Associates, Fairfax, VT, USA）を使用し 4 週間の自発走行運動を実施した。安静群は運動群の運動期間が終了するまで通常飼育した。運動期間終了後、各マウスにはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で溶解したドキソルビシンを 20 mg/kg に調製し腹腔に投与した。対照群には PBS を投与した。投与した 5 日後、各マウスの最大筋力を測定した後に解剖し、複数の骨格筋の重量を微量重量計にて測定した。採取したヒラメ筋からタンパクを抽出し、ウェスタンブロットにてリン酸化 p62 とマイトファジータンパクの発現を評価した。

2. p62skmKO マウスへのドキソルビシン投与による検討

p62skmKO マウスは、Mlc1f Cre マウスと p62 flox マウスを交配し作製した。実験には、10〜12 週齢の雄性 p62skmKO マウスと WT マウスを使用した。各マウスには実験 1 と同様の方法で筋萎縮を誘導し、最大筋力と複数の骨格筋の重量を測定した。

3. p62mTg マウスへのドキソルビシン投与による検討

p62mTg マウスは、筋クレアチニンキナーゼで p62 の発現を制御したプラスミドを導入し、作製した。実験には、10〜12 週齢の雄性 p62mTg マウスと WT マウスを使用した。各マウスには実験 1 と同様の方法で筋萎縮を

誘導し、最大筋力と複数の骨格筋の重量を測定し、ヒラメ筋のリン酸化 p62 とマイトファジータンパクの発現をウェスタンブロットにて評価した。

結　果

1. 自発走行運動実施マウスへのドキソルビシン投与による検討

ドキソルビシン投与は、マウスの最大筋力と筋重量を有意に低下した。しかしながら、自発走行運動実施後のマウスはドキソルビシン投与による最大筋力の低下と筋重量の低下を改善した（図 1a、b）。またヒラメ筋では、ドキソルビシン投与により p62 のリン酸化とマイトファジータンパクが有意に低下するが、自発走行運動を実施することでこれらのタンパクの減少を有意に抑制した（図 1c）。

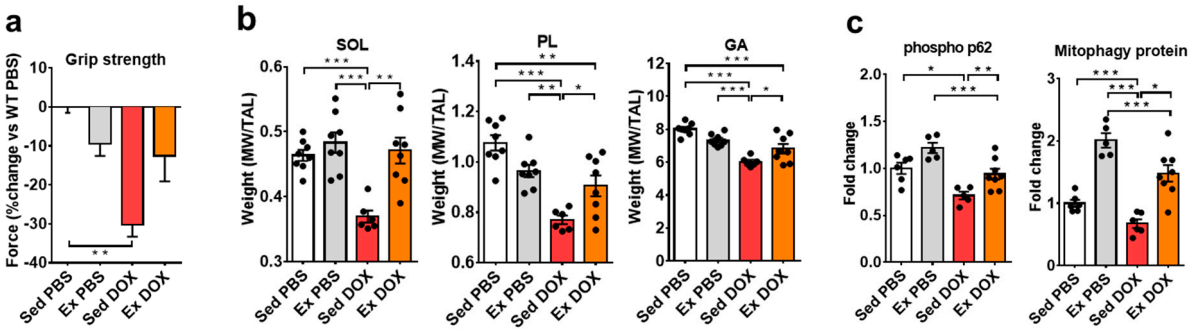


図 1. 自発走行運動実施マウスへのドキソルビシン投与による検討

a) 通常飼育後（Sed）もしくは自発走行運動実施後（Ex）のマウスにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）またはドキソルビシン（DOX）を投与したマウスの最大筋力（Grip strength）を測定し、通常飼育後に PBS を投与したマウスの最大筋力で標準化したものを示している。

b) 通常飼育後もしくは自発走行運動実施後のマウスに PBS またはドキソルビシンを投与したマウスのヒラメ筋（SOL），足底筋（PL），腓腹筋（GA）の重量（MW）を測定し、脛骨の長さ（TAL）で標準化したものを示している。

c) 通常飼育後もしくは自発走行運動実施後のマウスに PBS またはドキソルビシンを投与したマウスの SOL の p62 のリン酸化とマイトファジータンパクの発現量を示している。

統計処理は、Two way ANOVA を使用した（*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001）。

2. p62skmKO マウスへのドキソルビシン投与による検討

p62skmKO マウスは、WT マウスと比較してドキソルビシン投与による最大筋力の低下は促進しなかったが、筋重量の低下を有意に促進した（図 2a、b）。

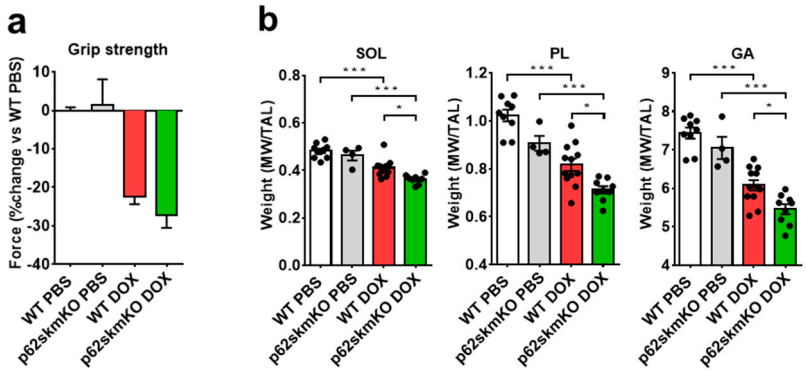


図 2. p62skmKO マウスへのドキソルビシン投与による検討

a) PBS またはドキソルビシンを投与した p62skmKO マウスと WT マウスの最大筋力を測定し、PBS を投与した WT マウスの筋力で標準化したものを示している。

b) PBS またはドキソルビシンを投与した p62skmKO マウスの SOL、PL、GA の重量を測定し、脛骨で標準化したものを示している。

統計処理は、Two way ANOVA を使用した（*p＜0.05、***p＜0.001）。

3. p62mTg マウスへのドキソルビシン投与による検討

p62mTg マウスは、WT マウスと比較してドドキソルビシン投与による最大筋力と筋重量の低下を有意に抑制した（図 3a、b）。また、p62mTg マウスのヒラメ筋ではドキソルビシン投与によるマイトファジータンパクの減少を有意に抑制した（図 3c）。

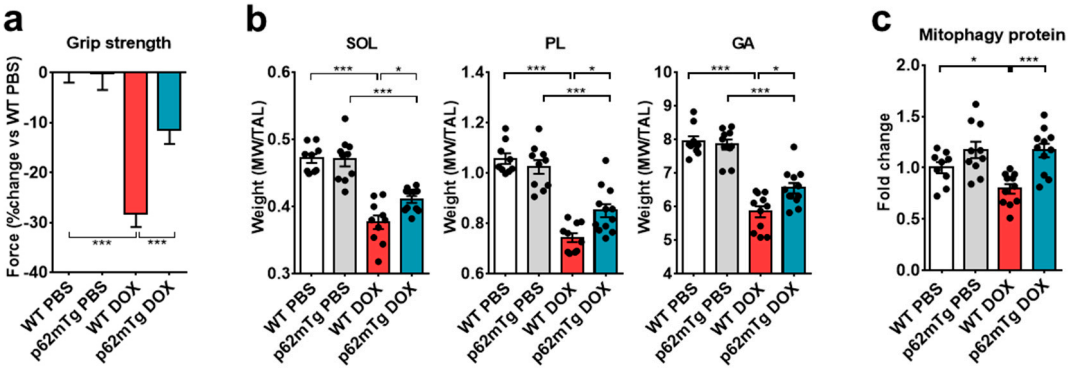


図 3. p62mTg マウスへのドキソルビシン投与による検討

a) PBS または DOX を投与した p62mTg マウスと WT マウスの最大筋力を測定し、PBS を投与した WT マウスの筋力で標準化したものを示している。

b) PBS またはドキソルビシンを投与した p62mTg マウスと WT マウスの SOL、PL、GA の重量を測定し、脛骨で標準化したものを示している。

c) PBS またはドキソルビシンを投与した p62mTg マウスと WT マウスの SOL のマイトファジータンパクの発現量を示している。

統計処理は、Two way ANOVA を使用した（*p＜0.05、***p＜0.001）。

考　察

本研究では、定期的な運動を実施することでドキソルビシン投与による筋萎縮を抑制することが明らかになった。この抑制効果は、ヒラメ筋において非常に顕著に確認された。さらに、ドキソルビシン投与はヒラメ筋において p62 のリン酸化を抑制しマイトファジータンパクの発現を抑制した。しかしながら、これらのタンパクの減少は運動実施により有意に抑制された。これらのことから、運動によるヒラメ筋の p62 のリン酸化はマイトファジーを促進することでドキソルビシンによるマイトファジー不全を抑制するために重要な因子の一つであることが示された。

本研究では、p62skmKO マウスはドキソルビシンによる筋萎縮を促進し、p62mTg マウスはドキソルビシンによる筋萎縮を抑制した。また、p62mTg マウスはドキソルビシンによるマイトファジータンパクの減少を抑制した。これらのことから、骨格筋の p62 やリン酸化した p62 はドキソルビシン投与によるマイトファジーの低下を抑制することで骨格筋の萎縮を軽減するために重要な因子であることが示された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学医学医療系の蕨栄治先生、名古屋市立大学大学院医学研究科の大石久史先生、名古屋市立大学大学院理学研究科の奥津光晴先生である。ご助言、ご指導頂きましたこと、深く御礼申し上げます。また公益財団法人上原記念生命科学財団よりご支援賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

文　献

1) M. Yamada, M. Iwata, E. Warabi, H. Oishi, V. A. Lira and M. Okutsu. p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle. FASEB J. 2019 Jul 33(7):8022-8032. PMID: 30913396 DOI: 10.1096/fj.201900133R

2) Tatsuya Yamada, Daisuke Murata, Yoshihiro Adachi, Kie Itoh, Shoichiro Kameoka, Atsushi Igarashi, Takashi Kato, Yoichi Araki, Richard L Huganir, Ted M Dawson, Toru Yanagawa, Koji Okamoto, Miho Iijima, Hiromi Sesaki. Mitochondrial Stasis Reveals p62-Mediated Ubiquitination in Parkin-Independent Mitophagy and Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Cell Metab. 2018 Oct 2;28(4):588-604. PMID: 30017357 DOI: 10.1016/j.cmet.2018.06.014

3) Hsiu-Chung Ou, Pei-Ming Chu, Yu-Ting Huang, Hui-Ching Cheng, Wan-Ching Chou, Hsin-Lun Yang, Hsiu-I Chen, Kun-Ling Tsai. Low-level laser prevents doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy by modulating AMPK/SIRT1/PCG-1α-mediated mitochondrial function, apoptosis and up-regulation of pro-inflammatory responses. Cell Biosci. 2021 Dec 7;11(1):200. PMID: 34876217 DOI: 10.1186/s13578-021-00719-w

4) Amie J Dirks-Naylor, Samir A Kouzi, Joseph D Bero, Diep T Phan, Heather N Taylor, Stephanie D Whitt, Raean Mabolo. Doxorubicin alters the mitochondrial dynamics machinery and mitophagy in the liver of treated animals. Fundam Clin Pharmacol. 2014 Dec;28(6):633-42. PMID: 24666153 DOI: 10.1111/fcp.12073