

- 8) Bourne, J. & Harris, K.M. (2007) *Curr. Opin. Neurobiol.*, 17, 381–386.
 9) Zhang, F., Aravanis, A.M., Adamantidis, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 577–581.

松尾 直毅

(藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
システム医科学研究部門)

Molecular basis of long-term memory

Naoki Matsuo (Division of Systems Medical Science, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan)

廃用性筋萎縮の治療ターゲットとしての ユビキチンリガーゼ

1. はじめに

高齢者社会を迎えている我が国では、寝たきりなど筋肉を使用しないことによる筋萎縮（廃用性筋萎縮）が、大きな社会問題の一つになっている。近年、なぜ廃用性筋萎縮が起こるのか（なぜ筋肉は使用しないと萎縮するのか？）が、明らかになりつつある。本稿では、そのメカニズムとそれに基づいた廃用性筋萎縮に対する治療について概説したい。

2. 廃用性筋萎縮の分子メカニズム

骨格筋は、運動器の活動状態（機械的ストレス）の影響を最も受けやすい器官であり、身体活動の程度によりそれらの量を変化しうる。例えば、宇宙フライトや寝たきりにより筋量が著明に減少する一方、運動トレーニングによりそれらの量を増大できる。廃用性筋萎縮は、宇宙のような無重力環境で最も起こりやすい。たしかに、地上においてもギプス固定や実験動物の後肢懸垂などでも廃用性筋萎縮は発症するが、萎縮の速度や程度はともに3倍ほど強い。そこで、私はJAXA（宇宙航空研究開発機構）と共同で、宇宙に約2週間滞在した宇宙ラットの骨格筋を用い、萎縮した骨格筋にどのような変化が起こっているのかを調べた。

骨格筋の構成タンパク質を分解する経路には、カテプシン群のリソソーム経路、カルパインによるカルシウム依存

性経路、ユビキチン化タンパク質を分解するプロテアソーム経路がある。宇宙フライトで萎縮した骨格筋では、ユビキチン化したタンパク質の集積、プロテアソーム活性の上昇、ユビキチン発現の亢進などがみられ、ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解経路が最も重要な働きをしていることが示唆された¹⁾。

ユビキチン-プロテアソームタンパク質分解経路について簡単に説明する。この経路はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) とユビキチンリガーゼ (E3) の酵素群からなるユビキチン化システム（分解すべきタンパク質にポリユビキチンを連結する）と、ポリユビキチンを認識して分解する 26S プロテアソームの二つの系からなる。基質の特異性を決定するユビキチンリガーゼの発現がこのシステムの律速段階であると考えられている。宇宙ラットの萎縮した骨格筋で発現の上昇しているユビキチンリガーゼを網羅的に解析したところ、*Cbl-b*、*MuRF-1*、*Siah-1A* と *MAFbx-1/atrogin-1*（この遺伝子だけは、当時我々の用いた Chip にはまだ載っていなかった。論文が発表された後に、解析すると約 20 倍の発現上昇が見られた。残念!!）であった²⁾。

MuRF-1 と *MAFbx-1/atrogin-1* など筋萎縮原因遺伝子 (atrogenes) が³⁾、21 世紀に入り DNA マイクロアレイ法により相次いで発見された^{3,4)}。これらは、坐骨神経を切除すると発現が上昇する骨格筋および心筋に特異的なユビキチンリガーゼ群である。さらに、それぞれの遺伝子をノックアウトしたマウスが坐骨神経切除による筋萎縮に抵抗性を示すことより、筋萎縮原因遺伝子であると証明された。その後の研究により、運動による筋肥大と廃用性筋萎縮は、**図 1** に示すような機構により誘導されていると考えられている。筋細胞の最も強力な栄養因子は、IGF-1 (insulin-like growth factor-1) であるが、筋萎縮環境に無い場合は、そのシグナルが十分に活性化され、筋タンパク質合成は亢進し筋タンパク質分解は抑制される⁵⁾。しかしながら、筋萎縮環境にある場合では IGF-1 のシグナルが減弱し、Akt-1/PKB (protein kinase B) の活性化 (リン酸化) が傷害される。その結果、筋タンパク質合成が低下し、逆に筋タンパク質分解は亢進する。興味深いのは、筋タンパク質分解である。先に示した atrogenes の発現はともに、Akt-1/PKB の下流にある FOXO (forkhead box O) 転写因子により制御されている。つまり、Akt-1/PKB の活性化が低下するとリン酸化しなかった FOXO 転写因子が核内に移行し、atrogenes の転写を高めると考えられている。これら atrogenes の生化学的特性については以下に詳しく述べる。

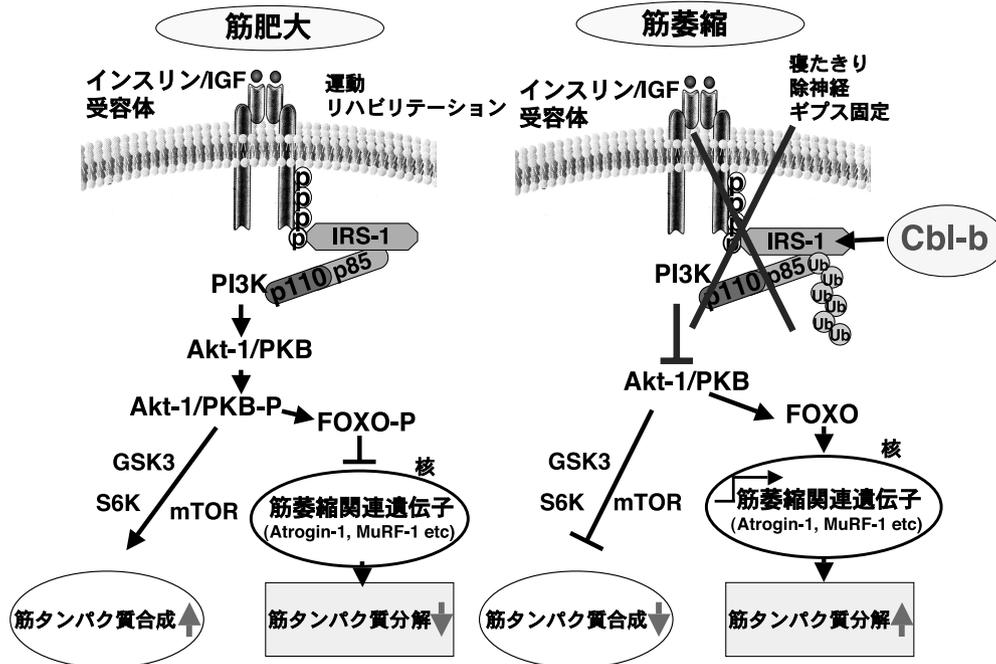


図1 筋肥大と筋萎縮のメカニズム
Sandri et al., Cell (2004) の一部改変

3. MAFbx-1 (muscle atrophy F-box protein-1)/atrogin-1

ユビキチンリガーゼは、その形態から図2に示すようにHECT (homologous to the E6-AP C-terminus) 型, Uボックス型, RING (really interesting novel gene) 型と SCF (Skp1-cullin-F-box) 複合型の四つに分類される。MAFbx-1/atrogin-1は、SCF 複合型ユビキチンリガーゼに属する。SCF 複合型ユビキチンリガーゼは、cullin をプラットフォームタンパク質として、Rbx1 (Roc1) のRING ドメインにE2が結合し、Skp1 を介して結合する F ボックスタンパク質が基質タンパク質を認識しユビキチン化する。MAFbx-1/atrogin-1 は、この F ボックスタンパク質の一種で分子量は約 40 kDa である。SCF 複合型ユビキチンリガーゼには、Nedd8 ユビキチン様タンパク質、CAND1 (cullin-associated Nedd8-dissociated) など、基本タンパク質以外にも結合するタンパク質が数多く報告されているが、これらが MAFbx-1/atrogin-1 ユビキチンリガーゼの活性などに影響を与えているのかどうかは不明である。

MAFbx-1/atrogin-1 は、心筋のカルシニューリン A をユビキチン化し分解することが報告されている⁶⁾。実際、MAFbx-1/atrogin-1 の過剰発現は、カルシニューリンを介した心筋肥大を阻害する⁶⁾。しかしながら、骨格筋におい

ても MAFbx-1/atrogin-1 がカルシニューリン A を基質としているかはまだはっきりしていない。一方、骨格筋では、筋細胞の分化や発達に重要な転写因子である MyoD が、MAFbx-1/atrogin-1 の基質であることがわかった⁷⁾。ところが、筋萎縮は分化した横紋筋細胞に起こるものであり、しかも、MAFbx-1/atrogin-1 欠損マウスの筋組織は正常であるので、MyoD と MAFbx-1/atrogin-1 の結合の生理的意義は不明のままである。近年、翻訳システムの eIF3 が MAFbx-1/atrogin-1 の基質であることも報告され⁸⁾、筋萎縮における筋タンパク質合成の低下において重要な役割が示唆されている。

4. MuRF-1 (muscle RING finger protein-1)

MuRF-1 は、分子量 40 kDa の単量体で、N 端に E2 結合領域である RING ドメイン、中央部に二つのコイルドコイルドメインを有する RING 型ユビキチンリガーゼである (図3)。筋萎縮関連遺伝子として認識されるのとほぼ同時に、Labeit らのグループにより巨大な筋構成タンパク質であるタイチン (コネクチン) と M 線と結合する筋特異的タンパク質として同定された⁹⁾。そのため、骨格筋の構成タンパク質の分解を担うユビキチンリガーゼである可能性が示唆されていた。実際、骨格筋細胞ではミオシン重鎖

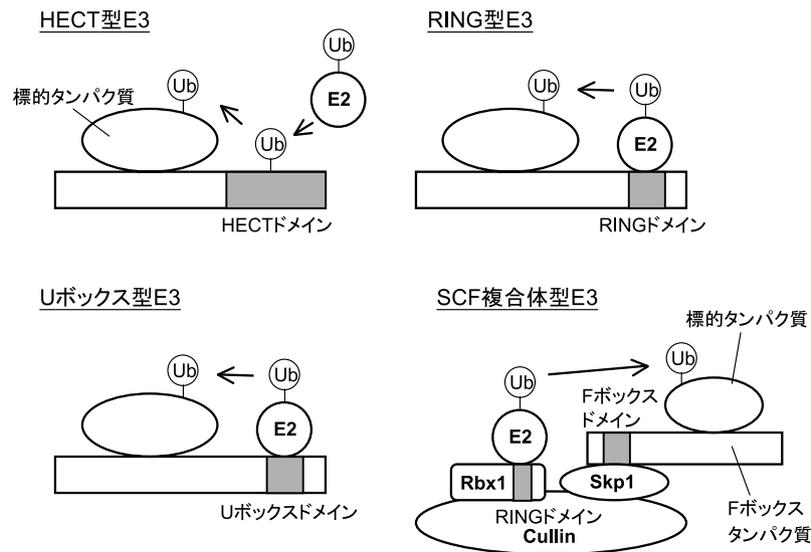


図2 ユビキチンリガーゼ (E3) の種類

を、心筋細胞ではトロポニンIをユビキチン化し、それらの分解を亢進することも報告されている^{10,11}。興味深いことに、MuRF-1は核内にも局在し、さらにグルココルチコイド応答性の転写を調節するGMEB-1 (glucocorticoid modulatory element binding protein-1) と結合することもわかった¹²。この結合の生理的意義は不明であるが、MuRF-1が転写因子のco-activator (co-repressor) としても機能していることを示唆している。

5. Cbl-b

Cbl-bは、がん遺伝子c-Cblと同じく増殖因子の作用を負に調節し、細胞分化や組織の発達を制御するアダプタータンパク質Cblファミリーに属する(図4)。分子量約120kDaと巨大なRING型ユビキチンリガーゼであり、チロシンリン酸化型受容体や細胞内シグナル分子をユビキチン化し

それらの分解を亢進することにより、増殖因子の作用を負に制御していることがわかってきた。図4に示すように、N端にリン酸化チロシンを認識するTKB (tyrosine kinase binding) ドメイン、中央部にRINGドメインとプロリンリッチドメイン、C端にロイシンジッパーが存在する。Cbl-bと結合するタンパク質は、Vav, EGF受容体, PI3Kなど非常に多いが、すべてをユビキチン化するわけではない¹³。

我々は、萎縮筋で著明に発現上昇がみられるCbl-bの機能について研究している。先に示したように、廃用性萎縮筋ではIGF-1シグナルが減弱している。しかしながら、なぜ筋肉を使用しなくなるとIGF-1シグナルが減弱するのかは不明のままであった。図1に示すように、我々は、宇宙フライトや尾部懸垂により萎縮した骨格筋を用いて、このCbl-bがIRS-1 (insulin receptor substrate-1) と特異的に結合し、そのユビキチン化と分解を亢進するため、IGF-1シグナルが減弱することを明らかにした^{14,15}。Cbl-b遺伝子欠損マウスの後肢筋は、尾部懸垂による筋萎縮に抵抗性を示し、下流のatrogin-1の発現も上昇しなかった¹⁵。

6. その他の筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ

廃用性の萎縮筋で発現上昇するその他のユビキチンリガーゼとして、HECT型のNedd4やKIAA10, RING型のOzz, Uボックス型のUFD2とCHN-1などが報告されている。KIAA10は筋特異的TATAボックス結合タンパク質TIP120Bを、Ozzはβ-カテニンを、UFD2とCHN-1はミ



図3 MuRF-1の構造

RING: RINGフィンガードメイン
MFC: MuRFファミリー高保存領域
B-Box: Bボックス型ジンクフィンガードメイン
CC: コイルドコイルドメイン
AR: 酸性アミノ酸残基領域
E2: ユビキチン結合酵素
Ub: ユビキチン

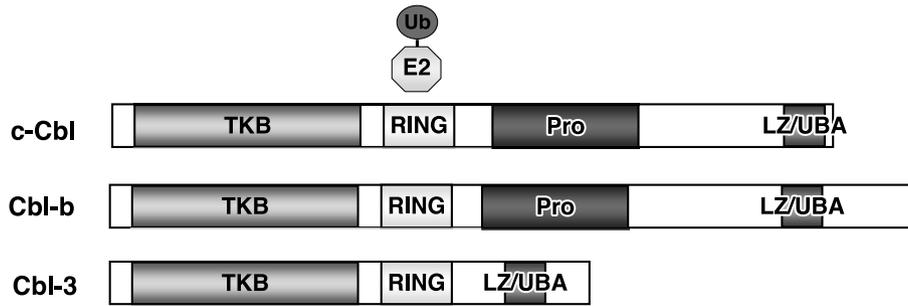


図4 Cblファミリーの構造
 TKB：チロシンキナーゼ結合ドメイン
 RING：RINGフィンガードメイン
 Pro：プロリンリッチドメイン
 LZ/UBA：ロイシンジッパー/ユビキチン結合ドメイン
 E2：ユビキチン結合酵素
 Ub：ユビキチン

オシンのシャペロンタンパク質であるUCN-45をユビキチン化する。

7. ユビキチンリガーゼ阻害剤

それぞれのユビキチンリガーゼ遺伝子欠損マウスが廃用性筋萎縮に抵抗性を示すことから、ユビキチンリガーゼの阻害剤は廃用性筋萎縮の有効な治療薬となり得ると考えた。ユビキチンリガーゼは基質の立体構造を認識して結合するため、Cbl-bとその基質IRS-1の結合を阻害する物質をオリゴペプチドに求めた(図5A)。Cbl-bはIRS-1の

ン酸化チロシンを認識して結合するので、その結合を競合的に阻害できるオリゴペプチドを探索した。Cbl-bによるIRS-1のユビキチン化を細胞なしで再現できる無細胞系のシステムを用いてオリゴペプチドを探索した結果、ある合成オリゴペプチド(Cblのinhibitorなので、Cblinと名づけた)と大豆タンパク質由来ペプチドのグリシニン画分が、IRS-1のユビキチン化を著明に阻害することを見出した(特願2006-145944, 特願2006-185089)。さらに、この合成オリゴペプチドを、坐骨神経を切除したマウス(神経性筋萎縮マウス)の腓腹筋に投与すると、IRS-1のユビキチ

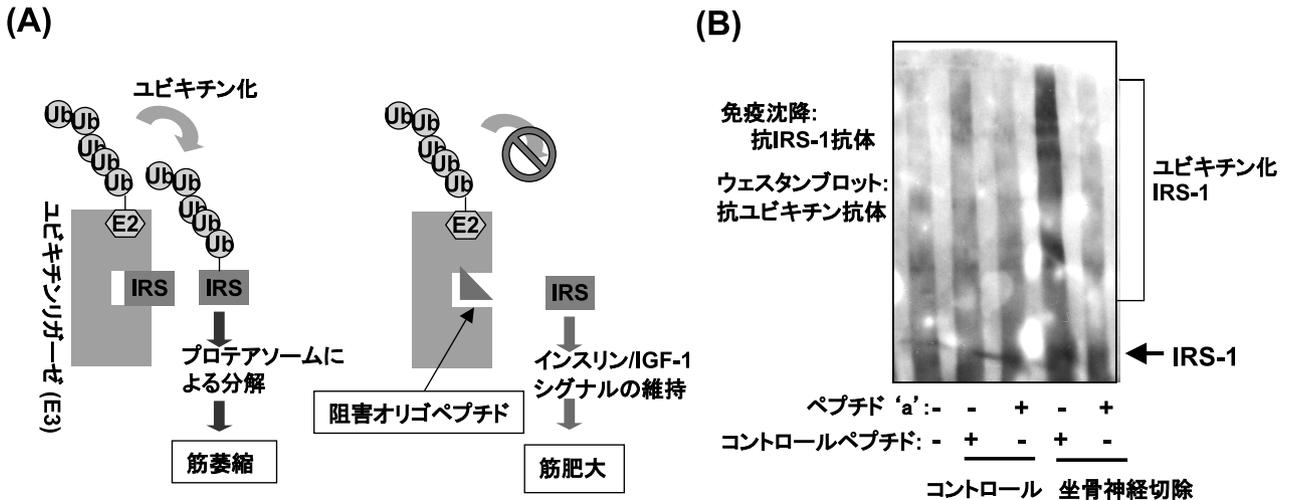


図5 オリゴペプチドによるユビキチン化阻害
 (A) 阻害メカニズムの原理
 (B) 坐骨神経切除マウスの腓腹筋に、オリゴペプチド(コントロールペプチドと阻害ペプチド)を2日おきに5回筋肉注射した。筋肉を採取し、IRS-1の抗体で免疫沈降(IP)し、ユビキチンに対する抗体でウェスタンブロット解析(IB)を行った。

ン化(図5B)とMAFbx-1 atrogin-1発現の増大が抑制され、坐骨神経切除による筋湿重量の減少が回復した¹⁵⁾。

8. おわりに

「運動」は、動物の生命維持に必要な不可欠な活動である。加齢などにより運動が障害されることは、動物にとって事実上の「死」を意味する。「骨格筋」は、その「運動」を担う主要器官であるにも関わらず、これまでの研究は骨粗鬆症など骨を中心としたものに偏ってきた。それゆえ、骨折により寝たきりになった場合、筋肉が萎縮してしまい、骨折が治癒した後も寝たきりという悲惨な状況になっている。しかも、廃用性筋萎縮の効果的な治療法は、リハビリテーション以外に無いのが実情である。本稿で示したように、近年の筋病学の進歩により廃用性筋萎縮の原因遺伝子(ユビキチンリガーゼ)が明らかになってきた。その阻害剤は、廃用性筋萎縮の有効な薬剤になり得る。ユビキチンリガーゼの阻害剤は、プロテアソーム阻害剤に比べ、ほとんど開発されていない。ユビキチンリガーゼは、廃用性筋萎縮だけでなく、神経変性疾患の原因でもあるので、今後のさらなる研究が待たれている。我々も、先に示したユビキチン化阻害ペプチドの立体構造に基づいた低分子ユビキチンリガーゼ阻害剤を開発中である。

謝辞

本研究は、JAXA および日本宇宙フォーラムの提供する研究助成金と農水省生研センターイノベーション創生事業からの競争的研究費により行われたものである。さらに、本研究の遂行にご援助・ご協力頂いた国立精神・神経センター武田伸一先生、埜中征哉先生をはじめとする多くの先生方および徳島大学生体栄養学分野の大学院生に対しても、感謝の意を表します。

- 1) Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., Kitano, T., Baldwin, K.M., Izumi, R., Nonaka, I., Towatari, T., Teshima, S., Rokutan, K. & Kishi, K. (2001) *FASEB J.*, **15**, 1279-1281.
- 2) Nikawa, T., Ishidoh, K., Hirasaka, K., Ishihara, I., Ikemoto, M., Kano, M., Kominami, E., Nonaka, I., Ogawa, T., Adams, G.R., Baldwin, K.M., Yasui, N., Kishi, K., & Takeda, S. (2004) *FASEB J.*, **18**, 522-524.
- 3) Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K. Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T. N., Yancopoulos, G.D., & Glass, D.J. (2001) *Science*, **294**, 1704-1708.
- 4) Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., & Goldberg, A.L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14440-

- 14445.
- 5) Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., & Goldberg, A.L. (2004) *Cell*, **117**, 399-412.
- 6) Li, H.H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D.Z., & Patterson, C. (2004) *J. Clin. Invest.*, **114**, 1058-1071.
- 7) Tintignac, L.A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovich, M.P., & Leibovich, S.A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **280**, 2847-2856.
- 8) Csibi, A., Leibovitch, M.P., Cornille, K., Tintignac, L.A. & Leibovitch, S.A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 4413-4421.
- 9) Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A.S., Pelin, K., Witt, C.C., Bang, M.L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C.C., Sorimachi, H., & Labeit, S. (2001) *J. Mol. Biol.*, **306**, 717-726.
- 10) Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E., & Glass, D.J. (2007) *Cell Metab.*, **6**, 376-385.
- 11) Kedar, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H., Rockman, H.A., & Patterson, C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 18135-18140.
- 12) McElhinny, A.S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., & Gregorio, C.C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **157**, 125-136.
- 13) Tsygankov, A. (2008) in CBL proteins (Tsygankov, A. ed.), pp. 75-98, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- 14) Suzue, N., Nikawa, T., Onishi, Y., Yamada, C., Hirasaka, K., Ogawa, T., Furochi, H., Kosaka, H., Ishidoh, K., Gu, H., Takeda, S., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Yamamoto, H., Kishi, K., & Yasui, N. (2006) *J. Bone Miner. Res.*, **21**, 722-734.
- 15) Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., Yamada, C., Ohno, A., Okumura, Y., Nonaka, I., Yasutomo, K., Baldwin, K.M., Kominami, E., Higashibata, A., Nagano, K., Tanaka, K., Yasui, N., Mills, E.M., Takeda, S., & Nikawa, T. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, in press.

二川 健

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
生体栄養学)

Development of ubiquitin ligase inhibitor as a drug against unloading-mediated muscle atrophy
Takeshi Nikawa (Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan)