

## 総説 (第29回徳島医学会賞受賞論文)

# 廃用性筋萎縮を防ぐ抗ユビキチン化ペプチド Cblin (Cbl-b inhibitor) の高機能化

越智 ありさ<sup>1)</sup>, 北畑 香菜子<sup>1)</sup>, 平坂 勝也<sup>1)</sup>, 真板 綾子<sup>1)</sup>, 近藤 茂忠<sup>1)</sup>,  
奥村 裕司<sup>1)</sup>, 長野 圭介<sup>2)</sup>, 河村 知志<sup>3)</sup>, 根本 尚夫<sup>3)</sup>, 二川 健<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>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分野

<sup>2)</sup>大塚製薬株式会社 探索第一研究所

<sup>3)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部機能分子合成薬学分野

(平成24年9月26日受付) (平成24年11月14日受理)

### はじめに

わが国の平均寿命, 健康寿命は, 世界トップクラスであるが, 高齢者の割合も高くなり超高齢化社会に突入している。それに伴い寝たきり患者数は増加の一途を辿っており, 医療費の圧迫など大きな社会問題となっている。また, 国際宇宙ステーション内の日本宇宙実験棟「きぼう」が完成し, 長期宇宙滞在が可能となってきた。このような寝たきり状態や無重力環境下では, 骨格筋への負荷が著しく減少し, 廃用性筋萎縮が起こる。しかしながら, この廃用性筋萎縮のメカニズムは研究段階であり, その有効な治療法はまだ開発されていない。そこで, われわれは, 廃用性筋萎縮のメカニズムを明らかとし, 栄養学的な予防・治療法を開発することを目的とし, 研究を行ってきた。

### 無重力とユビキチンリガーゼ Cbl-b

筋肉を構成している蛋白質(筋蛋白質)は, 常に分解と合成を繰り返し, その量が平等であると, 一定の筋量が維持される。地上環境では, 筋肉に負荷がかかるため, この量のバランスが保たれるが, 寝たきりや無重力環境の状態になると, バランスを保つことができなくなる。このバランスの破綻は, 筋蛋白質の合成量が低下し, 分

解量が増えることに起因する<sup>1,2)</sup>。われわれは, このバランスの破綻の原因を明らかとするために, 宇宙フライトを行ったラットの腓腹筋を解析し, 無重力環境における筋蛋白質の分解の亢進にユビキチン・プロテアソーム系が重要な役割を担っていることを明らかにした<sup>3)</sup>。また, DNA マイクロアレイ法での解析の結果, ユビキチンリガーゼであるCbl-b (casitas B-lineage lymphoma b) の発現が顕著に増加していることを明らかにした<sup>4)</sup>。

ユビキチンリガーゼは, Cbl-b 以外にも生体内に約1000種類ほど存在すると言われており, さまざまな基質蛋白質に対応している。筋蛋白質の分解に関連するユビキチンリガーゼでは, MuRF-1 (muscle RING finger protein-1) とMAFbx (muscle atrophy F-box protein)/atrogin-1があり, 総称して筋萎縮関連遺伝子群またはAtrogenesと呼ばれている。これらは, ともに遺伝子欠損マウスが筋萎縮のモデルである坐骨神経切除に耐性を示すことから同定された<sup>5)</sup>。

ユビキチンリガーゼは, 形態の違いからHECT (Homologous to the E6-AP C-terminus) 型, Uボックス型, RING (really interesting novel gene) 型, SCF (Skellucullin-F-box) 複合型の4種に分類される。このうち, Cbl-b と MuRF-1はRING型, MAFbx/atrogen-1はSCF型に属している。ユビキチンリガーゼは, それぞれが認識する基質にユビキチン鎖を結合させ, プロテアソーム

による分解へと導く。そして、Cbl-bが認識する基質は、筋肉の成長に重要な役割を担う、IGF-1 (insulin-like growth factor-1) シグナルの細胞内シグナル伝達分子である、IRS-1 (insulin receptor substrate-1) である。

### IGF-1シグナルと Cbl-b

IGF-1は、成長ホルモンや運動刺激に反応して、肝臓や筋細胞で合成され、筋肉や骨の成長を促進する<sup>6)</sup>。IGF-1がその受容体に結合すると、IRS-1, PI3K (Phosphoinositide3-kinase), Aktの順にリン酸化が起こる。Aktの活性化により、S6K, GSKを介して蛋白質合成が亢進し、その一方で、筋萎縮関連遺伝子の転写因子であるFOXO (fork head box O) のリン酸化も促進される。FOXOはリン酸化により、核内移行が妨げられるため、筋萎縮関連遺伝子の発現は抑制される(図1)。しかし、前項で述べたように、無重力環境下では、ユビキチンリガーゼCbl-bによりIRS-1はユビキチン化され、そのユビキチン化を認識するプロテアソームによって分解される。その結果、AktやFOXOのリン酸化が起こらず、筋蛋白質合成が低下する。さらに、リン酸化されな

くなったFOXOは、核内へ移行し筋萎縮関連遺伝子の転写が起こる(図1)。実際、宇宙フライトラットの骨格筋では、Cbl-bの発現増大、IRS-1の分解亢進やAktのリン酸化の減少が確認された<sup>7)</sup>。また、培養細胞(筋管細胞)にCbl-bを強発現させた場合においても、Cbl-bはIRS-1と結合しユビキチン化と分解を亢進し、筋管を萎縮させた<sup>7)</sup>。さらに、ラットの前脛骨筋にCbl-bを強発現させた場合にも、Cbl-bはIRS-1のユビキチン化を促進し筋萎縮を誘導した<sup>7)</sup>。以上の知見から、われわれは、Cbl-bは無重力下においてIRS-1のユビキチン化し分解を促進する、廃用性筋萎縮の原因の一つであると考えた。

### 筋萎縮を防ぐオリゴペプチド Cblin (Cbl-b inhibitor) の開発

前述のように、廃用性筋萎縮においてユビキチンリガーゼCbl-bは、IRS-1をユビキチン化し分解を促進することで、IGF-1シグナルを負に制御している。さらに、Cbl-b遺伝子欠損マウスは、尾部懸垂(微小重力モデル)による筋萎縮に抵抗性を示す<sup>7)</sup>。よって、廃用性筋

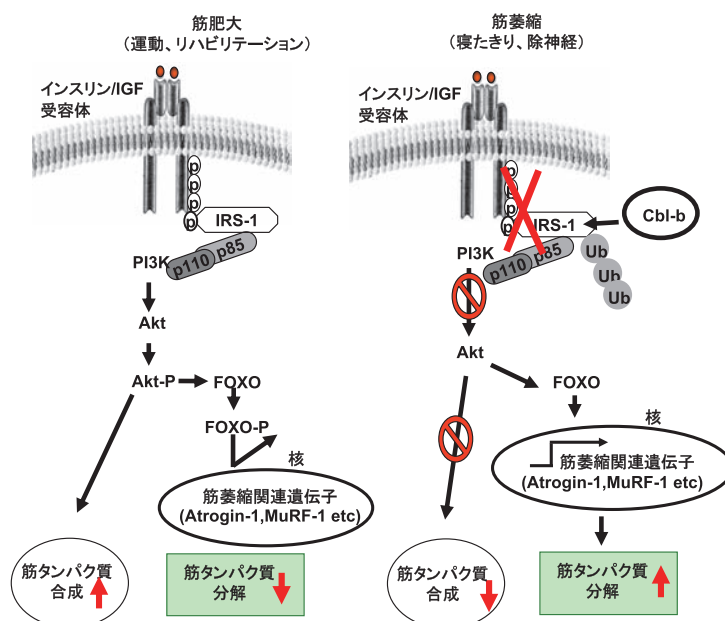


図1 IGF-1シグナルと Cbl-b

萎縮の治療には、このCbl-bのIRS-1に対するユビキチンリガーゼ活性を阻害することが有効であると考えた。Cbl-bは、基質の一部分（ペプチド）の立体構造とリン酸化チロシン残基を認識して結合することが報告されている<sup>8)</sup>。また、IGF-1シグナル伝達において、IRS-1のリン酸化は必須である<sup>9)</sup>。そこで、IRS-1のアミノ酸配列のうち、IGF-1シグナル伝達に伴って起こるチロシンリン酸化の部位を中心とした、5つのアミノ酸残基からなるペプタペプチドを作成し、それらのCbl-bによるIRS-1のユビキチン化阻害効果を実験系ユビキチン化法（Cell-free ubiquitination assay）で検討した（図2）。

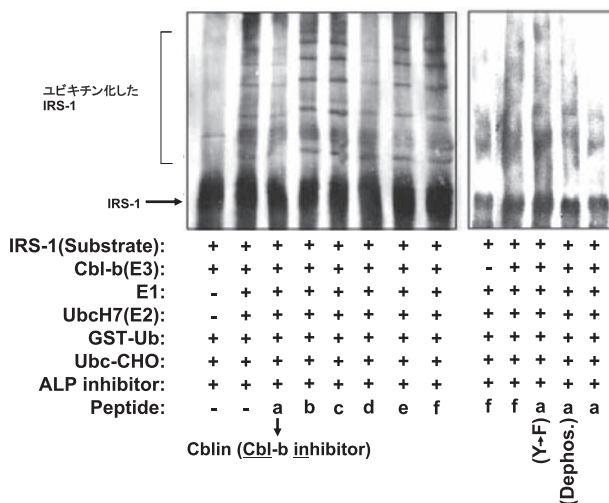
無細胞系ユビキチン化法とは、試験管内でユビキチンリガーゼによる基質のユビキチン化を再現する方法である。試験管内に、E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、Cbl-b（E3；ユビキチンリガーゼ）とATP、ユビキチン及び基質であるIRS-1を入れ、至適条件下で数時間反応させると、基質がユビキチン化される。この方法は、基質蛋白質とユビキチンリガーゼ以外の蛋白質が反応系に存在しないため、ペプチドのスクリーニングに有効である。この系を用いて、作成したペプチドのCbl-bのユビキチンリガーゼ活性阻害効果を検討したところ、DGpYMPの配列を持つペプチド‘a’（特願2006-145944）が最も高い効果を示した（図3）。したがって、このペプチド‘a’をCbl-bユビキチンリ

```

MASPPDIDGF SDVRI VGVLR KPKSMHKRRF VLRAASEAGG PARLEYEYNE
KKWRHKSSAP KRSIFLESDF NINKRADSKN KHLVALYTRD EHF AIAADSE 100
AEGDSWYQAL LQILNIRAKAH HDGAGGGGGG SCGSSGSGVGE AGEDLSYDTG
PGPAFKEVWD VILKPKGLGQ TKNLIGIYLR GLTSKTI SFV KLNSEAAAVV 200
LQLMNIRRCQ HSENFFFIEV GRSVAITGPG FIMQVDDSVV AQNHETILE
AMRAMSDEFR PRKTSQSSSS CSNPI SVPLR RHILNFPFPPS QVGLTRRSRT 300
ESIATSPAS MYGKPKGDFR VRASSDDEGT MSRFASVDGS PVSPSTNRTH
AHRHRSSRL HPPLNHSRSI PMPSSRCSPS ATSPVSLSSS STSGHGSTSD
CLFPRRSAS VSGSPSDGGF ILSDEYSSSP GDFRSSFVRSV TPDSLGHFPF 400
ARGEELSNY ICMGGKAST LTAPNGHY IL SRGNGHRYI PGATMGTSFA
LTGDEAAGAA DLDMRFKRRT HSAGTSPIT IS HGKTPSSSV VSIEEYEMM
PAAYPPGGGS GGRLPGRHRS AFVPTHSYPE EGLEMHILER RGGHRRPSS 600
NLHIT DGpYMP MSPGVAPVPS NRKGNQDYMV MSPKSVSAFO QIINP IRRHP
GRVDFNGYHM MSPSGSCSPD IGGSCSSSS ISAAPSGSSY QKPNWTVGG 700
HHTHALPHAK PPVESGGKQL LPCTGDYMMN SPVQDSNTSS PSECYGPED
PQHKPVLSSY SLPRSFKHTQ RPEPEEGAR HQHLRLSSS GRLRYATAE 800
DSSSSTSSDS LGGYCGARP ESSVTHPHH ALQPHLPKRV QTAAGLNSRL
ARPTLRLGDK PKASTLPRVR EGQGGGGGGG QSSLHPPEPK SGEYVNI EF 900
GSGOPGYLAG PATSRSSPSV RCLPQLHPAP REETGSEYM NIDLGPARRA
TWQESGGVEL GRVGPAPPGA ASICRPTRSV PNRSLGVTITL QICGPROSYV 1000
DTPSPVAVSY ADMRTGIAAE KVSLPRITGA APPSSSTASA SASVTPOGAA
EQAAHSSLLG GPOGPGMSA FTRVNLSPNH NGSAKVIRAD TQGRRRHSS 1100
ETFSAPTRAA NTVSFGAAGAA GGGSGGSGSE VKRHSSASF NVILRPGDLG
GASKESAPGC GAAAGLEL NYIDL DLVKD VKQHPQDCPS QGQSLPPPPP 1200
HQPLGSNEGS SPRRSSEDLIS TYAS NFKQG PEDRG
    
```

IRS-1のアミノ酸配列のうち、他のタンパク質との結合が報告されている部位をもとに、リン酸化チロシンを中心としたペプタペプチドを5つ作成した。

図2 IRS-1アミノ酸配列と合成ペプタペプチド選択部位



IRS-1のユビキチン化に対する合成ペプチド(Cblin)の効果を検討するため、無細胞系ユビキチン化法を用いて試験管内で反応させることにより、細胞を用いずユビキチン化反応を再現することができる。ユビキチン化されたIRS-1は、抗IRS-1抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。

図3 合成ペプタペプチドによるユビキチン化阻害効果の検討（無細胞系）

ガーゼ活性を阻害することからCblin（Cbl-b inhibitor）と名付けた<sup>10)</sup>。このとき、Cblinのリン酸化チロシン残基を脱リン酸化（Dephos.）したり、フェニルアラニンに置換（Y→F）したりした場合、そのユビキチン化阻害効果は低下したことから、リン酸化チロシン残基がその効果に重要な役割を担うことが示唆された（図3）。また、Cblinは、HEK293細胞を用いた培養細胞系でのユビキチン化法においても同様の阻害活性を示した（データ示さず）。さらに、坐骨神経切除によって神経性筋萎縮を引き起こしたマウスの腓腹筋にCblinを投与した場合にも、腓腹筋におけるIRS-1のユビキチン化と分解が抑制され、筋萎縮原因遺伝子の一つであるMAFbx/atrogen-1の発現も抑制され、筋萎縮が改善された<sup>7)</sup>。

N 端修飾による Cblin の高機能化

前項で述べたように、Cblinは *in vivo* でも筋萎縮を改善した。しかしながら、その効果を得るには、大量のCblinの投与が必要であった。これは、Cblinはペプチドであるため、生体内でペプチダーゼによって大部分が

分解されてしまうことが、主な原因と考えられる。そこで、Cblin にペプチダーゼによるペプチドの分解に抵抗性を示すと考えられる修飾を施し、Cblin の効果を増強できないか試みた。Cblin を修飾するにあたりわれわれは、炭素数14の長鎖脂肪酸であるミリスチン酸がペプチドのN末端に結合するミリストイル化を選択した。ミリストイル化は、生体内で起こる翻訳後修飾であり<sup>11)</sup>、細胞膜浸透性を高め、ペプチドの構造を安定化することがわかっている<sup>12,13)</sup>。

培養細胞系でミリストイル化Cblin のCbl-b ユビキチンリガーゼ活性阻害効果を検討した。その結果、未修飾のCblin のIRS-1 ユビキチン化阻害効果に対するIC<sub>50</sub>が120 $\mu$ Mであるのに対し、ミリストイル化Cblin は30 $\mu$ Mであった。また、培養細胞系筋管萎縮モデルであるデキサメタゾン処理で起こる筋管の萎縮に対しても、ミリストイル化Cblin は未修飾のCblin と比較して低濃度で高い効果を示した(データ示さず)。さらに、各ペプチドの細胞内取り込み量を比較したところ、ミリストイル化Cblin は、未修飾のCblin と比較し100倍近くもの量が細胞内に取り込まれていることが示唆された(データ示さず)。したがって、ミリストイル化は、Cblin をアミノペプチダーゼからの分解から守るだけでなく、細胞内への取り込み量を高めることで、Cblin の効果を増強すると考えられた。

#### おわりに

本研究により、寝たきりや無重力環境下では、ユビキチンリガーゼCbl-b の発現上昇により、筋萎縮が誘導されることが明らかとなった。そして、Cbl-b とその基質であるIRS-1との結合を阻害するCblin を開発した。さらに、ペプチドの状態では、効果が少ないCblin に対し、N端のミリストイル化修飾は、効果を増強させるのに有効であることが示唆された。

ユビキチンリガーゼ阻害の利点は、基質特異性の高さであり、現在用いられているプロテアソーム阻害剤に比べ、副作用が少ないことが予測される。われわれは、今回発見したCblin を用いて、世界初のユビキチンリガー

ゼ阻害剤を開発中である。これは、筋萎縮だけでなく、神経筋変性疾患や糖尿病の治療にもつながると考えている。そして、われわれの研究が、宇宙飛行士や寝たきり患者の筋萎縮、神経筋変性疾患の予防・治療法に貢献できることを期待している。

#### 謝 意

本研究は、JAXA (宇宙航空研究開発機構) MyoLab 宇宙実験のためのJAXAからの支援とJSF (日本宇宙フォーラム) による地上公募研究助成金、および農林水産省生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業からの支援により行われました。この場を借りて御礼申し上げます。また、本研究において、御指導、御鞭撻を頂きました徳島大学医学部栄養学科の諸先生方ならびに同生体栄養学分野の皆様にご心から感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Thomason, D. B., Biggs, R. B., Booth, F. W.: Protein metabolism and  $\alpha$ -myosin heavy chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, 257: R300-R305, 1989
- 2) Tischler, M. E., Rosenberg, S., Satarug, S., Henriksen, E. J., *et al.*: Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*, 39: 756-763, 1990
- 3) Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., *et al.*: Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.*, 15: 1279-1281, 2001
- 4) Nikawa, T., Ishidoh, K., Hirasaka, K., Ishihara, I., *et al.*: Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J.*, 18: 522-524, 2004
- 5) Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., *et al.*: Identification of ubiquitin ligases required for

- skeletal muscle atrophy. *Science*, **294** : 1704-1708, 2001
- 6) Goldspink, G., Williams, P., Simpson, H. : Gene expression in response to muscle stretch. *Clin. Orthop. Relat. Res.* : S146-S152, 2002
- 7) Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishido, K., *et al.* : Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol. Cell. Biol.*, **29** : 4798-4811, 2009
- 8) Thien, C. B., Langdon, W. Y. : Cbl : many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2** : 294-307, 2001
- 9) Greene, M. W., Morrice, N., Garofalo, R. S., Roth, R. A. : Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. *Biochem. J.*, **378** : 105-116, 2004
- 10) 二川健 : 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. *生化学*, **81** : 614-618, 2009
- 11) Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F. : N-terminal N-myristoylation of proteins : prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, **317** : 541-557, 2002
- 12) Nelson, A. R., Borland, L., Allbritton, N. L., Sims, C. E., *et al.* : Myristoyl-Based Transport of Peptides into Living Cells. *Biochemistry*, **46** : 14771-14781, 2007
- 13) Zheng, J., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., *et al.* : Crystal structures of the myristoylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.*, **2** : 1559-1573, 1993

## *Development of anti-ubiquitination oligopeptide, Cblin : Cbl-b inhibitor that prevents unloading-induced skeletal muscle atrophy*

*Arisa Ochi*<sup>1)</sup>, *Kanako Kitahata*<sup>1)</sup>, *Katsuya Hirasaka*<sup>1)</sup>, *Ayako Maita-Ohno*<sup>1)</sup>, *Shigetada Teshima-Kondo*<sup>1)</sup>, *Yuushi Okumura*<sup>1)</sup>, *Keisuke Nagano*<sup>2)</sup>, *Tomoyuki Kawamura*<sup>3)</sup>, *Hisao Nemoto*<sup>3)</sup>, and *Takeshi Nikawa*<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>*Departments of Nutritional Physiology, and* <sup>3)</sup>*Pharmaceutical Chemistry Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Japan*

<sup>2)</sup>*First Institute of New Drug Discovery, Otsuka Pharmaceutical Co., Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Skeletal muscle atrophy caused by unloading is characterized by both decreased responsiveness to myogenic growth factors and increased proteolysis. In our previous studies, it has been shown that ubiquitin ligase Cbl-b interacted and degraded the IGF-1 signaling intermediate IRS-1. We also reported that a peptide mimetic of tyrosin608-phosphorylated IRS-1 (DGpYMP), named Cblin, Cbl-b inhibitor. However, Cblin may tend to be degraded by aminopeptidase *in vivo*. We aimed to confirm whether Cblin inhibitor muscle atrophy caused by glucocorticoids in mouse C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes, and effects of the modified Cblin N-terminus to prevent it from degradation. Pretreatment with Cblin significantly prevented the decrease in diameters of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes treated with dexamethasone, and IRS-1 degradation, expression of atrogenes mRNA was repressed, and phosphorylation of Akt/mTOR was also protected. Moreover, the 50% inhibitory concentration of *N*-myristoylated Cblin and Cblin for Cbl-b-mediated IRS-1 ubiquitination was 35μM and 120μM, respectively. In addition, *N*-myristoylated Cblin significantly inhibited the dexamethasone-induced reduction of myotube diameter. Taken together, these results suggest that Cblin Cblin prevented the dexamethasone induced myotube atrophy, and *N*-myristoyled Cblin is more effective than non-modified Cblin in prevention of muscle atrophy.

Key words : skeletal muscle atrophy, dexamethasone, Cbl-b, IRS-1, N-terminus myristoylation