

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18766

研究課題名(和文)代謝シグナルに応答した骨格筋幹細胞の増殖・分化スイッチングの新規分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for proliferation-differentiation switch of skeletal muscle stem cells in response to metabolic signaling

研究代表者

米山 鷹介(Yoneyama, Yosuke)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：10748289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織幹細胞の一つである筋芽細胞は骨格筋の発生に寄与するとともに筋損傷時の再生も担っている。本研究により、筋芽細胞の機能維持に必須なホルモン、インスリン様成長因子のシグナル伝達経路の仲介分子であるインスリン受容体基質が、細胞内の代謝活性に応じてアセチル化されることが明らかとなった。インスリン受容体基質のアセチル化および脱アセチル化を担う酵素が同定されたことにより、筋芽細胞の増殖期から分化移行期への過程で生じるインスリン様成長因子シグナルの調節機構および筋芽細胞の増殖・分化の決定機構の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Myogenic precursor cells contribute to the development of skeletal muscle as well as regeneration after injury. Insulin-like growth factor is an important hormone that regulates the function of myogenic precursor cells including proliferation and differentiation. In this study, we showed that insulin receptor substrate, a mediator of insulin-like growth factor signaling, is acetylated in response to metabolic activity of myogenic precursor cells. We identified a set of enzymes that acetylate or deacetylate insulin receptor substrate. Our study revealed a potential mechanism in which insulin-like growth factor signaling is modulated during myogenesis to coordinate the fate decision of myogenic precursor cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：インスリン様成長因子 インスリン受容体基質 アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は動作を生み出す役割に加えて、個体の代謝制御を担う重要な臓器であり、骨格筋量の維持は個体の老化を防ぎ寿命を延伸するのに必須であることが、基礎および臨床研究から支持されている。骨格筋量は一般に、組織幹細胞である筋芽細胞の分化によって維持されている。普段静止状態にある筋芽細胞は若齢動物の成長期や損傷時に活性化して、増殖した後に細胞融合を起こして、多核の筋管細胞を形成することで、筋繊維を構築している。近年、様々な幹細胞では分化した細胞とは異なる物質代謝を保持しており、特定の代謝物質の変動それ自体が幹細胞の自己複製や分化に寄与していることが明らかとなってきた。しかしながら、どのように細胞内の代謝変動の情報が筋芽細胞の増殖・分化を制御しているのかに関しては、不明な点が多く残っている。

インスリン様成長因子 (IGF) は、筋芽細胞の増殖や分化を促進し、骨格筋量の維持に重要なホルモンとして知られている。IGF は細胞膜上の IGF-I 受容体を活性化し、これがインスリン受容体基質 IRS-1 をチロシン酸化することで、下流シグナル経路を活性化する。近年我々は、筋芽細胞が増殖期から筋管細胞への分化の過程で、IGF シグナルの on/off、すなわち、増殖期では IGF シグナルが活性化されている一方、分化移行期では一過的に不活性化されることで筋分化が促進される機構の存在を明らかにした。さらに、IRS-1 の翻訳後修飾解析から、IRS-1 の特定のリジン残基がアセチル化されること、IRS-1 のアセチル化が増殖期では高く維持されている一方、分化移行期では低下していることを見出した。タンパク質のアセチル化はアセチル CoA や NAD<sup>+</sup> といった代謝物質によって制御されているが、IRS-1 のアセチル化と IGF シグナルによる筋芽細胞の機能制御機構は未知であった。

## 2. 研究の目的

筋芽細胞内で起こる代謝変化に応じた増殖と分化の過程において、IRS-1 のアセチル化の変動が IGF シグナル伝達および筋分化を制御する詳しい分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的な目標として、下記の三つを設定した。

- (1) IRS-1 のアセチル化を制御するアセチル化酵素と脱アセチル化酵素を同定する。
- (2) 筋分化過程において IRS-1 のアセチル化が変動する機構を明らかにする。
- (3) IRS-1 のアセチル化制御が筋芽細胞の増殖や分化に果たす役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) これまでに、IRS-1 の当該アセチル化を認識する部位特異的抗体を独自に作製しており、IRS-1 のアセチル化を immunoblotting 法で検出することが可能で

ある。これまで報告されているタンパク質アセチル化酵素は全てアセチル CoA を補因子として用いている。過剰発現と RNAi 法による発現抑制が IRS-1 のアセチル化に及ぼす影響を、代表的なヒストンアセチル化酵素を対象にスクリーニングする。また、脱アセチル化酵素については、NAD<sup>+</sup> 依存性脱アセチル化酵素 (Sirtuin ファミリー) について、過剰発現と発現抑制が IRS-1 のアセチル化に及ぼす影響を解析する。このスクリーニングで IRS-1 のアセチル化に変化が見られた酵素について、IRS-1 との相互作用の解析や、*in vitro* における活性評価を行うことで、IRS-1 のアセチル化を調節するアセチル化酵素と脱アセチル化酵素を同定する。

(2) 筋分化過程において、同定したアセチル化酵素や脱アセチル化酵素の発現量や活性を評価することで、筋芽細胞の分化過程における IRS-1 のアセチル化の変動機構を明らかにする。

(3) アセチル化部位を変異させた IRS-1 変異体や、同定したアセチル化酵素・脱アセチル化酵素の発現抑制を用いて、IRS-1 のアセチル化によって制御される IGF シグナル伝達や筋芽細胞の増殖・分化の分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) IRS-1 のアセチル化の変化を引き起こす分子の特定

代表的なヒストンアセチル化酵素 5 種類を過剰発現させ、IRS-1 のアセチル化を解析した結果、CBP と p300 の過剰発現によって IRS-1 のアセチル化が顕著に増加した。さらに、L6 筋芽細胞を用いて、5 種類の中で CBP と p300 を発現抑制した場合にのみ、IRS-1 のアセチル化が減少した。免疫沈降法によって IRS-1 との相互作用を解析した結果、IRS-1 と CBP/p300 が細胞内で会合していることがわかった。さらに、精製した IRS-1 と CBP 活性ドメインを用いて、*in vitro* で CBP が IRS-1 を直接アセチル化できることが示された。CBP と p300 は構造的及び機能的に類似していることを併せ、CBP/p300 が IRS-1 のアセチル化酵素であることが明らかになった。

NAD<sup>+</sup> 依存性脱アセチル化酵素 SirT 5 種類に関して、過剰発現が IRS-1 のアセチル化に与える影響を解析した。その結果、SirT1 の過剰発現によってのみ、IRS-1 のアセチル化が顕著に減少することがわかった。しかし、L6 筋芽細胞において SirT1 を発現抑制しても IRS-1 のアセチル化に変化は見られなかった。この際、既知の SirT1 の脱アセチル化基質のアセチル化は上昇していたことから、筋芽細胞において SirT1 は IRS-1 に対する主要な脱アセチル化酵素ではないことが示唆された。

種々の脱アセチル化酵素の阻害剤を用いて IRS-1 のアセチル化の変化を解析したとこ

る、NAD<sup>+</sup>非依存性の脱アセチル化酵素群 (HDAC) に対する阻害剤 TSA の処理によって、IRS-1 のアセチル化が顕著に増加することを見出した。そこで 10 種類の HDAC について、過剰発現を行い、IRS-1 のアセチル化に与える影響を調べた。その結果、HDAC6 の過剰発現によって IRS-1 のアセチル化が減少することがわかった。加えて、HDAC6 の発現抑制や特異的阻害剤の処理によって、IRS-1 のアセチル化が上昇することを見出した。また、免疫沈降法によって細胞内で IRS-1 と HDAC6 が会合していることがわかった。HDAC6 が *in vitro* において IRS-1 を脱アセチル化できることを示す結果も併せ、HDAC6 が唯一の IRS-1 の脱アセチル化酵素であることが明らかになった。

### (2) 筋分化過程における IRS-1 のアセチル化の制御機構

L6 筋芽細胞を定法通り筋管細胞へ分化させ、分化過程における IRS-1 のアセチル化レベルの変動を解析した。その結果、増殖期の筋芽細胞では IRS-1 のアセチル化が高く維持されているが、増殖を停止し分化過程へ移行すると、IRS-1 のアセチル化が低下することがわかった。これまでに分化過程で NAD<sup>+</sup>が上昇することが報告されている。しかしながら、いずれの NAD<sup>+</sup>依存性 SirT も IRS-1 を脱アセチル化しないことから、この結果は、筋分化過程で見られる IRS-1 のアセチル化の減少には細胞内の NAD<sup>+</sup>レベルの変動は関与していないことを示唆している。IRS-1 を脱アセチル化する HDAC6 の発現量を調べたところ、筋分化誘導後に増加することがわかった。これらの結果から、HDAC6 が筋分化過程における IRS-1 のアセチル化の減少に機能している可能性が考えられる。また、増殖期の筋芽細胞内ではアセチル CoA レベルが高いことが報告されている。今後は筋芽細胞のアセチル CoA レベルと IRS-1 のアセチル化の関係にも注目し、筋分化過程において CBP/p300 と HDAC6 によって可逆的に制御される IRS-1 のアセチル化の詳細な制御機構について解析を進める。

### (3) IRS-1 のアセチル化制御が筋芽細胞の IGF シグナルや増殖・分化に果たす役割

IRS-1 のアセチル化が IGF シグナルに果たす役割を検討するために、筋芽細胞に HDAC6 の特異的阻害剤を処理し、IGF シグナル伝達分子の発現量やリン酸化の変動を解析した。その結果、HDAC6 阻害剤の処理によって、IRS-1 の発現量が部分的に減少することがわかった。さらに、IRS-1 の下流分子である Akt のリン酸化も減弱した。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて、HDAC6 をノックアウトした L6 筋芽細胞株を樹立し、この細胞内の IRS-1 量も減少していることを確認した。これらの結果は、IRS-1 のアセチル化が IRS-1 の安定性を制御し、それを反映

して IGF シグナルが調節されていることを示唆している。これを検証するために、アセチル化部位を変異させた IRS-1 を発現する筋芽細胞株を樹立した。しかしながら、野生型 IRS-1 と比較して IRS-1 変異体の発現量や IGF-I 依存的なリン酸化に変化は見られなかった。IRS-1 の質量分析解析により、研究開始当初には未同定の新たなアセチル化部位が見つかったことを併せ、IRS-1 の複数箇所のアセチル化が IRS-1 量やシグナル伝達能の制御に関与している可能性を考えている。HDAC6 ノックアウト筋芽細胞の増殖能には異常がないことを確認しており、筋分化過程に関わる HDAC6 や IRS-1 のアセチル化の制御機構について解析・検討を加えている。これらの成果は、IRS-1 のアセチル化を介した IGF シグナルや筋分化の制御を解析する場合に重要な知見となることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Ariga M, Yoneyama Y, Fukushima T, Ishiuchi Y, Ishii T, Sato H, Hakuno F, Nedachi T, Takahashi S. Glucose deprivation attenuates sortilin levels in skeletal muscle cells. *Endocr J*. 64(3):2550268 (2017) doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0319. (査読有り)

Hakuno F, Fukushima T, Yoneyama Y, Kamei H, Ozoe A, Yoshihara H, Yamanaka D, Shibano T, Sone-Yonezawa M, Yu BC, Chida K, Takahashi S. The novel functions of high-molecular-mass complexes containing insulin receptor substrates in mediation and modulation of insulin-like activities: Emerging concept of diverse functions by IRS-associated proteins. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 6:73 (2015) doi: 10.3389/fendo.2015.00073. (査読有り)

Lanzerstorfer P\*, Yoneyama Y\*, Hakuno F, Müller U, Höglinger O, Takahashi S, Weghuber J. Analysis of insulin receptor substrates signaling dynamics on microstructured surfaces. *FEBS J*. 282(6):987-1005 (2015) doi: 10.1111/febs.13213. (査読有り) (\*Co-first author)

[学会発表](計7件)

Yoneyama Y, Lanzerstorfer P, Weghuber J, Hakuno F, Takahashi S. Prolonged IGF signaling by IRS-1-mediated control of delayed IGF-IR internalization. Gordon Research Conference: IGF & Insulin System in Physiology & Disease (2017/3/12-2017/3/17) Ventura (USA) (ポス

ター発表)

Kamei H, Yoneyama Y, Hakuno F, Sawada R, Shimizu T, Duan C, Takahashi S. Early embryonic insulin receptor substrate-1 signaling underpins neural crest cell survival contributing to catch-up growth induced by changing environmental oxygen tension in developing zebrafish. Gordon Research Conference: IGF & Insulin System in Physiology & Disease (2017/3/12-2017/3/17) Ventura (USA) (ポスター発表)

Inamitsu T, Yoneyama Y, Chida K, Hakuno F, Takahashi S. The SCF-b-TRCP E3 ligase complex induces IRS-1 degradation mediated by mTORC1 pathway. Gordon Research Conference: IGF & Insulin System in Physiology & Disease (2017/3/12-2017/3/17) Ventura (USA) (ポスター発表)

Usui A, Hakuno F, Yoneyama Y, Kamei H, Chida K, Takahashi S. Role of IRS-1-induced cell competition in myogenic differentiation. Gordon Research Conference: IGF & Insulin System in Physiology & Disease (2017/3/12-2017/3/17) Ventura (USA) (ポスター発表)

Janzerstorfer P, Yoneyama Y, Hakuno F, Zindel D, Müller U, Krasel C, Buenemann M, Höglinger O, Takahashi S, Weghuber J. Analysis of receptor tyrosine kinases and G-protein coupled receptor signaling dynamics on micro-structured surfaces. Biophysical Society 61th Annual Meeting (2017/2/11-2017/2/15) New Orleans (USA) (ポスター発表)

Yoneyama Y. Temporal regulation of insulin-like growth factor signaling by IRS-1-dependent feedback loops. JSPS Core-to-Core Project International Seminar シンポジウム講演 (2017/1/24-2017/1/26) 東京大学(東京都文京区)(口頭発表)

稲光智美、米山鷹介、千田和宏、伯野史彦、高橋伸一郎 SCF ユビキチンリガーゼ複合体によるリン酸化依存的なインスリン受容体基質の分解制御 (2016/11/30-2016/12/2) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)(ポスター発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/shingroup/English/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米山 鷹介 (YONEYAMA, Yosuke)

東京大学・農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：10748289

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )