

令和元年5月29日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04926

研究課題名(和文) 転写調節因子FOXO1/PGC1 に着目した筋萎縮と運動能力改善の分子機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of muscle atrophy and exercise caused by FOXO1 and PGC1alpha

研究代表者

亀井 康富 (Kamei, Yasutomi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70300829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋機能の遺伝子発現調節に重要であるPGC1 およびFOXO1に着目して研究を進めた。PGC1 欠損遺伝子改変マウスを作製し、ミトコンドリア機能にPGC1 が重要であることを観察した。またPGC1 は骨格筋でグルコースアラニン回路に寄与した。DNAメチル化酵素Dnmt3aが筋萎縮時に骨格筋で顕著に発現低下し、筋損傷時の筋再生を低下させた。また食品成分のスクリーニングによりFOXO1の転写活性をビタミンDが抑制し筋萎縮を抑制していることを見出した。さらにPGC1 のホモログ・PGC1 の転写活性を大豆イソフラボンが促進しエネルギー消費上昇・抗肥満作用を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国において、骨格筋機能の向上は健康寿命の延長の観点から重要である。本研究では、FOXO1とPGC1 という2つの因子に着目して、標的遺伝子の探索と分子機序・機能解析を行った。筋萎縮と運動能力改善における遺伝子発現制御を調べ、さらに食品成分が及ぼす影響を解析した。その結果、ビタミンDが骨格筋萎縮抑制、大豆イソフラボンがエネルギー消費を促進するというデータが得られた。また筋萎縮・筋再生低下におけるDNAメチル化の関与が示唆された。本研究の成果は、筋萎縮予防・筋機能向上のための機能性食品や医薬品の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle plays important roles in exercise, energy expenditure, and glucose/amino acid metabolism. Understanding the molecular mechanisms underlying muscle metabolism during atrophy, which seriously impairs human health and the quality of life, is important for developing methods to prevent these conditions. In this study, we have investigated the mechanisms of muscle metabolism in vivo and in vitro, with focus on FOXO1 and PGC1 /PGC1 as major regulators. We found that vitamin D may prevent muscle atrophy through the FOXO1-mediated pathway in muscle cells. Additionally, soy-derived isoflavones activated PGC1 and increased the expression of energy expenditure genes. Furthermore, we have evaluated the possible involvement of DNA methylation, a major mechanism of epigenetic regulation, in the muscle atrophy/regeneration process. Our findings could provide a practical foundation to develop functional foods that target atrophy and/or obesity.

研究分野：分子栄養学

キーワード：骨格筋 筋萎縮 運動 生活習慣病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋はヒトの体重の約 40% を占める人体で最も大きい組織であり、タンパク質 (アミノ酸) の形でエネルギー貯蔵を行っている。骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。一方、寝たきりや加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少 (肥満) や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇 (糖尿病) そして生活の質 (QOL) 低下へと向かう。超高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮の抑制は健康寿命の延長の観点から重要である。一方、運動の作用は、骨格筋だけにとどまらず様々な臓器へ影響すると考えられる。生活習慣病の予防や QOL の維持に大きな役割を果たす骨格筋の、運動時の代謝能および肥大・萎縮の分子機序を理解する事は、国民の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

Forkhead box protein O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写調節因子であり、インスリンによる生体代謝の同化作用に拮抗する。研究代表者らは、個体レベルで FOXO1 の骨格筋代謝調節機構を検討してきた。すなわち、エネルギー欠乏により骨格筋における FOXO1 の遺伝子発現が増加すること (FEBS Lett, 2003) を踏まえ、FOXO1 を骨格筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、FOXO1 が骨格筋萎縮を引き起こすことを示した (J Biol Chem, 2004)。さらに、FOXO1 がタンパク質分解酵素 (Biochem J, 2010)、グルタミン合成酵素 (筋タンパク質分解時の副産物であるアンモニアの消去) (Am J Physiol, 2014) 遺伝子を活性化することを示した。骨格筋での FOXO1 の作用機序の解明は筋萎縮予防法開発の手がかりになると考えている。FOXO1 のみならず、転写共役因子 PPAR co-activator 1 (PGC1) は、骨格筋代謝に重要である。PGC1 は運動によって骨格筋で発現が増加する。研究代表者らは、PGC1 が骨格筋のミトコンドリア増加とエネルギー代謝促進を引き起こすことを見出した (PNAS, 2003)。さらに、PGC1 の発現増加により持久運動能力が向上し、同時に分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 代謝酵素を活性化するというデータを得ている (PLoS ONE, 2014)。

本研究は、FOXO1 と PGC1 に着目して、標的遺伝子の探索と、in vivo・in vitro での表現型の解析を行い、筋萎縮の予防・改善、運動能力の改善を目指して分子機序の解析・検証をするものである。

### 2. 研究の目的

#### 1) PGC1 KO マウスの解析

筋量維持は肥満予防に重要である。分岐鎖アミノ酸であるロイシンは mTORC1 キナーゼを活性化し、タンパク質合成を促進することが知られている。一方、転写調節因子 PGC1 はミトコンドリア合成、赤筋化などの骨格筋の性質を制御している。本研究において我々はロイシン誘導性のタンパク質合成促進作用に PGC1 が寄与しているか否かを検討した。また PGC1 欠損により生じる変化を明らかにするために網羅的な遺伝子発現解析を行った。

#### 2) PGC1 の新規標的遺伝子の解析

骨格筋は、タンパク質・アミノ酸の形でエネルギー貯蔵を行っており、異化の条件下において分解され、肝臓を含む他臓器において利用される。PGC1 は肝臓において絶食により発現増加して糖新生を促進させることが知られている。一方、PGC1 は骨格筋においても絶食や運動により発現増加し、ミトコンドリアの機能、脂肪酸酸化そして BCAA 代謝を促進する。絶食時、骨格筋において ALT (Alanine aminotransferase; アラニンアミノ基転移酵素/アラニン合成酵素) によりアラニンが合成され、糖新生の基質を供給すること (グルコース - アラニン回路) はよく知られているが、詳しいメカニズムについてはわかっていなかった。そこで本研究では骨格筋において PGC1 が ALT の発現を制御する可能性を検討した。

#### 3) 筋萎縮と関係する新規遺伝子の同定と遺伝子改変マウスの解析

筋萎縮による骨格筋機能低下のために寝たきりや車椅子が必要になるなど、生活の質 (QOL) の低下もたらされる。超高齢社会を迎えているわが国では骨格筋機能不全の予防戦略の確立は健康寿命延伸の観点から最重要課題のひとつである。

加齢により筋量・筋力が減少するとともに筋損傷からの回復 (筋再生) に時間がかかり寝たきりになりやすいことが知られる。筋再生には筋サテライト細胞 (筋幹細胞) が重要な役割を果たす。老齢などの筋萎縮時に筋サテライト細胞の機能が低下している可能性があるがその詳細は不明であった。本研究では筋萎縮時に DNA メチル化酵素・Dnmt3a の発現が骨格筋で低下することを見出し、筋再生における役割への関与を検討した。

#### 4) FOXO1, PGC1 の転写活性を調節する食品成分の探索

Forkhead box protein O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写調節因子であり、低栄養や不活動、がんなどの病態下などで発現増加することが報告されている。また、骨格筋特異的に FOXO1 を過剰発現させたマウスでは顕著な筋萎縮が観察されている。FOXO1 は筋萎縮を引き起こす重要な因子であり、その転写活性を抑制することは筋萎縮の抑制に有効であると考えられる。そこで本研究では FOXO1 のレポーターアッセイ (GAL4-FOXO1 レポーターアッセイ) を行い、筋萎縮の予防を目的とした FOXO1 の転写活性を抑制する化合物の探索を行った。

一方、PGC1 のホモログである PGC1 は、骨格筋で核内受容体 ERR (エストロゲン受容体関連受容体) を介して、脂肪酸酸化の遺伝子を活性化するとともにミトコンドリア量を増加させる。PGC1 を骨格筋で過剰に発現させたマウスでは、脂肪酸酸化に関わる遺伝子の発現が増加し、肥満が抑制された (Kamei et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003)。そのため PGC1 は抗肥満における有望な標的である。本研究では、PGC1 の転写活性を高め、抗肥満効果が期待される食品/天然化合物の探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1) PGC1 KO マウスの解析

骨格筋特異的 PGC1 欠損 (PGC1 KO) マウスは、PGC1 遺伝子の exon3~5 を挟むような loxP 配列を持つマウス (Handschin et al., 2007a) と、骨格筋特異的な  $\beta$ -actin プロモーター (Brennan and Hardeman, 1993) にドライブされる Cre リコンビナーゼを有するマウスと交配して作製した。

PGC1 KO マウスのミトコンドリア機能および持久運動能力を測定した。ロイシンはリン酸化酵素である哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR) を活性化し、その下流にある真核生物翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 (4EBP) のリン酸化を増加させる。これによりタンパク質翻訳は促進される。また、mTOR は PGC1 と複合体を形成することが報告されている。そこで、ロイシンによる mTOR の活性化 (4EBP のリン酸化) に PGC1 が寄与している可能性を検討した。野生型マウスにロイシンを投与し、4EBP のリン酸化を測定した。

さらに PGC1 KO マウス骨格筋について、マイクロアレイおよび次世代シーケンサーの網羅的発現解析を行った。

#### 2) PGC1 の標的遺伝子の解析

本研究では PGC1 がアラニン合成酵素である ALT の発現を増加させることによりアラニン合成が促進し、糖新生の基質を供給しているかどうか In vitro の筋細胞を用いて検討した。PGC1 過剰発現 C2C12 細胞において、ALT2 の発現を測定した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、PGC1 容量依存的に ALT2 プロモーターの活性を測定した。また PGC1 過剰発現 C2C12 細胞および培地中のアラニン量を測定した。さらに PGC1 の siRNA によるノックダウンで ALT2 の発現が減少するか検討した。

#### 3) 筋萎縮と関係する新規遺伝子の同定と遺伝子改変マウスの解析。

本研究では、筋萎縮モデルマウス (老齢、ギプス固定、神経切除) の骨格筋の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、筋萎縮時に骨格筋において DNA メチル化酵素である Dnmt3a が発現低下することを見出した。骨格筋特異的な  $\beta$ -actin プロモーター (Brennan and Hardeman, 1993) にドライブされる Cre リコンビナーゼを有するマウスと Dnmt3a の flox マウスを交配して骨格筋特異的 Dnmt3a 欠損マウス (Dnmt3a KO マウス) を作製した。カルディオトキシンを投与し筋損傷後の筋再生を測定した。また Dnmt3a KO マウスより筋サテライト細胞を単離し分化能を測定した。またマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現とメチル化感受性制限酵素 HpaII とプロモーターアレイを組み合わせて MIAMI 法により網羅的な DNA メチル化解析を行った。

#### 4) FOXO1, PGC1 の転写活性を調節する食品成分の探索

FOXO1 に DNA 結合領域の GAL4 を付加すると、FOXO1 自体の転写活性化能をレポーター (ルシフェラーゼ) で測定することができる。GAL4-FOXO1 融合タンパク質を発現するプラスミドと GAL4 認識配列の UAS を付加したルシフェラーゼを発現するプラスミドを HEK293T 細胞に導入すると、UAS に GAL4-FOXO1 融合タンパク質が結合し、FOXO1 の転写活性によってルシフェラーゼが発現する。このルシフェラーゼの活性を測定することで FOXO1 の転写活性化能を評価することができる。そのため、ルシフェラーゼ活性を減少させるような化合物は FOXO1 の転写活性を抑制する化合物であるということになる。本研究では 520 種類の食品・植物由来成分 (Sigma Aldrich 社より購入) をスクリーニングし、FOXO1 の転写活性に対する効果を検討した。PGC1、PGC1 に関して同様に GAL4 との融合タンパク質を発現するプラスミドを構築してレポーターアッセイに供した。

### 4. 研究成果

#### 1) PGC1 KO マウスの解析

本研究で PGC1 を骨格筋で特異的に欠損した PGC1 KO マウスを作製した。ミトコンドリアを特徴づけるコハク酸デヒドロゲナーゼ染色やクエン酸合成酵素活性測定の結果、このマウスの筋肉におけるミトコンドリア機能の減少が示唆された。また、PGC1 KO マウスは持久運動能力が低かった。分岐鎖アミノ酸 (BCAA: ロイシン、イソロイシン、バリン) は mTOR を活性化することが知られており、活性化された mTOR は、4E-BP1 や S6K1 をリン酸化して、翻訳 (タンパク質合成) を促進する。PGC1 が BCAA-mTOR 軸のタンパク質合成経路を媒介している可能性について検討した。PGC1 KO マウスにロイシンを経口投与し、mTOR 活性を 4E-BP1 リン酸化レベル

で評価した。コントロールの野生型マウスではロイシン投与によって 4E-BP1 のリン酸化レベルが増加したが、PGC1 KO マウスの骨格筋ではロイシンによる 4E-BP1 リン酸化増加が少なかった。ロイシンによる mTOR 活性化を PGC1 が媒介している事が示唆された。

Biosci Biotechnol Biochem. 80:288-90, 2016

PGC1 KO マウス骨格筋について、マイクロアレイおよび次世代シーケンサーの網羅的発現解析を行った。PGC1 は転写コアクチベーターであるため、PGC1 KO マウスで発現減少する遺伝子に着目した。PGC1 KO マウスで減少した 176 遺伝子がどのような機能をもった遺伝子群かみるため、パスウェイ解析を行ったところ、TCA 回路、酸化的リン酸化、脂肪酸代謝、BCAA 代謝などが検出された。また我々の以前の研究で PGC1 過剰発現 (トランスジェニック) により BCAA 代謝が活性化すること、TCA 回路が活性化することを示しているが、PGC1 KO マウスはトランスジェニックと逆向きの表現型を示しており、gain of function だけでなく、loss of function の実験によって、PGC1 の機能が明らかになった。すなわち、PGC1 を食品成分によって活性化することが筋機能の活性化に繋がること、in vivo の実験で示唆された。

Biochem Biophys Res Commun 481: 251-258, 2016

## 2) PGC1 の標的遺伝子の解析

絶食時、マウスの肝臓及び骨格筋において PGC1 と ALT の遺伝子発現が増加することを観察した。次に骨格筋において PGC1 が ALT の発現を増加させるかどうか in vitro の筋細胞を用いて検討した。その結果、PGC1 過剰発現 C2C12 細胞において、ALT の発現が有意に増加することを見出した。さらにマイクロアレイにより、この細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った結果、アラニン代謝が促進していることが示唆された。一致して、PGC1 過剰発現 C2C12 細胞内においてアラニン量が増加し、さらに培地中のアラニン量も増加していた。つづいて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、PGC1 の用量依存的に ALT 遺伝子プロモーターの活性が増加することを観察した。PGC1 と核内受容体 ERR を共発現させたところ、ALT プロモーターの活性がさらに増加した。これらの結果から絶食時に骨格筋において PGC1 は ERR を介して ALT の発現を増加させ、アラニン合成を促進させることが示唆された。PGC1 は肝臓だけでなく骨格筋においても飢餓適応に役割を担っているようである。本研究において我々は、飢餓時のグルコース - アラニン回路を PGC1 が調節している可能性をはじめて見出した。

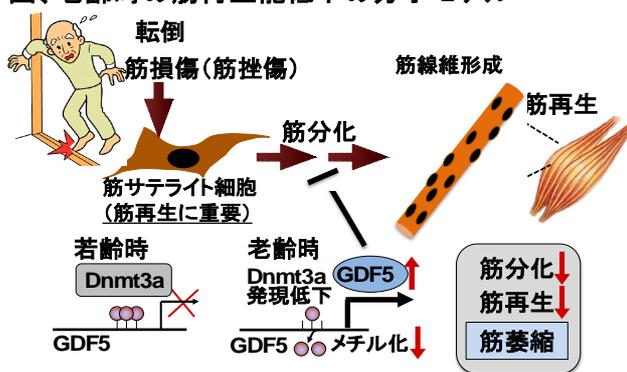
PLoS One 13(1):e0190904, 2018.

## 3) 筋萎縮と関係する新規遺伝子の同定と遺伝子改変マウスの解析

我々は様々な筋萎縮時に DNA メチル化酵素・Dnmt3a の発現が減少することを見出した。骨格筋の萎縮における DNA メチル化の役割は不明である。そこで、骨格筋で特異的に Dnmt3a を欠損するマウス (Dnmt3a KO マウス) を作製した。-actin プロモーターで Cre リコンビナーゼを骨格筋特異的に発現させたトランスジェニックマウスと、Dnmt3a flox マウスを交配することにより Dnmt3a KO マウスの作製に成功した。DNA メチル化酵素である Dnmt3a の発現維持が、Dnmt3a

が筋萎縮予防に関与し得る可能性を検討するために、骨格筋特異的 Dnmt3a 欠損マウス (Dnmt3a KO マウス) を作出した。Dnmt3a KO マウスの筋サテライト細胞では Dnmt3a の欠損により、TGF ファミリーの GDF5 (Growth Differentiation Factor 5) 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が低下・発現増加が観察された。Dnmt3a KO の筋サテライト細胞は分化能が低下し、筋再生を抑制することが明らかとなった (図)。これらの結果から、筋萎縮時の筋再生能低下には DNA メチル化酵素の発現低下によるエピジェネティクス制御が示唆された。

図、老齢時の筋再生能低下の分子モデル



FASEB J 32(3):1452-1467, 2018.

## 4) FOXO1, PGC1 の転写活性を調節する食品成分の探索

・ FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニング

GAL4-FOXO1 レポーターアッセイを用いて FOXO1 の転写活性を抑制する化合物のスクリーニングを行った。GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入すると、レポータールシフェラーゼ活性の増加が観察された。これは FOXO1 の転写活性化能によるものであることを示す。本研究では 520 種類の食品・植物由来化合物を用いてスクリーニングを行い、レポーター活性が 65% 以下の化合物をヒット化合物としたところ、1, 25(OH)2 VD3 など 10 種類の化合物がレポーター活性を抑制した。すなわち、これらの化合物は FOXO1 の転写活性を抑制す

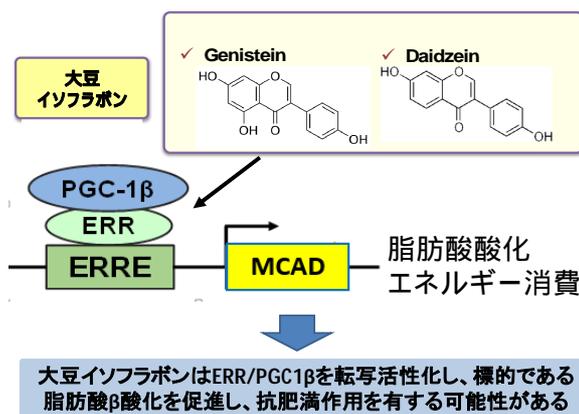
ることが示唆された。

合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン(DEX)はFOXO1の活性を増加させることが報告されている。そこでC2C12細胞にDEX及び、1,25(OH)2D3を添加し24時間後の遺伝子発現変化を調べた。DEXによってFOXO1標的遺伝子である筋萎縮関連遺伝子Atrogin 1の著しい発現増加が観察された。そしてDEX誘導性のAtrogin 1の遺伝子発現増加は1,25(OH)2D3によって抑制された。これらのデータより、1,25(OH)2D3はFOXO1の標的遺伝子である筋萎縮関連遺伝子を抑制することが示唆された。

Journal of Nutritional Science and Vitaminology 64(3):229-232, 2018

一方、FOXO1に加えて、運動に重要な転写調節因子PGC1およびホモログPGC1に関して、同様の評価系を確立した。PGC1の転写活性を評価するレポーターアッセイ系を用いて、様々な食品・植物由来の化合物(市販の166化合物)のスクリーニングを行った。その結果、大豆

### 図、PGC-1を活性化する食品成分のスクリーニング



イソフラボンであるゲニステイン、ダイゼインおよびレスベラトロール類似体がPGC1の転写活性を促進した。また大豆イソフラボンはC2C12細胞においてERR応答配列を介した転写活性を促進させた。さらに、PGC1を過剰発現させたC2C12筋芽細胞において、大豆イソフラボンはERRの標的であるMCAD(中鎖アシルCoA脱水素酵素)遺伝子の発現とミトコンドリア量(MitoTracker染色)を増加させた。これらの結果より、大豆イソフラボンがPGC1の転写活性の促進を介して抗肥満効果を持つ可能性が示唆された(図)。

Biochemistry and Biophysics Reports 17:51-55, 2019

Data in Brief 23:103814, 2019

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)  
(査読あり)

K. Takigawa, R. Matsuda, R. Uchitomi, T. Onishi, Y. Hatazawa, Y. Kamei\*. Effects of long-term physical exercise on skeletal muscles in senescence-accelerated mice (SAMP8). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 83:518-524, 2019 (\*Corresponding Author) doi: 10.1080/09168451.2018.1547625.

R. Uchitomi, S. Nakai, R. Matsuda, T. Onishi, S. Miura, Y. Hatazawa, Y. Kamei\*. Genistein, daidzein, and resveratrols stimulate PGC-1-mediated gene expression. Biochemistry and Biophysics Reports 17:51-55, 2019 (\*Corresponding Author) doi: 10.1016/j.bbrep.2018.11.009.

Y. Hatazawa, K. Qian, D.W. Gong, Y. Kamei\*. PGC-1 regulates alanine metabolism in muscle cells. PLoS One 13(1):e0190904, 2018. (\*Corresponding Author) doi: 10.1371/journal.pone.0190904.

Y. Hatazawa, Y. Ono, Y. Hirose, S. Kanai, N. L. Fujii, S. Machida, I. Nishino, T. Shimizu, M. Okano, Y. Kamei\*, Y. Ogawa. Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration. FASEB J 32(3):1452-1467, 2018. (\*Corresponding Author) doi: 10.1096/fj.201700573R.

X. Yuan, K. Tsujimoto, K. Hashimoto, K. Kawahori, N. Hanzawa, M. Hamaguchi, T. Seki, M. Nawa, T. Ehara, Y. Kitamura, I. Hatada, M. Konishi, N. Itoh, Y. Nakagawa, H. Shimano, T. Takai-Igarashi, Y. Kamei, Y. Ogawa. Epigenetic modulation of fibroblast growth factor 21 in the perinatal mouse liver is associated with attenuation of diet-induced obesity in adulthood. Nature Communications 9(1):636, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-03038-w.

〔学会発表〕(計 52 件)

Yasutomi Kamei, Reduced Dnmt3a Increases Gdf5 Expression with Suppressed Satellite Cell Differentiation and Impaired Skeletal Muscle Regeneration, Asia Pacific Nutrigenomics Nutrigenetics Organisation 2018 Conference (APNNO 2018) 2018年12月

亀井康富、畑澤幸乃、三浦進司 遺伝子改変マウスを用いた骨格筋アミノ酸代謝の解析 日本筋学会第4回学術集会(シンポジウム)2018年8月

Y Kamei, Y Hatazawa, K Minami, R Yoshimura, T Onishi, N Sawada, S Miura, Deletion of the transcriptional coactivator PGC1 in skeletal muscles is associated with reduced expression of genes related to oxidative muscle function Experimental Biology 2017 2017年4月

Y Kamei, Gene regulation in skeletal muscle function; atrophy and exercise, International Conference on Functional Food for Metabolic Homeostasis in Aging, 2017年3月

亀井康富、三浦進司、小川佳宏 骨格筋機能と肥満改善における転写制御因子の役割 第37回日本肥満学会 シンポジウム 2016年10月

〔図書〕(計 5 件)

畑澤幸乃、亀井康富 骨格筋の量と機能を決定する分子メカニズム実験医学 Vol. 36 No. 7 (増刊) 110-114, 2018

亀井康富、畑澤幸乃、三浦進司、「食品に秘められたサイエンス：アミノ酸による骨格筋機能の制御」実験医学 Vol. 35 No. 3 (2月号) 495-499, 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nutrition.life.kpu.ac.jp/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。