

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08982

研究課題名（和文）骨格筋Pin1による運動機能及びエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名（英文）The regulation of exercise and energy metabolism by Pin1 in skeletal muscle

研究代表者

中津 祐介（Nakatsu, Yusuke）

広島大学・医系科学研究科（医）・准教授

研究者番号：20452584

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）：プロリン異性化酵素Pin1は、標的蛋白のpSer/pThr-Pro配列を含むモチーフに結合し、プリンのシストランス異性化を行うことにより機能調節をしている。本研究では、Pin1が骨格筋機能に与える影響について検討した。骨格筋特異的Pin1 KOマウスは、高脂肪食負荷時の体重増加がWTと比べて顕著であり、糖代謝も悪化していた。また、Pin1 KOマウスは運動能力も低下していた。その原因として熱産生への影響やFOXO1等の発現量増加が考えられた。以上の結果より、骨格筋のPin1は、運動や糖代謝に重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の機能低下は、糖尿病等の生活習慣病につながる事が知られており、また、近年、筋重量や筋機能が低下するフレイルやサルコペニアが社会問題となっている。本研究により、骨格筋のPin1は、筋重量や筋線維の割合に影響を与えずに、糖代謝やエネルギー代謝を調節することが明らかとなった。そのメカニズムを解明することで、筋重量非依存的な糖代謝調節機構が明らかになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Prolyl isomerase Pin1 associates with substrates through the motif containing pSer/pThr-Pro, and regulates the functions. In this study, we examined the roles of Pin1 in skeletal muscle on exercise or energy metabolism. In high fat diet feeding, skeletal muscle specific Pin1 KO mice show the exacerbation of obesity, compared to wild type mice. In addition, Pin1 KO mice revealed the insulin resistance and the lower capacity of exercise. These phenomena may be caused by the changes of thermogenesis or the upregulation of Foxo1.

In conclusion, Pin1 in skeletal muscle is deeply committed to exercise and glucose metabolism.

研究分野：代謝学

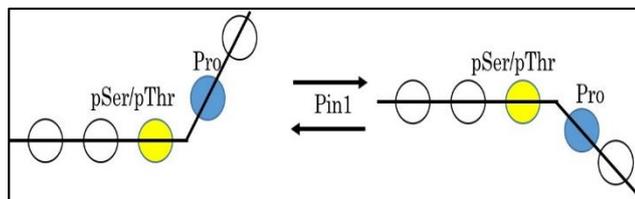
キーワード：Pin1 骨格筋 運動 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

糖代謝調節において、骨格筋は非常に重要な役割を担っており、その障害は、糖尿病などの生活習慣病につながるがよく知られている。骨格筋による糖取り込みは、主にインスリンにより調節されており、その作用により **Glucose transporter4 (Glut4)**が細胞質から膜に移動することで、糖の取り込みが開始される。また、運動による糖取り込み作用も糖代謝調節に重要であるが、筋重量が低下し、運動が適切に行えないサルコペニアやフレイルが近年、問題となっている。従って、骨格筋における筋重量やインスリン感受性を維持することは、極めて重要であるが、それらがどのように制御されているかは、未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

プロリン異性化酵素 **Pin1** は、様々な標的蛋白に結合し、プロリンのシス-トランス異性化を行うことにより標的蛋白の立体構造を変化させ、その機能を調節している酵素である (右図)。我々は、**Pin1** が代謝調節に重要であることを報告してきたが、骨格筋機能における **Pin1** の役割は不明であったため、今回、**Pin1** の骨格筋機能調節における役割、特に糖代謝と運動能力に着目し、検討を行った。



今回、**Pin1** の骨格筋機能調節における役割、特に糖代謝と運動能力に着目し、検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 骨格筋特異的 **Pin1 KO** マウスの作成：骨格筋特異的 **Pin1 KO** マウス (**skPin1 KO** マウス)を **Pin1 flox** マウスと **alpha-actin promoter cre** マウスを交配させることで、作成した。コントロールとして **Pin1 flox** マウスを用いた。これらのマウスに普通食または高脂肪食(HFD)を負荷した。

(2) 糖代謝の評価：糖代謝は、グルコース負荷試験 (**GTT**)やインスリン負荷試験 (**ITT**)により評価した。また、マウスにインスリンを投与した後、肝・筋・脂肪を摘出し、**Akt** のリン酸化をみることで、インスリンシグナルへの影響を観察した。

(3) 蛋白発現量の変化：蛋白発現量の変化は、組織から蛋白を抽出した後、定法に従い、ウエスタンブロットにより測定した。

(4) mRNA の変化：mRNA の変化は、組織より RNA を抽出した後、逆転写を行い、**SYBR Green** による **real time PCR** により測定した。

(5) 免疫沈降：293T 細胞に各プラスミドをトランスフェクションさせた後、**lysis buffer** を用いて細胞を可溶化した。遠心後、上清を分取し、**Flag beads** を加えて 2 時間 **rotate** を行った。その後、**Flag peptide** を加えることで、**Flag** 発現蛋白を含む複合体を回収し、ウエスタンブロットにて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) **skPin1 KO** マウスの作成・確認

**skPin1 KO** マウスが骨格筋特異的に、**Pin1** を欠損しているかを確認するために、骨格筋を含む各種臓器を摘出し、ウエスタンブロットを行った。その結果、骨格筋では、ヒラメ筋や腓腹筋等、いずれの部位においても **Pin1** の欠損が確認できたが、肝臓や脂肪組織においては、**Pin1** の発現量は、コントロールマウスと変わらなかった。しかしながら、心臓においても **Pin1** の欠損が確認できた。

### (2) 骨格筋重量に対する影響

**Pin1** 欠損が骨格筋重量に影響するかを検討するために、一晩絶食後に **WT** 及び **skPin1 KO** マウスからヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋を分取し、重量を測定した。その結果、コントロールマウスと比較して重量に明確な差は認められなかった (**Fig.1**)。また、遅筋・速筋の割合変化を調べるために、ヒラメ筋と長趾伸筋を用いて、**MHC-I** 等のマーカー遺伝子の発現量を測定したが、明確な変化は認められなかった。

次に、高脂肪食負荷での筋重量を調べたが、**WT** と **KO** で明確な差は認められなかった。以上の結果より、**Pin1** は筋重量や遅筋・速筋の割合に影響を与えないと考えられた。

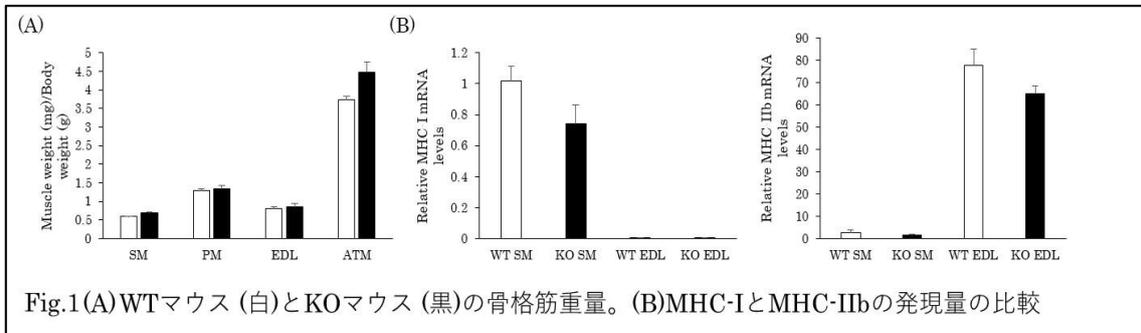


Fig.1(A)WTマウス(白)とKOマウス(黒)の骨格筋重量。(B)MHC-IとMHC-IIbの発現量の比較

### (3) 代謝に対する影響

代謝に対する影響を検討するために、まず普通食下での体重、耐糖能について検討した。その結果、体重の変動やグルコース負荷試験、インスリン負荷試験のいずれにおいても WT と KO で差は認められなかった。次に、高脂肪食負荷による変化を検討したところ、意外なことに KO マウスの方が WT と比較してより体重増加が顕著に認められた。また、これと一致して GTT や ITT 等の耐糖能も KO マウスで悪化していた。肝臓や脂肪重量、肝脂肪蓄積においても KO マウスの方が高かった。

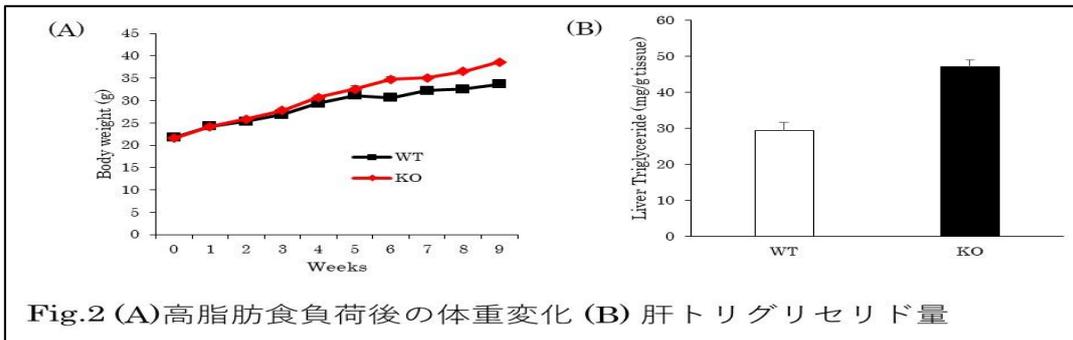


Fig.2 (A)高脂肪食負荷後の体重変化 (B) 肝トリグリセリド量

### (4) インスリンシグナルに対する影響

インスリンシグナルへの影響を調べるために、高脂肪食負荷後にインスリンを投与し、肝・筋・脂肪を摘出した。その後、pAkt Thr 及び Ser 抗体を用いてリン酸化の変化を検討した。インスリン刺激により Akt のリン酸化が認められるが、KO マウスの肝・筋では、リン酸化の程度が減弱していた。一方、脂肪組織においては顕著な差は認められなかった。

以上の結果より、骨格筋の Pin1 は、全身の代謝調節に重要な役割を担っていると考えられた。

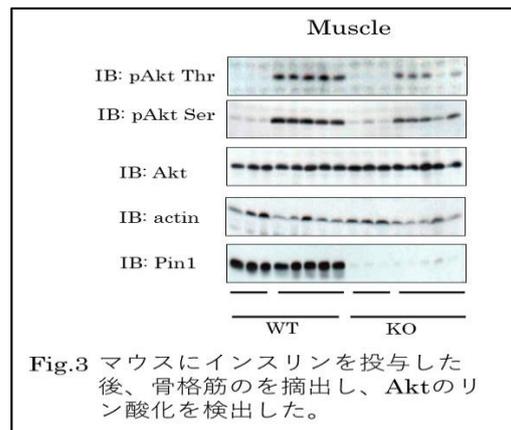


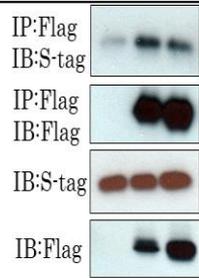
Fig.3 マウスにインスリンを投与した後、骨格筋のを摘出し、Aktのリン酸化を検出した。

### (5) 運動に対する影響

運動に対する骨格筋 Pin1 の役割を調べるために、トレッドミルによる持久力を測定した。その結果、KO マウスでは、WT 比べて走行時間・走行距離ともに低値であり、運動能力においても骨格筋の Pin1 が重要であることが示唆された。

### (6) 熱産生に対する影響

骨格筋は、ふるえ熱に加えて、近年、非ふるえ熱を産生することが報告されている。そこで、骨格筋 Pin1 が熱産生に影響を与えるかを検討するために、酸素消費量の測定を行った。その結果、skPin1 KO マウスは、WT マウスと比較して酸素消費量が低値であることが明らかとなった。また、骨格筋の lysate を用いた Pulldown assay と LC-MS/MS の解析により、Pin1 は SERCA1/2 と結合することを見出した (Fig. 4)。近年、SERCA1/2 が小ペプチドであるサルコリピンと結合することで非ふるえ熱産生を誘発することが報告されている。そこで、Pin1 が SERCA1 とサルコリピンとの結合に影響するかを Proximal ligation assay (PLA) により測定した。その結果、Pin1 KO マウスの骨格筋においては、SERCA1 とサルコリピンの結合が減弱しており、Pin1 は両者の結合を促進すると考えられた。



Flag-SERCA1	+		
Flag-SERCA2		+	
S-tag Pin1	+	+	+

Fig.4 293T細胞にSERCA1/2とPin1を過剰発現させ、免疫沈降を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hasei S, Yamamotoya T, Nakatsu Y, Ohata Y, Itoga S, Nonaka Y, Matsunaga Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Asano T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Carnosic Acid and Carnosol Activate AMPK, Suppress Expressions of Gluconeogenic and Lipogenic Genes, and Inhibit Proliferation of HepG2 Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 4040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22084040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kanna M, Hasei S, Ohata Y, Encinas J, Ito H, Okabe T, Asano T, Sakaguchi T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 plays an essential role in SARS-CoV-2 proliferation, indicating its possibility as a novel therapeutic target.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97972-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsunaga Y, Hasei S, Yamamotoya T, Honda H, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Ito H, Okabe T, Asano T, Nakatsu Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathological Role of Pin1 in the Development of DSS-Induced Colitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10051230.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yusuke Nakatsu, Takeshi Yamamotoya, Mizuki Okumura, Tetsuhiro Ishii, Mayu Kanamoto, Miki Naito, Mikako Nakanishi, Shunya Aoyama, Yasuka Matsunaga, Akifumi Kushiyama, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Hiraku Ono, Tomoichiro Asano	4. 巻 15
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 interacts with adipose triglyceride lipase and negatively controls both its expression and lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 154459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2020.154459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yusuke Nakatsu, Takeshi Yamamotoya, Koji Ueda, Hiraku Ono, Masa-Ki Inoue, Yasuka Matsunaga, Akifumi Kushiyama, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Akio Matsubara, Tomoichiro Asano	4. 巻 470
2. 論文標題 Prolyl isomerase Pin1 in metabolic reprogramming of cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer letters	6. 最初と最後の頁 106-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.10.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中津 祐介、山本屋 武、長谷井 竣、迫田 秀之、藤城 緑、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1は、骨格筋のSERCA1/2機能を制御し、全身の代謝調節に関与する
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中津 祐介、中井 菜摘、伊藤 輝、山本屋 武、上田 晃司、井上 賢紀、水野 優、味八木 茂、安達 伸生、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 骨格筋Pin1は、運動機能及び糖代謝を制御する
3. 学会等名 第62回 日本糖尿病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津 祐介、中井 菜摘、伊藤 輝、山本屋 武、味八木 茂、安達 伸生、浅野 知一郎
2. 発表標題 骨格筋のプロリン異性化酵素Pin1は、運動能力と全身の代謝制御に重要である。
3. 学会等名 第5回 日本筋学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------