

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580097

研究課題名（和文） 骨格筋機能保全のための遺伝子発現制御機構解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanism of skeletal muscle function, focusing on transcription factors

研究代表者

亀井 康富（KAMEI YASUTOMI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70300829

研究成果の概要（和文）：

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝や糖取り込み、運動において重要な役割を果たす。本研究では、リソソームタンパク分解酵素カテプシン L 遺伝子が FOXO1 によって活性化されることが判明し、絶食によって骨格筋で誘導される代謝変化や萎縮に重要な役割を担っていることが示唆された。また、本研究では、肥満により誘導される糖代謝の悪化における骨格筋の核内受容体 RXR γ の機能的意義を検討し、創薬ターゲットとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Skeletal muscle, the largest organ in the human body, plays roles in energy expenditure, glucose uptake and exercise. Here, we show that FOXO1 enhances gene expression of cathepsin L, a lysosomal proteinase, *in vivo* and *in vitro*. Our data indicate that cathepsin L is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle and suggest that the FOXO1/cathepsin L pathway plays a role in diabetes and starvation-induced skeletal muscle metabolic change and atrophy. Also, we investigated the glucose metabolism of RXR mice with induced obesity and impaired glucose metabolism. The data showed that increased glucose uptake in the skeletal muscle improved systemic glucose metabolism, and increasing RXR expression may be a novel therapeutic strategy against impaired glucose metabolism caused by obesity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 応用生物化学

キーワード：代謝生理

1. 研究開始当初の背景

寿命の延長に伴い、生活の質(QOL)の向上や健康寿命の延伸が社会的な課題となっている。その一環として運動器(筋骨格系)の機能保全への関心が高まっており、国連及びWHOは2000年~2010年を「The Bone and Joint Decade(運動器の10年)」と位置づけている。「寝たきり」や「ギプス固定」等により骨格筋を使わない状態が続くと、骨格筋量が減少し、骨格筋機能低下(廃用性筋萎縮/アトロフィー)のためにQOLの低下がもたらされるが、従来、骨粗鬆症に比較して骨格筋量の減少の分子機構やその効果的な予防法に関する研究はほとんどなかった。

従来、筋肉内脂肪量が骨格筋機能と関連することが指摘されており、肥満者や糖尿病患者においては筋肉内脂肪量とインスリン抵抗性と相関することが知られている(J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 3191-3196, 2005)。一方、持久的運動能力の高いマラソン選手のようなアスリートの骨格筋では、インスリン感受性が高いにもかかわらず筋肉内脂肪量が増大していると報告がある(Pediatric Diabetes 5: 219-226, 2004)。このように、骨格筋機能には(1)骨格筋の量と同時に(2)適切な筋肉内脂肪の量が重要であると考えられる。

SREBP1cは肝臓や脂肪組織における脂質代謝のマスターレギュレーターであるが、骨格筋においても肝臓や脂肪組織に匹敵するSREBP1cが発現しており、栄養条件によりSREBP1cが発現が大きく変動することが報告されている(J. Nutr. 133: 1787-1792, 2003)。更に、肝臓や脂肪組織におけるSREBP1cの遺伝子発現には核内受容体LXR/RXRが重要な役割を果たすことが証明されている(Mol. Cell. Biol. 21: 2991-3000, 2001)。一方、肝臓においてフォークヘッド型転写因子FOXO1を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、SREBP1cの遺伝子発現が減少すること(J. Biol. Chem. 281: 10105-10117, 2006)、FOXO1はコレプレッサーとして複数の核内受容体の転写促進作用を抑制的に作用することが報告されている(J. Biol. Chem. 278: 45485-45491, 2003)

申請者らは既に、絶食・再摂食により骨格

筋におけるFOXO1の遺伝子発現が増加・減少することを踏まえて、骨格筋においてFOXO1を過剰発現するトランスジェニックマウス(FOXO1マウス)を作製し、このマウスを用いてFOXO1が骨格筋の量と赤筋線維の遺伝子発現を共に制御することを世界に先駆けて証明した。さらにFOXO1マウスの骨格筋ではタンパク質分解酵素であるカテプシンL遺伝子の発現が顕著に亢進しており、筋萎縮への関与が予想された(J. Biol. Chem. 279: 41114-41123, 2004)。一方、FOXO1に関する検討を通して、絶食・再摂食のようなエネルギー状態の変動により骨格筋において核内受容体RXR γ の遺伝子発現が著しく変動することを見出した。最近では、骨格筋特異的にRXR γ を過剰発現するトランスジェニックマウス(RXR γ マウス)を作製し、RXR γ マウスの骨格筋では脂質合成のマスターレギュレーターであるSREBP1cの遺伝子発現が著しく増加していた。本研究は、以上の予備検討の成果を踏まえて施行するものである。

2. 研究の目的

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖取込み、運動において重要な役割を果たし、十分な骨格筋機能を保つことは肥満や糖尿病等の生活習慣病予防の観点からも重要であると考えられる。一方、骨格筋量のみならず、骨格筋機能の維持に筋肉内脂肪量が関与する可能性が最近注目されている。しかしながら、筋肉内脂肪量調節の分子機構には不明の点が多い。本研究では、筋肉内脂肪量の調節分子として、栄養条件により著しく発現変動するフォークヘッド型転写調節因子FOXO1および従来、機能的意義がほとんど知られていなかった核内受容体型転写調節因子RXR γ に新たに着目し、申請者らが独自に作製した遺伝子操作マウスを用いて骨格筋の遺伝子発現機構の検討を施行する極めて独創的なものである。本研究は骨格筋の量及び脂質代謝の分子機構の解明と生活習慣病予防を目指す基礎研究であるが、骨格筋萎縮および骨格筋における脂質代謝異常(脂肪毒性)のような骨格筋機能不全の分子機構が明らかになると、これらをターゲットとした骨格筋不全予防法の提案が可能となる。

3. 研究の方法

(1)骨格筋萎縮の分子機構に関する研究
分子生物学的手法を用いて、タンパク質分解酵素であるカテプシンLがFOXO1の標的遺伝子であるかどうかを検証する。カテ

プシンLの酵素活性を抑制することにより、カテプシンLが筋萎縮にどの程度寄与しているかを検討する。さらに細胞核内においてFOXO1を含む蛋白質複合体を検索する。

(2) 骨格筋の糖脂質代謝に関する研究

RXR γ マウスおよび優勢抑制型変異体 RXRトランスジェニックマウス(DN-RXRマウス)の筋肉内脂肪に関する表現型を、組織染色、生化学的手法により解析する。さらに、このマウスを用いて骨格筋機能(運動、糖取込み、エネルギー消費など)におけるRXR γ の生理的・病態生理的意義を検討する。

4. 研究成果

(1) 骨格筋萎縮の分子機構に関する研究

FOXO1の標的遺伝子の候補として、筋萎縮時にFOXO1と同様の遺伝子発現パターンを示すリソソームタンパク分解酵素カテプシンL遺伝子に着目した。絶食により誘導されるカテプシンLの遺伝子発現は、骨格筋特異的に優勢阻害型FOXO1を発現させたマウスおよび骨格筋特異的FOXO1遺伝子欠損マウスにおいて減弱していた。さらに、マウスおよびヒトカテプシンLいずれのプロモーターにおいてもFOXO1結合領域が存在し、FOXO1によって活性化されることが判明した。カテプシンLはエンドサイトーシスやオートファジーによって、リソソームに運ばれたタンパク質の分解を担う重要な酵素であると考えられている。FOXO1/カテプシンL経路は、絶食によって骨格筋で誘導される代謝変化や萎縮に重要な役割を担っていることが示唆される。

(2) 筋肉内脂肪、糖脂質代謝に関する研究

本研究では、RXR γ マウスを用いて、肥満により誘導される糖代謝の悪化における骨格筋のRXR γ の機能的意義を検討した。通常食で飼育したRXR γ マウスは骨格筋において、糖輸送担体であるGlut1の発現が増加しており、糖取り込みの増加が認められた。遺伝性肥満KKA y マウスとの交配により肥満を誘導するとRXR γ マウスは対照マウスと比較して、肥満による糖代謝の悪化が著しく抑制された。更に、RXR γ マウスでは肥満により誘導される脂肪肝と肝臓におけるインスリン感受性の改善が認められた。以上より、RXR γ マウスでは、骨格筋における糖取り込みの増加が全身の糖代謝を改善すると考えられ、肥満により誘導される糖代謝障害において骨

格筋RXR γ の創薬ターゲットとしての可能性が示唆された。

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6件)

1. Y. Kamei, S. Miura, T. Suganami, F. Akaike, S. Kanai, S. Sugita, A. Katsumata, H. Aburatani, O. Ezaki, and Y. Ogawa. Regulation of SREBP1c gene expression in the skeletal muscle: role of RXR/LXR and FOXO1. **Endocrinology** 149:2293-2305, 2008.
2. T. Chiba*, Y. Kamei*, T. Shimizu, T. Shirasawa, A. Katsumata, L. Shiraishi, S. Sugita, Y. Ogawa, S. Miura, and O. Ezaki. Overexpression of FOXO1 in skeletal muscle does not alter longevity in mice. **Mechanisms of Ageing and Development** 130:420-428, 2009. (*Equal contribution)
3. S. Miura, Y. Kai, Y. Kamei, C. Bruce, N. Kubota, M. Febbraio, T. Kadowaki, and O. Ezaki. AMPK activity is not essential for an increase in fatty acid oxidation during low-intensity exercise. **American Journal of Physiology** 296:E47-55, 2009.
4. Y. Kamei, T. Suganami, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto, S. Miura, O. Ezaki, M. Okano, and Y. Ogawa. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice overexpressing Dnmt3a. **Obesity** 18:314-21, 2010.
5. Y. Yamazaki, Y. Kamei*, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B.R. Troen, T. Kitamura, I. Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, Y. Ogawa. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle. **Biochemical Journal** 427:171-178, 2010. (*Corresponding author)
6. Y. Okazaki, N. Ohshima, I. Yoshizawa, Y. Kamei, S. Mariggio, K. Okamoto, M. Maeda, Y. Nogusa, Y. Fujioka, T. Izumi, Y. Ogawa,

Y. Shiro, M. Wada, N. Kato, D. Corda, N. Yanaka. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. **Journal of Biological Chemistry** 285:27652-63, 2010.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 亀井康富、三浦進司、菅波孝祥、赤池史子、金井紗綾香、杉田聡、勝又阿貴、江崎治、小川佳宏：骨格筋における SREBP1c 遺伝子の発現調節：核内受容体 LXR/RXR およびフォークヘッド因子 FOXO1 の役割：第 62 回日本栄養食糧学会 2008.5.2~5.4, 埼玉
2. 亀井康富、三浦進司、菅波孝祥、赤池史子、金井紗綾香、杉田聡、勝又阿貴、江崎治、小川佳宏：骨格筋における SREBP1c 遺伝子の発現調節：LXR/RXR/FOXO1 の役割：第 29 回日本肥満学会 2008.10.17-18, 大分
3. 山崎芳浩、亀井康富、三浦進司、杉田聡、赤池史子、金井紗綾香、平田結喜緒、江崎 浩、菅波孝祥、小川佳宏：「骨格筋における FOXO1 によるタンパク分解酵素カテプシン L 遺伝子の転写調節」：第 30 回日本肥満学会, 2009.10.9-10, 静岡
4. 亀井康富、小川佳宏：「骨格筋機能と遺伝子発現調節」：日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010.3.27-30, 東京
5. 杉田聡、亀井康富、赤池史子、菅波孝祥、金井紗綾香、真鍋康子、藤井宣晴、三浦進司、江崎治、小川佳宏：「骨格筋受容体における核内受容体 R X R γ の糖代謝促進作用」：第 31 回日本肥満学会, 2010.10.1-2, 群馬

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井康富 (KAMEI YASUTOMI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：70300829

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：