

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700698

研究課題名(和文) 運動で誘導される小胞体からの eIF2 $\alpha$  リン酸化の骨格筋機能制御における役割研究課題名(英文) Role of endoplasmic reticulum stress induced eIF2 $\alpha$  phosphorylation in skeletal muscle after exercise

研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE, Masato)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・助教

研究者番号：30588976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨格筋において運動など生理的な条件下においてPERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルの活性化を確認した。PERKを薬剤依存的に活性化できるFv2E-PERKを骨格筋特異的に発現したトランスジェニック(TG)マウスを作製した。高脂肪食を給餌したところTGマウスは、インスリン抵抗性の改善や基礎代謝の上昇を認め肥満抵抗性であり、骨格筋代謝に差はなかったが褐色脂肪組織においてエネルギー代謝関連遺伝子発現が上昇していた。PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルは骨格筋で抗肥満ホルモンであるFGF21発現を誘導し、FGF21が褐色脂肪細胞に作用してエネルギー代謝を上昇させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In skeletal muscle, some physiological stimulation, for example exercise activated PERK-eIF2 $\alpha$  phosphorylation signal. Fv2E-PERK is artificial gene that is activated by ligand. We generated muscle-specific Fv2E-PERK expressing transgenic (TG) mice. Adiposity of TG mice fed high-fat diet was decreased compared from wild type. TG mice also improved insulin sensitivity and oxygen consumption. However, metabolic profile in skeletal muscle seemed to be same between wild type and TG mice. Surprisingly, gene expression related to energy expenditure was higher in brown adipose tissue of TG mice than in that of wild type mice. Some experiments showed that PERK-eIF2 $\alpha$  phosphorylation single regulated anti obesity hormone FGF21 expression in skeletal muscle. Plasma concentration of FGF21 also increased in TG mice. These results suggest that FGF21 induced by eIF2 $\alpha$  phosphorylation in skeletal muscle increases energy expenditure by affecting on brown adipose tissue.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：骨格筋 肥満 小胞体 エネルギー消費 褐色脂肪 ホルモン 臓器連関

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の合成と正常な立体構造の構築を担う細胞内小器官である。小胞体の内部環境の恒常性が崩れると小胞体内に折り畳み不全タンパク質が蓄積して小胞体ストレスが発生する。細胞は、小胞体ストレスを軽減させるために小胞体ストレス応答を活性化する。小胞体ストレス応答は、翻訳減少や遺伝子発現変化を介して小胞体ストレスを軽減し、過剰な小胞体ストレスはアポトーシスを誘導する。小胞体ストレス応答は、PERK 経路、IRE1 経路、ATF6 経路によって引き起こされることが知られている。近年、小胞体ストレスが種々の疾患、特に代謝疾患に繋がることが明らかになってきている。

小胞体ストレス応答のなかで PERK 経路は、小胞体ストレスが発生したときに PERK が二量体化してリン酸化することから開始される。活性化した PERK は、翻訳開始因子の一部である eIF2 $\alpha$  をリン酸化することでグローバルな翻訳を抑制して小胞体ストレスを軽減させる。一方、一部の因子は翻訳上昇することが知られており、例えば転写因子 ATF4 は eIF2 $\alpha$  のリン酸化によって翻訳が上昇して小胞体内の酸化還元状態を制御する遺伝子やアポトーシスを誘導する遺伝子発現を誘導する。

骨格筋は、生体の最大のエネルギー消費器官であり、唯一の運動器官である。骨格筋機能の低下は、糖尿病などのメタボリックシンドロームや加齢時の QOL の低下に繋がる。骨格筋の収縮や弛緩は、筋線維内の筋小胞体からのカルシウムイオンの流入が起点となるため、小胞体の機能変化は骨格筋機能と密接に関連していると考えられる。しかし、小胞体から発せられるシグナルと骨格筋機能の関係の解明は十分ではない。

### 2. 研究の目的

運動時の筋線維の収縮によって小胞体内のカルシウムイオン濃度は、急激に変化することから筋収縮によって小胞体内部環境は大きく変化し、小胞体ストレス応答シグナルが活性化する可能性が考えられる。また、骨格筋における小胞体ストレス応答の機能はまだほとんどわかっていない。よって、本研究では骨格筋における小胞体ストレス応答、特にほとんど研究がされていない PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナル経路に着目して、生理的な活性化状態と骨格筋機能における役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)骨格筋における PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルが活性化する生理的な条件を明らかにするためにマウスを用いて運動、廃用性筋

萎縮モデル、寒冷暴露など種々の条件下における骨格筋の PERK-eIF2 $\alpha$  の活性化状態を解析した。

(2)骨格筋における PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルの機能を解析するために PERK 経路を薬剤 (AP) 依存的に活性化できる Fv2E-PERK (図 1) を骨格筋特異的に発現するトランスジェニック (TG) マウスを作製した。

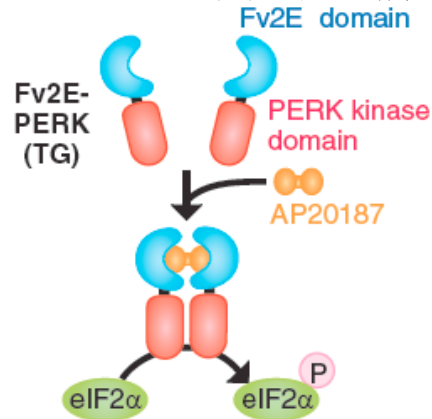


図 2. Fv2E-PERK システムの概略図

(3) これまでに培養細胞で PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルが制御しているという報告のあったアミノ酸代謝制御と小胞体内のレドックス制御について *in vivo* において明らかにするために TG マウス骨格筋において解析を行った。

(4) 肥満モデル、筋萎縮モデルについて検討を行った結果、TG マウスと野生型マウスを比較して大きな違いが観察された肥満モデルマウスについて詳細な表現型解析を行った。

(5) TG マウスの肥満モデルでの表現系の分子メカニズムを明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析やプロモーター活性の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1)小胞体ストレスの発生によって緑色蛍光を発する ERAI-venus マウスを用いて通常飼育時の様々な骨格筋を観察したところ、持久力の高い遅筋に比べ、瞬発力の高い速筋で蛍光が強かった。次にマウスにトレッドミルを用いて運動をさせたところ骨格筋における eIF2 $\alpha$  のリン酸化と小胞体ストレスマーカーの GRP78 発現が誘導された (図 2)。また、マウスを寒冷条件下で飼育したところ骨格筋において既知の ATF4 標的遺伝子の発現が誘導された。以上のことから、骨格筋において PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化経路は、生理的な条件で活性化することが示唆された。

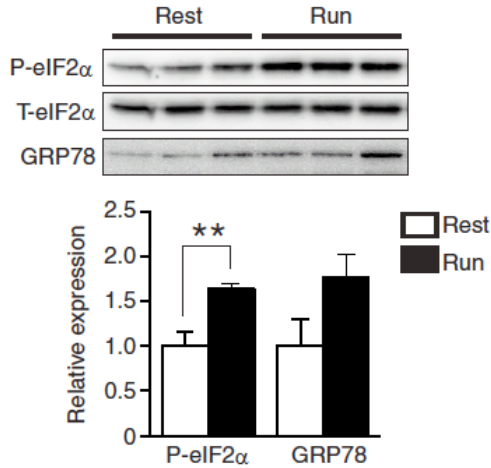


図2. 運動時の骨格筋における eIF2 $\alpha$  のリン酸化と GRP78 の発現

(2)骨格筋において Fv2E-PERK を発現する TG マウスを作製した。TG マウスは、野生型マウスと比べ、通常飼育時から eIF2 $\alpha$  のリン酸化が高く、さらに薬剤 (AP) によって eIF2 $\alpha$  のリン酸化がさらに誘導され、既知の標的遺伝子の発現が上昇した。本研究では主として通常飼育時の野生型マウスと TG マウスを比較検討することとした。

(3)TG マウスにおけるアミノ酸代謝関連遺伝子発現を調べたところ、特に細胞へのアミノ酸輸送担体、セリン代謝、アミノ酸からのグルタチオン合成系に関する遺伝子発現が上昇していた。さらに細胞内の遊離アミノ酸を測定したところグリシンなどいくつかのアミノ酸が上昇していた (図3)。さらに細胞内の還元型グルタチオンが上昇していた。

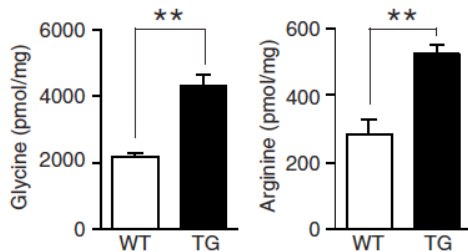


図3. 骨格筋の遊離アミノ酸含量

(4)通常飼育時において TG マウスは、野生型マウスと比べ、わずかに体重が減少していた。また、骨格筋量もわずかに減少していた。トレッドミルを用いた持久力検査を行い、野生型マウスと TG マウスで差は認められなかった。これと一致して筋線維型に差は認められなかった。次に TG マウスに高脂肪食 (HFD) を給餌したところ、野生型マウスと比べ体重増加が低く脂肪量が減少しており肥満抵抗性となっていた (図4)。それと一致して TG マウスでは野生型マウスと比べてインスリン抵抗性が改善していた。さらに、TG マウスでは酸素消費量などの基礎代謝が野生型マウスより大きく改善していた (図5)。しかし、

eIF2 $\alpha$  がリン酸化している骨格筋を解析したところ、通常飼育時と一致して筋線維型に差はなく、代謝関連遺伝子発現に差は認められなかった。一方、TG マウスにおいて肝臓の脂肪蓄積が低下し、褐色脂肪組織のエネルギー代謝関連遺伝子発現が上昇していた。以上のことから、骨格筋における eIF2 $\alpha$  のリン酸化は、肥満を軽減させ、それは骨格筋以外の組織の代謝が改善することによって起こることが示唆された。

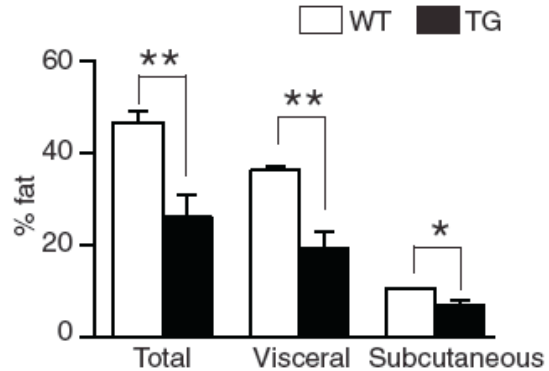


図4. HFD 給餌時のマウス体脂肪率

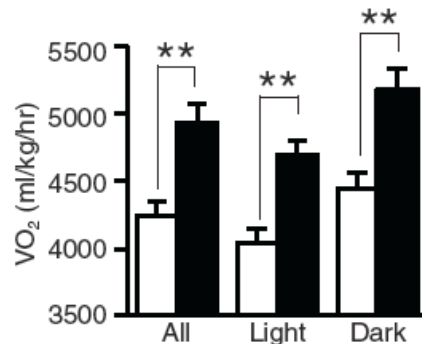


図5. HFD 給餌マウスの酸素消費量

(5)骨格筋の eIF2 $\alpha$  リン酸化が、骨格筋以外の組織に影響を与える分子メカニズムを明らかにするために野生型、TG マウス、AP 投与したマウスの骨格筋においてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析で野生型マウスと比較して TG マウスにおいて発現上昇していた遺伝子について Gene ontology 解析をしたところ先の結果と一致してアミノ酸代謝に関連する遺伝子群が上昇していた。さらに TG マウス骨格筋において fibroblast growth factor 21 (FGF21) の発現が最も大きく上昇しており (図6A)、AP 投与によってさらに発現が上昇していた。FGF21 は、抗肥満ホルモンとして知られており、FGF21 に着目してさらに解析を行った。骨格筋での遺伝子発現に一致して血漿中の FGF21 濃度が TG マウスで大きく上昇していた (図6B)。FGF21 のプロモーターを *in silico* で解析したところ、PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナル経路下流で発現上昇する転写因子 ATF4 の結合配列を持つことが確認された。そこで筋芽細胞株 C2C12 細胞において FGF21 プロモーターを用いてルフィフェラーゼアッ

セイを行ったところ eIF2 $\alpha$  のリン酸化や ATF4 の過剰発現によってプロモーター活性が上昇し、ATF4 結合配列を欠損したプロモーターと ATF4 結合配列に変異を導入したプロモーターを用いた解析から FGF21 発現誘導に ATF4 結合配列が重要であることが明らかとなった。また、C2C12 細胞において FGF21 の発現は、小胞体ストレスによって上昇することがわかった。さらに ATF4 を欠損したマウス胎児繊維芽細胞を用いて FGF21 の発現が ATF4 に依存していることを確認した。

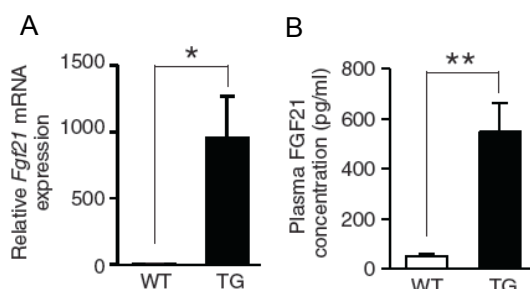


図6. 骨格筋における FGF21 の mRNA 発現 (A) と血清 FGF21 濃度 (B)

以上のことから、小胞体ストレス応答のうち、PERK-eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルは、骨格筋においてアミノ酸代謝の制御に関与し、さらに FGF21 発現制御を介して褐色脂肪組織などのエネルギー代謝を活性化させて肥満を防ぐことが明らかとなった。

#### 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 3 件)

- ① Shunsuke Iwasaki, Masato Miyake, Shinichiro Hayashi, Hitoshi Watanabe, Yuya Nagasawa, Shunsuke Terada, Kouichi Watanabe, Shyuichi Ohwada, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Hisashi Aso. Effect of myostatin on chemokine expression in regenerating skeletal muscle cells. *Cells Tissues Organ*, 査読有, 2013, 198, 66-74. doi: 10.1159/000351462.
- ② Shunsuke Iwasaki, Masato Miyake, Hitoshi Watanabe, Eri Kitagawa, Kouichi Watanabe, Shyuichi Ohwada, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Hisashi Aso. Expression of Myostatin in Neural Cells of the Olfactory System. *Mol Neurobiol*. 査読有, 2013, 47, 1-8. doi: 10.1007/s12035-012-8342-1.
- ③ Masato Miyake, Hideyuki Takahashi,

Eri Kitagawa, Hitoshi Watanabe, Takahiro Sakurada, Hisashi Aso, Takahiro Yamaguchi. AMPK activation by AICAR inhibits myogenic differentiation and myostatin expression in Cattle. *Cell and Tissue Research*, 査読有, 2012, 349 615-623. doi: 10.1007/s00441-012-1422-8.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 三宅 雅人, 野村 明利, 高原 一菜, 小倉 淳, 佐藤 亮祐, 倉橋 清衛, 親泊 美帆, 井上 寛, 親泊 政一 小胞体ストレスなどにより活性化される eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルによる骨格筋機能調節 第 8 回小胞体ストレス研究会, 2013. 10. 25, 金沢大学 (石川県金沢市)
- ② 三宅 雅人, 野村 明利, 小倉 淳, 高原 一菜, 佐藤 亮祐, 倉橋 清衛, 親泊 美帆, 井上 寛, 親泊 政一 骨格筋での小胞体ストレスなどからの eIF2 $\alpha$  リン酸化は Fgf21 発現を誘導しエネルギー消費の増加によって食事性肥満を防ぐ 第 86 回生化学会, 2013. 9. 11 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ③ 三宅 雅人, 野村 明利, 小倉 淳, 高原 一菜, 佐藤 亮祐, 倉橋 清衛, 親泊 美帆, 井上 寛, 親泊 政一 骨格筋における小胞体ストレスなどによる eIF2 $\alpha$  リン酸化は Fgf21 を介したエネルギー消費の増加によって食事性肥満を防ぐ 第 31 回内分泌代謝学サマーセミナー, 2013. 7. 12, ゆふいん山水館, (大分県由布市)
- ④ Masato Miyake, Akitoshi Nomura, Atsushi Ogura, Kazuna Takahara, Kiyoe Kurahashi, Ryosuke Sato, Miho Oyadomari, Hiroshi Inoue, Seiichi Oyadomari. eIF2 $\alpha$  Phosphorylation in Skeletal Muscle Increases FGF21 Expression as a Myokine and Prevents Diet-Induced Obesity by Increasing Energy Expenditure. *American Diabetes Association 73th Scientific Session*. 2013. 6. 24. McCormick Place (Chicago, Illinois, USA)
- ⑤ 三宅 雅人, 野村 明利, 高原 一菜, 小倉 淳, 佐藤 亮祐, 倉橋 清衛, 親泊 美帆, 井上 寛, 親泊 政一 骨格筋における小胞体ストレスなどによる eIF2 $\alpha$  リン酸化は全身のエネルギー消費を増加させて肥満を抑制する 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013. 5. 18, 熊本ホテルキャッスル (熊本県熊本市)
- ⑥ 三宅 雅人, 野村 明利, 高原 一菜, 佐藤

亮祐、倉橋 清衛、親泊 美帆、井上 寛、親泊 政一 骨格筋における小胞体ストレスなどからの eIF2 $\alpha$ リン酸化はエネルギー消費を制御して食事性肥満を防ぐ 第 85 回生化学会 2012. 12. 16、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

⑦ 三宅 雅人、野村 明利、高原 一菜、小倉 淳、佐藤 亮祐、倉橋 清衛、親泊 美帆、井上 寛、親泊 政一 骨格筋での小胞体ストレスなどによる eIF2 $\alpha$ リン酸化はエネルギー消費を増大させて肥満を抑制する 第 24 回分子糖尿病学シンポジウム、2012. 12. 8、品川インターシティ（東京都港区）

⑧ 三宅 雅人、野村 明利、高原 一菜、佐藤 亮祐、倉橋 清衛、親泊 美帆、井上 寛、親泊 政一 骨格筋での小胞体ストレスなどによる eIF2 $\alpha$ リン酸化はエネルギー消費を増大させて肥満を抑制する 第 7 回臨床ストレス応答学会大会、2012. 11. 24、東京女子医科大学（東京都新宿区）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE MASATO)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・助教

研究者番号：30588976