

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350893

研究課題名(和文) 加齢に伴う骨格筋萎縮における小胞体ストレス応答の機能解明

研究課題名(英文) Role of unfolded protein response on age-related skeletal muscle atrophy

研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE, Masato)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・助教

研究者番号：30588976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって細胞内小器官のひとつである小胞体より発するシグナルである小胞体ストレス応答シグナルが加齢マウスの骨格筋で活性化していることが明らかとなった。また小胞体ストレス応答シグナルの1つの経路であるPERK経路を遺伝子改変マウスを用いて活性化したところ、骨格筋の萎縮が非常に早く誘導された。このマウスの骨格筋ではアミノ酸代謝が変化しており、分岐鎖アミノ酸や抗酸化作用をもつアミノ化合物の変化が顕著であった。以上のことから小胞体ストレス応答シグナルが加齢に伴う筋萎縮に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Unfolded protein response (UPR) is one of signal transduction pathway activated in endoplasmic reticulum (ER) respond to accumulation of unfolded proteins in ER lumen. In this study, we found that UPR is more activated in skeletal muscle of old mice than young mice. To understand the role of PERK pathway, one of the UPR signaling, we generated transgenic mouse that enable to control PERK signaling pathway This transgenic mouse showed muscle atrophy in young age after activation of PERK. Skeletal muscle of the transgenic mouse changed the amino acid metabolism compared with wild type mouse, especially branched-chain amino acids and anti-oxidant amino compounds. Overall, this study suggests that unfolded response modulate age-related skeletal muscle atrophy or sarcopenia.

研究分野：筋細胞生物学

キーワード：小胞体 小胞体ストレス 骨格筋 萎縮 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、生体最大の組織で唯一の運動器官である。加齢に伴い骨格筋は萎縮してサルコペニアと呼ばれる症状を呈して運動機能を低下させQOLの低下や運動不全を引き起こし、世界的な問題となっている。そのために、サルコペニアの症状緩和や回復を目的とした創薬が強く望まれている。骨格筋を構成する筋線維は、筋小胞体と呼ばれる特徴的な小胞体を持ち、筋小胞体からのカルシウムイオンの流入が収縮と弛緩を制御しているため筋小胞体は筋機能と密接に関連していると考えられる。

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質を合成する細胞内小器官の一つであり、小胞体内で正常な立体構造の構築やジスルフィド結合、糖鎖の修飾がなされる。細胞内、細胞外の様々な要因によって小胞体内部環境の恒常性が乱れ、小胞体内腔に異常な構造をとった折り畳み不全タンパク質が蓄積することを小胞体ストレスという。細胞は、小胞体ストレスを軽減するために小胞体ストレス応答を活性化させる。小胞体ストレス応答は翻訳の抑制によってタンパク質合成を抑制して折り畳み不全タンパク質の増加を防ぎ、遺伝子発現変化によって恒常性の回復を行う。また、細胞に過度な小胞体ストレスが生じたときは、アポトーシスを誘導する。小胞体ストレス応答は、3つの小胞体膜貫通型センサータンパク質であるPERK、IRE1、ATF6が担っている。近年これらタンパク質を起点としたシグナル経路が小胞体恒常性の回復だけでなく、様々な生命現象や疾患と関与していることが明らかとなっている。

小胞体ストレス応答を担う3つのセンサータンパク質のうちPERKは、小胞体ストレスが発生したときに自己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をリン酸化することでグローバルな翻訳を抑制する。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を制御して小胞体恒常性を回復させる。また、PERK経路は過度なストレス時のアポトーシスを誘導する遺伝子発現を誘導することが報告されている。

2. 研究の目的

骨格筋の収縮と弛緩は筋小胞体からのカルシウムイオンの流入で制御されており、筋小胞体の機能は、筋機能や筋量と密接に関連していて、筋小胞体の恒常性破綻は筋機能の低下に繋がるのが推察される。一方で、いくつかの細胞において小胞体内を含めたタンパク質動態の恒常性は加齢に伴って破綻して小胞体ストレスが発生することが報告されているが骨格筋線維において加齢が小胞体ストレスを引き起こすかはよくわか

っていない。以上のことから、骨格筋において加齢に伴って小胞体ストレスが発生するか、また小胞体ストレスを軽減するための小胞体ストレス応答シグナルが筋機能や筋量に対してどのような役割を担っているかを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋において加齢に伴って小胞体ストレスが発生するかを検討するために、筋萎縮が起きるまで加齢した高齢マウスと成体マウスの骨格筋における小胞体ストレスの発生を検討した。

(2) 小胞体ストレス応答経路のうちPERK経路が骨格筋における筋萎縮や筋機能に対してどのような影響を与えるかを検討するためにPERK経路の活性化を薬剤(AP20187)依存的に活性化できるFv2E-PERKを骨格筋特異的に発現するトランスジェニックマウス(図1)を用いて骨格筋の表現型を解析した。

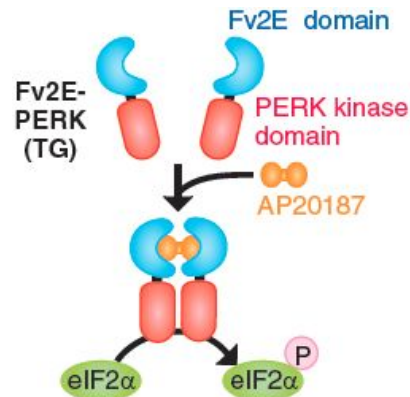


図1. Fv2E-PERK システムの概略図

(3) PERK経路下流の転写因子であるATF4を骨格筋特異的に欠損させた遺伝子改変マウスの骨格筋の表現型について解析した。

(4) いくつかの細胞ではPERK経路がアミノ酸代謝を制御していることが示唆されているため、PERK経路の活性化によって骨格筋でどのようなアミノ酸が変化しているかメタボローム解析で検討した。

(5) 小胞体ストレス応答経路のうちATF6の加齢に伴う筋機能や筋量に与える影響を調べるためにATF6を欠損した高齢マウスにおいて骨格筋の表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) 高齢マウスにおいて小胞体ストレスが発生しているかを検討するために小胞体ストレス応答によって発現上昇する遺伝子の発現を解析した。その結果、3つのシグナル経路の標的遺伝子の発現がそれぞれ若齢マ

ウスと比べ高齢マウスで上昇していた。また、の ATF6 経路の標的である主要な分子シャペロンである BiP のタンパク質発現が超高齢マウスで高かった (図 2)。



図 2. 高齢マウス骨格筋における BiP の発現

(2) 骨格筋において加齢に伴い上昇していた小胞体ストレス応答経路のうち PERK 経路を活性化させるため、骨格筋において Fv2E-PERK を発現するトランスジェニックマウスに対して AP20187 と投与した。まず、体重を比較したところ AP20187 の投与で体重が 4 日前後から低下して 1 週間で約 70% まで低下した (図 3)。その時の骨格筋の重量を測定すると骨格筋重量は、AP20187 の投与で野生型と比べ約 70% まで低下していた。また、骨格筋組織像を観察すると AP20187 を投与した群では筋線維径が低下して、一部に細胞死を起していると思われる細胞も認められた (図 4)。

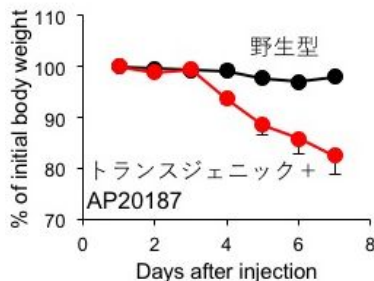


図 3. トランスジェニックマウスへの AP20187 投与による体重減少

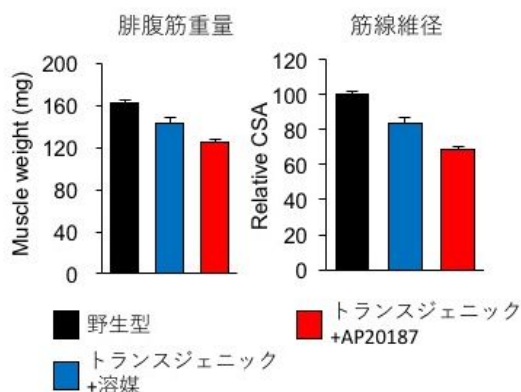


図 4. トランスジェニックマウスへの AP20187 投与による筋重量と筋線維径の低下

(3) 骨格筋特異的 ATF4 欠損マウスを若齢で解析した。正常時では ATF4 欠損マウスは野生型マウスと比べて、体重や骨格筋重量に差は認められなかった。次に、すでに報告されている絶食時における筋重量について確認したところ、報告の通り絶食による筋萎縮

が ATF4 欠損マウスではわずかに緩和されていた。また、本研究の実施中に骨格筋特異的 ATF4 欠損の高齢マウスでの骨格筋は、加齢に伴う筋萎縮が軽減されるという報告がなされた。

(4) PERK 経路活性化に伴う筋萎縮の表現型を調べるため、いくつかの細胞で報告されているアミノ酸代謝について解析した。トランスジェニックマウスに AP20187 を投与したときの筋線維内遊離アミノ酸含量を CE/MS 法にて調べた。その結果、筋線維内のアミノ酸含量は AP20187 の投与に伴う PERK 経路の活性化で大きく変動していた。なかでも分岐鎖アミノ酸であるロイシンやイソロイシンが AP20187 の投与で上昇していた。また、抗酸化作用を持つことが報告されているアンセリンやカルノシンなどが AP20187 の投与で低下していた (図 5)。さらに、アミノ酸と関連する細胞内シグナル伝達について調べたところ分岐鎖アミノ酸で活性化することが知られている mTOR 経路が AP20187 投与で活性化していた。

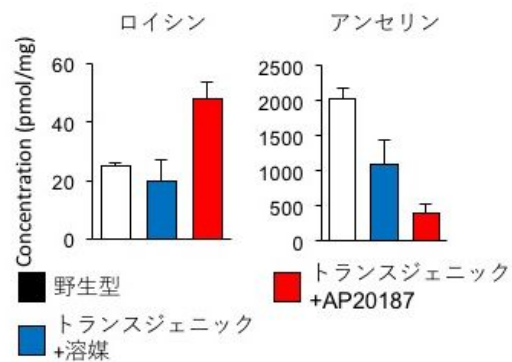


図 5. トランスジェニックマウスへの AP20187 投与による骨格筋内アミノ酸の変化

(5) 小胞体ストレス応答シグナルのなかでも ATF6 標的である BiP の発現上昇が顕著であったため、ATF6 を欠損した高齢マウスを用いて解析を行った。体重は、野生型と比べて ATF6 欠損マウスで低下していたが、筋重量は野生型と ATF6 欠損マウスの間で差は認められなかった。いくつかの解析のうちインスリン感受性が野生型マウスと比べ ATF6 欠損マウスでは高まっていた。よって、インスリンの主要標的器官である骨格筋の機能が ATF6 の欠損によって変化した可能性が考えられる。

以上のことから、骨格筋において加齢時には小胞体ストレスが発生して小胞体ストレス応答シグナルが活性化していることが判明した。また、小胞体ストレス応答シグナルのうち PERK 経路の活性化によって筋萎縮が誘導されることが明らかとなった。よって、加齢に伴う筋萎縮や筋機能低下において小胞体ストレスと小胞体ストレス応答経路の関与が示唆された。

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2件)

Shusuke Taniuchi, Masato Miyake, Kazue Tsugawa, Miho Oyadomari, Seiichi Oyadomari. Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 kinases. *Sci Rep*. 査読有、2016、16、32886 doi: 10.1038/srep32886.
Masato Miyake, Akitoshi Nomura, Atsushi Ogura, Kenji Takehana, Yoshihiro Kitahara, Kazuna Takahara, Kazue Tsugawa, Chinobu Miyamoto, Naoko Miura, Ryosuke Sato, Kiyoe Kurahashi, Heather P. Harding, Miho Oyadomari, David Ron, Seiichi Oyadomari. Skeletal muscle-specific eukaryotic translation initiation factor 2 phosphorylation controls amino acid metabolism and fibroblast growth factor 21-mediated non-cell-autonomous energy metabolism. *FASEB J*. 査読有、2016、30、798-812 doi: 10.1096/fj.15-275990.

[学会発表](計11件)

三宅雅人、親泊政一. 脂肪細胞における PERK 経路を起点とした細胞間相互作用による細胞死の誘導. 第 11 回小胞体ストレス研究会. 2016. 10. 10. 岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜県岐阜市)
三宅雅人、張君、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一. 第 89 回生化学会. 脂肪組織での小胞体ストレスなどで活性化される eIF2 リン酸化シグナルによる肥満抑制作用. 2016. 9. 25 仙台国際センター(宮城県仙台市)
三宅雅人、高原一菜、張君、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一. ATF6 の肥満・糖尿病における役割の解明. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2016.5.20. 国立京都国際会館(京都府京都市)
三宅雅人、倉橋清衛、森智子、宮本千伸、津川和江、三浦恭子、北原吉朗、親泊政一. 小胞体ストレスを減弱させ膵細胞でのインスリン生合成を促進する新規化合物の同定. 第 27 回分子糖尿病学シンポジウム. 2015.12.5. 丸ビルホールホール&コンファレンススクエア(東京都千代田区)
三宅雅人、張君、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一. 小胞体ストレスなどで活性化される eIF2 リン酸化シグナルによる摂食調節を介した肥満抑制作用. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会年会合同大会. 2015.12.1~4. 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

三宅雅人、高原一菜、森本雅俊、倉橋清衛、親泊政一. ATF6 の肥満・糖尿病における役割. 第 10 回小胞体ストレス研究会. 2015.11.29~30. 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県神戸市)

三宅雅人、倉橋清衛、森智子、宮本千伸、津川和江、三浦恭子、北原吉朗、親泊美帆、親泊政一. 小胞体ストレスを標的とした膵細胞でのインスリン生合成を促進する新規化合物の同定. 第 10 回臨床ストレス応答学会大会. 2015.11.06~07. 投稿農工大学(東京都小金井市)

三宅雅人、張君、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一. 小胞体ストレスなどで活性化される eIF2 リン酸化シグナルによる摂食調節を介した肥満抑制作用. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2015.5.21~24. 海峡メッセ下関(山口県山口市)

三宅雅人、倉橋清衛、張君、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一. 肥満や糖尿病における小胞体ストレスなどでリン酸化される eIF2 の組織特異的作用の解明. 第 37 回分子生物学会年会. 2014.11.26. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Masato Miyake, Kiyoe Kurahashi, Tomoko Mori, Chinobu Miyamoto, Kazue Tsugawa, Kyoko Miura, Yoshiro Kitahara, Miho Oyadomari, Seiichi Oyadomari. Identification and Characterization of a Small-molecule Inducer of ATF4 for Promoting Insulin Synthesis in Pancreatic β cells. 74th ADA Scientific Sessions. 2014.6.13. Moscone Center (San Francisco, USA)

親泊美帆、三宅雅人、倉橋清衛、森智子、宮本千伸、津川和江、三浦恭子、北原吉朗、親泊政一. 小胞体ストレスを標的としたインスリン生合成を改善する新規化合物の同定. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2014.5.23. リーガロイヤルホテル(大阪府大阪市)

[図書](計1件)

親泊政一、三宅雅人、日本臨牀社、新時代の臨床糖尿病学(上)2015年 667(179-184)

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmb/DMB/homu.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE, Masato)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号: 30588976