

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18784

研究課題名(和文) 2アドレナリン受容体シグナルによる転写因子FOXO1の遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文) beta2-adrenergic receptor signaling regulates FOXO1 mRNA expression in skeletal muscle

研究代表者

井尻 大地 (IJIRI, Daichi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：50551090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨格筋の 2アドレナリン受容体(2-AR)シグナルの役割の解明を目的としている。2-ARシグナルの活性化は、FoxO1 mRNAおよびタンパク質の発現量を急速に減少させることが判明した。続いて、2-ARシグナルの活性化による急速なFoxO1 mRNAの発現量減少の作用機序解明を目的として、microRNAのマイクロアレイを行った結果、2-ARシグナルの活性化により103種のmicroRNAの発現量が有意に変動することが明らかとなった。また、103種のうちの2種のmicroRNAの導入により、FoxO1 mRNAの発現量が減少することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to investigate the role of beta2-adrenergic receptor (AR) signaling in regulation of FOXO1 mRNA expression in skeletal muscle. We showed that beta2-AR activation by using its selective agonist (clenbuterol) rapidly decreases FOXO1 mRNA expression both in chick myotubes and C2C12 myotubes. Further, we performed microRNA (miRNA) microarray analysis and identified that 103 miRNAs were significantly changed in C2C12 myotubes stimulated with 1 μM clenbuterol for 1 h. Two of the 103 miRNAs successfully decreased FoxO1 mRNA expression in C2C12 myotubes, respectively. Our results indicated that the beta2-AR signaling has a role to suppress FOXO1 mRNA expression via regulating miRNA expression.

研究分野：栄養生化学

キーワード：骨格筋 タンパク質分解 FOXO microRNA

1. 研究開始当初の背景

長期的な飼料穀物の需給のひっ迫が懸念される状況下で、肉用家畜（肉用牛、豚、肉用鶏など）には、更なる産肉性の向上や飼料効率の改善によって経済性を高めることが求められている。産肉性の向上とは、体タンパク質蓄積量の増加による骨格筋量の増加とみなすことができ、体タンパク質の蓄積は、タンパク質量の合成量と分解量の差で表される。そのため、骨格筋のタンパク質の合成と分解の制御が可能となれば、家畜の肉生産量を向上させる技術の開発に貢献できる。

骨格筋タンパク質の合成促進および分解抑制を惹起する成長因子として、インスリン様成長因子 (IGF-I) がよく知られている。IGF-I は、IGF-I 受容体を介して、AKT をリン酸化する。リン酸化により活性化となった AKT は、mTOR を介してタンパク質合成を促進させる。同時に、活性化 AKT は、転写因子 FOXO をリン酸化し、FOXO の細胞内局在を変化 (核外へ移行) させる。その結果、FOXO の転写活性が低下し、標的遺伝子である atrogen-1/MAFbx および MuRF1 (E3 ユビキチンリガーゼ) の発現量が減少し、ユビキチンプロテアソーム (UPS) 系タンパク質の分解量が減少する。

転写因子 FOXO は、骨格筋の UPS 系タンパク質分解量の調節において中心的な機能を担うことから、「転写因子 FOXO の標的遺伝子に対する転写活性の新規調節機構の解明」は、肉用家畜の産肉性向上のための基盤情報となる。既往の研究から、標的遺伝子に対する FOXO の転写活性は、リン酸化、アセチル化、およびユビキチン化などの翻訳後修飾によって調節されることが明らかにされている。

アドレナリンは、G タンパク質共役型受容体であるアドレナリン受容体を介して様々な組織において機能する。哺乳類や鳥類では、 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 -AR) 作動薬による β_2 -AR の活性化が転写因子 FOXO の標的遺伝子である atrogen-1/MAFbx や MuRF1 の遺伝子発現量を減少させることが知られている。しかしながら、 β_2 -AR およびその下流シグナルが転写因子 FOXO に及ぼす影響については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋および骨格筋細胞における β_2 -AR の活性化が転写因子 FOXO に及ぼす影響を明らかにすること目的とした。

3. 研究の方法

(1) 鶏初生ヒナに対する β_2 -AR 作動薬の投与が骨格筋の転写因子 FOXO および atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量に及ぼす影響

12羽の1日齢初生ヒナ (ROSS308) を6羽ずつクレンプテロール投与区と対照区の2群に分けた。クレンプテロール投与区には、体重1 kgあたり0.1 mgとなるようにクレンプ

テロールを投与した。対照区には、PBS を投与した。飼料と水は自由摂取とし、クレンプテロール投与の3時間後に解体を行った。

(2) 鶏初生ヒナに対するアドレナリン、 β_1 -AR 作動薬、 β_2 -AR 作動薬、および β_3 -AR 作動薬の投与が骨格筋の atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量に及ぼす影響

骨格筋におけるタンパク質分解の抑制作用が β_2 -ARs シグナル特異的か否かを調べるために、鶏初生ヒナに対するアドレナリン、 β_1 -AR 作動薬、および β_3 -AR 作動薬の投与を行い、骨格筋の atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量に及ぼす影響を調べた。30羽の1日齢初生ヒナ (ROSS308) を6羽ずつ5群に分けた (アドレナリン区、 β_1 -AR 作動薬区、 β_2 -AR 作動薬区、 β_3 -AR 作動薬区、および対照区)。アドレナリンおよび各 β -AR 作動薬 (ドブタミン、クレンプテロール、BRL37344) の投与は、体重1 kgあたり0.1 mgの濃度で行った。対照区には、PBS を投与した。飼料と水は自由摂取とし、投与の3時間後に解体を行った。

(3) β_2 -AR 作動薬が鶏初代培養筋管細胞における転写因子 FOXO の mRNA およびタンパク質発現量に及ぼす影響

鶏13日胚の大腿筋から調整した筋芽細胞から筋管を形成させた後、クレンプテロール (1 μ M) を添加した培地中で1または3時間培養した。FOXO1 mRNA およびタンパク質の発現量をウエスタンブロッティング法およびリアルタイム PCR 法を用いて分析した。

(4) β_2 -AR 作動薬が C2C12 筋管細胞における転写因子 FOXO の mRNA およびタンパク質発現量に及ぼす影響

マウス由来の筋芽細胞 (C2C12 細胞) を定法により筋管形成させた後、クレンプテロール (1 μ M) を添加した培地中で1または3時間培養した。FOXO1 mRNA およびタンパク質の発現量をウエスタンブロッティング法およびリアルタイム PCR 法を用いて分析した。

(5) β_2 -AR 誘導性の FOXO1 mRNA の分解に影響を及ぼす可能性のある miRNA の発現解析

microRNA (miRNA) は、20~25塩基で機能を持つ微小 RNA で、近年様々な機能を持つことが明らかにされている。ヒトでは、14種類の miRNA が FOXO1 mRNA の分解に影響を及ぼすことが報告されている。そこで、本実験では、1時間のクレンプテロール刺激により FOXO1 mRNA の発現量減少が確認された C2C12 筋管細胞において発現が変動する miRNA をマイクロアレイ法により調べた。加えて、クレンプテロール刺激により変動が認められた miRNA のうち、FoxO1 mRNA の 3' UTR との結合が推測される miRNA を Target Scan により解析した。

(6) 骨格筋細胞への miRNA のトランスフェ

クションが FOXO1 mRNA の発現量に及ぼす影響

クレンブテロール刺激により変動が認められた miRNA のうち、Target Scan により FoxO1 mRNA の 3' UTR との結合が推測される miRNA (miRNA mimic) を C2C12 筋管細胞に導入し、FoxO1 mRNA の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 鶏初生ヒナに対する β_2 -AR 作動薬の投与が骨格筋の転写因子 FOXO および atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量に及ぼす影響

β_2 -AR 作動薬 (クレンブテロール) 投与 3 時間後の骨格筋における FOXO1 および atrogen-1/MAFbx の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により分析した結果、クレンブテロール投与区において FOXO1 および atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量の減少が認められた。これらの結果より、骨格筋における β_2 -AR の活性化は、FOXO1 mRNA 発現量の減少を介して atrogen-1/MAFbx の発現を負に調節し、タンパク質分解を抑制する可能性が示唆された。

(2) 鶏初生ヒナに対するアドレナリン、 β_1 -AR 作動薬、 β_2 -AR 作動薬、および β_3 -AR 作動薬の投与が骨格筋の atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量に及ぼす影響

投与 3 時間後の骨格筋における atrogen-1/MAFbx の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により分析した結果、アドレナリンおよび β_2 -AR 作動薬 (クレンブテロール) を投与したヒナにおいて骨格筋の atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量の減少が認められた。また、 β_1 -AR 作動薬 (ドブタミン) の投与は atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量に影響を及ぼさなかったが、 β_3 -AR 作動薬 (BRL37344) の投与は atrogen-1/MAFbx mRNA 発現量を有意に増加させた。

これらの結果より、骨格筋においてアドレナリンは、 β_2 -AR の活性化を介して atrogen-1/MAFbx の発現量を減少させ、タンパク質分解を抑制する可能性が示唆された。

(3) β_2 -AR 作動薬が鶏初代培養筋管細胞における転写因子 FOXO の mRNA およびタンパク質発現量に及ぼす影響

鶏初代培養筋管細胞において β_2 -AR 作動薬 (クレンブテロール) は、培地添加の 1 および 3 時間後に FOXO1 mRNA を有意に減少させた。FOXO1 タンパク質の発現量は、培地添加の 1 時間後には影響は認められなかったが、培地添加の 3 時間後に有意な減少が認められた。加えて、atrogen-1/MAFbx mRNA の発現量は、培地添加の 1 時間後には影響は認められなかったが、培地添加の 3 時間後に有意な減少が認められた。これらの結果より、鶏の骨格筋細胞における β_2 -AR の活性化は、リン酸化による FOXO1 の転写活性の調節に加えて、FOXO1 mRNA およびタンパク質の発現量減少を

介して atrogen-1/MAFbx の発現量を負に調節する可能性が示唆された。

(4) β_2 -AR 作動薬が C2C12 筋管細胞における転写因子 FOXO の mRNA およびタンパク質発現量に及ぼす影響

本実験では、鶏初代培養筋管細胞における結果と同様の結果を得た。すなわち、C2C12 筋管細胞において β_2 -AR 作動薬 (クレンブテロール) は、培地添加の 1 および 3 時間後に FOXO1 mRNA を有意に減少させた。FOXO1 タンパク質の発現量は、培地添加の 1 時間後には影響は認められなかったが、培地添加の 3 時間後に有意な減少が認められた。加えて、atrogen-1/MAFbx mRNA の発現量は、培地添加の 1 時間後には影響は認められなかったが、培地添加の 3 時間後に有意な減少が認められた。

これらの結果より、マウスの骨格筋細胞においても、 β_2 -AR の活性化は、リン酸化による FOXO1 の転写活性の調節に加えて、FOXO1 mRNA およびタンパク質の発現量減少を介して atrogen-1/MAFbx の発現量を負に調節する可能性が示唆された。

(5) β_2 -AR 誘導性の FOXO1 mRNA の分解に影響を及ぼす可能性のある miRNA の発現解析

1 時間のクレンブテロール刺激により FOXO1 mRNA の発現量減少が確認された C2C12 筋管細胞において発現が変動する miRNA をマイクロアレイ法により調べた結果、64 種が有意に増加し、39 種が有意に減少することが明らかとなった (合計 103 種の microRNA に有意な変動が認められた)。有意な増加が認められた 64 種の miRNA のうち、19 種の miRNA に FOXO1 mRNA の 3' UTR 領域と結合する可能性が推測された。

(6) 骨格筋細胞への miRNA のトランスフェクションが FOXO1 mRNA の発現量に及ぼす影響

(5) において、FOXO1 mRNA の 3' UTR 領域に対して結合する可能性が推測された 19 種の miRNA のうち、発現の増加量が大きかった 4 種の microRNA を、トランスフェクション法により C2C12 細胞へ導入した。その結果、2 種の microRNA の導入により、FoxO1 mRNA の発現量が有意に減少することが明らかとなった。

本研究により、骨格筋における β_2 -AR の活性化は、miRNA の発現量増加を誘導し、転写因子 FOXO1 mRNA 発現量を急速に減少させることが明らかとなった。その結果、FOXO1 タンパク質の発現量が減少し、FOXO1 の標的遺伝子である atrogen-1/MAFbx の発現量の減少を介して骨格筋タンパク質の分解が抑制される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1件)

1. Saki Shimamoto、Daichi Ijiri、Mana Kawaguchi、Kazuki Nakashima、Osamu Tada、Hiroki Inoue、Akira Ohtsuka. β_1 - and β_2 -adrenergic receptor stimulation differ in their effects on PGC-1 α and atrogen-1/MAFbx gene expression in chick skeletal muscle. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A、査読有、211 巻、2017 年、1-6.

〔学会発表〕(計2件)

1. 島元紗希、井尻大地、中島一喜、大塚彰. 骨格筋細胞において β_2 アドレナリン受容体作動薬クレンブテロールは microRNA を介して FoxO1 mRNA の発現を抑制する. 日本畜産学会、2018 年.

2. 島元紗希、井尻大地、中島一喜、川口真奈、井之上弘樹、多田司、大塚彰. ニワトリヒナ骨格筋においてアドレナリンによる PGC-1 α および atrogen-1 の遺伝子発現調節は異なる β アドレナリン受容体サブタイプを介する. 日本畜産学会、2017 年.

〔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
鹿児島大学農学部農業生産化学科栄養生化学・飼料化学研究室ホームページ
<http://acel.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri>

0035/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井尻 大地 (IJIRI Daichi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：50551090