

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08042

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答機構に着目した筋肥大化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of functional role of the endoplasmic reticulum stress response in muscle hypertrophy

研究代表者

米倉 真一 (Yonekura, Shinichi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：40443113

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)：本研究は小胞体ストレス応答分子であるXBP1が転写調節する骨格筋分化促進に関する分子を同定すると共に、骨格筋分化におけるXBP1の役割を明らかにすることを目的とした。XBP1ノックダウン筋芽細胞株では、分化誘導刺激後にオートファージおよびアポトーシス細胞死が亢進していることが明らかとなった。さらにXBP1sはCDK5(Cyclin-dependent kinase 5)を直接転写調節して筋分化に関与していることを見出した。以上より、IRE1-XBP1シグナルが、分化直後の細胞生存や分化進行において重要な役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食肉は骨格筋が由来であることから、赤身肉割合を高める技術を開発する上で筋形成のメカニズムを解明することは重要である。骨格筋は、筋芽細胞が細胞融合し多核の筋繊維に分化することによって形成される。本研究では、小胞体の恒常性の役割を有している小胞体ストレス応答機構が、骨格筋細胞の分化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。肉牛の筋肉量を増やす飼養技術開発へ向けた基礎的基盤の提供を行った。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to elucidate how the IRE1-XBP1 axis is involved in myogenic differentiation. Apoptosis and autophagy were dramatically enhanced in the XBP1-knockdown cells, highlighting the participation of IRE1-XBP1 in cell survival maintenance with differentiation stimuli during skeletal muscle differentiation. In myogenic cells, we demonstrated that the expression of CDK5 (Cyclin-dependent kinase 5) is regulated by XBP1s, and we propose that XBP1 regulates the expression of MyoD family genes via the induction of CDK5. In conclusion, this study revealed that IRE1-XBP1 signaling plays critical roles in cell viability and the expression of differentiation-related genes in pre-differentiated myoblasts and during the early differentiation phase.

研究分野：動物生理学

キーワード：骨格筋分化 小胞体ストレス応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋組織は、単核の筋芽細胞が分化・融合した多核の筋細胞(筋線維)の集合体である。骨格筋は、筋芽細胞が細胞融合し多核の筋繊維(筋管細胞)に分化することによって形成される。過去の研究によって骨格筋分化の後期過程、特に細胞融合および筋終末分化において重要な因子やシグナル経路について解明が進む一方で、筋芽細胞から分化誘導開始直後の細胞においては未解明な点が多く残されている。

Unfolded Protein Response (UPR) は、小胞体ストレスを緩和するために細胞に備わるシグナル機構であり、小胞体膜貫通タンパクとして存在する主要なセンサー分子、IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1)、PERK (protein kinase RNA-like ER kinase)、ATF6 (Activating transcription factor 6) によって開始される。近年、小胞体ストレスを感知して活性化する UPR はストレス排除に働くだけでなく、様々な組織の分化調節にも関与していることが明らかになっている。申請者は、UPR を破綻させると筋肉細胞の分化が著しく抑制することを明らかにした (Tokutake et al., IJMS, 2015)。また IRE1 が活性化されると、フレームスイッチ型スプライシング反応が誘起され、スプライスされた基質 XBP1 mRNA から活性型の転写因子 XBP1s が産生されるが、マウス筋芽細胞株である C2C12 に shRNA を用いて XBP1 遺伝子をノックダウンさせると分化能が著しく低下することも見出している。

2. 研究の目的

XBP1 は転写因子としての機能を有していることから、本研究では、XBP1 が転写調節する骨格筋分化促進に関与する分子を同定し、骨格筋分化における XBP1 の役割を明らかにすることを目的とした。食肉は家畜骨格筋が由来であることから、赤身肉割合を高める技術を開発する上で筋形成のメカニズムを解明することは重要である。「骨格筋分化に関与する分子」が明らかになることにより、肉牛の筋肉量を増やす飼養技術開発に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス筋芽細胞株 (C2C12 細胞) や XBP1 ノックダウン C2C12 細胞株 (XBP1KD 細胞) の培養は、増殖培地として 10% Fetal Bovine Serum を添加した DMEM-HG 培地、分化培地として 2 % Horse Serum を添加した DMEM-HG 培地を使用した。筋管形成の評価は、1 次抗体として Anti-Myosin 抗体、2 次抗体として Alexa Fluor 568 conjugated anti-Rabbit IgG 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得した後、Image J 画像解析ツールによって筋管の面積、1 筋管当たりの核個数を計測することで行った。

(2) オートファジーに関する評価は、オートファジー関連因子である LC3, Beclin1, p62 の遺伝子・タンパク発現を RT-qPCR、ウエスタンブロット法を用いて検討した。またオートファゴソーム形成の様子を電子顕微鏡により観察した。

(3) アポトーシスに関する評価は、Cleaved-Caspase3 発現量をウエスタンブロット法によって解析すると共に、PI および FITC 標識した Annexin V で細胞を染色後、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス細胞の割合を測定することで検討した。

(4) XBP1 が転写調節する遺伝子は、分化誘導刺激直後のコントロール細胞と XBP1KD 細胞を用いた RNA seq 解析、Chip アッセイ、ルシフェラーゼアッセイにより同定した。

(5) IRE1 の RNase 活性、CDK 活性と筋分化との関連性を明らかにするため、IRE1 の RNase 特異的な活性阻害剤である 4 μ 8c、CDK5 の活性阻害剤 Roscovitine を添加し、筋分化能を評価した。

4 . 研究成果

XBP1s の誘導に必要な IRE1 の RNase 活性が筋分化に及ぼす影響を検証するため、IRE1 の RNase 特異的な活性阻害剤である 4 μ 8c の添加実験を行った結果、4 μ 8c 処理細胞では筋管形成が著しく減少していた。すなわち IRE1-XBP1 シグナルが、筋分化において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

筋分化初期に行われるイベントであるオートファジーに着目し、XBP1KD 細胞の分化後におけるオートファジーの様子を検討した。XBP1KD 細胞では、分化誘導後 48 時間においてオートファゴソームの形成が通常細胞よりも著しく多く、分化過程を通してオートファゴソーム形成が促進していることが明らかになった。また、XBP1KD 細胞では、LC-II 発現が有意に上昇しており、オートファジー分解を受ける p62 の発現は有意に減少していたことから、XBP1KD 細胞ではオートファジーの亢進が生じていることが判明した。一方、オートファジーに不可欠な Beclin1 の遺伝子・タンパク発現はともに通常細胞よりも低かったため、XBP1KD 細胞では通常とは異なる分子経路を介したオートファジーが誘導されている可能性があると考えられた。XBP1KD 細胞ではオートファジーの亢進が生じており、そのことが、筋分化能が低下している要因であると考えられる。また XBP1KD 細胞では分化過程を通してコントロール細胞と比べて有意なアポトーシス細胞の増加が認められ、アポトーシス実行因子である Cleaved-Caspase3 の発現も、XBP1KD 細胞では分化誘導後 12 時間において急激に増加していた。以上の結果より、IRE1-XBP1 シグナルが、分化直後の細胞生存や分化進行において重要な役割を担うことが明らかとなった。

続いて、転写因子 XBP1 が直接転写調節している筋分化関連遺伝子の同定を試みた。コントロール細胞と XBP1KD 細胞を用いて、RNA seq 解析を行い、その解析データの中から、CDK5 (Cyclin-dependent kinase 5) という分子に着目し検討を行った。CDK5 の遺伝子発現は未分化細胞で最も高く、分化とともに減少するという XBP1s と同様の発現パターンであることが明らかとなった。また、XBP1KD 細胞では、Cdk5 遺伝子発現が有意に抑制されており、ChIP assay およびルシフェラーゼ assay の結果からも、XBP1s は Cdk5 を直接転写調節していることが明らかとなった。CDK5 の活性阻害剤 Roscovitine 添加により筋管形成を著しく抑制することが確認された。一方、分化初期におけるアポトーシス細胞死や、オートファジーに関しては特に影響がなく、CDK5 は XBP1KD 細胞で確認された分化初期のアポトーシス細胞死やオートファジーの亢進には関与していないことが示された。

一連の研究によって、IRE1-XBP1 シグナルが骨格筋分化に不可欠な UPR 因子であることを明らかとした。これまでに、in vitro の筋細胞分化の初期段階には、細胞内小器官のリモデリングや分化に不可欠なアポトーシスやオートファジーが誘導されることが報告されている。この際、アポトーシスやオートファジーの誘導が強すぎれば、分化に進行するまでもなく細胞生存に負の影響が生じる。本研究結果から、IRE1-XBP1 シグナルは、筋芽細胞が分化誘導刺激を受け取った際の適応や細胞生存に關する重要な経路である可能性が高いことが明らかとなり、骨格筋分化機構を解明する上で、極めて有用な知見を得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokutake Yukako, Yamada Keita, Hayashi Satoko, Arai Wataru, Watanabe Takafumi, Yonekura Shinichi	4. 巻 21
2. 論文標題 IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response Is Required during Early Differentiation of C2C12 Myoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 182 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010182	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 徳武 優佳子、山田 啓太、林 聡子、坂田 章太郎、米倉 真一	4. 巻 63
2. 論文標題 骨格筋分化の制御に寄与するIRE1-XBP1の機能解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 栄養生理研究会報	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂田 章太郎、佐藤 拓海、徳武 優佳子、高谷 智英、米倉 真一 .
2. 発表標題 骨格筋分化における小胞体ストレス応答経路IRE1のRNaseドメインの役割について
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 章太郎、鈴木 穰、高谷 智英、米倉 真一 .
2. 発表標題 骨格筋分化における小胞体ストレス応答分子IRE1によるId3発現制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shotaro Sakata, Takumi Sato, Yukako Tokutake, Shinichi Yonekura
2. 発表標題 The relationship between skeletal muscle differentiation and ER stress response signal IRE1a.
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Tropical Animal Science and Production (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 章太郎、佐藤 拓海、徳武 優佳子、米倉 真一.
2. 発表標題 骨格筋分化と小胞体ストレス応答経路IRE1aの関係
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018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