

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580414

研究課題名(和文) 栄養生理学的制御によるタンパク質分解関連遺伝子FBXO22発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of FBXO22 expression in skeletal muscle by nutritional and physiological conditions

研究代表者

中島 一喜(Nakashima, Kazuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所家畜生理栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：70370583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アトロジン-1(FBXO32)遺伝子は、様々な栄養・生理条件下における骨格筋タンパク質分解に重要な役割を果たしているが、FBXO22遺伝子の骨格筋における栄養生理学的制御については検討されていない。そこで、本研究では、鶏骨格筋におけるFBXO22の遺伝子発現をアトロジン-1遺伝子発現と比較し、栄養生理学的制御について検討した。その結果、これらの遺伝子は、栄養状態ならびに各種ホルモンによる発現調節が異なることが明らかになった。特に、グルココルチコイドによるこれらの遺伝子の発現調節は、グルココルチコイドレセプターを直接介しているが、異なる調節がされていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Atrogin-1, a muscle-specific E3 ubiquitin ligase, is regulated by nutritional and physiological conditions that result in muscle atrophy. FBXO22 is also an E3 ubiquitin ligase, but regulation of FBXO22 expression by nutritional and physiological conditions is largely unknown. In skeletal muscle of chicken, atrogin-1 and FBXO22 was regulated by nutritional conditions, and expression of FBXO22 and atrogin-1 was also regulated by various hormones. In particular, expression of FBXO22 and atrogin-1 was regulated by glucocorticoid via glucocorticoid receptor. These results indicate that expression of FBXO22 and atrogin-1 is differently regulated by nutritional and physiological conditions in chick skeletal muscle.

研究分野：農学

キーワード：ニワトリ タンパク質分解 FBXO22 アトロジン - 1 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

畜産における最大の使命は動物タンパク質生産であり、正味のタンパク質生産量はタンパク質の合成量と分解量の差である。タンパク質合成と分解の制御が可能になれば、正味のタンパク質生産量が増加し、効率的な畜産物生産技術の開発に貢献することができる。したがって、家畜生産物である骨格筋におけるタンパク質の合成と分解の調節機構を明らかにすることは、畜産において極めて重要な研究である。

家禽の骨格筋におけるタンパク質代謝制御に関する研究は、国内外で数多く行われているが、現在までにタンパク質分解機構に関する分子レベルでの研究は十分におこなわれていない。しかしながら、近年、鶏のゲノム情報が公開され、鶏において分子生物学的手法を用いた研究が進歩したことにより、鶏の骨格筋タンパク質の分解機構を分子レベルで明らかにすることが可能となった。これまで、申請者は鶏の骨格筋タンパク質分解機構の栄養生理学制御の研究を行い、タンパク質分解関連遺伝子発現が栄養により制御されていることを明らかにした。特に、タンパク質分解に関与する筋特異的ユビキチンリガーゼのアトロジン-1 遺伝子が様々な栄養・生理条件下における骨格筋タンパク質分解に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、申請者は肉用鶏と卵用鶏における骨格筋の成長速度の違いをモデルに骨格筋タンパク質分解を分子レベルで検討するため、タンパク質分解関連遺伝子発現を調べた。その結果、肉用鶏に比べ、卵用鶏でアトロジン-1 遺伝子の発現が3倍高かった。この結果は、肉用鶏と卵用鶏の骨格筋の成長速度の違いは、タンパク質分解関連遺伝子のアトロジン-1 が制御している可能性を示唆している。また、申請者は肉用鶏と卵用鶏の骨格筋の成長速度の違いをモデルとして用い、肉用鶏と卵用鶏の骨格筋において、DNA マイクロアレイ技術を用いて、骨格筋における遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、アトロジン-1 と同様にユビキチンリガーゼの一つである FBX022 遺伝子発現が肉用鶏に比べ、卵用鶏が8倍高いことを見いだした。

この結果は、肉用鶏と卵用鶏の骨格筋の成長速度の違いにアトロジン-1 と同様に FBX022 も重要な役割をしている可能性を示している。

アトロジン-1 の生化学的、栄養生理学的機能は多方面から明らかにされつつあるが、FBX022 に関しては、哺乳類も含めて知見が得られていない。そこで、本研究では骨格筋タンパク質分解における FBX022 遺伝子の調節機構を明らかにするため、栄養生理学制御による FBX022 遺伝子の発現調節機構の解明と新たな骨格筋タンパク質代謝制御技術の確立において基礎となる研究を計画した。

2. 研究の目的

アトロジン-1 は、タンパク質分解関連遺伝子であり、筋特異的に発現し、骨格筋タンパク質分解促進モデル(絶食、グルココルチコイド処理など)で発現量が8-40倍にも増加する。このアトロジン-1 は、骨格筋タンパク質分解を促進する遺伝子であることが、DNA マイクロアレイ技術を用いて明らかにされ、栄養生理学制御によるアトロジン-1 遺伝子の発現調節機構は哺乳類においては数多く報告されている。申請者は、肉用鶏と卵用鶏の骨格筋の成長速度の違いに関与する遺伝子発現を網羅的に解析するため、DNA マイクロアレイ技術を用いて比較した結果、肉用鶏に比べ、卵用鶏において FBX022 遺伝子発現量が8倍高いことを明らかにした。肉用鶏に比べ、卵用鶏はタンパク質分解速度が高いことから、FBX022 発現がタンパク質分解に関与している可能性が考えられる。しかし、アトロジン-1 ならびに FBX022 と同様のユビキチンリガーゼの一つである FBX025 発現は、骨格筋においてタンパク質分解に関与していないことが報告されているが、栄養生理学制御による FBX022 発現調節がタンパク質分解に関与していることについては、哺乳類を含めて報告されていない。そこで、本研究では鶏ヒナならびに培養筋肉細胞を用いて、栄養生理学制御による FBX022 遺伝子発現調節機構を RNA 干渉技術を用いて、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 栄養学的制御(絶食・再給餌、タンパク質栄養)がタンパク質分解関連遺伝子 FBX022 発現に及ぼす影響の検討

絶食・再給餌のモデルを用いた実験

鶏ヒナを24時間絶食後、2時間再給餌する。骨格筋を採取し、RNAを抽出後、リアルタイムPCR法でFBX022遺伝子発現量を測定する。絶食により骨格筋タンパク質分解ならびにユビキチンリガーゼの一つであるアトロジン-1 遺伝子発現量が増加し、再給餌によって減少することが明らかになっているので、この遺伝子と比較することにより、FBX022 遺伝子発現が骨格筋タンパク質分解に関与するかを確認した。

タンパク質栄養モデルを用いた実験

飼料中タンパク質含量を変えて、タンパク質分解に影響を及ぼすモデルを作成した。また、骨格筋タンパク質分解関連遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により測定した。FBX022の発現量ならびにタンパク質分解関連遺伝子であるアトロジン-1 発現量を測定し、これらの比較を行い、タンパク質栄養がFBX022 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

(2) 生理学的制御(インスリン様成長因子-1、グルココルチコイド、甲状腺ホルモン)がFBX022発現に及ぼす影響の検討

培養筋肉細胞を用いて、培地のインスリン様成長因子-1(IGF-1)、Dexならびに甲状腺ホルモン(T3)濃度を段階的に設け培養する。一定時間の培養後、細胞を回収し、その後、細胞からRNAを抽出し、筋肉細胞におけるFBX022ならびにアトロジン-1の発現量をリアルタイムPCR法により定量解析を行った。

その結果、IGF-1、DexならびにT3のFBX022遺伝子発現ならびに他のタンパク質分解関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。

(3) siRNAによるRNA干渉技術を用いたFBX022発現調節機構の検討

生理学的制御によるFBX022の発現調節機構を明らかにするため、FBX022遺伝子発現を調節すると考えられた遺伝子をRNA干渉技術を用いてノックダウンし、FBX022発現の抑制または促進を確認した。

FBX022の発現を調節に関与していると考えられる遺伝子(IGF-1受容体、グルココルチコイド受容体、甲状腺ホルモン受容体ならびにプロテインキナーゼ)のsiRNAプライマーを作成し、培養筋肉細胞に導入する。その遺伝子の発現がノックダウンしているかどうかをリアルタイムPCR法にて確認した。

の実験で検討し得たsiRNA導入条件で、生理学的制御(グルココルチコイド)処理を行い、FBX022の発現について検討した。

4. 研究成果

鶏ヒナを用い、骨格筋におけるFBX022の遺伝子発現をアトロジン-1(FBX032)遺伝子発現と比較し、栄養生理学的制御について検討した。まず、FBX022およびアトロジン-1の遺伝子発現の組織特異性を明らかにするため、骨格筋、心臓、筋胃、脳ならびに肝臓を採取し、これらの遺伝子の発現量を調べた。その結果、FBX022の遺伝子発現は、骨格筋に比べ、肝臓で低く、他の組織では差は見られなかった。一方、アトロジン-1遺伝子発現は、骨格筋に比べ、筋胃で10倍以上高く、心臓では差はなく、脳と肝臓では低かった。

次に、骨格筋におけるFBX022およびアトロジン-1の遺伝子発現に対する絶食ならびに再給餌の影響を調べた結果、FBX022遺伝子発現は、絶食ならびに再給餌で影響は見られなかったが、アトロジン-1遺伝子発現は、絶食で増加し、再給餌により減少した。

また、骨格筋におけるFBX022およびアトロジン-1の遺伝子発現に対するタンパク

質栄養の影響を調べるため、低タンパク質(CP7.5%)飼料を給与した。その結果、骨格筋のFBX022ならびにアトロジン-1の遺伝子発現は低タンパク質飼料給与により減少した。

以上の結果から、FBX022およびアトロジン-1遺伝子は、同じE3コピキチンリガーゼであるが、組織特異性ならびに栄養学的制御機構が異なる可能性が示唆された。

次に、培養筋肉細胞を用い、骨格筋におけるFBX022の遺伝子発現をアトロジン-1遺伝子発現と比較し、生理学的制御について検討した。まず、培養筋肉細胞を血清を含まない培地(血清飢餓)で培養する区、その後、血清を含む培地で培養する区ならびに血清を含むアミノ酸無添加培地で培養する区を設け、FBX022およびアトロジン-1遺伝子発現と比較した。その結果、FBX022の遺伝子発現は血清ならびにアミノ酸の有無の培養条件では影響が見られなかったが、アトロジン-1遺伝子発現は、血清飢餓で増加し、血清を含む培地に交換し培養すると減少した。

次に、骨格筋に対してタンパク質分解抑制作用を有するIGF-1ならびにタンパク質分解促進作用を有する合成グルココルチコイドのデキサメタゾン(Dex)を用いて、培養筋肉細胞のFBX022およびアトロジン-1の遺伝子の発現量を調べた。その結果、培養筋肉細胞において、IGF-1により、FBX022遺伝子発現には影響はみられなかったが、アトロジン-1遺伝子発現は有意に減少した。一方、Dexにより、FBX022遺伝子発現を有意に減少し、アトロジン-1遺伝子発現は有意に増加した。

次に、培養筋肉細胞において、タンパク質分解促進作用を有するFBX022およびアトロジン-1の遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンの影響を調べた。その結果、FBX022遺伝子発現は、甲状腺ホルモンの影響はみられなかった。また、アトロジン-1遺伝子発現も、甲状腺ホルモンの影響はみられなかった。

以上の結果から、FBX022およびアトロジン-1遺伝子は、培養筋肉細胞において、生理学的制御機構が異なる可能性が示唆された。また、両遺伝子ともグルココルチコイドで発現調節されているが、調節機構が異なる可能性が示唆された。

鶏骨格筋において、グルココルチコイドがFBX022遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。そこで、グルココルチコイドによるFBX022の発現機構を明らかにするため、グルココルチコイドレセプターをRNA干渉技術を用いてノックダウンし、FBX022発現による抑制作用に対する影響を調べ、グルココルチコイドで増加するアトロジン-1発現と比較した。

まず、グルココルチコイドレセプターのアンタゴニストであるRU486を用いて、FBX022ならびにアトロジン-1発現に対する作用の違いを明らかにするため、鶏培養筋肉細胞をグルココルチコイドのデキサメタゾン、

RU486、またはデキサメタゾン+RU486 を含む培地で培養した。その結果、デキサメタゾンによりFBX022は減少し、アトロジン-1発現は増加した。RU486単独ではFBX022ならびにアトロジン-1発現に影響は及ぼさなかった。一方、デキサメタゾンによるFBX022ならびにアトロジン-1発現に対する作用はRU486によりキャンセルされた。

次に、デキサメタゾンによるFBX022ならびにアトロジン-1発現に対する作用をRNA干渉技術を用いてグルココルチコイドレセプターを介した作用によるものかを明らかにするため、鶏培養筋肉細胞にグルココルチコイドレセプター-siRNAを導入し、デキサメタゾン含む培地で培養した。その結果、グルココルチコイドレセプター-siRNAを導入した細胞では、デキサメタゾンによるFBX022ならびにアトロジン-1発現に対する作用はキャンセルされた。

以上の結果は、鶏骨格筋において、FBX022ならびにアトロジン-1遺伝子は、グルココルチコイドにより、グルココルチコイドレセプターを介し発現調節されているが、その下流の調節機構が異なる可能性が示唆された。

一連の結果から、鶏骨格筋におけるFBX022とアトロジン-1遺伝子の発現調節機構は異なり、特に、グルココルチコイドにより、グルココルチコイドレセプターを介して、これらの遺伝子は発現調節されていることが明らかになった。

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)

K Nakashima and A Ishida. Response of atrogen-1/MAFbx expression in various skeletal muscles to fasting in broiler chickens. Journal of Poultry Science. 印刷中. 査読有

K Nakashima, A Ishida, D Ijiri and A Ohtsuka. Effect of dexamethasone on the expression of atrogen-1/MAFbx in chick skeletal muscle. Animal Science Journal. 印刷中. 査読有

K Nakashima, A Ishida, K Katsumata, Atrogen-1/MAFbx, a muscle-specific ubiquitin ligase, is highly expressed in the smooth muscle of the chicken gizzard. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry. 77(5), 1092-1095, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

中島一喜、石田藍子、井尻大地、大塚 彰. グルココルチコイドが鶏骨格筋のアトロジン-1遺伝子発現に及ぼす影響. 日本畜産学会 119 回大会. 2015 年 3 月 28 日.

宇都宮大学峰キャンパス(栃木県宇都宮市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 一喜 (NAKASHIMA KAZUKI)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：70370583