

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292076

研究課題名(和文) 骨格筋アミノ酸代謝と筋量制御における転写調節因子FOXO1 / PGC1 の役割

研究課題名(英文) Role of PGC1alpha and FOXO1 in skeletal muscle amino acid metabolism, and muscle mass

研究代表者

亀井 康富 (Kamei, Yasutomi)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：70300829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写制御因子FOXO1およびPGC1を骨格筋アミノ酸代謝の主要制御因子と想定し、その分子機序を解明した。骨格筋においてFOXO1はグルタミン代謝を、PGC1は分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝を制御することを見出した。本研究においては、運動が身体にどのように良い効果を与えるかという分子説明を可能とした点について学術的な価値がある。これは運動が、どのように生活習慣病を予防・改善するかという分子的な説明を与えるものであり、今後の機能性食品の開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：A well-balanced body energy budget is controlled by limiting calorie intake and/or increasing energy expenditure, which is typically achieved by appropriate physical exercise, and is the most effective treatment for obesity and diabetes mellitus. In this study, we showed that PGC1 and FOXO1 are critical regulators of amino acid metabolism in skeletal muscle (BCAA and glutamine, respectively). Our aims are to better understand the molecular mechanisms underlying skeletal muscle metabolism, establish novel strategies for the prevention of lifestyle-related diseases and sarcopenia, and establish a fundamental biological basis for the effects of functional foods.

研究分野：分子栄養学

キーワード：骨格筋 転写調節 運動 代謝

1. 研究開始当初の背景

骨格筋はヒトの体重の約 40%を占め、人体で最も大きい組織でありタンパク質(アミノ酸)の形でエネルギー貯蔵を行なっている。飢餓時においては、骨格筋はアクチンやミオシンといった構成タンパク質を分解し、生成したアミノ酸は他臓器にてエネルギー源として利用される。骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、例えば、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。骨格筋の肥大化は、同化ホルモンであるインスリンや IGF-1 などの作用が知られるとともに、分岐鎖アミノ酸(BCAA)が骨格筋を肥大化させるといふ知見がある。一方、寝たきりやギプス固定、飢餓や加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少(肥満)や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇(糖尿病)へと向かう。高齢化社会を迎えている我が国において、生活習慣病の予防や生活の質の維持に大きな役割を果たす骨格筋の代謝能および肥大・萎縮の分子機序を理解する事は、国民の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

Forkhead protein-O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンシグナルに拮抗する。研究代表者らは、数年来、個体レベルで FOXO1 の骨格筋代謝調節機構を検討してきた。すなわち、エネルギー欠乏により骨格筋における FOXO1 の遺伝子発現が増加することを踏まえ、FOXO1 を骨格筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、FOXO1 が骨格筋萎縮を引き起こすことを示した。また、脂質合成および糖取り込み増加が FOXO1 によって抑制されることを見出した。さらに、タンパク質分解酵素遺伝子が FOXO1 によって転写活性化されることを示した。この結果は、FOXO1 が骨格筋でのエネルギー欠乏への適応(糖利用の抑制、タンパク質分解促進)に役割を果たす事を示唆する。

FOXO1 のみならず、転写共役因子 PPAR co-activator 1 (PGC1) は、骨格筋代謝および骨格筋量の維持に重要であることが示唆される。研究代表者らは、PGC1 が骨格筋のミトコンドリア増加とエネルギー代謝(脂肪酸酸化)亢進を引き起こすことを見出した。さらに、PGC1 の過剰発現により、筋萎縮が抑制される事が報告されている。一方、本研究課題の予備検討として、骨格筋において FOXO1 がグルタミン合成酵素の遺伝子発現を、PGC1 が BCAA 分解酵素およびアラニン合成酵素の遺伝子発現を増加させる未発表データを得ており、FOXO1 と PGC1 はそれぞれ、骨格筋のアミノ酸代謝に重要な役割を果たすことが示唆される。

2. 研究の目的

骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、例えば、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。骨格筋の肥大化は、同化ホルモンであるインスリンや IGF-1 などの作用が知られるとともに、分岐鎖アミノ酸(BCAA)が骨格筋を肥大化させる。一方、寝たきりやギプス固定、栄養不足や加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少(肥満)や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇(糖尿病)へと向かう。超高齢化社会を迎えている我が国において、生活習慣病の予防や生活の質の維持に大きな役割を果たす骨格筋の代謝能および肥大・萎縮の分子機序を理解する事は、国民の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

骨格筋のアミノ酸代謝は栄養学的に重要な現象だが、その代謝に関連する酵素類の発現制御の分子機序は不明な点が多い。研究代表者らの未発表の検討結果から、転写調節因子 FOXO1 および PGC1 が骨格筋のアミノ酸代謝の主要な制御因子として機能すると予想している。そこで本研究では、これら転写調節因子に着目して骨格筋機能変化の分子機序を解析した。これは、栄養科学のみならず運動生理学および健康医学研究の進展において意義あるものである。

3. 研究の方法

1). 遺伝子改変動物を用いた骨格筋機能向上の分子機序解明

- ・遺伝子改変マウスの遺伝子発現変動解析
- ・アミノ酸代謝の機能解析
- ・筋萎縮抑制の分子機序解析

2). 筋代謝産物の解析

- ・メタボローム解析
- ・タンパク質合成量の測定

1)、2)の方法により遺伝子発現に関する分子レベルでの作用機序を解明する。そして細胞、個体レベルでの科学的エビデンスを獲得する。

4. 研究成果

運動時の骨格筋での PGC1 を介したアミノ酸代謝制御

メタボローム解析により、PGC1^{-/-}Tg マウスの骨格筋中の低分子代謝物の変動を網羅的に解析した。その結果、TCA 回路の代謝産物の量の増加が観察された。そして、TCA 回路の基質となりうる BCAA や -アラニンを含むアミノ酸の量が顕著に減少していた。さらに運動時に活性化することが知られているプリンヌクレオチド回路とアスパラギン酸-リンゴ酸シャトルの代謝産物の量が増加した。これらの結果から、PGC1 がアミノ酸を含む様々な基質を利用して TCA 回路を活性化し、運動時のエネルギー源としている可能性が示唆された。

これらの結果から PGC1 は骨格筋において BCAA 異化を促進していると考えられた。運動時に骨格筋において BCAA 異化が促進し、有用なエネルギー源として利用されることが知られている。そのため、運動による PGC1 の発現増加は BCAA 異化を促進させ、持久運動能力向上に寄与している可能性がある。すなわち本研究により運動と BCAA 利用をつなぐ欠けたピースとして、PGC1 を同定した。本研究成果は、運動持久能力を向上させるためのサプリメントや機能性食品の開発につながる可能性がある。PLoS One. 10:e0129084, 2015., PLOS ONE 9:e91006, 2014

PGC1 KO マウスを用いた解析

ロイシンはリン酸化酵素である哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)を活性化し、その下流にある真核生物翻訳開始因子 4E 結合タンパク質(4EBP)のリン酸化を増加させる。これによりタンパク質翻訳は促進される。また、mTOR はペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 転写共役因子 1 (PGC1)と複合体を形成することが報告されている。そこで、ロイシンによる mTOR の活性化(4EBP のリン酸化)に PGC1 が寄与している可能性を検討した。野生型マウスの骨格筋ではロイシン投与により 4EBP のリン酸化が増加した。しかし、骨格筋特異的 PGC1 欠損マウス(PGC1 KO)の骨格筋では、4EBP のリン酸化はほとんど増加していなかった。このことから、PGC1 がロイシンによる mTOR の活性化に寄与していることが示唆された。Biosci Biotechnol Biochem. 80:288-90, 2016

FOXO1 の役割に関する解析：筋再生

骨格筋は人体の中で、最も優れた再生能力を有する組織の一つである。この再生を可能にしているのが骨格筋幹細胞のサテライト細胞である。骨格筋が損傷を受けるとサテライト細胞は活性化し、増殖・分化を経て新たな筋線維を形成する。マウスを尾部懸垂させ脚の負荷をなくすと筋損傷後の再生が遅延することが報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、不活動時に発現増加する FOXO1 が筋再生遅延の原因ではないかと考え、筋芽細胞と遺伝子改変マウスを用いて筋再生遅延における FOXO1 の寄与について調べた。その結果、C2C12 (FOXO1-3A-ER)筋芽細胞の TAM 処理群で p57 及び Gadd45 の mRNA レベルが増加し、増殖能の低下が見られた。ゆえに、FOXO1 の活性化によって筋芽細胞の増殖が抑制されることが示された。次に不活動モデルとして FOXO1-Tg マウス及び野生型 (WT)マウスで筋損傷を誘導したところ、Tg マウスで筋重量、筋断面積の再生遅延が見られた。このことから、FOXO1 は骨格筋の再生を阻害している可能性が示唆された。C2C12 とマウス筋損傷実験の結果から、FOXO1 による筋芽細胞の増殖抑制が不活動時における骨格筋再生遅延の原因の一つである可

能性が示唆された。Biosci Biotechnol Biochem. In press, 2016

FOXO1 の役割に関する解析：グルタミン合成酵素

FOXO1 Tg マウスおよび FOXO1 を骨格筋特異的に欠損させたマウス(FOXO1 KO マウス)を使用し、それぞれの野生型同腹仔の骨格筋と比較して、アミノ酸代謝に関する遺伝子発現を測定した。FOXO1 Tg マウスの骨格筋において、FOXO1 の既知の標的遺伝子であるカテプシン L の発現増加と伴に、グルタミン合成酵素の遺伝子発現が増加した。C2C12 細胞において、FOXO1 の活性化はグルタミン合成酵素の遺伝子発現を増加させた。絶食時、野生型マウスでは FOXO1 とグルタミン合成酵素の発現が顕著に増加するが、FOXO1 KO マウスでは、グルタミン合成酵素の発現増加が減弱していた。レポーターアッセイでは、FOXO1 容量依存的にグルタミン合成酵素遺伝子の転写活性が増加し、3' 領域にあるコンセンサスの FOXO1 結合領域の欠損は転写活性を顕著に減少させた。さらに、ChIP アッセイにより、C2C12 細胞において FOXO1 がグルタミン合成酵素遺伝子の 3' 領域に強くリクルートされることを見出した。また、培地中のグルタミンによりグルタミン合成酵素タンパク質量が減少することが判明した。一方、グルタミンによりグルタミン合成酵素 mRNA 量は影響を受けなかった。これらの結果から、FOXO1 はグルタミン合成酵素遺伝子を発現制御することが明らかとなった。FOXO1 KO マウスではグルタミン合成酵素の発現抑制と逆相関して、血中のアンモニアレベルは増加しており、アンモニアの消去能が低下していることが示唆された。骨格筋において FOXO1 は絶食や運動のような異化時にアミノ酸代謝に役割を担っているかもしれない。また、FOXO1 によるグルタミン合成酵素の発現促進は、異化時に生成されるアンモニアの消去にも役割を果たす可能性がある。American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism 307:E485-93, 2014.

PGC-1 の過剰発現による速筋および遅筋の脂質組成変化：

骨格筋特異的に PGC-1 を過剰発現させたマウス(PGC-1 -Tg)および野生型マウス(WT)より、骨格筋(速筋の代表として EDL、遅筋の代表として Soleus)を摘出し、LC/MS による脂質成分の網羅的解析を行った。検出されたすべてのピークに対して主成分分析を行った結果、骨格筋への PGC-1 の過剰発現は、骨格筋の脂質組成を大きく変化させることが示された。主成分分析の loading plot より、WT と PGC-1 -Tg の脂質組成の違いには、リン脂質画分の分子種が貢献することが示唆された。次に、リン脂質画分の分子種に限り主成分分析を行うと、第 1 主成分により WT と PGC-1 -Tg のプロットは、特に EDL にお

いて、明白に分けられた。因子負荷量の統計的仮説検定より、第1主成分に有意である分子種として phosphatidylcholine (PC) 12 分子と phosphatidylethanolamine (PE) 6 分子が同定された。

さらに、PGC-1 過剰発現による PC、PE 組成の変化と同様の変化が運動トレーニングにより誘導されるのか、また、これらの変化に PGC-1 は必要であるかを検証するため、PGC-1 を骨格筋特異的に欠損させたマウス (PGC-1^{-KO}) に自発運動トレーニングをさせ、摘出した骨格筋中の PC、PE 分子種を測定した。その結果、PC (18:0/22:6) を代表とする PC 4 分子と PE (18:0/22:6) を代表とする PE 2 分子は、コントロールマウスの運動群 EDL において増加したが、PGC-1^{-KO} の運動群 EDL では増加しなかった。すなわち、これらの分子種は、運動トレーニングにより PGC-1 依存的に増加したと考えられた。J Lipid Res. 56:2286-96, 2015

要約

メタボローム解析により PGC1 がアミノ酸を含む様々な基質を利用して TCA 回路を活性化し、運動時のエネルギー源としている可能性が示唆された。本研究成果は、運動持久能力を向上させるためのサプリメントや機能性食品の開発につながる可能性がある。次に、ロイシンによる mTOR の活性化 (4EBP のリン酸化) に PGC1 が寄与している可能性を検討し、PGC1 がロイシンによる mTOR の活性化に寄与していることが示唆された。一方、FOXO1 は骨格筋の再生を阻害している可能性が示唆された。C2C12 とマウス筋損傷実験の結果から、FOXO1 による筋芽細胞の増殖抑制が不活動時における骨格筋再生遅延の原因のひとつである可能性が示唆された。また運動トレーニングが PGC-1 依存的に n-3 系多価不飽和脂肪酸含有リン脂質を増加させることを明らかにした。

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 6 件)

1) A. Yamashita, Y. Hatazawa, Y. Hirose, Y. Ono, Y. Kamei*. FOXO1 delays skeletal muscle regeneration and suppresses myoblast proliferation. Biosci Biotechnol Biochem. In press, 2016 (*Corresponding author)

2) R. Yoshimura, K. Minami, J. Matsuda, N. Sawada, S. Miura, Y. Kamei*. Phosphorylation of 4EBP by oral leucine administration was suppressed in the skeletal muscle of PGC-1 α knockout mice. Biosci Biotechnol Biochem. 80:288-90, 2016 (*Corresponding author)

3) Y. Hatazawa, N. Senoo, M. Tadaishi, Y. Ogawa, O. Ezaki, Y. Kamei*, S. Miura. Metabolomic

Analysis of the Skeletal Muscle of Mice Overexpressing PGC-1 α . PLoS One. 10:e0129084, 2015. (*Corresponding author)

4) N. Senoo, N. Miyoshi, N. Goto-Inoue, K. Minami, R. Yoshimura, A. Morita, N. Sawada, J. Matsuda, Y. Ogawa, M. Setou, Y. Kamei*, S. Miura*. PGC-1 α -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. J Lipid Res. 56:2286-96, 2015 (*Corresponding author)

5) Y. Kamei*, M. Hattori, Y. Hatazawa, T. Kasahara, M. Kanou, S. Kanai, X. Yuan, T. Suganami, W.H. Lamers, T. Kitamura, Y. Ogawa. FOXO1 activates glutamine synthetase gene in mouse skeletal muscles through a region downstream of 3'-UTR: possible contribution to ammonia detoxification. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism 307:E485-93, 2014. (*Corresponding author)

6) Y. Hatazawa, M. Tadaishi, Y. Nagaïke, A. Morita, Y. Ogawa, O. Ezaki, Y. Kitaura, Y. Shimomura, Y. Kamei*, S. Miura. PGC-1 α -mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. PLOS ONE 9:e91006, 2014 (*Corresponding author)

[学会発表](計 4 件)

1) 亀井康富、三浦進司 第70回 日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム
ロコモティブシンドロームと栄養：骨格筋機能におけるアミノ酸代謝の役割と分子機序 兵庫県西宮市 2016年5月14日

2) Yasutomi Kamei, Shinji Miura, Yoshihiro Ogawa 12TH Asian Congress of Nutrition 14-18 May 2015, Yokohama, Japan (Symposium)
Molecular mechanism of gene expression in skeletal muscle function and amino acid metabolism

3) Y. Kamei, M Hattori, Y Hatazawa, T Kasahara, T Kitamura, Y Ogawa FOXO1 activates glutamine synthetase gene in mouse skeletal muscles Experimental Biology 2014, April 26-30 2014 at San Diego Convention Center, USA

4) 亀井康富 骨格筋機能と遺伝子発現調節 シンポジウム：アミノ酸と脂質糖質代謝のインターコネクション 第67回日本栄養・食糧学会 愛知県名古屋市 2013年5月26日

[図書](計 5 件)

1) 亀井康富、小川佳宏 「骨格筋からみた糖尿病の病態と治療」月刊糖尿病 医学出版 vol.7 No1 p.80-85, 2015

2) 山下敦史、亀井康富「骨格筋と脂肪組織にかかわる最近の話題」、『化学と生物』、日本農芸化学会 会誌、第 53 巻 1 号、5-6、2015

3) 吉村亮二、亀井康富「骨格筋とオートファジー」 内分泌・糖尿病・代謝内科 vol 40, 445-452, 2015

4) 畑澤幸乃、吉村亮二、亀井康富「骨格筋の形質を決定する分子メカニズムの解明：食肉の品質改良」、『食品加工技術』、日本食品・機械研究会、第 33 巻 3 号、29-36、2013

5) 吉村亮二、畑澤幸乃、亀井康富「骨格筋萎縮の分子メカニズム」、『BIOINDUSTRY』、シーエムシー出版、第 30 巻 10 号、4-8、2013

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://nutrition.life.kpu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井康富

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70300829