



教授
亀井康富

京都大学農学部食品工学科卒業、米国カリフォルニア大学、大阪バイオサイエンス研究所、国立健康・栄養研究所、東京医科歯科大学を経て 2011 年より現職

骨格筋機能を改善する食品由来成分の探索系確立のための 核内受容体・転写共役因子相互作用の研究

緒言

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う知見がある。一方、寝たきりや飢餓、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しする事は、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。

目的

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。我々は、FOXO1 が骨格筋萎縮を引き起こすことを示した（*J Biol Chem* 279:41114-23, 2004）。そして、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された。一方、核内受容体の転写共役因子 PPAR γ co-activator 1 α （PGC1 α ）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。我々は、PGC1 α 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 β 酸化）亢進を引き起こすことを見出した（*Proc Natl Acad Sci USA* 100:12378-83, 2003）。独自の予備検討結果から、FOXO1 と PGC1 α 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。研究テーマとしては、FOXO1 および PGC1 α を骨格筋アミノ酸代謝の主要制御因子と想定し、その分子機序を明らかにし、さらに、FOXO1 と PGC1 α が骨格筋量を調節する作用機序について検討を行うものである。すなわち、FOXO1 および PGC1 α の遺伝子改変マウス／培養筋細胞のアミノ酸代謝能の表現型解析（骨格筋内および全身での代謝産物変動の解

析)を行ない、特に筋分解時に産生されるグルタミンとアラニン、骨格筋で多く消費される BCAA に着目し、骨格筋を含む全身のアミノ酸代謝ネットワークにおける FOXO1 および PGC1 α の生理的機能を明らかにすることを旨とした。本研究では、特に、FOXO1 によるアミノ酸代謝の遺伝子発現調節機構に関する研究を行なった。具体的には、分子生物学的手法を用いて、骨格筋における FOXO1 の標的遺伝子(アミノ酸代謝関連酵素類)を同定・解析した。

研究方法

1. 実験動物

野生型マウスとして C57BL/6J マウスを使用した。骨格筋特異的 FoxO1 ノックアウトマウス(myogenin-cre, FoxO1 flox/flox)は北村教授(群馬大学)より供与された。コントロール群として flox/flox の同腹仔を使用した。

2. 遺伝子発現解析

細胞および組織からの Total RNA の抽出は、Trizol 1mL を使用した。cDNA の作製には QIAGEN Quanti test Reverse Transcription Kit を使用した。Fast SYBER Green Master Mix (Applied Biosystems) 5.0 μ L, primer forward (50 μ M) 0.1 μ L, primer reverse (50 μ M) 0.1 μ L cDNA(5.0ng/ μ L) 2.5 μ L 滅菌蒸留水 2.3 μ L の Total 10 μ L とした。Real-time PCR 反応は StepOnePlus (Applied Biosystems)を用いた。Internal control として 36B4 を使用した。

3. アミノ酸含有量解析

50mg 分取した組織にメタノール 0.6mL,滅菌蒸留水 0.24mL を加え遠心分離した。窒素ガスを用いて揮発させた後、沈殿物を滅菌蒸留水 0.2mL に溶解し、アミノ酸含有量の測定は SRL 社に依頼した。

4. Luciferase assay

C2C12 筋芽細胞を 12well plate に培養した。ルシフェラーゼプラスミド (pSP-GS) 0.8 μ g,及び発現プラスミドの pCAG-FOXO1(3A), pCAG-PGC1 α , empty pCAG (total 0.8 μ g), を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。internal control には phRL-TK 25ng (Promega)を使用した。トランスフェクションから 24 時間後、細胞を溶解し Dual Luciferase kit (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性(internal control) に対するホタルルシフェラーゼ活性の比により計算した。

5. ChIP assay(クロマチン免疫沈降法)

C2C12-pLXSN-FoxO1(3A)-ER 細胞にタモキシフェン 1 μ M を添加し 10 時間インキュベートした。対照として DMSO を使用した。細胞を 1%ホルムアルデヒド、37°C で 10 分間処置後、グリシン 625mM で 5 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、protease inhibitor 入りの SDS lysis buffer で細胞を回収した。ソニケーションを 30 秒間隔で 30 回、冷却しながら行った。ProG(Dynabeads ProteinG (invitrogen))に抗体を結合させるため、混合物を室温で 10 分置き、その後 4°C で 1 時間置いた。使用した抗体は FKHR(H-128)(sc-11350; SantaCruz Biotechnology)と Normal rabid IgG (sc-11350;SantaCruz)。2 μ g の抗体と 10 倍量の ChIP dilution buffer で溶解した Lysate 6 μ g を 4°C で 2 時間置き免疫沈降した。High salt wash buffer, low salt wash buffer, LiCl wash buffer, TE による洗浄後、1% SDS で溶出した。5M NaCl による脱クロスリンク、ProK、フェノール・クロロホルム抽出により DNA を精製した。ChIP DNA 量は定量的リアルタイム PCR により測定した。結果は Normal rabid IgG に対する ChIP DNA の比により算出した。

6. 頸静脈アンモニア投与実験

FoxO1-KO マウスおよび野生型同腹仔のマウスを頸静脈カニューレーションオペの 2 日後に 4 時間絶食を行

い、ペントバルビタール麻酔下で実施した。アンモニア負荷を実施(0, 50, 75, 100 μ mol/hr、各 80min、各前後に採血実施、control 群には生理食塩水を infusion した)。PocketChem BA PA-4140 (アークレイ社)を使用し全血から NH₃ を測定した。

研究結果

1. 絶食により FOXO1 mRNA の発現が顕著に誘導された。またグルタミン合成酵素(GS)の遺伝子発現が顕著に増加していた。分岐鎖アミノ酸代謝酵素(BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素の遺伝子発現はわずかに増加した。
2. FOXO1 マウスの骨格筋内のグルタミン含有量はコントロールマウスに比して有意に増加していた。さらに、骨格筋内で重要なアミノ酸代謝遺伝子の発現量を検討した。すると、分岐鎖アミノ酸代謝酵素(BCAT, BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素などの遺伝子発現は増加していなかったが、グルタミン合成酵素(GS)の遺伝子発現が顕著に増加していた。
3. TAM 処理により FOXO1 の標的遺伝子として既知である Gadd45 のみならず GS mRNA を増加させた。TAM の非存在下の FOXO1 (3A) 細胞、または空のベクター(モック)を安定的に発現させたコントロール C2C12 細胞では GS mRNA の発現の変化は観察されなかった。これらの結果により、筋細胞において FOXO1 を活性化により GS の発現がすることが示唆された。
4. GS 遺伝子を解析したところ FoxO1 が結合し得る配列 TTGTTTAC (以下、DBE (daf-16 family protein-binding element))を発見した。また、この DBE と DBE に類似した配列 FoxO1 DBE motif (AAACAA/TTGTTT)に対する FoxO1 の作用を *in vitro* で検討した。Luciferase assay 法を用いて FoxO1 による GS の転写促進作用を検討した。DBE の存在下で、FoxO1(3A) 用量依存的に GS プロモーターを転写活性化させた。GS 遺伝子の 5' プロモーターの遺伝子を欠損させたいくつかの欠損体では、転写活性化が抑制されなかった。一方、3' 側に存在する FoxO1 結合配列を欠損させたコンストラクトでは、転写活性化が抑制された。ChIP assay により GS 遺伝子の FoxO1 結合配列(DBE)特異的に FoxO1 が結合した。GS 遺伝子の exon 内やプロモーター領域には FoxO1 が結合することはなかった。GS 遺伝子での 3' UTR の重要性も報告されており、この結果より、3' 側に存在する FoxO1 結合配列が重要であることが示唆された。
5. FoxO1-KO マウスの頸静脈にアンモニアを投与したところ、FoxO1-KO マウスにおいて野生型と比較し血中アンモニア濃度が有意に増加した。すなわち、FoxO1-KO において欠損している GS が生体内でアンモニア除去の役割を果たしていると考えられる。

考察

FOXO1 が骨格筋で顕著に増加している飢餓状態においては、骨格筋は萎縮が生じ、構成タンパク質を分解し糖新生に利用される。グルタミンは、糖新生の基質として利用されると共に、アミノ酸分解時に生成されるアンモニアの除去にも役割を果たすことが知られる。すなわち FOXO1 によるグルタミン合成は生体の飢餓適応の一序である可能性がある。一方、FOXO1 は、骨格筋アミノ酸代謝に重要な分岐鎖アミノ酸代謝酵素(BCAT, BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素などの遺伝子発現は活性化せず、骨格筋アミノ酸代謝においての他の転写因子との役割分担があることが示唆される。本実験のさらなる進展により、FOXO1 および PGC1 α によって制御される異化・同化に関わる標的遺伝子の調節機序および関与する因子を明らかになり、その成果を利用して、核内受容体と転写共役因子(FOXO1 および PGC1 α)の複合体形成能を利用した骨格筋機能を改善する食品由来成分のスクリーニング系の確立が可能となることが期待される。