

博士論文

生活習慣病予防に向けた  
骨格筋代謝調節機構の分子基盤

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用生命化学専攻 食品生化学研究室

平成26年度 博士課程修了

佐々木 崇

指導教員 佐藤 隆一郎

## 目次

略語一覧	1
第一章 序論	4
第二章 骨格筋における LPL 発現調節機構の解析	22
2-1. 緒言	23
2-2. 実験材料及び手法	23
2-3. 実験結果	39
2-4. 考察	44
第三章 骨格筋における TGR5 発現調節機構の解析	60
3-1. 緒言	61
3-2. 実験材料及び手法	61
3-3. 実験結果	71
3-4. 考察	76
第四章 骨格筋における TGR5 の機能解析	100
4-1. 緒言	101
4-2. 実験材料及び手法	101
4-3. 実験結果	109
4-4. 考察	114
第五章 総合討論	137
引用文献	142
原著論文	158
要旨	159
謝辞	163

## 略語一覽

<b>4E-BP</b>	<b>eIF4E-binding protein</b>
<b>ACC</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase</b>
<b>Act. D</b>	<b>Actinomycin D</b>
<b>ADP</b>	<b>Adenosine diphosphate</b>
<b>AICAR</b>	<b>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</b>
<b>AMP</b>	<b>Adenosine monophosphate</b>
<b>AMPK</b>	<b>AMP-activated protein kinase</b>
<b>ARE</b>	<b>AU-rich element</b>
<b>ASK1</b>	<b>Apoptosis signal-regulating kinase 1</b>
<b>ATF</b>	<b>Activating transcription factor</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosine triphosphate</b>
<b>BAT</b>	<b>Brown adipose tissue</b>
<b>BiP</b>	<b>Immunoglobulin heavy chain-binding protein</b>
<b>BSA</b>	<b>Bovine serum albumin</b>
<b>CD36</b>	<b>Cluster of differentiation 36</b>
<b>CHOP</b>	<b>C/EBP-homologous protein</b>
<b>CIRP</b>	<b>Cold-inducible RNA binding protein</b>
<b>Com.C</b>	<b>Compound C</b>
<b>CPT1</b>	<b>Carnitine palmitoyltransferase 1</b>
<b>CREB</b>	<b>cAMP response element-binding protein</b>
<b>DG</b>	<b>Diacylglycerol</b>
<b>Dio2</b>	<b>Deiodinase, iodothyronine 2</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's modified eagle's medium</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimethyl sulfoxide</b>
<b>ERAD</b>	<b>ER-associated degradation</b>
<b>ERK</b>	<b>Extracellular signal-regulated kinase</b>
<b>ERSE</b>	<b>ER stress response element</b>
<b>FA</b>	<b>Fatty acid</b>
<b>FA-CoA</b>	<b>Fatty acyl-CoA</b>
<b>FAS</b>	<b>Fatty acid synthase</b>
<b>FATP</b>	<b>Fatty acid transporter protein</b>
<b>FBS</b>	<b>Fetal bovine serum</b>

<b>FGF</b>	<b>Fibroblast growth factor</b>
<b>FXR</b>	<b>Farnesoid X receptor</b>
<b>GAPDH</b>	<b>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</b>
<b>GFP</b>	<b>Green fluorescent protein</b>
<b>GLP-1</b>	<b>Glucagon-like peptide-1</b>
<b>GLUT4</b>	<b>Glucose transporter 4</b>
<b>GPCR</b>	<b>G protein-coupled receptor</b>
<b>HBSS</b>	<b>Hanks's balanced salt solution</b>
<b>HDAC</b>	<b>Histone Deacetylase</b>
<b>HEPES</b>	<b>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</b>
<b>HFD</b>	<b>High fat diet</b>
<b>HS</b>	<b>Horse serum</b>
<b>IGF</b>	<b>Insulin-like growth factor</b>
<b>IRE1</b>	<b>Inositol-requiring enzyme 1</b>
<b>IRS1</b>	<b>Insulin receptor substrate 1</b>
<b>ITT</b>	<b>Insulin tolerance test</b>
<b>JNK</b>	<b>C-jun N-terminal kinase</b>
<b>LDL</b>	<b>Low-density lipoprotein</b>
<b>LPL</b>	<b>Lipoprotein lipase</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolysaccharide</b>
<b>MCK</b>	<b>Muscle creatine kinase</b>
<b>Mef2</b>	<b>Myocyte enhancer factor-2</b>
<b>MEM</b>	<b>Minimum essential medium</b>
<b>MyoD</b>	<b>Myogenic determination factors</b>
<b>MyHC</b>	<b>Myosin heavy chain</b>
<b>mTOR</b>	<b>Mammalian target of rapamycin</b>
<b>NEFA</b>	<b>Non-esterified fatty acids</b>
<b>OGTT</b>	<b>Oral glucose tolerance test</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate-buffered saline</b>
<b>PDE</b>	<b>Phosphodiesterase</b>
<b>PERK</b>	<b>Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</b>
<b>PGC-1</b>	<b>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1</b>
<b>PI3K</b>	<b>Phosphoinositide 3-kinase</b>

<b>PIP2</b>	<b>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</b>
<b>PIP3</b>	<b>Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate</b>
<b>PKA</b>	<b>Protein kinase A</b>
<b>PPAR</b>	<b>Peroxisome proliferator-activated receptor</b>
<b>PPRE</b>	<b>PPAR response element</b>
<b>Rbm3</b>	<b>RNA-binding motif protein 3</b>
<b>S1P</b>	<b>Site-1 protease</b>
<b>S2P</b>	<b>Site-2 protease</b>
<b>S6K</b>	<b>S6 kinase</b>
<b>SCD1</b>	<b>Stearoyl-CoA desaturase</b>
<b>SDS</b>	<b>Sodium dodecyl sulfate</b>
<b>Sik1</b>	<b>Salt-inducible kinase 1</b>
<b>TG</b>	<b>Triacylglycerol</b>
<b>Tg</b>	<b>Transgenic</b>
<b>TLCA</b>	<b>Taurolithocholic acid</b>
<b>TRAF2</b>	<b>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2</b>
<b>TRE</b>	<b>TPA responsive element</b>
<b>UCP</b>	<b>Uncoupling protein</b>
<b>UPR</b>	<b>Unfolded protein response</b>
<b>UPRE</b>	<b>Unfolded protein response element</b>
<b>VLDL</b>	<b>Very low-density lipoprotein</b>
<b>WAT</b>	<b>White adipose tissue</b>
<b>WT</b>	<b>Wild type</b>
<b>XBP-1</b>	<b>X-box binding protein 1</b>
<b>ZT</b>	<b>Zeitgeber time</b>

# 第一章

## 序論

## 緒言

近年、肥満は先進国のみならず、発展途上国においても増加の一途をたどっている (1)。中でも過剰な内臓脂肪の蓄積によってもたらされる肥満症は、生体内でインスリンの効きが悪くなってしまう状態、すなわちインスリン抵抗性を惹起し、糖尿病、高血圧、脂質異常症と言った生活習慣病のリスクを高める事が知られている。このように内臓脂肪型の肥満を基盤とし、複数の生活習慣病が一個人に集積した状態をメタボリックシンドロームと呼び、心血管疾患の危険率を大幅に高める事が分かっている。我が国においてもメタボリックシンドロームは深刻な社会問題となっており、平成 19 年度の国民健康・栄養調査によると、40-74 歳の日本国民のうち、メタボリックシンドロームが強く疑われる者、あるいはその予備軍と考えられる者は、実に男性の 2 人に 1 人、女性の 5 人に 1 人に及んでいる。国民の健康寿命を延伸し、増大する医療費に歯止めをかけるためにも、効果的なメタボリックシンドロームおよび生活習慣病予防法の確立が急務となっている。

メタボリックシンドロームに伴う生活習慣病は、その名の通り生活習慣を見直す事で大部分が改善可能である。実際、治療の現場においては、食事療法と共に運動療法が第一選択のひとつとして採用される事が多く、運動が生活習慣病予防やインスリン抵抗性の改善に効果的である事はよく知られた事実となっている (2, 3)。したがって運動によりもたらされる代謝改善機構の分子レベルでの解析は、新たなメタボリックシンドロームおよび生活習慣病予防法の確立に直接貢献すると期待されている。また骨格筋はインスリン刺激による糖取り込みの約 80%を担う事が知られており、非運動時においても血糖コントロールに大きく貢献するため、糖尿病治療のターゲット臓器としても非常に魅力的である。そのため骨格筋を軸とした代謝改善機構の解明は、生活習慣病を標的とした薬剤や機能性食品などの開発に大きなインパクトを与えると予測される。

### ・骨格筋

骨格筋は、関節を挟むかたちで骨と骨とを繋ぎ、任意に収縮する事が可能な組織である。この他に類を見ない特性を持つ骨格筋は動物の運動に不可欠な器官であり、それゆえ骨格筋の障害は生活の質を著しく低下させる事になる。超

高齢化社会を迎えた我が国においては、運動器の障害による要介護の状態や要介護のリスクが高い状態（ロコモティブシンドローム）となる高齢者が多く、骨格筋を含む運動器の健康維持の重要性を啓発する動きが広まっている。一方、代謝と言う側面から俯瞰すると、骨格筋は人体において体重の約 40%を占める最大のエネルギー消費組織であり、糖、脂質代謝を担う最重要臓器のひとつでもある。したがって代謝異常を起点として発症する種々の生活習慣病を予防するにあたり、骨格筋は重要なターゲットになると考えられている。またメタボリックシンドローム発症の根幹をなす肥満症は、エネルギー摂取量とエネルギー消費量のインバランスにより惹起されるため、一定の筋量を維持する事はロコモティブシンドロームの予防のみならずメタボリックシンドロームの予防にも効果的である。

### ・インスリンシグナル

インスリンは膵臓ランゲルハンス島  $\beta$  細胞から分泌される、分子量約 58 kDa のペプチドホルモンであり、血糖値の恒常性維持に重要な役割を担っている。食後の血糖値上昇に伴い分泌されるインスリンは、肝臓や脂肪組織、骨格筋などに発現するインスリン受容体を介してエネルギー代謝調節を行う。インスリンは細胞表面に存在するインスリン受容体  $\alpha$  サブユニットに結合すると、チロシン残基の自己リン酸化を誘導し、それに伴い活性化する (4)。活性型となったインスリン受容体は IRS1 (insulin receptor substrate) のチロシン残基をリン酸化し、更に PI3K がリン酸化 IRS1 に結合する事で活性化する (5)。PI3K (phosphoinositide 3-kinase) は脂質リン酸化酵素であり、PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) から PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate) を産生する (6)。PDK1 と Akt は共に PIP3 結合ドメインを持つため、PI3K の活性化に伴い増加した PIP3 は両者を細胞膜近傍に引き寄せ、会合させる事で Akt のリン酸化を引き起こす。これにより活性化した Akt は Glut4 (glucose transporter 4) の細胞膜へのトランスロケーションを誘導して糖取り込みを増加させる (7)。また Akt は mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex I) を活性化し、下流の S6K (S6 kinase) や 4E-BP (eIF4E-binding protein) を介してタンパク質合成を促進する事も知られている (8)。一方で S6K は IRS1 のセリン残基をリン酸化する事でインスリンシグナルを遮断する事が示されており、インスリンシグナルのネガティブフィードバック因子としても注目されている。実際、S6K を欠損したマウ



スはインスリン感受性が増大し、高脂肪食により誘導される肥満やインスリン抵抗性が抑制される事が報告されている (9)。肥満により誘導されるインスリン抵抗性は生活習慣病発症の根幹をなす病態であるため、その予防法の確立が強く望まれてきた。そういった中で、S6K の抑制を介したインスリン感受性改善作用は注目に値するものである (Fig.1-1)。

## ・運動を介した代謝改善効果の分子メカニズム

### AMPK と骨格筋代謝

運動は糖、脂質代謝を中心に、全身の代謝改善に大きく寄与する事が知られている。運動時には、直接の作用点である筋細胞において様々な代謝変動が引き起こされるが、その調節因子として中心的な役割を担うのが、AMPK (AMP-activated protein kinase) と呼ばれるエネルギーセンサータンパク質である。AMPK は真核生物間でよく保存されたセリン・スレオニンキナーゼであり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットからなる三量体を形成している (10-13)。AMPK は $\gamma$ サブユニットに ATP や AMP が結合するサイトが存在しており、ここに AMP が結合する事で $\alpha$ サブユニットがリン酸化され、活性化する (14)。また同時に、 $\gamma$ サブユニットへの AMP の結合は、 $\alpha$ サブユニットの脱リン酸化を抑制する (15)。したがって AMPK は AMP/ATP 比の上昇、すなわち細胞内のエネルギー枯渇を感知して活性化するエネルギーセンサーとしての役割を果たしており、骨格筋においては運動後に強く活性誘導される事が知られている (16,17)。

活性化された AMPK はエネルギー枯渇状態から回復するべく、様々な代謝調節を行う。AMPK 活性化剤 AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) を投与したラットの骨格筋ではグルコーストランスポーター Glut4 の発現上昇や、細胞膜上への Glut4 のトランスロケーションが誘導され、細胞内への糖取り込みを促進する事が明らかにされており (18, 19)、これらは同じく糖取り込みを促進するインスリンシグナルとは独立した経路である事が分かっている (20, 21)。そのため AMPK は血糖値のコントロールに重要な役割を担うと考えられており、糖尿病治療薬メトフォルミンの効果の一部は AMPK の活性化によるものとされている (22)。また AMPK は糖代謝のみならず脂質代謝にも大きく影響を与える。AMPK は骨格筋において ACC2 (acetyl-CoA carboxylase II) をリン酸化し、その活性を抑制する事が知られており、これにより細胞内 Malonyl-CoA 濃度が減少し、CPT1 (carnitine palmitoyltransferase I) を介したミトコンドリアへの脂肪酸輸

送を促進する (23)。更に AMPK は PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) の発現亢進や活性化を誘導する事でミトコンドリアの生合成を促し、脂肪酸の  $\beta$  酸化を亢進すると考えられている (24-26)。近年は AMPK を介したオートファジーの調節も多数報告されており、これまで考えられていた以上に多面的にエネルギー産生に関わる事が示されている (27, 28)。

### 運動による脂質代謝改善と LPL

LPL (lipoprotein lipase) は細胞表面に係留された形で存在するリパーゼであり、血中のカイロミクロンや VLDL (very low-density lipoprotein) に含まれる中性脂肪を加水分解し、脂肪酸を遊離させる働きを持つ。骨格筋は LPL を高発現する組織の 1 つであり、骨格筋が CD36 などの脂肪酸トランスポーターを介して細胞内に脂肪酸を取り込む際に、LPL による血中中性脂肪の分解が重要な役割を担う事がよく知られている。全身の脂質代謝における骨格筋 LPL の重要性は骨格筋特異的 LPL ノックアウトマウスの解析から明らかにされており、当該マウスにおいては肝臓や脂肪組織でインスリン抵抗性を発症するとともに、食事誘発性の肥満を悪化させる事が報告されている (29)。また近年、糖尿病になりやすい家系のヒトでは、そうでないヒトと比べて骨格筋 LPL 発現量が半分以下に低下している事が報告され、骨格筋における LPL の発現量が生活習慣病と密接なつながりを持つ事が示されている (30)。したがって生活習慣病を予防するにあたり、骨格筋 LPL 発現量を上昇させる事が重要な戦略の 1 つになると考えられる。

骨格筋と並んで LPL を高発現する脂肪組織においては、その発現調節機構についてよく研究が進んでいる。LPL 遺伝子の上流には PPRE (PPAR response element) が存在し、そこに脂肪組織に高発現する核内受容体 PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) が結合する事で LPL 発現が正に調節される事が分かっている (31)。一方、骨格筋では運動後に LPL 発現が一過的に上昇する事が報告されており、この LPL の活性化が運動による脂質代謝改善作用と強く相関する事が大規模な疫学調査からも明らかになっている (32, 33)。培養骨格筋細胞においては AMPK の活性化により LPL 発現が亢進する事が明らかにされているため、これが運動による LPL 発現上昇を説明するものと予測されているが、その分子メカニズムの詳細は明らかになっていない (34, 35)。新たなメタボリックシンドロームおよび生活習慣病予防法確立に向け、骨格筋における

LPL 発現調節機構の解明が強く望まれている。

### ・核内受容体 PPAR ファミリーによる代謝調節

PPARは核内受容体の1つであり、DNA上のPPREと呼ばれるAGGTCA n AGGTCAの6塩基ダイレクトトリピート配列に結合する。PPARはこれまでに $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の3つのサブタイプが報告されており、それぞれ発現部位や機能が異なる。

#### PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$ は、肝臓、心筋などに比較的多く発現している (36, 37)。脂質異常症治療薬であるフィブラート系薬剤はPPAR $\alpha$ のアゴニストであり、肝臓におけるリポプロテイン代謝や脂質合成、 $\beta$ 酸化関連遺伝子の発現を調節する事で血中脂質低下作用を示すと考えられている (38)。

#### PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$ をコードする遺伝子PPARGは2つの異なる転写開始点を持ち、そのため $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ の2つのアイソフォームが存在する。PPAR $\gamma$ の内因性リガンドとしては、脂肪酸、15d-PGJ<sub>2</sub> (15-deoxy- $\Delta^{12, 14}$  prostaglandin J<sub>2</sub>)、酸化LDL (low-density lipoprotein) 中に含まれるhydroxyocta-decadienoic acid (9-HODE、13-HODE) などが知られている (39-41)。PPAR $\gamma 2$ は脂肪細胞に非常に強く発現しており、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであると考えられている (36, 42)。一方PPAR $\gamma 1$ は脂肪組織だけでなく、インスリンの主要標的器官である肝臓や骨格筋などにも発現している。しかしPPAR $\gamma$ の骨格筋における発現量は脂肪組織での発現量に比べると非常に少なく、脂肪組織の5-10%程度とされている (36, 43)。発現量こそ低いですが、骨格筋特異的にPPAR $\gamma$ をノックアウトしたマウスではインスリン抵抗性を惹起する事が報告されており、さらにこのノックアウトマウスにおいては、糖尿病治療薬でありPPAR $\gamma$ のアゴニストとして知られるチアゾリジン系薬剤の投与によってもインスリン抵抗性は改善しないため、骨格筋においてPPAR $\gamma$ は、インスリン感受性に対して重要な作用を持つ事が示唆されている (44)。

しかし骨格筋におけるPPAR $\gamma$ についての研究は少なく、PPAR $\gamma$ 発現調節メカニズムやその機能についての詳細はほとんど分かっていない。

## PPAR $\delta$

PPAR $\delta$ は他のサブタイプに比べて、全身に広く発現している (36)。そのため機能の特定が難しく、PPARファミリーの中で最も研究が遅れていた。現在では、PPAR $\delta$ は骨格筋において脂質代謝を亢進する事や、筋リモデリングを誘導し、赤筋を増加させる事が知られている (45, 46)。近年では、骨格筋においてAMPKとPPAR $\delta$ の共活性化により、運動を模倣した作用が得られるとの報告も有り、メタボリックシンドロームの予防・治療のターゲットとして注目を集めている (47)。

## ・ G タンパク質共役型受容体

GPCR (G protein-coupled receptor) は7回膜貫通型の構造を持つ細胞膜局在タンパク質であり、ペプチドホルモンや低分子化合物、あるいは光刺激などの細胞外シグナルを受容し、細胞内に伝達するタンパク質である。ヒトでは既に800種類以上のGPCRが同定されており、記憶や学習、エネルギー代謝調節、炎症反応など多彩な生命現象に関与する事が知られている。現在使用されている治療薬の半数以上がGPCRを標的としていると考えられており、創薬のターゲットとして重要な役割を担っている。2012年のノーベル化学賞がGPCRの構造や機能に関する研究に対して授与された事も記憶に新しく、GPCRの注目度の高さを伺い知る事が出来る。

## GPCRによるシグナル伝達

GPCRはその名の通りGタンパク質と共役する性質を持ち、Gタンパク質を介してシグナル伝達を行う受容体である。Gタンパク質は不活性化時にはヘテロ三量体を形成しており、GPCRに結合する事で活性化する。リガンド非結合時のGPCRは細胞膜上で緊縮したコンフォメーションを形成しているため、ヘテロ三量体Gタンパク質がGPCRに結合する事が出来ないが、アゴニストが結合する事で構造が変化し、その変化が細胞内ループに伝わる事でヘテロ三量体Gタンパク質がGPCRに結合可能となる。これによりGタンパク質 $\alpha$ サブユニット ( $G\alpha$ ) と結合していたGDPがGTPへと変換され、Gタンパク質が活性化する。その結果、三量体を形成していたGタンパク質はGPCRから離れ、 $G\alpha$ 、及び $G\beta\gamma$ 二量体に解離する事で、それぞれがエフェクターに作用し様々な生理機

能をもたらす (48,49) (Fig.1-2)。

GPCR の種類によって共役する G タンパク質は異なり、G $\alpha$  サブユニットはその機能から 4 種類に大別される。それぞれの機能の概要を以下の表にまとめる。

	機能	共役する GPCR の例
G $_{\alpha s}$	細胞膜上のアデニル酸シクラーゼを活性化し、セカンドメッセンジャーである cAMP (cyclic-AMP) 合成を促進する。	ヒスタミン H2 受容体 プロスタグランジン受容体
G $_{\alpha i}$	アデニル酸シクラーゼ活性を抑制し cAMP 合成を抑制する。	オピオイド受容体 アデノシン P1A1 受容体
G $_{\alpha q}$	ホスホリパーゼ C $\beta$ を活性化する。	タキキニン受容体
G $_{12/13}$	低分子量 G タンパク質 Ras や Rho を活性化する。	P2Y5

一方で、G $\beta\gamma$  二量体の機能は G $\alpha$  サブユニットに比べて明確には分かっていない。哺乳類ではこれまで G $\beta$  サブユニットで 5 種類、そして G $\gamma$  サブユニットで 12 種類のアイソフォームが確認されているため、その組み合わせの多様性によりシグナルが複雑化している事が、解析を困難にしている原因のひとつと考えられている (50)。

#### 骨格筋における cAMP シグナルと GPCR

cAMP は現在最も研究が進んでいる細胞内シグナル分子の 1 つである。骨格筋における cAMP 濃度は GPCR による制御を受けており、 $\beta$ -アドレナリン受容体、Frizzled7 受容体、IL-6 (interleukin-6) 受容体、アデノシン受容体などが筋細胞内 cAMP 濃度を増加させる GPCR として知られている。これらの受容体は G $_{\alpha s}$  サブユニットと共役しており、リガンドが結合する事でアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP 産生を促している (51)。

骨格筋における cAMP の最も主要なエフェクターは PKA (protein kinase A) と呼ばれるセリン/スレオニンキナーゼである。PKA は 1960 年代に cAMP により活性化される因子としてウサギの骨格筋から発見された (52)。これまでに PKA がリン酸化を触媒するタンパク質は多数報告されており、グリコーゲン合成酵素 (53)、イオンチャネル (54, 55)、転写因子 CREB (cAMP response element-binding

protein) (56) などが挙げられる。

### GPCR と筋肥大

Gas 共役型の GPCR は、その活性化により骨格筋の肥大化を誘導する事がよく知られている (57-62)。GPCR による筋肥大に関しては、タンパク質の合成促進と分解抑制がその一端を担うと考えられており (63-66)、筋細胞において cAMP 分解酵素 PDE (phosphodiesterase) の活性を阻害した場合や cAMP アナログを投与した際も同様に骨格筋の肥大化が確認される事から (67-69)、GPCR-cAMP 経路が筋肥大に重要な役割を担うと予測されている。これは Gas ノックアウトマウスでは筋線維の萎縮が誘導されるという報告とも矛盾しない (70)。

現在、骨格筋の肥大化に関わるシグナル経路として注目されているのが Akt-mTORC1 経路である。このシグナル経路はインスリンや IGF-1 (insulin-like growth factor-1) などにより GPCR 非依存的に活性化する事が知られており、骨格筋特異的に IGF-1 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは骨格筋の肥大化が誘導される (71)。IGF-1 は骨格筋細胞表面に存在する受容体型チロシンキナーゼ IGFR と結合すると、インスリンシグナルと類似した機構で Akt-mTORC1 経路を活性化し、タンパク質合成を促進する事が明らかとなっている (72)。IGF-1 誘導性の筋肥大が mTORC1 阻害剤である Rapamycin 存在下では大きく抑制される事からも、IGF-1 による筋肥大は Akt-mTORC1 経路によるタンパク質合成亢進が重要である事が示されている (73, 74)。これまで、骨格筋に発現する Gas 共役型 GPCR である  $\beta$ -アドレナリン受容体や Frizzled7 受容体のアゴニストを投与したマウスでも Akt-mTORC1 経路を介した骨格筋の肥大化が確認されている (75-77)。しかしこれらの GPCR がどのような機構で Akt-mTORC1 経路を活性化しているかに関しては不明な点が多く、cAMP シグナルや G $\beta$ G $\gamma$  二量体の関与が示唆されるものの統一的な見解は得られていない (78)。

一方で、PKA により活性化される転写因子 CREB が、筋形成に関与する事も明らかにされている。筋細胞において PKA により活性化された CREB は、ターゲット遺伝子である Sik1 (salt-inducible kinase I) の発現を転写レベルで亢進すると同時に、PKA は Sik1 タンパク質をリン酸化する事で安定化し、細胞内 Sik1 タンパク質量の増大を促す。その後 Sik1 は Class II HDACs (histone Deacetylase) をリン酸化する事で、その活性を抑制する。Class II HDACs は筋分化を担う転写

因子のひとつである Mef2 (myocyte enhancer factor-II) と結合し、Mef2 を不活性化しているが、Sik1 によりリン酸化を受けた Class II HDACs は Mef2 と解離し、活性化した Mef2 は筋形成を亢進する (79, 80)。骨格筋特異的にドミナントネガティブフォームの CREB を発現したマウスでは筋ジストロフィー様の症状を呈し骨格筋が萎縮するが、Sik1 を過剰発現する事で筋萎縮が抑制される事からも、PKA-CREB-Sik1 経路が骨格筋量の維持に重要である事が示されており (79)、GPCR を介した筋肥大の一端を担う事が予測される。

#### 胆汁酸をリガンドとする GPCR: TGR5

胆汁酸は肝臓においてコレステロールから合成される両親媒性の分子であり、摂食刺激に応じて胆嚢から消化管に排出され、脂質や脂溶性ビタミンを可溶化する事でこれらの吸収を助ける。胆嚢から排出された胆汁酸の約95%は小腸下部より再吸収され、門脈を経由し再び肝臓に戻る。これを腸肝循環と呼ぶ。この時一部の胆汁酸は肝臓での取り込みを免れ、体循環に乗る。それゆえ、食後は血中胆汁酸濃度が高まる事が知られており、ヒトでは $\mu\text{M}$ オーダーでその濃度が推移する (81)。

1999 年、核内受容体 FXR (Farnesoid X receptor) が生理的濃度の胆汁酸により活性化される事が発見され、胆汁酸が消化吸収に関与するだけでなく、シグナル分子としても機能する事が明らかとなった (82)。さらに 2002 年には TGR5 (Gpbar1/M-Bar) が胆汁酸をリガンドとする GPCR として同定され、胆汁酸がこれらの因子を介し、実に様々な生理現象に関わる事が明らかになっている (83)。

TGR5 は肝臓、小腸、褐色脂肪細胞、骨格筋などに広く発現しており、リガンド結合により G $\alpha$ s を介して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる働きを持つ (84, 85)。現在までに TGR5 は抗肥満、抗糖尿病効果を持つ事が報告されているが、その作用点は大きく 2 つに分類される。まず 1 つが、GLP-1 (glucagon-like peptide-I) を介した糖代謝の調節である。GLP-1 は小腸から分泌されるインクレチンのひとつであり、膵  $\beta$  細胞の保護や、血糖依存的なインスリン分泌の促進などにより糖代謝を改善する事が知られる (86)。TGR5 の合成アゴニストを投与したマウスでは、高脂肪食負荷に伴う耐糖能異常が改善される事が明らかになっており、この作用の一部は小腸に発現する TGR5 が活性化される事で GLP-1 の分泌を亢進するためだと考えられている (87)。TGR5 による代謝改善効果を説明す

るもう1つの経路は、Dio2 (deiodinase, iodothyronine II) を介した褐色脂肪組織や骨格筋におけるエネルギー消費、すなわち熱産生の亢進である。Dio2 は不活性型のサイロキシンを活性型のトリヨードサイロニンに変換する酵素であり、トリヨードサイロニンはサイロイドホルモン受容体と結合し、熱産生に関わるPGC-1 $\alpha$  や UCP-1 (uncoupling protein-I) と言った遺伝子の発現量を上昇させることでエネルギー消費を促す事が知られている (88)。Dio2 はアドレナリン受容体の活性化と、それに伴う cAMP の濃度上昇により発現が増加するが (89)、TGR5 も同様に Dio2 発現を上昇させる事が報告されている (90)。実際、高脂肪食投与により肥満を誘導したマウスに TGR5 のリガンドとなる胆汁酸を与えると、褐色脂肪組織において Dio2 の発現上昇が確認され、高脂肪食負荷による肥満やインスリン抵抗性が改善する。一方 Dio2 ノックアウトマウスでは、胆汁酸投与によるこれらの効果は見られなくなっていた。マウスでは骨格筋において Dio2 発現が低く、褐色脂肪組織に Dio2 が比較的多く発現しているため、TGR5-cAMP-Dio2 経路による熱産生遺伝子の発現上昇は主に褐色脂肪組織が担うとされているが、ヒトでは Dio2 発現が骨格筋でも認められる事から、TGR5 を介したエネルギー消費亢進作用は主に骨格筋が担うと予想されている (90) (Fig.1-3)。

当研究室でも TGR5 活性化能を持つ食品成分として柑橘成分ノミリンを見出しており、高脂肪食によって誘導される肥満や耐糖能異常を改善する事を既に報告している (91)。TGR5 はメタボリックシンドロームや生活習慣病を予防する上で重要なターゲットとなると考えられており、今後の更なる研究が期待される。

### ・小胞体ストレス

小胞体は全ての真核生物に認められる細胞内小器官であり、細胞内で合成された膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体で適切な形に折りたたまれる事で正常な機能を果たす事が可能となる。しかし何らかの原因でタンパク質の折りたたみに異常が生じた場合、小胞体内には異常タンパク質が蓄積する事となり、小胞体には小胞体ストレスと呼ばれる負荷が生じる (92)。小胞体はこのストレスを感知すると、小胞体ストレス応答 / UPR (unfolded protein response) を活性化し、以下の3つの方法により小胞体ストレスの緩和に努める。①異常タンパク質の更なる蓄積を避けるべく、タンパク質の翻訳を抑制する。②タンパク質



の正常な折りたたみを助ける分子シャペロンやフォールディング酵素の発現を転写レベルで誘導し、フォールディング容量を増加させる。③小胞体内に蓄積した異常タンパク質を細胞質に輸送し、ユビキチン・プロテアソーム系により分解する。この反応は、小胞体関連タンパク質分解機構（ER-associated degradation; ERAD）と呼ばれる。しかし、以上 3 つの応答によっても回避する事が出来ないほどの強い小胞体ストレスが生じた場合、アポトーシス様の細胞死が惹起される事になる (93)。

### UPR の分子メカニズム

代表的な小胞体ストレスセンサーとして、小胞体膜タンパク質 ATF6(activating transcription factor 6)、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1)、PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) が挙げられる。これらの因子は通常状態では BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein) と結合する事で不活化されているが、小胞体ストレスが生じると BiP が解離し、活性化する (94)。

ATF6 は小胞体膜結合性転写因子である。小胞体ストレスが生じると小胞体からゴルジ体に輸送され、S1P (site-1 protease) および S2P (site-2 protease) による二段階の切断を介し活性型の ATF6 (N) となる (95)。ATF6 には異なる遺伝子から合成される ATF6 $\alpha$  と ATF6 $\beta$  が存在する (96)。プロセッシングにより活性化を受けた ATF6 $\alpha$  (N) はホモダイマーを形成し、更に基本転写因子 NF-Y と相互作用する事で ERSE 配列 (ER stress response element ; 5'-CCAAT N9 CCACG) に結合し (97)、転写レベルで小胞体シャペロンや ERAD 関連因子、また後述する XBP-1 (x-box binding protein 1) の発現を促す (98, 99)。一方 ATF6 $\beta$  は ATF6 $\alpha$  と DNA 結合ドメインがよく保存されているため標的遺伝子に大きな差はないと予測されるが、ATF6 $\alpha$  および  $\beta$  ノックアウトマウスから得られた MEF (mouse embryonic fibroblast) を比較すると、ATF6 $\alpha$  ノックアウト MEF では小胞体ストレスに対する応答が減弱するが、ATF6 $\beta$  ノックアウト MEF では大きな差が見られない事などから、ATF6 $\beta$  の転写活性化能は ATF6 $\alpha$  に比べて低いと考えられている (100)。しかし ATF6 $\alpha$ 、 $\beta$  をそれぞれシングルノックアウトしても通常飼育下で目立ったフェノタイプは見られないが、ダブルノックアウトしたマウスおよびメダカでは胎生致死になる事から、ATF6 $\beta$  も何らかの形で ATF6 $\alpha$  の機能を代償している可能性が有る (100, 101)。

IRE1 は RNase 活性を持つキナーゼであり、小胞体ストレスにより活性化した IRE1 は XBP-1 (X-box binding protein I) mRNA を基質として特異的なスプライ

シングを引き起こす。スプライシングを受ける前の XBP-1 mRNA には 26 bp のイントロンが残存しているため、翻訳の際に読み枠がずれ、転写活性が無い不活性型 XBP-1 しか発現できないが、IRE1 を介したスプライシングによって転写活性を持つ XBP-1 が発現可能となる (99, 102)。活性型の XBP-1 はホモダイマーを形成して UPR (unfolded protein response element; TGACGTGG/A) に結合し、ERAD 関連遺伝子の発現を誘導するほか、ATF6 $\alpha$  とヘテロダイマーを形成し、NF-Y と複合体を形成する事で ERSE にも結合し、転写を活性化する (99, 103, 104)。また IRE1 は TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) を介して ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) を活性化し、これにより JNK (c-jun N-terminal kinase) 経路を活性化する事でアポトーシスの誘導にも寄与する事が知られている (105)。

PERK もまた小胞体膜に存在するキナーゼであり、翻訳開始因子である eIF2 $\alpha$  をリン酸化する事でタンパク質の翻訳を広く抑制し、小胞体への負荷を軽減する働きを担う (106)。一方でリン酸化 eIF2 $\alpha$  は転写因子 ATF4 の翻訳を特異的に亢進し、タンパク質合成や代謝に関わる様々な遺伝子や、アポトーシスの誘導を担う転写因子 CHOP (C/EBP-homologous protein) などの発現を増加させる (107, 108) (Fig.1-4)。

### 骨格筋における UPR

生体において過度な ER ストレスは代謝異常を誘導し、肥満や二型糖尿病の原因となる事が知られており、主に肝臓や膵臓において分子レベルでの解析が進んでいる (109)。しかし、骨格筋に関しては UPR と代謝異常をつなぐ研究はやや遅れている。近年、マウスに長期的に高脂肪食を与えると骨格筋において UPR が活性化する事が報告され、これにより mTORC1 経路の抑制を介した筋萎縮が誘導されると予測されている (110, 111)。しかし多くのデータが培養骨格筋細胞を用いた実験であり、生体における重要性は明らかになっていない。また筋細胞に飽和脂肪酸の一種であるパルミチン酸を投与する事で UPR が生じ、インスリン抵抗性を惹起する事が報告されたが (112)、高脂肪食を 6 週間摂取したヒトでは肥満やインスリン抵抗性を惹起するにも関わらず UPR の活性化が確認できなかった事から (113)、生体においてメタボリックシンドロームや生活習慣病と言った病態に骨格筋 UPR が関与するかは不明である。

一方、運動後の骨格筋においても一過的に UPR が活性化する事が、ヒトおよびマウスで報告されている (114, 115)。一般に生体に生じる慢性的な小胞体スト

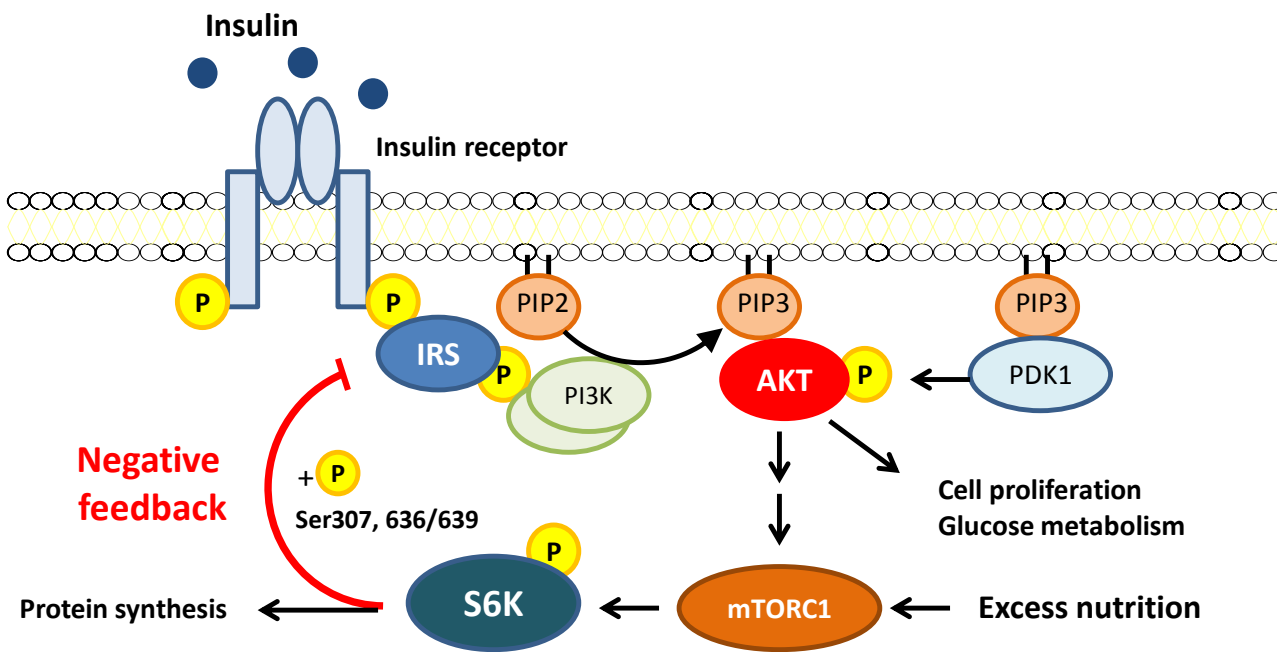
レスは代謝疾患の原因になると考えられているが、運動後の骨格筋に生じる一過的なUPRは運動への適応に貢献するとされている。実際、ATF6 $\alpha$ を欠損するマウスは正常なUPRが起こらないため、運動による筋損傷からの回復が遅く、筋障害マーカーである血中クレアチンキナーゼ活性の値が上昇し、骨格筋における炎症関連遺伝子の発現上昇が確認される(115)。

骨格筋におけるUPRの役割については不明な点が多いが、分子レベルでこれを理解する事により、メタボリックシンドロームおよび生活習慣病の発症メカニズムや運動の代謝改善効果に関する有益な知見が得られると期待されている。

### ・本研究の目的

骨格筋は人体で最大の糖、脂質代謝組織であり、生活習慣病を含む種々の代謝疾患に及ぼす影響は極めて大きい。したがって骨格筋代謝調節機構を分子レベルで理解する事は、国民の生活の質を向上させ、健康寿命を延伸する上で重要な課題であるが、骨格筋を介した代謝改善メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、生活習慣病予防に向けた骨格筋代謝改善機構の分子基盤を確立するべく、運動による脂質代謝改善作用において重要な役割を担うLPLの骨格筋における発現調節機構の解明、および抗肥満、抗糖尿病作用を持つ機能分子TGR5の骨格筋における役割の解明を目指した。



**Fig.1-1 インスリンシグナルとS6Kによるネガティブフィードバック機構**

インスリンはインスリン受容体に結合した後、IRS1のチロシン残基のリン酸化を介して下流にシグナルを伝える。AktはmTORC1-S6K経路を活性化し、S6KはIRS-1のセリン残基をリン酸化する事でインスリンシグナルを抑制する。

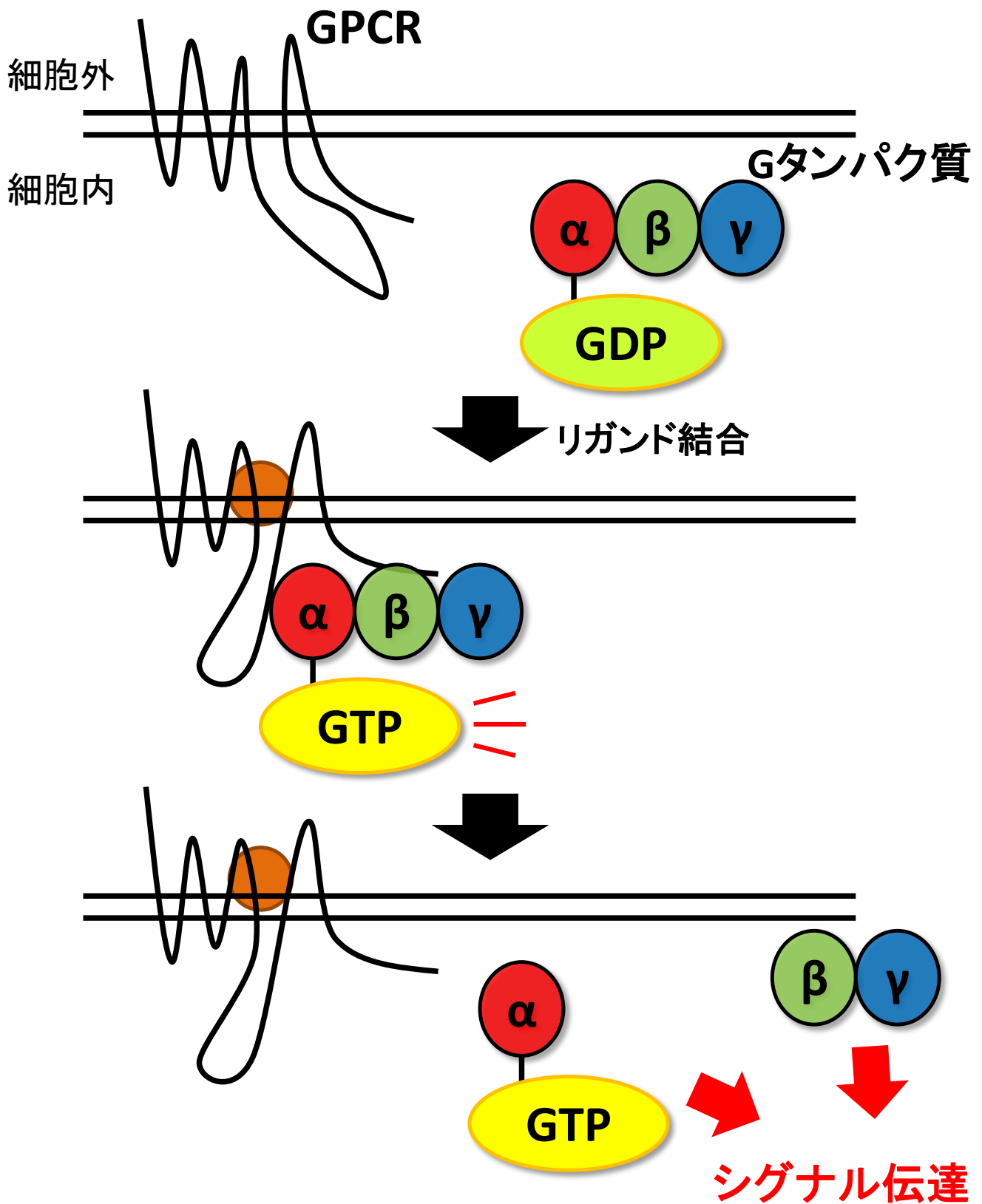
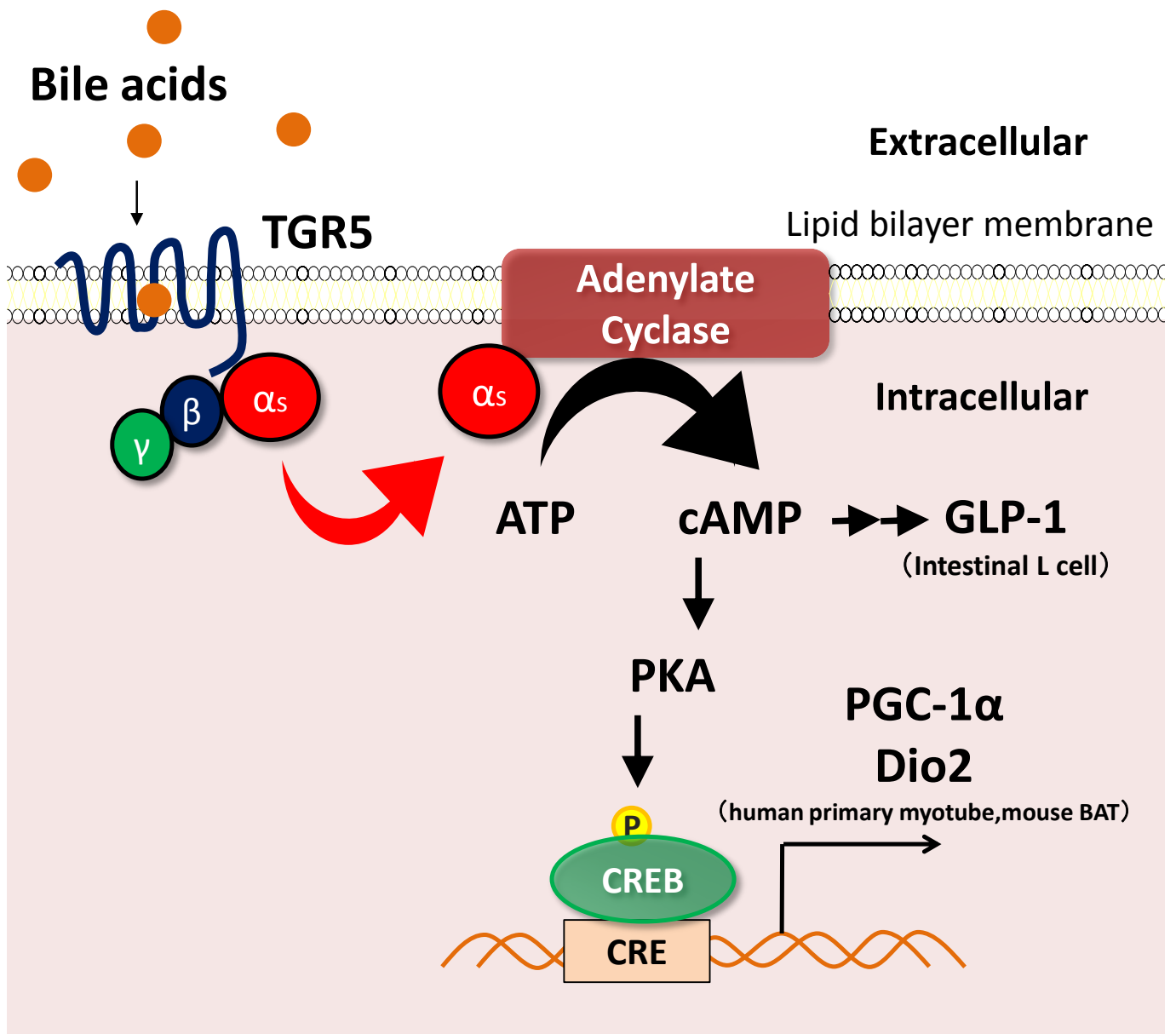


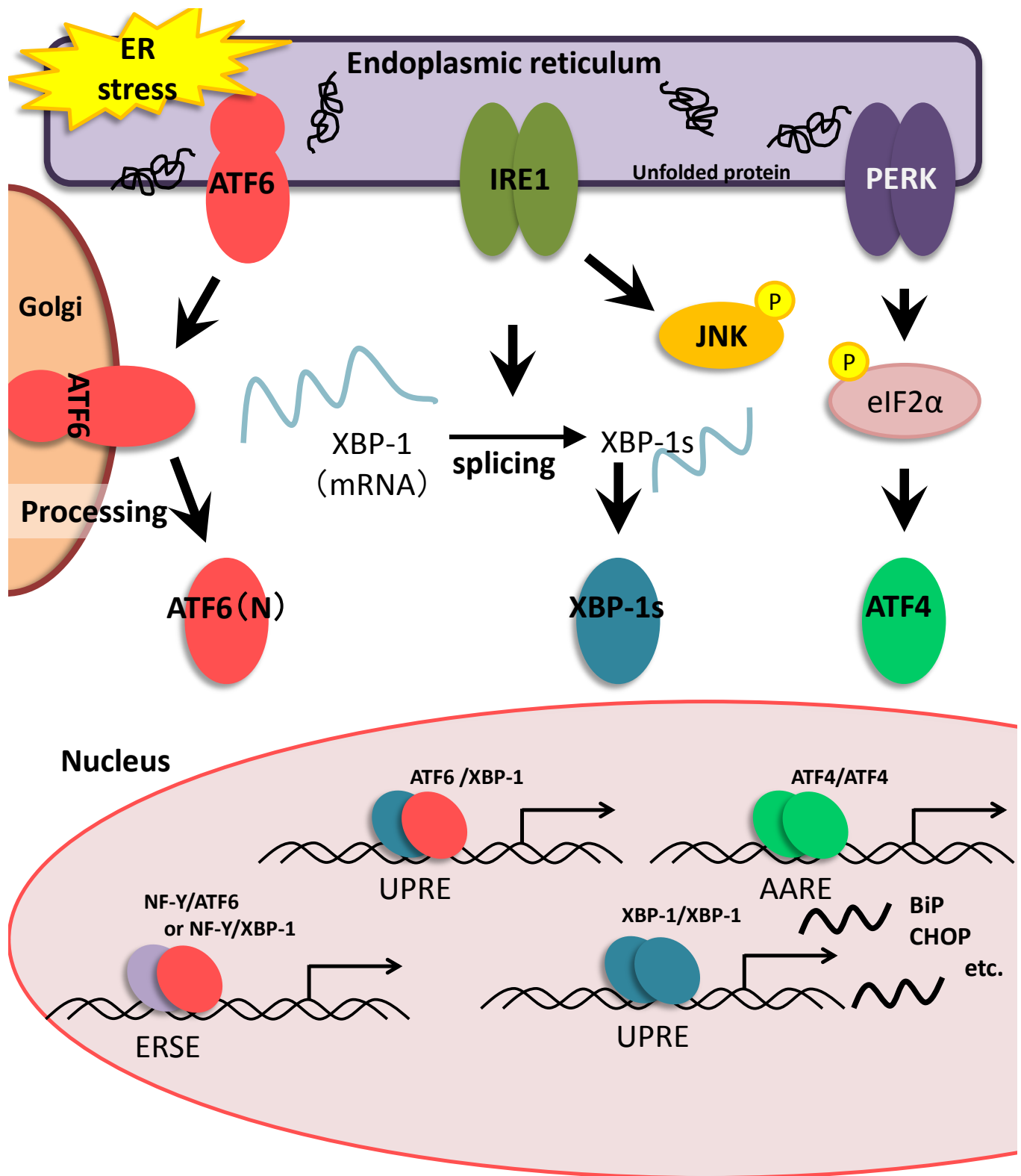
Fig.1-2 GPCRの活性化機構概略図

リガンドの結合により、GPCRにGタンパク質が結合し、活性化する。



**Fig.1-3 TGR5による代謝改善機構の分子メカニズム**

TGR5は、小腸L細胞においてはGLP-1分泌亢進、マウス褐色脂肪組織やヒト骨格筋においてはPGC-1αや熱産生遺伝子Dio2の発現亢進を介して抗肥満効果を発揮すると考えられている。



**Fig.1-4 UPRの主要経路概略図**

UPRは主にATF6、IRE1、PERKの3経路で構成される。それぞれの経路の下流で活性化する転写因子ATF6(N)、XBP-1s、ATF4はERSEやUPRE、AAREと言ったDNA上の配列に結合する事で遺伝子発現調節を行う。

## 第二章

### 骨格筋における LPL 発現調節機構の解析



## 2-1. 緒言

LPL は主に骨格筋や脂肪組織に発現するリパーゼであり、キロミクロンや VLDL 中に含まれるトリグリセリドを加水分解し、細胞内への脂肪酸取り込みに寄与する。骨格筋 LPL は運動刺激により発現亢進する事が分かっており、これが運動による代謝改善効果の一端を担うものと推測されているが、骨格筋 LPL がどのようなメカニズムで発現調節されるのかは不明である。そこで本章では、骨格筋における LPL 発現調節機構を明らかにするべく研究を進めた。

## 2-2. 実験材料および手法

### 実験材料

#### ・細胞培養試薬および細胞投与試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM) は High Glucose、Low Glucose 共に Wako より購入した。Penicillin-Streptomycin (P/St) 溶液は (株) 明治より購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) は Benchmark より購入した。ウマ血清 (Horse serum; HS) は、Equitech-Bio Inc. より購入した。トリプシン粉末は Difco より購入した。5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) は Wako より購入した。Compound.C (Com.C) は Calbiochem より購入した。メトフォルミン粉末は SIGMA より購入した。Actinomycin D は SIGMA より購入した。ポリブレン (hexadimethrine bromide)、forskolin は SIGMA から購入した。

その他、特に指定の無い試薬に関しては、Wako、ナカライテスク、SIGMA の特級、生化学実験用のものを用いた。

#### ・抗体

抗 actin 抗体 (1: 5000) は Chemicon より購入した。抗 AMPK $\alpha$  抗体 (1: 1000)、抗 Phospho-AMPK $\alpha$  (Thr 172) 抗体 (1: 1000)、抗 Lamin 抗体 (1: 1000)、抗 HuR 抗体 (1: 1000) は cell signaling より購入した。抗 PPAR $\gamma$  抗体 (1: 200) は SANTA CRUZ より購入した。抗 Flag 抗体 (1: 5000) は SIGMA より購入した。HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1: 2000)、HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (1: 2000) は Jackson ImmunoResearch より購入した。

ウエスタンブロッティングを行う際は、括弧内の濃度に希釈して用いた。

・プラスミド

[pENTR4-H1]

[pCS-RfA-EG]

[pCAG-HIVgp]

[pCMV-VSV-G-RSV-Rev]

理化学研究所の三好浩之先生からご供与頂いた。

[pCS-shcontrol]

当研究室で以前に作成されたものを用いた。

[pCS-shPPAR $\gamma$ ]

以下に示したオリゴヌクレオチド（カートリッジ精製）をpENTR4-H1の*Bgl* II / *Xba* Iサイトに挿入した。PPAR $\gamma$ の標的配列については、すでにノックダウン効果が報告されている配列 (5'-GTGTAAGAGATTATGGAGTAT-3') を用いた (116)。

Top strand:

5'-GATCGTGTAAGAGATTATGGAGTATTTCAAGAGAATACTCTGTGATCTC  
TTGCACTTTTTT-3'

Bottom strand

5'-CTAGAAAAAAGTGCAAGAGATCACAGAGTATTCTCTTGAAATACTCCA  
TAATCTCTTACAC-3'

クローニングは以下のように行った。

上記の Top strand、Bottom strand のオリゴヌクレオチドを 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  となるよう milliQ 水 (Millipore) で調製し、それぞれ 2  $\mu\text{L}$  ずつ採取して Oligo Annealing Buffer (100 mM CH<sub>3</sub>COOK、2 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4)) : 46  $\mu\text{L}$  と混合した。ヒートブロックを用いて 90°C、3 分間処理を行い、その後ヒートブロックの電源を切り、室温で自然放熱する事でアニーリングを行った。こ

のようにして得られた double strand DNA（末端が *Bgl* II / *Xba* I の粘着末端）を pENTR4-H1 の *Bgl* II / *Xba* I サイトにクローニングした。このベクターと pCS-RfA-EG を Gateway LR Clonase（Invitrogen）反応により組み換えることで、目的のレンチウイルスベクターを得た。

## 細胞培養試薬の調製

### ・PBS (-) 溶液

137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を MilliQ 水で溶解し、オートクレーブにより滅菌した。

### ・ウシ胎児血清 (FBS) およびウマ血清 (HS)

-20°C で凍結保存していた血清を 37°C で融解し、56°C で 30 分間インキュベートする事で補体成分の非働化を行った。その後分注し、-20°C で保存した。

### ・トリプシン溶液

トリプシン粉末を 0.5% (w/v) になるように 0.02% EDTA を含む PBS (-) に溶解し、0.22µm フィルター (Millipore) でろ過滅菌したものを分注して -20°C で保存した。使用時に PBS (-) で 10 倍希釈した。

### ・ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (P/St)

500µL ずつ分注し、-20°C で保存した。使用時に、1/1000 量 (終濃度 100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン) となるように培地に加えた。

### ・5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside 溶液 (AICAR)

粉末のまま -20°C で遮光保存し、使用時に滅菌水に溶解して 100 mM の溶液とした。

### ・Compound.C 溶液 (Com.C)

DMSO に溶解し、10 mM の溶液として分注し -20°C で遮光保存した。

### ・メトフォルミン溶液

滅菌水に溶解し、100 mM の溶液として分注し、-20°C で遮光保存した。

#### ・ Actinomycin D 溶液

エタノールに溶解し、1 mg / mL のストックとして -20°C で保存した。

#### 細胞培養

C2C12 細胞は DMEM (High Glucose) に 10% FBS、P/St を加えた培地 (Growth Medium; GM) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。細胞は 60% confluence 以上に密にならないように注意し、 $1.5 \times 10^5$  cells/dish の割合で 2 日に 1 度継代した。筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導を行う際は 6 well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well の割合で撒き、Growth Medium で 2 日間培養した後、DMEM (High Glucose) に 2% HS、P/St を加えた培地 (Differentiation Medium; DM) に培地交換した。培地は 2 日毎に新しい Differentiation Medium に交換し、4 日間から 5 日間分化誘導したものを筋管細胞として用いた。

HEK293 細胞に SV40 ウイルス由来 T-large 抗原遺伝子を組み込んだ HEK293-T 細胞は、DMEM (High Glucose) , 10% FBS, P/St を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、 $1 \times 10^6$  cells / dish の割合で継代を行った。

#### ・ 継代

100 mm dish で培養した細胞を PBS (-) で洗浄した後、トリプシン溶液を 1mL 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 分間インキュベートした。その後培地 4mL を加えてトリプシンを失活させ、50 mL チューブに回収した。190×g で 4 分間遠心後に上清を除去し、培地を 5 mL 加えてピペッティングにより懸濁した。ヘモサイトメーターにより細胞数を計測し、必要量の懸濁液を 10 ml の培地を含む新たな 100 mm dish に撒いた。

#### レンチウイルスによる遺伝子導入

トランスフェクションの前日、HEK293-T 細胞を 100 mm dish に  $2 \times 10^6$  cells / dish となるように播種した。翌日、目的の遺伝子を挿入したレンチウイルスベクターを 20 μg、pCAG-HIVgp を 8 μg、pCMV-VSV-G-RSV-Rev を 8 μg ずつリン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入した。以下、遺伝子導入後から C2C12 細胞へのインフェクションまでの操作は P2 レベルで行った。

遺伝子導入から 12 時間後に 10  $\mu$ M forskolin を含む DMEM 培地 (10% FBS, P/St) で培地交換 (10 mL / dish) を行い、さらに 24-48 時間後に培養上清を回収した。得られた培養上清を 0.45  $\mu$ m フィルター (Advantec) を通すことで濾過滅菌し、レンチウイルスストック液とした (-80°C 保存)。インフェクション後に GFP の蛍光強度がコントロールとほぼ同じになるように適量の基本培地 (DMEM, 10% CS, P/St) を加え、さらに用事調製した 10 mg/mL ポリブレン溶液を終濃度 10  $\mu$ g/mL となるように添加して、レンチウイルス溶液とした。

インフェクションの前日、C2C12 細胞を 6 well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells / well となるように播種した。翌日、レンチウイルス溶液を 2 mL / well となるように加え、1,370 $\times$ g、室温で 90 分間遠心した後、12 時間 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。PBS (-) で 2 回 wash した後通常の Growth Medium を 2 mL 加え、再び 37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養し、実験に用いた。

## RNA 抽出

ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて RNA 抽出を行った。

まず 6 well plate で培養した細胞を PBS (-) 1 mL で洗浄し、ISOGEN を 500  $\mu$ L ずつ well に加えた。室温で 5 分間振とうした後、それぞれを 1.5 mL チューブに回収した。次に 100  $\mu$ L のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスした。そのまま室温で 2-3 分間インキュベートした後、12000 $\times$ g、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を 200  $\mu$ L 新たな 1.5 mL チューブに回収し、160  $\mu$ L のイソプロパノールを加え、十分に攪拌した。5-10 分間、室温でインキュベートした後、12000 $\times$ g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清をピペットできれいに取り除き、沈殿を 600  $\mu$ L の 70% エタノールで洗浄した。その後 7500 $\times$ g、4°C で 5 分間遠心分離し、70% エタノールを除去した。70% エタノールによる洗浄操作は 2 回行った。70% エタノールをピペットによりきれいに取り除いた後、室温で 5 分間乾燥させ、30  $\mu$ L の RNase-free water を加えた。ここで得られた RNA 溶液は分光光度計 (NANO DROP 1000) により濃度を測定した後、DNase 処理を行った。すなわち、RNA 溶液から 2  $\mu$ g の RNA を 0.2 mL チューブに移し、RNase-free water で 8  $\mu$ L にメスアップし、続いてそこに 1/30 DNase I 溶液 (Roche) を 2  $\mu$ L 加えた。この溶液を 37°C で 30 分インキュベートし、最後に 75°C で 10 分間処理をすることで、DNase を不活性化した。ここで得られた 10  $\mu$ L の溶液を RNA サンプルとし、全量を逆転写反応に用いた。

## 逆転写反応 (Reverse Transcription; RT)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) を用いて RT を行った。以下にその詳細を示す。

10×RT Buffer: 2.0 μL

25×dNTP Mix (100 mM) : 0.8 μL

10×RT Random Primers: 2.0 μL

RTase (200U/μL) : 0.5μL

RNase-free water: 4.7μL

RNA サンプル (DNased) : 10μL

上記の試薬を 0.2mL チューブでピペッティングにより混合し、25°Cで 10 分、37°Cで 120 分逆転写反応を行い、85°Cで 5 秒間処理して逆転写酵素を不活化した。

## Real-time PCR

モニタリング試薬として、TaqMan<sup>®</sup> probe (Applied Biosystems) と SYBR Green (Roche) を使い、各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。反応液の組成は以下の通りである。

### TaqMan<sup>®</sup> probe

TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, NO Amp Erase UNG (2X) <sup>2</sup>: 5 μL

20×Assay on Demand<sup>™</sup> Gene Expression Assay Mix: 0.5 μL

滅菌 MilliQ 水: 2.5 μL

Template cDNA: 2 μL

### SYBR Green

Power SYBR Green PCR Master Mix: 10 μL

10μM Forward Primer: 0.4 μL

10μM Reverse Primer: 0.4 μL

滅菌 MilliQ 水: 7.2 μL

Template cDNA: 2 μL

MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems) 中で上記の反応液を混合し、スピンドウン後、Step One Plus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) を用いて反応、及び定量を行った。それぞれの遺伝子の mRNA 量は 18S の mRNA 量で除する事で補正した。また、1 回の試行につき 3 連以上のサンプルを用い、平均値と標準偏差を算出した。

SYBR Green で用いた各 Primer を以下に示す。以下に示していない遺伝子は、全て TaqMan® probe で測定した。

MyoD	Sense:	5'-GCTTCTATCGCCGCCACTCC -3'
	Antisense:	5'- CGCACATGCTCATCCTCACG -3'
Myogenin	Sense:	5'-GCATGTAAGGTGTGTAAGAG -3'
	Antisense:	5'- GCGCAGGATCTCCACTTTAG -3'
PGC-1 $\alpha$	Sense	5'- TTCTGGGTGGATTGAAGTGGTG -3'
	Antisense	5'- TGTCAGTGCATCAAATGAGGGC -3'
PPAR $\alpha$	Sense	5'- CTCGCGTGTGATAAAGC -3'
	Antisense	5'- CGATGCTGTCCTCCTTG -3'
PPAR $\gamma$ 1	Sense	5'- GGACTGTGTGACAGACAAGATTTG -3'
	Antisense	5'- CTGAATATCAGTGGTTCACCCG -3'
PPAR $\gamma$ 2	Sense	5'- CTCTGTTTTATGCTGTTATGGGTGA -3'
	Antisense	5'- GGTC AACAGGAGAATCTCCCAG -3'
PPAR $\delta$	Sense	5'- GCCTCGGGCTTCCACTAC -3'
	Antisense	5'- AGATCCGATCGCACTTCTCA -3'
CD36	Sense:	5'- CTTCCACATTTCTACATGCAA -3'
	Antisense:	5'- ATCCAGTTATGGGTTCCACATC -3'
LPL	Sense:	5'-CTTCTTGATTTACACGGAGGT -3'
	Antisense:	5'- ATGGCATTTCACAAACTG -3'
UCP3	Sense:	5'- GAGTCAGGGGCCTGTGGAAA -3'
	Antisense:	5'- GCGTTCATGTATCGGGTCTT -3'

## ウエスタンブロッティング

### ・タンパク質の定量

タンパク質定量には、BCA protein Assay Kit (Pierce) を用いた。96 well-plate 上で、タンパク質サンプル 5  $\mu$ L に BCA Protein Assay 反応液 (A 液:B 液=50:1 の割合で混合したもの) を 150  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間インキュベートした。肉眼で発色を確認後、570 nm における吸光度を測定した。測定には Microplate Reader Model 680 (BIO RAD) を用いた。

### ・タンパク質の検出

<細胞からのタンパク質抽出>

#### RIPA buffer

50 mM Tris-HCl (pH7.4)

150 mM NaCl

1 % NP-40

0.25 % Deoxycholate

4°C で保存し、使用時に以下の試薬を添加した。

Protease inhibitor cocktail (1/100 量)

1 mM PMSF

Phosphatase inhibitor cocktail (1/100 量)

25 mM カルパイン阻害剤 (1/500 量)

#### 6×Laemmli Sample buffer

280 mM Tris-HCl (pH6.8)

30 % Glycerol

10 % SDS

93 mg/mL DL-Dithiothreitol for electrophoresis

Bromophenol blue (適量)

分注して-20°C で保存した。

以下の操作は氷上で行った。6 well-plate で培養した細胞を、氷冷した PBS (-)



1 mL で洗浄した後、さらに PBS (-) 1 mL を加え、細胞をスクレイパーでかきとって 1.5 mL チューブに回収した。4°C、4,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。ペレットを RIPA buffer 200  $\mu$ L に懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートして溶解した。4°C、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清をタンパク質溶液としてサンプリングした。定量後、サンプルの濃度を揃えた後、1/5 量の 6 $\times$ Laemmli Sample buffer を加え、95°C で 3 分間加熱処理した。これをタンパク質サンプルとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

<細胞の核画分、細胞質画分の調製>

IH buffer

10 mM HEPES-KOH (pH 7.4)

250 mM Sucrose

1 mM EDTA

4°C で保存し、使用時に以下の試薬を添加した。

Protease inhibitor cocktail (1/100 量)

1 mM PMSF

Phosphatase inhibitor cocktail (1/100 量)

25 mM カルパイン阻害剤 (1/500 量)

6 well plate で培養した C2C12myotube を PBS (-) で wash 後、IH buffer を 150  $\mu$ l 加え、スクレイパーで 1.5 ml チューブに移した。氷上で 25G シリンジを用いて 6 回穏やかにホモジナイズした後、1000  $\times$ g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清 50  $\mu$ l を回収した後、残ったサンプルに IH buffer を 50  $\mu$ l 加え、再び同一条件で遠心分離を行った。上清 50  $\mu$ l を回収し、先に回収した上清と合わせて細胞質画分とした。残ったサンプルから上清をすべて取り除き、IH buffer で 1 度 wash した後、遠心分離を行い IH buffer を完全に取り除いた。残ったペレットに RIPA buffer を 150  $\mu$ l 加え、ピペッティングにより懸濁した。15,000  $\times$ g、4°C で 3 分間遠心分離し、上清を核画分とした。それぞれのサンプルは 1/5 量の 6 $\times$ Laemmli Sample buffer を加え、95°C で 3 分間 boil する事でタンパク質サンプルとした。

<SDS-PAGE>

10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム

過硫酸アンモニウム (nacalai tesque) 1 g を滅菌水 10 mL に溶解した。

Running buffer

25 mM Tris

192 mM Glycine

0.1 % SDS (w/v)

分離ゲル (7.5 % ミニゲル 1 枚)

1 M Tris-HCl (pH8.8)	2.25 mL
30 (w/v) %-アクリルアミド/ビス混合液 (29:1) (nacalai tesque)	1.5 mL
milliQ 水	2.19 mL
10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム	60 $\mu$ L
N, N, N', N',-tetramethyl-ethylenediamine (nacalai tesque)	3 $\mu$ L

濃縮ゲル (ミニゲル 1 枚)

1 M Tris-HCl (pH8.8)	350 $\mu$ L
30 (w/v) %-アクリルアミド/ビス混合液 (29:1)	300 $\mu$ L
milliQ 水	1.69 mL
10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム	40 $\mu$ L
N, N, N', N',-tetramethyl-ethylenediamine	2.5 $\mu$ L

ゲルボックスに Running buffer を入れ、ゲル板をセットした。ゲルの各ウェルに Prestained XL-Ladder (APRO) を 10  $\mu$ L、サンプルを 10  $\mu$ g になるようにアプライして、定電圧 100 V で電気泳動を行った。

<ブロットイング>

Blotting buffer

100 mM Tris

192 mM Glycine

5 % Methanol

Bio craft セミドライ式ブロッキング装置を用いてブロッキングを行った。PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) はあらかじめメタノールに浸した後、blotting buffer に浸しておいた。SDS-PAGE 後のゲルをブロッキング装置に、マイナス極側から濾紙 2 枚、ゲル、PVDF 膜、濾紙 2 枚の順にセットした。ブロッキングは PVDF 膜 1 cm<sup>2</sup> あたり、2.4 mA の定電流で 60-90 分行った。

<抗体反応>

#### PBS-T

ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (ICI 社商標 Tween 20 相当 (WAKO)) を終濃度 0.1 % になるように PBS (-) に加えた。

#### TBS-T

ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (ICI 社商標 Tween 20 相当 (WAKO)) を終濃度 0.1 % になるように TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) に加え、混合した。

#### ブロッキング溶液

5% (w/v) の濃度になるように PBS-T にスキムミルク粉末 (WAKO) を溶解した。抗リン酸化抗体を用いて検出する場合には、5% (w/v) の濃度になるように BSA (Wako) を TBS-T に希釈した。

ブロッキング後、PVDF 膜をブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間、あるいは 4°C で一晩振とうしてブロッキングした。

各一次抗体を、それぞれ 5 % (w/v) ブロッキング溶液または Signal Enhancer HIKARI solution A (nacalai tesque) にて適当な濃度に希釈し、PVDF 膜を浸して室温で 1 時間、あるいは 4°C で一晩インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄した後、各二次抗体を 5 % (w/v) ブロッキング溶液または Signal Enhancer HIKARI solution B (nacalai tesque) にて適当な濃度に希釈し、PVDF 膜を浸して室温で 1 時間インキュベートした。その後 PBS-T で 3 回洗浄した。抗リン酸化抗体を用いた場合は、PBS-T ではなく TBS-T を用いて全ての操作を行った。

ECL (GE healthcare) または Immobilon Western (Millipore) に PVDF 膜を浸し、シグナルをルミノイメージアナライザー LAS-4000 mini (Fujifilm) で検出した。

### アガロースゲル電気泳動

1×TAE (40 mM Tris-HCl (pH 7.5)、40 mM 酢酸、1 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)) に 1% アガロース ME (ナカライテスク) を加えて電子レンジで沸騰させ、アガロースを溶解した。ある程度冷めたところで (約 50°C) SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) を 1/100000 量加え、セットしたゲル作製のホルダーに注ぎ、コームを挿して固めた。1×TAE を張った泳動槽にゲルを置き、DNA サンプルに 10×loading dye (TaKaRa) を加えてアプライした。マーカーは 1 kb DNA Ladder あるいは 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs) を用いた。泳動槽は Mupid-2plus (Advance) を用い、100 V で 20-40 分間通電することで電気泳動した。泳動が終了したゲルを Safe imager<sup>™</sup> 2.0 (Invitrogen) にかざしバンドを検出した。

### アガロースゲルからの DNA 断片回収

[GENECLEAN III KIT (BIO 101) を用いた回収法]

目的の DNA 断片を含むアガロースゲルをカッターで切り取り、1.5 mL チューブに移して NaI 溶液をゲル重量の 3 倍量加え、55 °C でゲルを溶解した。EZ-GLASSMILK を 10 µL~20 µL 加えて室温で 10 分間ゆっくり回転させた後、遠心して上清を除いた。沈殿に洗浄バッファー (New WASH 1.4 mL、エタノール 28 mL、滅菌 milliQ 水 31 mL) を 1 mL 加え、15,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を除いた。この洗浄操作は 3 回繰り返した。上清を慎重に取り除き、十分に風乾した後、沈殿に滅菌水を加え、55 °C で 5 分間放置した。15,000 rpm で 1 分間遠心した後、上清を回収し、DNA 溶液とした。

### 制限酵素処理

制限酵素は TaKaRa、TOYOBO、New England BioLabs より購入した。添付された適正なバッファーを用い、37°C で 2 時間から一晩かけて反応を行った。

### ライゲーション

vector: insert DNA = 1: 3 から 1: 10 のモル比となるように調製した DNA 溶液に ligation high (TOYOBO) を等量加え、16 °C で 30 分以上反応を行った。

### 大腸菌の形質転換 (トランスフォーメーション)

<形質転換用試薬>

• TFB1 (pH 5.8)

30 mM CH<sub>3</sub>COOK、100 mM RbCl<sub>2</sub>、10 mM CaCl<sub>2</sub>、50 mM MnCl<sub>2</sub>、15% グリセロール

• TFB2 (pH 6.5)

10 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)、75 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM RbCl<sub>2</sub>

<大腸菌培養培地>

• LB 培地

LB Broth (SIGMA) を 1 L あたり 20 g となるように溶解し、オートクレーブ滅菌した。クリーンベンチ内で 50 mL チューブに小分けして室温で保存した。

• アンピシリン

アンピシリン (SIGMA) の粉末を滅菌 milliQ 水で 100 mg/mL となるように調製し、0.45 μm フィルター (Advantec) で濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注して-20°Cで保存した。

• カナマイシン

カナマイシン (SIGMA) の粉末を滅菌 milliQ 水で 20 mg/mL となるように調製し、0.45 μm フィルターで濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注して-20°Cで保存した。

• アンピシリンプレート、カナマイシンプレート

LB 培地に 1.5% (w/v) となるように寒天を加え、オートクレーブ滅菌した。約 50°Cまで冷めたところでアンピシリン (終濃度: 100 μg/mL)、カナマイシン (終濃度: 20 μg/mL) を加え、10 cm プレートに 10~15 mL ずつ流し込み、室温に戻るまで放置した。作製したプレートは使用するまで 4°Cで保存した。

<コンピテントセルの作成>

コンピテントセルは大腸菌株である TG1 (Zymo Research) および Stbl3 (Invitrogen) を用いた。LB 寒天培地に播いて得られたコロニーをピックアップし、OD<sub>550</sub> が 0.6 程度になるまで 37°Cで数時間培養後、氷上に 15 分程度放置して冷却し、4°Cで遠心した。上清を除き菌体に培養液の 1/10 量の TFB1 を加え丁寧に懸濁した。再び氷上に 5 分間放置した後、4°Cで遠心した。上清を除き菌体に培養液の 1/25 量の TFB2 を加えピペッティングにより丁寧に懸濁し、更に氷

上に 15 分間放置した。1.5 mL チューブに 160  $\mu$ L ずつ分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に冷やしたエタノールボックスに入れて急速冷凍した。

#### <形質転換>

DNA 溶液をコンピテントセル: 50  $\mu$ L に加え、氷上で 30 分間インキュベートした。 $42^{\circ}\text{C}$  で 60 秒間ヒートショックを与えた後、氷上で 3 分間以上冷却した。LB 培地 400  $\mu$ L を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間培養した後、ガスバーナーの下でコーンラージ棒を用い、アンピシリンプレートに播いた。

#### プラスミドミニプレップ (粗精製)

##### <プラスミド DNA 調製用試薬>

- Solution I ( $4^{\circ}\text{C}$  保存)

10 mM EDTA (pH 8.0)、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

- Solution II (常温保存)

1% SDS (sodium dodecyl sulfate)、0.2 M NaOH

- Solution III ( $4^{\circ}\text{C}$  保存)

3 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 5.2)

- TE (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)

- RNase A

SIGMA から購入した。10 mg/mL となるように milliQ 水を加えて溶かし、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

コロニーを 3 mL の 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリンを含む LB 培地で 12 時間振盪培養し、15,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で 3 分間遠心した。回収した菌体に 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の RNase A を含む Solution I 溶液を 200  $\mu$ L 加え、ボルテックスにより十分に懸濁した。Solution II 溶液を 200  $\mu$ L 加え 5 から 6 回転倒混和し、5 分間室温でインキュベートした。Solution III 溶液を 200  $\mu$ L 追加した後 5 から 6 回転倒混和し、氷上で 5 分間インキュベートした。15,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心後、上清を回収した (2 回)。500  $\mu$ L のイソプロピルアルコールを加え、激しく攪拌した後、15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除き、1 mL の 70% エタノールを加え、15,000 rpm で遠心して上清を丁寧に取り除いた。5 -10 分間の風乾の後、沈殿を滅菌 milliQ 水 30  $\mu$ L に溶解する事でプラスミド DNA 溶液を得た。このプラスミド DNA 溶液 5  $\mu$ L を制

限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動を行うことでインサートの確認をした。

### プラスミドラージプレップ（細胞内遺伝子導入用）

Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用い、プロトコルに示された方法に従って行った。

コロニーを 5 mL の 100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地で 8 時間前培養を行った後、うち 100 µL を 50 mL の 100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地で 37°C、TG1 であれば 12 時間、Stbl3 であれば 16 時間程度振盪培養した。6,000 rpm、4°C で 10 分間遠心して菌体を回収し、Buffer P1 (+100 µg/mL RNase A) を 4 mL 加え十分にペレットを攪拌した。Buffer P2 を 4 mL 加え 4~6 回転倒混和することで混合し、5 分間室温でインキュベートした。冷却した Buffer P3 を 4 mL 加え 4~6 回激しく転倒混和することで混合し、15 分間氷上でインキュベートした。11,000 rpm、4°C で 30 分間遠心後、濾紙を用いて上清を濾過した。得られた上清は Buffer QBT を 4 mL 加え平衡化した QIAGEN-tip 100 に添加し自然落下により樹脂に浸透させた。Buffer QC を 10 mL 加えて QIAGEN-tip を 2 回洗浄し、Buffer QF を 5 mL 加え DNA を溶出した。溶出した DNA 液に 3.5 mL のイソプロピルアルコールを加え混合した後、11,000 rpm、4°C で 30 分間遠心した。上清を除き、70%エタノール溶液 2 mL を加え、11,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を除去し、DNA 沈殿を室温で 5 分間風乾させた後、滅菌 milliQ 水に溶解した。

### マウスを用いた動物実験

#### ・飼育条件

マウスは C57BL/6 を日本クレアより購入し、一週間の馴化の後実験に使用した。12 時間毎の明暗サイクル (21:00 消灯) 下で飼育し、固形飼料 (NOSAN) と水 (滅菌蒸留水) は自由摂取とした。全ての実験は東京大学動物実験実施規則に基づいて行った。

#### ・トレッドミル走行運動

マウス、ラット兼用トレッドミルは室町機械より購入した。マウスは 6 週齢オスの C57BL/6 を用い、走行運動を負荷する際には、実験の 3 日前から低速で短時間 (8 m/min, 10 min/day) トレッドミル走行させることで馴化させた。長期走行運動負荷試験においては、速度 15 m/min、傾斜 10° のトレッドミル走行運動

を1日30分、4週間にわたり強制し、最後のトレッドミル走行運動から18時間後にマウスを解剖した。得られた組織はすぐに液体窒素で凍結し、実験に用いるまで-80℃で保存した。

#### ・マウスへの AICAR 投与実験

8週齢、オスの C57BL/6J マウスに対し、AICAR (200 mg / kg) または等量の生理食塩水を1日に2回、10:00 と 20:00 に腹腔内投与した。初日は 20:00 から AICAR を投与開始し、3日後の 10:00 に最終投与を行った。最終日は 16 時に解剖を実施し、腓腹筋を採取した。組織は回収後直ちに液体窒素で凍結し、実験に用いるまで-80℃で保存した。

#### **統計処理**

2群間の比較には Student's t-test、多群間比較には Bonferroni の多重比較を用いた。



## 2-3. 実験結果

### 長期の運動や AICAR の投与により、マウス骨格筋で LPL 発現が亢進する

運動後の骨格筋で起こる遺伝子発現変動を確認するため、まずマウスへの長期走行負荷実験を行った。その後、得られた腓腹筋サンプルを Real-time qPCR に供し、mRNA 発現変動を解析した。その結果走行運動群では PGC-1 $\alpha$  や UCP3、そして LPL の発現亢進が確認され、概ね過去の報告と一致する結果が得られた (Fig.2-1) (47, 117, 118)。運動後の骨格筋では AMPK が強く活性化する事が知られているため、骨格筋における LPL の発現上昇には AMPK が関与する事が予測された。そこで次にマウスに対し AMPK 活性化剤 AICAR を 3 日間腹腔内投与し、人為的に AMPK を活性化させた際に骨格筋における LPL の発現がどのように変化するのかを Real-time qPCR により調べた。その結果、予想通り骨格筋における LPL 発現が上昇しており、運動後の骨格筋における LPL 発現上昇に AMPK が関与する事が示唆された (Fig.2-2)。尚、PGC-1 $\alpha$  は AMPK の活性化時に発現上昇する事が知られており (119, 120)、運動マウスや AICAR 投与マウスで確認された PGC-1 $\alpha$  の発現上昇は骨格筋における AMPK の活性化を裏付けるものである。

AMPK 自身には転写因子としての機能は無いため、LPL 発現を mRNA レベルで調節するには何らかの転写因子や転写因子コアクチベーターを仲介する必要がある。LPL のプロモーター上には PPAR 結合配列である PPRE が存在する事から (31) 運動や AMPK 活性化剤投与後のマウス骨格筋では PPAR 発現上昇を介して LPL 発現を亢進している可能性があると考えた。そこで骨格筋に発現する PPAR の 3 つのアイソフォームに関して mRNA レベルで発現量を測定したところ、PPAR $\gamma$ 1 のみが両実験で有意な発現上昇を示した (Fig.2-1, 2-2)。以上の結果より、AMPK が何らかの形で PPAR $\gamma$ 1 mRNA の発現上昇を誘導し、結果的に LPL 発現が上昇していると予測された。

### C2C12myotube において AMPK の活性化は PPAR $\gamma$ 1 発現を亢進する

筋細胞において AMPK が PPAR $\gamma$ 1 発現を調節し得るかを詳細に検討するため、培養骨格筋細 C2C12 を用いて実験を進めた。4-5 日間の分化誘導により筋管を形成した C2C12myotube に対し、AMPK 活性化剤 AICAR を終濃度 1 mM になるように投与し、経時的な mRNA 発現変動を測定した。その結果、マウス骨格筋で見られた応答と同様に、PPAR アイソフォームの中では唯一 PPAR $\gamma$ 1 の mRNA 発

現増加が確認された (Fig.2-3A: 一部修士論文と重複するデータを使用)。AMPK 応答遺伝子として PGC-1 $\alpha$  の発現も測定したが、PGC-1 $\alpha$  が AICAR 投与から 9 時間程度で発現上昇するのに対し、PPAR $\gamma$ 1 は 3 時間後から発現増加が確認された (Fig.2-3A)。次に、AICAR 投与による PPAR $\gamma$ 1 の発現上昇が AMPK 依存的であることを確認するため、AMPK 阻害剤 Compound.C を用いて確認を行った。すると 10  $\mu$ M の Compound.C で 1 時間前処理した C2C12myotube においては、AICAR 投与による PPAR $\gamma$ 1 の mRNA 発現亢進が見られなくなったことから、AICAR 投与により誘導された PPAR $\gamma$ 1 発現応答は AMPK を介した作用である事が確かめられた (Fig.2-3B)。

以上の結果より筋細胞では AMPK により PPAR $\gamma$ 1 mRNA 発現が調節される事が明らかとなった。そこで次に mRNA 変動に応じて PPAR $\gamma$ 1 タンパク質量が増加するかウエスタンブロッティングにより確認を行った。その結果、AICAR 投与により AMPK のリン酸化が亢進し、PPAR $\gamma$ 1 タンパク質量はそれに伴って増加する事が確認され (Fig.2-4A)、AICAR の濃度は 0.5-1.0 mM 程度でその効果がピークに達する事が分かった (Fig.2-4A)。さらに PPAR $\gamma$ 1 は AICAR 投与後経時的に発現増加し、投与から 6 時間程度でその発現量は横ばいとなった (Fig.2-4B)。

AMPK は AICAR だけでなく、糖尿病治療薬 metformin や過酸化水素の刺激によっても活性化する事が知られている (121)。PPAR $\gamma$ 1 タンパク質が AICAR 以外の AMPK 活性化刺激によっても発現誘導される事を確認するため、C2C12myotube に対し AICAR (1 mM)、Metformin (2 mM)、過酸化水素水 (300  $\mu$ M) を投与し、12 時間後の PPAR $\gamma$ 1 発現をウエスタンブロッティングにより測定した。その結果、これら全ての処理によって PPAR $\gamma$ 1 発現は増加する事が明らかになり、AMPK 阻害剤 Compound.C はこれを強く抑制した (Fig.2-5)。これらの結果は、骨格筋 PPAR $\gamma$ 1 発現量は AMPK の活性化により調節される事を示している。

### AMPK は PPAR $\gamma$ 1 mRNA を安定化する

続いて AMPK がどのような機構により PPAR $\gamma$ 1 mRNA を増加させているかを明らかにしようと考え、まずはレポーターアッセイにより PPAR $\gamma$ 1 の転写レベルでの制御を確認した。PPAR $\gamma$ 1 遺伝子の 5' 上流配列 2000 bp を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作製し、これを C2C12 細胞にトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を測定する事でプロモーター活性を評価した。しかし AMPK 活性化剤により PPAR $\gamma$ 1 プロモーター活性が上昇する事は無かった

(data not shown)。したがって AMPK は PPAR $\gamma$ 1 の転写を活性化するのではなく、mRNA を安定化し、分解を抑制することで mRNA 発現を増大させていると予測された。

AMPK が PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定性に与える影響を確認するため、転写阻害剤 Actinomycin D で処理した C2C12myotube より経時的に RNA を回収し、PPAR $\gamma$ 1 mRNA 残存量からその安定性を評価した。その結果、control 群の細胞では PPAR $\gamma$ 1 mRNA の半減期が 4 時間程度であったのに対し、AICAR を加えた群では半減期が 9 時間以上に伸びる事が明らかとなった (Fig.2-6A)。また AICAR 処理の前に Compound.C を加え、AMPK の活性化を阻害した場合、Actinomycin D 投与から 9 時間後の PPAR $\gamma$ 1 mRNA 残存量は AICAR のみ投与した群に比べて減少したため (Fig.2-6B)、AICAR 投与による PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定化は AMPK の活性化を介した作用である事が確認された。

一般に、半減期の短い mRNA の 3'UTR (untranslated region) には、アデニン (A) とウラシル (U) に富んだ ARE (AU-rich element) が存在し、そこに AUBP (AU-rich element binding protein) が結合して安定性を調節する事が知られている (122, 123)。PPAR $\gamma$ 1 mRNA の 3'UTR に ARE が存在するかを解析した結果、わずか 200 塩基ほどの 3'UTR に、AUBP 結合配列として知られる、AUUU (U) A 配列 (ARE) が 5 つ見つかり、それはヒト、マウス、ラットで保存されていた (Fig.2-7)。AUBP はこれまで 20 種近く報告されているが、そのうち HuR と呼ばれる AUBP は、AMPK によってリン酸化され、細胞内局在が変化する事が知られている。mRNA を安定化するには細胞質側に局在する事が重要であるが、AMPK によりリン酸化された後に HuR が細胞質に局在するのか、あるいは核内に局在するのかは細胞種によって異なる報告がなされている (124, 125)。そこで C2C12myotube において AMPK 活性化剤投与前後の HuR 局在変動をウェスタンブロッティングにより検証した。しかし AICAR 投与により HuR の局在が大きく変動する事は無く、PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定化に HuR が関与するという確証は得られなかった (Fig.2-8)。

### **AMPK 活性化による LPL 発現上昇は PPAR $\gamma$ 1 を介した作用である**

筋細胞において PPAR $\gamma$ 1 の発現上昇が LPL 発現に関与するかを確認するため、Flag タグ付きの PPAR $\gamma$ 1 を過剰発現するレンチウイルスを作製した。レンチウイルスは分化誘導後の C2C12myotube に対しては感染効率が良くないため、分化前の C2C12myoblast にレンチウイルスを感染させ、その後分化させた。分化誘

導 4 日目に細胞を回収し、ウエスタンブロッティングによりタンパク質発現変動を調べたところ、ウイルスを感染させた C2C12myotube において Flag-PPAR $\gamma$ 1 は確かに発現しており、この時 LPL 発現もまた顕著に増加する事が明らかとなった (Fig.2-9A)。続いて同様に処理した細胞から RNA を回収し、Real-time qPCR により mRNA 発現変動を確認した。その結果、脂肪組織などで PPAR $\gamma$  ターゲットとして知られる LPL、CD36、UCP3 のうち、特に LPL が非常に強く発現誘導され、上昇幅は 40 倍を超えるに至った (Fig.2-9B)。したがって筋細胞においては LPL が PPAR $\gamma$ 1 の主要なターゲットである事が示唆された。ただし、ウイルス感染を分化誘導前に行っているため、PPAR $\gamma$ 1 が筋分化に何らかの影響を及ぼし、それにより先の遺伝子発現変動が生じた可能性も否定できない。そこで両群で筋分化マーカー遺伝子である MyoD、Myogenin、MyHC の発現を比較したが、これらの発現に大きな差はなかったため (Fig.2-9B)、PPAR $\gamma$ 1 は特に筋分化には影響を及ぼさないと結論付けた。

次に、C2C12myotube において AMPK の活性化により LPL 発現が上昇するか、そしてそこに PPAR $\gamma$ 1 が関与するのかを検証した。まず C2C12myotube に対し終濃度 1 mM となるように AICAR を投与し、経時的に mRNA 発現量を測定した。その結果、AICAR 投与により LPL 発現が上昇する事が確認され、過去の報告とほぼ一致する結果となった (Fig.2-10) (34, 35)。また PPAR $\gamma$ 1 や PGC-1 $\alpha$  は比較的発現応答が速く、LPL、CD36、UCP3 はそれに遅れる形で発現上昇する事が分かった (Fig.2-10)。さらに AICAR による LPL 発現上昇に PPAR $\gamma$ 1 が関与するか明らかにするため、shRNA により PPAR $\gamma$  をノックダウンするレンチウイルスを作製した。作製した shPPAR $\gamma$  ウイルスにより PPAR $\gamma$  がノックダウンされるか確認するため、このウイルスを感染させた C2C12 を分化誘導し、AICAR 投与から 12 時間後のタンパク質発現をウエスタンブロッティングにより測定したところ、AICAR による PPAR $\gamma$  発現の上昇が抑制されている事が確認された (Fig.2-11A: 修士論文と同一のデータを使用)。またこの時、PPAR $\gamma$  をノックダウンしても分化の程度に差がない事を、筋分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量から確認している (Fig.2-11B)。次に PPAR $\gamma$  をノックダウンした C2C12myotube に対し AICAR を投与し、36 時間後の mRNA 発現変動を測定した。すると PPAR $\gamma$  をノックダウンした群では基底状態において LPL の発現が大きく低下し、また AICAR 投与による LPL 発現上昇も抑制された (Fig.2-12)。この時 CD36 や UCP3 に関しては LPL ほど大きな変化は見られなかった事から、これらの遺伝子は AMPK により発現上昇するものの PPAR $\gamma$  の関与は大きくない事が示された (Fig.2-12)。

shPPAR $\gamma$  を使用した実験においてはオフターゲット効果が懸念される事から、最後に PPAR $\gamma$  アンタゴニストである GW9662 を用い、同様の実験を行った。C2C12myotube に対して終濃度 1 mM の AICAR 及び終濃度 20  $\mu$ M の GW9662、あるいはそれらの溶媒を等量投与し、36 時間後の遺伝子発現変動を Real-time qPCR により測定した。その結果やはり GW9662 により AICAR 誘導性の LPL 発現上昇が顕著に抑制されたため、AMPK は PPAR $\gamma$  を介して LPL 発現を調節する事が示された (Fig.2-13)。

## 2-4. 考察

LPL は、運動による脂質代謝改善作用において重要な役割を担う事が知られているが、骨格筋においてはどのような機構で発現調節されているのかは不明であった。本章では、骨格筋における LPL 発現調節メカニズムを分子レベルで解明する事を目指して研究を進め、AMPK-PPAR $\gamma$ 1 経路を介した新たな LPL 発現調節機構を明らかにした。

本研究はまず、長期運動後のマウス骨格筋における遺伝子発現変動を測定する事から始まった。その結果、運動を行ったマウスの骨格筋ではLPLだけでなく、核内受容体PPAR $\gamma$ 1もまた発現上昇する事を見出し、これはAMPK活性化剤AICARの投与により模倣された (Fig.2-1, 2-2)。また培養骨格筋細胞C2C12myotubeにおいても、AMPKの活性化によりPPAR $\gamma$ 1の発現上昇が確認されたため、AMPKは骨格筋においてPPAR $\gamma$ 1の発現を調節する事が示唆された (Fig2-3, 2-4, 2-5)。PPAR $\gamma$ のもう1つのアイソフォームであるPPAR $\gamma$ 2に関しては、発現量がPPAR $\gamma$ 1より低く、検出する事が出来なかった (data not shown)。近年、運動後のヒト骨格筋では活性酸素種が生じ、これが引き金となってPPAR $\gamma$ の発現が上昇する事が報告されている (126)。本研究でもC2C12myotubeに対し活性酸素種の1つである過酸化水素を投与する事でAMPK依存的にPPAR $\gamma$ 1発現が上昇する事を見出しており (Fig.2-5)、矛盾しない結果となっている。また同時に、AMPK活性化によるPPAR $\gamma$ 1発現上昇はヒトの骨格筋でも起こり得る事を強く支持するものである。

培養細胞を用いて AMPK による PPAR $\gamma$ 1 発現調節メカニズムを探索したところ、興味深い事に mRNA の安定化がその一端を担う事を明らかにした (Fig.2-6)。一般に mRNA の安定性は、mRNA 上の特定の配列と、そこに結合する RNA 結合タンパク質によって決定される。mRNA の安定性を規定する配列としては、UCAU 配列や *Alu-repeat* などが知られるが (127)、最も研究が進んでいるのは ARE である (128, 129)。PPAR $\gamma$ 1 mRNA の 3'UTR 領域には、ヒトやげっ歯類で高度に保存された ARE が複数存在しており、何らかの AUBP が PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定性に寄与するものと考えられた (Fig.2-7)。しかし実際に PPAR $\gamma$ 1 mRNA の 3'UTR 領域が mRNA の安定性に重要であるかは未検証であり、今後より詳細に検討する必要がある。具体的な実験計画として、例えば GFP (green fluorescence protein) 遺伝子の ORF (open reading frame) の 3'側に、PPAR $\gamma$ 1 mRNA 3'UTR 断

片を挿入したレポーターベクターを作製し、C2C12 細胞に導入することでキメラ mRNA を発現させ、キメラ GFP mRNA の安定性が AMPK 活性化剤により変化するかを検証する実験を想定している。また HuR は AMPK によりリン酸化を受け細胞内局在を変化させる AUBP であるため、本研究ではまず HuR に着目したが、現在 HuR が PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定化に関与すると言う証拠は得られていない (Fig.2-8)。今後 AMPK 依存的に PPAR $\gamma$ 1 mRNA を安定化する因子を同定するためには、siRNA を用いた AUBP ノックダウン実験が有効と思われる。さらに AMPK による PPAR $\gamma$  の発現上昇は脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞では確認できなかったため (data not shown)、骨格筋特異的に発現する因子に絞ることで効率的な探索が可能になると考えられる。

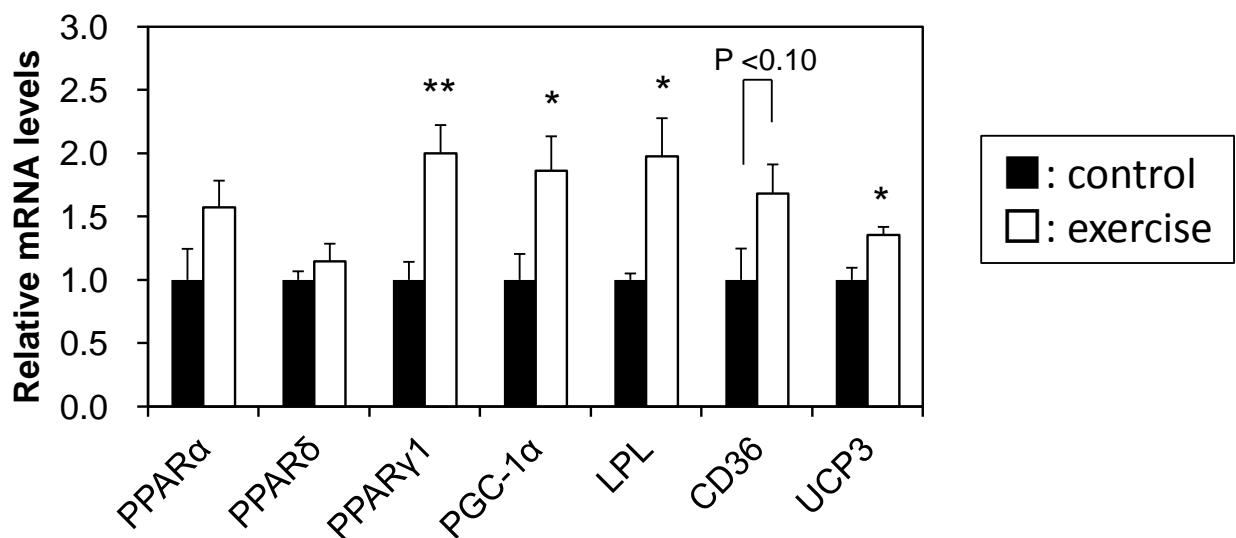
一方、PPAR $\gamma$ 1 の 5' 上流配列 2000 bp を含むルシフェラーゼレポーターベクターを用いたプロモーターアッセイの結果より、AMPK により PPAR $\gamma$ 1 mRNA 発現が転写レベルで調節されている可能性を暫定的に棄却した。しかしレポーターベクターは内在性の DNA を完全に再現しているわけではなく、DNA のメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化を評価するのは難しいとされていることや、2000 bp よりさらに上流に重要なエレメントが存在している可能性を考慮すると、転写レベルでの制御が無いと断定する事は出来ない。AMPK による PPAR $\gamma$ 1 の転写レベルでの調節の有無や、mRNA の安定化のみで 5 倍近くに及ぶ PPAR $\gamma$ 1 mRNA の発現上昇が説明できるのかと言う点に関しては、更なる検討の余地が残されている (Fig.2-3)。

PPAR $\gamma$  は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られる核内受容体であり、骨格筋における発現量は高くない。それゆえ、骨格筋で PPAR $\gamma$  が機能を発揮するには、その発現量を上昇させる事が重要になると予測される。実際に C2C12myotube に対し PPAR $\gamma$  アゴニストである Pioglitazone を投与した際には LPL 発現上昇が 1.5 倍程度上昇するのみであったが (data not shown)、PPAR $\gamma$ 1 を過剰発現させたところ LPL は 40 倍以上の上昇を見せた事や (Fig.2-9)、PPAR $\gamma$  をノックダウンした C2C12 では LPL 発現が 20%程度まで減少した事から (Fig.2-12)、筋細胞においては PPAR $\gamma$ 1 自身の発現量はその活性に重要である事が示唆された。また AICAR 投与による LPL 発現上昇が PPAR $\gamma$  ノックダウンにより抑えられた事から、AMPK の活性化に伴う LPL 発現上昇は PPAR $\gamma$ 1 の発現量変化を介した作用であると考えられる (Fig.2-12)。さらに PPAR $\gamma$  アンタゴニストである GW9662 も LPL 発現を抑制した事を考えると (Fig.2-13)、PPAR $\gamma$ 1

による LPL 発現調節はリガンドの存在が必要ではあるものの、細胞内には脂肪酸などの内因性 PPAR $\gamma$  アゴニストがある程度存在しているため、最終的に PPAR $\gamma$ 1 の発現量が骨格筋 LPL 発現にとって決定的な要因になっていると予測される。

本章では、骨格筋において AMPK が PPAR $\gamma$ 1 発現上昇を介して LPL の発現を調節する事を示し、その一部は PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定化により説明できる事を明らかにした。この成果は運動による代謝改善効果の一端を明らかにするばかりでなく、生活習慣病予防と言う観点において多くの示唆に富んだ結果と言える。特に骨格筋における PPAR $\gamma$  の機能を発現量の観点から明らかにした点は注目すべき成果の 1 つであり、今後骨格筋の PPAR $\gamma$ 1 および LPL の発現調節を介して脂質代謝改善を担う機能性食品成分や医薬品へと応用される事が期待される。

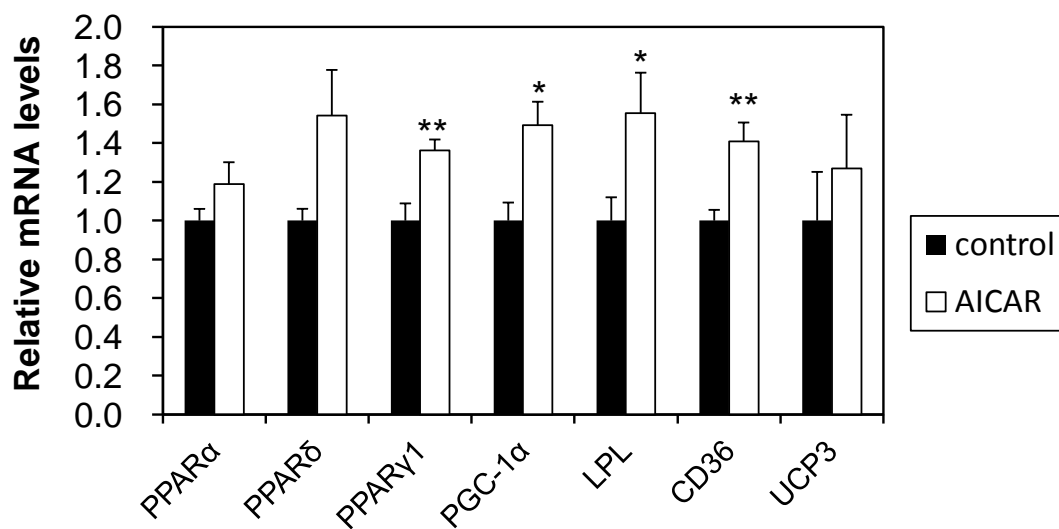




### Fig.2-1 トレッドミル走行運動負荷マウス骨格筋におけるmRNA発現変動

4週間のトレッドミル走行運動を負荷し、最後の走行運動から18時間後に骨格筋 (gastrocnemius muscle)を採取した。その後骨格筋よりTotal RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、control群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=4)

\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。

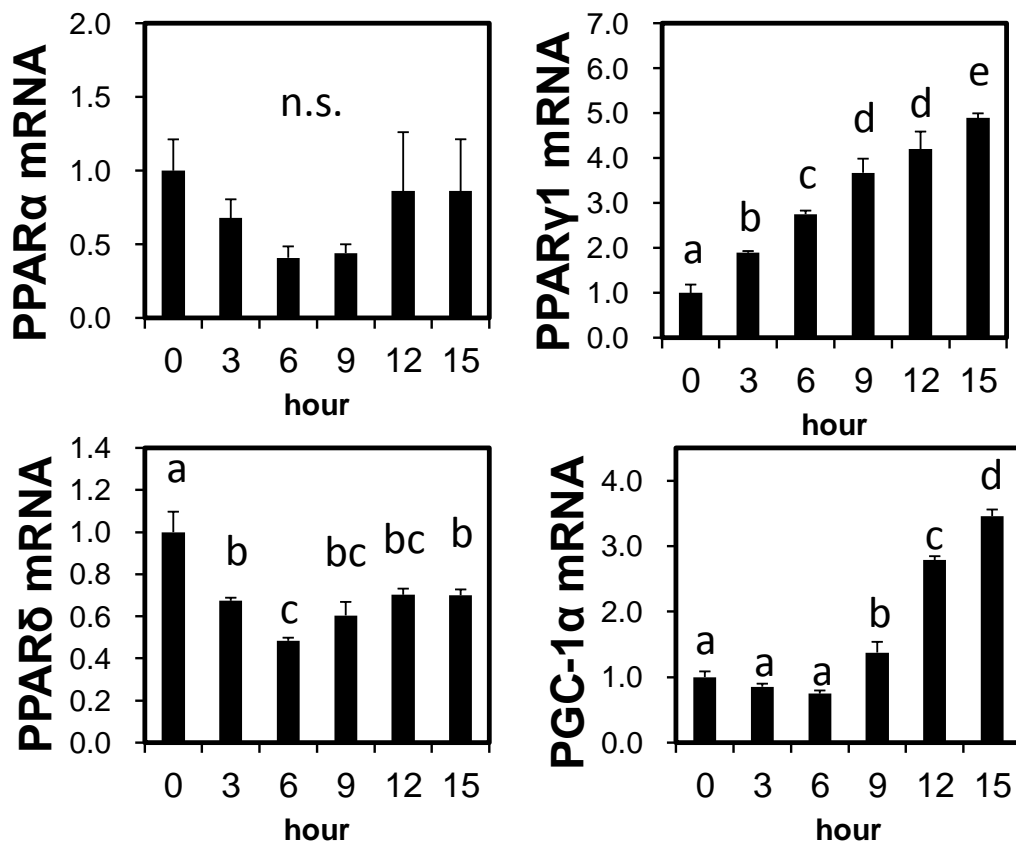


### Fig.2-2 AICAR投与がマウス骨格筋遺伝子発現に与える影響

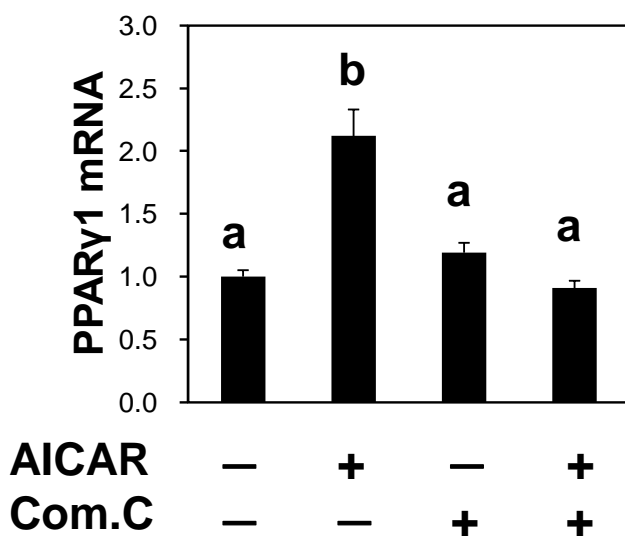
マウスに対しAMPK活性化剤AICARを200 mg/kgで1日2回、3日間に渡り腹腔内投与した。最後の投与から6時間後に骨格筋(gastrocnemius muscle)を回収し、total RNAを抽出した。RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供し、mRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、control群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=5)

\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。

**A**



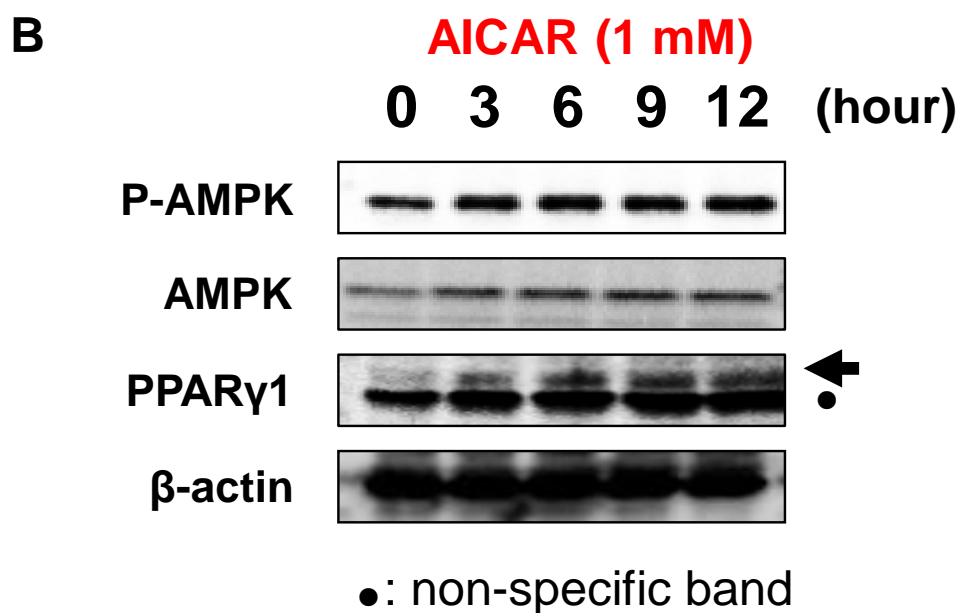
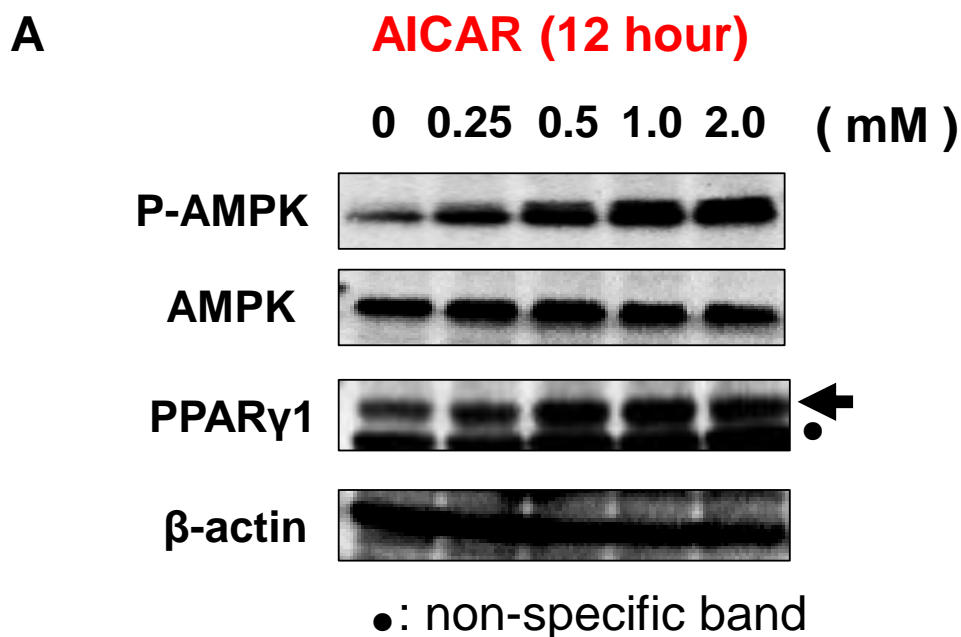
**B**



**Fig.2-3 培養骨格筋細胞C2C12myotubeのAICARに対する短期応答**

A: C2C12myotubeにAMPK活性化剤AICARを終濃度1 mMとなるように投与し、0、3、6、9、12、15時間後のmRNA発現変化をReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、0時間を1として、平均値±標準偏差で示した。異なる文字間で有意差(P<0.01)。

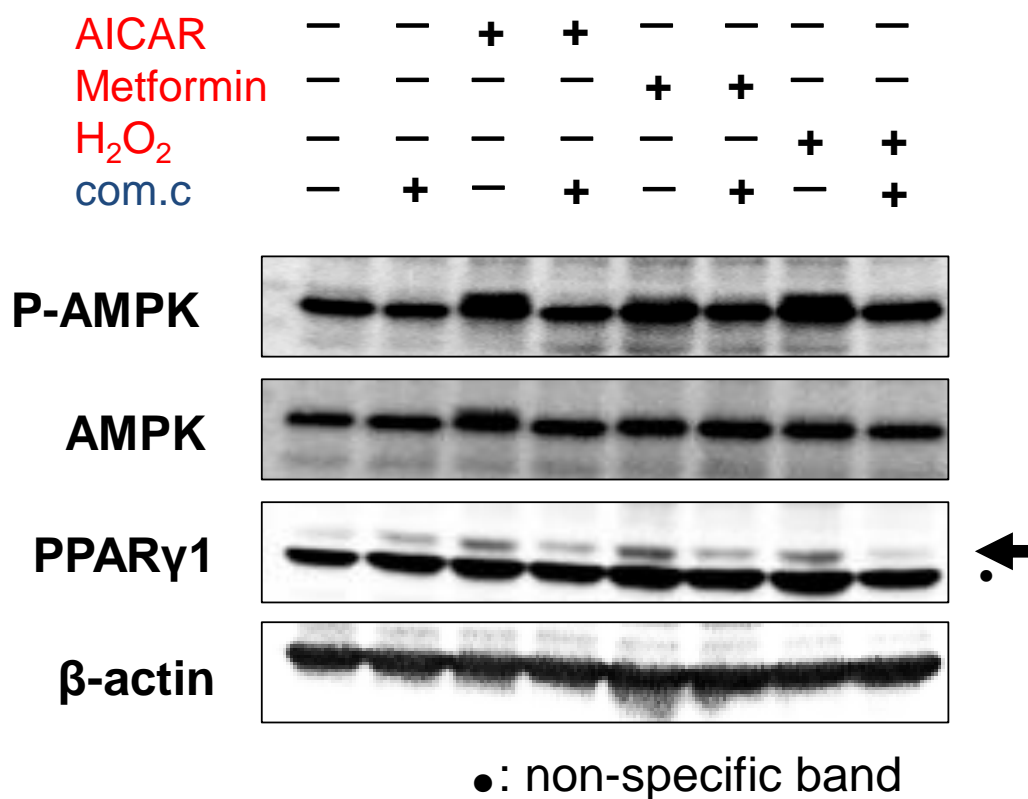
B: C2C12myotubeを10 μMのAMPK阻害剤Compound.Cで1時間処理した後、1 mMのAICARを加え、9時間後に細胞を回収した。その後mRNA発現量をReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値を18Sで補正し、0時間を1として、平均値±標準偏差で示した。異なる文字間で有意差(P<0.05)。



**Fig.2-4 AICARがPPAR $\gamma$ 1タンパク質発現に及ぼす影響**

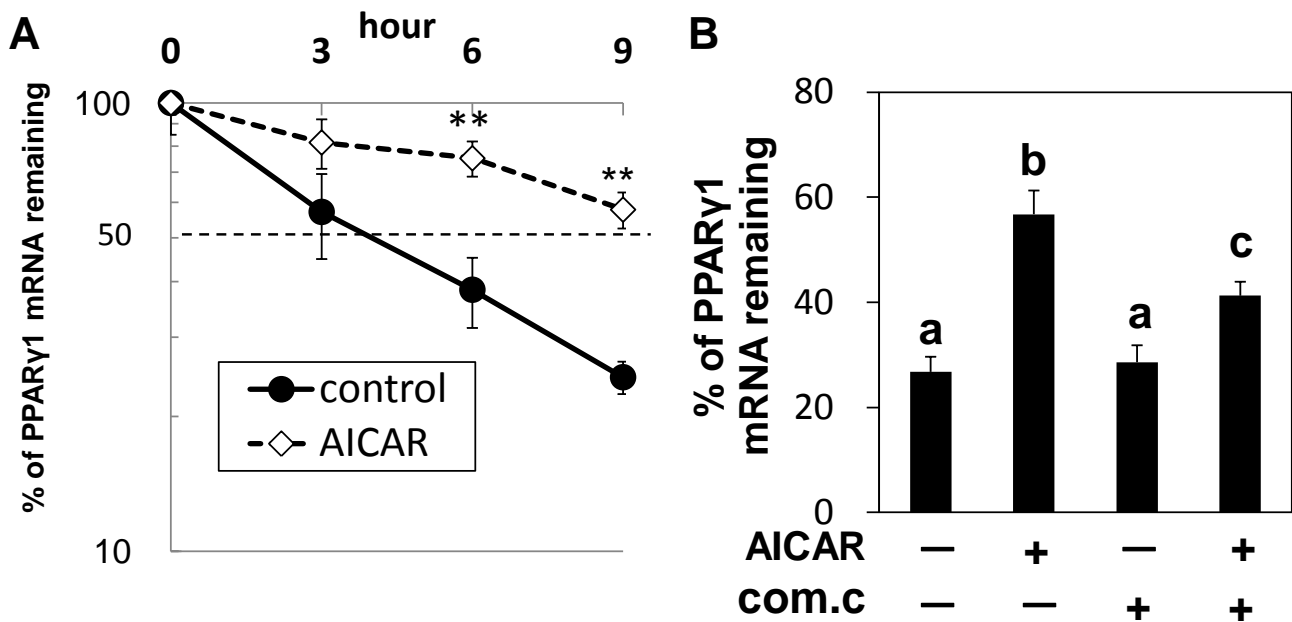
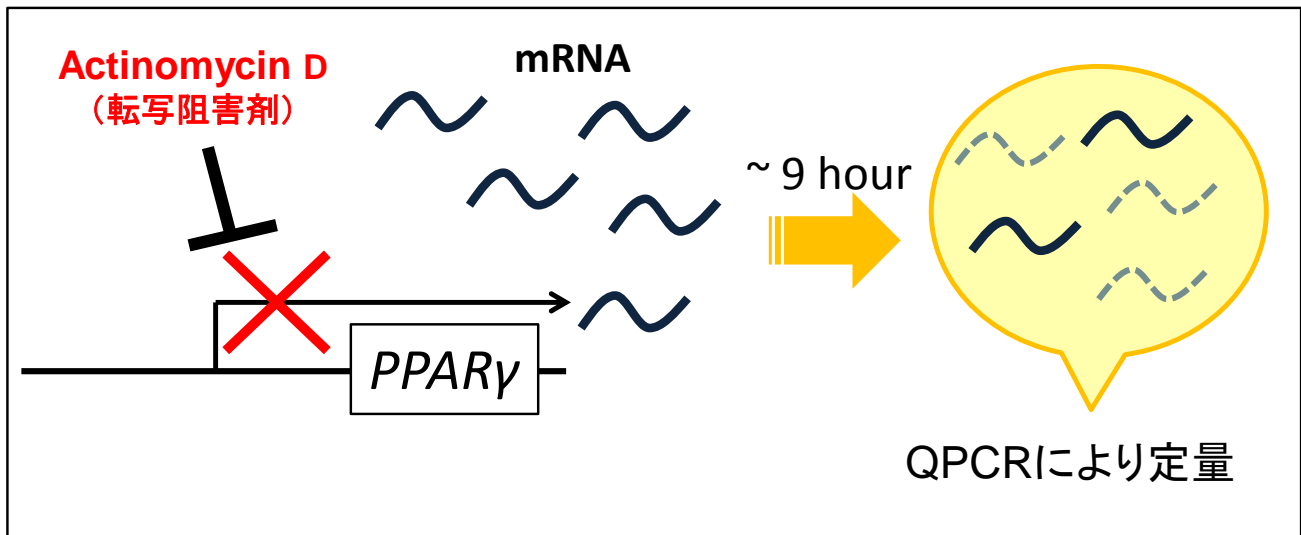
A: C2C12myotubeに対しAMPK活性化剤AICARを表記した終濃度となるように投与し、12時間培養後に細胞を回収した。その後、回収した細胞をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、anti-P AMPK抗体、anti-AMPK抗体、anti-PPAR $\gamma$ 抗体、anti- $\beta$  actin抗体を用いてWestern blottingを行った。

B: C2C12myotubeに対し1 mMのAICARを投与し、0, 3, 6, 9, 12時間後に細胞を回収し、得られたタンパク質をAと同様にwestern blottingに供した。



### Fig.2-5 種々のAMPK活性化剤によるPPAR $\gamma$ 1発現変動

C2C12myotubeをcompound.Cの存在下、あるいは非存在下で1時間インキュベートした後、AICAR(1 mM)、metformin(2 mM)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(300  $\mu$ M)を加え更に12時間インキュベートした。その後細胞を回収し、RIPA bufferで溶解することでタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、anti-P AMPK抗体、anti-AMPK抗体、anti-PPAR $\gamma$ 抗体、anti- $\beta$  actin抗体を用いてWestern blottingを行った。



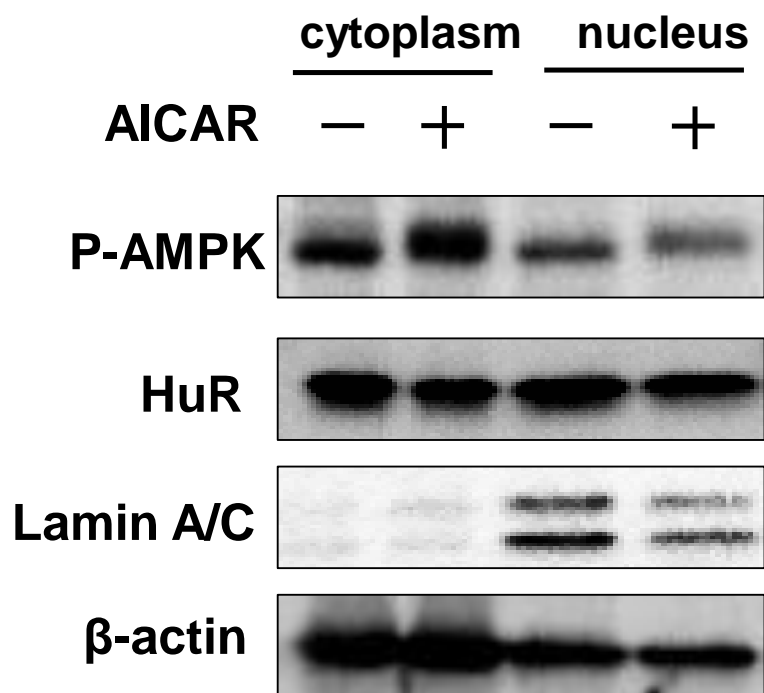
**Fig.2-6 AICARがPPAR $\gamma$ 1 mRNAの安定性に及ぼす影響**

A: C2C12myotubeを転写阻害剤Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml)を含む培地で30分間インキュベートした後、終濃度が1 mMになるようにAICARまたは等量の溶媒を培地に加えた。0, 3, 6, 9時間後に細胞を回収し、PPAR $\gamma$ 1の残存mRNA量をreal-time qPCRにより測定した。それぞれの値を18Sで補正し、0時間を100%として、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。\*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。

B: C2C12myotubeをActinomycin D (5  $\mu$ g/ml)を含む培地で30分間インキュベートした後、終濃度が10  $\mu$ Mとなるようにcompound.cあるいは等量の溶媒を培地に加えた。更に30分後に終濃度1mMのAICARまたは等量の溶媒を培地に加え、9時間後のPPAR $\gamma$ 1 mRNA残存量をreal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、0時間を100%として、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。異なる文字間で有意差( $P < 0.05$ )。

hPPAR $\gamma$ 3'UTR	1	CAGAGAGUCCUGAGCCACUGCCAACAUUCUCCUUCUCCAGUUGCACUAUUU-----	53
mPPAR $\gamma$ 3'UTR	1	CAGGAAAAGUCCCAACCGCUGACAACGUGUUCUUCUAUUGAUUGCACUAUUUUUGA--G	59
rPPAR $\gamma$ 3'UTR	1	CAGAAAAGUCCAGUCGCUGACAAAGUGUUCCUUCUAUCGAUUGCACUAUUUUUUUGAGG	60
hPPAR $\gamma$ 3'UTR	54	GAGGGAAAAUCUGACACCUAAGAAUUUAUGUG-----AAAAAGCAUUUUAAAAA-----GAAAGGU	112
mPPAR $\gamma$ 3'UTR	60	GGAAAAAAAUUCUGACACCUAAGAAUUUAUGUG-----AAAAAGCAUUUUAAAAA-----GAAAGGU	117
rPPAR $\gamma$ 3'UTR	61	GGAAAAAAAUUCUGACACCUAAGAAUUUAUGUG-----AAAAAGCAUUUUAAAAA-----GAAAGGU	119
hPPAR $\gamma$ 3'UTR	113	UUUAGAAUAUGAUCUAUUUUATGCAUAUUGUUUAUAAAAGAUACAUUUUAUAAUUUAUUUUU	172
mPPAR $\gamma$ 3'UTR	118	UUUAGAACAUGAUCUAUUUUATGCAUAUUGUUUAUAAAAGAUACAUUUUAUAAUUUAUUUUU	177
rPPAR $\gamma$ 3'UTR	120	UUUAGAACAUUGAUCUAUUUUATGCAUAUUGUUUAUAAAAGAUACAUUUUAUAAUUUAUUUUU	179
hPPAR $\gamma$ 3'UTR	173	AAUAAUAAAAUUUACCAUAUUUUUAGAAA--	199
mPPAR $\gamma$ 3'UTR	178	AAUAAUAAAAUUUACCAUAUUUUUAGAAA--	206
rPPAR $\gamma$ 3'UTR	180	AAUAAUAAAAUUUACCAUAUUUUUAGAAA--	201

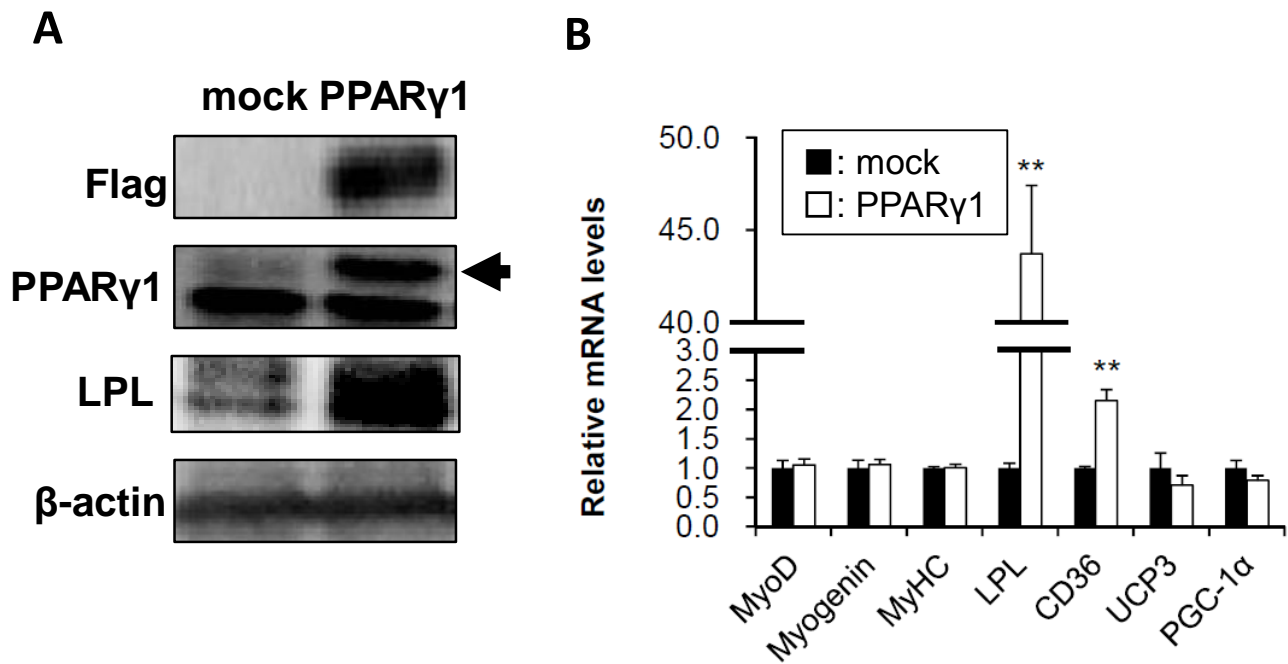
**Fig.2-7 ヒト、マウス、ラットにおけるPPAR $\gamma$ 1 mRNA 3'UTR配列**  
 Human(h), Mouse(m), Rat(r)におけるPPAR $\gamma$ 1 mRNA 3'UTR配列を比較した。AREを赤枠で囲んである。



### Fig.2-8 HuR細胞内局在に対するAICARの影響

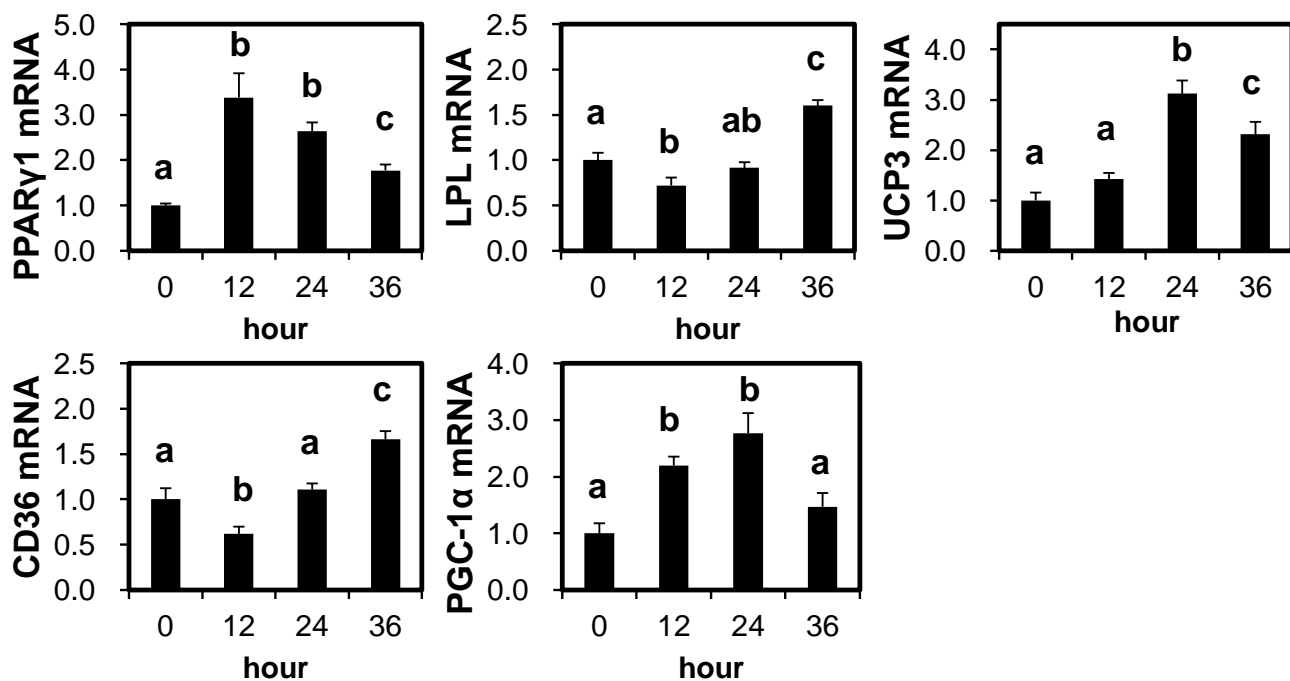
C2C12myotubeに対し終濃度1 mMになるようにAICARあるいは等量の溶媒を投与し6時間後に細胞を回収した。得られた細胞は核画分と細胞質画分に分画し、それぞれSDS-PAGEに供した後、anti-P-AMPK抗体、anti-HuR抗体、anti-Lamin A/C抗体、anti-β-actin抗体を用いてWestern blottingを行った。





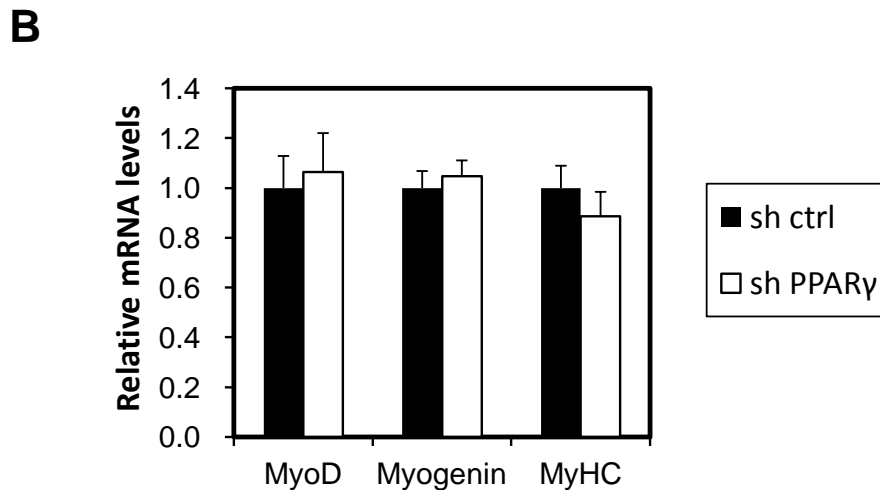
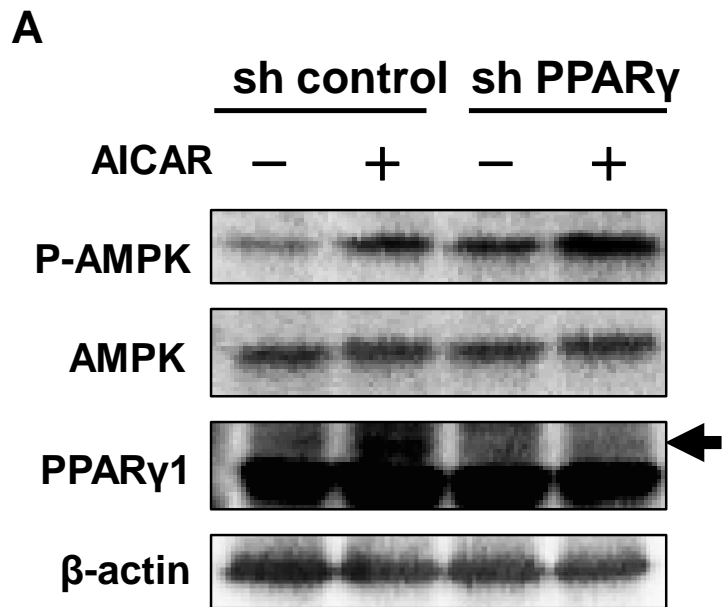
### Fig.2-9 C2C12myotubeに対するPPAR $\gamma$ 1過剰発現実験

C2C12myoblastにFlag-PPAR $\gamma$ 1 lentivirusを感染させた後、4日間分化誘導を行い、細胞を回収した。  
 A: 回収した細胞をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、anti-Flag抗体、anti-PPAR $\gamma$ 抗体、anti-LPL抗体、anti- $\beta$  actin抗体を用いてWestern blottingを行った。  
 B: 回収した細胞からtotal RNAを抽出した。RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供し、mRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、mock群を1として、平均値±標準偏差で示した。  
 \*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。



**Fig.2-10 培養骨格筋細胞C2C12myotubeのAICARに対する長期応答**

C2C12myotubeにAMPK活性化剤AICARを終濃度1 mMとなるように投与し、0, 12, 24, 36 時間後のmRNA発現変化をReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、0時間を1として、平均値±標準偏差で示した。異なる文字間で有意差(P<0.05)。

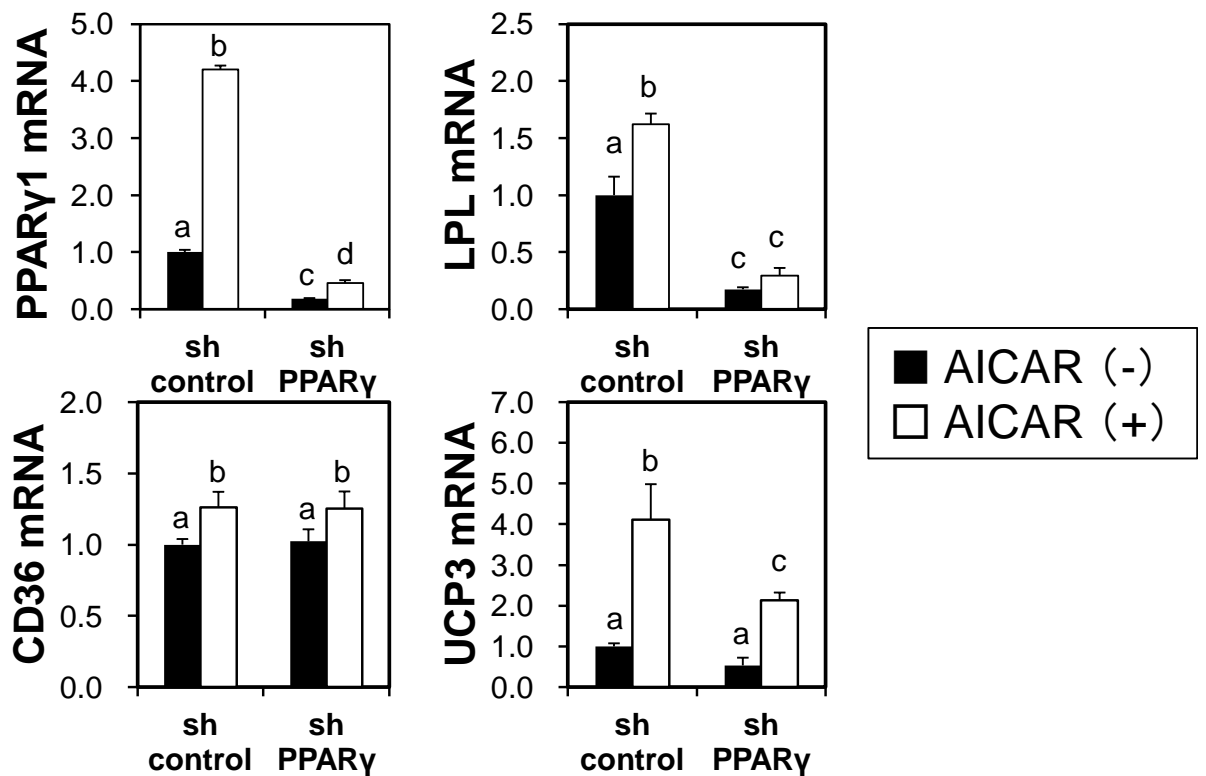


### Fig.2-11 shPPAR $\gamma$ レンチウイルスによるPPAR $\gamma$ のノックダウン

コラーゲンコートした6 well-plateにC2C12を播種し、24時間後にsh control レンチウイルスまたはsh PPAR $\gamma$  レンチウイルスをインフェクションし、更に24時間培養した。その後分化誘導培地に交換し、4日間の分化誘導の後に得られたC2C12myotubeを実験に用いた。

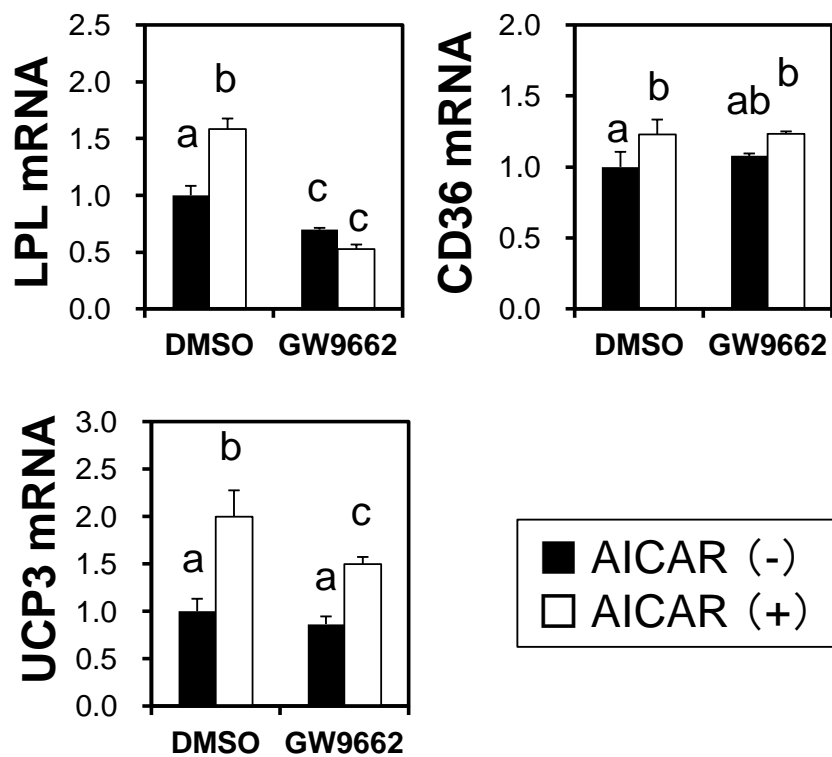
A: 終濃度1 mMのAICARまたは等量の溶媒を投与し、12時間後に細胞を回収した。回収した細胞をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。これをSDS-PAGEに供した後、anti-P AMPK抗体、anti-AMPK抗体、anti-PPAR $\gamma$ 抗体、anti- $\beta$  actin抗体を用いてWestern blottingを行った。

B: Aと同様の条件で処理したC2C12myotubeからtotal RNAを抽出した。RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供し、mRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、sh control群を1として、平均値±標準偏差で示した。



### Fig.2-12 PPAR $\gamma$ ノックダウンC2C12myotubeへのAICAR投与

コラーゲンコートした6 well-plateにC2C12を播種し、24時間後にsh control lentivirusまたはsh PPAR $\gamma$  lentivirusをインフェクションし、更に24時間培養した。4日間の分化誘導後に終濃度1 mMとなるようにAICARあるいは等量の溶媒を加え、36時間後に細胞を回収した。total RNAを抽出し、RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供することでmRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、sh control, AICAR不含群を1として、平均値±標準偏差で示した。異なる文字間で有意差 (P<0.05)。



**Fig.2-13 C2C12myotubeへのAICAR、GW9662の同時投与**  
 C2C12myotubeにAMPK活性化剤AICARを終濃度1 mM、PPAR $\gamma$ アンタゴニストGW9662を終濃度20  $\mu$ Mとなるように投与し、36時間後のmRNA発現変化をReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、AICARおよびGW9662不含群を1として、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。異なる文字間で有意差 (P<0.05)。

### 第三章

## 骨格筋における TGR5 発現調節機構の解析

### 3-1. 緒言

TGR5 は G タンパク質共役型受容体の 1 つであり、血中の胆汁酸を内因性リガンドとして活性化する。胆汁酸や TGR5 合成リガンド、あるいは TGR5 活性化能を持つ食品成分ノミリンを投与したマウスでは、高脂肪食負荷に伴う肥満や耐糖能異常が抑制されるため、TGR5 はメタボリックシンドロームやそれに伴う生活習慣病を予防する因子として注目されている。TGR5 は最大のエネルギー代謝臓器である骨格筋にも発現しており、ヒト初代培養筋細胞に TGR5 リガンドを投与する事で、熱産生に関わる Dio2 活性の上昇や酸素消費量の増大が確認される事から、骨格筋も TGR5 による代謝改善効果を担う重要な組織であると予想されている。しかし、骨格筋における TGR5 の性質や機能、生理的役割は十分に解明されたとは言い難く、分子レベルでの詳細な解析が望まれている。

TGR5 のリガンドとなる胆汁酸は摂食に応じて血中濃度が上昇し、 $\mu\text{M}$  オーダーでその濃度が推移する。したがって通常の生活を送る限り、TGR5 リガンドは定期的に、そしてある程度潤沢に血中に流入するものと考えられる。それゆえ TGR5 の活性調節という面では、胆汁酸の有無だけでなく TGR5 自身の発現量の調節が非常に重要な要因になる事が予測された。そこで本章では、骨格筋における TGR5 発現調節機構の解明を試みた。

### 3-2. 実験材料および手法

#### 実験材料

##### ・細胞培養試薬および細胞投与試薬

第二章と共通する試薬に関しては、2-2.に準じる。

Tunicamycin、Thapsigargin は Nacalai Tesque より購入した。SP600125 は Wako より購入した。その他、特に指定の無い試薬に関しては、Wako、ナカライテスク、SIGMA の特級、生化学実験用のものを用いた。

##### ・抗体

本章で新たに使用する抗体のみ以下に示す。

抗 BiP 抗体 (1: 1000) は cell signaling より購入した。抗 TGR5 抗体 (1: 200)、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (1: 200) は SANTA CRUZ より購入した。

ウエスタンブロッティングを行う際は、括弧内の濃度に希釈して用いた。

#### ・プラスミド

<ルシフェラーゼレポーターアッセイ用プラスミド>

Mouse cDNA library を鋳型として、5'末端および3'末端に適切な制限サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応を行い、TGR5 promoter 領域を増幅した。括弧内の数字は組み込んだ配列の長さを示しており、+1 を転写開始点として示した。PCR 産物はアガロース電気泳動により精製後、pGL4.10 に挿入した。

#### mTGR5 promoter 2000 (-2042 ~ +47)

Forward primer

5'- TATACTCGAGGTCATGTGGTGGAGTG TAGGAG -3'

Reverse primer

5'- ATATAAGCTTTCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'

#### mTGR5 promoter 1550 (-1550 ~ +47)

Forward primer

5'- TATACTCGAGTACACAGGAGGGGGAGCCCT -3'

Reverse primer

5'- ATATAAGCTTTCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'

#### mTGR5 promoter 1500 (-1500 ~ +47)

Forward primer

5'- TATACTCGAGCCCACCCCCAGAGGCGGAGC -3'

Reverse primer

5'- ATATAAGCTTTCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'



mTGR5 promoter mutNF-Y (-1550 ~ +47)

Forward primer

5'-TATACTCGAGTACACAGGAGGGGGAGCCCTCCCAGTAAAAGACG  
GCAGGATGTGCCACGTCCCAC -3'

Reverse primer

5'- ATATAAGCTTTCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'

mTGR5 promoter mutN9 (-1550 ~ +47)

Forward primer

5'-TATACTCGAGTACACAGGAGGGGGAGCCCTCCCAGTAAAAGCAGT  
CATTCGTTGCCACGTCCCACCCCCAG -3'

Reverse primer

5'- ATATAAGCTTTCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'

mTGR5 promoter mut ATF6 / XBP1 (-1550 ~ +47)

Forward primer

5'-TATACTCGAGTACACAGGAGGGGGAGCCCTCCCAGTAAAAGCAGT  
CAGGATGTGAACATTCCCACCCCCAGAGGCGGAG -3'

Reverse primer

5'- ATATAAGCTTTCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'

<過剰発現用プラスミド>

[pCMV-3×Flag-ATF6α (N) ]

京都大学大学院理学研究科の森和俊教授よりご供与頂いた pCMV-EGFP-ATF6  
を鋳型とし、以前当研究室で作製されたものを用いた。

[pCMV-3×Flag-7.1]

SIGMA より購入した。

[pCMV-3×Flag-XBP-1s]

[pCMV-3×Flag-ATF2]

[pCMV-3×Flag-ATF3]

[pCMV-3×Flag-ATF4]

[pCMV-3×Flag-CHOP]

[pCMV-3×Flag-CREBH]

以前当研究室で作製されたものを用いた。

[pcDNA3.1/Hygro (+) ]

Invitrogen から購入した。

[pcDNA3.1-c-jun]

[pcDNA3.1-junB]

[pcDNA3.1-junD]

C2C12myotube 由来 Mouse cDNA を鋳型として、5'末端に *HinDIII*、3'末端に *NotI* の制限サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応を行い、目的の遺伝子配列を増幅した。PCR 産物はアガロース電気泳動により精製後、pcDNA3.1/Hygro (+) の *HinDIII* /*NotI* サイトに挿入した。

<アデノウイルス用プラスミド>

[pENTR-1A]

[pAd-CMV-V5-DEST]

[pAd-CMV-V5-GW/LacZ]

Invitrogen から購入した。

[pAd-CMV-3×Flag-ATF6 (N) ]

pCMV-3×Flag-ATF6 $\alpha$  (N) を鋳型として、5'末端に *BglIII*、3'末端に *NotI* の制限サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応を行い、pENTR-1A の *BglIII* / *NotI* サイトに挿入した。このベクターと pAd-CMV-V5-DEST を Gateway LR clonase (Invitrogen) により組み換える事で目的のアデノウイルスベクターを得た。

## 細胞培養試薬の調製

・ Tunicamycin

DMSO に溶解し、4 mg/ml ストックを作製して-20°Cで保存した。

#### ・ Thapsigargin

DMSO に溶解し、500  $\mu$ M のストックを作製して-20°Cで保存した。

#### ・ SP600125

DMSO に溶解し、20 mM のストックを作製して-20°Cで保存した。

その他の試薬調製は 2-2.に準じた。

### 細胞培養

C2C12 の培養、継代は 2-2.に準じた。

#### ・ HEK293A 細胞

アデノウイルスの作製に用いた HEK293A 細胞は DMEM (High Glucose) に 10% FBS、P/St を加えた培地を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ 100mm dish の割合で継代を行った。継代の方法は C2C12 と同じである。

### アデノウイルスによる遺伝子導入

作製したアデノウイルスベクターを *PacI* により切断し、鎖状にした。これを 6 well plate で培養した HEK293A 細胞に 1.5  $\mu$ g 程度リポフェクションし、3-4 日後に 100 mm dish に播き直した。その後 2-3 日毎に培地交換を行い、細胞が半分程度はがれたところで培地を細胞ごと回収した。得られた培地は 3 回凍結融解を繰り返した後 3,000 rpm、室温で 15 分遠心分離し、上清を回収した (P1 ウイルス液)。

P1 ウイルス液を再び HEK293A に感染させ、3-4 日後、細胞がはがれ始めた時点で培地を細胞ごと回収した。得られた培地は 3 回凍結融解を繰り返した後 3,000 rpm、室温で 10 分遠心分離し、上清を回収した (P2 ウイルス液)。

P2 ウイルスの力価を測定し、一定量のウイルスを C2C12 細胞へ感染させる事で遺伝子導入を行った。

### RNA 抽出

2-2.に準じた。

### 逆転写反応 (Reverse Transcription; RT)

2-2.に準じた。

### Real-time PCR

2-2.に準じた。

なお、本章で新たに使用するプライマーは以下に示す。その他の遺伝子は、全て TaqMan<sup>®</sup> probe で測定した。

ATF4	Sense:	5'- ATGGCCGGCTATGGATGAT-3'
	Antisense:	5'- CGAAGTCAAACCTCTTTCAGATCCATT-3'
ATF6 $\alpha$	Sense:	5'- TTATCAGCATAACAGCCTGCG -3'
	Antisense:	5'- CTTGGGACTTTGAGCCTCTG -3'
BiP	Sense:	5'-GAAAGGATGGTTAATGATGCTGAG -3'
	Antisense:	5'-GTCTTCAATGTCCGCATCCTG -3'
CHOP	Sense:	5'-CTGCCTTTCACCTTGGAGAC-3'
	Antisense:	5'-CGTTTCCTGGGGATGAGATA-3'
CIRP	Sense:	5'- GCAGATCTCCGAAGTGGTG -3'
	Antisense:	5'- CAGCCTGGTCAACTCTGAT -3'
CREBH	Sense:	5'- CCAGAGCCCTTTACCCATACAT -3'
	Antisense:	5'- ATGGTTGGAGGTTAGGGTTCAG -3'
FGF21	Sense:	5'-CCTCTAGGTTTCTTTGCCAACAG-3'
	Antisense:	5'-AAGCTGCAGGCCTCAGGAT-3'
Rbm3	Sense:	5'-TGGAGAGTCCCTGGATGGG -3'
	Antisense:	5'-TGGATCCCCTGGCAGACTT -3'

XBP-1t	Sense:	5'-GAGCAGCAAGTGGTGGATTT-3'
	Antisense:	5'-CCCGTGAGTTTTCTCCCGTAA-3'
XBP-1s	Sense:	5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3'
	Antisense:	5'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-3'

#### ウエスタンブロッティング

2-2.に準じた。

#### アガロースゲル電気泳動

2-2.に準じた。

#### アガロースゲルからの DNA 断片回収

2-2.に準じた。

#### 制限酵素処理

2-2.に準じた。

#### ライゲーション

2-2.に準じた。

#### 大腸菌の形質転換（トランスフォーメーション）

2-2.に準じた。

#### プラスミドミニプレップ（粗精製）

2-2.に準じた。

#### プラスミドラージプレップ（細胞内遺伝子導入用）

2-2.に準じた。

## ルシフェラーゼアッセイ

Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製したプラスミドを使用した。

トランスフェクションの前日に C2C12 筋芽細胞を 12 well plate に  $5.0 \times 10^4$  cells / well の割合で播種し、Growth Medium (DMEM (High Glucose), 10% FBS) で培養した。翌日、リン酸カルシウム法を用いたトランスフェクションを行った。以下にその方法を示す。

### • 2.5 M CaCl<sub>2</sub>

MilliQ 水で 2.5 M に調製し、オートクレーブ滅菌して -20°C で保存した。

### • 2×HBSS (pH 7.05)

0.28 M NaCl、10 mM KCl、1.38 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、11.1 mM グルコース、42 mM HEPES を 1 N NaOH で pH を 7.05 に合わせ、0.22 μm フィルター (Millipore) を用いて濾過滅菌した後、クリーンベンチ内で 1.5 mL チューブに小分けして、-20°C で保存した。

プラスミド DNA: 各々 100-200 ng、2.5 M CaCl<sub>2</sub>: 3 μL を含む溶液に滅菌 milliQ 水を加えて合計 30 μL とした。この溶液を 2×HBSS (pH 7.05) : 30 μL に一滴ずつ加え、20 回 bubbling を行った。室温で 20 分間インキュベートした後、2~3 回のピペッティングにより DNA complex を混和した。細胞にまんべんなく一滴ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。

24 時間後に培地交換し、必要に応じて試薬を添加した。一定時間後細胞を回収し、2 mL の PBS (-) で洗浄した。1×Luciferase Lysis Buffer (25 mM Tris-phosphate (pH 7.8)、2 mM DTT、2 mM CDTA (trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)、10% glycerol、1% Triton X-100) を 100 μL 加え、15 分間室温でインキュベートした。溶液は 1.5 mL チューブに回収し 4°C、13000 rpm で 10 分間遠心分離した。ここで得られた上清を Cell lysate とし、ホタルルシフェラーゼアッセイおよび β-galactosidase アッセイに用いた。

### <ホタルルシフェラーゼアッセイ>

#### • Luciferase Substrate Reagent

20 mM Tricine、1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg (OH)<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O、2.67 mM MgSO<sub>4</sub>、0.1 mM EDTA、0.53 mM ATP (adenosine triphosphate)、33.3 mM DTT、0.27 mM coenzyme A、0.47 mM luciferin (Promega) を混合し、1 mL ずつ分注して -20°C で

遮光保存した。

アシストチューブ (SARSTEDT) 中で Luciferase Substrate Reagent: 50  $\mu$ L に cell lysate: 10  $\mu$ L を加え、ホタルルシフェラーゼ活性を mini Lumat LB9506 (Berthold) により 10 秒間測定した。

< $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) アッセイ>

• 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.5)

0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 41: 9$  で混合し (混合するだけで pH 7.5 になる)、室温で保存した。

• 100 $\times$ Mg Sol.

用時調製。1 M  $\text{MgCl}_2$ : 20  $\mu$ L、2-メルカプトエタノール (2-ME) : 63  $\mu$ L、滅菌 milliQ 水: 117  $\mu$ L を混合した。

• 1 $\times$ ONPG (ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)

0.1 M リン酸ナトリウムバッファーで 4 mg/mL に調製し、-20 $^{\circ}$ C で遮光保存した。

氷冷した 96 well plate 上で  $\beta$ -gal Substrate Reagent: 90  $\mu$ L (100 $\times$ Mg Sol.: 1  $\mu$ L、1 $\times$ ONPG: 22  $\mu$ L、0.1 M リン酸ナトリウムバッファー: 67  $\mu$ L) に cell lysate を 10  $\mu$ L 混合し、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。黄色の色が肉眼により確認されたところで、405 nm (reference: 570 nm) の吸光度を測定した。

ホタルルシフェラーゼ活性の値を  $\beta$ -galactosidase 活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1 回の試行につき 3 連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

## マウスを用いた動物実験

野生型の C57BL/6J マウスは日本クレアから購入した。

ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスは京都大学大学院理学研究科の森和俊教授の研究室で作製したものをヘテロ型でご供与頂き、それをもとに当研究室で飼育・繁殖を行った。

• 飼育条件

2-2. に準じた。

## ・実験条件

### <トレッドミル走行負荷実験>

日本クレアより購入した7週齢、オスのC57BL/6Jマウスを1週間馴化飼育した後、2日間のトレッドミル走行馴化(8 m/min, 5 min, 10° uphill)を行った。その翌日に、下記の強度で本走行試験を行った。

5 m/min, 5 min → 10 m/min, 5 min → 15 m/min, 20 min → 18 m/min, 30 min  
(全て 10° uphill)

走行時間が60分に達するか、疲労により後部電極より6秒以上走行ベルトに戻れなくなった時点で走行を終了した。

試験終了から5時間後に組織を回収し、この間は絶食、自由飲水とした。組織は採取後直ちに液体窒素で凍結し、実験に用いるまで-80℃で保存した。

### <絶食負荷実験(野生型マウス)>

8週齢オスのC57BL/6Jマウスをランダムに6匹ずつ2群に分け、一方の群は自由摂食、もう一方の群は36時間絶食させた。絶食は22:00(ZT13)より開始し、絶食期間中は自由飲水とした。

### <絶食負荷実験(ATF6αノックアウトマウス)>

8-9週齢オスのATF6αノックアウトマウスを5匹ずつランダムに2群に分け、一方の群は自由摂食、もう一方の群は36時間絶食させた。絶食は22:00(ZT13)より開始し、絶食期間中は自由飲水とした。

### <高脂肪食負荷実験>

6週齢オスのC57BL/6マウスをランダムに2群に分け、一方の群(n=7)は通常食(Normal Diet)、もう一方の群(n=8)には高脂肪食(60 kcal% Fat, High fat diet: HFD)(Research diets)を与え、15週間飼育した。その後解剖を行い、腓腹筋を回収した。得られた組織は直ちに液体窒素で凍結し、実験に用いるまで-80℃で保管した。

## 統計処理

2-2.に準じた。



### 3-3. 実験結果

#### 筋細胞において TGR5 は ER ストレス誘導剤により発現上昇する

TGR5 の発現調節機構に関してはこれまで報告が無いため、まずは分化誘導後の C2C12myotube に対し、インスリンや PPAR アゴニスト処理、胆汁酸投与や低グルコース培養など様々な刺激を加え、TGR5 mRNA 発現量を測定した。その結果、カルシウムイオンを小胞体から細胞質に漏出させる事で ER ストレスを誘導する薬剤 Thapsigargin を投与した際に TGR5 mRNA の発現上昇が確認できた (Table.3-1)。TGR5 が ER ストレス応答性因子である事を確認するため、ER ストレス誘導剤として Thapsigargin だけでなく、タンパク質への糖鎖修飾を阻害する事で小胞体ストレスを誘導する Tunicamycin を投与した群も設定し、TGR5 および ER ストレス応答遺伝子の発現変動を測定した。するとこれらの小胞体ストレス誘導剤の投与により ATF6 $\alpha$  や BiP、XBP-1s などの ER ストレス誘導性因子の発現が軒並み上昇する事が確認され、この時同時に TGR5 についても有意な発現上昇を示す事が明らかとなった (Fig.3-1)。

以上の結果より TGR5 が新規 ER ストレス応答遺伝子である可能性が高いと考え、その詳細解明を試みた。

#### TGR5 は ATF6 $\alpha$ および XBP-1 の標的遺伝子である

TGR5 の mRNA 発現に関わる転写因子を同定するため、mouse TGR5 遺伝子の 5' 上流領域を 2000 bp クローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを作製した。これを ER ストレスにより活性化する転写因子を発現するプラスミドと共に C2C12myoblast にトランスフェクションし、TGR5 プロモーター活性を上昇させる転写因子の特定を行った。その結果、TGR5 プロモーター活性は ATF6 $\alpha$  (N) および XBP-1s の強発現により大きく上昇する事が明らかとなり、ER ストレス負荷時の TGR5 発現上昇にこれらの因子が関与する事が示唆された (Fig.3-2)。

次にレポーターベクターに挿入する TGR5 5' 上流配列を徐々に短くする事で、応答エレメントの位置を絞り込んだ。これにより、-1600 から -1400 の位置に ATF6 $\alpha$  (N) の結合サイトが存在する事が明らかとなった (Fig.3-3)。これまでに、ATF6 $\alpha$  や XBP-1 は NF-Y とヘテロ二量体を形成する事で ERSE (CCAAT N9 CCACG) に結合し、ターゲット遺伝子の転写を促進する事が報告されており、特に CCAAT 配列には NF-Y、CCACG には ATF6 $\alpha$  や XBP-1 が結合する事が明ら

かにされている。また ATF6 $\alpha$  と XBP-1 のヘテロ二量体や XBP-1 ホモ二量体は UPRE (C/T CACGTCA) に結合する事で転写亢進する事も知られている (103, 104)。実際に TGR5 5'上流配列の-1600 から-1400 を調べた所、ERSE 様配列と UPRE 様配列が連なった領域 (GCAGT CAGGATGTG CCACGTCC ) を発見した (Fig.3-3)。そこで次にこの ERSE / UPRE 様配列が ATF6 $\alpha$  や XBP-1 による発現調節に重要であるかを確認するため、NF-Y が結合すると考えられる配列 (GCAGT)、N9 配列 (CAGGATGTG)、および ATF6 $\alpha$  や XBP-1 が結合すると予測される配列 (CCACGTCC) にそれぞれ変異を導入したレポーターベクターを作製し (Fig.3-4)、ATF6 $\alpha$  および XBP-1 による TGR5 プロモーター活性を解析した。その結果、ATF6 $\alpha$  による活性化は NF-Y 結合配列、ATF6 $\alpha$  / XBP-1 結合配列に変異を導入する事で消失し、ERSE / UPRE 様配列を完全に欠損した場合も同様に活性が完全に消失した (Fig.3-5)。XBP-1 については NF-Y 結合配列、N9 配列に変異を導入する事で活性が大きく抑制され、ATF6 $\alpha$  / XBP-1 配列に変異を導入する事で活性は完全に消失した。また ATF6 $\alpha$  と同様に、ERSE / UPRE 様配列を完全に欠損した場合も活性は消失した (Fig.3-6)。本実験結果より、ATF6 $\alpha$  および XBP-1 は、TGR5 遺伝子上流-1550 から-1500 の間に存在する ERSE / UPRE 様配列を介して TGR5 プロモーター活性を上昇させている事が明らかになった。

続いて、C2C12myotube に対しアデノウイルスを用いて ATF6 $\alpha$  (N) を過剰発現させ、内因性レベルで TGR5 の発現が変動するか確認した。アデノウイルスのインフェクションから 48 時間後に細胞を回収し遺伝子発現を解析した所、TGR5 の mRNA 発現量はコントロール群 (LacZ) に比べて 15 倍以上に増加し、主要な ATF6 $\alpha$  ターゲットである BiP や CHOP よりも高い上昇率を示した (Fig.3-7A)。また同時にタンパク質レベルでの解析を行った結果、やはり TGR5 の顕著な発現上昇が誘導された (Fig.3-7B)。

以上の結果は、TGR5 が ATF6 $\alpha$  及び XBP-1 の新たな標的遺伝子である事を示している。

### **TGR5 発現は JNK 経路による制御も受ける**

ER ストレスは ATF6 $\alpha$ 、XBP-1、ATF4 などの転写因子を活性化するだけでなく、ASK1 を介して JNK 経路を活性化する事も知られている。したがって TGR5 が JNK 経路による発現調節を受けている可能性があると考え、その検証を行った。

まず JNK 阻害剤 SP600125 で前処理した C2C12myotube に対し ER ストレス誘導剤 Tunicamycin を投与し TGR5 発現変動を mRNA レベルで測定した。その結

果 Tunicamycin により誘導される TGR5 発現上昇は SP600125 で有意に抑制される事が明らかとなった (Fig.3-8)。この結果より、TGR5 発現は JNK 経路によっても調節を受け得る事が示された。

JNK 経路は小胞体ストレスが発生時のみならず、様々なストレスにより活性化する事が知られており、例えばヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 においては、低温刺激を与えた際に JNK 経路が活性化する事が報告されている (130)。そこで C2C12myotube に対しても低温刺激を与える事で JNK 経路の活性化が起こり得るか、またこの時 TGR5 の発現上昇が見られるかを確認し、TGR5 が ER ストレス非依存的な JNK 活性化にも応答するかの検証を行う事にした。まず分化誘導後の C2C12myotube を 24°C で 12 時間インキュベートし、JNK の活性化、すなわちリン酸化が亢進するか確認したところ、予想通りリン酸化 JNK の増加が確認された (Fig.3-9A)。そこで次に 24°C インキュベートから 0 時間、6 時間、及び 18 時間後に細胞を回収し mRNA を測定した。その結果、過去に低温刺激によって発現亢進する事が知られている CIRP (cold-inducible RNA binding protein) や Rbm3 (RNA-binding motif protein-3) の発現上昇と同様に (131, 132)、TGR5 の発現亢進が確認された (Fig.3-9B)。更に低温刺激に際し JNK 阻害剤 SP600125 を培地に添加した所、低温刺激による CIRP や Rbm3 の発現上昇に大きな変化は見られなかったが、TGR5 に関してはその発現上昇が強く抑制される事が明らかとなった (Fig.3-10A)。また低温刺激温度を 24°C から 29°C に上げた場合には JNK 経路依存的な TGR5 の発現亢進は確認できず、ある一定の温度を下回った場合にのみ応答する事が確認された (Fig.3-10B)。

JNK はキナーゼであるため、自身は転写活性を持たない。したがって JNK 活性化による TGR5 の mRNA 発現上昇は何らかの転写因子を介していると考えられる。c-jun を含む Jun ファミリーに属するタンパク質は、JNK によってリン酸化を受け活性化する主要な転写因子である。そこでこれらの発現ベクターを作製し TGR5 プロモーター活性に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより確認した。作製した Jun ファミリータンパク質発現ベクターが活性を持つ事を確認するため、Jun ファミリータンパク質の結合配列である TRE (TPA responsive element; TGA C/G TCA) を含むルシフェラーゼアッセイに供したところ、過去の報告通り c-jun が最も活性が高く、junD、junB とこれに続く形となった (133, 134) (Fig.3-11)。しかしこれらのタンパク質は TGR5 プロモーター活性を上昇させる事は無く、他の因子を介した転写調節が想定された (Fig.3-11)。

以上より、TGR5 は JNK 経路による転写調節を受ける事が明らかになったが、

これは Jun ファミリータンパク質非依存的な調節である事が示唆された。

### 運動後の骨格筋では UPR が生じ TGR5 発現が増加する

培養骨格筋細胞 C2C12 を用いた実験より、TGR5 は新規 UPR 応答因子である事が示された。マウスやヒトの骨格筋では強い運動後に UPR が生じる事が報告されているため (115)、この時 TGR5 発現が上昇すると予測された。そこで実際にマウスに対してトレッドミル走行運動を負荷し、UPR が活性化している事が報告されているタイミングで骨格筋を回収し、遺伝子発現変動を mRNA レベルで解析した。すると BiP、GRP94、ATF3 などの UPR 応答遺伝子と TGR5 の有意な発現上昇が確認され、マウス骨格筋においても TGR5 が UPR に応じて発現調節される事が示唆された (Fig.3-12)。

### 絶食により TGR5 発現が誘導される

TGR5 は胆汁酸をリガンドとするため、摂食シグナルを感知する GPCR と解釈する事が出来る。そこで TGR5 自身の発現もまた、摂食や絶食により変動している可能性があると考え、マウスに対する絶食負荷試験を行った。36 時間の絶食後に骨格筋を回収し、自由摂食群と遺伝子発現を比較したところ、興味深い事に TGR5 の発現上昇が確認された (Fig.3-13A)。この時、BiP、ATF4、XBP-1 などの mRNA 発現が上昇している事や (Fig.3-13A)、JNK のリン酸化が亢進している事 (Fig.3-13B) を合わせて考えると、絶食により何らかの理由で活性化した UPR や JNK 経路が TGR5 の発現を調節している可能性が高いと考えられた。また、絶食による TGR5 の発現上昇は、その後に再摂食を行う事で穏やかな減少傾向を示し、絶食の影響は長期に及ぶ事が確認された (Fig.3-14)。

次に、絶食による TGR5 発現上昇に ATF6 $\alpha$  が関与するかを確認するため、ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスに対する絶食負荷実験を行った。すると予想に反して ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスでは絶食負荷時の TGR5 発現上昇幅が野生型に比べて大きく、4 倍以上の上昇を見せた (Fig.3-15)。

### 肝臓においても絶食時に TGR5 発現上昇が誘導される

CREBH は肝臓特異的に発現する転写因子であり、絶食時に PPAR $\alpha$  の活性化を介して発現増加する事が知られている (135)。また CREBH は ER ストレスが生じると ATF6 $\alpha$  と類似した機構により活性化し、UPRE に結合する事でターゲット遺伝子の転写を促進する (136)。これらの報告は、絶食時には骨格筋のみ

ならず肝臓においても TGR5 発現が上昇する事を示唆しているため、その検証を行った。

まず CREBH の活性型である CREBH (N) を発現するプラスミドを用い、TGR5 プロモーターアッセイを行った。その結果、CREBH (N) もまた非常に強く TGR5 プロモーター活性を上昇させる事が明らかになった (Fig.3-16)。更に 36 時間絶食後のマウス肝臓を採取し mRNA 発現を比較した所、一部の小胞体ストレス応答因子の発現増加が見られ、CREBH も過去の報告通り発現増加が確認された。またこの時 TGR5 mRNA も有意に発現上昇しており、プロモーターアッセイの結果と併せて考えると、絶食時の肝臓における TGR5 発現上昇には、ATF6 $\alpha$  や XBP-1、JNK 経路のみならず CREBH もこれに関与しているものと予測される (Fig.3-17)。

#### 長期高脂肪食飼育により骨格筋 TGR5 発現は低下する

長期高脂肪食負荷後の骨格筋において小胞体ストレスが生じるかどうかに関しては、現在議論が分かれている (110, 137)。そこで高脂肪食負荷が骨格筋 UPR を誘導するか、そしてそれが TGR5 発現に影響を及ぼすかを検証するため、6 週齢の C57BL/6J マウスに 15 週間に渡り高脂肪食飼育を行い、通常食飼育マウスと UPR 関連遺伝子発現を比較した。その結果少なくとも ATF6 $\alpha$  や CHOP、XBP-1 に関しては発現に差はなく、BiP についても統計的に有意差はあるが上昇率はわずかであった。また TGR5 に関しては有意な減少が確認され、高脂肪食負荷時には UPR を介した TGR5 発現上昇は起こらない事が示された (Fig.3-18)。

### 3-4. 考察

本章における実験結果より、TGR5 が新規 UPR ターゲット遺伝子である事が明らかになった。UPR を介した TGR5 の発現調節機構は、以下のようにまとめる事が出来る。

小胞体ストレスなど何らかの原因により UPR が生じた場合、ATF6 経路、IRE1 経路、PERK 経路が活性化する。このうち、ATF6 $\alpha$  や IRE1 経路によりスプライシングを受け活性化した XBP-1 は、TGR5 プロモーター上流約 1550 bp の位置に存在する ERSE / UPRE 様配列に結合する事で TGR5 のプロモーター活性を上昇させる事が示された (Fig.3-2, 3-3, 3-5, 3-6)。ATF6 $\alpha$  は NF-Y 結合配列や ATF6 / XBP-1 結合配列に変異を導入する事で活性が完全に消失する事から、NF-Y とダイマー形成し ERSE 様配列に結合すると考えられ、XBP-1 は ATF6 / XBP-1 結合配列に変異を導入すると活性が完全に抑制されるものの、NF-Y 結合配列に変異を導入した際にはやや活性が残る事から、NF-Y とダイマー形成し ERSE 様配列に結合するほか、XBP-1 ホモダイマーが UPRE 様配列に結合する事で TGR5 プロモーター活性を調節していると考えられる (Fig.3-5, 3-6)。また XBP-1 に関しては、本来その配列に重要な意味を持たないとされている N9 配列に変異を導入した際にも活性が大きく低下しており、N9 配列もまた何らかの形で XBP-1 の結合に関与していると推測された (Fig.3-6)。C2C12myotube に対しアデノウイルスを用いて ATF6 $\alpha$  (N) を強発現させた際にも TGR5 の発現上昇が mRNA およびタンパク質レベルで確認された事から、ATF6 $\alpha$  や XBP-1 による TGR5 プロモーター活性の亢進は内因性 TGR5 発現にも重要な役割を持つと予測される (Fig.3-7)。また興味深い事に、肝臓特異的に発現する転写因子 CREBH も同様に TGR5 プロモーター活性を上昇させる事が明らかになった (Fig.3-16)。CREBH が UPRE に結合するという過去の報告と併せると、CREBH も ATF6 $\alpha$  や XBP-1 と同様に TGR5 遺伝子上流の ERSE / UPRE 様配列を認識してプロモーター活性を上昇させていると考えられる。CREBH は ATF6 に構造的に類似した膜貫通型転写因子のひとつであり、このような特徴を持つ転写因子は OASIS ファミリーとして 5 つ見つかっている。精巢に優先的に発現する CREB4 もまた OASIS ファミリーに属する転写因子であり、CREBH と同様に UPRE に結合する事が報告されている事から、CREB4 も精巢における TGR5 発現に関与する事が予測される (138)。しかし CREB4 は小胞体ストレス下で活性化する性質を持たず、どの

ように活性化を受けるかは分かっていない。したがって ERSE / UPR 様配列を介した TGR5 の発現調節は、組織により異なるシグナルで制御されている可能性が有る。

一方で、小胞体ストレスにより活性化する JNK 経路も TGR5 発現に関与する事が示された (Fig.3-8)。C2C12myotube へ低温刺激を与えた一連の実験より、小胞体ストレスとは無関係なストレス刺激により JNK を活性化させた場合にも TGR5 発現が誘導される事が明らかになった (Fig.3-9, 3-10)。JNK 経路は低温刺激だけでなく、UV 照射 (139) や活性酸素種 (140) などによる様々なストレスに応じて活性化する事が知られているため、TGR5 もまたストレス応答性の因子として発現上昇する事が予測される。本研究では活性酸素種の 1 つである過酸化水素で C2C12myotube を処理した際には TGR5 の発現上昇は見られなかったが (Table.3-1)、過酸化水素による JNK 活性化のタイミングや濃度などは未検討であるため、今後慎重に追試する必要があると思われる。また JNK 経路により TGR5 発現を直接調節する因子の同定を試み、最も主要な JNK の基質である jun ファミリータンパク質に着目したが、これらが TGR5 発現に関与すると言う決定的な証拠は得られていない (Fig.3-11)。JNK のターゲットとして知られる因子は数多く報告されているため、今後更に幅広く検証を進める必要があるだろう。ここまでに明らかにした UPR による TGR5 発現調節メカニズムの概略図は、Fig.3-19 のようにまとめられる。

本章後半部では、培養細胞レベルで得られた上記の結果をもとに、マウス骨格筋における TGR5 発現調節機構の解析を行った。骨格筋においては強い運動後に UPR が生じる事が知られているため (114, 115)、運動後の骨格筋サンプルを用い mRNA を測定したところ、予想通り TGR5 の発現上昇が確認された (Fig.3-12)。ただしこの時 XBP-1s の発現量にほぼ変化はなく、ATF6 $\alpha$  のターゲットである BiP や GRP94 の発現が上昇している事から、ここで見られた TGR5 発現上昇には主に ATF6 $\alpha$  が関与すると考えられる (Fig.3-12)。運動後の骨格筋で一過的に生じる UPR は運動への適応に重要である事が報告されているため、UPR により誘導される TGR5 も何らかの形で運動への適応に関与する可能性や、運動後の骨格筋で起きる様々な変化、例えば糖、脂質代謝改善や筋肥大などに TGR5 が関わる可能性が示され、この結果は骨格筋における TGR5 の役割を予想する上で重要な知見と考えられる。また低温刺激による TGR5 発現上昇が生体でも生じるか確認するため、マウスを室温 4°C で 3 日間飼育する実験を行ったが、

骨格筋における TGR5 発現量に大きな差は見られなかった (data not shown)。C2C12 細胞を用いた実験からも、TGR5 発現上昇にはある程度以上の温度低下が必要である事が示されており (Fig.3-10B)、これは恒温動物では低温飼育をしても生理的に起こり得ない可能性が有る。

更に TGR5 が摂食シグナルである胆汁酸をリガンドとして活性化する GPCR である事から、その発現量も摂食や絶食と言った条件下で変動する可能性が高いと考え、マウスへの絶食、再摂食負荷実験を行った。その結果興味深い事に TGR5 は絶食時の骨格筋において発現上昇する事が明らかになった (Fig.3-13, 3-14)。この時 UPR 関連遺伝子の発現変動や JNK の活性化が確認された事から、絶食時にもこれらのシグナルが TGR5 発現を調節していると考えられた (Fig.3-13)。また、絶食による TGR5 発現上昇は ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスでより顕著であったため、絶食時の TGR5 発現に ATF6 $\alpha$  は直接的に関与していない可能性が高い (Fig.3-15)。しかし ATF6 $\alpha$  ノックアウトマウスで応答が変化するという事は、絶食時の TGR5 発現上昇に何らかの形で UPR が関与する事を示している。ATF6 $\alpha$  の欠損により UPR に異常をきたし、小胞体ストレス応答に抑制がかからなくなる事で、JNK や XBP-1 経路を介した TGR5 発現上昇が増強されている可能性などが考えられる。

当初の予想としては、TGR5 は摂食時に発現を増加させ、胆汁酸を介した摂食シグナルを効率よく細胞内に伝達するのであると考えていたため、絶食時の TGR5 発現上昇は予想外であった。絶食時、すなわち血中に TGR5 リガンドとなる胆汁酸が存在しないタイミングで TGR5 発現が上昇する事には、一見何の意味もない事のように思える。しかしこれは来るべき摂食シグナルへの備えであると考えれば極めて合目的な応答であり、絶食を経た筋細胞は発現増加した TGR5 を介して通常時の筋細胞よりも強く摂食シグナルを受容する事が可能になると考えられる。骨格筋における TGR5 の機能は今のところ不明な点が多いが、TGR5 が絶食によりエネルギー枯渇に陥った筋細胞を回復させる役割を持つ事を予測させる結果である。更に絶食時の TGR5 発現上昇は、骨格筋のみならず肝臓でも同様に確認されている (Fig.3-17)。また分子メカニズムは不明であるが、高脂肪食負荷により栄養過多にした場合には骨格筋において UPR は生じる事は無く、絶食時とは逆に TGR5 発現が減少する事が明らかになった (Fig.3-18)。

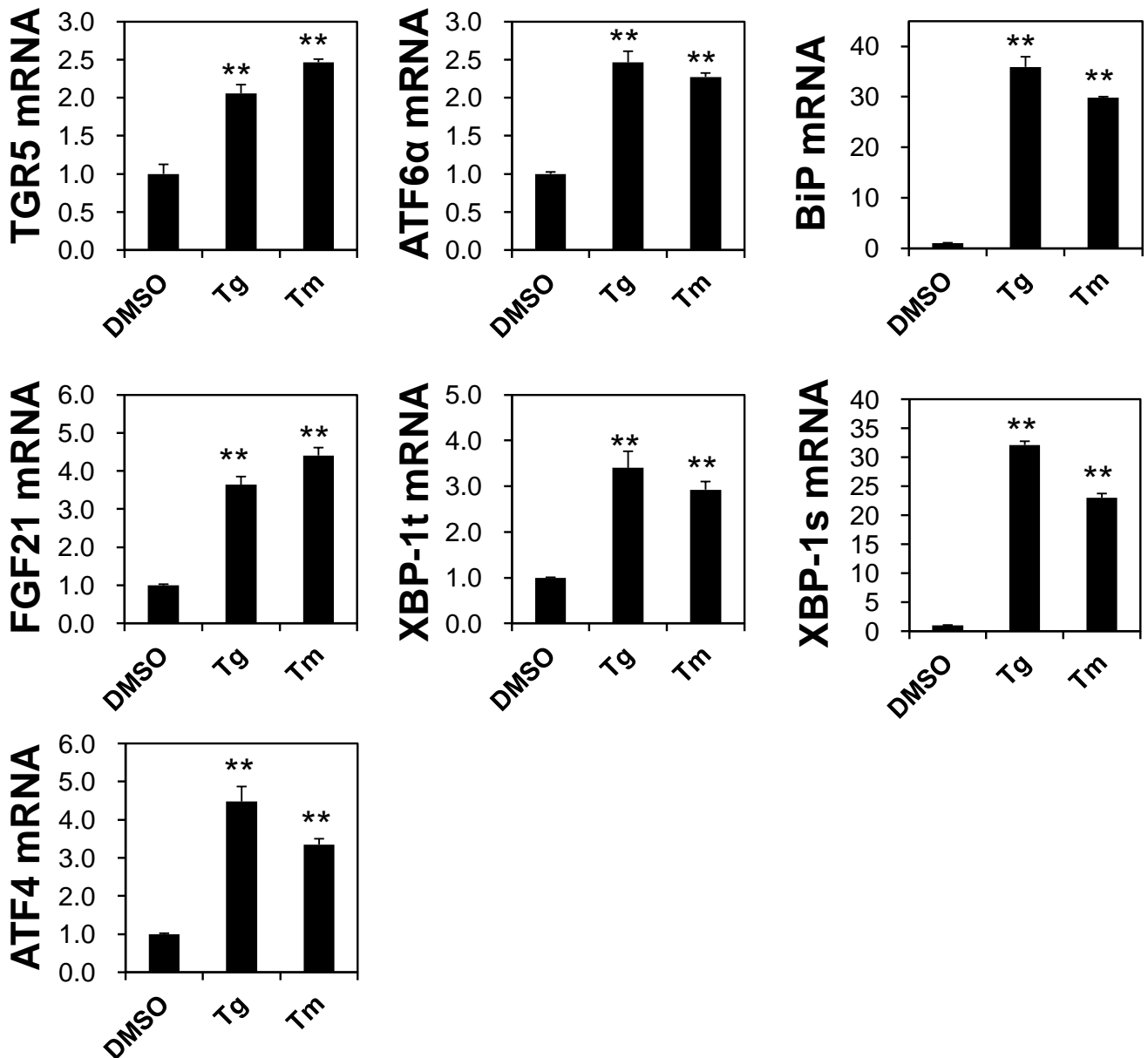
現時点では推測の域を出ないが、TGR5 は全身で広く栄養枯渇後の摂食行動により活性化する仕組みを持ち、エネルギー代謝を包括的に支配している可能性



が考えられる。TGR5 の機能に関する報告はまだまだ少ないため、この点に関しては今後の更なる検証が必要である。

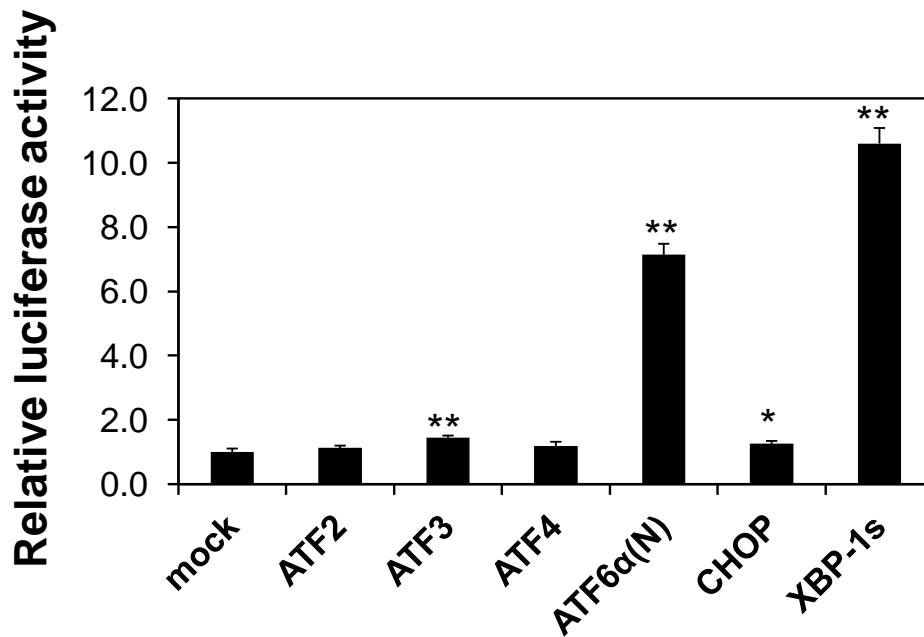
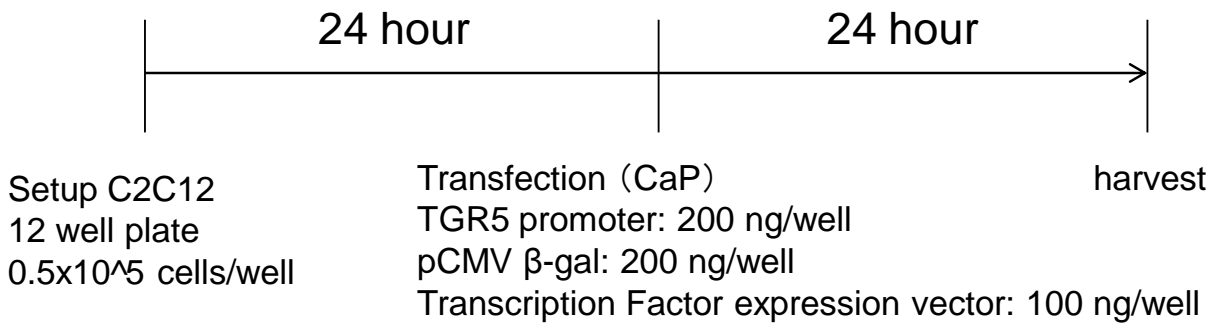
Description	RelativeTGR5 mRNA expression	significance
AICAR (1 mM, 12 hour)	0.65±0.15	
TLCA (50 µM, 6 hour)	1.03±0.18	
Rosiglitazone (10 µM, 36 hour)	1.13±0.14	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (300 µM, 24 hour)	1.36±0.53	
Insulin (500 nM, 3 hour)	1.23±0.20	
Resveratrol (50 µM, 24hour)	1.08±0.12	
Low Glucose (5.5 mM, 24 hour)	1.26±0.21	
Serum starvation (0%, 24 hour)	0.80±0.06	
Rapamycin (100 nM, 24 hour)	1.54±0.81	
Dexamethasone (1 µM, 12 hour)	0.94±0.20	
<b>Thapsigargin (250 nM, 6 hour)</b>	<b>2.40±0.10</b>	<b>**</b>

**Table.3-1 様々な刺激によるTGR5 mRNA発現変動**  
 4日間分化誘導を行ったC2C12myotubeに対し表の左列に示す処理を行った後、TGR5 mRNA発現変化をReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、control群を1として、平均値±標準偏差で示した。\*\*は有意差P<0.01を示す。



**Fig.3-1 C2C12myotubeの小胞体ストレス誘導剤に対する応答**

4日間分化誘導を行ったC2C12myotubeに対し、小胞体ストレス誘導剤Thapsigargin (Tg: 終濃度250 nM)、Tunicamycin (Tm: 終濃度2.5 μg/ml)または等量の溶媒(DMSO)を投与し、9時間後に細胞を回収した。その後Total RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、DMSO群を1として、平均値±標準偏差で示した。\*\*はDMSO群に対する有意差P<0.01を示す。



**Fig.3-2 小胞体ストレスにより活性化する転写因子がTGR5プロモーター活性に与える影響**

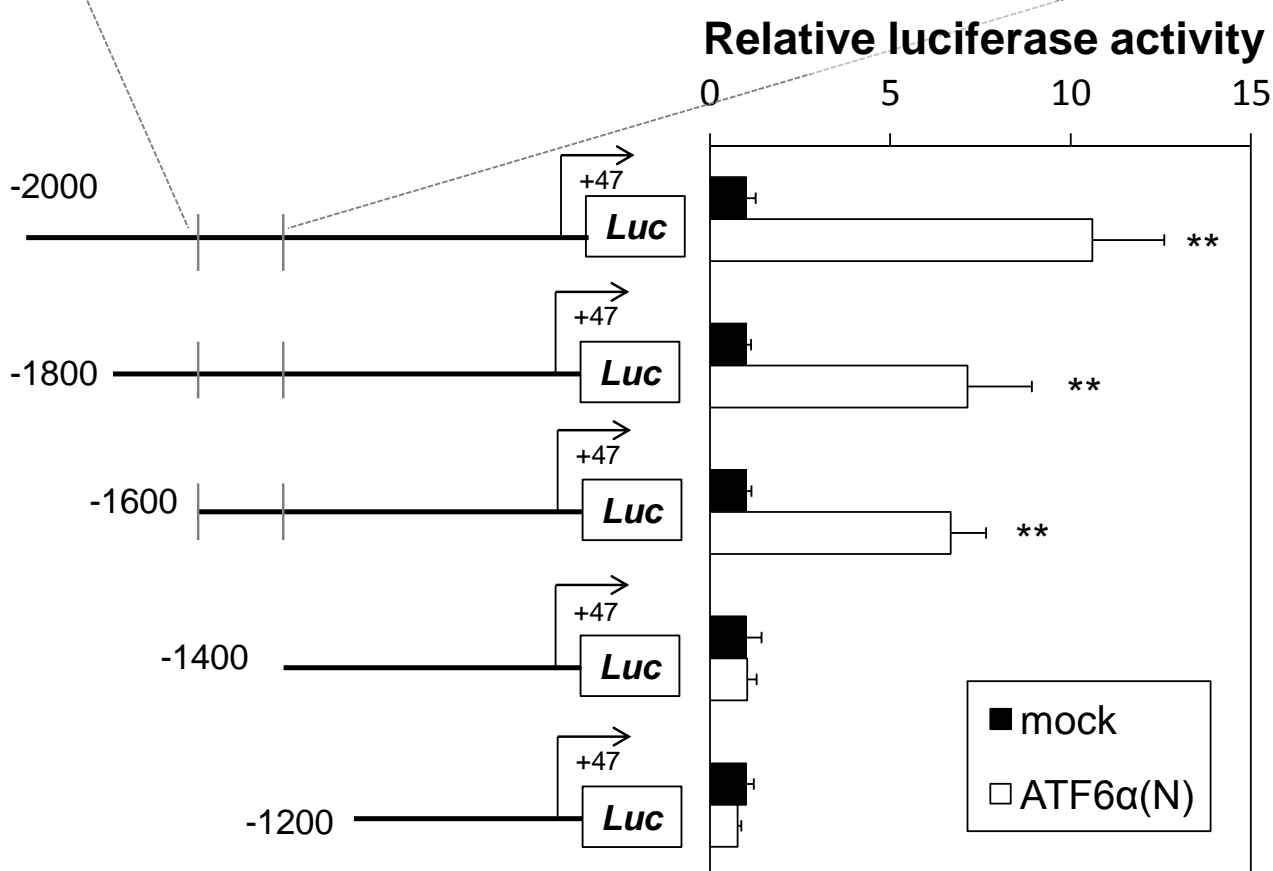
C2C12細胞を12 well-plateに播種し24時間培養した後、リン酸カルシウム法によりpCMV-β-gal plasmid(200 ng/well)、TGR5 promoter(2000 bp)-Luc plasmid(200 ng/well)、ならびに小胞体ストレス応答性転写因子を発現する種々のplasmid(100 ng/well)を導入し、更に24時間培養した。

細胞はLysis bufferで溶解し、溶解液をLuciferase assayおよびβ-gal assayに用いた。グラフはLuciferase assayの値をβ-galの値で補正し、mockを1として平均値±標準偏差で示した。\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。

### TGR5 5' upstream (-1600 - -1400)

```

acacc  accca  ggttt  catga  tgtag  ccgac
tgcta  gggaa  gggtt  cactt  acaca  ggagg
gggag  ccctc  ccagt  aaaag  cagtc  aggat
gtgcc  acgtc  ccacc  cccag  aggcg  gagcc
aagac  tgagg  tcctt  cagct  tggac  tcctc
catcc  cttca  ggagt  ccagg  ccagg  ccaga
gtctg  agcag  gcaag  cctgg
  
```

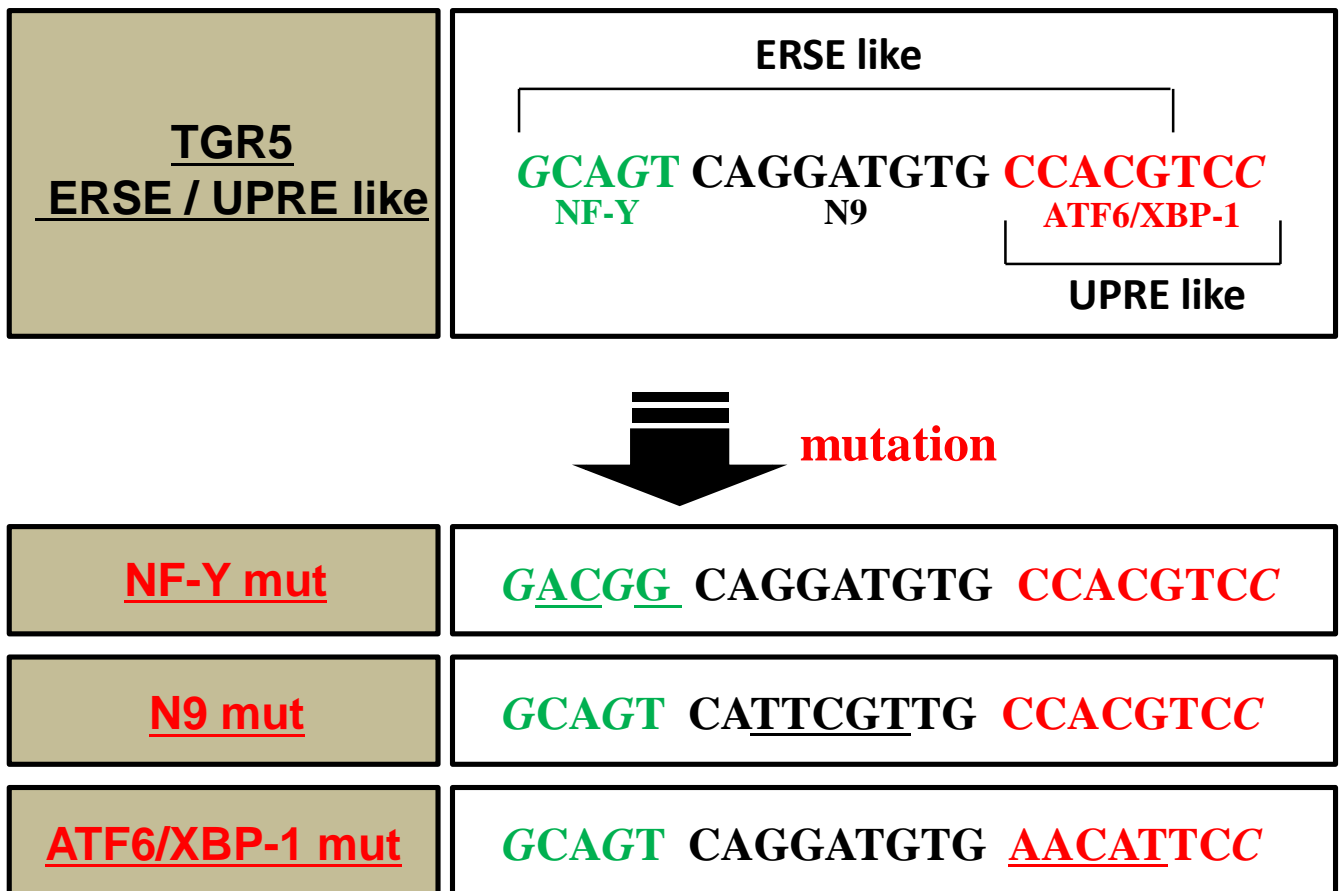


**Fig.3-3 ルシフェラーゼアッセイによるATF6α結合領域の絞り込み**

C2C12細胞を12 well-plateに播種し24時間培養した後、リン酸カルシウム法によりpCMV-β-gal plasmid (200 ng/well)、ATF6α(N)発現plasmid (100 ng/well)、ならびに種々のTGR5 promoter-Luc plasmid (200 ng/well)を導入し、更に24時間培養した。

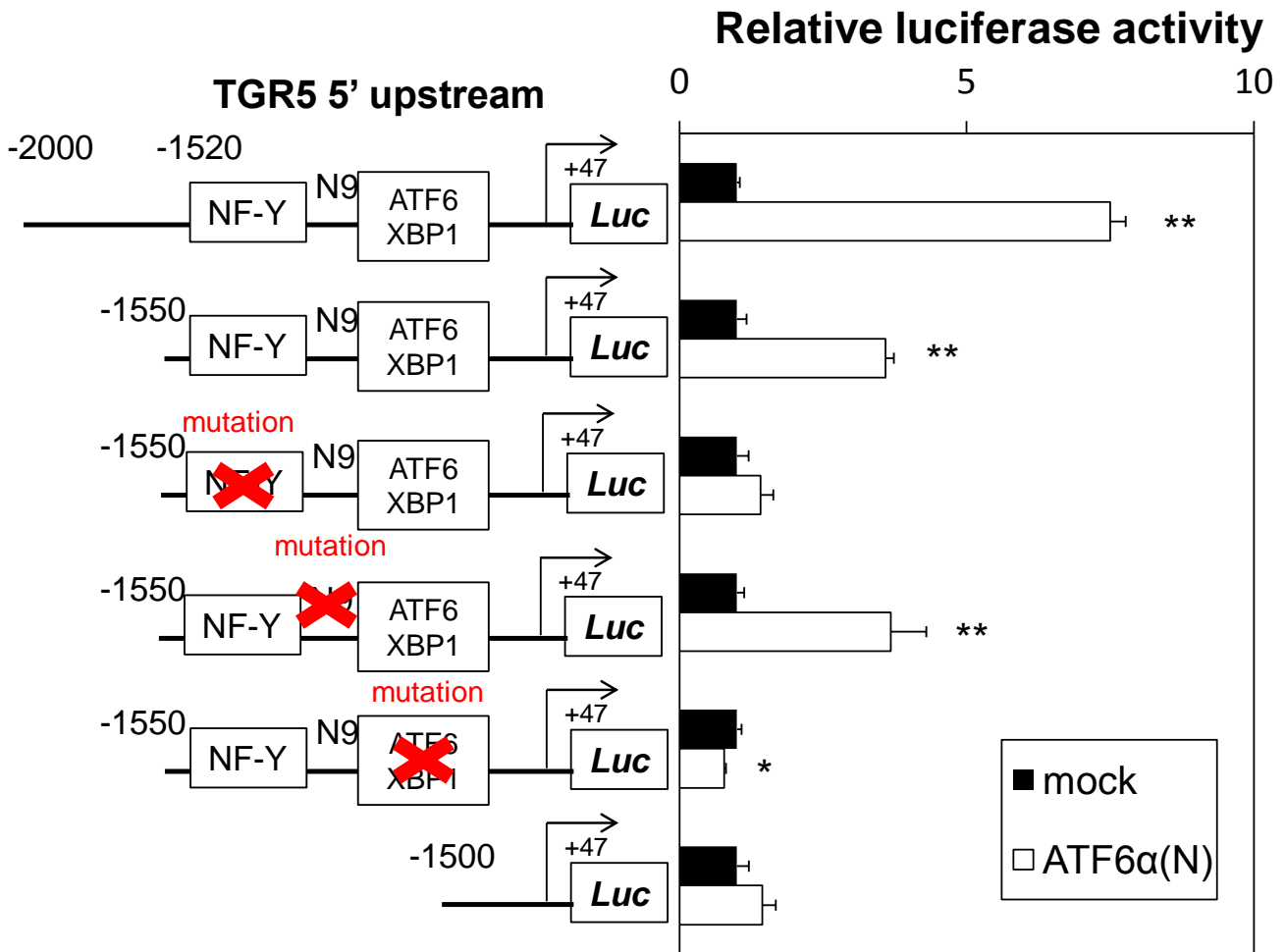
細胞はLysis bufferで溶解し、溶解液をLuciferase assayおよびβ-gal assayに用いた。グラフはLuciferase assayの値をβ-galの値で補正し、mockを1として平均値±標準偏差で示した。\*\*は有意差P<0.01を示す。

TGR5 5'上流配列に存在するERSE / UPRE様配列は赤字で示した。



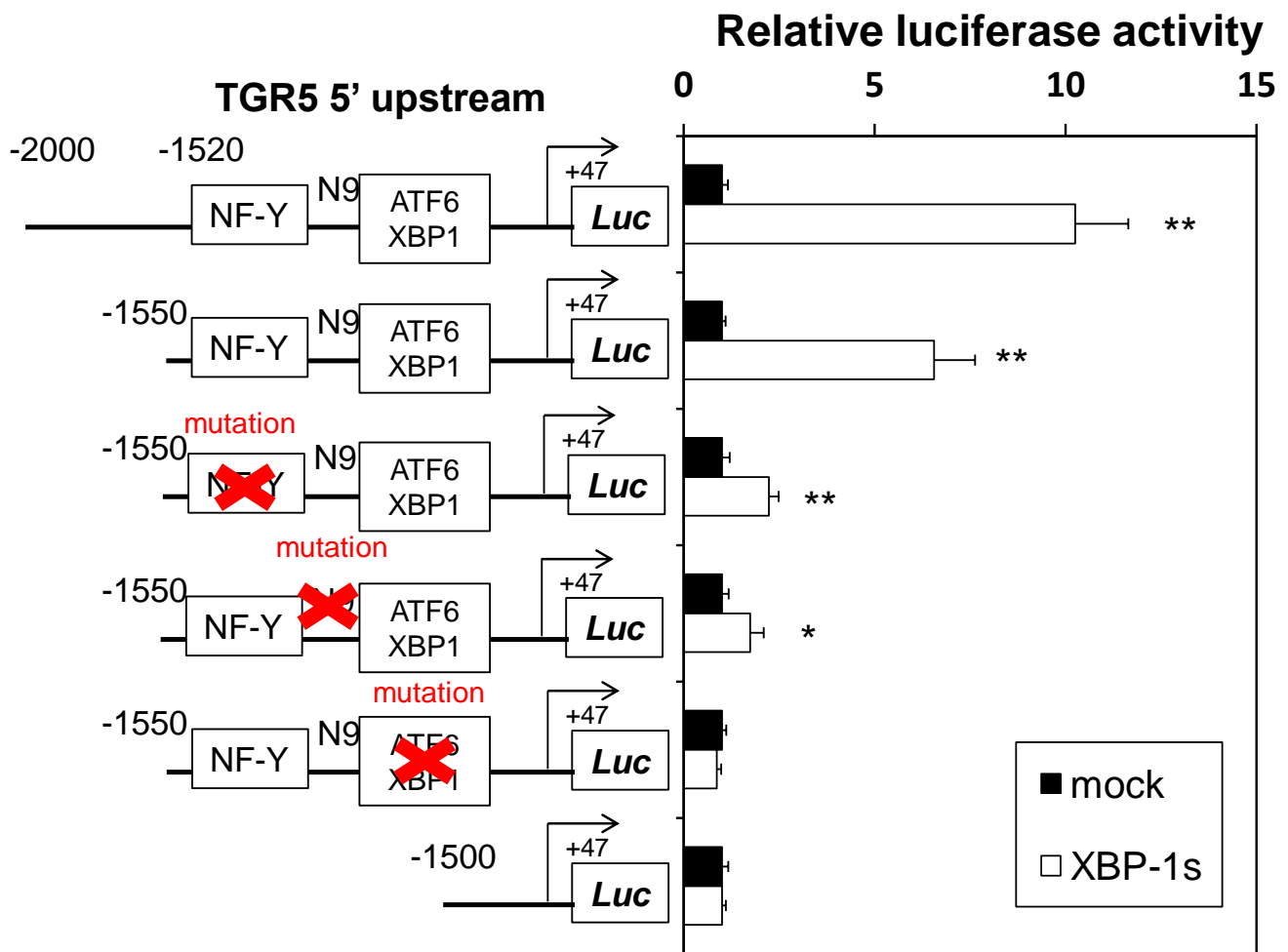
### Fig. 3-4 ERSE/UPRE様配列への変異導入

TGR5 promoter-Luc plasmidのERSE/UPRE様配列へは、図に示す通り変異を導入した。ERSEおよびUPREのコンセンサス配列と異なる部分は斜体で示し、変異導入個所は下線で示した。



### Fig.3-5 変異導入TGR5 promoter assayによるATF6α結合配列の同定

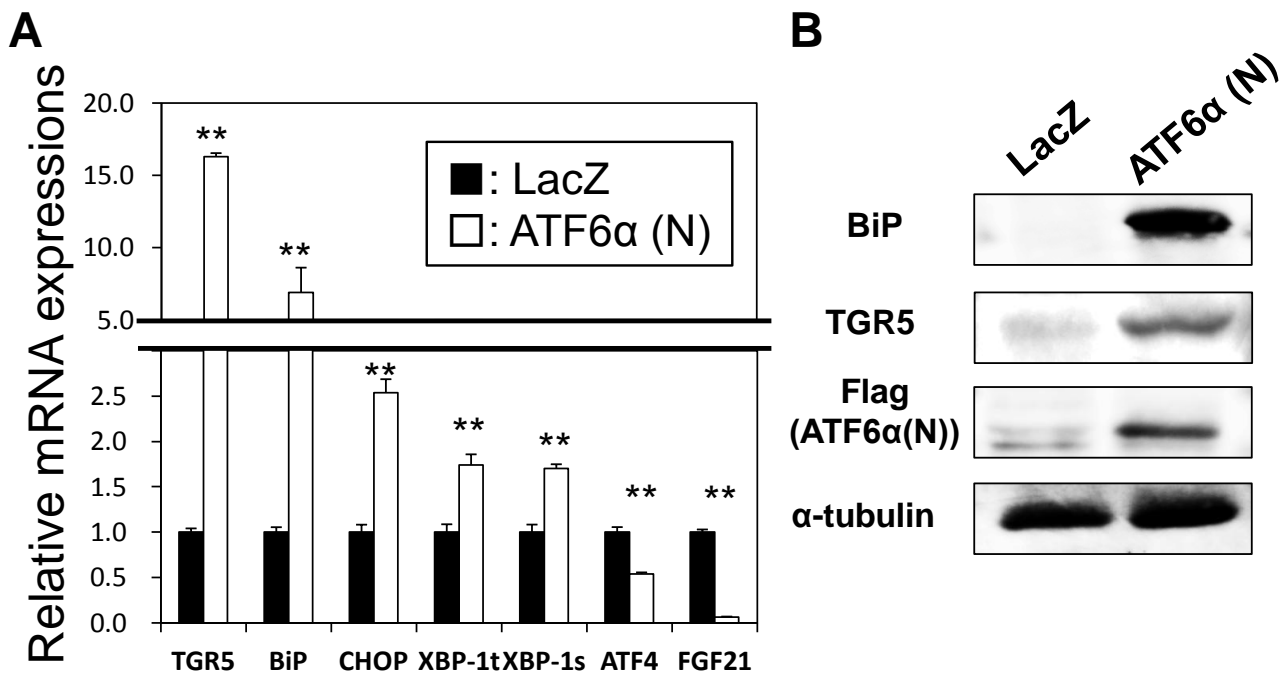
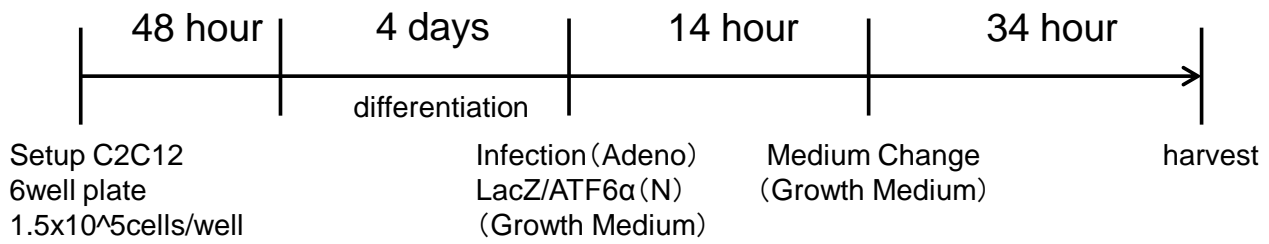
C2C12細胞を12 well-plateに播種し24時間培養した後、リン酸カルシウム法によりpCMV-β-gal plasmid (200 ng/well)、ATF6α(N)発現plasmid (100 ng/well)、ならびに種々のTGR5 promoter-Luc plasmid (200 ng/well)を導入し、更に24時間培養した。細胞はLysis bufferで溶解し、溶解液をLuciferase assayおよびβ-gal assayに用いた。グラフはLuciferase assayの値をβ-galの値で補正し、mockを1として平均値±標準偏差で示した。\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。



**Fig.3-6 変異導入TGR5 promoter assayによるXBP-1結合配列の同定**

C2C12細胞を12 well-plateに播種し24時間培養した後、リン酸カルシウム法により pCMV-β-gal plasmid (200 ng/well)、XBP-1s発現plasmid (100 ng/well)、ならびに種々のTGR5 promoter-Luc plasmid (200 ng/well)を導入し、更に24時間培養した。細胞はLysis bufferで溶解し、溶解液をLuciferase assayおよびβ-gal assayに用いた。グラフはLuciferase assayの値をβ-galの値で補正し、mockを1として平均値±標準偏差で示した。\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。



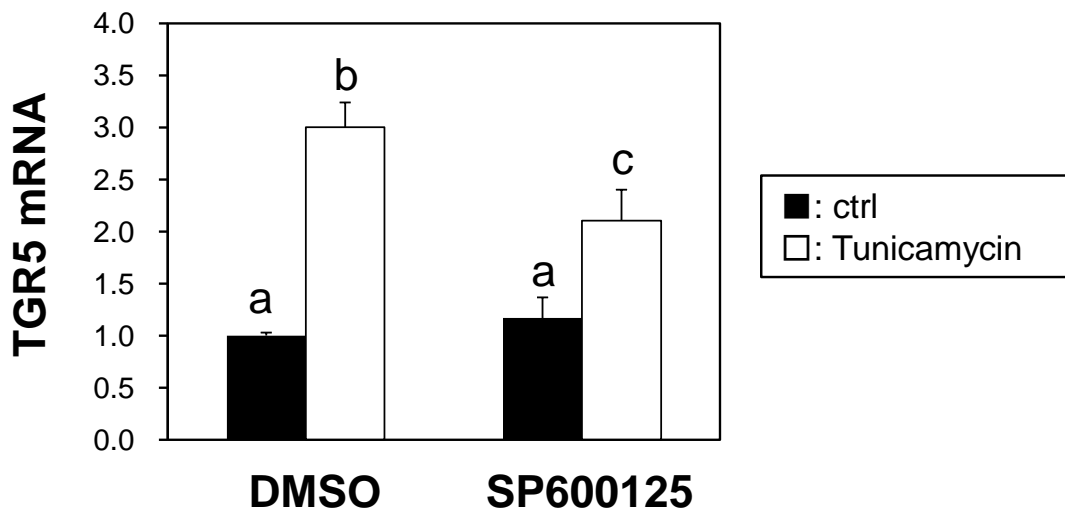


### Fig.3-7 ATF6α(N)の過剰発現による遺伝子発現変動

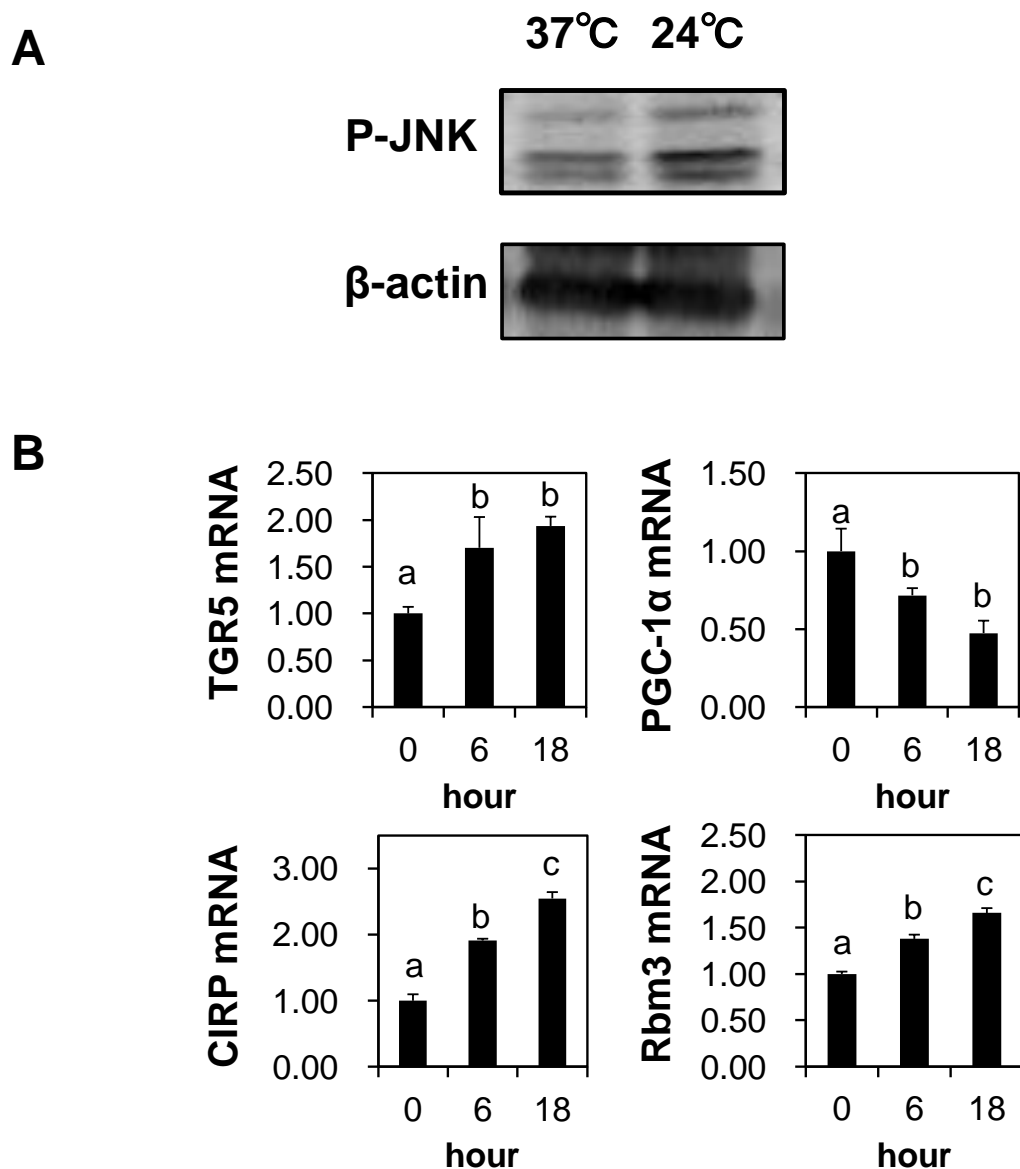
C2C12myotubeに対しLacZあるいはATF6α(N)を発現するアデノウイルスを感染させ、48時間後に細胞を回収した。

A: 回収した細胞からTotal RNAを抽出し、RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供し、mRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、LacZ群を1として、平均値±標準偏差で示した。\*\*は有意差P<0.01を示す。

B: 回収した細胞をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質サンプルはSDS-PAGEに供した後、anti-BiP抗体、anti-TGR5抗体、anti-Flag抗体、anti-α-tubulin抗体を用いてWestern blottingを行った。



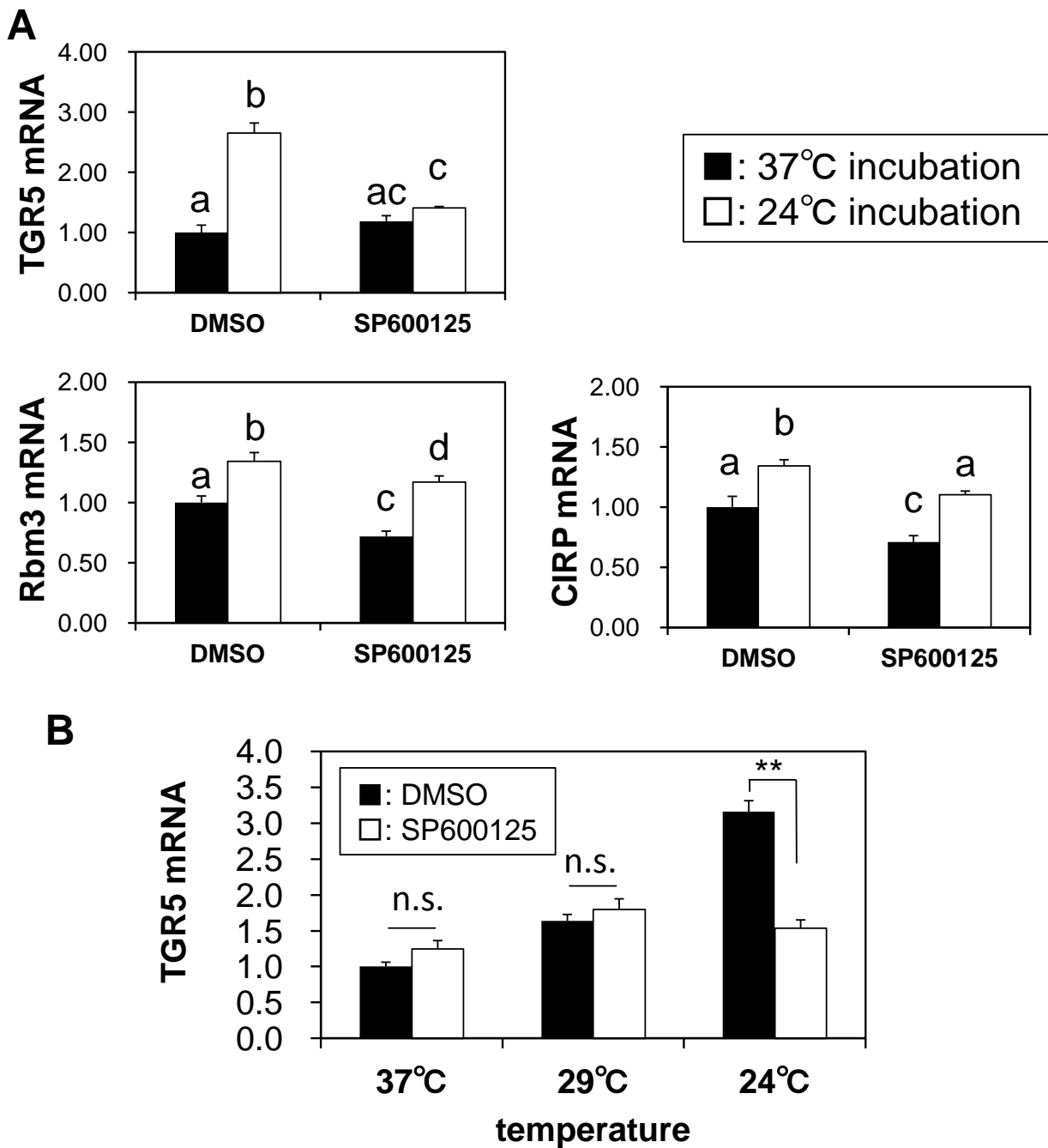
**Fig.3-8 JNK阻害剤SP600125がTunicamycinによるTGR5発現変動に及ぼす影響**  
 C2C12myotubeをSP600125 (終濃度 20 μM)の存在下あるいは非存在下で30分インキュベートした後、Tunicamycin (終濃度 2.5 μg/ml)または等量の溶媒を培地に加え、更に6時間インキュベートした。TGR5 mRNA量は18Sで補正し、SP600125、Tunicamycin不含群を1として、平均値±標準偏差で示した。異なる文字間で有意差 (P<0.05)。



### Fig.3-9 C2C12myotubeに対する低温刺激実験

A: C2C12myotubeを24°Cで9時間インキュベートした後、細胞を回収した。回収した細胞をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。これをSDS-PAGEに供した後、anti-P-JNK抗体、anti-β actin抗体を用いてWestern blottingを行った。

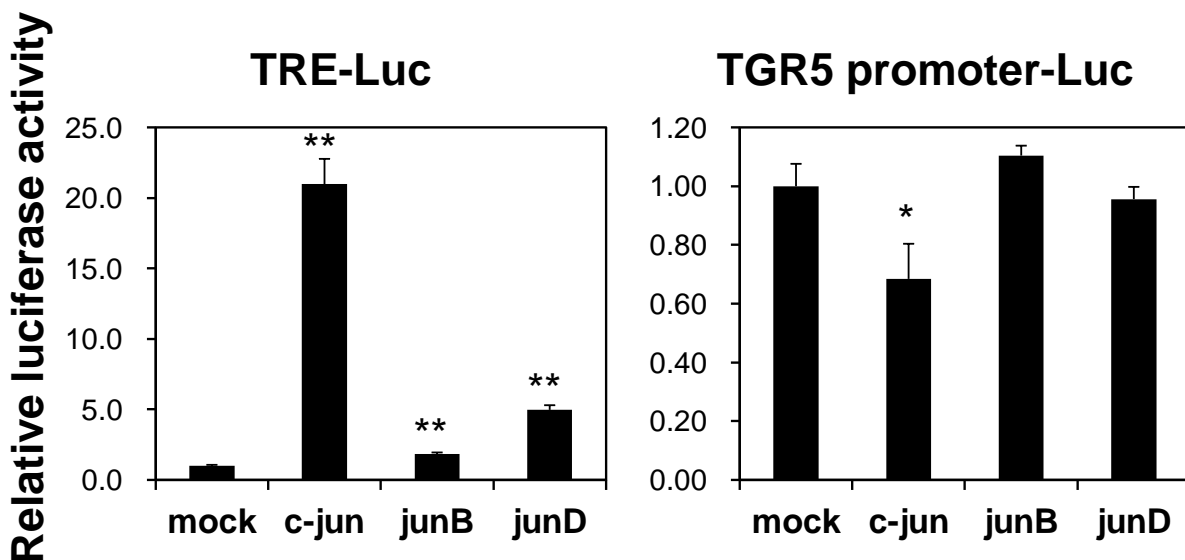
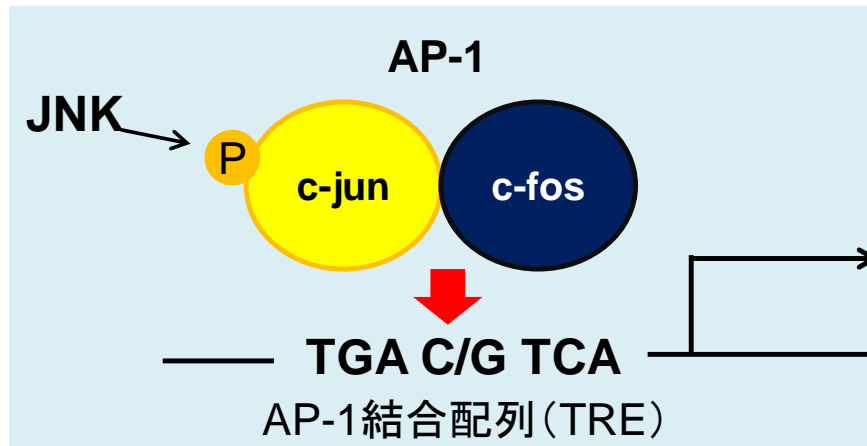
B: C2C12myotubeを24°Cでインキュベートし、0時間後、6時間後、および18時間後に細胞を回収した。細胞からTotal RNAを抽出し、RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供し、mRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、0時間群を1として、平均値±標準偏差で示した。異なる文字間で有意差 (P<0.05)。



### Fig.3-10 SP600125処理細胞への低温刺激実験

A: C2C12myotubeを終濃度30  $\mu$ MのSP600125、あるいは等量の溶媒を含む培地で30分前処理し、その後24°Cあるいは37°Cで12時間インキュベートした。その後細胞からRNAを回収し、Real-time qPCRによりmRNA量を測定した。異なる文字間で有意差 ( $P < 0.05$ )

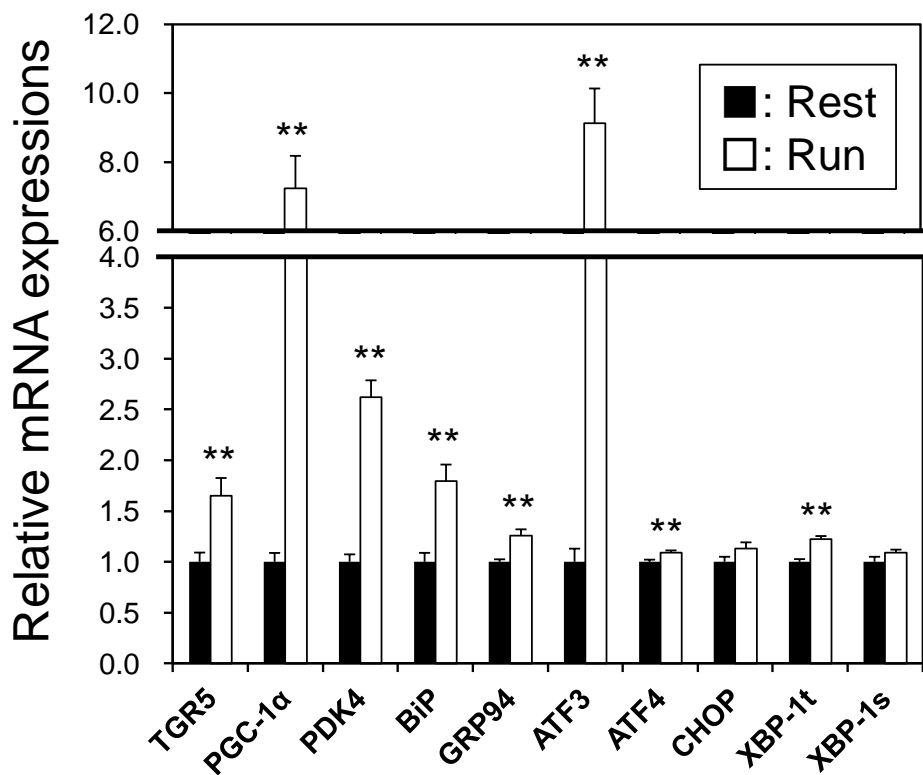
B: 終濃度30  $\mu$ MのSP600125で30分間処理したC2C12myotubeを37°C、29°C、または24°Cで12時間培養し、細胞を回収した。RNAを抽出し、Real-time qPCRによりmRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、37°C (DMSO) 群を1として、平均値±標準偏差で示した。\*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。



### Fig.3-11 Junタンパク質がTGR5プロモーター活性に及ぼす影響

C2C12細胞を12 well-plateに播種し12時間培養した後、リン酸カルシウム法により pCMV-β-gal plasmid (200 ng / well)、各種Jun family protein発現plasmid (200 ng/well)、ならびに種々のTRE-LucあるいはTGR5 promoter-Luc plasmid (200 ng / well)を導入し、更に24時間培養した。

細胞はLysis bufferで溶解し、溶解液をLuciferase assayおよびβ-gal assayに用いた。グラフはLuciferase assayの値をβ-galの値で補正し、mockを1として平均値±標準偏差で示した。\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。



### Fig.3-12 運動後の骨格筋におけるmRNA発現変動

8週齢のC57BL/6J (male) マウスをRest群とRun群の2群に分け、Run群に対し、以下に示す条件でトレッドミル走行運動を負荷した。

Treadmill (10% uphill);

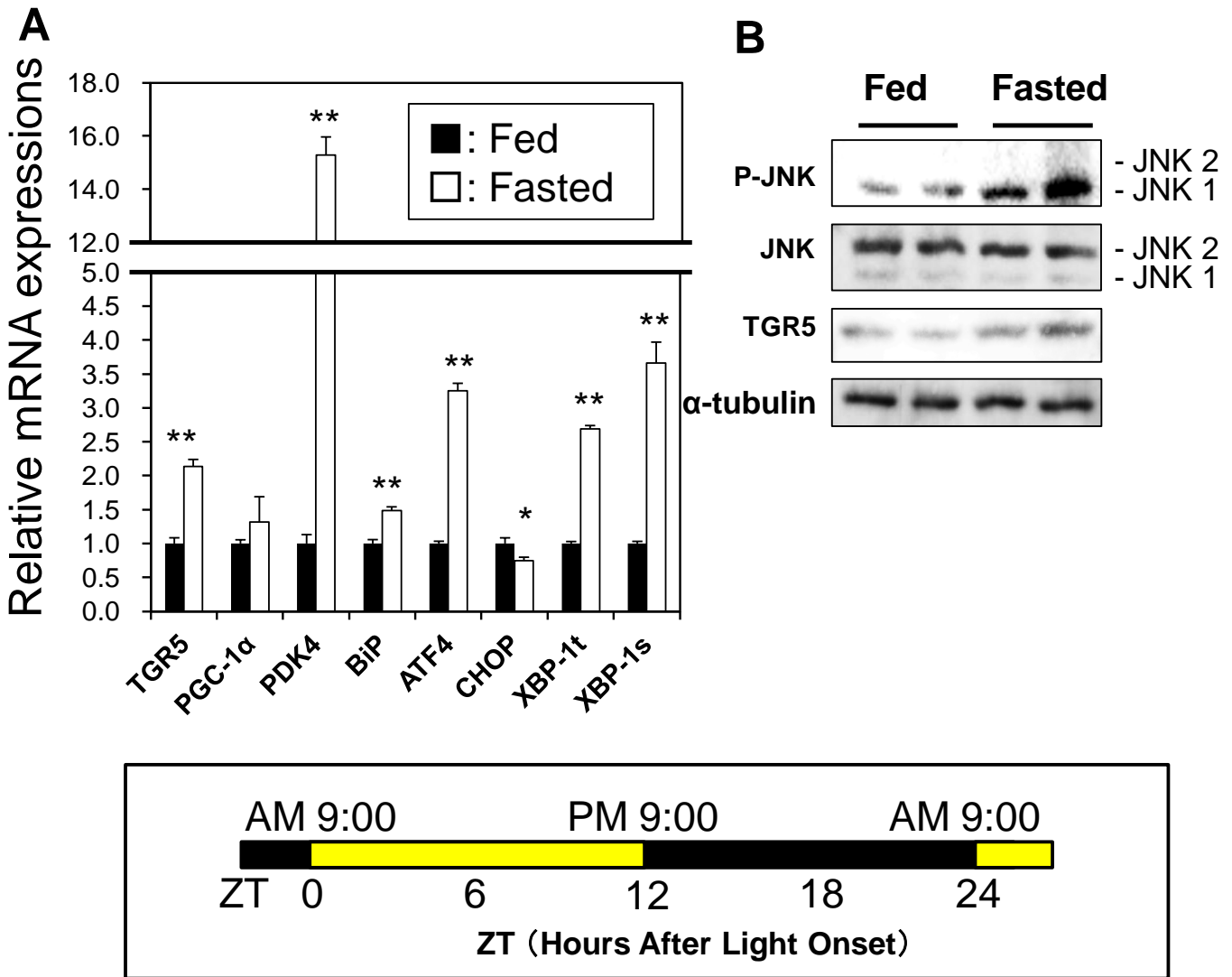
5 m/min (5 min) → 10 m/min (5 min) → 15 m/min (20 min) → 18 m/min (30 min)

計60分を走り切るか、疲労により走行困難になった時点(走行レーン後部の電極から走行レーンへ6秒以上復帰できなくなったら走行困難と判断)で走行負荷終了。5時間後に両群を解剖し、骨格筋(gastrocnemius muscle)を採取した。走行後の5時間は絶食、自由飲水とした。

その後骨格筋よりTotal RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、RestI群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=6)

\*\*は有意差P<0.01を示す。

## Fasted for 36 hours (ZT 13 - )



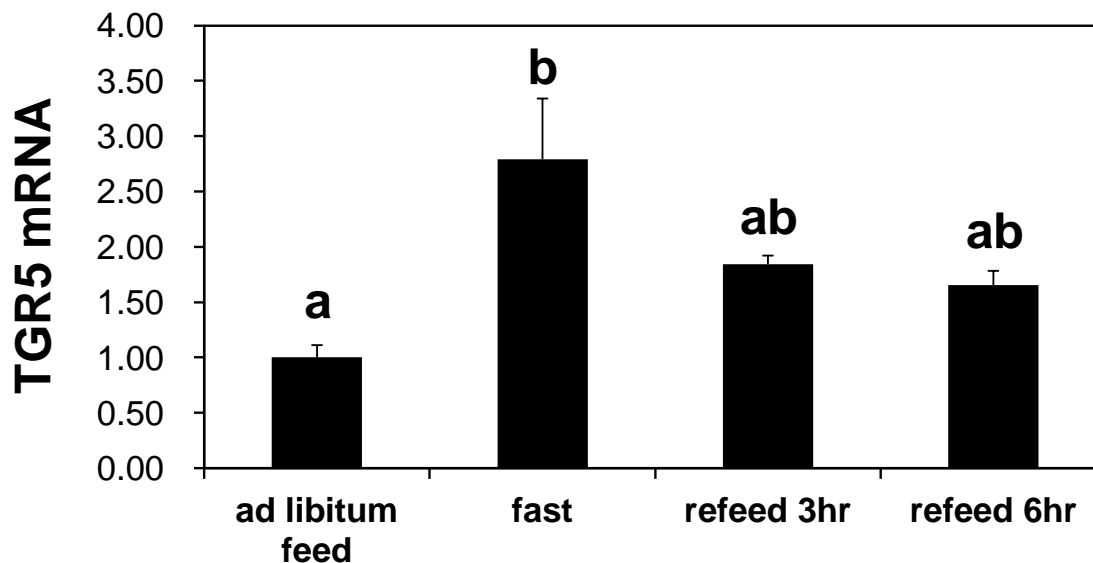
### Fig.3-13 絶食が骨格筋遺伝子発現に及ぼす影響

8週齢のC57BL/6J (male)マウスを6匹ずつランダムに2群に分け、一方の群は自由摂食 (Fed)、もう一方の群はZT13より36時間の絶食を負荷 (Fasted) した後、骨格筋 (gastrocnemius muscle) を採取した。

A: Total RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、Fed群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=6)

B: 回収した骨格筋をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、anti-P JNK抗体、anti-JNK抗体、anti-TGR5抗体、anti-α tubulin抗体を用いてWestern blottingを行った。

\*は有意差 $P < 0.05$ 、\*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。

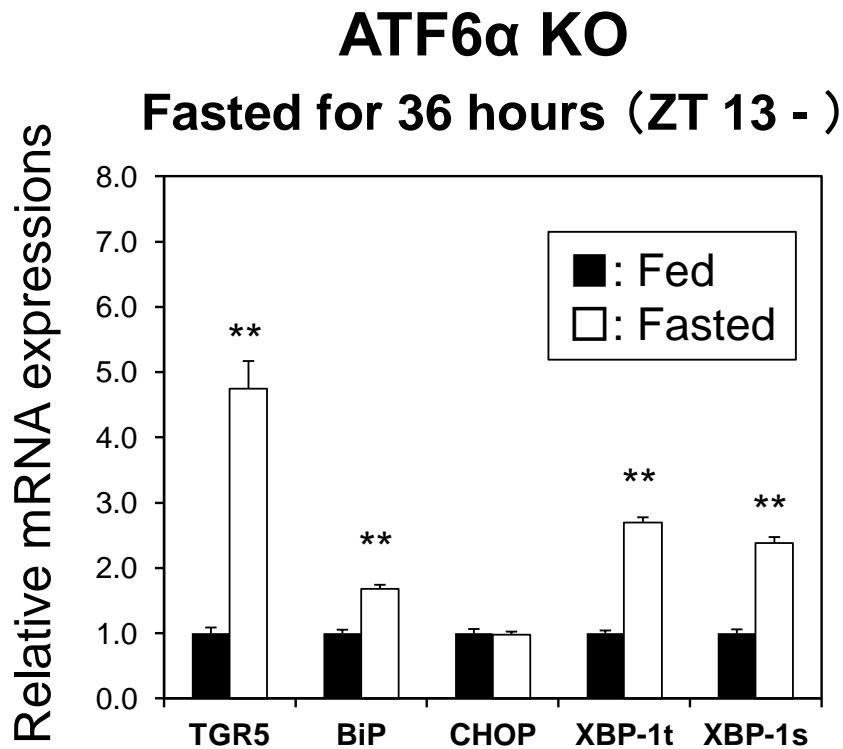


**Fig.3-14 絶食・再摂食による骨格筋TGR5 mRNA発現変動**

8週齢のC57BL/6J (male) マウスを6匹ずつランダムに4群に分けた。1つの群は自由摂食(ad libitum feed)とし、他の群は24時間の絶食を負荷した。絶食群(Fast)は絶食負荷直後に骨格筋(gastrocnemius muscle)を採取し、残りの群はその時点から再摂食を開始し、再摂食から3時間後(refeed 3 hr)および6時間後(refeed 6 hr)に骨格筋を採取した。

骨格筋からtotal DNAを抽出し、RT反応により得られたcDNAをReal-Time qPCRに供しmRNA量を測定した。TGR5 mRNAの値は18Sで補正し、ad libitum feed群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=6)

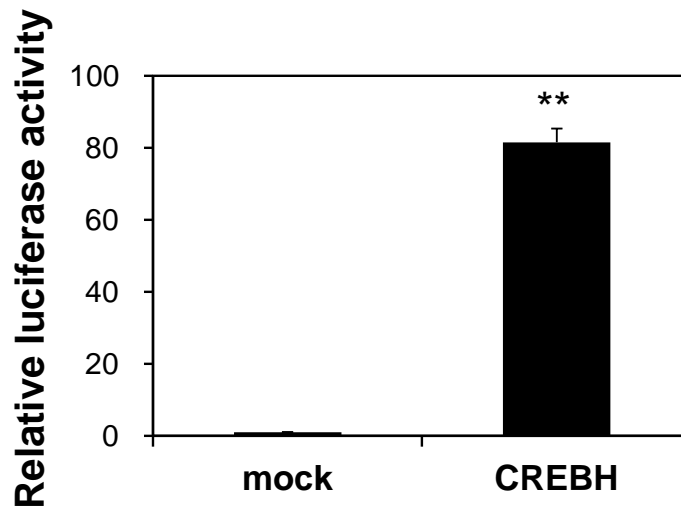
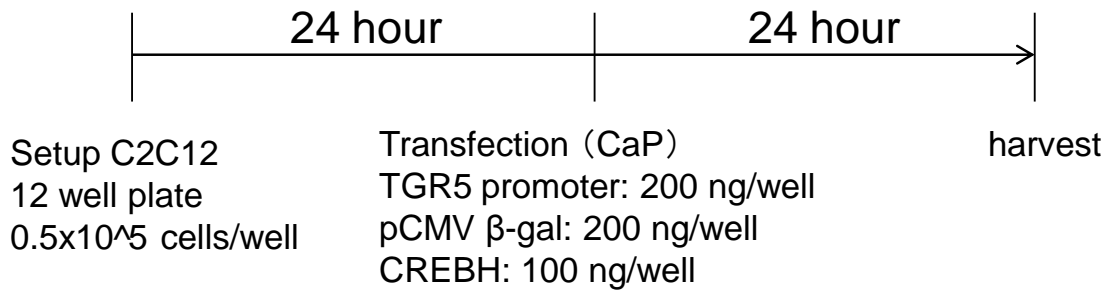




**Fig.3-15 ATF6 $\alpha$  KOマウスに対する絶食負荷が骨格筋遺伝子発現に及ぼす影響**

8-9週齢のATF6 $\alpha$  KOマウスを5匹ずつランダムに2群に分け、一方の群は自由摂食とし(Fed)、もう一方の群はZT13より36時間の絶食を負荷(Fasted)した後、骨格筋(gastrocnemius muscle)を採取した。その後Total RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、Fed群を1として、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。(n=5)

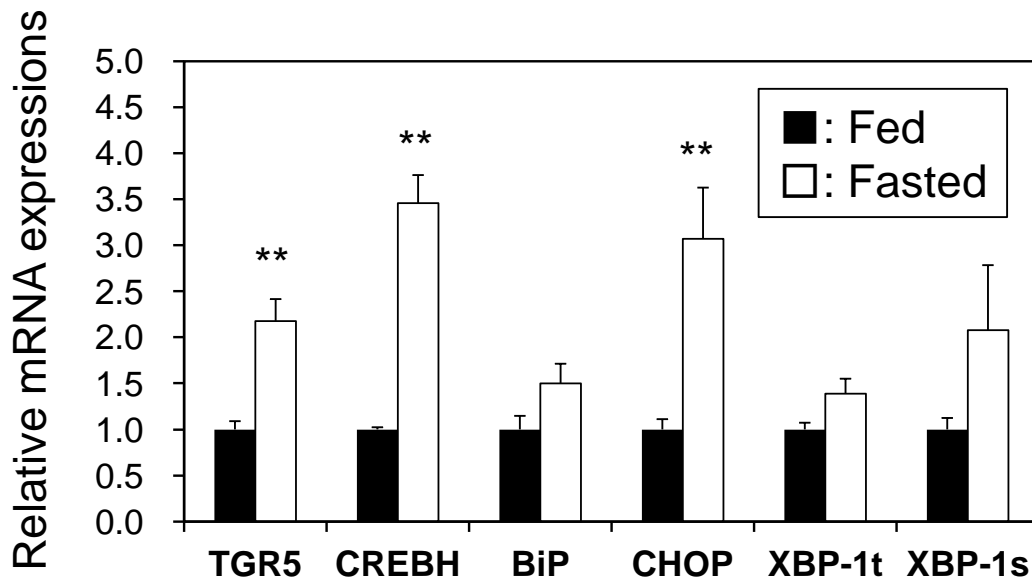
\*\*は有意差P<0.01を示す。



### Fig.3-16 CREBH(N)がTGR5プロモーター活性に及ぼす影響

C2C12細胞を12 well-plateに播種し24時間培養した後、リン酸カルシウム法により pCMV-β-gal plasmid(200 ng/well)、TGR5 promoter(2000 bp)-Luc plasmid(200 ng/well)、ならびにCREBH(N) plasmid(100 ng/well)を導入した。

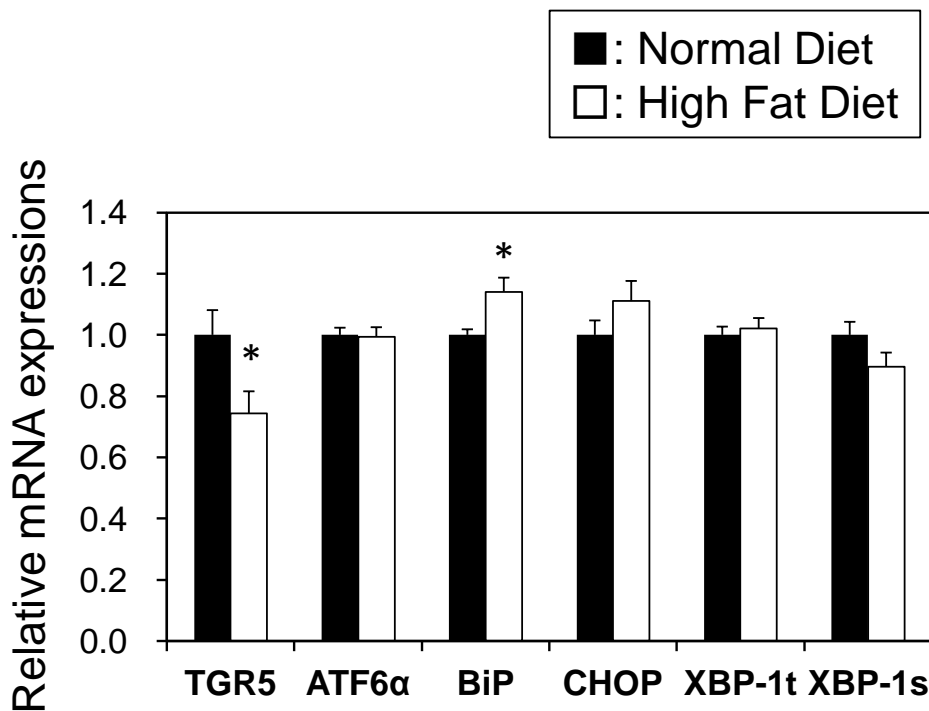
24時間後に細胞をLysis bufferで溶解し、溶解液をLuciferase assayおよびβ-gal assayに用いた。グラフはLuciferase assayの値をβ-galの値で補正し、mockを1として平均値±標準偏差で示した。\*\*は有意差P<0.01を示す。



### Fig.3-17 絶食後の肝臓におけるmRNA発現変動

8週齢のC57BL/6J (male)マウスを6匹ずつランダムに2群に分け、一方の群は自由摂食 (Fed)、もう一方の群はZT13より36時間の絶食を負荷 (Fasted) した後、肝臓を採取した。採取した肝臓よりTotal RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、Fed群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=6)

\*は有意差 $P < 0.05$ 、\*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。

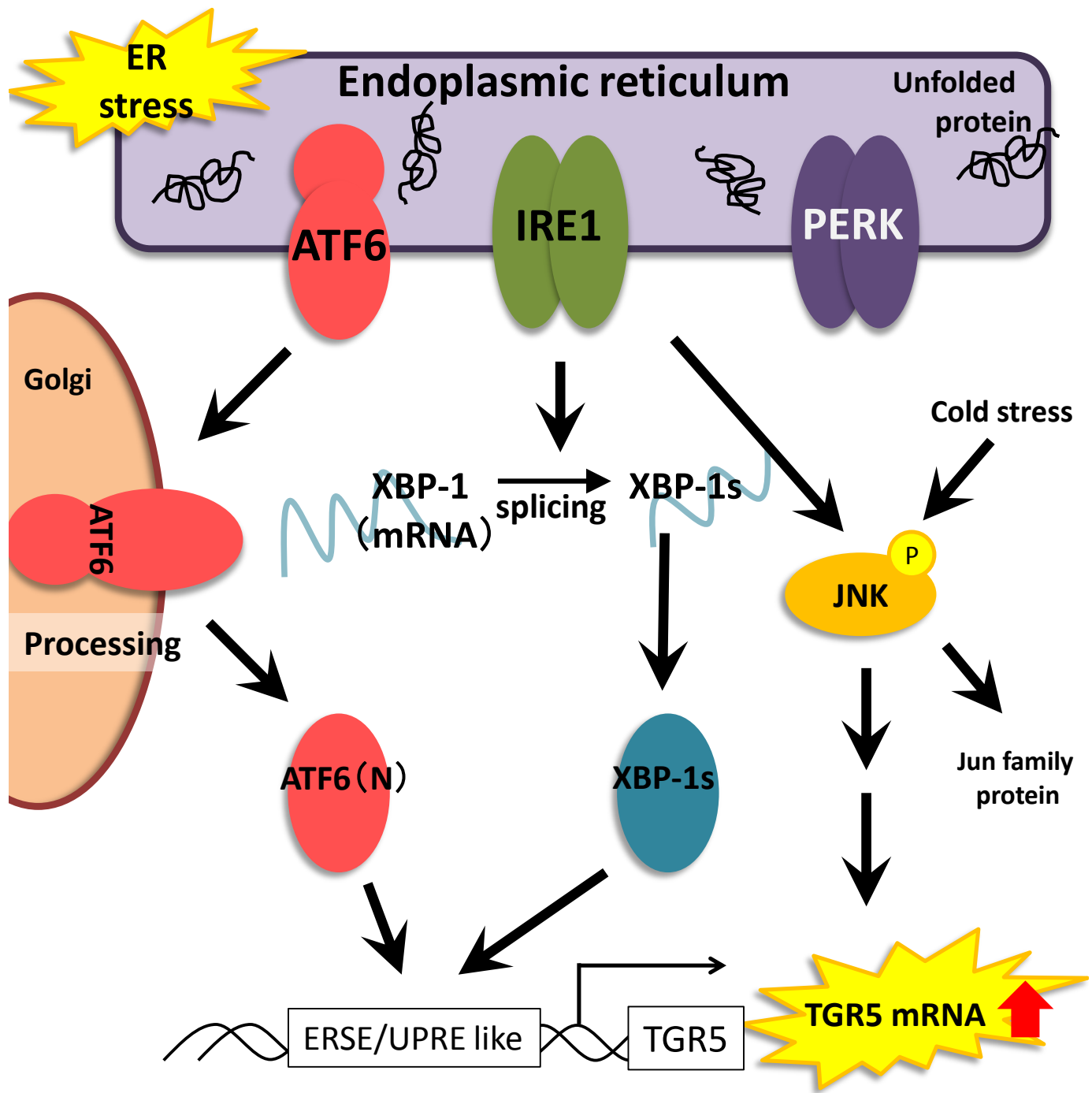


### Fig.3-18 長期HFD投与後の骨格筋におけるmRNA発現変動

6週齢のC57BL/6J (male) マウスを7-8 匹ずつランダムに2群に分け、一方の群は通常食 (Normal Diet)、もう一方の群は高脂肪食 (High Fat Diet) で15週間飼育し、骨格筋を採取した。

採取した骨格筋よりTotal RNAを抽出し、RT反応によりcDNAを得た。mRNA発現変化はReal-time qPCRにより測定した。それぞれの値は18Sで補正し、Normal Diet 群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n =7-8)

\*は有意差 $P < 0.05$ を示す。



**Fig.3-19**

本章で明らかになったUPRによるTGR5発現調節の分子メカニズム

## 第四章

### 骨格筋における TGR5 の機能解析

#### 4-1. 緒言

前章では TGR5 の骨格筋における発現調節機構の解析を行い、いくつかの興味深い結果を得る事が出来た。しかし骨格筋で TGR5 が発現上昇する事にどのような意義が有るのかについては不明な点が多い。特に *in vivo* での解析は不足しており、骨格筋 TGR5 が生体で代謝改善に寄与すると言う決定的な証拠は未だ存在しない。

そこで本章では骨格筋特異的に TGR5 を過剰発現したトランスジェニックマウスを作出し、そのフェノタイプ解析を中心に骨格筋における TGR5 の機能解明を目指した。

#### 4-2. 実験材料および手法

##### 実験材料

##### ・細胞培養試薬および細胞投与試薬

第二章、第三章と共通する試薬に関しては、2-2. 3-2. に準じる。

TLCA (tauroolithocholic acid)、HBSS (粉末) は Sigma より購入した。

その他、特に指定の無い試薬に関しては、Wako、ナカライテスク、SIGMA の特級、生化学実験用のものを用いた。

##### ・抗体

本章で新たに使用する抗体のみ以下に示す。

抗 S6K 抗体 (1: 1000)、抗 Phospho-S6K (Thr 389) 抗体 (1: 1000)、抗 Akt 抗体 (1: 1000)、抗 Phospho-Akt 抗体 (1: 1000)、抗 IRS1 抗体 (1: 1000)、抗 Phospho-IRS1 (Ser 307) 抗体 (1: 1000) は cell signaling より購入した。抗 MyHC (MF-20) 抗体は R&D systems より購入した。抗マウス IgG (FITC) 抗体は Jackson Immuno Research より購入した。

ウエスタンブロッティングを行う際は、括弧内の濃度に希釈して用いた。

### ・プラスミド

<ルシフェラーゼアッセイ用プラスミド>

[pGL4-CRE-Luc]

Invitrogen より購入した。

<トランスジェニックマウス作製用プラスミド>

[pBS-MCK promoter]

Addgene より購入した (Plasmid #12528)。

[pBS-MCK promoter-3×Flag -hTGR5]

以前当研究室で作製された pCMV-3×Flag-hTGR5 を鋳型として、5'末端 *EcoRI*、3'末端に *BamHI* の制限サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応を行い、pBS-MCK promoter の *EcoRI* / *BamHI* サイトに挿入した。

<アデノウイルス用プラスミド>

[pAd-CMV-3×Flag-hTGR5]

pCMV-3xFlag-hTGR5 を鋳型として、5'末端に *BglII*、3'末端に *NotI* の制限サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応を行い、pENTR-1A の *BglII* / *NotI* サイトに挿入した。このベクターと pAd-CMV-V5-DEST を Gateway LR clonase (Invitrogen) により組み換える事で目的のアデノウイルスベクターを得た。

## 細胞培養試薬の調製

### ・ TLCA

DMSO に溶解し、100 mM で-20°C保存した。

### ・ チャコール処理 FBS および HS

-20°Cで凍結した血清を室温で融解した後、56°Cで30分間インキュベートする事で補体成分の非働化処理を行った。その後、Charcoal, Dextran Coated (SIGMA)



を 10 g 加え、4°Cで一晩穏やかに攪拌した。3,500 rpm、4°Cで 30 分間遠心分離し、フィルター滅菌した後 50 ml チューブに分注し、-20°Cで保存した。

その他の試薬調製は 2-2.および 3-2.に準じた。

### 初代培養筋衛星細胞の調製と分化誘導

#### ・コラゲナーゼ溶液

HBSS (粉末、含フェノールレッド) : 490 mg

HEPES: 119 mg

NaHCO<sub>3</sub> (sodium hydrogen carbonate) : 17.5 mg

これらを約 40ml の ddw に溶解し、コラゲナーゼを 100 mg 加え、スターラーで 1 時間程度攪拌した。1N 以下の NaOH で pH 7.5 に調整し、ddw で 50 ml にメスアップ。最後にフィルター滅菌を行った。

#### ・ Growth medium (GM)

DMEM (High Glucose) , 20% FBS, P/St

#### ・ Differentiation medium (DM)

DMEM (High Glucose) , 5% HS, P/St

6-8 週齢のマウス後肢より腓腹筋、大腿四頭筋を採取し、PBS で wash した。この際、ピンセットを用いて結合組織や脂肪組織を出来る限り丁寧に除いた。筋組織を一辺 1-2 mm 程度になるまでミンスし、コラゲナーゼ溶液に浸した。これを 37°Cで 60 分間、穏やかに攪拌しながらインキュベートし、その後 20 回程度ピペッティングを行う事で組織を懸濁した。これを 400×g で 6 分間遠心し、上清を除いた。ここに 5 ml の GM を加え、ピペッティングにより攪拌した後、再び 400×g で 6 分間遠心。上清を除き、得られたペレットに 5 ml の GM を加え懸濁。セルストレイナーでフィルターろ過し、得られた細胞をコラーゲンコートした 12 well プレートに播種した。

細胞が 80-90 % confluency に達した時点で DM に交換し、分化誘導を開始した。DM は 2 日毎に交換し、4 日間分化誘導を行う事で筋管細胞を得た。

## 細胞培養

必要に応じて、培地に含まれる FBS や HS をチャコール処理している。  
その他は 2-2.3-2. に準じた。

## C2C12 細胞の免疫染色（ミオシン重鎖）

まず細胞を PBS で 2 回 wash し、4% パラホルムアルデヒド（PBS）で 15 分間固定処理した。PBS で wash し、0.5% Triton X-100（PBS）を加え、5 分間インキュベートする事で透過処理を行った。再び PBS で wash し、3% BSA 溶液（PBS）で 60 分ブロッキングを行った。続いて 3% BSA 溶液に抗 MyHC（MF-20）抗体を 1/100 希釈した溶液で 60 分間一次抗体処理を行った。PBS で wash した後、3% BSA 溶液に抗マウス IgG（FITC）抗体を 1/200 希釈した溶液で 30 分間、遮光しながら二次抗体処理を行った。PBS で wash した後、DAPI を含む封入剤を用いて封入し、蛍光顕微鏡を用いて撮影した。

## アデノウイルスによる遺伝子導入

3-2. に準じた。

## RNA 抽出

2-2. に準じた。

## 逆転写反応（Reverse Transcription; RT）

2-2. に準じた。

## Real-time PCR

2-2. に準じた。

なお、本章で新たに使用するプライマーは以下に示す。その他の遺伝子は、全て TaqMan<sup>®</sup> probe で測定した。

Atrogin1	Sense:	5'- GCAAACACTGCCACATTCTCTC -3'
	Antisense:	5'- CTTGAGGGGAAAGTGAGACG -3'
IGF-1	Sense:	5'- GGTGGATGCTCTTCAGTTCGT-3'
	Antisense:	5'- AGTACATCTCCAGTCTCCTCAGATCA-3'

MEF2A	Sense:	5'- ACACGCATAATGGATG AGAGGAACCGAC-3'
	Antisense:	5'- CAACGATATCCGAGTT CGTCCTGCTTTC-3'
MEF2C	Sense:	5'-AGATACCCACAACACACCACGCGCC -3'
	Antisense:	5'-ATCCTTCAGAGAGTCGCATGCGCTT -3'
MuRF1	Sense:	5'- ACCTGCTGGTGGAAAACATC -3'
	Antisense:	5'- CTTCGTGTTTCCTTGACATC -3'
Sik1	Sense:	5'- TCCACCACCAAATCTCACCG -3'
	Antisense:	5'- GTTTCGGCGCTGCCTCTTC -3'

#### ウエスタンブロッティング

2-2.に準じた。

#### アガロースゲル電気泳動

2-2.に準じた。

#### アガロースゲルからの DNA 断片回収

2-2.に準じた。

#### 制限酵素処理

2-2.に準じた。

#### ライゲーション

2-2.に準じた。

## 大腸菌の形質転換（トランスフォーメーション）

2-2.に準じた。

## プラスミドミニプレップ（粗精製）

2-2.に準じた。

## プラスミドラージプレップ（細胞内遺伝子導入用）

2-2.に準じた。

## ルシフェラーゼアッセイ

3-2.に準じた。

## トランスジェニックマウスの作出

pBS-MCK promoter-3×Flag -hTGR5 を *XmnI* で処理し直鎖状にした後、日本エスエルシー株式会社に委託しマイクロインジェクション法によりトランスジェニックマウス（C57BL/6 系統）を得た。

## Genotyping

マウスの尾組織を 1-3 mm 程度採取し、1.5 ml チューブ中で 300  $\mu$ l の 50 mM NaOH を加え、時折攪拌しながら 95°C で 30-60 分間インキュベートした。1M Tris-HCl (pH 8.0) を 30  $\mu$ l 加えて混和し、13,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。得られた上清を DNA 溶液とした。

DNA 溶液を以下に示すプライマーを用いて PCR 反応に供し、反応後の溶液をアガロースゲルで電気泳動する事により遺伝子型を判別した。

### •Control primer (mTGR5, 847 bp)

Sense	5'-CTAGCAACAGCAGATGCTCCTG -3'
Antisense	5'-TCTTGGCACATGGAGGGTCC -3'

### •Transgene primer (3xflag hTGR5, 491 bp)

Sense	5'- TGGACTACAAAGACCATGACGGTG -3'
Antisense	5'- CAGACTGGCAAAGAGCAGG -3'

## マウスを用いた動物実験

### ・飼育条件

2-2.に準じた。

トランスジェニックマウスに関しては、全てヘテロで維持した。

### ・実験条件

<A line トランスジェニックマウスの通常飼育下でのフェノタイプ解析>

オスの A line トランスジェニックマウス (n=10) および同腹仔の野生型マウス (n=8) を 4 週齢より通常食で単頭飼育した。8 週齢に達した時点で体重を測定し、経口糖負荷試験 (oral glucose tolerance test: OGTT) を行った。

また 8 週齢における組織重量を測定したが、これは飼育条件は同一であるが OGTT を行っていない別の群のマウスを用いた (n=8-10)。

<A line トランスジェニックマウスへの長期抗脂肪食負荷試験>

オスの A line トランスジェニックマウス (n=13) および同腹仔の野生型マウス (n=12) に対し、4 週齢に達した時点で高脂肪食 (60 kcal% Fat, High fat diet: HFD) (Research diets) の投与を開始した。4 日毎に体重及び摂食量を測定し、摂食量を測定時の体重で除し、一日当たり、体重当たりの摂食量を算出した。HFD 投与から 8 週間後に OGTT を行い、更に 3 週間後にインスリン負荷試験 (insulin tolerance test: ITT) を行った。ITT から 20 日後、4 時間の絶食を挟みマウスの解剖を行った。得られた組織は直ちに液体窒素で凍結し、実験に用いるまで -80°C で保管した。

<B line トランスジェニックマウスへの長期抗脂肪食負荷試験>

オスの B line トランスジェニックマウス (n=10) および同腹仔の野生型マウス (n=8) を 4 週齢に達した時点で通常食飼育を開始し、30 日後から HFD 投与を行った。通常食飼育時は 5 日に 1 度、HFD 飼育時は 4 日に 1 度体重及び摂食量を測定した。HFD 投与開始から 10 週間後に OGTT を実施し、更に 3 週間後に ITT を行った。ITT から 4 週間後に、4 時間の絶食を挟みマウスの解剖を行った。回収した組織はすぐに液体窒素で凍結し、実験に用いるまで -80°C で保管した。

### ・OGTT

OGTT を行うマウスは前日の 20:00 より絶食とし、16 時間後から OGTT を開

始した。生理食塩水（大塚製薬）20 ml に対しグルコースを 4 g 溶解し、これをマウスの体重 1 g あたり 10  $\mu$ l 経口投与した。0、15、30、60、120 分後に尾静脈より血液を採取し、ブリーズ 2（Bayer）を用いて経時的に血糖値を測定した。

#### ・ITT

生理食塩水 20 ml に対しインスリン（humulin R100）（Eli Lilly）を 15  $\mu$ l 加えた溶液を、11:00 より 6 時間絶食処理を行ったマウスに体重 1 g あたり 10  $\mu$ l 腹腔内投与した（0.75 IU insulin/g BW）。0、20、40、60、90、120 分後に尾静脈より血液を採取し、ブリーズ 2 を用いて経時的に血糖値を測定した。

#### ・血中成分の測定

血中成分の測定には以下のキットを使用した。

<血糖値>

グルコース CII テストワコー（Wako）

<血中 TG 値>

トリグリセリド E-テストワコー（Wako）

<血中遊離脂肪酸値>

NEFA C-テストワコー（Wako）

<インスリン値>

レビス<sup>®</sup>インスリン-マウス T（シバヤギ）

#### 統計処理

2-2.に準じた。

### 4-3. 実験結果

#### 骨格筋特異的 3×Flag hTGR5 発現トランスジェニックマウスの作出

TGR5 の骨格筋における機能を解析するにあたり、まず骨格筋特異的に 3×Flag hTGR5 を発現するトランスジェニックマウスを作出した。骨格筋特異的に TGR5 を発現させるために、MCK (Muscle creatine kinase) 遺伝子のプロモーター及び転写開始点から翻訳開始点の直前までの領域を含むプラスミドの下流に 3×Flag hTGR5 遺伝子を挿入し、これをマイクロインジェクション法によりマウス DNA に組み込んだ。得られた産仔 32 匹をジェノタイピングし、うち 4 匹にトランスジェノムの挿入を確認した。この 4 匹に関して、A-D ラインとした。

次に、それぞれのラインに関して目的のタンパク質が発現しているか確認するため、8 週齢に達した各ライン、オスのマウスより腓腹筋を採取し、ウェスタンブロットに供した。その結果、A および B ラインで強い発現が確認された (Fig.4-1)。更に A ラインのマウスに関して組織間での発現比較を行ったところ、骨格筋に特異的な発現が確認された (Fig.4-2A)。MCK プロモーターを用いて骨格筋特異的なトランスジェニックマウスを作製した場合、骨格筋の種類により発現量が異なる場合があり、白筋に比べて赤筋では発現量が低くなる傾向がある (141)。本トランスジェニックマウスでもやはり白筋の腓腹筋や大腿四頭筋で発現が高く、赤筋であるひらめ筋では発現量が低くなっており、過去の報告と一致する結果になった (Fig.4-2B)。

#### トランスジェニックマウスは骨格筋が肥大化する

A ラインのトランスジェニックマウスを用いて、フェノタイプ解析を行った。オスのトランスジェニックマウスおよび同腹仔の野生型マウスを通常食で飼育し、8 週齢に達した時点での体重、及び摂食量を測定したが、両群で大きな差は見られなかった (Fig.4-3A, B)。またこの時、経口糖負荷試験 (oral glucose tolerance test: OGTT) により耐糖能を比較したが、有意な差は確認されなかった (Fig.4-3C)。続いて、組織重量の比較を行った。マウスより腓腹筋、大腿四頭筋、ひらめ筋、肝臓、精巣上体脂肪組織を採取し両群で重量に比較を行ったところ、ひらめ筋、肝臓、精巣上体脂肪組織では差が認められなかったが、白筋である腓腹筋、大腿四頭筋で有意な重量増加が確認された (Fig.4-4)。

筋肥大に関わる代表的な因子のひとつに、mTORC1 が挙げられる (74)。mTORC1 は生理的には摂食時に活性化し、タンパク質の合成を促進する事で骨

格筋を肥大化する事が知られている。そこでトランスジェニックマウスで確認された筋の肥大化に mTORC1 が関与するか確認するため、mTORC1 の代表的な基質である S6K のリン酸化の度合いをウエスタンブロットにより測定し、mTORC1 の活性を評価した。ここでは TGR5 の効果を見やすくするため、16 時間の絶食後に TGR5 リガンドであるコール酸を 0.5% (W/W) 含む餌を再摂食させ、4 時間後の腓腹筋をサンプルとして用いた。その結果意外な事に、トランスジェニックマウスでは S6K のリン酸化が抑制されており、予想とは逆に mTORC1 の活性は抑制されている事が示唆された (Fig.4-5A)。mTORC1 はインスリンシグナル下流の Akt により活性化され、エネルギーセンサータンパク質 AMPK により活性抑制される事が報告されている (142)。しかしこれらの経路に目立った変化は見られず、トランスジェニックマウスにおける mTORC1 抑制は、Akt や AMPK 以外の経路により制御されていると考えられた (Fig.4-5A)。また筋肥大に関わる IGF-1 や、筋タンパク質を分解する事で筋萎縮を誘導する ubiquitin E3 ligases である Atrogin1 や MuRF1 の発現を mRNA レベルで測定したが、これらに有意な差は見られなかった (Fig.4-5B)。

### **TGR5 は骨格筋の分化を促進する**

筋細胞において、cAMP-CREB 経路の活性化は Sik1 の発現上昇を誘導し、Sik1 が ClassII HDACs をリン酸化により不活化する事で、ClassII HDACs により活性抑制されていた Mef2 を活性化する。Mef2 は Myogenin や MCK の発現を転写レベルで上昇させる事で筋分化、筋形成を促進する因子であるため、筋細胞における cAMP-CREB 経路は筋量に影響する事が知られている (79, 80)。TGR5 も cAMP-CREB 経路を活性化するため、トランスジェニックマウスで確認された筋肥大は Sik1 を介した作用である事が予測された。マウス個体から得られる筋組織は既に分化済みの筋線維が大半を占めるため、Sik1 を介した筋分化や筋形成の過程を観察するには不向きと考え、C2C12 細胞を用い培養細胞レベルで検証を進める事にした。

培養細胞で TGR5 の機能を解析するにあたり、3×Flag hTGR5 を発現するアデノウイルスを作製した。このウイルスを C2C12myotube に感染させ、48 時間後にタンパク質発現をウエスタンブロットにより調べたところ、目的の位置に Flag のバンドが確認された (Fig.4-6A)。更に発現した TGR5 が活性を持つ事を確認するため、CRE-Luc プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。そ



の結果アデノウイルスにより TGR5 を過剰発現した C2C12myoblast では、胆汁酸の一種である TLCA 投与により非常に大きくルシフェラーゼ活性が上昇する事が明らかになった (Fig.4-6B)。また TLCA は 10  $\mu$ M という低濃度でも十分な活性化が確認された。以上の実験結果より、作製したアデノウイルスが目的の機能を果たす事が確認された。尚、TLCA 投与の際は培地の血清中に含まれる内因性胆汁酸の影響を出来る限り減らすため、活性炭処理により胆汁酸を除去した血清 (チャコール処理血清) を用いている。今後も特に断りがない限りは、TGR5 リガンド投与の際は培地中の血清をチャコール処理血清に置き換えている。

続いて、TGR5 が筋分化に与える影響を確認するため、未分化の C2C12myoblast に TGR5 あるいはコントロール群として LacZ を強発現させ、20  $\mu$ M の TLCA または等量の DMSO を含む分化誘導培地を用いて筋分化誘導を行った。その後、経時的に細胞を回収し、mRNA 発現を測定した。その結果、TGR5+TLCA 群では分化初期から中期にかけて、Sik1 や分化マーカーである Myogenin、Mef2A、MCK などの遺伝子発現が軒並み高い水準を維持している事が分かった (Fig.4-7)。この結果は TGR5 が筋分化を促進する機能を持つ事を示唆している。そこで次に、分化が進んだ筋細胞に特異的に発現する MyHC を免疫染色し、視覚的に筋分化の亢進を評価する事にした。先ほどと同様の条件で分化誘導を開始し、2 日後に抗 MyHC 抗体を用いた免疫染色および DAPI による核染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて細胞の様子を観察した。すると mRNA 発現変化から予測された結果と一致し、TGR5+TLCA 群において MyHC 陽性の筋細胞が多く確認された (Fig.4-8)。また、一視野に存在する全ての核の数に対する MyHC 陽性細胞内に存在する核の割合を求める事で Differentiation Index を算出したところ、やはり TGR5+TLCA 群で有意に高値を示した (Fig.4-8)。以上の結果より、少なくとも培養細胞レベルでは TGR5 が筋分化を亢進する事が明らかとなった。TGR5 による筋分化亢進がトランスジェニックマウスの筋細胞でも起こり得るか確認するため、トランスジェニックマウスおよび同腹仔の野生型マウスより初代培養筋衛星細胞 (未分化の筋細胞) を調製し、分化誘導 4 日目の mRNA 発現を測定した。すると C2C12 細胞で見られた応答と矛盾することなく、トランスジェニックマウス群では Sik1、Myogenin、Mef2A、MCK の有意な発現上昇が確認された (Fig.4-9)。したがってトランスジェニックマウスで確認された骨格筋肥大も、TGR5 による筋分化の亢進が関与すると考えられる。

## TGR5 はインスリン抵抗性を改善する

トランスジェニックマウスにおける筋肥大メカニズムを解析する過程で、TGR5 が S6K の活性を抑制する機能を持つ事を発見した (Fig.4-5)。S6K はタンパク質の合成を担う因子であると同時に、IRS1 のセリン残基をリン酸化する事でインスリンシグナルのネガティブフィードバック機構を担う因子でもある。実際、S6K ノックアウトマウスでは高脂肪食負荷により生じるインスリン抵抗性を免れる事が報告されている (9)。これらを合わせて考えると、TGR5 トランスジェニックマウスも S6K 活性を抑制する事でインスリン抵抗性に対する耐性を示す事が予想された。そこで、トランスジェニックマウスに対する長期高脂肪食投与実験を行った。

まず、A ライン、オスのトランスジェニックマウス及び同腹仔の野生型マウスに対し、4 週齢より高脂肪食飼育を開始した。4 日に 1 度のペースで体重や摂食量を測定したが、両群で有意な差は認められなかった (Fig.4-10)。しかし高脂肪食負荷から 8 週間後に OGTT を行ったところ、トランスジェニックマウス群で耐糖能の改善が確認された (Fig.4-11A)。更に 3 週間後、ITT を行ったところ、有意差はつかなかったが改善傾向が認められた (Fig.4-11B)。以上の結果より、骨格筋において TGR5 は高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性を改善する機能を持つ事が示唆された。ITT から 20 日後、4 時間の絶食の後マウスを解剖した。この時組織重量を測定したところ、やはり白筋である腓腹筋、大腿四頭筋で有意な重量増加が確認された。一方、ひらめ筋や肝臓、脂肪組織の重量に有意な差は見られなかった (Fig.4-12)。また解剖時に採取した血漿を用いて血糖値、中性脂肪値、遊離脂肪酸値、インスリン値を測定したが、これらの値には両群で差が認められなかった (Fig.4-13)。トランスジェニックマウスで見られた OGTT、ITT の成績改善が S6K の抑制を介した作用であるとするれば、S6K のターゲットである IRS1 セリン残基のリン酸化が減弱しているはずである。そこで高脂肪食負荷後の骨格筋サンプルを用いてその検証を行った。するとトランスジェニックマウスでは野生型マウスに比べてセリンリン酸化 IRS-1 の割合が有意に低下しており、TGR5 が S6K の活性を抑制する事でインスリン抵抗性を抑制しているという仮説を裏付ける結果となった (Fig.4-14)。またこの時、絶食後のサンプルを用いたため S6K のリン酸化はほぼ検出できなかった (Fig.4-14)。

トランスジェニックマウスはその性質上、トランスジーンが染色体上のランダムな位置に組み込まれているため、一定の確率で何らかの遺伝子を破壊してしまう事が有る。それゆえ、トランスジェニックマウスを用いた解析は異なる

複数ラインでの実験が推奨されている。そこで本実験に関しても、**B** ラインのトランスジェニックマウスを用いて追試を行った。**B** ライントランスジェニックマウスは 4 週齢から 30 日間通常食で飼育を行い、そこから高脂肪食に切り替え、120 日間飼育を行った。この間、通常食期間においても高脂肪食期間においても、体重、摂食量に差は見られなかった (Fig.4-15A,B)。高脂肪食飼育から 10 週間目に OGTT を行ったところ、トランスジェニックマウスでは耐糖能の改善が見られた (Fig.4-16A)。その 3 週間後に行った ITT では、経時的な血糖値の変化に関して一部有意な改善が認められた (Fig.4-16B)。高脂肪食飼育から 120 日目に、4 時間の絶食の後に解剖を行い、組織重量を測定した。その結果やはり腓腹筋の有意な重量増加が確認され、ひらめ筋や肝臓、精巣上体脂肪組織の重量に変化は見られなかった (Fig.4-17A)。また血中成分についても、血糖値、中性脂肪値、遊離脂肪酸値、インスリン値に差は無かった (Fig.4-17B)。最後に、骨格筋サンプルにおける IRS-1 のセリン残基のリン酸化をウエスタンブロットにより評価したところ、トランスジェニックマウスでは IRS-1 セリンリン酸化が減弱している事が確認された (Fig4-18)。総じて、**A** ラインと **B** ラインのトランスジェニックマウスにおいて、同様の結果を得る事が出来た。以上の結果より、骨格筋において TGR5 が高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性を改善する事が示された。

#### 4-4. 考察

本章では、骨格筋特異的 TGR5 トランスジェニックマウスの解析を中心に、骨格筋における TGR5 の機能解析を試みた。その結果、興味深い現象がいくつか見つかったため、順に考察を行う。

まずトランスジェニックマウス作製に際し、MCK プロモーターを用いる事で骨格筋特異的、特に白筋特異的に TGR5 を発現するマウスを作製した。TGR5 は由来がヒトであれマウスであれ、胆汁酸をリガンドとして活性化し、下流で cAMP シグナルを活性化する点で同様の機能を持つ。しかしいくつかの食品成分に関して、ヒト TGR5 およびマウス TGR5 間でリガンド応答性がやや異なっている事が当研究室で確認されており、研究を今後ヒトへ応用する事を考慮してヒト由来の TGR5 を選択した。作製したトランスジェニックマウスより骨格筋を採取し、Flag 抗体により TGR5 発現を確認したところ、目的の分子量付近に複数のバンドが検出された (Fig.4-1, 4-2)。GPCR は 7 回膜貫通構造を持つため、一般に非常に疎水性領域が多く、凝集しやすい性質を持つ。それゆえ、TGR5 を過剰発現した細胞からタンパク質サンプルを調製する際、還元剤や熱処理により大部分の高次構造は破壊されていると思われるが、一部の TGR5 がタンパク質内、あるいはタンパク質間で凝集し、いくつかの立体構造パターンが形成されることで複数のバンドが現れているものと予想される。この現象は C2C12 にアデノウイルスを用いて TGR5 を過剰発現した際にも見られたが (Fig.4-6A)、TGR5 は問題無く機能している事が確認されている (Fig.4-6B)。

トランスジェニックマウスのフェノタイプを解析したところ、骨格筋の肥大化が確認された (Fig.4-4)。肥大化した骨格筋は白筋のみであり、これはトランスジェニックマウスの TGR5 の発現部位と対応している事から、TGR5 は直接的に筋肥大を誘導していると考えられた (Fig.4-2B, 4-4)。筋肥大のメカニズムに関しては、タンパク質合成に関わる mTORC1-S6K 経路や、タンパク質分解に関わる Atrogin1、MuRF1 の発現変化では説明がつかなかったため (Fig.4-5A,B)、現在 Sik1 を介した分化誘導の促進が筋肥大を誘導していると考えている。Sik1 は転写因子 Mef2A を活性化する事で、Myogenin や MCK、あるいは Mef2A 自身の発現を上昇させ、筋分化を促進する事が知られている (143, 144)。実際、アデノウイルスを用いて TGR5 を過剰発現した C2C12 細胞や、トランスジェニック

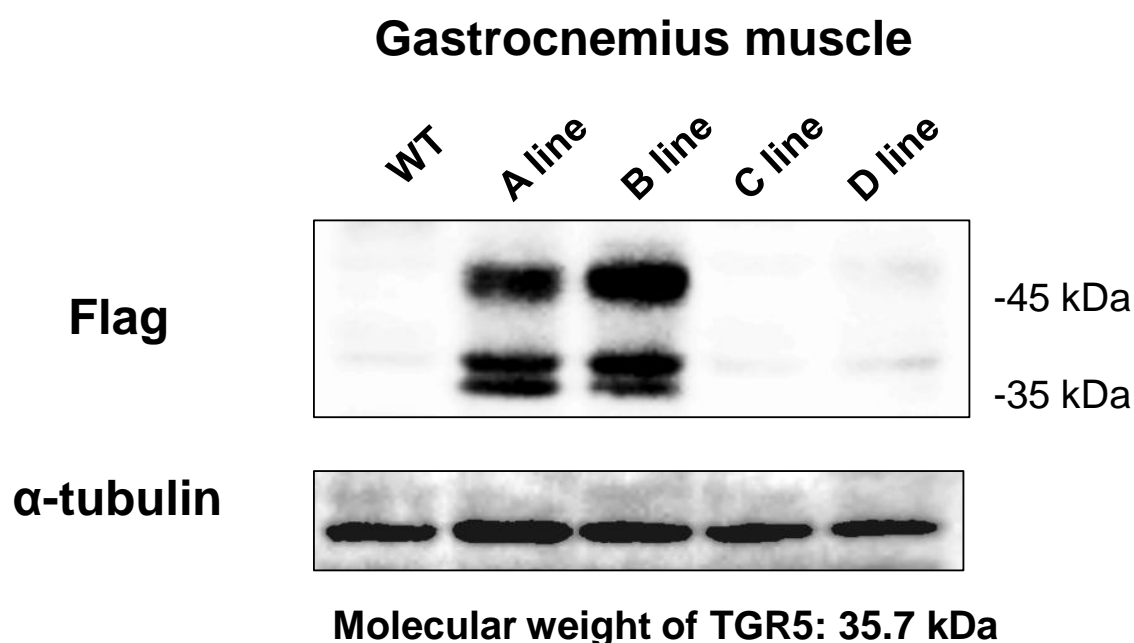
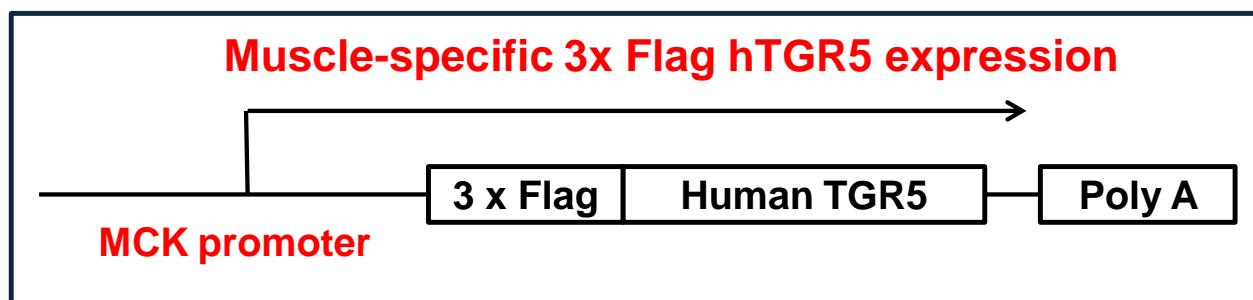
マウスから得られた初代培養筋衛星細胞に関しても、Sik1 の発現上昇や、それに伴う Myogenin、MCK、Mef2A の発現上昇が確認されており、TGR5 により Sik1 経路が活性化している事を裏付ける結果が得られている (Fig.4-7, 4-9)。以上の結果から予想される経路は、Fig.4-19 のようにまとめられる。しかし TGR5 を介した筋肥大、筋分化促進に対する Sik1 経路の寄与の大きさは明らかでなく、今後 Sik1 のノックダウン実験などにより詳細に検証していく必要が有ると思われる。

筋肥大メカニズムを解析する過程で、トランスジェニックマウスの骨格筋では食後の S6K リン酸化が減弱している事が明らかとなった (Fig.4-5A)。S6K は mTORC1 の主要な基質の 1 つであり、S6K のリン酸化は mTORC1 の活性を反映すると考えられている。したがってトランスジェニックマウスでは、何らかの機構で mTORC1 活性が抑制されていると予想された。mTORC1 を活性化するシグナルは主に 2 つ存在し、1 つはインスリンや IGF などの成長因子シグナル、もう 1 つがアミノ酸シグナルである (145)。インスリンシグナルは Akt のリン酸化を介して mTORC1 を活性化するが、今回の実験では野生型マウスおよびトランスジェニックマウス間で Akt のリン酸化強度に顕著な差は見られなかったため、TGR5 がインスリンシグナルの Akt よりも上流を阻害しているとは考えづらい (Fig.4-5A)。したがって TGR5 は Akt シグナルよりも下流、あるいはアミノ酸シグナルの阻害により mTORC1 活性を抑制していると考えられる。TGR5 がアミノ酸シグナルに関与すると仮定した場合、TGR5 が摂食時に活性化する因子である事を考えると、アミノ酸の取り込みを阻害するとは考えにくく、むしろ取り込んだアミノ酸を積極的に代謝してしまう事で細胞内のアミノ酸濃度が一過的に減少し、mTORC1 の活性化が抑制されているのではないかと予想される。分岐鎖アミノ酸のひとつであるロイシンは mTORC1 を強く活性化するが、クロフィブラートの投与により分岐鎖アミノ酸分解の律速酵素 BCKDC を活性化したラットの肝臓では mTORC1 経路が抑制される事が実際に報告されており、アミノ酸代謝がトランスジェニックマウス骨格筋の mTORC1 抑制に関与する可能性は高いと考えている (146)。この点に関しては、今後トランスジェニックマウスへのインスリン、アミノ酸投与実験や、骨格筋中の遊離アミノ酸含量の測定、あるいは TGR5 を過剰発現した培養細胞レベルでの解析を中心に、詳細を明らかにしていきたいと考えている。

S6K はインスリンシグナルのネガティブフィードバックの役割を担い、S6K ノックアウトマウスは高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性を免れる事が報告されている (9)。そこで TGR5 トランスジェニックマウスも同様の現象が見られると予想し、TGR5 トランスジェニックマウスに対する高脂肪食負荷試験を行った。高脂肪食負荷後の OGTT、ITT の結果から、異なる 2 つのトランスジェニックラインで高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性抑制が確認されたため、骨格筋において TGR5 がインスリン感受性改善に寄与すると結論付けた (Fig.4-11, 4-16)。通常食飼育下では OGTT の成績に差が無かった事を考慮すると、TGR5 は糖取り込みを促進するのではなく、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性を抑制していると考えられる。またトランスジェニックマウスでは IRS-1 のセリンリン酸化が抑制されているという事実は、インスリン抵抗性改善が S6K の活性抑制を介した作用であるという仮説をサポートするものである (Fig.4-14, 4-18)。しかし、IRS-1 のセリン残基をリン酸化するのは S6K だけではない。高脂肪食摂取などにより筋細胞内に過剰に脂肪酸が流入した場合、多くはエネルギー産生のため  $\beta$  酸化に利用されるが、余剰分は筋細胞内に TG の形で蓄えられる。この際、代謝中間産物であるジアシルグリセロール (DG) は PKC $\theta$  を活性化し、IRS-1 のセリン残基をリン酸化する事でインスリン抵抗性を惹起すると考えられており、PKC $\theta$  ノックアウトマウスでは脂質を投与した後もインスリン抵抗性が生じない事が明らかにされている (147, 148)。したがって本実験で見られたトランスジェニックマウスにおける IRS-1 のセリンリン酸化抑制やインスリン抵抗性の改善も、一部は筋細胞内の脂質代謝改善とそれに伴う DG の減少が関与している可能性が有るため、骨格筋中の TG および DG 含量や脂質代謝関連遺伝子の変動についても今後検討して行く必要が有るだろう。更に近年、加齢に伴う筋量の減少、すなわちサルコペニアが二型糖尿病やインスリン抵抗性の原因となりうる事が疫学的な調査より明らかになっている (149, 150)。これは骨格筋の物質的な量が、血糖値のコントロールやインスリン感受性に重要である事を意味している。したがって TGR5 トランスジェニックマウスで見られたインスリン抵抗性の改善には骨格筋の肥大化も関与している可能性が有り、S6K 経路を含むいくつかの要因が複合的にインスリン感受性の改善へと導いたと考えられる。一方で、インスリン抵抗性の指標とされる空腹時血糖値やインスリン値には、野生型マウスとトランスジェニックマウスでは有意な差が認められなかった (Fig.4-13, 17B)。これはトランスジェニックマウスでは骨格筋でのみインスリン抵抗性が改善されているため、肝臓や脂肪組織では両群ともインスリン抵

抗性が進行しており、これらのパラメーターには差がつかなかったものと考えられる。

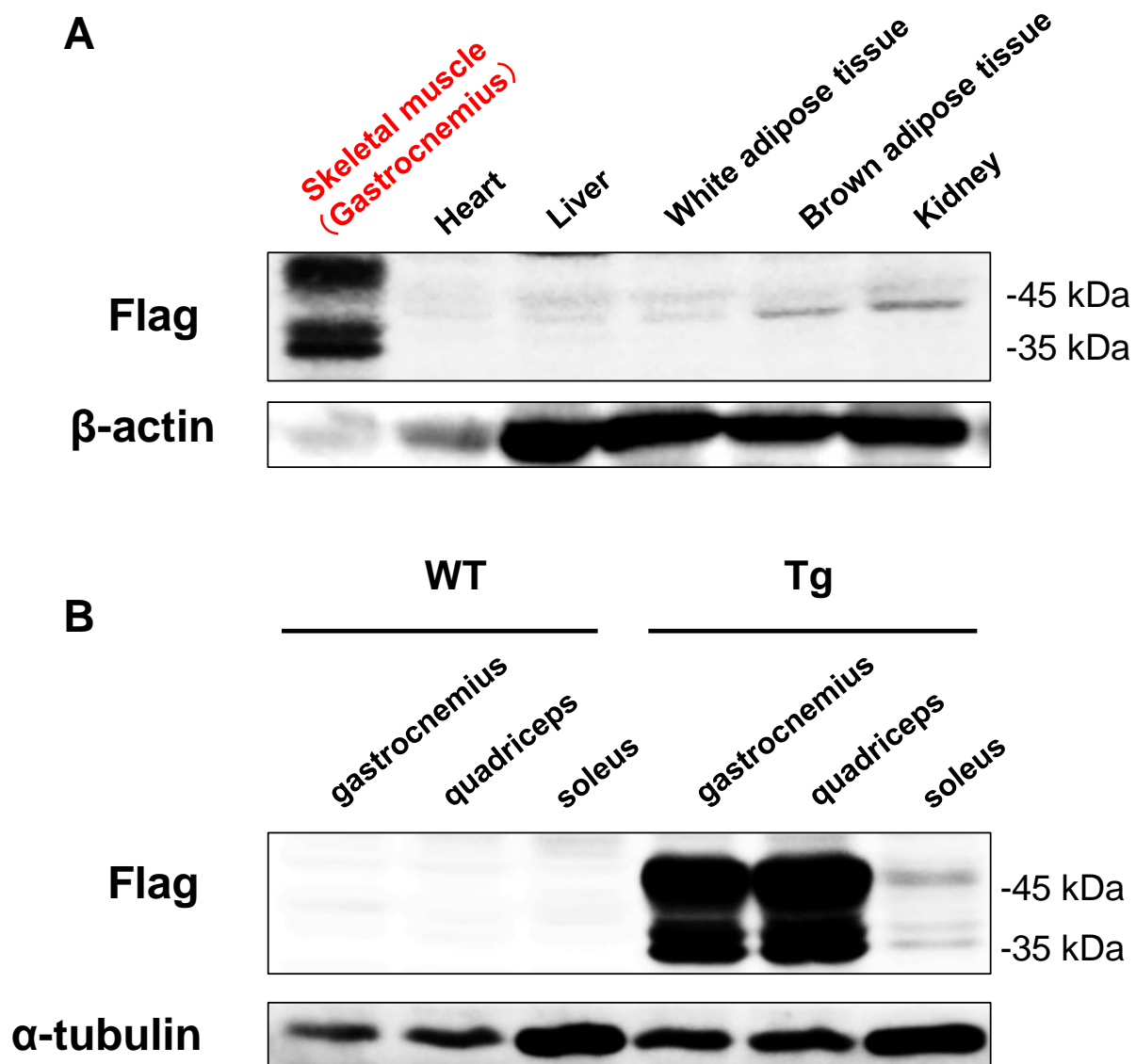
以上、骨格筋特異的に TGR5 を過剰発現したマウスの解析を軸に、TGR5 を介した代謝改善作用において、骨格筋が重要なターゲットのひとつとなり得る事を示す事ができたと考えている。しかし本章では、S6K 活性抑制のメカニズムや、筋肥大の分子機構を含め、詳細が未解明な現象も多く残されている。これらに関しては今後の更なる解析が必要である。



### Fig.4-1 トランスジェニックマウスライン間のTGR5発現比較

Muscle creatine kinaseプロモーター下流に、N末端に3x Flagタグを付加したhuman TGR5遺伝子 cDNAを組み込むことで、筋特異的に3x Flag hTGR5を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドをマイクロインジェクション法によりC57BL/6マウス受精卵に導入し、筋特異的3x Flag hTGR5トランスジェニックマウスを作出した。得られた4ラインのトランスジェニックマウス(8週齢 オス)から採取した骨格筋(腓腹筋: gastrocnemius muscle)をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質サンプルを調製後SDS-PAGEに供し、anti-Flag抗体、anti-α tubulin抗体を用いてWestern blottingを行った。

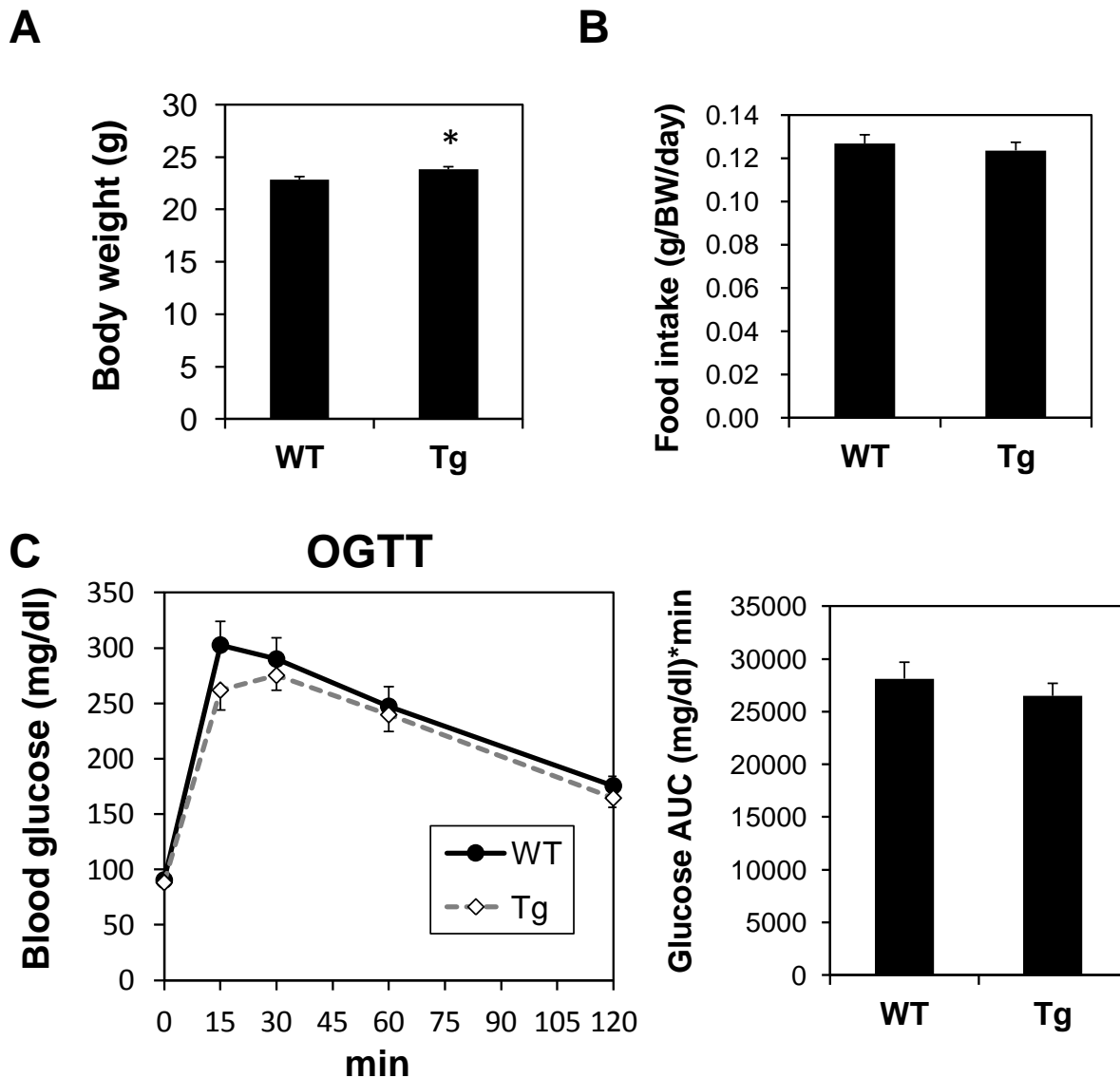




#### Fig.4-2 トランスジェニックマウスにおけるTGR5発現部位の確認

A: トランスジェニックマウス (A line, 8週齢 オス) から採取した骨格筋 (腓腹筋: gastrocnemius muscle)、心筋 (Heart)、肝臓 (Liver)、白色脂肪組織 (White adipose tissue)、褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue)、腎臓 (Kidney) をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質サンプルを調製後SDS-PAGEに供し、anti-Flag抗体、anti- $\beta$ -actin抗体を用いてWestern blottingを行った。

B: 同様に、トランスジェニックマウス及び同腹仔の野生型マウスより腓腹筋 (gastrocnemius)、大腿四頭筋 (quadriceps)、ひらめ筋 (soleus) を採取しWestern blottingを行った。



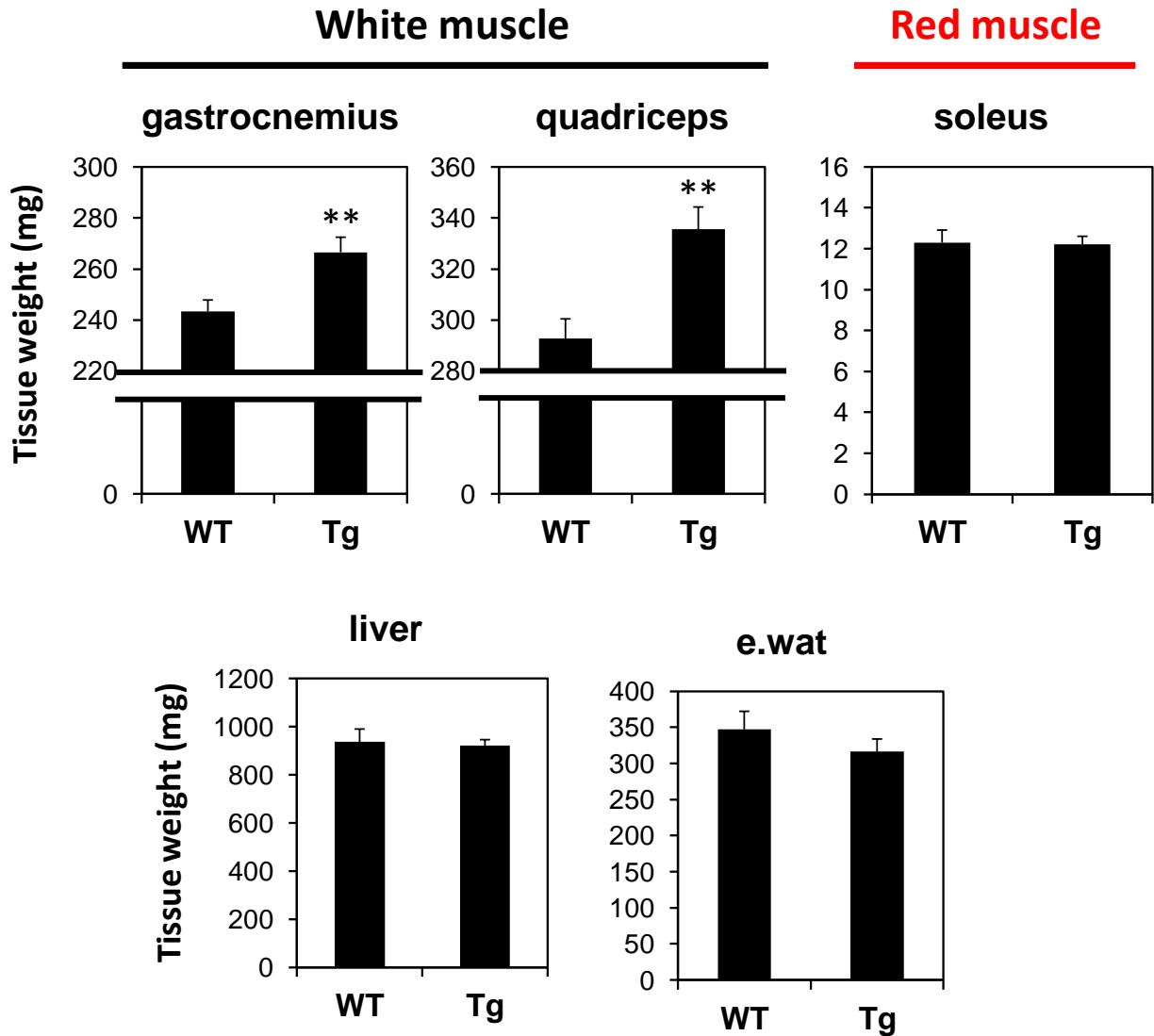
**Fig.4-3 通常食飼育下におけるトランスジェニックマウスの体重、摂食量および耐糖能の解析**

オスのA lineトランスジェニックマウス(n=10)および同腹仔の野生型マウス(n=8)を8週齢まで通常食で飼育した。

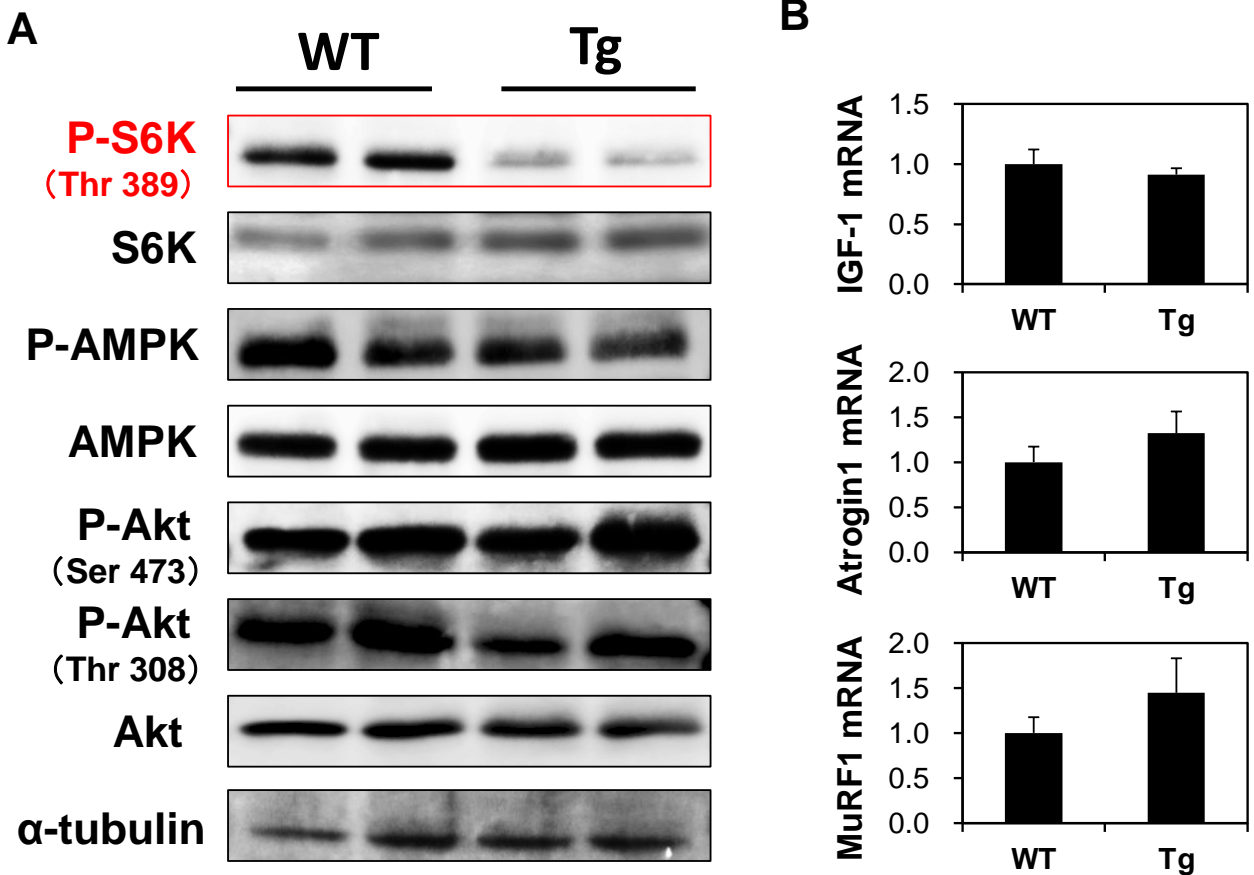
A: 8週齢における両群の体重を測定した。

B: 7-8週齢における摂食量を測定し、体重で除することで1日あたり、体重 (g)あたりの摂食量 (g)を求めた。

C: 8週齢に達した段階で、経口糖負荷試験を実施した。両群のマウスは20:00(ZT 11)より絶食、自由飲水とし、16時間後にグルコース水を経口投与した(2g/kg body weight)。投与から0分、15分、30分、60分、120分の時点で尾静脈から採血し、血糖値を測定した。棒グラフはAUC(Area under the curve)を示す。値は平均値±標準誤差で示した。(n=8-10)



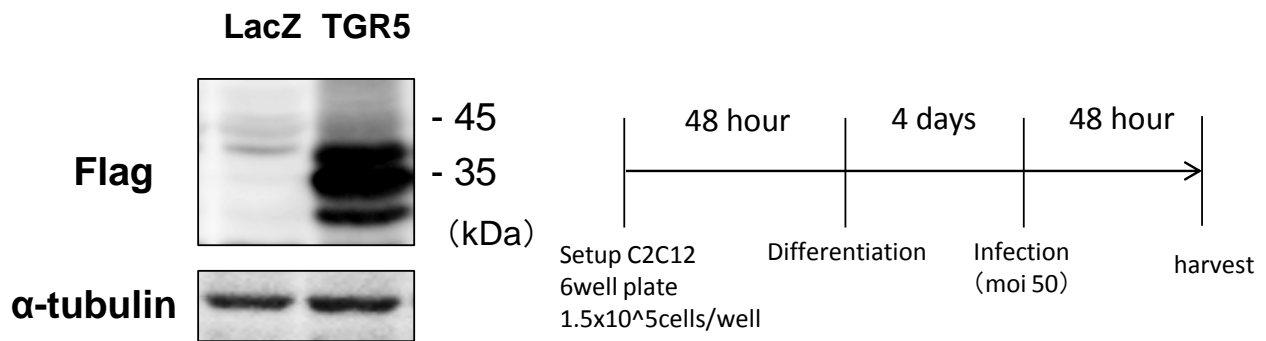
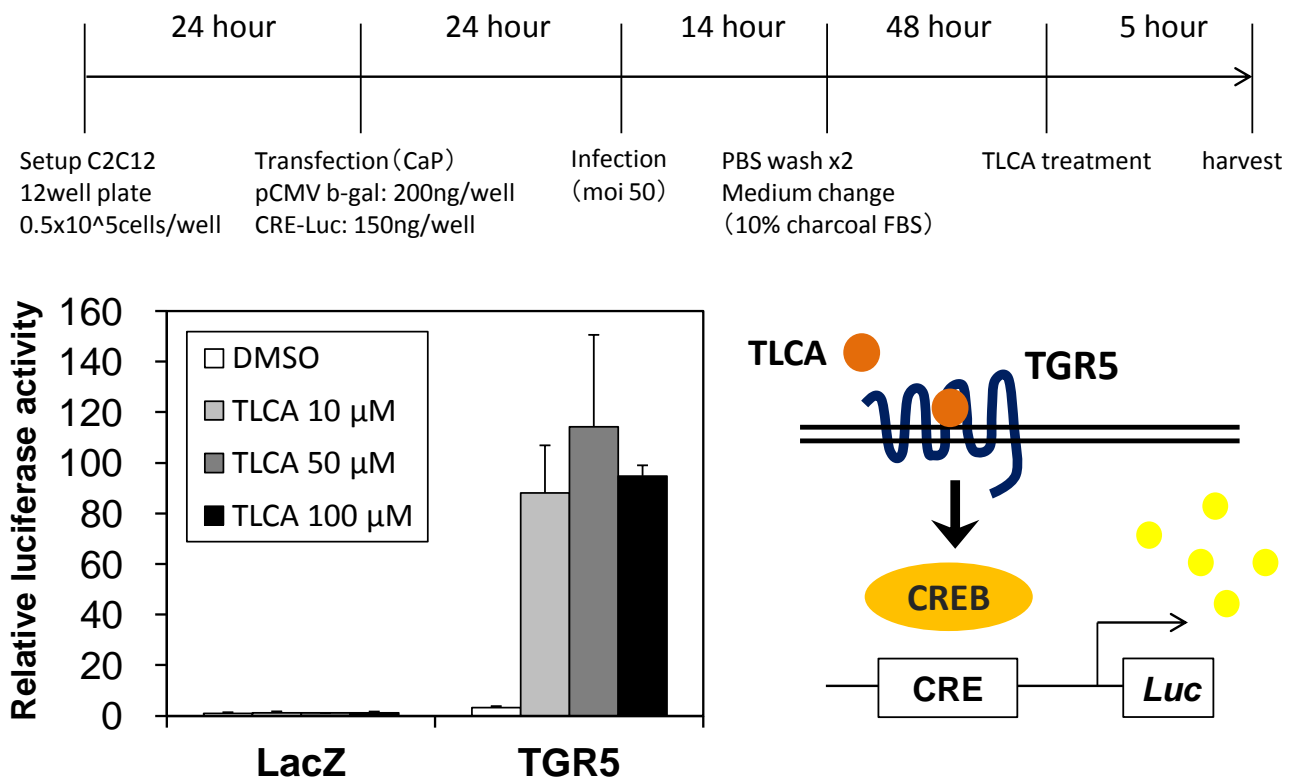
**Fig.4-4 トランスジェニックマウスにおける組織重量変化**  
 オスのA line トランスジェニックマウス (n=10) および同腹仔の野生型マウス (n=8) を8週齢まで通常食で飼育後に解剖し、骨格筋 (腓腹筋: gastrocnemius、大腿四頭筋: quadriceps、ひらめ筋: soleus)、肝臓、精巣上体脂肪組織の重量を測定した。それぞれの重量は平均値±標準誤差で示した。\*\*は有意差P<0.01を示す。



### Fig.4-5 トランスジェニックマウス骨格筋のタンパク質、およびmRNA発現解析

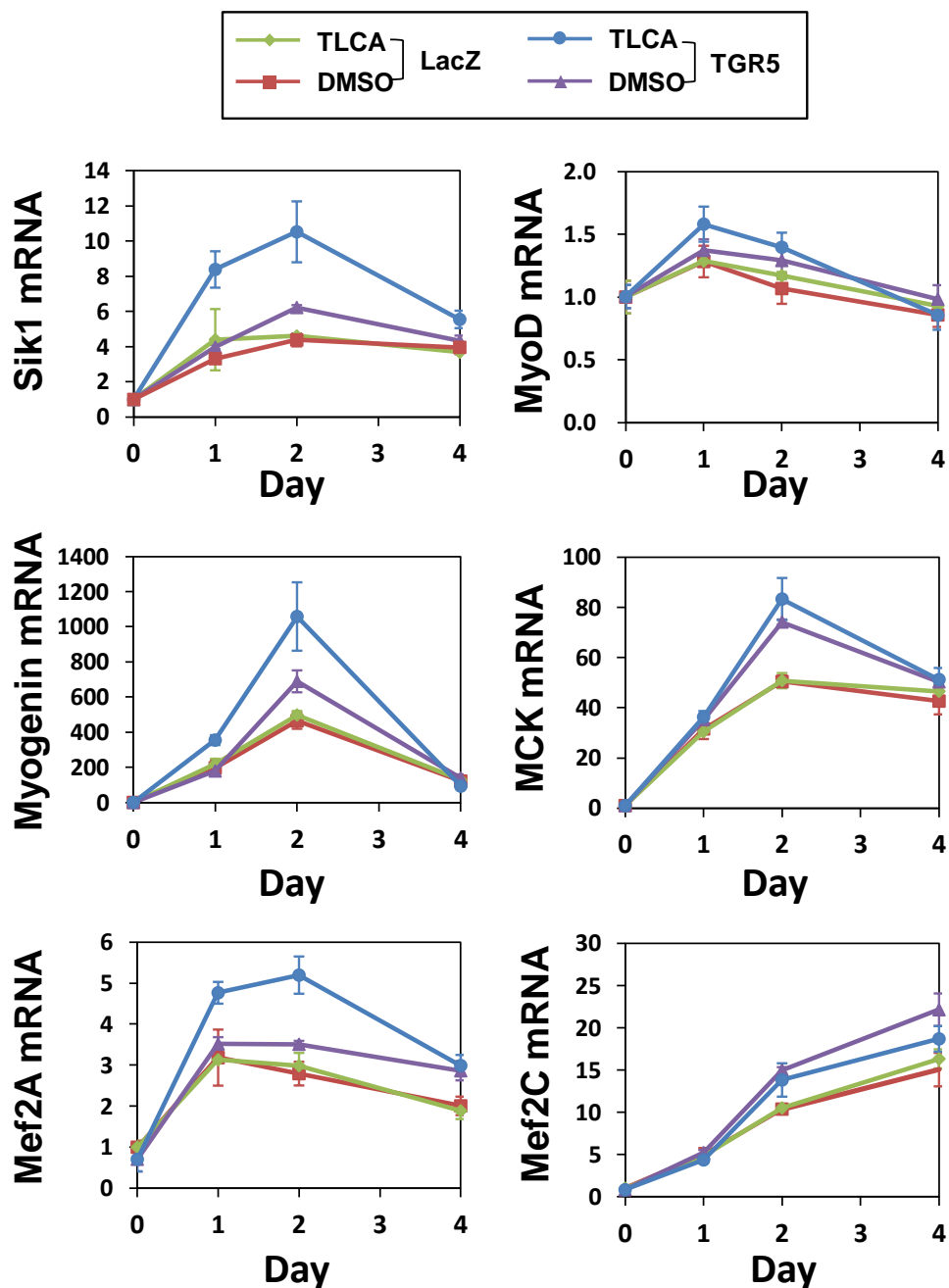
16週齢メスのA lineトランスジェニックマウスを16時間絶食させた後、0.5% (W/W) のコール酸を含む粉末食を4時間自由摂食させ、腓腹筋を回収した。A: RIPA bufferを用いて回収したタンパク質をWestern blottingに供し、タンパク質発現およびリン酸化修飾の変動を解析した。

B: RNAを回収し、Real-time qPCRによりmRNA発現量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、WT群を1として、平均値±標準誤差で示した。(n=3)

**A****B****Fig.4-6 TGR5発現アデノウイルスの活性確認**

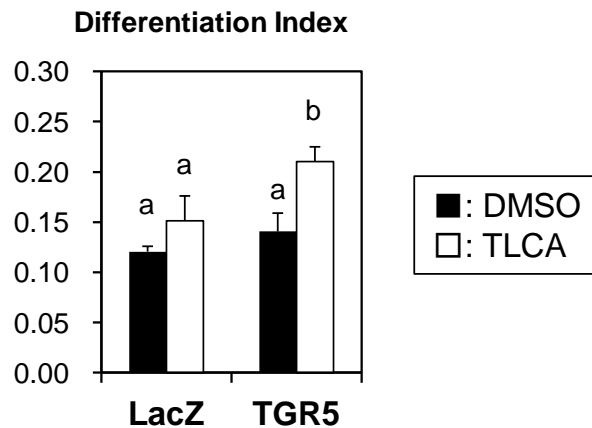
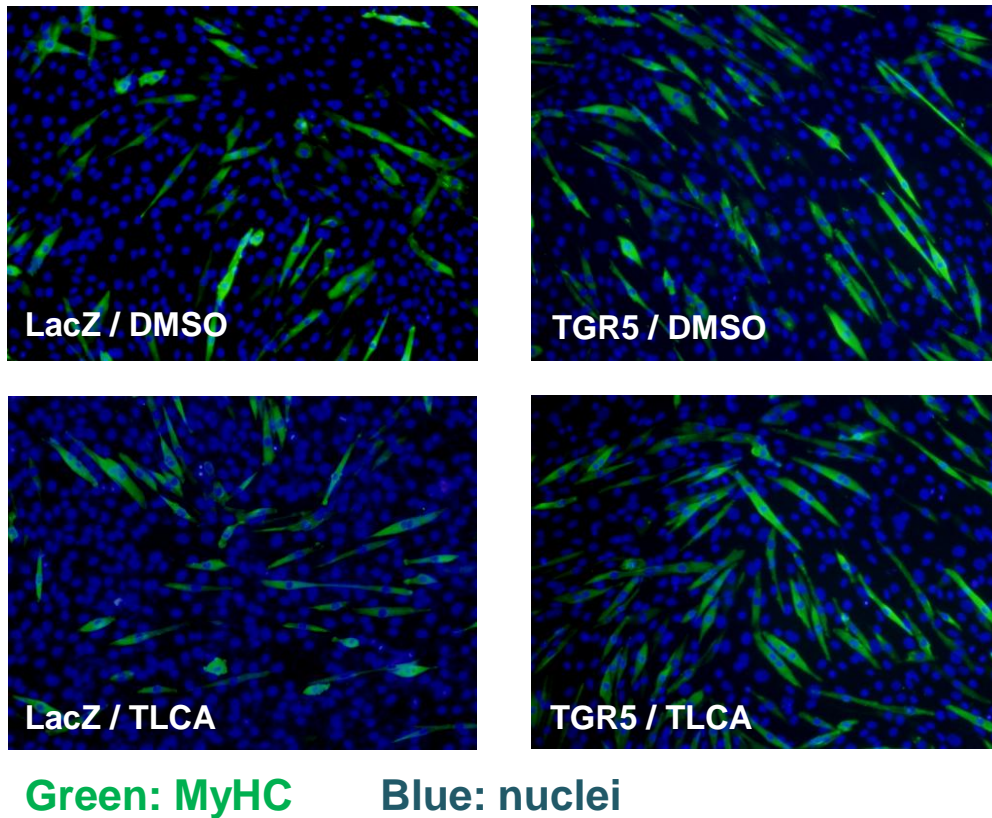
A: C2C12myotubelにTGR5を発現するアデノウイルスあるいはコントロールとしてLacZを発現するアデノウイルスを感染させ、48時間後にタンパク質を回収しanti-Flag抗体、anti-α-tubulin抗体を用いてWestern blottingを行った。

B: 上部に示すタイムスケジュールに従ってCRE-Lucプラスミド、およびβ-galプラスミドをトランスフェクションしたC2C12myoblastにTGR5発現アデノウイルスを感染させた。その後リガンドを添加し、細胞をルシフェラーゼアッセイに供する事でTGR5活性を評価した。Luciferase activityはLacZ感染DMSO投与群を1として、平均値±標準偏差で示した。(n=3)



### Fig.4-7 TGR5が筋分化に与える影響

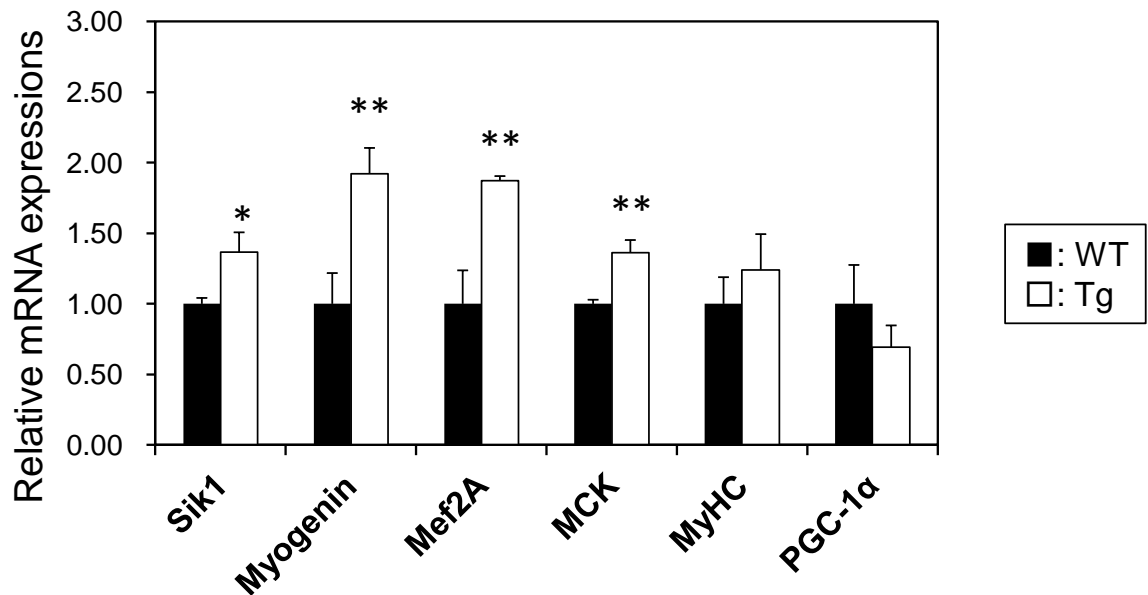
C2C12mtoblastに対しTGR5を発現するアデノウイルスを感染させ、36時間後よりTLCA (20  $\mu$ M)あるいは等量のDMSOを含むDMで分化誘導を行った。培地は毎日交換し、Day 0、1、2、4に細胞を回収した。その後細胞からRNAを抽出し、Real-time qPCRによりmRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、Day 0 (DMSO)群を1として、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。



### Fig.4-8 免疫染色法を用いた筋分化指数の比較

C2C12myoblastに対しTGR5を発現するアデノウイルスを感染させ、36時間後から20  $\mu$ MのTLCAまたは等量のDMSOを含む分化誘導培地を用い分化誘導を行った。分化誘導から2日後にミオシン重鎖(MyHC)を免疫染色した。緑がMyHC、青が核を示す。

Differentiation Index (nuclei within MyHC positive myocytes/ total number of nuclei)はランダムに選んだ異なる3視野以上の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。異なる文字間で有意差 ( $P < 0.05$ )。

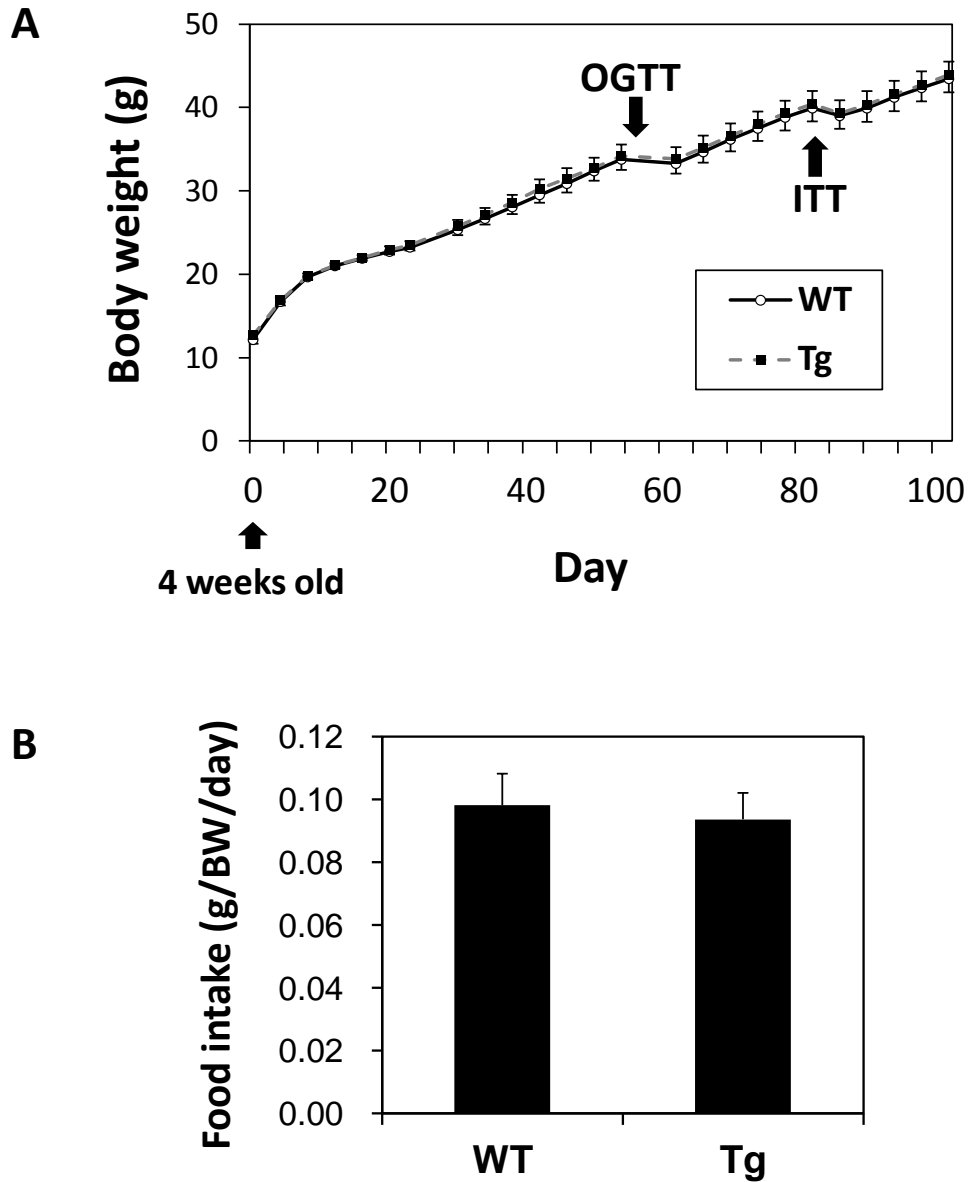


**Fig.4-9 初代培養筋衛星細胞を用いた分化マーカー遺伝子の比較**

トランスジェニックマウス後肢骨格筋より初代培養筋衛星細胞を調製し、4日間分化誘導を行った後に細胞からRNAを回収した。RT反応により得られたcDNAをReal-time qPCRに供し、mRNA量を測定した。それぞれの値は18Sで補正し、WT群を1として、平均値±標準偏差で示した。(n=3)

\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。





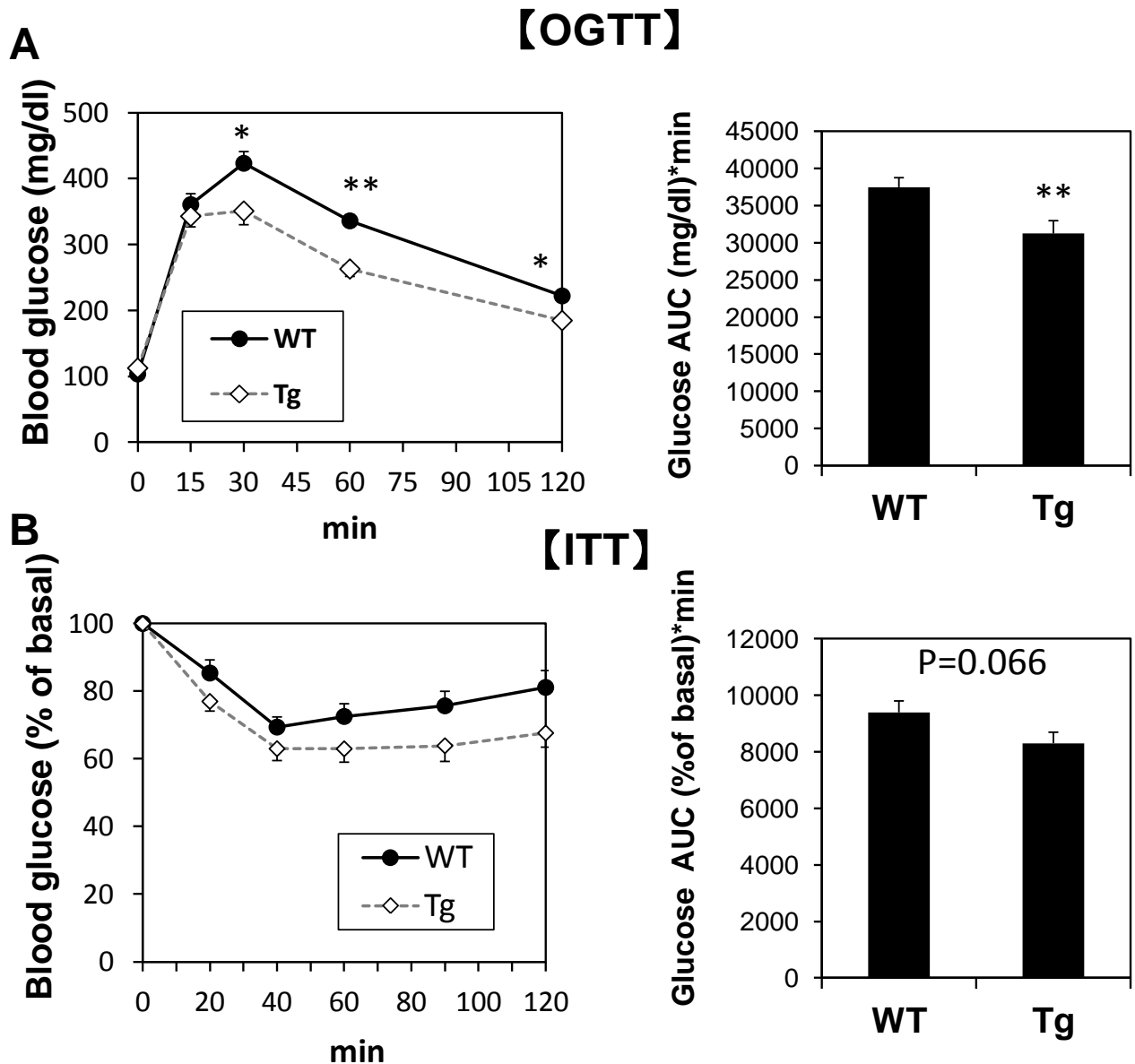
**Fig.4-10 高脂肪食飼育時の体重変動と摂食量(Aライン)**

4週齢オスのA line トランスジェニックマウス(n=13)および同腹仔の野生型マウス(n=12) に対し高脂肪食飼育を行った。

A: 体重の推移を図に示した。OGTT、ITTを行った時点を図中に矢印で示している。

B: 体重を測定する際に摂食量も測定し、摂食量を体重で除することで1日あたり、体重 (g)あたりの摂食量 (g)を求めた。

値は平均値±標準誤差で示している。



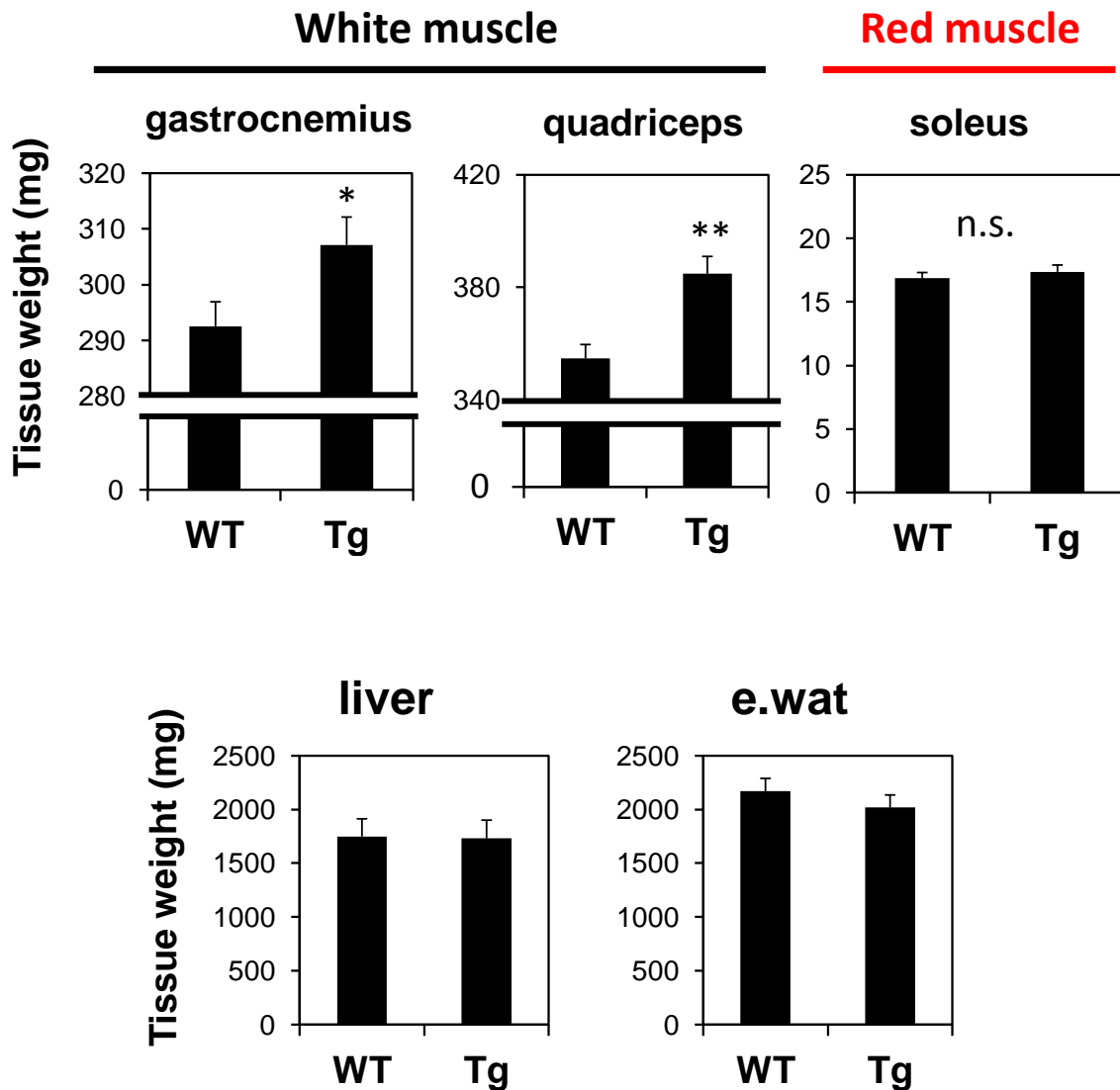
**Fig.4-11 高脂肪食負荷トランスジェニックマウスにおけるOGTTおよびITT(Aライン)**

A lineトランスジェニックマウスおよび同腹仔野生型マウスへのHFD投与から8週間後にOGTTを実施し、その3週間後にITTを実施した。

A: マウスは20:00(ZT 11)より絶食、自由飲水とし、16時間後にグルコース水を経口投与した(2 g/kg body weight)。投与から0分、15分、30分、60分、120分の時点で尾静脈から採血し、血糖値を測定した。棒グラフはAUC (Area under the curve)を示す。値は平均値±標準誤差で示した。(n=12-13)

B: マウスを11:00(ZT 2)から6時間絶食、自由飲水させた後、インスリン溶液を腹腔内投与した(0.75 IU insulin/g BW)。投与から0分、20分、40分、60分、90分、120分の時点で尾静脈から採血し、血糖値を測定した。値は0分の血糖値を100%とし、平均値±標準誤差で示した。(n=12-13)

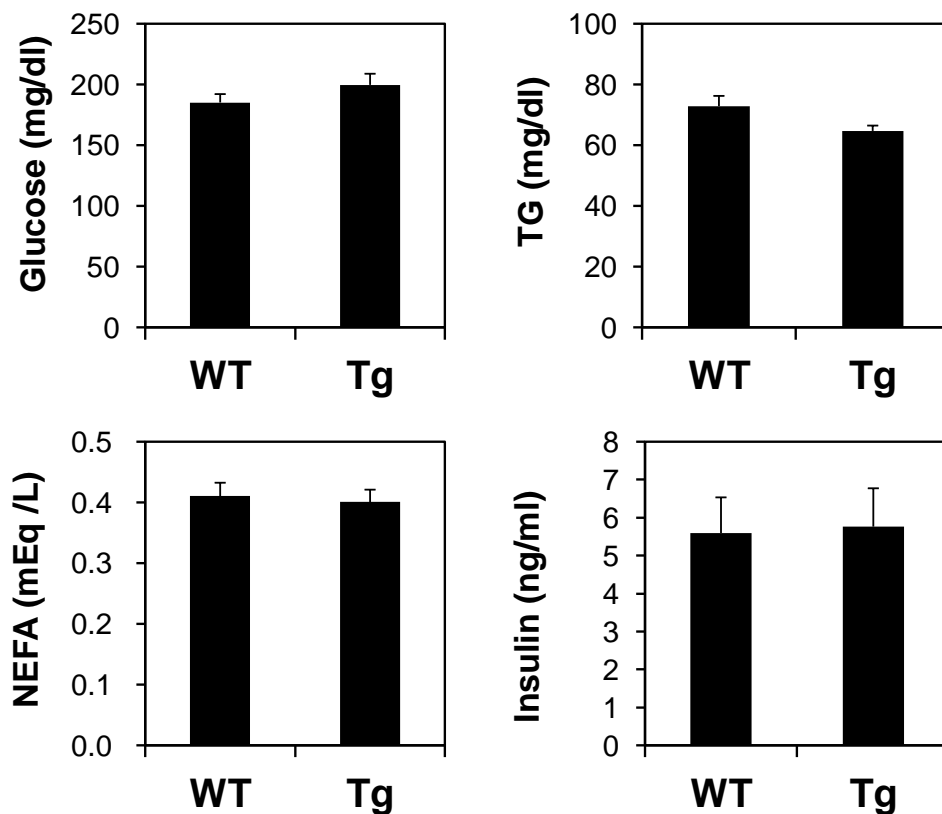
\*は有意差P<0.05、\*\*は有意差P<0.01を示す。



**Fig.4-12 高脂肪食飼育後の組織重量(Aライン)**

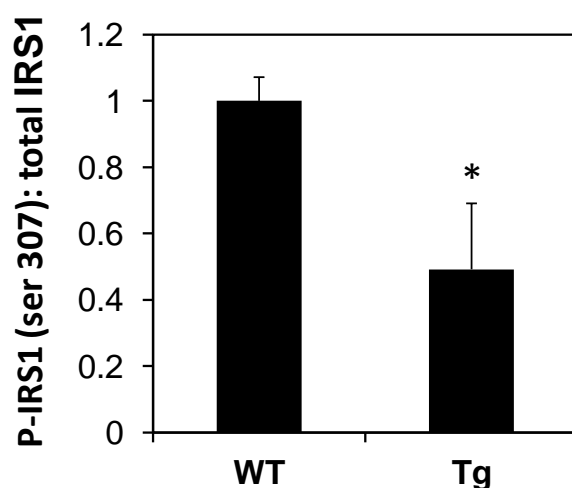
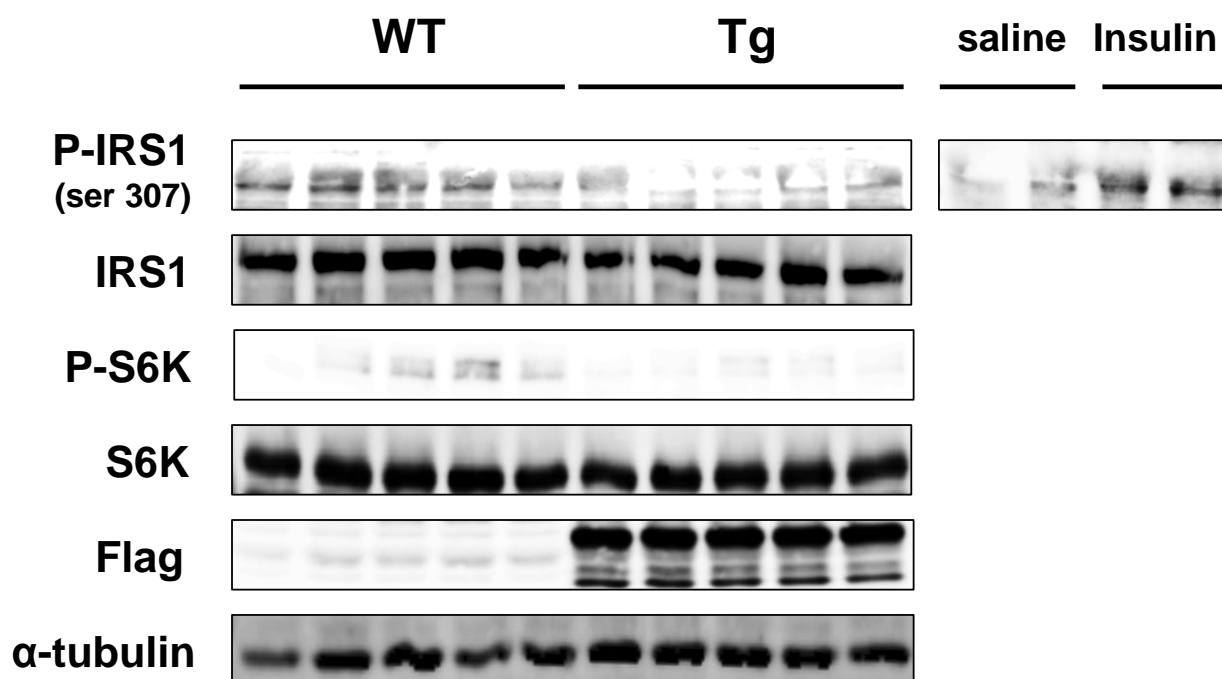
長期高脂肪食負荷後にマウスを解剖し、骨格筋（腓腹筋: gastrocnemius、大腿四頭筋: quadriceps、ひらめ筋: soleus）、肝臓、精巣上体脂肪組織の重量を測定した。それぞれの重量は平均値±標準誤差で示した。(n=12-13)

\*は有意差 $P < 0.05$ 、\*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。



**Fig.4-13 高脂肪食飼育後の血中成分(Aライン)**

解剖時(4時間絶食後)に採取した血漿を用い、血中グルコース濃度、血中TG(中性脂肪)濃度、血中NEFA(遊離脂肪酸)濃度、インスリン濃度を示した。それぞれの値は平均値±標準誤差で示した。(n=12-13)

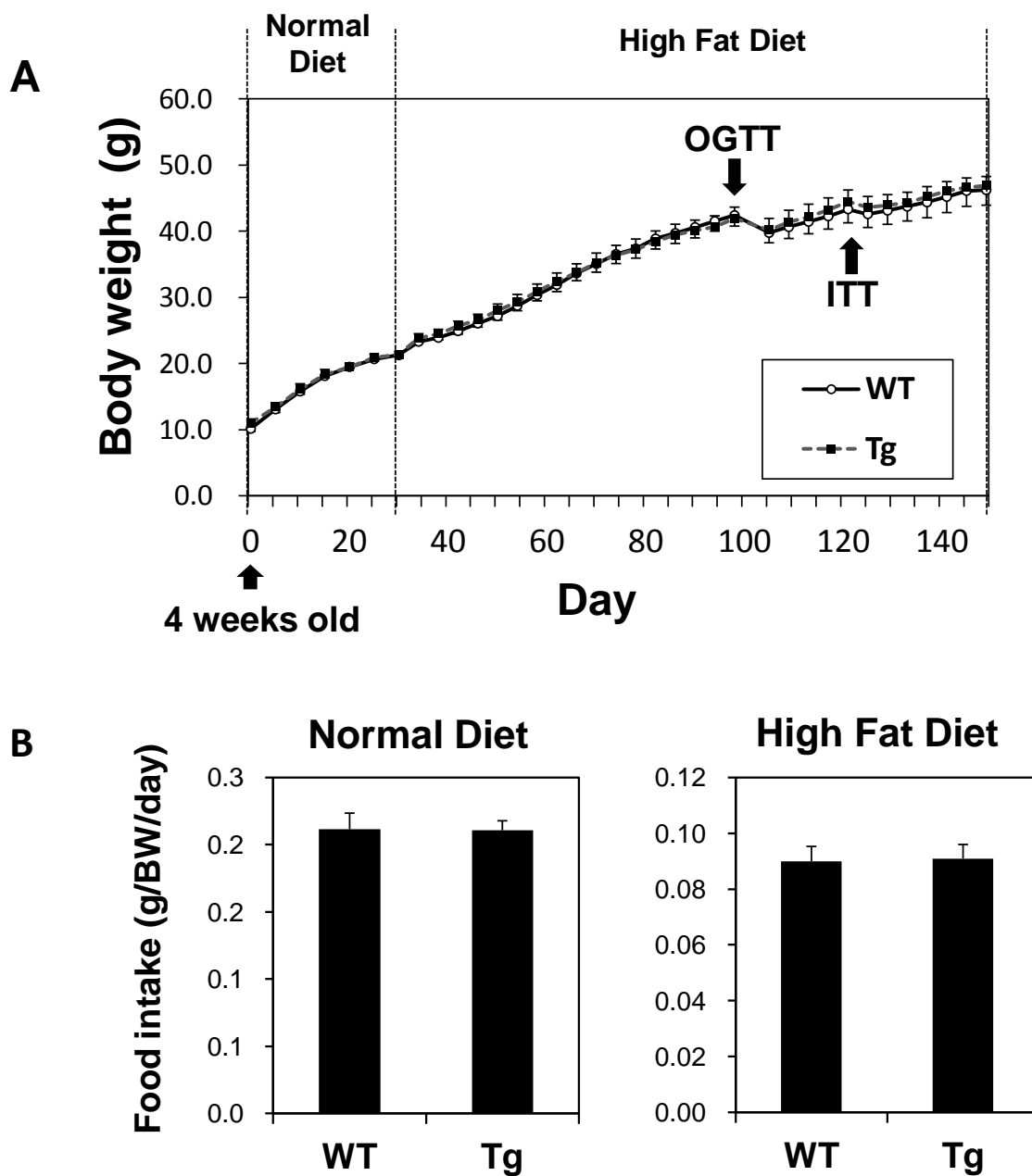


#### Fig.4-14 高脂肪食負荷後の骨格筋におけるタンパク質解析(Aライン)

高脂肪食飼育後、マウスから得られた骨格筋(gastrocnemius muscle)をRIPA bufferで溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質サンプルを調製後SDS-PAGEに供し、anti-P-IRS1 (ser 307)抗体、anti-IRS1抗体、anti-P-S6K抗体、anti-S6K抗体、anti-Flag抗体、anti- $\alpha$ -tubulin抗体を用いてWestern blottingを行った。なお、IRS1セリンリン酸化のポジティブコントロールとしてインスリンを腹腔内投与した野生型マウスの骨格筋サンプルを右に示している。

P-IRS1とIRS-1のバンドは定量化し、両群でP-IRS1 (Ser 307)/IRS1比を求めた。グラフは平均値±標準誤差で示している。(n=5)

\*は有意差 $P < 0.05$ を示す。



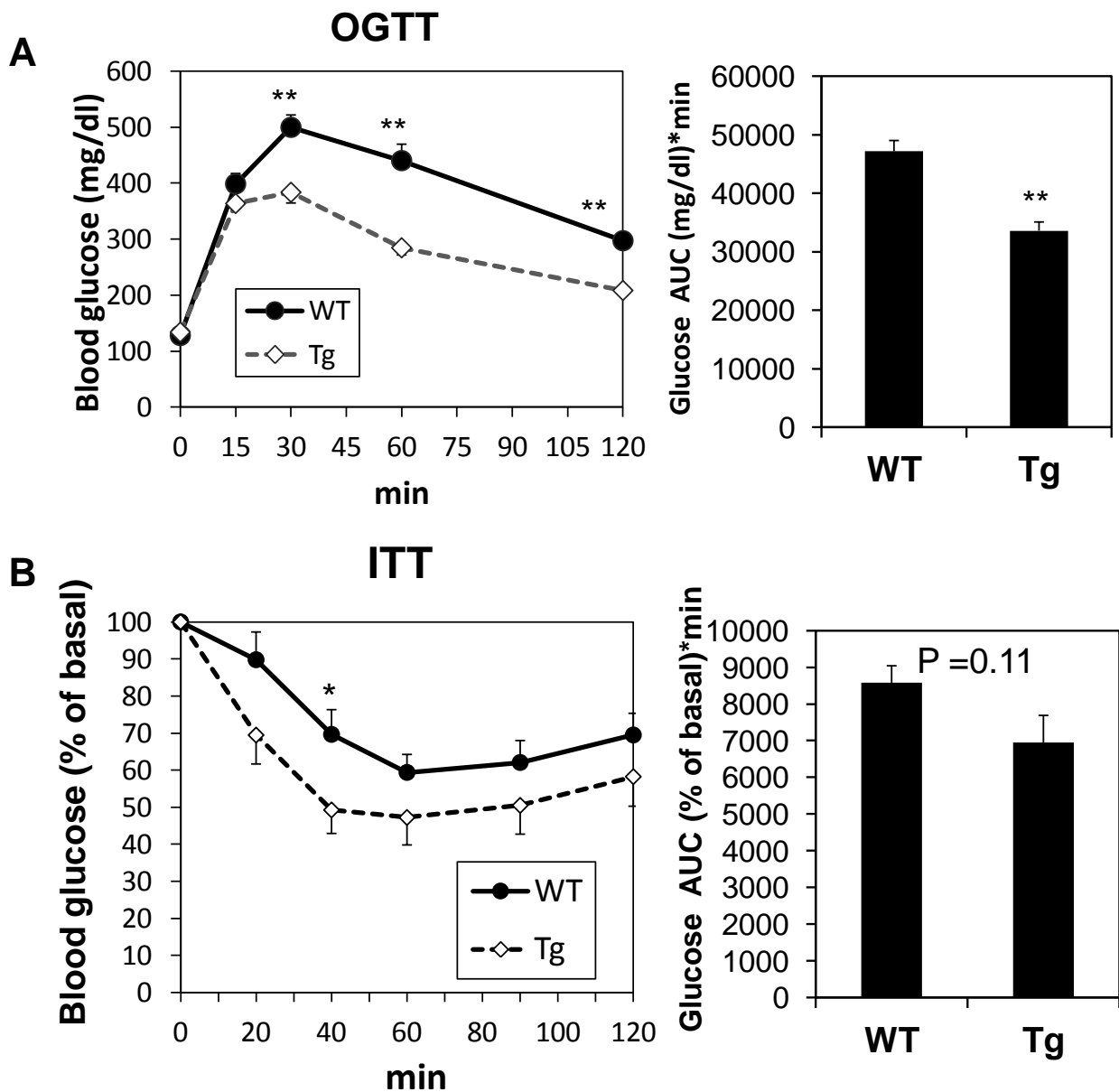
**Fig.4-15 通常食および高脂肪食飼育時の体重変動と摂食量(Bライン)**

4週齢オスのB line トランスジェニックマウス (n=10) および同腹仔の野生型マウス (n=8) を30日間通常食で飼育した後、120日間に渡り高脂肪食で飼育した。

A: 通常食投与時は5日に1度、高脂肪食投与時は4日に1度体重を測定した。OGTT、ITTを行った時点を図中に矢印で示した。

B: 体重を測定する際に摂食量も測定し、摂食量を体重で除することで1日あたり、体重 (g) あたりの摂食量 (g) を求めた。

値は平均値±標準誤差で示している。



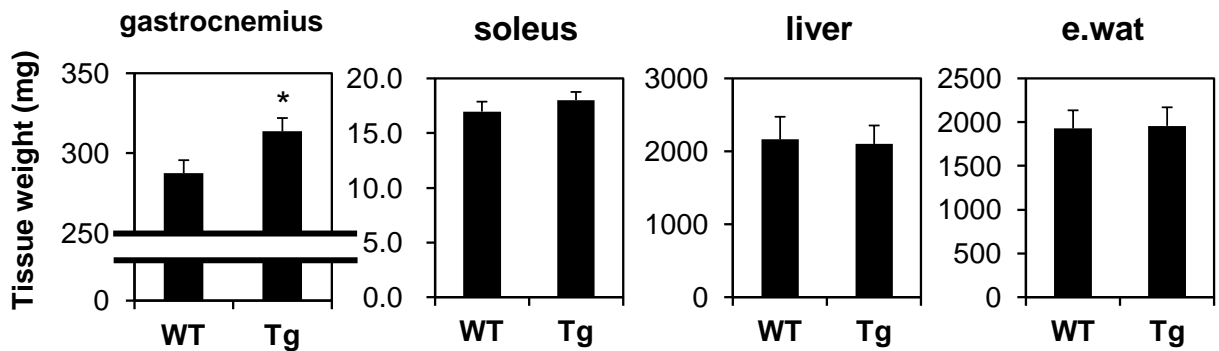
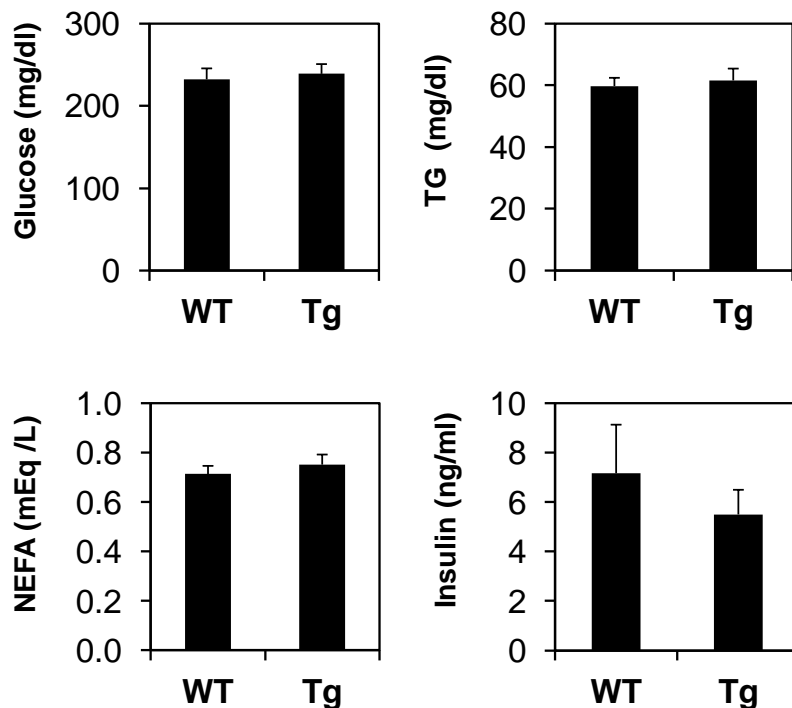
**Fig.4-16 高脂肪食負荷トランスジェニックマウスにおけるOGTTおよびITT (Bライン)**

B lineトランスジェニックマウスおよび野生型マウスへのHFD投与から10週間後にOGTTを実施し、その3週間後にITTを実施した。

A: マウスは20:00 (ZT 11)より絶食、自由飲水とし、16時間後にグルコース水を経口投与した (2 g/kg body weight)。投与から0分、15分、30分、60分、120分の時点で尾静脈から採血し、血糖値を測定した。棒グラフはAUC (Area under the curve)を示す。値は平均値±標準誤差で示した。(n=8-10)

B: マウスは11:00 (ZT 2)から6時間絶食、自由飲水させた後、インスリン溶液を腹腔内投与した(0.75 IU insulin/g BW)。投与から0分、20分、40分、60分、90分、120分の時点で尾静脈から採血し、血糖値を測定した。値は0分の血糖値を100%とし、平均値±標準誤差で示した。(n=8-10)

\*は有意差 $P < 0.05$ 、\*\*は有意差 $P < 0.01$ を示す。

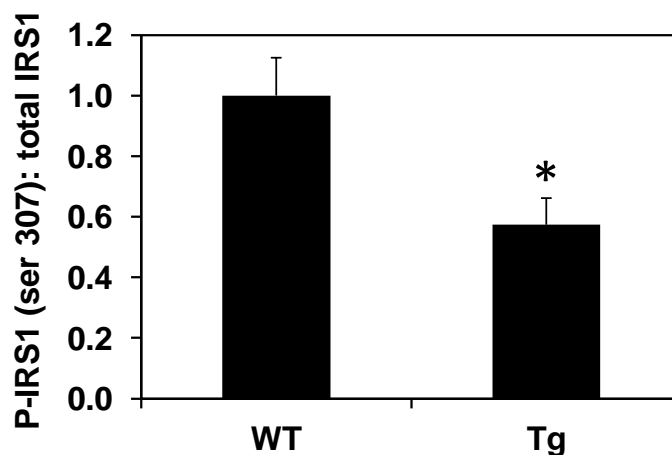
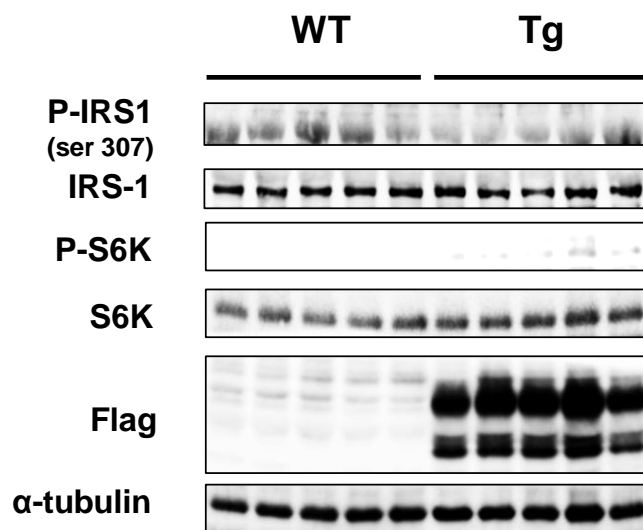
**A****B****Fig.4-17 高脂肪食飼育後の組織重量および血中成分(Bライン)**

A: 120日間の高脂肪食飼育後、マウスを解剖し骨格筋（腓腹筋: gastrocnemius、ひらめ筋: soleus）、肝臓、精巢上体脂肪組織の重量を測定した。それぞれの重量は平均値±標準誤差で示した。(n=8-10)

B: 解剖時(4時間絶食後)に採取した血漿を用い、血中グルコース濃度、血中TG(中性脂肪)濃度、血中NEFA(遊離脂肪酸)濃度、インスリン濃度を示した。それぞれの値は平均値±標準誤差で示した。(n=8-10)

\*は有意差P<0.05を示す。



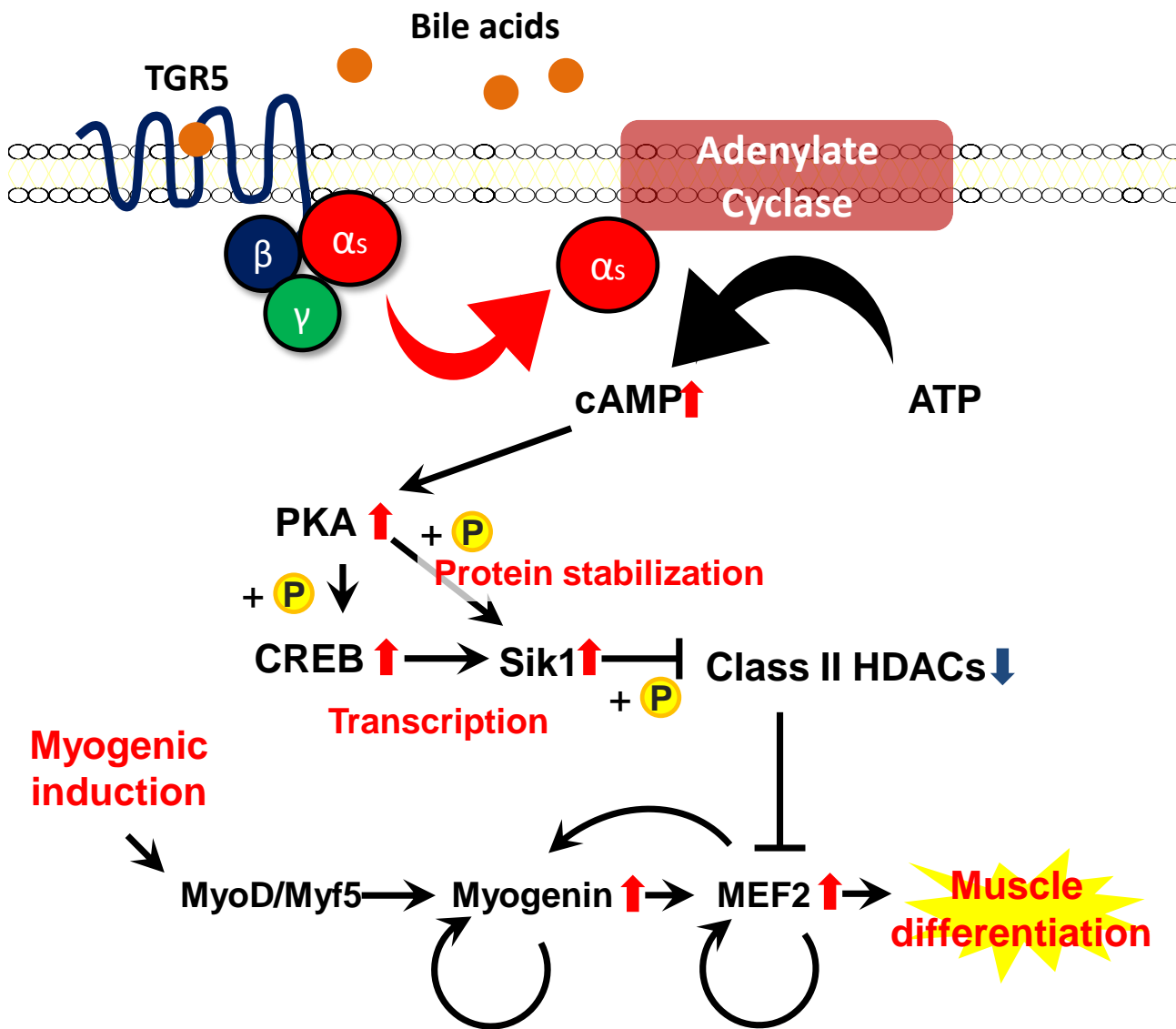


**Fig.4-18 高脂肪食負荷後の骨格筋におけるタンパク質解析(Bライン)**

120日間の高脂肪食飼育後、マウスから得られた骨格筋 (gastrocnemius muscle) を RIPA buffer で溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質サンプルを調製後 SDS-PAGE に供し、anti-P-IRS1 (ser 307) 抗体、anti-IRS1 抗体、anti-P-S6K 抗体、anti-S6K 抗体、anti-P62 抗体、anti-Flag 抗体、anti-α-tubulin 抗体を用いて Western blotting を行った。

P-IRS1 と IRS-1 のバンドは定量化し、両群で P-IRS1 (Ser 307) / IRS1 比を求めた。グラフは平均値 ± 標準誤差で示している。(n=5)

\*は有意差  $P < 0.05$  を示す。



**Fig.4-19 TGR5による筋分化亢進において想定される経路**  
 TGR5はcAMP-PKA経路を介してSik1の発現を上昇させ、Mef2を活性化することにより筋分化を促進すると考えられる。

## 第五章

# 総合討論

本研究では一貫して骨格筋代謝調節機構の解明に取り組み、骨格筋における糖、脂質代謝、あるいは骨格筋自体の量的変化に関する興味深い現象をとらえる事に成功した。まず第二章では、骨格筋における LPL の発現調節において AMPK-PPAR $\gamma$ 1 経路が重要な役割を担う事を示し、骨格筋脂質代謝制御機構の新たな一面を明らかにした。また第三章、第四章では、代謝改善効果を持つ GPCR として知られる TGR5 に焦点を当て、骨格筋における TGR5 発現調節機構を分子レベルで解析し、TGR5 の発現増加がインスリン抵抗性改善や筋肥大に関与する事を明らかにした。以下、本研究から得られた知見をもとに、骨格筋代謝の分子機構、および生活習慣病との関わりについて総合的に論じる。

#### ・運動による脂質代謝改善の分子メカニズムとその応用

運動は脂質代謝改善に有効であり、その一部は LPL の活性化により説明される。本研究では LPL 発現調節機構を分子レベルで解析し、AMPK-PPAR $\gamma$ 1 経路により LPL 発現が調節される事を見出した。これにより運動による LPL 活性化メカニズムの一端を明らかにする事が出来たと考えている。

運動後の LPL 活性化が脂質代謝の改善に重要である事が過去に報告されているが (32, 33)、注意すべき点も存在する。骨格筋特異的に LPL を過剰発現したマウスでは、骨格筋への TG 蓄積量が増加するものの、骨格筋インスリン抵抗性は発症しないと報告が有る一方で (151)、別の研究グループは骨格筋特異的に LPL を過剰発現したマウスに高脂肪食を与えると、骨格筋におけるインスリン抵抗性が増悪すると報告している (152)。LPL は脂肪酸の取り込みに関与する因子であるため、その発現上昇により筋細胞に TG が蓄積する事や、それにより条件次第ではインスリン抵抗性を発症してしまう可能性は十分に考えられる。おそらく運動による脂質代謝改善作用において重要なのは、LPL の活性化により筋細胞が積極的に脂肪酸を取り込む事に加え、取り込んだ脂肪酸を即座に分解し、熱や運動エネルギーの形で消費する事にあるのではないだろうか。そのように考えると、AMPK は非常に効果的に脂質代謝の改善に貢献すると考えられる。つまり AMPK は運動時にエネルギー枯渇を感知する事で活性化し、PPAR $\gamma$ 1 経路を介して LPL 発現を上昇させ、これにより筋細胞内へ脂肪酸を流入させる。また同時に AMPK は ACC のリン酸化や PGC-1 $\alpha$  の発現上昇を誘導する事で  $\beta$  酸化を亢進し、流入した脂肪酸は直ちにエネルギーに変換され、消費される (23-26)。そのため運動時には筋細胞に TG が蓄積したり、インスリン抵抗性が惹起されたりする事もなく、全身の脂質代謝を改善すると予測される。こ

のような機能を果たし得る事も、最大のエネルギー消費臓器たる骨格筋の特徴であり、魅力であるように思う。

近年、運動により骨格筋で生じる活性酸素種も、運動によるインスリン感受性の改善に重要な役割を果たしている事が報告された(126)。一般に活性酸素種は生体に害を及ぼすと考えられていたが、当該論文では運動の前に抗酸化剤であるビタミンCやビタミンEを摂取したヒトは、運動後のインスリン感受性の上昇が見られなくなるという結果が示されている。また興味深い事に、運動後の骨格筋ではヒトでもPPAR $\gamma$ の発現が上昇すること、そしてビタミンCやビタミンEの摂取によりその一部が抑制される事が報告されていた。論文が報告された当時は、PPAR $\gamma$ が運動後に発現上昇するメカニズムやその役割に関しては明らかでなかったが、本研究で示したデータはこの報告とよく合致するものとなった。つまり、運動により生じた活性酸素種は、Fig.2-5で示されたようにAMPKの活性化を促し、これにより発現上昇したPPAR $\gamma$ 1がLPLを介して脂質代謝改善に導いた事で、インスリン感受性を亢進させたと予測される。この報告は、本研究で示されたAMPK-PPAR $\gamma$ 1-LPL経路がヒトでも起こり得る事を強く支持するものと考えている。

厚生労働省が発表した平成21国民健康・栄養調査によると、体重管理を心掛けている人は男性で7割、女性で8割だが、実際にメタボリックシンドローム予防・改善のための運動をしている人は全体の3割に満たない事が明らかとなった。定期的な運動習慣を確立する事が困難な現代社会において、運動による代謝改善の分子メカニズムを明らかにし、機能性食品や薬剤によりそれを模倣する試みが重要になると考えられる。

#### ・骨格筋におけるTGR5役割と生活習慣病予防への応用

本研究の後半部、第三章と第四章では、胆汁酸をリガンドとするGタンパク質共役型受容体TGR5に焦点を当て研究を進めた。これまで、マウスにTGR5リガンドを投与する事で肥満や耐糖能異常が改善する事が確認されていたが(87, 88)、TGR5を介した代謝改善効果に対する骨格筋の寄与は明らかでなかった。そこで骨格筋におけるTGR5の発現調節機構の解析、および機能解析を通して、代謝改善における骨格筋TGR5の役割と重要性を明らかにしようと考えた。

まず第三章において、TGR5が新規UPRターゲット遺伝子である事を明らかにした。また生体骨格筋においては運動後、そして絶食中にUPRが生じ、TGR5

発現が上昇する事が明らかになった。更に第四章では骨格筋特異的に **TGR5** を過剰発現するマウスを作出し、そのフェノタイプ解析を行ったところ、骨格筋の肥大化、そして高脂肪食により誘導されるインスリン抵抗性の改善が確認された。その分子メカニズムを全て明らかにするには至らなかったが、それぞれ **Sik1** を介した筋分化の促進や、**S6K** の活性抑制を介したインスリン感受性の亢進が関与している事が示唆されている。以上の結果をまとめると、骨格筋における **TGR5** の生理的役割がいくつか推測される。

最初に、運動後の骨格筋における **TGR5** の役割について考察する。まず最も興味深い点は、筋肥大やインスリン抵抗性の改善といった、運動後の骨格筋で生じる有益な効果が **TGR5** トランスジェニックマウスで再現された点である。これは、**TGR5** が運動による代謝改善効果の一端を担う可能性を示している。ただし、運動による筋肥大が主に **mTORC1-S6K** 経路で説明されるのに対し (153, 154)、本研究で示した **TGR5** による筋肥大は **Sik1** による筋分化亢進が関与していると予測されており、特に **S6K** の抑制が確認された点で全く性質を異にしている。これは運動と摂食刺激が組み合わさった時にのみ活性化する新たな筋肥大経路の存在を示唆するものであり、いくら運動を行っても摂食による栄養の補給が無ければ筋肥大が生じにくい仕組みを備えていると考えられる。

次に、**TGR5** が絶食により発現亢進する意義について考察する。そもそも骨格筋は、運動器であると同時にアミノ酸貯蔵器としての機能も持っている。絶食時には骨格筋を構成するタンパク質が分解されアミノ酸を生成し、肝臓に運ばれた後、糖新生に利用される。これは脳のグルコース要求を満たす上で重要な応答だが、当然タンパク質を消費された分、骨格筋は萎縮してしまう。ではこういった危機的状況下で骨格筋 **TGR5** の発現を上昇する事にどのような意味が有るのだろうか。本研究で明らかにした **TGR5** の機能から推察するに、おそらくは絶食を経た筋細胞は **TGR5** を介して摂食シグナルである胆汁酸をより強く受容し、これにより萎縮した筋細胞を再び肥大化させているのではないかと考えている。またインスリンシグナルのネガティブフィードバック機構を担う **S6K** を不活性化する事で摂食後のインスリンシグナルを長時間持続させ、エネルギー枯渇に陥った筋細胞へのグルコースの取り込みを促進する事も予測される。つまり、絶食時に自身を犠牲にする事で脳をグルコース欠乏から保護していた骨格筋が、摂食による栄養の流入に応じて急速に回復するために **TGR5** が役立っているのではないかと考えられる。

骨格筋に発現するアドレナリン受容体や Frizzled7 と言った GPCR が筋肥大に関わる事はすでに良く認知されており、それは mTORC1 経路の活性化により誘導されると考えられている (75-77)。TGR5 もまた筋肥大を誘導したが、その機構はこれまでの GPCR とは全く異なるものであった。特にアドレナリン受容体も Frizzled7 受容体も、TGR5 と同じく Gas 共役型 GPCR であるにも関わらず、TGR5 のみが mTORC1 経路を抑制していた点は興味深く、これは Gas 非依存的な経路、つまり Gβγ 二量体を介した経路が、GPCR による mTORC1 活性調節に重要である事を物語っている。実際、過去に Gβγ 二量体が mTORC1 の上流因子である Akt 活性化に関与する事が報告されているため (155)、今後 TGR5 による筋肥大に Gβγ 二量体が関与するかどうか、慎重に検討する必要があると考えている。

TGR5 は高脂肪食による肥満や耐糖能異常を改善する機能分子として注目を集めている。その効果は、マウスでは BAT、ヒトでは骨格筋における熱産生遺伝子の発現上昇や、小腸からの GLP-1 分泌促進により説明されてきた。しかし本研究では、骨格筋に発現する TGR5 が、筋の肥大化やインスリン感受性の改善にも関与する事を明らかにし、TGR5 の作用点としての骨格筋の重要性を新たに示す事ができた。筋萎縮が糖尿病と相関する事や (149, 150)、メタボリックシンドロームの根源が肥満により惹起されるインスリン抵抗性である事を考えると、TGR5 が担う筋肥大、およびインスリン抵抗性の抑制は、生活習慣病予防に貢献し得るものと考えられる。今後更に研究が発展し、TGR5 をターゲットとした生活習慣病治療薬や機能性食品が開発される事を期待する。

## 引用文献

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M (2011) National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. **377**, 557-567.
2. Golbidi S, Mesdaghinia A, Laher I. (2012) Exercise in the metabolic syndrome. *Oxid Med Cell Longev*. **2012**, 349710.
3. Perseghin G, Price TB, Petersen KF, Roden M, Cline GW, Gerow K, Rothman DL, Shulman GI. (1996) Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N Engl J Med*. **335**, 1357-1362.
4. Marino-Buslje C, Martin-Martinez M, Mizuguchi K, Siddle K, Blundell TL. (1999) The insulin receptor: from protein sequence to structure. *Biochem Soc Trans*. **27**, 715-726.
5. White MF. (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*. **182**, 3-11.
6. Koyasu S. (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nature Immunol* **4**, 313-319.
7. Pearce LR, Komander D, Alessi DR. (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**, 9-22.
8. Ma XM, Blenis J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **10**, 307-318.
9. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. **431**, 200-205.
10. David S, Ken I M, Guang GW, Belinda J. M, Trazel Teh, Colin M. House, C. Shamala Fernandez, Timothy C, Lee AW, Bruce E. K. (1996) Mammalian AMP-activated Protein Kinase Subfamily. *J Biol Chem*. **271**, 611-614.
11. Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI, Nicholl JK, Fernandez CS, Michell BJ, Witters LA, Power DA, Sutherland GR, and Kemp BE. (1997) AMP-activated



- protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett.* **409**, 452–456.
12. Thornton C, Snowden MA, Carling D. (1998) Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem.* **273**, 12443–12450.
  13. Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* **346**, 659–669.
  14. Simon AH, Michele AS, Elaine GG, Arthur ME, David C, D. Grahame H. (1995) 5'-AMP Activates the AMP-activated Protein Kinase Cascade, and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Activates the Calmodulin-dependent Protein Kinase I Cascade, via Three Independent Mechanisms. *J Biol Chem.* **270**, 27186–27191.
  15. Davies SP, Helps NR, Cohen PTW, Hardie DG. (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2Ca and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* **377**, 421–425.
  16. Winder WW, Hardie DG. (1996) Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **270**, E299–E304.
  17. Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, Kemp BE, McConell GK. (2003) Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes.* **52**, 2205–2212.
  18. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. (1999) Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol.* **87**, 1990–1995
  19. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. (1999) 5'-AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes.* **48**, 1667–167
  20. Niu W, Bilan PJ, Ishikura S, Schertzer JD, Contreras-Ferrat A, Fu Z, Liu J, Boguslavsky S, Foley KP, Liu Z, Li J, Chu G, Panakkezhum T, Lopaschuk GD, Lavandero S, Yao Z, Klip A. (2010) Contraction-related stimuli regulate glut4 traffic in c2c12-glut4myc skeletal muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **298**, E1058–E1071.

21. Somwar R, Niu W, Kim DY, Sweeney G, Randhawa VK, Huang C, Ramlal T, Klip A. (2001) Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating glut4 translocation and glucose transport. *J Biol Chem.* **276**, 46079–46087.
22. Hardie DG. (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr.* **93**, 891S-896S
23. Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., Witters, L.A. (1999) Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* **276**, E1–E18
24. Sibylle Jäger, Christoph Handschin, Julie St.-Pierre, Bruce M. Spiegelman. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12017-12022
25. Suwa M, Egashira T, Nakano H, Sasaki H, Kumagai S.(2006) Metformin increases the PGC-1alpha protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol.* (1985). **101**, 1685-1692.
26. Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU, and Park JY. (2006) AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARα and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **340**, 291–295.
27. Jounghmok K, Mondira K, Benoit V and Kun-Liang G. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. cell biol.* **13**, 132-141.
28. Daniel F. Egan, David B. Shackelford, Maria M. Mihaylova, Sara Gelino, Rebecca A. Kohnz, William Mair, Debbie S. Vasquez, Aashish Joshi, Dana M. Gwinn, Rebecca Taylor, John M. Asara, James Fitzpatrick, Andrew Dillin, Benoit Viollet, Mondira Kundu, Malene Hansen, Reuben J. Shaw. (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science.* **331**, 456-461.
29. Wang H, Knaub LA, Jensen DR, Young Jung D, Hong EG, Ko HJ, Coates AM, Goldberg IJ, de la Houssaye BA, Janssen RC, McCurdy CE, Rahman SM, Soo Choi C, Shulman GI, Kim JK, Friedman JE, Eckel RH. (2009) Skeletal muscle-specific deletion of lipoprotein lipase enhances insulin signaling in skeletal muscle but causes insulin resistance in liver and other tissues. *Diabetes.* **58**, 116–124.

30. Morino K, Petersen KF, Sono S, Choi CS, Samuel VT, Lin A, Gallo A, Zhao H, Kashiwagi A, Goldberg IJ, Wang H, Eckel RH, Maegawa H, Shulman GI. (2012) Regulation of mitochondrial biogenesis by lipoprotein lipase in muscle of insulin-resistant offspring of parents with type 2 diabetes. *Diabetes*. **61**, 877–887.
31. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. **15**, 5336-5348.
32. Seip RL, Mair K, Cole TG, Semenkovich CF. (1997) Induction of human skeletal muscle lipoprotein lipase gene expression by short-term exercise is transient. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **272**, E255–E261.
33. Bergeron J, Couillard C, Després JP, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. (2001) Race differences in the response of postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities to endurance exercise training in men: results from the HERITAGE Family Study. *Atherosclerosis*. **159**, 399-406.
34. Ohira M, Miyashita Y, Murano T, Watanabe F, Shirai K. (2009) Metformin promotes induction of lipoprotein lipase in skeletal muscle through activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Metabolism*. **58**, 1408–1414.
35. Ohira M, Endo K, Saiki A, Miyashita Y, Terai K, Murano T, Watanabe F, Tatsuno I, Shirai K. (2012) Atorvastatin and pitavastatin enhance lipoprotein lipase production in L6 skeletal muscle cells through activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Metabolism*. **61**, 1452–1460.
36. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl Acad. Sci*. **91**, 7355–7359
37. Nakamura MT, Yudell BE, Lior JJ. (2014) Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. **53**, 124-144.
38. Bart Staels, Jean Dallongeville, Johan Auwerx, Kristina Schoonjans, Eran Leitersdorf, Jean-Charles Fruchart. (1998) Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation*. **98**, 2088-2093.
39. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor

- gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. **83**, 813-819.
40. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. (2001) peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res*. **56**, 239-263.
  41. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. **93**, 229-240.
  42. P Tontonoz, E Hu, R A Graves, A I Budavari, B M Spiegelman. (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. **8**, 1224–1234.
  43. Loviscach M, Rehman N, Carter L, Mudaliar S, Mohadeen P, Ciaraldi TP, Veerkamp JH, Henry RR. (2000) Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia*. **43**, 304-311.
  44. Andrea L Hevener, Weimin He, Yaacov Barak, Jamie Le, Gautam Bandyopadhyay, Peter Olson, Jason Wilkes, Ronald M Evans, Jerrold Olefsky. (2003) Muscle-specific *Pparg* deletion causes insulin resistance. *Nat. Med*. **9**, 1491 – 1497.
  45. Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., and Muscat, G.E. (2003) The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol. Endocrinol*. **17**, 2477–2493.
  46. Bassel-Duby, R., Olson, E.N. (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu. Rev. Biochem*. **75**, 19–37.
  47. Vihang A. Narkar, Michael Downes, Ruth T. Yu, Emi Emblar, Yong-Xu Wang, Ester Banayo, Maria M. Mihaylova, Michael C. Nelson, Yuhua Zou, Henry Juguilon, Heonjoong Kang, Reuben J. Shaw, Ronald M. Evans. (2008) AMPK and PPAR $\delta$  Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell*. **134**, 405–415.
  48. Deupi X, Standfuss J. (2011) Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol*. **21**, 541-551.
  49. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skinotitis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. (2011) Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. **477**,

- 549-555.
50. Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbé JC, Miller GJ, Hébert TE. (2013) The expanding roles of G $\beta\gamma$  subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev.* **65**, 545-577.
  51. Berdeaux R, Stewart R. (2012) cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **303**, E1-E17.
  52. DeLange RJ, Kemp RG, Riley WD, Cooper RA, Krebs EG. (1968) Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by adenosine triphosphate and adenosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem.* **243**, 2200–2208.
  53. Soderling TR, Hickenbottom JP, Reimann EM, Hunkeler FL, Walsh DA, Krebs EG. (1970) Inactivation of glycogen synthetase and activation of phosphorylase kinase by muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* **245**, 6317-6328.
  54. Sculptoreanu A, Scheuer T, Catterall WA. (1993) Voltage-dependent potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature.* **364**, 240–243.
  55. Seiler S, Wegener AD, Whang DD, Hathaway DR, Jones LR. (1984) High molecular weight proteins in cardiac and skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles bind calmodulin, are phosphorylated, and are degraded by Ca<sup>2+</sup>-activated protease. *J Biol Chem.* **259**, 8550– 8557.
  56. Gonzalez GA, Montminy MR. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* **59**, 675–680.
  57. Benson DW, Foley-Nelson T, Chance WT, Zhang FS, James JH, Fischer JE. (1991) Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J Surg Res.* **50**, 1–5.
  58. C Spurlock DM, McDanel TG, McIntyre LM. (2006) Changes in skeletal muscle gene expression following clenbuterol administration. *BMC Genomics.* **7**, 320.
  59. Choo JJ, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ. (1992) Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by  $\beta$ 2-adrenoceptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **263**, E50–E56.
  60. Hall JE, Kaczor JJ, Hettinga BP, Isfort RJ, Tarnopolsky MA. (2007) Effects of a CRF2R agonist and exercise on mdx and wildtype skeletal muscle. *Muscle Nerve.*

- 36**, 336–341.
61. Hinkle RT, Donnelly E, Cody DB, Samuelsson S, Lange JS, Bauer MB, Tarnopolsky M, Sheldon RJ, Coste SC, Tobar E, Stenzel-Poore MP, Isfort RJ. (2003) Activation of the CRF 2 receptor modulates skeletal muscle mass under physiological and pathological conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **285**, E889–E898.
  62. Ryall JG, Lynch GS. (2008) The potential and the pitfalls of beta-adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. *Pharmacol Ther.* **120**, 219–232.
  63. Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. (1984) Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep.* **4**, 83–91.
  64. Maltin CA, Hay SM, Delday MI, Lobley GE, Reeds PJ. (1989) The action of the beta-agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles. *Biochem J.* **261**, 965–971.
  65. Benson DW, Foley-Nelson T, Chance WT, Zhang FS, James JH, Fischer JE. (1991) Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J Surg Res.* **50**, 1–5.
  66. Forsberg NE, Ilian MA, Ali-Bar A, Cheeke PR, Wehr NB. (1989) Effects of cimaterol on rabbit growth and myofibrillar protein degradation and on calcium-dependent proteinase and calpastatin activities in skeletal muscle. *J Anim Sci.* **67**, 3313–3321.
  67. Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ. (2005) Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* **32**, 775–781.
  68. Baviera AM, Zanon NM, Carvalho Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. (2007) Pentoxifylline inhibits  $Ca^{2+}$ -dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**, E702–E708.
  69. Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. (2000) Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **279**, E663–E668.
  70. Chen M, Feng HZ, Gupta D, Kelleher J, Dickerson KE, Wang J, Hunt D, Jou W, Gavrilova O, Jin JP, Weinstein LS. (2009)  $G_{\alpha}$  deficiency in skeletal muscle leads

- to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol.* **296**, C930–C940.
71. Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.* **27**, 195-200.
  72. Laplante M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* **149**, 274-293.
  73. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* **3**, 1009–1013.
  74. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* **3**, 1014–1019.
  75. Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC. (2007) Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol* **102**, 740–747.
  76. Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, Lynch GS. (2010) Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic (beta)-adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol.* **588**, 4811–4823.
  77. von Maltzahn J, Bentzinger CF, Rudnicki MA. (2011) Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* **14**, 186-191.
  78. Berdeaux R, Stewart R. (2012) cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **303**, E1-E17.
  79. Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, Montminy M. (2007) SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nat Med.* **13**, 597-603.
  80. Stewart R, Akhmedov D, Robb C, Leiter C, Berdeaux R. (2013) Regulation of SIK1 abundance and stability is critical for myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

**110**, 117-122.

81. Schalm SW, LaRusso NF, Hofmann AF, Hoffman NE, van Berge-Henegouwen GP, Korman MG. (1978) Diurnal serum levels of primary conjugated bile acids. Assessment by specific radioimmunoassays for conjugates of cholic and chenodeoxycholic acid. *Gut*. **19**, 1006-1014.
82. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B.(1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. **284**, 1362-1365.
83. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K. (2002) Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. **298**, 714-719.
84. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. (2003) A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. **278**, 9435-9440.
85. Maruyama T, Tanaka K, Suzuki J, Miyoshi H, Harada N, Nakamura T, Miyamoto Y, Kanatani A, Tamai Y. (2006) Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J Endocrinol*. **191**, 197-205.
86. Cho YM, Fujita Y, Kieffer TJ.(2014) Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond. *Annu Rev Physiol*. **76**, 535-559.
87. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakı C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K.(2009) TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*.**10**, 167-177.
88. Arrojo E Drigo R, Fonseca TL, Werneck-de-Castro JP, Bianco AC.(2013) Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta*. **1830**, 3956-3964.
89. Silva JE, Larsen PR.(1983) Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*. **305**, 712-713.
90. Watanabe M, Houten SM, Matakı C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. **439**, 484-489.
91. Ono E, Inoue J, Hashidume T, Shimizu M, Sato R. (2011) Anti-obesity and



- anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* **410**, 677-681.
92. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. (2005) *Mutat Res.* **569**, 29-63.
  93. Ron D and Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 519-29.
  94. Lee AS. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* **35**, 373-381.
  95. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* **6**, 1355-1364.
  96. Haze K, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K.(2001) Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **355**, 19-28.
  97. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **20**, 6755-6767.
  98. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K.(2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* **33**, 75-89.
  99. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* **107**, 881-891.
  100. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K.(2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell.* **13**, 365-376.
  101. Ishikawa T, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kamei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K.(2013) ATF6 $\alpha/\beta$ -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 1387-1395.

102. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. **415**, 92-96.
103. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K.(2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell*. **4**, 265-271.
104. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K.(2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem*. **136**, 343-350.
105. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. **16**, 1345-1355.
106. Harding HP, Zhang Y, Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. **397**, 271-274.
107. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. **6**, 1099-1108.
108. Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D. (1996) Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol*. **16**, 4273-4280.
109. Lee J, Ozcan U. (2014) Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem*. **289**, 1203-1211.
110. Deldicque L, Cani PD, Philp A, Raymackers JM, Meakin PJ, Ashford ML, Delzenne NM, Francaux M, Baar K. (2010) The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **299**, E695-E705.
111. Deldicque L, Bertrand L, Patton A, Francaux M, Baar K. (2011) ER stress induces anabolic resistance in muscle cells through PKB-induced blockade of mTORC1. *PLoS One*. **6**, e20993.

112. Peng G, Li L, Liu Y, Pu J, Zhang S, Yu J, Zhao J, Liu P. (2011) Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*. **152**, 2206-2218.
113. Deldicque L, Van Proeyen K, Francaux M, Hespel P. (2011) The unfolded protein response in human skeletal muscle is not involved in the onset of glucose tolerance impairment induced by a fat-rich diet. *Eur J Appl Physiol*. **111**, 1553-1558.
114. Kim HJ, Jamart C, Deldicque L, An GL, Lee YH, Kim CK, Raymackers JM, Francaux M. (2011) Endoplasmic reticulum stress markers and ubiquitin–proteasome pathway activity in response to a 200-km run. *Med Sci Sports Exerc*. **43**, 18-25.
115. Wu J, Ruas JL, Estall JL, Rasbach KA, Choi JH, Ye L, Boström P, Tyra HM, Crawford RW, Campbell KP, Rutkowski DT, Kaufman RJ, Spiegelman BM. (2011) The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 $\alpha$ /ATF6 $\alpha$  complex. *Cell Metab*. **13**, 160-169.
116. Liao W, Nguyen MT, Yoshizaki T, Favelyukis S, Patsouris D, Imamura T, Verma IM, Olefsky JM. (2007) Suppression of PPAR- $\gamma$  attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol. Endocrinol. Metab*. **293**, E219-E227.
117. Bonen A, Dyck DJ, Ibrahim A, Abumrad NA. (1999) Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol*. **276**, E642-E649.
118. Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK. (1985) Regulation of lipoprotein lipase in muscle and adipose tissue during exercise. *J Appl Physiol*. **71**, 404-409.
119. Suwa M, Nakano H, Kumagai S. (2003) Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol*. **95**, 960-968.
120. Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. (2002) Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. **296**, 350-354.
121. Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, Soo Kim S, Ha J. (2001) The Regulation of AMP-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem Biophys Res Commun*. **287**, 92-97.

122. Shaw G, Kamen R.(1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. **46** 659-667.
123. Chen CY, Shyu AB. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends. Biochem. Sci.* **20** 465-470.
124. Wang W, Fan J, Yang X, Fürer-Galban S, Lopez de Silanes I, von Kobbe C, Guo J, Georas SN, Foufelle F, Hardie DG, Carling D, Gorospe M. (2002) AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol.* **22**, 3425-3436.
125. Martínez-Chantar ML, Vázquez-Chantada M, Garnacho M, Latasa MU, Varela-Rey M, Dotor J, Santamaria M, Martínez-Cruz LA, Parada LA, Lu SC, Mato JM. (2006) S-adenosylmethionine regulates cytoplasmic HuR via AMP-activated kinase. *Gastroenterology*. **131**, 223-232.
126. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. (2009) Antioxidants prevent healthpromoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**, 8665–8670.
127. Sugiura R, Kita A, Shimizu Y, Shuntoh H, Sio SO, Kuno T.(2003) Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature*. **424**, 961-965.
128. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol.* **195**, 356-372.
129. Pérez-Ortín JE, Alepuz P, Chávez S, Choder M. (2013) Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *J Mol Biol.* **425**, 3750-3775.
130. Ohsaka Y, Ohgiya S, Hoshino T, Ishizaki K. (2002) Phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in human hepatoblastoma cells is transiently increased by cold exposure and further enhanced by subsequent warm incubation of the cells. *Cell Physiol Biochem.***12**, 111-118.
131. Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, Kishishita M, Yoshida O, Fujita J. (1997) A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol.* **137**, 899-908.
132. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Xue JH, Itoh K, Matsuda T, Fujita J. (1997) Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun.* **236**, 804-807.

133. McBride K, Nemer M. (1998) The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol Cell Biol.* **18**, 5073-5081.
134. Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H, Iba H. (1991) Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5537-5542.
135. Danno H, Ishii KA, Nakagawa Y, Mikami M, Yamamoto T, Yabe S, Furusawa M, Kumadaki S, Watanabe K, Shimizu H, Matsuzaka T, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. (2009) The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha. *Biochem Biophys Res Commun.* **391**, 1222-1227.
136. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell.* **124**, 587-599.
137. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* **306**, 457-461.
138. Nagamori I, Yabuta N, Fujii T, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y, Nojima H. (2005) Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells.* **10**, 575-594.
139. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**, 2135-2148.
140. Lo YY, Wong JM, Cruz TF. (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* **271**, 15703-15707.
141. Finck BN, Bernal-Mizrachi C, Han DH, Coleman T, Sambandam N, LaRiviere LL, Holloszy JO, Semenkovich CF, Kelly DP. (2005) A potential link between muscle peroxisome proliferator- activated receptor-alpha signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab.* **1**, 133-144.
142. Hay N, Sonenberg N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18**, 1926-1945.
143. Potthoff MJ, Olson EN. (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental

- programs. *Development*. **134**, 4131-4140.
144. Ramachandran B, Yu G, Li S, Zhu B, Gulick T. (2008) Myocyte enhancer factor 2A is transcriptionally autoregulated. *J Biol Chem*. **283**, 10318-10329.
145. Huang K, Fingar DC. (2014) Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol*. **36C**, 79-90.
146. Ishiguro H, Katano Y, Nakano I, Ishigami M, Hayashi K, Honda T, Goto H, Bajotto G, Maeda K, Shimomura Y. (2006) Clofibrate treatment promotes branched-chain amino acid catabolism and decreases the phosphorylation state of mTOR, eIF4E-BP1, and S6K1 in rat liver. *Life Sci*. **79**, 737-743.
147. Jornayvaz FR, Samuel VT, Shulman GI. (2010) The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annu Rev Nutr*. **30**, 273-290.
148. Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI. (2004) PKC- $\theta$  knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. **114**, 823-827.
149. Sanada K, Miyachi M, Tanimoto M, Yamamoto K, Murakami H, Okumura S, Gando Y, Suzuki K, Tabata I, Higuchi M. (2010) A cross-sectional study of sarcopenia in Japanese men and women: reference values and association with cardiovascular risk factors. *Eur J Appl Physiol*. **110**, 57-65.
150. Srikanthan P, Hevener AL, Karlamangla AS. (2010) Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PLoS One*. **5**, e10805.
151. Voshol PJ, Jong MC, Dahlmans VE, Kratky D, Levak-Frank S, Zechner R, Romijn JA, Havekes LM. (2001) In muscle-specific lipoprotein lipase-overexpressing mice, muscle triglyceride content is increased without inhibition of insulin-stimulated whole-body and muscle-specific glucose uptake. *Diabetes*. **50**, 2585-2590.
152. Ferreira LD, Pulawa LK, Jensen DR, Eckel RH. (2001) Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance. *Diabetes*. **50**, 1064-1068.
153. Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. (2013) Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med*. **19**, 101-106.

154. Baar K, Esser K. (1999) Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol.* **276**, C120-C127.
155. Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS. (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma. *J Biol Chem.* **273**, 19080-19085.

原著論文

Sasaki T, Nakata R, Inoue H, Shimizu M, Inoue J, Sato R. (2014) Role of AMP K and PPAR $\gamma$ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **306**, E1085-E1092



## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 24 年度博士課程進学  
氏名 佐々木 崇  
指導教員名 佐藤 隆一郎

### 論文題目

## 生活習慣病予防に向けた骨格筋代謝調節機構の分子基盤

骨格筋は人体で最大のエネルギー消費組織であり、同時に最大の糖、脂質代謝の場である。それゆえ、代謝異常を基点として発症する種々の生活習慣病を予防するにあたり、骨格筋は重要なターゲットになると考えられている。そこで本研究では新たな生活習慣病予防法の確立に向け、骨格筋代謝調節機構の分子基盤構築を試みた。

### 骨格筋における LPL 発現調節機構の解析

LPL (lipoprotein lipase) は細胞表面に係留された形で存在するリパーゼであり、血中のカイロミクロンや VLDL に含まれる中性脂肪を加水分解し、脂肪酸を遊離させる事で筋細胞の脂肪酸取り込みを促す働きを持つ。骨格筋において LPL は運動時に一過的に発現上昇する事が知られており、運動による脂質代謝改善において重要な役割を担う事が分かっている。それゆえ、LPL 発現量のコントロールは生活習慣病予防・治療において重要な課題の 1 つとなっている。そこで骨格筋における LPL 発現上昇メカニズムを分子レベルで明らかにする事を目的とし、研究を行った。

まず 4 週間に渡りトレッドミル走行運動を負荷したマウスから骨格筋を採取し、遺伝子発現変動を測定した。その結果、従来の報告通り LPL の発現亢進が確認された。次に運動時に活性化する事が知られる AMPK (AMP-activated protein kinase) に着目し、マウスへの AMPK 活性化剤投与実験を行った。その結果運動後の骨格筋と同様に LPL の発現亢進が確認されたことから、運動後に発現上昇する LPL は AMPK により発現調節を受けている事が示唆された。さらに運動後の骨格筋と AMPK 活性化剤投与後の骨格

筋では核内受容体 PPAR $\gamma$ 1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1) の発現が上昇するという意外な共通点を発見した。脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$ 1 は骨格筋での発現量が低く、筋細胞における機能はこれまであまり着目されてこなかったが、脂肪細胞では LPL の発現に寄与する事が報告されている。そこで運動後の LPL 発現上昇も PPAR $\gamma$ 1 により調節されている可能性があると考え、培養骨格筋細胞 C2C12 を用いて検証を行った。

まず C2C12myotube に対し AMPK 活性化剤を投与したところ、マウス骨格筋で見られた応答と同様に PPAR $\gamma$ 1 の発現亢進が確認された。この応答は様々な AMPK 活性化剤により同様に誘導され、AMPK 阻害剤の存在下では一様に抑制された事から、筋細胞において PPAR $\gamma$ 1 は AMPK 依存的に発現調節される事が明らかとなった。また興味深い事に、AMPK 活性化剤を投与した C2C12myotube では PPAR $\gamma$ 1 mRNA の安定化が確認され、PPAR $\gamma$ 1 発現上昇の少なくとも一部は mRNA の安定化を介した作用であると考えられた。安定化のメカニズムは現在のところ明らかになっていないが、PPAR $\gamma$ 1 mRNA の 3' UTR に存在する ARE (AU-rich element) 配列に何らかの安定化因子が結合しているのではないかと予想している。

次に PPAR $\gamma$ 1 が骨格筋において LPL 発現に関与するか確認するため、レンチウイルスを用いた PPAR $\gamma$ 1 の過剰発現、並びにノックダウン実験を行った。その結果、PPAR $\gamma$ 1 を過剰発現した C2C12myotube は LPL mRNA 発現が 40 倍以上に上昇し、タンパク質レベルでも強く発現増加する事、そして PPAR $\gamma$ 1 ノックダウンにより LPL mRNA の基底状態での発現量が 20%程度まで減少し、AMPK 活性化剤により誘導される LPL 発現亢進が抑制される事を明らかにした。以上の結果より、骨格筋における LPL 発現に関して AMPK-PPAR $\gamma$ 1 経路が重要な役割を担う事が示された。本研究で明らかになった新たな LPL 発現調節機構は、運動による脂質代謝改善の分子メカニズムを明らかにするばかりでなく、生活習慣病の予防という観点から AMPK-PPAR $\gamma$ 1 経路の重要性を示すものである。

### 骨格筋における TGR5 の発現調節機構および機能の解析

TGR5 は肝臓、小腸、褐色脂肪組織、骨格筋などに広く発現する G タンパク質共役型受容体であり、胆汁酸をリガンドとして活性化する事が知られている。マウスに TGR5 リガンドを投与すると抗肥満作用や耐糖能異常の改善が見られる事から、TGR5 はメタボリックシンドロームや生活習慣病予防のターゲット因子として注目されている。TGR5 は小腸において GLP-1 (glucagon-like peptide-1) の分泌亢進を促し、糖代謝を改善する事が報告されている他、骨格筋においては熱産生を促す事が予測されているもの

の、骨格筋 TGR5 の役割に関しては不明な点が多く、その詳細解析が望まれている。

骨格筋における TGR5 の性質を明らかにするため、まずはその発現調節機構の解明に取り組んだ。TGR5 発現調節の分子機構に関してはこれまで報告が無かったため、まずは C2C12myotube に対し様々な刺激を与え、TGR5 発現の変動を追跡した。その結果、小胞体ストレス誘導剤の投与により TGR5 発現が有意に上昇する事を見出した。小胞体ストレスが生じた細胞では、小胞体ストレス応答/UPR (unfolded protein response) が生じ、ATF6 $\alpha$  (activating transcription factor 6 alpha)、XBP-1 (X-box binding protein 1)、ATF4 と言った転写因子群が活性化する事や、JNK (c-jun N-terminal kinase) 経路が活性化する事が知られている。そこでこれらの因子が TGR5 発現に関与するか調べたところ、ATF6 $\alpha$  と XBP-1 が TGR5 の 5' 上流に存在する ERSE (ER stress response element) 様配列と UPRE (unfolded protein response element) 様配列が連結した領域を介して TGR5 プロモーター活性を上昇させている事、並びに JNK 経路も何らかの形で TGR5 発現上昇に寄与する事を明らかにした。また C2C12myotube に対しアデノウイルスを用いて ATF6 $\alpha$  を過剰発現させた際にも TGR5 の発現上昇が確認されたため、内因性 TGR5 の発現にも UPR が関与する事が示された。

続いて、生体骨格筋における TGR5 発現調節について検討を行った。これまで、運動後の骨格筋では一過的に UPR が生じる事が報告されている。そこでトレッドミル走行運動を負荷したマウス後肢から骨格筋を採取し、mRNA 発現変動を測定した。その結果、過去の報告通り UPR 関連遺伝子の発現増加が確認され、この時同時に TGR5 の発現亢進が確認された。さらに TGR5 が胆汁酸をリガンドとして活性化する因子、つまり摂食刺激により活性化する因子である事から、絶食時やその後の再摂食により発現変動する可能性が高いと考えた。実際に検証を行ったところ、絶食時に TGR5 発現が上昇する事が確認され、更にこの時 UPR 関連因子の発現上昇や JNK の活性化が確認された事から、絶食時の TGR5 発現上昇も UPR により誘導されると考えられた。以上の結果より、生体骨格筋において TGR5 は運動や絶食といったストレス下で発現増加し、来る摂食シグナルに備えているものと考えられる。

更に骨格筋における TGR5 の機能を解析するべく、骨格筋特異的 TGR5 トランスジェニックマウスを作出した。すると驚くべき事に、トランスジェニックマウスは野生型マウスに比べて約 10% に及ぶ骨格筋の肥大化が確認された。この時、タンパク質合成を促進する事で筋肥大を誘導する S6K (S6 kinase) は予想に反して活性抑制された事などから、TGR5 が筋分化を亢進する事で筋肥大を誘導していると予想した。実際、C2C12 細胞に対してアデノウイルスにより TGR5 を過剰発現し、更にリガンドを投与する事により筋分化が促進する事が示された。この時の遺伝子発現の経時的な変化を確認したとこ

る、この現象は **Sik1** の発現上昇とそれに次ぐ **Mef2** の活性化が関与すると推測され、トランスジェニックマウスから得られた初代培養筋衛星細胞を分化誘導した際も類似した遺伝子発現パターンが確認された。以上の結果より、**TGR5** 誘導性の筋肥大は筋分化の促進によってその一部が説明できると考えられた。

**TGR5** トランスジェニックマウスで活性抑制された **S6K** は、インスリンシグナルにより活性化してタンパク質合成を促進する因子であると同時に、インスリンシグナルのネガティブフィードバックを担う事も知られる。それゆえ、**S6K** ノックアウトマウスは高脂肪食負荷により誘導されるインスリン抵抗性を免れる事が報告されていた。そのため **TGR5** トランスジェニックマウスも高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性に対して耐性を示すと予想し、長期高脂肪食負荷試験を行った。その結果、野生型、及びトランスジェニックマウス間で体重に有意な差は生じなかったが、トランスジェニックマウスでは経口糖負荷試験の成績が改善し、インスリン負荷試験でも改善傾向が確認された。また **S6K** のターゲットでありインスリン抵抗性の原因にもなる **IRS-1** (Insulin receptor substrate 1) セリン残基のリン酸化も、トランスジェニックマウスでは抑制されていた。同様の結果は、異なる2つのトランスジェニックラインで確認された。この結果は、生体骨格筋において **TGR5** がインスリン抵抗性改善に寄与する事を示している。

## 総括

本研究前半部では、**AMPK** の新たな役割として、**PPAR $\gamma$ 1** を介した **LPL** の発現調節作用を明らかにした。糖尿病になりやすい家系のヒトは、骨格筋における **LPL** 発現量が健常者の半分程度まで低下している事が報告されており、**AMPK-PPAR $\gamma$ 1-LPL** 経路が新たな糖尿病予防法確立に向けた重要な経路となる事が期待される。

また後半部では骨格筋における **TGR5** の機能を解析し、筋肥大やインスリン抵抗性抑制作用を持つ事を明らかにした。生理的には、絶食により萎縮した骨格筋の再生や運動後の骨格筋の肥大化、あるいはインスリンネガティブフィードバックの阻害による糖取り込みの促進などの役割を担うと予測されるが、**TGR5** 活性化能を持つ機能性食品成分などを利用しこの機能をうまく活用する事で、代謝改善、更には生活習慣病予防に貢献し得るものと考えられる。

## 発表論文

Sasaki T, Nakata R, Inoue H, Shimizu M, Inoue J, Sato R.

“Role of AMPK and PPAR $\gamma$ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle.”

*Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2014) 306: E1085-E1092

## 謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室にて行われたものです。

本研究を遂行するにあたり、先見の明を持った重要な研究テーマを与えて頂いたうえ、5年間もの長きに渡り終始熱心にご指導いただき、また思う存分に研究に打ち込める環境を整えて下さいました、東京大学大学院農学生命科学研究科、応用生命化学専攻食品生化学研究室、佐藤隆一郎教授に深く感謝するとともに、その研究に対する直向な姿勢に心から敬意を表します。

本研究を遂行するにあたり、細部に渡り適切な助言をいただき、研究における論理的な思考法とその大切さをご指導いただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科、応用生命化学専攻食品生化学研究室、井上順准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験操作のご指導のみならず豊富な知識を背景に様々なアイデアを提供していただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科、応用生命化学専攻食品生化学研究室、清水誠助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、研究室に配属したばかりの私に基礎的な実験技術や研究の進め方を丁寧に教えて頂いた、東京大学大学院農学生命科学研究科、応用生命化学専攻食品生化学研究室、橋詰力特任助教に深く感謝致します。

第二章の研究を遂行するにあたり、共同研究者として実験材料をご供与頂いた、奈良女子大学、井上裕康教授に深く感謝致します。

第二章の研究を遂行するにあたり、共同研究者として実験材料をご供与頂いた、奈良女子大学、中田理恵子講師に深く感謝致します。

第三章及び第四章の研究を遂行するにあたり、様々な面で研究のサポートをしていただいた、三田萌子学士に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、経済面でのご支援を賜りました、日本学術支援会に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々なご配慮、ご助力、ご指導をいただいた食品生化学研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、私の研究生活を理解し、支えて下さった家族に、心より感謝申し上げます。

2014年12月  
東京大学大学院 農学生命科学研究科  
応用生命化学専攻 食品生化学研究室