

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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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ことから、筋細胞において PPAR γ 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 γ 1 mRNA の安定化が確認され、PPAR γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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ことから、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 α (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 α と XBP-1 が TGR5 の 5' 上流に存在する ERSE (ER stress response element) 様配列と UPR (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 α 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 γ 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 γ 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 γ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle.”

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