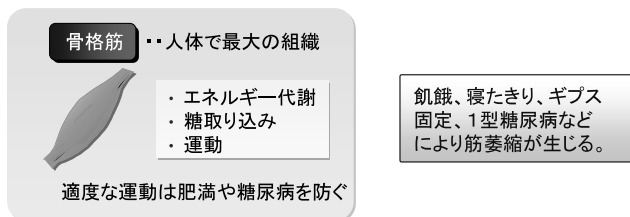




骨格筋機能と FOXO タンパク質

1. はじめに

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖（グルコース）取込み、運動において重要な役割を果たす（図1）。生体のエネルギー状態を反映し、骨格筋はその代謝機能を調節する。骨格筋はインスリンの主要な標的臓器のひとつであり、骨格筋の機能不全はメタボリックシンドローム（特に糖尿病や肥満）に結びつく。また骨格筋の量と質はその機能に重要であり、身体活動・環境・病態などによって変化する。例えば、飢餓や寝たきりなどにより骨



筋線維は大きく2種類に分類される	
タイプI	タイプII
赤筋・遅筋	白筋・速筋
長い運動 (マラソン)	短い運動 (100m走)
ミトコンドリア豊富	

図1 骨格筋について

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖（グルコース）取込み、運動において重要な役割を果たす。適切な運動により、エネルギー消費が増加し肥満が解消され、また糖代謝が活発になり糖尿病が予防・改善されることはよく知られている。運動トレーニングを継続することにより、骨格筋の量は増加する。しかしながら、栄養不足や、骨格筋を長い間使用しない場合には骨格筋の萎縮が生じる。また、骨格筋線維はミトコンドリアを豊富に有するタイプI筋線維（赤筋）およびタイプII筋線維（白筋）に大きく分類される。

格筋の萎縮が生じる。本稿ではフォークヘッド型転写因子 Forkhead box-containing protein, O1 (FOXO1) の骨格筋機能における役割について論じる。

2. フォークヘッド型転写因子 FOXO サブファミリー

FOXO1 (FKHR と呼ばれる) は、横紋筋肉腫において遺伝子転座を起こし FOXO1-Pax7 あるいは FOXO1-Pax3 の融合タンパク質を生ずる遺伝子として同定され^{1,2)}、FOXO1 は骨格筋機能に何らかの役割を担っていることが推察されていた。FOXO1 は FOXO3a, FOXO4 という遺伝子と同源性を有し、FOXO サブファミリーを形成する³⁾。FOXO タンパク質はフォークヘッドドメインを介して DNA に結合し転写因子として遺伝子発現調節を行う。また、FOXO はいくつかの核内ホルモン受容体とタンパク質-タンパク質相互作用し、転写共役因子として遺伝子発現調節を行う⁴⁾。線虫やショウジョウバエにも FOXO は保存されており、遺伝学的な研究により、FOXO はインスリン/インスリン様増殖因子 (IGF) シグナルの下流に存在し、抑制的に作用することが示唆された。さらに哺乳類でも FOXO はインスリン/IGF シグナルの下流で抑制的に作用していることが明らかになった。たとえば、肝臓ではインスリンは糖新生を抑制するが、FOXO はグルコース 6 ホスファターゼやホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子を活性化し糖新生を促進する³⁾。インスリン/IGF1 は受容体に結合し、リン酸化カスケードにより Akt が活性化され、リン酸化を受けた FOXO は核外に排出され、プロテアソームによって分解されることが知られている (図2A)⁵⁾。

3. 骨格筋の代謝適応における FOXO1 の役割

生体のエネルギー状態を反映して、骨格筋はその代謝機能を適応させる。絶食により骨格筋は糖の利用を抑制し、脂質を主なエネルギー源として用いる。これは血糖値の維持のために合目的な適応である。絶食時には血中インスリン値が低下し、再摂食により回復する。我々は骨格筋の代謝調節における FOXO の役割を解析する手がかりとして栄養条件変動による FOXO の遺伝子発現を検討した。すると FOXO1, FOXO3a, FOXO4 のうち、FOXO1 の遺伝子発現が絶食により顕著に増加し、再摂食により減少した⁶⁾。この顕著な遺伝子発現増加は検討した臓器のうち骨格筋のみで観察された。C2C12 筋培養細胞を用いた実験により、FOXO1 の発現増加により、血中から骨格筋に脂質を取り込む際に重要な酵素であるリポプロテインリパー

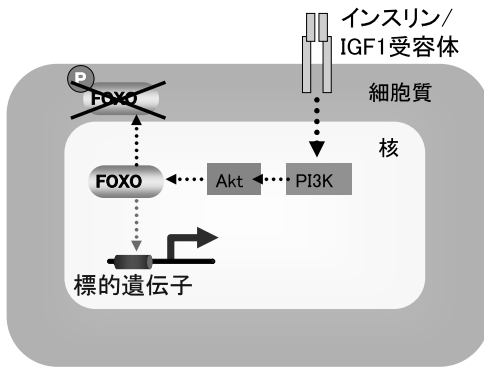


図 2A

図 2 FOXO1 の作用機序および標的遺伝子

図 2A インスリンシグナルにおける FOXO の位置づけ

FOXO はインスリン/IGF シグナルの下流に存在し、抑制的に作用する。インスリン/IGF1 は受容体に結合し、リン酸化カスケードにより Akt を活性化し、Akt は FOXO をリン酸化し、リン酸化された FOXO は核外に排出され、プロテアソームによって分解されることが知られている。

図 2B 絶食の骨格筋における FOXO1 による代謝遺伝子の発現調節

短期的な絶食時には FOXO1 が発現増加し *PDK4* 遺伝子が活性化され解糖系が抑制される。また、リボプロテインリパーゼ (*LPL*) 遺伝子が活性化され細胞内への脂肪酸の取り込みが増加し脂質利用が活発になる。また FOXO1 により核内受容体 LXR/RXR を介した *SREBP1c* 遺伝子の転写活性化能が低下し、脂肪合成が減少する。長期的な絶食時 (飢餓時) には FOXO1 は、*4EBP* (タンパク質翻訳抑制)、*atrogen1* (ユビキチンリガーゼ)、*Bnip3* (オートファジー)、*Gadd45* (細胞増殖抑制) といった標的遺伝子を活性化し、骨格筋萎縮が生じる。

FOXO1による遺伝子発現調節(短期間の絶食時)		
<i>PDK4</i> ↑	<i>LPL</i> ↑	<i>SREBP1c</i> ↓
糖利用 ↓	脂質取り込み ↑	脂質合成 ↓

FOXO1による遺伝子発現調節(長期間の絶食(飢餓)時)			
<i>4EBP</i> ↑	<i>Atrogen1</i> ↑	<i>Bnip3</i> ↑	<i>Gadd45a</i> ↑
タンパク質翻訳 ↓	タンパク質分解 ↑	オートファジー ↑	細胞増殖 ↓

図 2B

ゼ (*LPL*) 遺伝子の発現増加が引き起こされることが判明した (図 2B)⁶⁾。Furuyama らは、FOXO1 が、解糖系の抑制に作用するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 4 (*PDK4*) の遺伝子発現増加を起こすことを報告している⁷⁾。さらに、我々は核内受容体の liver X receptor (LXR) と retinoid X receptor (RXR) (特に RXR γ) が脂質合成のマスターレギュレーターである sterol regulatory element binding protein 1c (*SREBP1c*) 遺伝子の発現を活性化し筋肉内脂肪の蓄積を起こし、一方 FOXO1 は LXR/RXR による *SREBP1c* の遺伝子発現を負に制御することを見出した⁸⁾。以上の結果を合わせると、絶食時には FOXO1 の発現により骨格筋の糖利用および脂質合成が制限され、エネルギー源として脂質を利用するスイッチの切り替えがなされることが示唆される (図 2B)。

4. FOXO1 は筋萎縮を引き起こす

短期間の絶食により、エネルギー源として脂質の利用が盛んになることを述べたが、絶食が長期間に及んだ場合、筋萎縮が生じることが知られている。筋萎縮の生理的な目的は、栄養不足に対する防御反応で、骨格筋のタンパク質を分解し、アミノ酸を生成し、肝臓でグルコースに変え、脳にグルコースを優先的に供給するためと考えられる。す

なわち、飢餓状態になると、脳の機能を守るため、身体の防御機構として骨格筋を分解するわけである。この筋萎縮に FOXO は重要な役割を果たしているようである。遺伝子工学的な方法を用いて FOXO1 を骨格筋で過剰に発現する遺伝子改変マウス (FOXO1 マウス) を作製したところ、そのマウスでは赤筋の脱落を主体とする筋萎縮が生じた (図 3)⁹⁾。筋萎縮はがん・糖尿病・エイズなどの病気、老化、栄養不足 (飢餓)、あるいはギプス固定をして骨格筋を長い間使用しない場合などに生じ、筋萎縮による骨格筋機能低下のために生活の質 (quality of life, QOL) の低下がもたらされる。FOXO1 の発現増加は筋萎縮に共通して認められ、筋萎縮の原因となっていることが示唆される。FOXO1 および FOXO3a はユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解¹⁰⁾、オートファジーの亢進¹¹⁾、さらにタンパク質合成の抑制¹²⁾ (図 2B) など様々な機序により筋萎縮を引き起こすことが明らかになっている。また、IGF-1 とインスリンは骨格筋萎縮と逆の現象、骨格筋肥大を起こすことが知られる。IGF-1 とインスリンは、FOXO を分解するため (図 2A)、筋萎縮が抑制されるのであろう。

一方、FOXO1 の骨格筋特異的ノックアウトマウスでは、赤筋線維の減少が生じることが報告されている。FOXO1 は Notch シグナル経路を介して発生時における筋肉細胞の

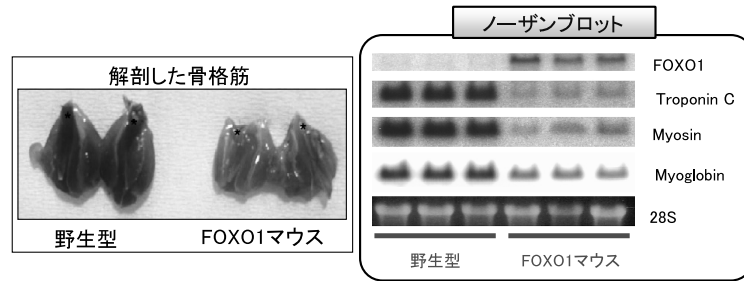


図3 FOXO1トランスジェニックマウス (FOXO1マウス) の骨格筋筋萎縮が生じる時にFOXO1の量が骨格筋で増加する。このFOXO1を人工的に骨格筋で過剰発現する遺伝子改変マウス (トランスジェニックマウス) の解析により、FOXO1が筋萎縮を引き起こす分子であることが明らかとなった。トランスジェニックマウス作成には骨格筋特異的に発現する α アクチンプロモーターを使用した。写真はFOXO1マウスのふくらはぎの骨格筋を解剖したものである。左側の通常のマウスの骨格筋に比べ、右側のFOXO1マウスの骨格筋は、サイズが小さく筋萎縮が起こっている。また、全体に色が薄く、赤筋の量が少なくなっている。またFOXO1マウスの骨格筋では赤筋 (タイプI線維) を特徴付ける遺伝子発現が顕著に減少していた。

分化にも重要な役割を果たしており、成体における骨格筋での作用に加えて、筋形成における多様な役割が示唆される¹³⁾。

5. 骨格筋機能におけるFOXO1と核内受容体とのクロストークの可能性

FOXOはいくつかの核内受容体とタンパク質-タンパク質相互作用し、核内受容体の活性を正または負に制御することが報告されている⁴⁾。興味深いことに、核内受容体PPAR δ の骨格筋における活性化や核内受容体ERR α の転写共役因子PGC1 β の発現増加は、ミトコンドリアの増加、赤筋化、エネルギー消費量の増加、体重減少を引き起こす^{14,15)}。例えば、骨格筋を含む様々な組織においてPGC1 β を過剰発現するトランスジェニックマウスは、餌をよく食べるがやせており (やせの大食い)、エネルギー消費量 (酸素消費量) は増大し、骨格筋ではPGC1 β の発現量増加によりエネルギー消費に関与する一群の遺伝子群が活性化されて代謝の変動が起こっている¹⁵⁾。一方、前述のFOXO1マウスでは筋萎縮に伴い自発的活動量がコントロールマウスに比べ減少し、また、グルコース経口投与後およびインスリン注射後の糖代謝能が悪化していた。すなわちFOXO1マウスは持久運動能力、耐糖能およびインスリン感受性が低下していることが示された⁹⁾。また、骨格筋におけるFOXO1の過剰発現はマウスの体脂肪量を増大することが明らかになった。これは、骨格筋におけるFOXO1の過剰発現が筋萎縮およびミトコンドリアを豊富に有する赤筋線

維の減少による骨格筋の量的及び質的な変化をもたらすことによるものと考えられる。以上の結果は、単純化すれば、PPAR δ やERRといった核内受容体とFOXO1が、骨格筋のエネルギー消費などの代謝調節において、逆の方向に作用することを示唆するものである。さらに、肥満や糖尿病発症予防における骨格筋の機能不全の改善の重要性がクローズアップされるものであり、その分子メカニズムにはFOXOと核内受容体のシグナルのクロストークの可能性が予想され、今後の詳細な研究が必要である。

6. おわりに

寿命の延長に伴い、QOLの向上や健康寿命の延伸が社会的な課題となっている。その一環として運動器 (筋骨格系) の機能保全への関心が高まっており、国連及びWHOは2000年~2010年を「The Bone and Joint Decade (運動器の10年)」と位置づけている。本稿では、骨格筋の代謝応答におけるFOXO (主にFOXO1) の役割について概説した。FOXOシグナルの解明により骨格筋萎縮や骨格筋機能不全、およびその機能改善の分子機構が明らかになると、これらをターゲットとした骨格筋不全の予防法さらにはメタボリックシンドローム (糖尿病、肥満) の予防法の開発につながることを期待される。

1) Biegel, J.A., Nycum, L.M., Valentine, V., Barr, F.G., & Shapiro, D.N. (1995) *Genes Chromosomes Cancer*, 12, 186-192.

- 2) Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A., & Barr, F.G. (1994) *Cancer Res.*, 54, 2869-2872.
- 3) Nakae, J., Oki, M., & Cao, Y. (2008) *FEBS Lett.*, 582, 54-67.
- 4) Kodama, S., Koike, C., Negishi, M., & Yamamoto, Y. (2004) *Mol. Cell Biol.*, 24, 7931-7940.
- 5) Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., Fukamizu, A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11285-11290.
- 6) Kamei, Y., Mizukami, J., Miura, S., Suzuki, M., Takahashi, N., Kawada, T., Taniguchi, T., & Ezaki, O. (2003) *FEBS Lett.*, 536, 232-236.
- 7) Furuyama, T., Kitayama, K., Yamashita, H., & Mori, N. (2003) *Biochem. J.*, 375, 365-371.
- 8) Kamei, Y., Miura, S., Suganami, T., Akaike, F., Kanai, S., Sugita, S., Katsumata, A., Aburatani, H., Unterman, T.G., Ezaki, O., & Ogawa, Y. (2008) *Endocrinology*, 149, 2293-2305.
- 9) Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I., & Ezaki, O. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 41114-41123.
- 10) Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., & Goldberg, A.L. (2004) *Cell*, 117, 399-412.
- 11) Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S., & Sandri, M. (2007) *Cell Metab.*, 6, 458-471.
- 12) Southgate, R.J., Neill, B., Prelovsek, O., El-Osta, A., Kamei, Y., Miura, S., Ezaki, O., McLoughlin, T.J., Zhang, W., Unterman, T.G., & Febbraio, M.A. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 21176-21186.
- 13) Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Funahashi, Y., Shawber, C.J., Castrillon, D.H., Kollipara, R., DePinho, R.A., Kitajewski, J., & Accili, D. (2007) *J. Clin. Invest.*, 117, 2477-2485.
- 14) Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T., & Sakai, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 15924-15929.
- 15) Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., & Kaki-zuka, A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 12378-12383.

亀井 康富¹, 小川 佳宏^{1,2}

(¹東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野)

(²東京医科歯科大学グローバル COE プログラム)

Skeletal muscle function and FOXO

Yasutomi Kamei and Yoshihiro Ogawa (¹Department of Molecular Medicine & Metabolism, Medical Research Institute, Tokyo Medical & Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan; ²Global COE Program, Tokyo Medical & Dental University)

タンパク質リン酸化を介した DNA 二重鎖切断修復制御のメカニズム

1. はじめに

生命のプログラムとしてのゲノムの情報がわずかにでも失われることは、生物にとって致命的である。そのため全ての生物は内的・外的要因によって生じる DNA 上の傷に対する様々な防御システムを備えている。DNA 二重鎖切断修復もその一つである。しかし、その防御機構もヒト等の多細胞生物で考えたとき、使う手段や場所を誤ると DNA 配列の改変や染色体転座を引き起こし最終的に発がんなど疾病の原因となってしまう危険性を含んでいる。このような事態を防ぐために細胞内では DNA 上の傷を認識し、傷の種類や細胞の状態を判断した上で、その場に応じた適切な修復酵素群を会合させて配置する制御メカニズムが存在すると考えられているが、その分子メカニズムは明らかではない。真核生物の細胞内では DNA 二重鎖切断 (DSB) はおもに非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) で修復されることが知られている (図 1)。相同組換えは、Rad52 グループ遺伝子群が中心的機能を果たし、同じ遺伝情報を持つ鋳型をコピーすることで変異等を伴うことなく DNA 二重鎖切断を元通りに修復できるエラーフリーの手段である。しかし、全く同一の遺伝情報を持つ鋳型 DNA として姉妹染色体を必要とするために、使うことのできる時期が S₂ 期に限定される。もしも、G₁ 期に相同組換えが活性化したら、異なる染色体間の繰り返し配列等の間で組換えが起きてしまい、染色体転座を招いてしまう危険性がある。一方、NHEJ は切れた DNA 末端同士をそのまま結合する反応であることから細胞周期を通じて使うことができるが、DSB 末端部分の遺伝情報が失われる危険性がある。そのため、NHEJ は HR を使うことのできない (つまり、姉妹染色体の存在しない) G₁ 期あるいは静止期において必須の修復機構であると考えられている。このように、G₁ と S/G₂ の間で DNA 二重鎖切断修復に機能する修復酵素群には違いがあると考えられるが、その制御の分子メカニズムについてはあまりわかっていない。そこで、我々は細胞周期を通じてどのように DSB 修復機構が選択されているか、そのメカニズムに焦点をあて解析を行っている。