

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	小川 真弘
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	Regulatory Mechanism of Skeletal Muscle Mass by Estrogen Signaling (女性ホルモンシグナルによる骨格筋量調節機構の解明)	
論文審査委員	主査	山地 亮一
	副査	乾 隆
	副査	杉本 憲治

## 論文要旨

### 序章

体重の約40%を占める骨格筋組織は、運動器としての役割以外に、糖質あるいは脂質の代謝も担うことから、生命活動に重要な機能を果たしている。これらのことから、骨格筋量の低下は、運動機能のみならず、他の生理的機能に影響を与えられている。女性は男性よりも骨格筋量が少ないことから、基礎代謝量が低だけでなく、高齢期の転倒リスクが高い。この男女間の性差を引き起こす要因として性ホルモンが挙げられる。男性ホルモン（アンドロゲン）は詳細な機構は不明であるが骨格筋の量的そして質的な亢進に関与する。一方で女性ホルモン（エストロゲン）に関しては骨格筋量における役割は不明である。エストロゲンが結合し活性化したエストロゲン受容体（ER）は標的遺伝子のプロモーター領域にあるエストロゲン応答配列（ERE）に結合することで標的遺伝子の発現を転写レベルで調節する。ERには2つのアイソフォームER $\alpha$ とER $\beta$ が存在し、ER $\alpha$ とER $\beta$ は互いに拮抗的に作用する。骨格筋ではER $\alpha$ とER $\beta$ は発現している。そこで本研究では骨格筋量の性差に着目し、女性ホルモンの骨格筋形成に及ぼす影響を解明するとともに、その機構を分子基盤とし、女性の骨格筋を増強することを目的とした。

## 第1章 17 $\beta$ -エストラジオールは脱ユビキチン化酵素ユビキチンペプチダーゼ 19 の発現を上昇させ筋分化を抑制する

骨格筋量はミオシン重鎖 (MHC) やトロポミオシンといった骨格筋構成タンパク質の合成と分解のバランスで調節されている。骨格筋組織が形成される時は (1) サテライト細胞が増殖する、(2) サテライト細胞が筋芽細胞へ分化する、(3) 筋芽細胞が融合し多核化した筋管細胞を形成する、(4) 筋管細胞が集合して骨格筋組織を構成する筋繊維になる、という特徴的な過程を経る。筋形成モデル細胞である C2C12 細胞を用いて、エストロゲン (17 $\beta$ -エストラジオール (E2)) の筋分化過程に対する影響を検討した。その結果、E2 は筋分化マーカーである MHC とトロポミオシンの発現を抑制し、筋管細胞への分化を形態的にも抑制した。E2 による筋分化抑制作用に関与する因子を探索するため、二次元電気泳動法と質量分析機器を利用したプロテオミクス解析を行ったところ、E2 により発現量が上昇するタンパク質として脱ユビキチン化酵素であるユビキチンペプチダーゼ 19 (USP19) を同定した。骨格筋量が減少するときは骨格筋特異的ユビキチンリガーゼの発現が上昇することで骨格筋構成タンパク質や筋分化に関わる因子へのユビキチン付加が増加し、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の分解が亢進する。一方、ユビキチン化されたタンパク質からユビキチン分子を遊離させる脱ユビキチン化酵素は、ユビキチン化タンパク質からユビキチン分子を再利用するために回収する役割以外にユビキチンリガーゼと拮抗的に作用してユビキチン化タンパク質をプロテアソームによる分解から保護する役割も担う。よってユビキチン付加反応だけでなく、脱ユビキチン化反応もユビキチン-プロテアソーム系の恒常性の維持に重要である。E2 はタンパク質レベルだけでなく mRNA レベルでも USP19 の発現量を増加させた。エストロゲンを分泌する組織である卵巣を摘出した OVX マウスの骨格筋組織では USP19 の発現は減少したが、OVX マウスに E2 を投与すると USP19 の発現は有意に増加した。E2 による C2C12 細胞の筋分化抑制は USP19 をノックダウンすることによって解除された。一方、C2C12 細胞で USP19 を高発現させると筋分化を抑制したが、脱ユビキチン化酵素活性をもたない変異体 USP19 では筋分化は抑制されなかった。C2C12 細胞では ER $\alpha$  と ER $\beta$  はともに発現しているため、それぞれの ER に選択的なアゴニストの筋分化に及ぼす影響を検討したところ、ER $\alpha$  選択的アゴニストが E2 と同様に筋分化を抑制し、USP19 の発現量を上昇させた。マウスから単離したサテライト細胞の筋管細胞への分化過程においても E2 によって USP19 の発現が上昇し、筋管細胞数は減少した。一方、ER $\beta$  選択的アゴニストは E2 非存在下では単独で筋分化に影響はなかったが、E2 による USP19 の発現上昇と E2 による筋分化抑制を阻害した。以上のことから、USP19 は E2 による筋分化抑制において重要な因子であり、その発現を阻害することで筋分化抑制を解除することが判明した。

## 第2章 USP19 はマウスの骨格筋量の性差に関与する

上記の研究結果から E2 は ER $\alpha$  を活性化させることで USP19 の発現を上昇させ、筋分化を抑制することが判明した。しかしながら、USP19 が骨格筋量の性差に関与するのか、また ER $\alpha$  はどのようにして USP19 の発現を制御しているのかは不明である。USP19 の発現は E2 により上昇するため、若年齢のオスとメスマウスの骨格筋組織（ヒラメ筋と腓腹筋）における USP19 の発現量を検討した。その結果、骨格筋における USP19 mRNA の発現量はオスマウスの発現量よりもメスマウスのほうが高かったので骨格筋量の性差に USP19 が関与するのかを評価した。siRNA を用いてオスマウスとメスマウスの骨格筋での USP19 の発現をノックダウンさせたところ、メスマウスで筋量は増加したが、オスマウスの筋量には影響がなかった。組織切片を解析したところ、USP19 をノックダウンすることでメスマウスの筋繊維の面積が増加した。次に E2 による USP19 の発現調節機構を解明するため、USP19 遺伝子配列を解析したところ USP19 遺伝子のイントロン 1 に ERE の半分の領域を持つ half-ERE と推定される候補配列が存在したので、その領域のゲノム DNA をクローニングし、C2C12 細胞でルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、E2 はレポーター活性を増加させたが、half-ERE に変異を導入すると E2 によるレポーター活性の上昇が消失した。また E2 によるレポーター活性の上昇は ER $\alpha$  のノックダウンすることで消失した。さらにクロマチン免疫沈降法で検討したところ、卵巣を摘出したマウスに E2 を投与するとヒラメ筋で ER $\alpha$  の half-ERE への結合量が増加した。またメスマウスの骨格筋では half-ERE と ER $\alpha$  が結合したが、オスマウスではその結合が見られなかった。そこで骨格筋の ER $\alpha$  をノックダウンさせたところ、メスマウスのヒラメ筋で USP19 の発現量が減少し、筋量が増加したが、オスマウスでは USP19 の発現量にも筋量にも影響はなかった。以上の結果から、若年齢のメスマウスでは ER $\alpha$  の恒常的な活性化によりオスマウスよりも USP19 の発現が高く、骨格筋量が負に制御されていることが示された。

## 第3章 メスマウスにおいて ER $\beta$ 選択的アゴニストは E2 による骨格筋量の減少を抑制する

上記の研究結果から ER $\beta$  を活性化させると E2 による筋分化抑制が阻害されることが判明した。植物エストロゲンであるダイゼインは ER $\alpha$  よりも ER $\beta$  に対して高い親和性を持つ。本章では ER $\beta$  アゴニストであるダイゼインを用いて ER $\beta$  の骨格筋量に及ぼす影響について評価した。C2C12 細胞において E2 による筋分化抑制作用に対するダイゼインの影響を検討したところ、ダイゼインは ER $\beta$  選択的アゴニストと同様に E2 による USP19 の発現上昇と筋分化抑制作用を阻害した。またクロマチン免疫沈降法で解析したところ、USP19 遺伝子の half-ERE 上で、エストロゲンにより増加した ER $\alpha$  の結合

量は ER $\beta$  選択的アゴニストまたはダイゼインに依存して減少し、逆に ER $\beta$  の結合量が ER $\beta$  選択的アゴニストまたはダイゼインに依存して増加したことから、half-ERE 上で ER $\beta$  と ER $\alpha$  は競合的に結合することがわかった。第一章で示したとおり、OVX マウスに E2 を投与すると USP19 の発現は上昇するが、OVX マウスにダイゼイン摂取させることで E2 による USP19 の発現上昇と筋量の減少は抑制された。クロマチン免疫沈降法により骨格筋においてもダイゼインは E2 による ER $\alpha$  と half-ERE の結合を減少させ、ER $\beta$  と half-ERE との結合量を増加させることがわかった。ダイゼインが骨格筋量の性差に関与するのか評価するためメスマウスにダイゼインを摂取させたところ、USP19 の発現量が減少し、筋量が増加したが、オスマウスでは筋量に及ぼすダイゼイン摂取の影響はなかった。メスマウスの骨格筋での ER $\beta$  をロックダウンさせることで、ダイゼインによる筋量の増加は消失した。以上より、メスマウスにおいてダイゼインのような ER $\beta$  アゴニストは E2 による USP19 の発現亢進を抑え、筋分化抑制を解除し、骨格筋量を維持することが判明した。

## まとめ

本研究をまとめると、USP19 は E2 による筋分化抑制において重要な因子であり、メスマウスの骨格筋では ER $\alpha$  を介して USP19 の発現を上昇させ、筋量を減少させることが明らかとなった。さらに ER $\beta$  を活性化させることで USP19 の発現上昇を緩和し、筋量を増加させることが判明した。つまり、USP19 は骨格筋量の性差に関与する鍵因子であり、女性にとって ER $\beta$  の活性化は USP19 の発現を減少させ、骨格量を増加させることが示唆された。

## 審査結果の要旨

体重の約 40%を占める骨格筋組織は、運動器としての役割以外に、糖質あるいは脂質の代謝も担うことから、生命活動に重要な機能を果たす。したがって骨格筋量の低下は、運動機能だけでなく、他の生理的機能にも影響を与えると考えられる。女性は男性よりも骨格筋量が少ないことから、基礎代謝量が低く、また高齢期での転倒リスクが高い。男女間の性差を引き起こす要因として性ホルモンが挙げられ、男性ホルモンは骨格筋を量的そして質的に亢進する。一方で、女性ホルモン（エストロゲン）の骨格筋における

役割は不明である。エストロゲンは、エストロゲン受容体 (ER) に結合し、ER を活性化する。活性化した ER は標的遺伝子のプロモーター領域にあるエストロゲン応答配列 (ERE) に結合することで標的遺伝子の発現を転写レベルで調節する。ER には 2 つのアイソフォーム ER $\alpha$ と ER $\beta$ が存在し、ER $\alpha$ と ER $\beta$ は互いに拮抗的に作用する。ER $\alpha$ と ER $\beta$ は骨格筋において発現しているが、骨格筋におけるこれら 2 つの ER の役割も不明である。本研究では骨格筋量の性差、特に女性の骨格筋量に着目し、エストロゲンが骨格筋量を調節する分子機構を解明し、その分子機構を基盤として女性の骨格筋量を増強することを目的として行われた。

第 1 章では、骨格筋形成過程である筋芽細胞の筋管細胞への分化に及ぼすエストロゲンの影響を解析した。エストロゲン (17 $\beta$ -エストラジオール (E2)) は筋芽細胞株 C2C12 細胞の筋管細胞への筋分化を抑制し、また E2 により筋分化中に発現量が増加するタンパク質として脱ユビキチン化酵素であるユビキチンペプチダーゼ 19 (USP19) を同定した。USP19 をノックダウンすると E2 による筋分化抑制が解除され、また USP19 による筋分化抑制に USP19 の脱ユビキチン化活性が必要であることも明らかにした。C2C12 細胞には ER $\alpha$ と ER $\beta$ がともに発現しており、ER $\alpha$ 選択的アゴニストが E2 と同様に筋分化を抑制し、USP19 の発現を亢進したが、ER $\beta$ アゴニストにはそれらの効果はなかった。ER $\alpha$ を高発現させると E2 による筋分化の抑制が亢進し、逆に ER $\alpha$ をノックダウンすると E2 による筋分化の抑制が解除された。以上の結果より、E2 が ER $\alpha$ を介して筋分化抑制に寄与する USP19 の発現を亢進し、その結果として筋分化が抑制されることを示した。

第 2 章では、骨格筋量の性差における USP19 の関与を検証した。siRNA を用いてオスマウスとメスマウスの骨格筋の USP19 の発現をノックダウンすることによって、メスマウスのヒラメ筋の重量が増加するが、オスマウスの骨格筋には影響がないことを明らかにした。ヒラメ筋組織切片を解析したところ、USP19 をノックダウンすることによってメスマウスでは筋繊維の面積が増加することが判明した。さらに ER $\alpha$ による USP19 の発現制御機構を検証した。USP19 のプロモーター領域の遺伝子を単離してルシフェラーゼレポーター解析系を構築し、E2 に応答して ER $\alpha$ が結合する ERE を同定した。メスマウスの骨格筋では ER $\alpha$ が ERE に結合していたが、オスマウスでは ER $\alpha$ は ERE に結合していなかった。また骨格筋の ER $\alpha$ をノックダウンすることによって、メスマウスのヒラメ筋で USP19 の発現量が減少して、筋量が増加したが、オスマウスでは USP19 の発現量にも筋量にも影響がなかった。以上の結果から、メスマウスでは ER $\alpha$ の恒常的な活性化によって USP19 の発現が亢進しており、その結果として骨格筋量が負に制御されることを示した。

第 3 章では、骨格筋量の調節における ER $\beta$ アゴニストと ER $\beta$ の役割について評価した。C2C12 細胞において植物エストロゲンであるダイゼインが ER $\alpha$ に比べて ER $\beta$ の転写活性を促進し、さらにダイゼインが ER $\beta$ 選択的アゴニストと同様に、E2 による USP19 の

発現上昇と筋分化抑制作用を阻害することを明らかにした。また USP19 遺伝子の ERE 上では、E2 によって増加した ER $\alpha$  レベルが ER $\beta$  選択的アゴニストまたはダイゼインによって低下した。さらにダイゼインを摂取させたメスマウスでヒラメ筋量が増加したが、骨格筋の ER $\beta$  をロックダウンするとダイゼインによる筋量増加効果がなくなることを見いだした。以上の結果から、ER $\beta$  を活性化することによって、E2 による筋分化抑制が阻害されることを示した。

以上、本研究は、メスマウスの骨格筋では、E2 は ER $\alpha$  を介して筋分化抑制に寄与する USP19 の発現を上昇させて筋量を減少させること、さらにダイゼインのような ER $\beta$  アゴニストによって ER $\beta$  を活性化させることが E2 による USP19 の発現上昇を抑制して筋量を増加させること、を明らかにした。つまり、USP19 は骨格筋量の性差に関与する鍵因子であり、女性にとって ER $\beta$  の活性化が USP19 の発現を減少させ、骨格量を増加させることに寄与することが示唆された。これらの成果は、生化学、細胞生物学、生理学、分子栄養学の分野に大きく貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。