

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	北風 智也
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	Regulatory mechanism of skeletal muscle mass by the provitamin A β -carotene (ビタミンA前駆体 β -カロテンによる骨格筋量調節機構に関する研究)	
論文審査委員	主査	山地 亮一
	副査	乾 隆
	副査	川口 剛司

論文要旨

序章

骨格筋は身体の大部分をしめる組織であり、運動機能や姿勢の保持、糖や脂質の代謝、生理活性物質の分泌など多くの機能を担っている。骨格筋量はデスクワーク中心のライフスタイルによる運動不足、寝たきりによる不活動、そして加齢によって減少する。骨格筋量の減少は運動機能不全をもたらすだけでなく、肥満や糖尿病などの代謝生疾患に罹患するリスクの上昇にも繋がる。骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスにより調節されており、タンパク質合成の割合が分解を上回ると筋肥大が促進し、筋重量が増加する。筋タンパク質合成を増加させ、筋肥大を促進させるために、運動習慣の他に食習慣を含む生活習慣を改善することが骨格筋の量と質にとって有益な手段となりうる。したがって近年、骨格筋量の維持・増強をサポートする食品成分や天然に存在する栄養補助成分を摂取することが運動機能不全や代謝生疾患の予防や改善に有効な方法として期待されている。 β -カロテンは緑黄色野菜などに多く含まれ、またヒトの血中において検出されるカロテノイドの一つである。抗酸化作用以外に、 β -カロテンは体内でビタミンAへと変換されるため、ビタミンA前駆体として位置づけられている。レチノイン酸受容体(RAR)は、活性型ビタミンAである *all trans*-レチノイン酸(ATRA)と結合すると遺伝子発現

を調節する転写因子として機能する。疫学的研究から、血中カロテノイド濃度の低下が筋力低下や歩行速度低下と相関することが明らかとなっているが、詳細な分子機構は不明である。本研究ではβ-カロテンが骨格筋量に与える影響を評価し、さらにその詳細な分子機構を解明することを目的とした。

第1章 β-カロテンはマウスのヒラメ筋の重量を増加し、筋肥大を促進する

β-カロテンが骨格筋量に与える影響を解析するため、β-カロテンをマウスに経口投与し筋重量を測定した。β-カロテン投与7日目では、ヒラメ筋、長趾伸筋、腓腹筋、大腿四頭筋、足底筋の重量に変化は見られなかった。14日目では、ヒラメ筋重量のみがβ-カロテン投与によって有意に増加した。筋重量の増加したヒラメ筋の筋断面積を測定した結果、β-カロテンにより筋断面積が有意に増加した。さらにヒラメ筋を単離し筋力を測定したところ、β-カロテンにより強縮力が有意に増加した。その際、単位面積当たりの筋力に変化がなかったことから、β-カロテンによる筋重量の増加は筋力を維持した機能的な筋肥大であることが明らかとなった。タンパク質合成を評価したところ、β-カロテンによりヒラメ筋でのタンパク質合成が増加した。骨格筋のタンパク質合成に関わる主要な因子であるインスリン様成長因子(IGF-1)がサブタイプのIGF-1Eaとしてヒラメ筋で発現レベルが増加した。次にタンパク質分解の主要なユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系を評価したところ、β-カロテンによりユビキチン化タンパク質レベルが減少したが、筋特異的ユビキチンリガーゼや脱ユビキチン化酵素の発現レベルに変化はみられなかった。オートファジーマーカーであるLC-3II/LC-3Iの発現レベルはβ-カロテンによる影響を受けなかった。以上の結果から、β-カロテンはタンパク質合成を増加させ、ユビキチン化が関連するタンパク質分解を抑制することでヒラメ筋重量を増加させることが示唆された。

第2章 β-カロテンはレチノイン酸受容体γを介して筋重量を増加する

第1章でβ-カロテンがヒラメ筋重量を増加させることが明らかとなったため、β-カロテンのビタミンA機能に着目し、β-カロテンによる筋重量増加機序の解明を目的に検討を行った。骨格筋や筋細胞株C2C12細胞ではRARの3つのサブタイプRARα、RARβ、RARγの全てが発現していた。どのRARサブタイプが骨格筋において主に機能しているかを検討した。C2C12細胞において、β-カロテンとATRAはRARの転写活性を増加させたが、RARγのノックダウンによりβ-カロテンとATRAによる転写活性が抑制された。また、RARγのノックダウンはβ-カロテンによるタンパク質合成の促進を抑制した。さらに、*in vivo*においてもβ-カロテンによる筋重量の増加にRARγが関与するかを検討した。β-カロテンによるヒラメ筋の重量の増加、タンパク質合成の増加、mTORの基質であるp70S6Kのリン酸化の増加は、RARγをノックダウンしたヒラメ筋で抑制された。一方、β-カロテンによるユビキチン化タンパク質の減少は、RARγのノックダウンによる影響を受けなかった。これらの

ことから、 β -カロテン摂取によるヒラメ筋における筋重量増加とタンパク質合成促進に、 $RAR\gamma$ が関与することが明らかとなった。 RAR を介した作用は、 RAR が転写因子として作用するゲノミックな経路と転写因子として作用しない短時間応答のノンゲノミックな経路があるが、 β -カロテンは 120 分までの短時間では $mTOR$ シグナルに影響を与えず、24 時間で $p70S6K$ のリン酸化を増加させた。これらの結果から、 $RAR\gamma$ を介したタンパク質合成が、遺伝子の転写を介したゲノミックな作用によるものと推測した。そこで、 $RAR\gamma$ に応答して発現の増加する分泌因子がタンパク質合成を促進するか検討したところ、C2C12 筋管細胞を β -カロテンで刺激して得られた培養上清がタンパク質合成や $mTOR$ と $p70S6K$ のリン酸化レベルを増加させることが判明した。一方で、 $RAR\gamma$ をノックダウンした細胞を β -カロテンで刺激して得られた培養上清ではタンパク質合成が促進しなかった。これらの結果から、 $RAR\gamma$ の活性化は分泌性因子を介してタンパク質合成を促進することが明らかとなった。C2C12 筋管細胞における $RAR\gamma$ 応答遺伝子を探索するため、 $ATRA$ で刺激後の筋管細胞を RNA-sequence に供した。その結果、候補遺伝子としてトランスグルタミナーゼ 2 ($TGM2$) が得られた。 $TGM2$ は C2C12 細胞において、 β -カロテンと $ATRA$ によって発現レベルが増加した。また $RAR\gamma$ をノックダウンしたヒラメ筋において、 β -カロテンによる $TGM2$ の発現上昇が抑制された。C2C12 細胞において $TGM2$ を高発現させると、筋構成タンパク質であるミオシン重鎖の発現レベルが増加し、筋管細胞の短径も増加した。この際、 $TGM2$ が高発現していない細胞でも筋管細胞の短径が増加していたことから、 $TGM2$ が細胞外に分泌され、タンパク質合成促進作用を発揮すると示唆された。組換え体 $TGM2$ を作製し、細胞外 $TGM2$ として C2C12 細胞に作用させた結果、Akt、 $mTOR$ 、 $p70S6K$ のリン酸化が増加した。 $mTOR$ と $PI3K$ の阻害剤の他に、Src 阻害剤も細胞外の $TGM2$ による $p70S6K$ のリン酸化を抑制したことから、 $TGM2$ は Src/ $PI3K$ /Akt/ $mTOR$ シグナルを介して、タンパク質合成を促進することが示唆された。以上の結果から、 β -カロテンはビタミン A 作用により、 $RAR\gamma$ を介して $TGM2$ の発現を増加させ、Src/ $PI3K$ /Akt/ $mTOR$ シグナルを活性化することでタンパク質合成を増加させ、筋肥大を促進することが示唆された。

第 3 章 低酸素が骨格筋でカロテノイドトランスポーター $CD36$ の発現を調節する

第 1 章において、 β -カロテンはヒラメ筋の重量を増加させたが、なぜ β -カロテンがヒラメ筋でのみ作用するのかは不明である。骨格筋は遅筋と速筋の 2 種に大別され、筋重量の増加したヒラメ筋は遅筋であり、重量の変化しなかった他の筋肉は速筋である。そこで、遅筋と速筋におけるカロテノイドトランスポーター ($CD36$ 、 $SR-BI$ 、 $NPC1L1$) の発現レベルを検討した結果、 $CD36$ の発現レベルが遅筋で高いことが明らかとなった。ヒラメ筋において $CD36$ のノックダウンは β -カロテンによる筋重量の増加を抑制したことから、 β -カロテンは $CD36$ を介してヒラメ筋内に取り込まれ、作用することが示唆された。遅筋は毛細血管やミトコンドリアが多く酸素を多く消費する組織であるため、遅筋と速筋で酸素環境が異なる。そこで遅筋と

速筋の酸素環境が CD36 の発現調節に関与すると仮説を立て検証を行った。低酸素状態 ($pO_2 < 10 \text{ mmHg}$) でタンパク質と結合するピモニダゾールをマウスに投与したところ、速筋に比べて遅筋でピモニダゾール結合タンパク質レベルが高かった。転写因子である低酸素誘導因子 1α (HIF- 1α) はタンパク質として低酸素環境下では安定に発現するが、常酸素環境下では速やかに分解される。遅筋では HIF- 1α のタンパク質発現レベルが速筋と比較して高かったが、HIF- 1α の mRNA 発現レベルは遅筋よりもむしろ速筋で高かったことから、遅筋では HIF- 1α タンパク質の安定性は高く、遅筋が速筋と比べて低酸素状態にあることが示唆された。C2C12 細胞を低酸素状態で培養した結果、SR-BI と NPC1L1 の発現レベルに影響はなかったが、CD36 の発現レベルが増加した。HIF- 1α をノックダウンして低酸素状態で培養したところ、低酸素による CD36 の発現誘導が抑制された。以上の結果から、CD36 は HIF- 1α によって発現が調節され、遅筋と速筋の酸素環境の違いが CD36 の発現に影響していることが示唆された。

まとめ

本研究をまとめると、 β -カロテンは機能的な筋肥大を促進する有用な食品成分であり、RAR γ を介して TGM2 の発現を上昇させることでタンパク質合成を促進することが示唆された。また、 β -カロテンは CD36 を介して遅筋に作用し、CD36 の発現は酸素環境によって調節されていることが示唆された。

審査結果の要旨

骨格筋は身体の大部分をしめる組織であり、運動機能や姿勢の保持、糖や脂質の代謝、生理活性物質の分泌など多くの機能を担っている。骨格筋量はデスクワーク中心のライフスタイルによる運動不足、寝たきりによる不活動、そして加齢によって減少する。骨格筋量の減少は運動機能不全をもたらすだけでなく、肥満や糖尿病などの代謝性疾患に罹患するリスクの上昇にも繋がる。 β -カロテンはヒトの血中において検出されるカロテノイドの一つであり、体内でビタミン A へと変換されるため、ビタミン A 前駆体として位置づけられている。レチノイン酸受容体 (RAR) は、活性型ビタミン A である *all trans*-レチノイン酸 (ATRA) と結合すると遺伝子発現を調節する転写因子として機能する。疫学的研究から、血中カロテノイド濃度の低下が筋力低下や歩行速度低下と相関することが明らかとなっているが、詳細な分子機構は不明である。本研究は β -カロテンが骨格筋量に与える影響を評価し、さらにその詳細な分子機構を解明することを目的として行われた。

第 1 章では、マウスの骨格筋の量と質におよぼす β -カロテン摂取の影響を解析し

た。 β -カロテンをマウスに経口投与して筋重量を測定した結果、ヒラメ筋重量が増加したが、長趾伸筋、腓腹筋、大腿四頭筋、足底筋の重量は影響を受けなかった。 β -カロテン投与により増量したヒラメ筋では筋断面積と強縮力が増加しており、また、単位面積当たりの筋力に変化がなかったことから、筋重量の増加が筋力を維持した機能的な筋肥大であることを明らかとした。さらに、 β -カロテンがタンパク質合成を増加させ、ユビキチン化が関連するタンパク質分解を抑制することでヒラメ筋重量を増加させることを明らかにした。以上の結果より、 β -カロテン摂取は骨格筋、特にヒラメ筋を量的・質的に向上させることを明らかにした。

第2章では、 β -カロテンが筋重量を増加させる分子機構を検証した。マウス筋芽細胞株において、RARの3つのサブタイプのうち、RAR γ をノックダウンすると β -カロテンによるタンパク質合成の促進が抑制されること、またマウスのヒラメ筋でもRAR γ のノックダウンが β -カロテンによるタンパク質合成の促進と筋量の増加を抑制することを明らかにした。さらに β -カロテン存在下で培養したC2C12筋管細胞からRAR γ を介して分泌された因子がタンパク質合成促進能をもつことを明らかにしたので、ATRAで刺激した筋管細胞をRNA-sequenceに供してRAR γ 応答遺伝子を探索した結果、候補遺伝子としてトランスグルタミナーゼ2 (TGM2)を得た。TGM2の発現は β -カロテン摂取によりヒラメ筋で上昇していたが、RAR γ をノックダウンしたヒラメ筋では、 β -カロテンによる発現上昇が抑制された。C2C12細胞でTGM2を高発現させると、筋管細胞の短径が増加した。組換え体TGM2を作製し、筋管細胞を刺激したところ、Akt、mTOR、p70S6Kのリン酸化が増加した。さらにシグナル伝達に関する各種阻害剤を用いて、組換え体TGM2がSrc/PI3K/Akt/mTORシグナルを介してタンパク質合成を促進することを見出した。以上の結果から、 β -カロテンはビタミンA作用によりRAR γ を介してTGM2の発現を増加させること、さらにTGM2がSrc/PI3K/Akt/mTORシグナルを活性化することでタンパク質合成を促進させ、筋肥大を誘導させることを示した。

第3章では β -カロテンが速筋である腓腹筋や長趾伸筋には影響せず、遅筋であるヒラメ筋の重量を増加させる分子機構を解析した。速筋に比べて遅筋ではカロテノイドトランスポーターであるCD36の発現レベルが高いことを見出し、ヒラメ筋においてCD36をノックダウンすると β -カロテンによる筋重量の増加が抑制されることを明らかにした。さらに遅筋におけるCD36の発現を調節する因子として遅筋と速筋の酸素環境の違いに着目して解析をした。マウスに低酸素状態 ($pO_2 < 10$ mmHg) でタンパク質と結合するピモニダゾールを投与したところ、速筋よりも遅筋でピモニダゾール結合タンパク質が多く検出され、また低酸素下で安定に発現する低酸素誘導因子1 α (HIF-1 α)のタンパク質レベルが遅筋で高いことを明らかにした。さらに、C2C12細胞においてCD36はHIF-1 α 依存的に低酸素により発現が誘導されることを示した。以上の結果から、 β -カロテンは遅筋で発現レベルの高いCD36を介して取り込まれることを明らかにし、また遅筋におけるCD36の発現制御にHIF-1 α が関与している可能性を示した。

以上、本研究は、 β -カロテンが遅筋にCD36を介して取り込まれ、RAR γ を活性化して筋力を維持した機能的な筋肥大を促進することを証明した。さらに β -カロテ

ンによる筋肥大に TGM2 が関与し、遅筋での CD36 の発現制御に酸素環境が関与する可能性を示し、β-カロテンが遅筋の量的・質的な向上に有用な食品成分であることを示唆した。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、本論文の審査ならびに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。