

骨格筋における解糖系の制御と PFK-2 /PFKFB3 の関与

学位論文内容の要旨

骨格筋は中枢神経からの指令により随意的に収縮する。その原理はアクチン、ミオシンなどの収縮蛋白がアデノシン3リン酸(ATP)の化学エネルギーを消費して収縮する。筋肉中に貯蔵されているATPはきわめて少ないため、運動を長時間継続するためにはATPの再合成が必要になる。この再合成はすべて生体内で行われ、骨格筋におけるATP供給過程のひとつが解糖系である。解糖系は糖質代謝の中心的な役割を担っており、その律速酵素は6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) である。また、PFK-1の活性化因子としてFructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP)が存在する。F2,6BPは6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2)によりFructose-6-phosphate (F6P)から合成される。F2,6BPはATPのPFK-1活性の阻害に拮抗し、PFK-1活性を亢進させ解糖系を活性化させる。

PFK-2は同一分子内にキナーゼドメインとフォスファターゼドメインを持つ二機能性酵素で、4種類のアイソフォームが報告されている(PFKFB1~4)。各アイソフォームはキナーゼ・フォスファターゼの活性比が異なり、PFKFB3蛋白はキナーゼ活性が最も高く、癌細胞や胎盤などの増殖がさかんな臓器に高発現している。また、腫瘍細胞のPFKFB3遺伝子をsiRNAでノックダウンすることにより細胞増殖を抑制することが報告されている。PFKFB3遺伝子は19のエクソンで構成され、エクソン13から19は選択的スプライシングにより組織特異的な発現様式を示す。しかし、各アイソフォームの働きの違いや特徴は解析されていない。糖代謝とPFKFB3に関して、AMP-activated protein kinase (AMPK)によりPFKFB3蛋白のセリン461がリン酸化されキナーゼ活性が亢進することが報告され、インスリンのシグナル伝達との関連は、PFKFB3蛋白はPKB, PKCなどによりリン酸化されることが報告されている。また、これまでの報告では糖尿病と解糖系の関与として、肝臓におけるグルコキナーゼの酵素活性低下によって惹起されるmaturity onset diabetes of the young 2 (MODY 2)が知られているのみである。解糖系は糖尿病治療への応用という点では未開発の分野である。今回私は、骨格筋の組織特異的な解糖系調節機構に注目し、エネルギー消費の観点から糖代謝異常の治療の標的因子を明らかにする目的で、PFK-2/PFKFB3の発現と機能の解析を行った。

骨格筋における低酸素による解糖系の亢進とPFKFB3の関連を明らかにするため、C2C12筋管細胞を低酸素に暴露した。3時間と24時間後の総RNAを抽出し、RT-PCRでPFKFB3 mRNAの発現量を正常酸素濃度下で培養した細胞と比較した。低酸素に暴露された細胞において3時間後と24時間後にPFKFB3 mRNAが高発現した。

骨格筋における炎症刺激による解糖系の亢進とPFKFB3の発現誘導の関連を明らかにするため、無血清培地で前処理したC2C12筋管細胞にLPSを作用させた。刺激後3時間でPFKFB3 mRNAの発現を測定した。LPSの濃度依存性にPFKFB3 mRNAの発現が亢進した。ま

た、骨格筋において解糖系が亢進した際に高発現する IL-6 mRNA も LPS の濃度依存性に高発現した。

骨格筋における PFKFB3 遺伝子の選択的スプライシングによる組織特異的な発現様式を検討するためエクソン 13 から 19 を特異的に増幅するプライマーを用いて RT-PCR を施行した。C2C12 筋管細胞では、270bp と 90bp に PCR 産物が認められ、エクソン 13 から 19 をそれぞれエクソン A から G とすると、エクソン A, C, G とエクソン A, G が含まれると推測された。また、マウス骨格筋では 280bp と 270bp, 90bp に PCR 産物が認められ、エクソン A, C, D, G とエクソン A, C, G とエクソン A, G が含まれると推測された。さらに、これらの PCR 産物をサブクローニングし、シークエンスを行い各スプライシングアイソフォームを確認した。それぞれのアイソフォームを PFKFB3-ACDG, PFKFB3-ACG, PFKFB3-AG と命名した。

8 週令 BALB/c マウスを 24 時間絶食後、腹腔内に LPS 1.0 $\mu\text{g/g}$ (体重)を投与し、3 時間後に骨格筋を摘出し総 RNA を抽出した。骨格筋における PFKFB3 遺伝子の選択的スプライシングによる発現様式を検討するためエクソン 13 から 19 を増幅するプライマーを用いて RT-PCR を施行した。PBS 投与群の骨格筋ではヒラメ筋、大腿筋ともに PFKFB3-ACDG が発現しており、LPS 投与群の骨格筋では、ヒラメ筋、大腿筋ともに PFKFB3-ACG の発現が有意に増強していた。

PFKFB3 の選択的スプライシングによるアイソフォームである PFKFB3-ACDG と PFKFB3-ACG を HEK293 細胞に遺伝子導入後、安定株を樹立し各クローンの 2-deoxy- ^3H glucose の取り込みと F2, 6BP 量を比較した。それぞれのアイソフォームを導入した細胞群では empty vector を導入した対照群と比較し、有意に 2-deoxy- ^3H glucose の細胞内への取り込みが増加し、また F2, 6BP 量が増加していた。

F2, 6BP 量と糖尿病の関連を調べるため、肥満 2 型糖尿病のモデルマウスである 11 週令 *db/db* マウスと *+m/+m* マウスの下肢骨格筋の F2, 6BP 量を測定したところ、両群における F2, 6BP 量に差は認めなかった。

これらの結果から、骨格筋における PFKFB3 は解糖系の制御に大きく関与していることが示唆された。骨格筋におけるインスリンシグナルと PFKFB3 の関連について解明していくことは、インスリン感受性組織における PFKFB3 による解糖系調節機序を明らかにすることに繋がると考えられる。また、PFKFB3 の活性化機序を解明し、骨格筋の解糖系を亢進させることができれば、エネルギー消費の観点から糖尿病の新しい治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

骨格筋における解糖系の制御と PFK-2 /PFKFB3 の関与

骨格筋はアデノシン3リン酸(ATP)の化学エネルギーを消費して収縮する。筋肉内のATP量は極めて少なく、運動を継続するためにはATPの再合成が必要になる。このATP供給過程に解糖系が存在する。解糖系の律速酵素は6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) である。また、PFK-1の活性化因子としてFructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) が存在する。F2,6BPは6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) によりFructose-6-phosphate (F6P) から合成される。F2,6BPはATPのPFK-1活性の阻害に拮抗し、PFK-1活性を亢進させ解糖系を活性化させる。

PFK-2は同一分子内にキナーゼドメインとフォスファターゼドメインを持つ二機能性酵素で、4種類のアイソフォームが報告されている。各アイソフォームはキナーゼ・フォスファターゼ活性比が異なり、PFKFB3蛋白はキナーゼ活性が最も高い。PFKFB3遺伝子は19のエクソンで構成され、エクソン13から19は選択的スプライシングにより組織特異的な発現様式を示す。しかし、各アイソフォームの働きの違いや特徴は解析されていない。

今回私は、骨格筋の組織特異的な解糖系調節機構に注目し、エネルギー消費の観点から糖代謝異常の治療の標的因子を明らかにする目的で、PFK-2/PFKFB3の発現と機能の解析を行った。

骨格筋における低酸素による解糖系の亢進と PFKFB3 の関連を明らかにするため、C2C12 筋管細胞を低酸素に暴露した。PFKFB3 mRNA の発現は時間依存性に増加した。

骨格筋における炎症刺激による解糖系亢進と PFKFB3 の発現誘導の関連を明らかにするため、C2C12 筋管細胞に LPS を作用させた。刺激後 3 時間では LPS の濃度依存性に PFKFB3 mRNA の発現が亢進した。また、骨格筋の解糖系が亢進した際に高発現する IL-6 mRNA も LPS の濃度依存性に高発現した。

骨格筋における PFKFB3 遺伝子の選択的スプライシングによる組織特異的な発現様式を検討するため RT-PCR を施行した。C2C12 筋管細胞では PFKFB3-ACDG, PFKFB3-AG が発現し、マウス骨格筋では PFKFB3-ACDG, PFKFB3-ACG, PFKFB3-AG が発現していた。

BALB/c マウスに LPS を投与し、3 時間後に骨格筋を摘出し RT-PCR を施行し

た. 対照群では PFKFB3-ACDG が発現しており, LPS 投与群では PFKFB3-ACG の発現が有意に増強していた.

PFKFB3 の選択的スプライシングアイソフォームである PFKFB3-ACDG と PFKFB3-ACG を HEK293 細胞に遺伝子導入後, 安定株を樹立し各クローンの 2-deoxy- ^3H glucose の取り込みと F2, 6BP 量を比較した. それぞれのアイソフォームを導入した細胞群では対照群と比較し, 有意に 2-deoxy- ^3H glucose の細胞内への取り込みが増加し, また F2, 6BP 量が増加した.

F2, 6BP 量と糖尿病の関連を調べるため, *db/db* マウスと *+m/+m* マウスの下肢骨格筋の F2, 6BP 量を測定したが, 両群の F2, 6BP 量に差は認めなかった.

これらの結果から, 骨格筋における PFKFB3 は解糖系の制御に大きく関与していることが示唆された.

質疑応答においては畠山教授から, C2C12 筋管細胞における解糖系亢進と Toll like receptor の関連, 骨格筋と C2C12 細胞のアイソフォームの違いについて, C2C12 細胞の分化前後のアイソフォームに関して, PFKFB3 スプライシングアイソフォームの発現調節機構, PFKFB3 mRNA と RNA binding protein に関して, 安定発現株のグルコースの取り込みの機序について, 質問があった. 次に吉岡教授から, PFK-2 のノックアウトマウスに関して, PFK-1 と PFK-2 活性の違いについて, C2C12 筋管細胞とグルコーストランスポーターに関して, 骨格筋のグルコース取り込みの機序について質問があった. 次に小池教授から, LPS の解糖系亢進における *in vivo* と *in vitro* の違いについて, IL-6 を阻害する実験について, PFKFB3 遺伝子とスプライシング発現部位について, PFKFB3 を糖尿病治療に用いる場合の展望に関して質問があった. いずれの質問に対しても, 申請者は概ね適切に回答した.

本論文における検討から, PFKFB3 の活性化機序の解明は糖尿病の新しい治療法の開発に繋がる可能性が考えられた.

審査委員一同は, これらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した.