

骨格筋萎縮を抑制する食品成分の探索と作用機序解明

京都府立大学大学院生命環境科学研究科・教授 亀井 康富

■ 目的

寝たきりや不活動、飢餓や加齢などによって骨格筋の萎縮が生じる。超高齢社会を迎える我が国において、筋萎縮の抑制は健康寿命延長の観点から重要である。forkhead box protein O1 (FOXO1)はフォークヘッド型の転写因子であり、筋萎縮において重要な役割を担っていることが知られる。このような背景のもと FOXO1 のレポーターアッセイを行い、筋萎縮の予防を目的とした FOXO1 の転写活性を抑制する物質の探索を行った。さらに培養細胞を用いて、候補物質(特にビタミン D)による筋萎縮抑制作用を調べた。

■ 方法

○スクリーニング

細胞は HEK293T を使用した。プラスミドは pM FOXO1 (GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミド)、4 × UAS TK Luc (レポーターのホタルルシフェラーゼの上流に GAL4 認識配列である UAS を組み込んだプラスミド)、ph RL-TK (常時発現型のウミシイタケルシフェラーゼ プラスミド、内部標準用)を用いた。トランスフェクション後、食品成分入りの培地に交換した。400 種類の食品成分ライブラリー (Sigma Aldrich, cat : s990043 シリーズ)を添加した。また 1,25(OH)₂ ビタミン D₃ (Cayman Chemical, cat : 71820)を添加した。Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, cat : E2920) を使用し、GloMax NAVIGATOR System GM 2010 (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

○C2C12 筋細胞を用いた筋萎縮関連遺伝子発現の解析

C2C12 筋細胞 (理研)を用いた。合成グルココルチコイド (dexamethasone, DEX) および 1,25(OH)₂ ビタミン D₃ を添加し 24 時間後に回収し、遺伝子発現解析に供した。CFX connect real time PCR system (BioRad)を用いてリアルタイム PCR を行った。

■ 結果および考察

GAL4-FOXO1 レポーターアッセイを用いて FOXO1 の転写活性を抑制する化合物の探索を行った。GAL4-FOXO1 融合タンパク質発現プラスミドを HEK293T 細胞に導入すると、レポータールシフェラーゼ活性の増加が観察された。これは FOXO1 の転写活性が増加していることを示す。約 400 種の食品由来化合物を用いて FOXO1 の転写活性を抑制する化合物の探索を行った。その結果、いくつかの化合物が FOXO1 の転写活性を抑制することを見出した。そのうち、1,25(OH)₂ ビタミン D₃ が強く FOXO1 の転写活性を抑制した。そこで FOXO1 の転写活性に対する 1,25(OH)₂ ビタミン D₃ の効果に着目した。1,25(OH)₂ ビタミン D₃ は容量依存的に FOXO1 のレポーター活性を抑制した。そのため、1,25(OH)₂ ビタミン D₃ は FOXO1 の転写活性を抑制することが示唆された。

C2C12 筋細胞に DEX 及び 1,25(OH)₂ ビタミン D₃ を添加し 24 時間後の遺伝子発現変化を調べたところ、FOXO1 遺伝子発現の増加傾向が観察された。また DEX の添加により筋萎縮関連遺伝子である Atrogin 1 及び Cathepsin L の有意な遺伝子発現の増加が観察された。1,25(OH)₂ ビタミン D₃ の添加により、ビタミン D 受容体の遺伝子発現増加が観察された。さらに興味深いことに、1,25(OH)₂ ビタミン D₃ の添加により、DEX 誘導性の Atrogin 1 及び Cathepsin L の遺伝子発現増加が抑制された。

■ 結語

FOXO1 の転写活性を抑制する食品成分は筋萎縮を抑制する可能性がある。本研究において我々は FOXO1 の転写活性をレポーターで検出する系を独自に開発し、400 種類の市販食品成分が与える影響を検討した。その結果、複数の成分が濃度依存的に FOXO1 の転写活性を抑制した。その中のひとつが活性型ビタミン D である 1,25(OH)₂ ビタミン D₃ であった。本研究で、ビタミン D が FOXO1 の転写活性を抑制することを、レポーターアッセイを用いて明らかにした。さらにビタミン D は C2C12 筋芽細胞において、グルココルチコイドによる筋萎縮関連遺伝子の Atrogin 1 及び Cathepsin L の発現誘導を抑制した。すなわち、ビタミン D は筋細胞において FOXO1 経路を介する筋萎縮を抑制することが示唆された。