Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1α gene

吉岡，東洋

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2009-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲4717

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004717

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	吉岡　東洋
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 4717 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1α gene （ヒト PGC-1α 遺伝子の代替プロモーターの同定と解析）

審　査　委　員

主　査　　教　授　片岡　徹

教　授　中村　俊一

教　授　平田　建一

Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1α gene

ヒトPGC-1α 遺伝子の代替プロモーターの同定と解析

吉岡　東洋、稲垣　健二郎、野口　哲也、酒井　真志人、小川　渉、細岡　哲也
井口　晴久、渡辺　英二郎 松木　泰、平松　隆司 、春日　雅人

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
糖尿病・代謝・内分泌内科学
（指導教員：春日　雅人教授　（客員教授））

吉岡　東洋

Key words：PGC-1αgene, alternativepromoter, skeletal muscle, exercise, cAMP response element, E-box, muscle-specific transcription factor, CREB

[背景と目的]

PPAR-γ coactivator-1α (PGC-1α)は、ミトコンドリアの生合成、ならびにインスリンに高い感受性を示すⅠ型骨格筋繊維(遅筋)の形成をつかさどる転写共役因子である。インスリン感受性を高める持久運動は、げっ歯類やヒトの筋肉においてPGC-1α の発現を誘導し、酸化的代謝を促進する。これらの事実から、PGC-1α の発現や活性を骨格筋選択的に増強することが、インスリ抵抗性の予防や治療に有効ではないかと考えられてきた。

過去の報告において、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に伴って活性化されたカルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅣ (CaMKIV)とカルシニューリンA (CnA)が、それぞれ転写因子 cAMP response element (CRE)-binding protein (CREB)あるいは myocyte enhancer factor 2 (MEF2)を介して、PGC-1α 遺伝子の転写を活性化することが示されている。これらに加えて、p38 MAPK キナーゼであるMKK6、および β2-アドレナリン作動性受容体(これらも共に運動によって活性化される)も、筋肉におけるPGC-1α の発現を誘導することが知られている。

最近、我々および他の研究グループは、それぞれ独立してマウスPGC-1α 遺伝子の代替第1エクソン(エクソン 1b と呼ぶ)を同定した。エクソン 1b は、PGC-1α 遺伝子転写産物の新規アイソフォーム(以下PGC-1α-b mRNA)の 5'非翻訳領域と始めの 12 コドンをコードしており、スプライシングを受けて正規の第2エクソンへとつながる。PGC-1α-b mRNA は、翻訳されて転写活性を有する蛋白となるが、興味深いことに、骨格筋におけるその発現は、これまで知られていたPGC-1α 遺伝子の転写産物(PGC-1α-a mRNA)に比べてより著しく運動によって上昇することがわかった。これらの成績は、骨格筋におけるPGC-1α の発現誘導機構が、PGC-1α-a mRNA の責任プロモーターを対象とした以前の研究にもとづいて提唱されてきたものより複雑であることを示唆する。この問題に対処するために、今回我々は、ヒトPGC-1α 遺伝子の代替プロモーターをクローニングし、これを解析した。

[方法および結果]

PGC-1α-b mRNA は、マウスのみならず、ヒトの骨格筋にも存在した。PGC-1α 遺伝子のエクソン 1b と代替 5'隣接領域に相同のヌクレオチド配列をヒトゲノム・データベースで検索したところ、翻訳開始点を基準として-278～-273 にE-box 様配列(CACCTG)が見出された(図 1A)。加えて、その下流(-255～-262)に潜在的 CRE 配列(TGATGTCA)が存在した。E-box と CRE の塩基配列はヒト、マウス、ラット間で保存されていることから、これらは機能的に重要なシスエレメントであると考えられた(図 1A)。
PGC-1α-b の発現調節機構を調べるために、我々は、異なる長さのプロモーター断片(P2-P5)、さらにはE-box および CRE に点変異を導入したフラグメント(ΔE-box およびΔCRE)を含むレポータープラスミドを作製した(図 1B)。

PGC-1α-b mRNA は、骨格筋と心臓で最も豊富であったので(補足図 S1)、まずMyoD ファミリーの転写因子がPGC-1α-b プロモーターを活性化するかどうかを、ルシフェラーゼアッセイで調べた。
3-kb のプロモーター断片(P1)は、単独ではマウス C2C12 筋芽細胞中でほとんど活性を示さなかったが、MyoD および MRF4 の強制発現によってそれぞれ 3.5 倍、5.7 倍以上にその活性が上昇した(図 2A)。
-404～-3032 領域の欠損によってプロモーター活性は著明に減少したが、MyoD と MRF4 による活性増

強効果は認められた(図 2A)。しかし、E-box 配列を欠くプロモーターは、まったく活性化されなかった(図 2A)。一方、MyoD および MRF4 の存在下での ΔE-box(図 1B)のプロモーター活性は、野生型プロモーターに比べて著しく低かった(図 2B)。さらに、electrophoretic mobility-shift assay (EMSA)によって、E-box 配列を含むオリゴヌクレオチドプローブに MyoD と MRF4 が特異的に結合することが確認された(図 2C)。以上の結果は、筋肉特異的な転写因子が、E-box モチーフを介して PGC-1α-b プロモーターを活性化することを示唆した。

次に我々は、運動の生理作用に重要な役割を持つ CaMKIV と CnA(カルシウム依存性シグナル伝達の主要因子)の効果を調べた。恒常的に活性化された CaMKIV(図 3A、B)あるいは CnA(図 3C、D)を発現させると、PGC-1α-b プロモーターの活性はそれぞれ 17 倍、4.4 倍以上に増加した。これらの効果は、CRE に点変異を導入することによって 88%以上抑制された(図 3A、C)。さらに、CREB のドミナントネガティブ変異体(A-CREB)の発現は、CaMKIV および CnA による PGC-1α-b プロモーターの活性化をほぼ完全に阻害した(図 3B、D)。これらの結果は、筋収縮に関連するカルシウムシグナルが、CREB を介して PGC-1α-b プロモーターの転写活性を誘導することを示唆した。

続いて、細胞内カルシウムとは無関係に活性化される運動依存性シグナルの効果を検討した。5'-AMPK を活性化する 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside は、PGC-1α-b プロモーターの活性に影響を及ぼさなかった。対照的に、フォルスコリン処理にて細胞内の cAMP 濃度を増加させた場合(図 3E、F)、あるいは MKK6 の強制発現によって p38 MAPK を活性化した場合(図 3G、H)には、プロモーター活性がそれぞれ、3.4 倍、2 倍以上増加した。フォルスコリンの効果は、CRE の変異(図 3E)、もしくは A-CREB の発現(図 3F)によって阻害された。MKK6 による活性化もまた、CRE の変異(図 3G)や A-CREB の発現(図 3H)によって著しく抑制された。すなわち骨格筋においては、cAMP や p38 MAPK を介するシグナルが CREB を通して PGC-1α-b の発現を調節する可能性が示唆された。

PGC-1α-b プロモーター上の CRE に対応するオリゴヌクレオチドプローブは、in vitro で CREB と結合した(図 4A)。さらに、chromatin immunoprecipitation (ChIP)アッセイによって、CRE を含むプロモーター領域と内因性 CREB が、フォルスコリン処理依存性に細胞内で特異的に結合することが明らかとなった(図 4B)。これらの観察結果から、PGC-1α 遺伝子の代替プロモーターに CREB が直接結合し、その転写活性を制御すると考えられた。

CREB の転写活性は、転写コアクチベーターとして知られる p300 と CBP によって修飾されている。p300 あるいは CBP を含む分子複合体と結合し、その機能を阻害する pE1A を強制発現させると、CaMKIV および CnA による PGC-1α-b プロモーターの活性化が有意に抑制された(補足図 S2A、B)。逆に、CaMKIV による PGC-1α-b プロモーターの活性化は、p300 あるいは CBP の過剰発現により強まった(補足図 S2C、D)。これらの結果は、p300 と CBP が PGC-1α-b の発現に関わることを示唆した。

最後に我々は、C2C12 筋管細胞を用いて、細胞内のカルシウムイオンと cAMP の上昇が PGC-1α の発現を誘導するかどうかを検証した。カルシウムイオノフォア(A23187)、あるいはフォルスコリンで細胞を処理すると、PGC-1α-b mRNA の量が、それぞれ 35 倍、30 倍まで増えた(図 4C)。対照的に、PGC-1α-a mRNA の発現は増加しなかった(図 4C)。以上より、細胞内のカルシウムと cAMP によって媒介されるシグナルが、PGC-1α-b の内因性プロモーターを活性化すると考えられた。またこれらの結果は、PGC-1α の二つのアイソフォームが筋収縮に対して異なった反応を示す事実(PGC-1α-b mRNA の増加の程度は PGC-1α-a mRNA のそれに比べて著しく大きい)に合致するものでもあった。

[考察]

運動は、CREB を介して酸化的代謝に関わる遺伝子の発現を再プログラムする様々なシグナルを筋細胞において惹起する。第一に、細胞内のカルシウムイオン濃度の増加は、CaMK と CnA の活性化を引き起こす。CaMK は CREB の Ser133 をリン酸化してこれを活性化する。一方 CnA は、コアクチベーターとして働く TORC の脱リン酸化と核内移行を促すことによって CREB を活性化する。第二に、運動で活性化された交感神経は、β-アドレナリン作動性受容体を刺激し、カテコールアミンの分泌を促すことによって cAMP の細胞内蓄積を促す。結果として生じるプロテインキナーゼAの活性化は、Ser133 のリン酸化を通して、もしくは TORC の機能を負に調節している salt-inducible kinase (SIK)の抑制を介して、CREB 活性を増加させる。第三に、筋収縮によって生じる機械的なストレスは、p38 MAPK を活性化し、その下流エフェクターである MAPKAP-K2 および MSK1 を介して CREB のリン酸化を誘導する。我々は、これらのプロセスのすべてが骨格筋における PGC-1α-b の運動依存性発現誘導に寄与するという作業仮説を提唱する。(図 4D)。

本研究によって、CREB と MyoD ファミリーの転写因子が、ヒト PGC-1α 遺伝子の代替プロモーターを活性化することが明らかとなった。前者は、運動によって生じたシグナルの重要な標的としてはたらき、骨格筋における PGC-1α-b の発現誘導を媒介する。一方後者は、新たに同定された PGC-1α mRNA のスプライシングバリアントの筋肉での豊富な発現に寄与するのかもしれない。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2031号	氏　名	吉岡 東洋
論文題目 Title of Dissertation	Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1α gene （ヒト PGC-1α遺伝子の代替プロモーターの同定と解析）		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	片岡 徹 平田 健一 中村 俊一	
審査終了日	平成２１年　４月　　日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

PPAR-γ coactivator-1α（PGC-1α）は、ミトコンドリアの生合成、ならびにインスリンに高い感受性を示すⅠ型骨格筋繊維（遅筋）の形成を司る転写共役因子である。インスリン感受性を高める持久運動は、げっ歯類やヒトの筋肉においてPGC-1αの発現を誘導し、酸化的代謝を促進する。これらの事実から、PGC-1αの発現や活性を骨格筋選択的に増強することが、インスリン抵抗性の予防や治療に有効ではないかと考えられてきた。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に伴って活性化されたカルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅣ (CaMKⅣ)とカルシニューリンA (CnA)が、それぞれ転写因子 cAMP response element (CRE)-binding protein (CREB)あるいは myocyte enhancer factor 2 (MEF2)を介して、p38 MAPK キナーゼである MKK6、及びβ2-アドレナリン作動性受容体も筋肉における PGC-1α の発現を誘導することが知られている。マウス PGC-1α遺伝子の代替第１エクソン（エクソン 1b）が同定され、エクソン 1b から転写される PGC-1α-b mRNA に由来する蛋白質は、既知の PGC-1α-a mRNA 由来の蛋白質に比べ、運動によって骨格筋で著しく上昇する。本研究者は、ヒト PGC-1α遺伝子の代替プロモーターをクローニングし、その機能を解析した。

PGC-1α-b 遺伝子では、翻訳開始点を基準として-278～-273 に E-box 様配列（CACCTG）、-255～-262 に潜在的 CRE 配列（TGATGTCA）が存在した。異なる長さのプロモーター断片、E-box 及び CRE に変異を導入したフラグメント（ΔE-box、ΔCRE）を含むレポータープラスミドを作製した。3-kb のプロモーター断片は、単独ではマウス C2C12 筋芽細胞中でほとんど活性を示さなかったが、MyoD 及び MRF4 の強制発現によってプロモーター活性が上昇した。-404～-3032 領域の欠損したプロモーターの活性は著明に減少したが、MyoD と MRF4 による活性増強効果は残存した。しかし、ΔE-box プロモーターは、全く活性化されなかった。EMSA では E-box 配列に MyoD と MRF4 が特異的に結合した。

運動の生理作用に重要な役割を持つ CaMKⅣや CnA を発現させるとプロモーター活性は増加したが、この増加はΔCRE 変異導入および CREB の優勢阻害変異体 A-CREB の発現によりほぼ完全に阻害された。5'-AMPK を活性化する 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside は、プロモーター活性に影響を及ぼさなかったが、フォルスコリン処理や MKK6 の強制発現によってプロモーター活性が増加した。フォルスコリンと MKK6 の効果

は、ΔCRE変異やA-CREBの発現によって阻害された。EMSAではPGC-1α-bプロモーター上のCREはCREBと結合した。ChIPアッセイによって、CREを含むプロモーター領域と内因性CREBが、フォルスコリン処理依存性に細胞内で特異的に結合した。CREBの転写活性を修飾することが知られている転写コアクチベーターp300とCBPの過剰発現によりCaMKIV依存性のプロモーター活性が増強された。また、C2C12筋管細胞をA23187あるいはフォルスコリンで処理すると、PGC-1α-b mRNAは増加したがa mRNAは増加しなかった。

本研究によって、CREBとMyoDファミリーの転写因子が、ヒトPGC-1α遺伝子の代替プロモーターを活性化することが明らかとなった。前者は、運動によって生じたシグナルの重要な標的として働き骨格筋におけるPGC-1α-bの発現誘導を仲介し、後者は、PGC-1α-bの筋肉での豊富な発現に寄与すると考えられた。

本研究は、骨格筋のインスリン感受性に強い影響を持つ転写共役因子PGC-1αの発現調節機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった新規スプライシングバリアントPGC-1α-bのCREBとMyoDファミリー転写因子による転写調節機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。