

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08646

研究課題名(和文) ヒトの偽遺伝子を標的とした筋萎縮に対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for skeletal muscle atrophy by targeting human pseudogene

研究代表者

常陸 圭介 (Hitachi, Keisuke)

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：10508469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、タンパク質メチル化酵素Mettl21eのノックアウトマウスの骨格筋組織を解析することで、Mettl21eが骨格筋量の維持に必要な新たな筋量制御因子であることを明らかにした。また、Mettl21eの基質となる骨格筋タンパク質を同定することで、骨格筋タンパク質のメチル化修飾を介してMettl21eが骨格筋量を制御していることを明らかにした。遺伝子導入効率の問題からMettl21eを用いてヒト骨格筋細胞を肥大化させることはまだ成功していないが、実験手法を改善することでMettl21eをヒトの筋萎縮に対する新たな治療法へと応用することが可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患や老化によって引き起こされる骨格筋の量の減少(筋萎縮)は、疾患での生存率やQOL(クオリティ・オブ・ライフ)を低下させるだけでなく、社会的な生産性の低下にもつながる。しかしながら、筋萎縮に対する安全で有効な治療薬は未だ存在しない。本研究により、骨格筋量の制御とタンパク質のメチル化修飾の意義が明らかとなったことで、将来的には特定のタンパク質のメチル化修飾を標的とした筋萎縮に対する新たな創薬が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：By analyzing the skeletal muscle tissue of the knockout mouse of protein methyltransferase Mettl21e, I revealed that Mettl21e is a novel regulator of skeletal muscle mass. I also identified a skeletal muscle protein as a substrate for Mettl21e and found that Mettl21e regulates skeletal muscle mass through the methylation of muscle protein. Although the use of Mettl21e to increase the size of human skeletal muscle cells has not yet been successful due to the issue of gene transfer efficiency, it was suggested that Mettl21e could be applied to new treatments for human muscle atrophy by improving the method.

研究分野：医化学一般

キーワード：タンパク質メチル化修飾 骨格筋 筋萎縮 筋肥大 メチル化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

疾患や老化によって引き起こされる骨格筋の量の減少（筋萎縮）は、疾患での生存率や QOL（クオリティ・オブ・ライフ）を低下させる要因となるだけでなく、社会的な生産性の低下にもつながる社会的な問題である。しかしながら、筋萎縮に対する安全で有効な治療法は未だ存在していない。運動やトレーニングにより骨格筋の量を増加（筋肥大）させることは筋萎縮の緩和に有効であるが、体力の衰えた高齢者や患者がこれらの行為を行うことは難しい。そのため骨格筋量を制御する分子機構を明らかにし、筋肥大を誘導することで失った筋量を回復させる安全な治療法を開発することは、医学的にも社会的にも非常に需要が大きい。

我々はこれまでに、マイクロアレイを用いた骨格筋組織における網羅的な遺伝子発現解析により、筋肥大マウスの骨格筋で発現が最も増加している遺伝子として *Mettl21e* 遺伝子を同定している。*Mettl21e* 遺伝子はタンパク質メチル化酵素をコードし、骨格筋に特異的な発現を示した。我々のこれまでの研究から、*Mettl21e* 遺伝子にマウス骨格筋を肥大させる作用があることが示されているが、*Mettl21e* 遺伝子がどのような分子機構で筋量を制御しているのかその詳細に関しては未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Mettl21e* 遺伝子を欠損した *Mettl21e* ノックアウト(KO)マウスの骨格筋組織の解析から、*Mettl21e* 遺伝子が骨格筋の肥大を誘導するメカニズムを解明することと、*Mettl21e* 遺伝子を標的にしたヒト骨格筋の筋肥大誘導法を開発することを目的とした。

### 1) 骨格筋量制御における *Mettl21e* 機能の解明

ゲノム編集により *Mettl21e* タンパク質が欠損したマウスを作製し、*Mettl21e* の欠損による筋量や筋力、筋タンパク質の合成・分解経路への影響を検証する。

### 2) *Mettl21e* によりメチル化修飾される筋タンパク質の同定

高感度プロテオミクス解析により、*Mettl21e* によりメチル化修飾される筋タンパク質の網羅的な同定を試みる。

### 3) *Mettl21e* 遺伝子を標的にした筋肥大の誘導法の開発

*Mettl21e* 遺伝子がヒト骨格筋細胞に対しても筋肥大を誘導できるかを、ヒト骨格筋細胞を用いた実験により明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) *Mettl21e* KO マウスを用いた *Mettl21e* 機能の解明

ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)により、マウス *Mettl21e* 遺伝子の Exon3 にアデニン 1 塩基が挿入された *Mettl21e* KO マウスを作製した。*Mettl21e* KO マウスと同腹の野生型マウスについて、体重、筋重量、筋断面積、筋繊維数、筋張力の比較と、HE 染色による筋組織の観察を行い、*Mettl21e* 遺伝子の欠損による骨格筋への影響を評価した。

### 2) *Mettl21e* によりメチル化修飾される筋タンパク質の同定

Flag-tag 配列を付加したマウス *Mettl21e* 遺伝子を、エレクトロポレーションによりマウスの前脛骨筋へと遺伝子導入した。次に Flag 抗体を用いて Flag-Mettl21e を免疫沈降することで *Mettl21e* と結合するタンパク質を精製し、超高分解能フーリエ変換型質量分析装置 (Orbitrap Fusion) によりそれぞれのタンパク質を同定した。

9 週齢のオス *Mettl21e* KO マウスと野生型マウスの前脛骨筋を単離し、プロテオミクス解析に用いるタンパク質溶解液を調製した。トリプシンによるタンパク質の切断後に、Orbitrap Fusion によりプロテオミクス解析を行い、*Mettl21e* によってメチル化修飾されるタンパク質の同定を試みた。また、マウス *Mettl21e* リコンビナントタンパク質を大腸菌によって作製した。作製したリコンビナントタンパク質を用いて、同定した骨格筋タンパク質の *in vitro* メチル化反応を行った。*Mettl21e* による骨格筋タンパク質のメチル化修飾の検出は、リジン残基へのモノメチル化修飾を特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロッティング法により行った。

### 3) *Mettl21e* 遺伝子を標的にした筋肥大の誘導法の開発

Flag-tag 配列を付加したヒトの *Mettl21e* 遺伝子の全長配列を人工合成によって合成し、トランスポゼースによる遺伝子組換えが可能な pSBtet ベクターへと導入した。ヒト骨格筋細胞に作製した pSBtet-hMettl21e を遺伝子導入することで、ドキシサイクリンでヒト *Mettl21e* 遺伝子を発現誘導可能なヒト骨格筋細胞の樹立を試みた。導入した遺伝子の発現は、Flag 抗体を用いた免疫細胞染色法により確認した。

## 4. 研究成果

### 1) *Mettl21e* KO マウスの骨格筋組織の解析

9 週齢の *Mettl21e* KO マウスでは同腹の野生型マウスと比べて、15%ほどの筋力の低下と、10-20%ほどの前脛骨筋、ヒラメ筋、長趾伸筋、大腿四頭筋、腓腹筋の筋量の減少が観察された。筋繊維数の変化や HE 染色による筋への損傷は観察されなかった。*Mettl21e* KO マウスに除神経による筋萎縮誘導処理を行ったが、野生型マウスと比べて *Mettl21e* 遺伝子の欠損による筋萎縮への影響は観察されなかった。

### 2) *Mettl21e* によってメチル化修飾されるタンパク質の同定

内在性のマウス *Mettl21e* の免疫沈降を行うために、*Mettl21e* を認識する抗体の作製を行った。具体的には、大腸菌を用いて *Mettl21e* リコンビナントタンパク質を発現させ、このリコンビナントタンパク質を抗原としてウサギに免疫し *Mettl21e* 抗体を作製した。しかしながら、検出感度と特異性の問題から作製した抗体では内在性の *Mettl21e* を検出することはできなかった。そこで、Flag タグを付加した *Mettl21e* をマウス骨格筋へとエレクトロポレーションによって遺伝子導入し、Flag 抗体による免疫沈降を利用して *Mettl21e* 結合タンパク質を精製し、質量分析法によりそれぞれのタンパク質を同定した。その結果 50 種類の *Mettl21e* 結合タンパク質を同定することに成功した。

また別のアプローチとして、*Mettl21e* KO マウスの骨格筋抽出液を用いて同腹の野生型マウスと比較プロテオミクス解析をすることで、*Mettl21e* の骨格筋でメチル化修飾が減少している骨格筋タンパク質を同定した。さらに、*Mettl21e* リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* メチル化反応系を構築し、*Mettl21e* によってメチル化修飾される詳細なアミノ酸部位を同定した。

### 3) *Mettl21e* 遺伝子を標的にした筋肥大の誘導法の開発

まずヒトの *Mettl21e* 遺伝子のスプライシング構造を理解するために、ヒトとチンパンジーの *Mettl21e* 相同遺伝子のエクソン 3 領域の比較を行った。それぞれの領域を pcDNA3 ベクターにクローニング後に、Hela 細胞、293 細胞、ヒト myoblast に遺伝子導入し、ヒトとチンパンジーの *Mettl21e* 遺伝子のスプライシング様式の違いの検出を試みた。しかしながら、両者のスプライシング様式に差は認められなかった。そこで次に、ヒト骨格筋組織から RNA を抽出し、PCR によってヒト *Mettl21e* 相同遺伝子のエクソン 3 領域を増幅したところ、スプライシングによって生じる約 250 bp のバンドを検出することに成功し、ヒトにおいても *Mettl21e* 遺伝子が正常に発現していることを明らかにした。

次に *Mettl21e* 遺伝子によってヒトの骨格筋細胞を肥大させることが可能であるかを検証するために、Flag-tag 配列を付加したヒトの *Mettl21e* 遺伝子の全長配列を人工合成によって作製し、ヒトの *Mettl21e* 遺伝子を誘導によって発現できるヒト骨格筋細胞の作製を試みた。しかしながら、遺伝子導入効率が十分ではないためにヒトの *Mettl21e* 遺伝子を発現するヒト骨格筋細胞は作製することはできなかった。今後は一過性にヒト *Mettl21e* 遺伝子をヒト骨格筋細胞へと過剰発現し、ヒト骨格筋細胞の大きさへの影響を精査することで、*Mettl21e* によるヒト骨格筋の肥大効果をより詳細に検証する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hitachi Keisuke, Nakatani Masashi, Funasaki Shiori, Hijikata Ikumi, Maekawa Mizuki, Honda Masahiko, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression Levels of Long Non-Coding RNAs Change in Models of Altered Muscle Activity and Muscle Mass	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1628～
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21051628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zhong Zhuoheng, Furuya Takashi, Ueno Kimitaka, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Tani Masahiko, Tian Jingkui, Komatsu Setsuko	4. 巻 21
2. 論文標題 Proteomic Analysis of Irradiation with Millimeter Waves on Soybean Growth under Flooding Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 486～
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21020486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Saitoh Mariko, Takayama Kentaro, Hitachi Keisuke, Taguchi Akihiro, Taniguchi Atsuhiko, Tsuchida Kunihiro, Hayashi Yoshio	4. 巻 30
2. 論文標題 Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126892～
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.126892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Data describing the effects of depletion of Myoparr, myogenin, Ddx17, and hnRNP in differentiating C2C12 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104172～
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2019.104172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhong Zhuoheng, Liu Shengzhi, Zhu Wei, Ou Yuting, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Tian Jingkui, Komatsu Setsuko	4. 巻 18
2. 論文標題 Phosphoproteomics Reveals the Biosynthesis of Secondary Metabolites in Catharanthus roseus under Ultraviolet-B Radiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 3328 ~ 3341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.9b00267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurokawa Riki, Takeuchi Akihide, Shiina Nobuyuki, Katahira Masato, Yamashita Takefumi, Matsuno Yoko, Hitachi Keisuke, et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 Versatility of RNA-Binding Proteins in Living Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 7~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11648/j.bs.20190501.12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hitachi Keisuke, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Okada Hitoshi, Tsuchida Kunihiro, Honda Masahiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Deficiency of Vgll2 Gene Alters the Gene Expression Profiling of Skeletal Muscle Subjected to Mechanical Overload	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Sports and Active Living	6. 最初と最後の頁 41~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fspor.2019.00041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hitachi Keisuke, Nakatani Masashi, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Long Non-Coding RNA Myoparr Regulates GDF5 Expression in Denervated Mouse Skeletal Muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 33~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ncrna5020033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aslam Muhammad, Rehman Shafiq, Khatoon Amana, Jamil Muhammad, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Li Xinyue, Sunohara Yukari, Matsumoto Hiroshi, Komatsu Setsuko	4. 巻 20
2. 論文標題 Molecular Responses of Maize Shoot to a Plant Derived Smoke Solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1319 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20061319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jhanzab Hafiz, Razzaq Abdul, Bibi Yamin, Yasmeen Farhat, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Komatsu Setsuko	4. 巻 20
2. 論文標題 Proteomic Analysis of the Effect of Inorganic and Organic Chemicals on Silver Nanoparticles in Wheat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 825 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Honda Masahiko, Tsuchimochi Hirotsugu, Hitachi Keisuke, Ohno Seiko	4. 巻 234
2. 論文標題 Transcriptional cofactor Vgl12 is required for functional adaptations of skeletal muscle induced by chronic overload	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 15809 ~ 15824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.28239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hitachi Keisuke, Nakatani Masashi, Takasaki Akihiko, Ouchi Yuya, Uezumi Akiyoshi, Ageta Hiroshi, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Myogenin promoter associated lnc RNA Myoparr is essential for myogenic differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e47468 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201847468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ageta Hiroshi, Ageta-Ishihara Natsumi, Hitachi Keisuke, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3936 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06197-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Xinyue, Rehman Shafiq ur, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Yamaguchi Takuya, Sunohara Yukari, Matsumoto Hiroshi, Komatsu Setsuko	4. 巻 181
2. 論文標題 Proteomic analysis of the effect of plant-derived smoke on soybean during recovery from flooding stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 238 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2018.04.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuchida Kunihiro, Nakatani Masashi, Hitachi Keisuke	4. 巻 5
2. 論文標題 Therapeutic strategies against muscular dystrophy and related atrophic disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Translational Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/JTS.1000275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa Riki, Komiya Reina, Oyoshi Takanori, Matsuno Yoko, Tani Hidenori, Katahira Masato, Hitachi Keisuke, et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Multiplicity in Long Noncoding RNA in Living Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 18 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11648/j.bs.20180402.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 常陸圭介、中谷直史、上田洋司、上住聡芳、土田邦博
2. 発表標題 筋分化・筋萎縮における新規長鎖非コードRNA Myoparrの機能解析
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常陸圭介、土田邦博
2. 発表標題 新規長鎖非コードRNA Myoparrによる筋分化と筋萎縮制御機構の解析
3. 学会等名 第51回藤田学園医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常陸圭介、中谷直史、土田邦博
2. 発表標題 骨格筋分化におけるMyoparr結合タンパク質hnRNPKの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Hitachi, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 Promoter-associated long non-coding RNA, Myoparr, is a novel regulator of skeletal muscle cell differentiation and skeletal muscle atrophy
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conferences. RNA Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 常陸圭介、土田邦博
2. 発表標題 骨格筋の恒常性の維持における長鎖非コードRNA Myoparrの機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 常陸圭介、土田邦博
2. 発表標題 転写調節領域から発現する新規長鎖非コードRNA Myoparrを介した新たな筋分化制御機構の解析
3. 学会等名 ConBio2017(2017年度生命科学系学会合同年次大会、第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 常陸圭介、中谷直史、前川瑞希、小川千奈見、土方郁実、舟崎史織、土田邦博
2. 発表標題 骨格筋の肥大・萎縮時における長鎖非コードRNAの発現変化の解析
3. 学会等名 ConBio2017(2017年度生命科学系学会合同年次大会、第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keisuke Hitachi, Akihiko Takasaki, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 A promoter derived novel lncRNA, Myog pancRNA, is essential for both host-gene expression and the differentiation of skeletal muscle cells
3. 学会等名 THE 43rd NAITO CONFERENCE. Noncoding RNA : Biology, Chemistry, & Diseases (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 521
3. 書名 The Chemical Biology of Long Noncoding RNAs	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	乾 雅史  (Inui Masafumi)  (20643498)	明治大学・農学部・専任講師   (32682)	
連携研究者	亀山 俊樹  (Kameyama Toshiki)  (60298544)	藤田医科大学・総合医学研究所・助教   (33916)	