

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07315

研究課題名（和文）タンパク質のメチル化修飾を介した新たな骨格筋量の制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名（英文）Novel regulatory mechanism of skeletal muscle mass via protein methylation

研究代表者

常陸 圭介（Hitachi, Keisuke）

藤田医科大学・医科学研究センター・講師

研究者番号：10508469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で、Mettl21eのノックアウトマウス、その標的タンパク質のノックインマウスの解析を進めることで、Mettl21eによるタンパク質のメチル化修飾が骨格筋量を調節する分子機構を明らかにした。またMettl21eを中心にヒトサンプルの解析を進めることで、これまで不明であったヒト筋疾患とメチル化修飾の関係性についても迫ることができた。さらに、ノックインマウスの作製過程で得られた筋ミオシンのダブルノックアウトマウスの解析から、速筋型ミオシンがヒトの筋疾患に関与する可能性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mettl21eによるタンパク質のメチル化修飾を介した骨格筋量の制御メカニズムは、従来のタンパク質分解・合成の枠に囚われない新たな筋量制御機構である可能性を見出すことができた。また、ヒト筋疾患サンプルにおいてもメチル化修飾が変化していることが見出せた。よって本研究により、タンパク質のメチル化修飾を基軸とすることでヒトの筋萎縮・筋疾患に対する新たな治療戦略を構築することが可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：I have investigated the role of Mettl21e in regulating skeletal muscle mass by analyzing knockout mice of Mettl21e and knock-in mice of its target protein. Through this study, I have successfully elucidated the molecular mechanism underlying the methylation by Mettl21e. Additionally, my focus on Mettl21e has allowed me to shed light on the previously unclear relationship between methylation and human muscle disorders. Furthermore, during the generation of knock-in mice, I obtained double knockout mice of myosin. The analysis of these mice has revealed a potential association between fast-twitch myosin and human muscle disorder.

研究分野：医科学一般

キーワード：メチル化修飾 骨格筋 筋疾患 筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

老化や疾患で生じる骨格筋量の減少は筋萎縮と呼ばれ、高齢者や患者の活動や疾患による生存率を低下させ、健康寿命の延伸を妨げる主要因である。そのため、超高齢化社会となった本邦においては、健康的な生活を送るために筋萎縮を予防・治療することが重要である。しかしながら、安全で有効な筋萎縮の治療法はいまだ確立されておらず、筋萎縮の治療法開発につながる研究基盤を構築することは、超高齢化社会を迎えた本邦にとって喫緊の課題である。

申請者はこれまでに、タンパク質メチル化酵素 Mettl21e のノックアウト (KO) マウスを作製し、この酵素の欠損により全身の骨格筋量が減少することを見出している。興味深いことに、筋萎縮で通常認められる筋タンパク質の分解はこのマウスでは観察されず、代わりに筋タンパク質のメチル化修飾の消失が観察された。よってこれまで知られていなかった、タンパク質のメチル化修飾レベルの変化を介して、骨格筋量を制御する新たなメカニズムが存在している可能性が非常に高い。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質のメチル化修飾の消失が筋量の減少を引き起こすメカニズムを解明し、それによりヒト筋萎縮に対する新治療法を確立することを目的とした。

(1) メチル化修飾が筋タンパク質の機能に与える影響の解析

Mettl21e の KO マウスの骨格筋組織の解析、Mettl21e 標的タンパク質のメチル化修飾部位を変化させたノックイン (KI) マウスの作製と組織解析、プロテオミクス解析などを組み合わせることで、タンパク質のメチル化修飾が骨格筋量を調節するメカニズムを明らかにする。

(2) ヒトの筋萎縮に対する新治療法の確立

ヒト骨格筋細胞の筋肥大誘導法の開発や、メチル化修飾レベルと筋疾患・筋萎縮との関係性をヒトサンプルを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの解析

野生型と Mettl21e KO マウスの骨格筋から筋タンパク質を精製し、メチル化の有無による活性への影響を精査した。メチル化修飾の消失が筋萎縮を引き起こす直接の原因となるかを明らかにするために、標的タンパク質のメチル化を受けるリジン残基をアルギニン残基に置換した KI マウスをゲノム編集によって作製した。KI マウスは、B6 系統マウスの受精卵に、Cas9 タンパク質、gRNA、ssODN を注入し、CRISPR/Cas9 システムを応用したエレクトロポレーションによる i-Gonad 法により作製した。複数世代のバッククロスの後、KI マウスの体重、筋重量、筋断面積、筋力の測定と、HE 染色による筋組織の観察などを行い、メチル化修飾部位を変化させた場合に生じる骨格筋量と筋機能への影響を評価した。それぞれの遺伝子改変マウスについて、遺伝子発現、タンパク質の翻訳後修飾の変化などを解析し、メチル化修飾の下流に位置し筋量の制御に関わる新たなシグナル経路の同定を試みた。また、標的タンパク質のモノメチル化修飾された状態を検出可能なモノクローナル抗体を作製し、その局在の解析を行なった。

KI マウスの作製の過程で、2 つの筋ミオシンタンパク質を欠損したダブルノックアウト (dKO) マウスが得られたため、このマウスの骨格筋組織の解析とタンパク質発現への影響を解析した。

(2) ヒトサンプルでの Mettl21e の解析

ヒト骨格筋組織から単離した細胞に Mettl21e を過剰発現することで、ヒトの骨格筋細胞でも筋肥大の誘導が可能かを、免疫染色やウェスタンブロットにより精査した。ヒト骨格筋組織でのメチル化酵素の発現機構の解析や、筋疾患とメチル化修飾レベルとの関係に関してウェスタンブロットでの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスの解析

メチル化修飾の有無によりタンパク質の機能に変化が生じるかを明らかにするために、野生型と Mettl21e KO マウスの骨格筋から筋タンパク質を生化学的に精製し、その活性を測定した。その結果、メチル化修飾されることでタンパク質の機能が抑制的に制御されることを明らかにした。さらに、Mettl21e KO マウスに筋萎縮や筋肥大などの負荷処置を行うことで、Mettl21e が筋肥大するために必要であることを見出した。メチル化修飾を特異的に認識する非常に高感度なモノクローナル抗体を作製し、この抗体を用いることで骨格筋組織における標的タンパク質のメチル化の局在を明らかにした。分子シミュレーションを用いてメチル化修飾の有無による、標的タンパク質の構造への解析を進めた結果、メチル化修飾により影響を受ける箇所を特定した。

Mettl21e によってメチル化修飾を受けないように t 変異を導入した KI マウスについては、定常状態では予想したよりも筋機能への影響が弱かった。そのため、Mettl21e KO マウスと同様に、筋萎縮や筋肥大などの負荷処置を行なった結果、この KI マウスでは絶食処置を行った場合に野生型マウスと比べて萎縮が促進することを見出した。

ゲノム編集による KI マウスの作製過程で得られた dKO マウスについては、これまで報告され

ていたミオシンの KO マウスと比べて非常に重度の筋萎縮を呈することを明らかにした。興味深いことに、この dKO マウスは生後 3 週間程度で筋量が野生型マウスの 1/4 程度まで減少し、その後数日のうちに死亡することを明らかにした。プロテオミクス解析から、dKO マウスの骨格筋組織ではサルコメアに関連したタンパク質の発現が大きく変化していることも発見している。また、筋衛生細胞や PDGFR 陽性細胞に対しても影響が及んでいることを明らかにした。

(2) ヒトサンプルでの Mettl21e の解析

ヒト骨格筋細胞を筋管細胞へと分化させて、Mettl21e の遺伝子導入手法の検討を行った結果、AAV9 ウイルスを用いることで Mettl21e を筋管細胞へと遺伝子導入することに成功した。Mettl21e の遺伝子導入により、ヒト筋管細胞のサイズが増加する傾向と、標的タンパク質のメチル化修飾レベルの増加が観察された。また、ヒトでの標的タンパク質のメチル化修飾を認識する抗体を作製し、複数のヒト筋疾患におけるメチル化修飾レベルの変化の解析を行った。その結果、これまでタンパク質のメチル化修飾の変化が起きることが知られていない筋疾患においても、大きな修飾の変化が生じていることを見出すことができた。今後、その分子機構について詳細に解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hitachi Keisuke, Kiyofuji Yuri, Yamaguchi Hisateru, Nakatani Masashi, Inui Masafumi, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Simultaneous loss of skeletal muscle myosin heavy chain IIX and IIB causes severe skeletal muscle hypoplasia in postnatal mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202200581R	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, Honda Masahiko, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 The Functional Role of Long Non-Coding RNA in Myogenesis and Skeletal Muscle Atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2291 ~ 2291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11152291	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 Takayama Kentaro, Hitachi Keisuke, Okamoto Hideyuki, Saitoh Mariko, Odagiri Miki, Ohfusa Rina, Shimada Takahiro, Taguchi Akihiro, Taniguchi Atsuhiko, Tsuchida Kunihiro, Hayashi Yoshio	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Myostatin Inhibitory d-Peptides to Enhance the Potency, Increasing Skeletal Muscle Mass in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 492 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00705	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, Kiyofuji Yuri, Nakatani Masashi, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Myoparr-Associated and -Independent Multiple Roles of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K during Skeletal Muscle Cell Differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 108 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010108	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 Komatsu Setsuko, Maruyama Junya, Furuya Takashi, Yin Xiaojian, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Miyashita Natsuki, Tsuchida Kunihiro, Tani Masahiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Proteomic and Biological Analyses Reveal the Effect on Growth under Flooding Stress of Chickpea Irradiated with Millimeter Waves	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 4718 ~ 4727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.1c00368	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 Komatsu Setsuko, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Kono Yuhi, Nishimura Minoru	4. 巻 22
2. 論文標題 Proteomic and Biochemical Analyses of the Mechanism of Tolerance in Mutant Soybean Responding to Flooding Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9046 ~ 9046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22169046	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, Kiyofuji Yuri, Inagaki Hidehito, Kurahashi Hiroki, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 An Analysis of Differentially Expressed Coding and Long Non-Coding RNAs in Multiple Models of Skeletal Muscle Atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2558 ~ 2558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052558	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 Mohd Amnan Muhammad Asyraf, Pua Teen-Lee, Lau Su-Ee, Tan Boon Chin, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Komatsu Setsuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Osmotic stress in banana is relieved by exogenous nitric oxide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e10879 ~ e10879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.10879	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 Hashiguchi Akiko, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Watanabe Kazuo	4. 巻 10
2. 論文標題 An Optimized Protein Extraction Method for Gel-Free Proteomic Analysis of Opuntia Ficus-Indica	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 115 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10010115	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 Hashiguchi Akiko, Okabayashi Koji, Yamaguchi Hisateru, Tsuchida Kunihiro, Hitachi Keisuke, Isoda Hiroko	4. 巻 23
2. 論文標題 The Effect of Mung Bean (Vigna radiata (L.)) Coat Extract on Mouse Liver Metabolism During Progesterone Withdrawal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Food	6. 最初と最後の頁 967 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/jmf.2020.4703	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 Mustafa Ghazala, Hasan Murtaza, Yamaguchi Hisateru, Hitachi Keisuke, Tsuchida Kunihiro, Komatsu Setsuko	4. 巻 224
2. 論文標題 A comparative proteomic analysis of engineered and bio synthesized silver nanoparticles on soybean seedlings	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 103833 ~ 103833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2020.103833	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

〔学会発表〕 計9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, 清藤友梨, 山口央輝, 中谷直史, 乾雅史, 土田邦博
2. 発表標題 複数の速筋型ミオシン重鎖の同時欠損は重度の筋萎縮を引き起こす
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 常陸圭介, 山口央輝, 清藤友梨, 中谷直史, 乾雅史, 小澤龍彦, 茅元司, 土田邦博
2. 発表標題 タンパク質メチル化修飾を介した速筋型ミオシン重鎖活性の制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Hitachi, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 The functional role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in skeletal muscle atrophy
3. 学会等名 The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤祐太郎, 常陸圭介, 土田邦博
2. 発表標題 エクソーム解析による筋損傷・筋疾患の原因となる新たな遺伝子変異の同定
3. 学会等名 第69回中部日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 常陸圭介, 清藤友梨, 山口央輝, 中谷直史, 乾雅史, 土田邦博
2. 発表標題 Myh1とMyh4遺伝子の同時欠損による骨格筋機能への影響の解析
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 常陸圭介, 土田邦博
2. 発表標題 長鎖非コードRNAによる骨格筋量の調節機構
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会 シンポジウム 卓越研究員企画：若手研究者による骨格筋の分子生物学 -基礎から臨床まで- (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Hitachi, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 Identification and characterization of novel long non-coding RNAs associated with multiple skeletal muscle atrophy
3. 学会等名 Noncoding RNA World: From Mechanism to Therapy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常陸圭介, 土田邦博
2. 発表標題 複数の骨格筋萎縮モデルを用いた新規長鎖非コードRNAの発現変化の解析
3. 学会等名 第6回日本筋学学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常陸圭介, 山口央輝, 中谷直史, 乾雅史, 土田邦博
2. 発表標題 タンパク質メチル化修飾を介した新たな骨格筋量調節機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会ワークショップ
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------