

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19491

研究課題名（和文）骨格筋の運動適応に関する長鎖ノンコーディングRNAの同定とその生理機能

研究課題名（英文）Role of long non-coding RNAs in exercise-induced muscle adaptation

研究代表者

及川 哲志（Oikawa, Satoshi）

早稲田大学・スポーツ科学大学院・その他（招聘研究員）

研究者番号：20844997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋の持久性運動適応における長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）の機能を明らかにすることを目的とした。運動後の腓腹筋を用いた網羅的遺伝子発現解析から、運動誘導性lncRNAを同定し、これらの機能を検討するため、ミトコンドリア量を指標とした機能的スクリーニングを生体骨格筋で行った。骨格筋の運動効果を模倣するPGC-1 Tgマウスの前脛骨筋においてあるlncRNAをノックダウンしたところクレアチンキナーゼ活性の顕著な低下が認められた。したがってこのlncRNAはミトコンドリア量を調節する因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）は新たな機能性RNA分子として注目されているが、その生理機能はほとんど明らかでない。またこれらのRNAはがんをはじめとするさまざまな疾患の治療標的となる可能性がある。本研究は、骨格筋の運動適応に関する新たなlncRNAを同定し、その生理機能を明らかにすることで代謝性疾患の治療標的の開発へ繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the function of long non-coding RNAs (lncRNAs) in skeletal muscle adaptation to endurance exercise. Based on our RNA-seq analysis using the gastrocnemius muscle following exercise training, we identified 16 exercise-inducible lncRNAs whose functions have not yet been determined. To address the function of these lncRNAs, we manipulated their expression and evaluated citrate synthase (CS) activity as a marker of mitochondrial volume in adult skeletal muscle. Knockdown of an lncRNA in the tibialis anterior muscle of PGC-1 Tg mice, which mimics the effects of skeletal muscle exercise, resulted in a significant decrease in CS activity. This suggests that this lncRNA could be a novel regulator of mitochondrial volume in skeletal muscles.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：骨格筋 持久性運動 ミトコンドリア ノンコーディングRNA lncRNA

1. 研究開始当初の背景

持久性運動は、高い疲労耐性を有する遅筋線維や ATP 産生を担うミトコンドリアの量・活性の増加、筋線維を取り巻く毛細血管網の発達などの骨格筋適応を誘導するが、その分子メカニズムは十分に明らかにされていない。骨格筋の運動適応の分子機序を明らかにすることで、骨格筋のエネルギー代謝を活性化し肥満や糖尿病といった代謝性疾患を改善する新たな治療標的の開発に貢献することが期待される。

長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA: lncRNA) はタンパク質へ翻訳されない全長 200 塩基以上のノンコーディング RNA であり、エピジェネティクス修飾やタンパク質との相互作用をはじめ、さまざまな分子機構によりその生理機能を発揮する (Yao et al. Nat Cell Biol. 2019)。現在までに骨格筋細胞に発現する lncRNA の筋細胞の増殖や分化、マウス骨格筋の発生における役割が明らかにされてきた (Cesana et al. Cell. 2011, Jin et al. PNAS. 2018, Ballarino et al. EMBO J. 2018)。一方で、持久性運動による lncRNA の発現変動およびそれらの運動適応における機能を検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋の持久性運動適応における lncRNA の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

骨格筋における運動誘導性の lncRNA を抽出するため、12 週間の自発走運動を行わせたマウスの腓腹筋サンプルを回収し RNA-seq 解析を実施した。このデータセットから、運動によって有意に発現が増加あるいは低下した lncRNA を抽出した。

核および細胞質への分画は、Hwang らの方法を改良して実施した (Hwang et al. Science. 2007)。マウス C2C12 筋芽細胞を 2%ウマ血清を含む DMEM 培地で培養し、筋管細胞へ分化誘導した。筋管細胞を 0.5% NP-40 を含む lysis buffer を用いて溶解、洗浄し、遠心分離後の液相を細胞質分画、ペレットを核分画として回収した。Isogen-LS または Isogen II を用いて RNA を精製し PCR 解析に用いた。

運動誘導性 lncRNA の機能を検討するため、骨格筋の運動適応の表現型を模倣する PGC-1 α トランスジェニック (Tg) マウス (Tadaishi et al. PLoS One. 2011) において shRNA を用いた機能的スクリーニングを行った。lncRNA の発現を低下させるため、それぞれの lncRNA に対する shRNA 発現ベクターをデザインした。コントロールベクター (pGFPbsd-U6-shLuciferase) あるいは lncRNA を標的とするベクター (pGFPbsd-U6-shlncRNA) をエレクトロポレーション法によってコントロールおよび PGC-1 α Tg マウスの左右の前脛骨筋へそれぞれ導入した。その 2 週間後に骨格筋を回収し、クエン酸合成酵素活性 (CS 活性) を評価した。CS 活性の測定は Spinazzi らが報告した方法に従って実施した (Spinazzi et al. Nat Protoc. 2012)。

4. 研究成果

運動後の腓腹筋を用いた RNA-seq 解析から、これまでに機能が明らかとなっていない 16 の運動誘導性 lncRNA を同定した。このうちいくつかの lncRNA は速筋線維が優位な足底筋と比較して、遅筋線維が優位であるヒラメ筋において高い発現が認められた。

lncRNA はその細胞内局在によって異なる機能を発揮することが知られており (Yao et al. Nat Cell Biol. 2019)、機能未知である lncRNA の細胞内局在を明らかにすることは、それらの機能およびメカニズムを理解する上で重要な手がかりとなる可能性がある。筋管細胞を核および細胞質分画へ分離後、それぞれの分画における lncRNA の発現を PCR 解析で定量した。本研究において同定された運動誘導性 lncRNA は主に細胞質に局在することが明らかとなった。

運動によって発現が増加した lncRNA に着目し、これらの機能を明らかにするためにミトコンドリア量を指標とした機能解析を生体骨格筋で行った。PGC-1 α Tg マウスの前脛骨筋においてある lncRNA (lncRNA-X) をノックダウンしたところ CS 活性の顕著な低下が認められた (図 1)。したがってこの lncRNA-X はミトコンドリア量を調節する因子である可能性が示唆された。

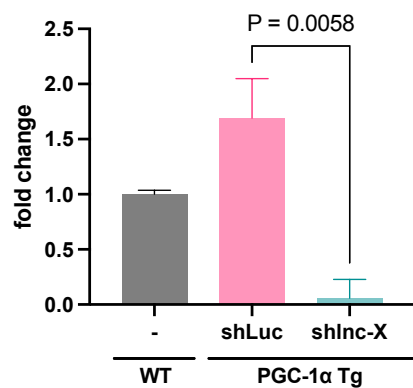


図 1, *lncRNA-X* のノックダウンによる CS 活性の変化 PGC-1α Tg マウスの骨格筋に *lncRNA* に対する shRNA を発現するベクターを導入し, その 2 週間後に骨格筋組織を採取して CS 活性を評価した. その結果, *lncRNA-X* の発現低下によって CS 活性の顕著な低下が認められた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Inai Yuto, Oikawa Satoshi, Akama Takao	4. 巻 10
2. 論文標題 Study on the Efficiency of Data Collection, Organization and Feedback Methods for Triathlon Races	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Human Movement and Sports Sciences	6. 最初と最後の頁 155 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.13189/saj.2022.100204	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 Peng Heng, Oikawa Satoshi, Inai Yuto, Maeda Seiji, Akama Takao	4. 巻 303
2. 論文標題 Effects of lung volume and trigeminal nerve stimulation on diving response in breath-hold divers and non-divers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Physiology & Neurobiology	6. 最初と最後の頁 103918 ~ 103918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resp.2022.103918	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 Sun Ziyue, Inai Yuto, Koseki Kyoko, Oikawa Satoshi, Eda Nobuhiko, Akama Takao	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of simple detection method of polyreactive secretory immunoglobulin A in saliva	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 207 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7600/jpfsm.11.207	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 Yook Jin-Seon, Taxin Zachary H., Yuan Bo, Oikawa Satoshi, Auger Christopher, Mutlu Beste, Puigserver Pere, Hui Sheng, Kajimura Shingo	4. 巻 0
2. 論文標題 A liver-specific mitochondrial carrier that controls gluconeogenesis and energy expenditure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.12.06.519308	査読の有無 無
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 Oikawa Satoshi, Akimoto Takayuki	4. 巻 2640
2. 論文標題 Functional Analysis of MicroRNAs in Skeletal Muscle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 339 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3036-5_24	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 Yook Jin-Seon, Taxin Zachary H., Yuan Bo, Oikawa Satoshi, Auger Christopher, Mutlu Beste, Puigserver Pere, Hui Sheng, Kajimura Shingo	4. 巻 120
2. 論文標題 The SLC25A47 locus controls gluconeogenesis and energy expenditure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2216810120	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 Oikawa Satoshi, Yuan Shuaibang, Kato Yoshio, Akimoto Takayuki	4. 巻 290
2. 論文標題 Skeletal muscle enriched miRNAs are highly unstable <i>in vivo</i> and may be regulated in a Dicer independent manner	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5692 ~ 5703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16917	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0件

〔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			
米国	Beth Israel Deaconess Medical Center			