

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09218

研究課題名(和文)骨格筋再生における翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文)Translational control in skeletal muscle regeneration

研究代表者

椎森 仁美 (Shiimori, Masami)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：20833891

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、マウス筋芽細胞株C2C12の骨格筋分化過程において、翻訳開始抑制因子4E-BP1や4E-TのCNOT4依存的なユビキチン化が、筋分化に必要な遺伝子の効率的な翻訳に重要であることを見出した。また、マウス個体の筋萎縮モデルにおいても、CNOT4ヘテロノックアウトにより筋萎縮が悪化することから、CNOT4が重要な役割を持つことが示唆された。さらに、マウスES細胞を用いたMyoD発現誘導による骨格筋細胞への分化系を確立したため、今後より詳細な解析を進め、骨格筋筋線維の修復・再生過程の分離メカニズムの理解につなげたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マウス筋芽細胞株であるC2C12におけるCNOT4によるユビキチン化が寄与するmRNA翻訳制御を解明することで、骨格筋分化過程を制御する分子メカニズムの一端が明らかになった。また、マウス個体のサルコペニアモデルにおいてもCNOT4は重要な役割を持つことから、ヒトのサルコペニアをはじめとした筋関連疾患の発症機構の理解等、医学分野への波及効果が期待できる。この成果は筋分化の基礎原理の理解のみならず、将来的には筋関連疾患の予防・治療法の確立につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that CNOT4-dependent ubiquitination of translation repressors 4E-BP1 and 4E-T is important for efficient translation during skeletal muscle differentiation in the mouse myoblast cell line C2C12. In mouse model of muscular atrophy, muscle atrophy was exacerbated in CNOT4 hetero knockout mice. This result suggests that CNOT4 has an important role in muscle atrophy. Furthermore, we have established a differentiation system for skeletal muscle cells by induction of MyoD expression using mouse ES cells. We will analyze more detailed molecular mechanisms of skeletal muscle repair and regeneration processes using these systems.

研究分野：分子生物学

キーワード：CNOT4 ユビキチン化 翻訳制御 骨格筋 筋分化

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋筋線維の修復・再生過程は、運動機能のみならず個体の発生や生存に必須のプロセスである。しかしながら、骨格筋修復・再生時における各素過程の分子基盤は未だ明らかではない。CCR4-NOT 複合体は、mRNA の合成、翻訳及び分解に至る広範な遺伝子発現制御に寄与し、酵母からヒトまで広く保存されている。哺乳類において、CNOT4 は翻訳開始因子 eIF4E または RNA ヘリケース DDX6 との結合を介して翻訳抑制に機能する 4E-T (4E-Transporter) と結合することも報告されている。しかしながら、CNOT4 が mRNA 翻訳制御機構において機能するかどうかは明らかになっていない。これまでの研究から、CNOT4 ユビキチン転移酵素活性欠質変異により、筋分化に関与する遺伝子群の翻訳レベルが低下すること、CNOT4 ノックアウト株で多核の筋線維へ分化・融合が阻害されることを明らかにした。これらの結果から、遺伝子発現制御因子 CCR4-NOT 複合体の構成因子、ユビキチン転移酵素 CNOT4 が mRNA 翻訳制御を介して、骨格筋修復・再生に機能する可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

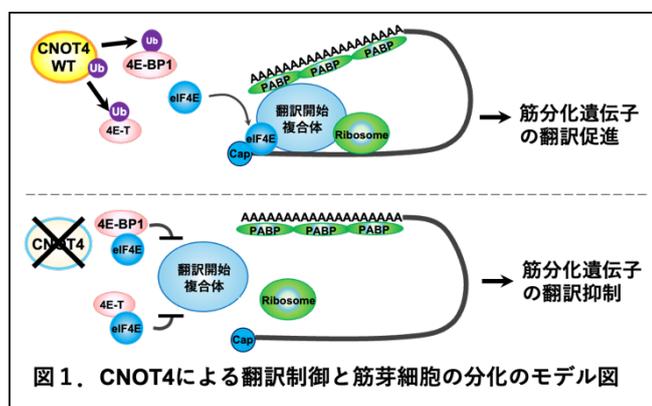
本研究では、骨格筋の修復・再生に CNOT4 による翻訳制御因子のユビキチン化を介した mRNA 翻訳制御機構が寄与するのか明らかにする。骨格筋の再生・修復過程における CNOT4 のユビキチン化標的因子とそれらによる翻訳制御機構の全体像を明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

CNOT4 のユビキチン化標的タンパク質の同定を行うため、マウス筋芽細胞株 C2C12 の野生型株および CNOT4 ノックアウト株において、内在性のユビキチン化タンパク質の pull-down を行い、標的候補因子のユビキチン化状態を解析した。候補タンパク質ユビキチン化レベルが低く C2C12 での検出が難しかったため、トランスフェクション効率の高い HEK293T 細胞に CNOT4 野生型とユビキチン転移酵素活性欠質変異体を過剰発現させ、翻訳制御因子のユビキチン化を検出した。また、幹細胞から筋分化への分子機構の理解につなげるため、マウス ES 細胞における MyoD の発現誘導による骨格筋細胞への分化系の構築を行った。個体レベルでの CNOT4 の骨格筋修復・再生における役割を明らかにするため、野生型及び CNOT4 ヘテロノックアウトマウスを用いた解析を行う。マウス下肢固定による筋萎縮時に筋重量および筋横断面積 (CSA) 遺伝子の発現変化の解析を行う。

### 4. 研究成果

マウス筋芽細胞 C2C12 の野生型及び CNOT4 ノックアウト株を用いて、C2C12 細胞の分化誘導時におけるユビキチン化タンパク質検出系の確立を行った。内在性のユビキチン化タンパク質の pull-down が可能である人工タンパク質を用いて解析を進めたが、発現レベルが低い内在のタンパク質については、そのユビキチン化は検出できなかった。そのため、トランスフェクション効率が高い HEK293T 細胞を用いて翻訳関連因子の CNOT4 ユビキチン転移酵素活性依存的なユビキチン化状態の解析を行い、翻訳開始抑制因



の CNOT4 ユビキチン転移酵素活性依存的なユビキチン化状態の解析を行い、翻訳開始抑制因

子である 4E-BP1 や 4E-T が CNOT4 依存的にユビキチン化されていることを明らかにした (図 1)。さらに、筋分化の過程での CNOT4 の挙動とユビキチン化標的タンパク質を詳細に解析するため、マウス ES 細胞を用いた MyoD 発現誘導による骨格筋細胞への分化系を確立した。

野生型と CNOT4 へテロノックアウトマウスを用いて、下肢固定による筋萎縮に CNOT4 がどのように寄与するのか明らかにするため解析を行った。その結果、CNOT へテロノックアウトでの有意な筋重量の低下と筋横断面積 (CSA) の減少がみられた。さらに、筋萎縮時に特異的な遺伝子の発現上昇を RT-qPCR で確認された。本研究では、翻訳開始抑制因子である 4E-BP1 や 4E-T が CNOT4 依存的にユビキチン化されることにより、筋分化に必要な遺伝子が効率的に翻訳されることで、筋分化が誘導されることを明らかにした。また、マウス個体でも CNOT4 が筋萎縮時において重要な役割を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------