

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11677

研究課題名(和文) 運動による転写制御の分子機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional molecular mechanism induced by exercise

研究代表者

榊原 伊織 (Sakakibara, Iori)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50734662

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)：運動により誘導されるシグナルを網羅的に解析するために、運動時の骨格筋の核抽出タンパク質におけるリン酸化プロテオミクス解析を行なった。その結果、リン酸化シグナルを受けるタンパク質としてエピゲノム修飾酵素Phf2を同定した。PHF2の機能を解明するために、Phf2遺伝子の欠損したC2C12細胞に電気刺激装置(EPS)を用いたin vitroの運動モデルを用いて、遺伝子発現に与える変化を解析したところ、PHF2が運動による骨格筋の遅筋化を制御するエピゲノム修飾酵素であることが示唆された。続いて、Phf2の生理機能を解明するために、骨格筋特異的なPhf2欠損マウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会の現在、全身の筋力低下(サルコペニア)は重要課題である。運動はサルコペニアの予防作用を有しており、運動の骨格筋への作用機構を分子レベルで解明することは新しいサルコペニアの予防・治療薬の開発につながるため、非常に有意義である。運動は骨格筋の遺伝子発現を変化させるが、運動刺激を骨格筋の遺伝子の発現変化へと変換する分子機構には不明な点が多い。そこで、本研究では、運動による転写制御の分子機構を解明するために研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the transcriptional mechanism induced by exercise, we performed phosphoproteomic analysis of nuclear extracted proteins from skeletal muscle during exercise. As a result, we identified the epigenome modification enzyme Phf2 as a protein that receives phosphorylation signals. In order to elucidate the function of PHF2, we analyzed changes in gene expression using an in vitro exercise model using an electrical stimulator (EPS) in C2C12 cells lacking the Phf2 gene. It was suggested that this enzyme is an epigenome modification enzyme that controls muscle slow type fiber specification. Next, to elucidate the physiological function of Phf2, we generated skeletal muscle-specific Phf2-deficient mice.

研究分野：骨格筋

キーワード：骨格筋 運動 エピゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化多死社会を迎えている現在、高齢者の健康、自立をいかに保っていくかは現代社会の重要な課題である。加齢に伴いさまざまな機能が低下するが、その中でも骨格筋の萎縮は顕著である。加齢による骨格筋量の減少によって、全身の筋力低下(サルコペニア)が起こり、進行すると歩行や立ち座りなどの日常生活に障害を来す(ロコモティブシンドローム)。さらに進行すると要介護や寝たきりになるリスクが高くなることから、サルコペニアの予防・治療は緊急課題である。運動は、メタボリックシンドロームへの予防・治療作用があるだけでなく、サルコペニアの予防作用も有しているため、運動の骨格筋への作用機構を分子レベルで解明することは非常に有意義である。骨格筋は可塑性を有しており、継続的な運動により骨格筋の量や質すなわち遅筋(赤筋)と速筋(白筋)といった骨格筋のファイバタイプを変化させる。運動の骨格筋への作用の分子メカニズムとしては、タンパク質合成を制御する mTOR 系の研究が多くおこなわれているが、運動の刺激は遺伝子発現も変化させるため、運動刺激を骨格筋の核内に伝え、遺伝子の発現変化へと変換する分子機構が存在することが示唆されるが、その分子機構には不明な点が多く、運動刺激による骨格筋の転写制御の研究はまだ緒についたばかりである。

遺伝子発現は、転写因子が核内で標的遺伝子のプロモーター、もしくは、エンハンサーに結合することで制御するが、転写因子による遺伝子発現制御はエピゲノムによっても影響を受ける。エピゲノムには、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化やメチル化などの多種多様な修飾(エピゲノム修飾)があり、遺伝子の発現パターンを規定するための基盤を形成する。外的環境からの刺激によってゲノムに付加されるエピゲノム修飾は比較的安定に保たれ細胞の記憶を形成する(Bintu et al., *Science*, 2016)。運動による転写制御には、1回の運動による一過性の転写誘導と継続的な運動による持続する転写誘導に分けることができる。一過性の転写誘導には転写因子がより重要であると考えられ、継続的な運動トレーニングによって引き起こされた骨格筋の形質変化は、トレーニングをやめてもしばらくは維持されることから、エピゲノムによる制御機構の関与が考えられる。本申請の問いは、「運動による転写制御はどのような転写因子とエピゲノム修飾酵素によって担われるか」ということである。

### 2. 研究の目的

運動は全身的な作用があり、内分泌系、神経系、エネルギー代謝を変化させるため、運動時の骨格筋には、運動神経の発火によるカルシウムシグナル、交感神経系のアドレナリンシグナル、副腎皮質からグルココルチコイド作用、細胞内 AMP/ATP の増加による AMPK の活性化などが起こる。これらのシグナルが転写因子の核内移行や翻訳後修飾を起こし、転写を制御すると考えられる。エピゲノムについても、DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化を触媒するエピゲノム修飾酵素により制御されるため、運動によりエピゲノム修飾酵素の核内移行、および、翻訳後修飾が起こることが示唆される。そこで、本申請の目的は運動時の骨格筋において活性化される転写因子とエピゲノム修飾酵素を同定し、その生理機能を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 運動時の骨格筋核画分におけるプロテオミクス解析

トレッドミル運動後のマウスから骨格筋を採取し、核を単離した上で、定量プロテオミクス解析、ならびにリン酸化プロテオミクス解析を行う。すでに *Pgc1a* などの既知の運動誘導性遺伝子の発現を誘導するトレッドミルの運動条件の検討は終わっており、骨格筋からの核画分の単離方法も確立し、プロテオミクスの予備データを得ている。この中から転写因子 *Zfp292*、および、エピゲノム修飾酵素 *Kdm1a* を運動誘導性転写制御因子の候補とする。

## (2) 運動誘導性転写制御遺伝子のスクリーニング

上記 1 で得られた *Zfp292*、および、*Kdm1a* が運動誘導性転写制御を行うかどうかを検証するために、Crispr/Cas9、もしくは、siRNA、shRNA を用いて、マウス骨格筋にエレクトロポレーションにより導入し、候補遺伝子をノックアウト、もしくは、ノックダウンした上で、一過性、および、継続的な運動依存性転写誘導が起こるかどうかを解析する。一過性の運動依存性遺伝子としては、*Pgc1a*、*Irf2*などを指標にし、これらの遺伝子の発現誘導を解析する。継続的な運動依存性遺伝子としては、遅筋タイプの Myosin heavy chain 遺伝子、および、ミトコンドリアの好気呼吸に関連する遺伝子を指標にする。申請者はエレクトロポレーションを用いたマウス骨格筋への遺伝子導入法には習熟しており、siRNA、プラスミド DNA の骨格筋への導入実験条件は確立されている。

## (3) 電気刺激装置を用いた in vitro 運動系の確立

運動の研究を進めるためには in vitro での実験系が有効である。筋管形成した C2C12 細胞に培養液中で電気刺激を与えることが可能なので、運動を模倣した電気刺激パターンと、運動で起こる内分泌的变化を組み合わせて、in vivo で起こる遺伝子発現誘導を in vitro でも再現できる実験条件を確立する。申請者は筋管形成した C2C12 細胞に電気刺激を与える装置を保有しており、電気刺激を与える実験系を確立している。

## (4) 運動誘導性転写制御遺伝子上流シグナル解析

運動時の骨格筋には、運動神経の発火によるカルシウムシグナル、交感神経系のアドレナリンシグナル、副腎皮質からのグルココルチコイド作用、細胞内 AMP/ATP の増加による AMPK の活性化などが起こる。アドレナリンの拮抗薬・作動薬、AMPK の阻害剤・活性化薬、Calcineurin の阻害剤・活性化薬などを用いて、*Zfp292*、および、*Kdm1a* を活性化するシグナルを同定する。上記 3 で確立された in vitro 実験系も活用した上で、in vivo で投与可能な薬剤については、マウスへ投与した上で、トレッドミル運動を行う。

## (5) 運動応答性配列の同定

同定した *Zfp292*、および、*Kdm1a* が結合するゲノム上の領域を決定するために、ChIP-seq 解析を行うことで、運動応答性配列を同定する。同定した運動応答性配列はルシフェラーゼアッセイにより転写能を確認する。運動応答性配列ルシフェラーゼを発現するレンチウイルス、もしくは、レトロウイルスを作製し、C2C12 細胞株へ導入し、運動を評価できる細胞株を作製する。上記の上流シグナルの解析が完了していない場合、作製した細胞株を用いて上流シグナルのスクリーニングにも使用する。

## 4. 研究成果

運動により誘導されるシグナルを網羅的に解析するために、運動時の骨格筋の核抽出タンパク質におけるリン酸化プロテオミクス解析を行なった。その結果、多くの候補タンパク質を同定したが、リン酸化シグナルを受けるタンパク質として *Zfp292*、*Kdm1a* よりもエピゲノム修飾酵素 Phf2 (PHD Finger Protein 2) が機能的に重要であることが示唆されたため、PHF2 に着目して研究を行った。PHF2 はヒストン 3 の 9 番目のリジン残基のメチル基 (H3K9me2) を外す活性を持つエピゲノム修飾酵素であり、H3K9me2 は遺伝子の転写を抑制するエピゲノム修飾であるため、PHF2 は遺伝子の活性化に関わると予想される。PHF2 の機能を解明するために、Phf2 遺伝子の欠損した C2C12 細胞に電気刺激装置 (EPS) を用いた in vitro の運動モデルを用いて、遺伝子発現に与える変化を解析したところ、EPS を用いると、野生型の C2C12 細胞では *Myh2* の遺伝子発現が誘導されたが、Phf2 KO C2C12 細胞では EPS による *Myh2* 遺伝子の発現上昇が起こらないことが明らかとなった。これらの結果から、PHF2 が運動による骨格筋の遅筋化を制御するエピゲノ

ム修飾酵素であることが示唆された。続いて、Phf2の生理機能を解明するために、骨格筋特異的なPhf2欠損マウスを作出した。まずはPhf2のin vitroの研究成果をPLOS ONE誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukushima Taku, Takata Miho, Kato Ayano, Uchida Takayuki, Nikawa Takeshi, Sakakibara Iori	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome Analyses of In Vitro Exercise Models by Clenbuterol Supplementation or Electrical Pulse Stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 10436 ~ 10436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app112110436	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 Fukushima Taku, Hasegawa Yuka, Kuse Sachi, Fujioka Taiju, Nikawa Takeshi, Masubuchi Satoru, Sakakibara Iori	4. 巻 19
2. 論文標題 PHF2 regulates sarcomeric gene transcription in myogenesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0301690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0301690	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榊原伊織
2. 発表標題 運動によるエピゲノム制御機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榊原伊織
2. 発表標題 運動によるエピゲノム制御機構の解明
3. 学会等名 日本筋学会
4. 発表年 2021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
---------	---------