

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23680065

研究課題名(和文) 骨格筋サイズを制御する遅筋または速筋特有のエピジェネティクス検索

研究課題名(英文) Identification of type-specific epigenetics in skeletal muscles

## 研究代表者

河野 史倫 (Kawano, Fuminori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90346156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：速筋において転写の多い遺伝子座では、転写開始点付近において上述の活性型ヒストン修飾が顕著に認められたが、遅筋では遺伝子の転写量とヒストン修飾には関係が認められなかった。過負荷した足底筋では、遅筋特異的な遺伝子の発現が有意に亢進したが、これらの遺伝子座では活性型ヒストン修飾量は逆に減少する傾向であった。更に、神経切除やバルプロ酸の投与によるエピゲノムへの影響は、速筋では顕著であったが、遅筋では程度が弱いことも明らかになった。以上から、筋活動による遺伝子転写は活性型ヒストン修飾を伴わないことが明らかとなった。遅筋では転写活性化されている遺伝子座へのアクセスが制限されているためであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide analysis using a ChIP-seq revealed that transcriptionally active histone marks, H3K4me3 and acetylation of H3, were less mapped at the genes activated specially in slow soleus, whereas the transcription of fast muscle-specific genes was associated with these active histone marks in fast plantaris in rats. We also found that the epigenome of plantaris was susceptible to the physiological and pharmacological stimuli, but that of soleus was resistive. For instance, silencing of muscle activity by denervation caused the displacement of acetylated histone and Pol II in 5' ends of genes in plantaris, but minor effects were seen in soleus. Increased recruitment of Pol II induced by forced acetylation of histone was also suppressed in valproic acid-treated soleus. These observations indicate that slow skeletal muscle has a unique characteristic in the histone modifications, which may relate to the preservation of the genetic backbone against physiological stimuli.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 骨格筋 遅筋と速筋 筋活動

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は遅筋と速筋に大別される。遅筋は持久性に富み強固な構造を保有する遅筋線維で主に構成されており、深層部に多く分布し、重力に抗して骨格を支持するために持続的に活動することが知られている。持久性運動能力を要求されるスポーツ種目や生活習慣病の予防やその改善策として用いられる運動において、遅筋特性を保有する筋の代謝能やサイズがパフォーマンスや運動効果を左右することは近年では一般的な認識である。一方で、速筋は表層部に多く分布し断続的な骨格の動きをサポートする。怪我や疾病等により床上生活を余儀なくされた場合、筋活動レベルの低下に伴い筋萎縮が誘発されるが、その程度は速筋に比べ遅筋において顕著である。また、活動パターンや活動頻度は遅筋と速筋で大きく異なるものの、生後発育に伴う筋線維肥大は同等に引き起こされることも我々の過去の研究結果から明らかである。以上の事象から、遅筋と速筋がそれぞれ固有の筋サイズ調節機構を保有していると考えられる。

骨格筋のサイズ調節機構に関しては、タンパク質合成および分解系の研究が国内・国外問わず数多くなされてきた。Akt/mTOR を介したタンパク質合成系のシグナルは骨格筋萎縮時には減衰し、肥大時には活性化される。逆に、萎縮時には分解系の活性化が引き起こされ、ミオシン重鎖等の筋タンパク質が特異的にユビキチン化を受けプロテアソームで分解されることも分かっている。Atrogin-1 や MuRF-1 といったユビキチンリガーゼの発現が筋萎縮時に高まることも報告されている。一方、遅筋線維においては、AMP やカルシウム依存的シグナルが、その分化やミトコンドリアバイオジェネシスに深く関与していることも明らかにされている。しかしながら、AMP によって活性化されるキナーゼ (AMPK) やカルシニューリンは Akt/mTOR 系シグナルを抑制することも分かっており、現在の見解では遅筋線維がその特性を維持しながら肥大する機構には矛盾が生じている。そこで、筋タイプ特有のエピジェネティクスが存在し、遺伝子制御機構全体に影響を与えているという仮説を立て、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

DNA は、ヒストンの 8 量体に巻き付き、ヌクレオソームを形成する。ヒストン修飾は、このような遺伝子の構造に影響を与え、遺伝子の転写を強く制御することが知られている。本研究では、ラットの足底筋 (速筋) とヒラメ筋 (遅筋) において、正常な状態でどのようなヒストン修飾の違いがあり、どのように転写制御に影響するのか検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 実験モデル

成熟ウイスターハノーバー雄ラットを用いて、以下の実験を実施した。

実験 1: 未処置の正常ラットから足底筋とヒラメ筋をサンプリングした。

実験 2: 足底筋に過負荷を与えるために、協働筋であるヒラメ筋と腓腹筋の遠位腱を麻酔下において切除し、28 日間飼育した。

実験 3: 臀部において坐骨神経を切除し、後肢筋を不活動にした。28 日後に足底筋、ヒラメ筋をサンプリングした。

実験 4: ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるバルプロ酸を、毎日腹腔内に投与し、薬理的にヒストンアセチル化を誘導した。7 日後に足底筋、ヒラメ筋をサンプリングした。

### ヒストン修飾解析

ホモジナイズした筋サンプルの沈殿物をパラホルムアルデヒドで固定し、超音波処理によりクロマチンを抽出した。これらのクロマチンサンプルに対し、アセチル化ヒストンまたは H3K4me3 抗体を用いた免疫沈降を行い、DNA を精製した。ChIP-seq 解析では、精製した DNA を次世代シーケンサーで解析し、リード情報を取得、ゲノムにマッピングした。ChIP-qPCR 解析では、速筋または遅筋に特異的な遺伝子座の転写開始点付近におけるヒストン修飾分布を定量した。

### 遺伝子発現解析

正常筋から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施した。その結果に基づき、速筋または遅筋特異的な遺伝子を選定し、各実験モデルから得られたサンプルにおいて、Taqman probe を用いた発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### 実験 1:

成熟ラットの足底筋とヒラメ筋における活性型ヒストン修飾（アセチル化ヒストン、H3K4me3）の分布を、ChIP-seq によりゲノムワイドに解析した。速筋においては、遺伝子転写が活性化されている遺伝子座の転写開始点付近において、これらの活性型ヒストン修飾が顕著に認められた。しかし、ヒラメ筋ゲノムでは、遺伝子発現と活性型ヒストン修飾の分布には関係が認められなかった。

##### 実験 2:

協働筋腱切除による過負荷は、筋活動量を増大させることが知られている。過負荷を与えた足底筋では、遅筋特異的遺伝子の発現が有意に増大し、速筋特異的遺伝子の発現は減少する傾向にあった。この時、H3K4me3 の分布には変化がなかったものの、アセチル化ヒストンの分布は、速筋・遅筋特異的遺伝子座のどちらにおいても減少する傾向が見られた。したがって、ヒラメ筋に見られる活性型ヒストン修飾を伴わない遺伝子転写制御は、筋活動量の増大によるものである可能性が示唆された。

##### 実験 3:

神経切断による神経接続の除去は、骨格筋において HDAC 活性を低下させ、筋タンパク質のアセチル化を誘導することが知られている。本研究で用いた神経切除モデルにおいても、アセチル化ヒストンの発現量は顕著に増加したものの、ChIP-qPCR 解析の結果、ヌクレオソームを形成しているアセチル化ヒストンは劇的に減少したことが分かった。また、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の動員量も有意に減少した。このような現象は、速筋である足底筋で特に顕著であったが、ヒラメ筋では神経切断による影響は認められなかった。

##### 実験 4:

神経切断による骨格筋への影響は、ヒストンのアセチル化のみならず、不活動の影響も考えられるため、バルプロ酸投与による薬理的なヒストンアセチル化の影響を検討した。バルプロ酸を投与した場合、足底筋・ヒラメ筋ともにアセチル化ヒストンの発現量が増大した。速筋または遅筋特異的な遺伝子座においても、アセチル化ヒストンの分布が有意

に増加した。それに伴い、Pol II の動員量も増加し、アセチル化ヒストン分布の変化と Pol II 動員量の変化には有意な正の相関が認められた。このような変化は、足底筋・ヒラメ筋の両筋で認められたが、足底筋に比べヒラメ筋では影響の程度が弱かった。

以上の実験結果をまとめると、速筋は遺伝子の転写活性に伴い活性型のヒストン修飾が付加されるが、遅筋では転写が活性化されていても活性型ヒストン修飾が付加されないことが分かった。このような違いは、筋活動量の違いに起因する可能性が高く、その結果、遅筋では転写活性化されている遺伝子座へのヒストン修飾関連因子のアクセスが制限されているためであると考えられる。したがって、速筋の遺伝子転写活性は非常に強く、遅筋では弱いことが示唆された。本研究全体を通じて、速筋と遅筋では異なるエピジェネティクスを発生しており、遺伝子転写制御全体が異なる可能性があることが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 13 件)

1. 河野史倫。抗重力筋が引き起こす特殊なエピゲノム変化。第 92 回日本生理学会(神戸国際会議場、兵庫県), 2015.
2. 河野史倫、小野悠介、藤田諒、長谷川俊介、中田研、大平充宣、中井直也。胎児筋核の喪失が骨格筋のエピゲノムおよび遺伝子制御に及ぼす影響。第 3 回骨格筋生物学研究会(東北大学、宮城県), 2015.
3. 河野史倫、二村圭祐、中井直也、中田研、大平充宣。筋タイプ特有のヒストン修飾とその役割。第 69 回日本体力医学会(長崎大学、長崎県), 2014.
4. Kawano F, Nimura K, Nakai N, Ohira Y, and Nakata K. Different epigenetic properties in the gene transcription of fast and slow skeletal muscles. 35th Annual International Society for Gravitational Physiology meeting (Waterloo, Canada),

- 2014.
5. 河野史倫。骨格筋に引き起こされるエピゲノム変化と筋特性の保持メカニズム。第 91 回日本生理学会(鹿児島大学、鹿児島県), 2014.
  6. 河野史倫。骨格筋特性の発生におけるヒストンアセチル化の役割。第 2 回骨格筋生物学研究会(北海道医療大学、北海道)
  7. 河野史倫、大平充宣。抗重力筋特性の保持におけるヒストンアセチル化の役割。第 59 回日本宇宙航空環境医学会(川崎医療福祉大学、岡山県), 2013.
  8. 河野史倫、中井直也、大平充宣。ヒラメ筋のヒストン修飾および遺伝子転写における神経切断に伴う不活動の影響。第 68 回日本体力医学会(日本教育会館、東京都), 2013.
  9. Kawano F, Nakai N, and Ohira Y. Muscle activity/inactivity modulates histone acetylation and gene transcription. 34th Annual International Society for Gravitational Physiology meeting (Toyohashi, Japan), 2013.
  10. 河野史倫。筋活動によって発生するエピジェネティクスの検索。第 1 回骨格筋生物学研究会(中之島センター、大阪府), 2013.
  11. 河野史倫、大平充宣。抗重力筋に引き起こされるエピジェネティクスの検索。第 58 回日本宇宙航空環境医学会(豊橋商工会議所、愛知県), 2012.
  12. 河野史倫、芝口翼、中井直也、大平充宣。肥大中の骨格筋における HSP25 のリン酸化動態および分子挙動の変化。第 67 回日本体力医学会(長良川国際会議場、岐阜県), 2012.
  13. Kawano F, Shibaguchi T, ohira T, Nakai N, and Ohira Y. Differential responses of soleus and plantaris muscle fibers to overloading. 33th Annual International Society for Gravitational Physiology meeting (Aberdeen, UK), 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 河野史倫(大阪大学・医学系研究科)  
 研究者番号：90346156

(2)研究分担者  
 なし

(3)連携研究者  
 なし