

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06029

研究課題名（和文）オプトジェネティクス酸化ストレス誘導法による筋萎縮メカニズムの解明と治療薬探索

研究課題名（英文）Elucidation of muscular atrophy mechanism by optogenetics oxidative stress induction method and search for therapeutic agents

研究代表者

佐藤 文規（Sato, Fuminori）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：10588263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋における酸化ストレスが筋萎縮に繋がる過程および機構を解析することが本研究の目的であり、個体を用い複雑系を維持した状態で、骨格筋におけるミトコンドリア障害（ROS産生過多）が骨格筋にどのような影響を与えるかを調べ、そのことによって引き起こされる筋萎縮過程を解析することが必須である。

ゼブラフィッシュ個体を用いて上記の実験系の確立を試みたが、骨格筋のミトコンドリア特異的に光照射誘導よりROSを産生するタンパク質を発現するゼブラフィッシュ系統を樹立することができなかった。研究遂行のためには、発現制御をより厳密に操作可能な発現制御システムを導入し、再度ゼブラフィッシュ系統を樹立する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスによる骨格筋萎縮を生体内のミトコンドリア特異的なROS産生誘導により解析した研究はこれまでほとんどなく、さらにROS産生の誘導方法として光照射を用い、実験対象動物としてゼブラフィッシュを用いたものはない。

新たな骨格筋萎縮機構の解明に貢献するだけでなく、高効率な治療薬スクリーニングなどへの流用も可能である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to analyze the process and mechanism by which oxidative stress in skeletal muscle leads to muscular atrophy. Therefore, it is essential to investigate how mitochondrial disorders (overproduction of ROS) in skeletal muscle affect skeletal muscle while maintaining a complex system using Individual organism, and analyze the muscular atrophy process caused.

An attempt was made to establish the above experimental system using zebrafish, but it was not possible to establish a transgenic zebrafish line that expresses a protein that produces ROS by light irradiation in skeletal muscle mitochondria. In order to carry out the research, it is necessary to introduce an expression control system that can control expression control more strictly and to establish a transgenic zebrafish strain again.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 骨格筋 筋萎縮 酸化ストレス ミトコンドリア オプトジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

細胞小器官であるミトコンドリア内では常に ATP 産生に伴い ROS が発生している。通常はスカベンジャーによって速やかに除去されるが、様々な条件下で ROS の産生過多が誘導され、細胞傷害を引き起こす。

骨格筋においてはその動力源となる ATP の消費量が多く、ATP の安定的な供給は骨格筋の機能的発達・維持にとって必須である。そのためミトコンドリアの機能不全は ROS の産生過多を誘導し、それに起因する細胞障害は筋萎縮という形で表面化する。ROS 産生過多に対しては酸化ストレスに対する初期の応答反応に引き続き骨格筋萎縮が誘導されると考えられているが、この過程に関しては不明な点が多く残されている。その結果、ROS を起因とする筋萎縮に対しては ROS そのものを除去することによる予防が主流となっており、筋萎縮の直接的な原因の解明や、それらを対象とした予防法・治療法の開発は進んでいない。

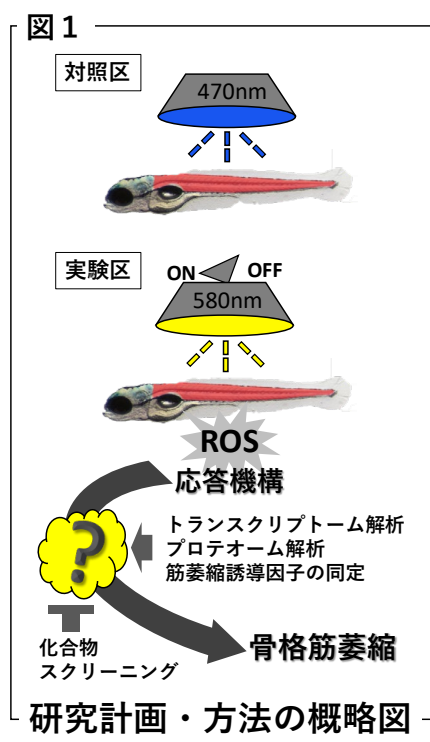
### 2. 研究の目的

ミトコンドリアで発生する ROS を起因とする筋萎縮に対して予防法・治療法の開発が進展しない要因として、骨格筋は多様な間質細胞・細胞外基質に加えて、収縮制御を担う運動神経・感覚神経や血管系で構成され、運動器としての機能単位である腱および骨など、様々な組織（細胞種）が隣接し、さらには運動（メカニカルストレス）や代謝が大きく関与する複雑系であることが考えられる。これらのことから、個体を用い複雑系を維持した状態で、骨格筋におけるミトコンドリア障害（ROS 産生過多）が骨格筋にどのような影響を与えるかを調べ、そのことによって引き起こされる筋萎縮過程を解析することが新規の予防法・治療法の開発必要不可欠である。

そこでヒトやマウスと同様な骨格筋組織を有し、モデル生物として個体レベルの解析に有用な小型水棲生物であるゼブラフィッシュを用いて、骨格筋のミトコンドリア特異的に ROS の産生過多を誘導し、筋萎縮過程の詳細を解析することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

ゼブラフィッシュは発生初期からしばらくの間（3週間程度）は体の透明度が高い点、また色素欠損系統に関しては成熟後も体の透明度が高い点を生かした、光による ROS 産生誘導の方法が最適と考え、その作製を試みた。励起光照射（580nm）により高い ROS 産生能力を持つミトコンドリア局在型 mitoSuperNova 蛍光タンパク質と様々な組織・細胞に特異的に発現させるのに有効な Gal4-UAS システムを組み合わせた、光誘導型の組織特異的ミトコンドリア ROS 産生トランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、さらに多数の個体へ励起光を照射するための超高輝度 LED 照明を作製した。この光誘導型の骨格筋特異的ミトコンドリア ROS 産生トランスジェニックゼブラフィッシュと骨格筋可視化トランスジェニックゼブラフィッシュ（骨格筋を膜局在型 GFP で標識しており、共焦点顕微鏡により容易に筋径測定が可能）の掛け合わせによって得られる個体を用いて、骨格筋ミトコンドリア特異的かつ持続的な ROS 産生過多が骨格筋の発生・発達・維持・萎縮に及ぼす影響の詳細を明らかにする。具体的には（図 1）、ROS の直接的な影響を調べるために運動量や給餌量などには特に変化が生じないように循環水槽により通常条件下で飼育し、実験区には 580nm（対照区は 470nm）の LED 照明を照射する。応答機構から筋萎縮までの過程を詳細に調べるために経時的なサンプリングを実施し、筋径の測定、骨格筋トランスクリプトーム解析および骨



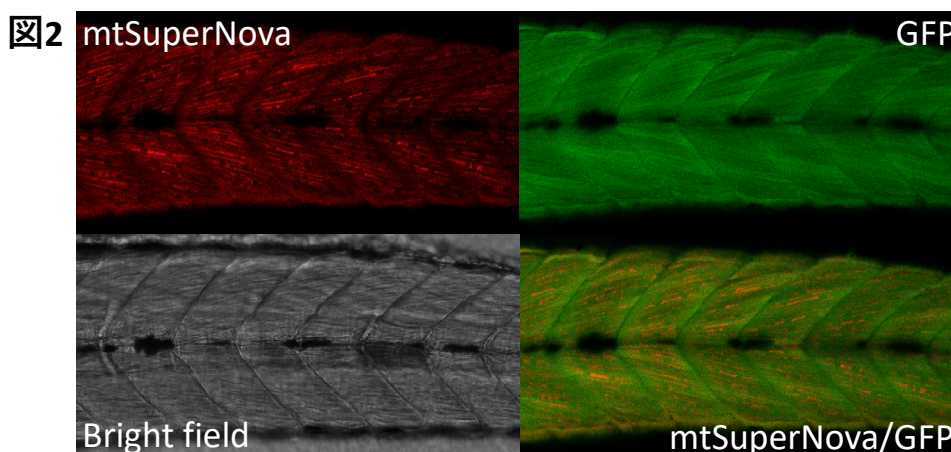
骨格筋トランスクリプトーム解析および骨

骨筋プロテオーム解析を実施する。これらの結果と既に得られている様々な骨格筋萎縮条件下の骨格筋トランスクリプトーム解析の結果を比較・検討することによって ROS 産生による筋萎縮誘導過程の解明を試みる。

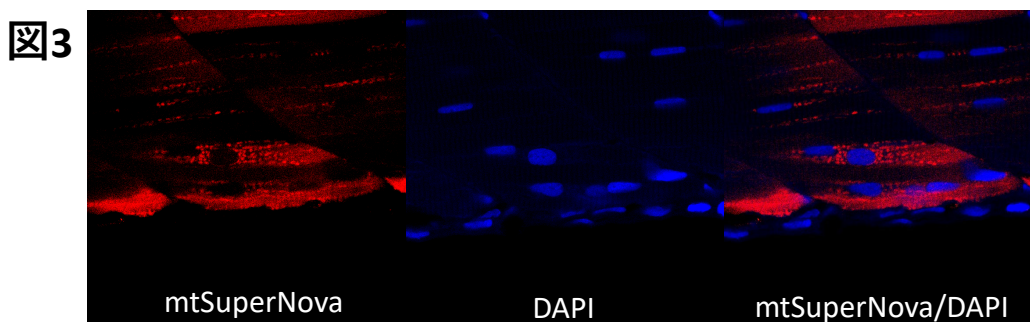
#### 4. 研究成果

(1) 骨格筋特異的にミトコンドリア局在型 SuperNova を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの作製

骨格筋特異的にミトコンドリア局在型 SuperNova の発現を誘導するために Gal4-UAS システムを用いた。Gal4 を骨格筋特異的に発現する Gene/Enhancer Trap 系統をライブラリー検索により選択した。これと UAS:MitoSuperNova トランスジェニックゼブラフィッシュを掛け合わせることで骨格筋特異的にミトコンドリア局在型 SuperNova を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。(図2)

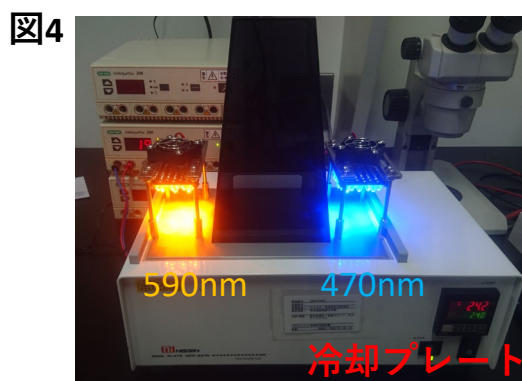


核染色 (DAPI) により確認したところ、細胞質内にミトコンドリアと同様の特徴的な形態を示す SuperNova の蛍光が確認され。(図3)



(2) 多数の個体へ励起光を照射するための超高輝度 LED 照明を作製

高輝度 LED を用いてゼブラフィッシュ個体を対象とした SuperNova 励起用の照明を作製した。長時間の照射により水温の上昇が認められたが、冷却プレートを使用することにより水温上昇を抑制することが確認できた。(図4) また、大型の循環型水槽を使用することにより同様に水温上昇を招くことなく、長時間の励起光照射が可能であることが確認された。



(3) 系統樹立過程 (継代) における SuperNova 発現量の減少

(1) (2)の結果より実験条件が確定したことから、UAS:MitoSuperNove トランスジェニックゼブラフィッシュ系統樹立（バッククロスによるコンジェニック化）に向けた継代を進めたところ MitoSuperNove の著しい発現量の減少が確認され、十分な ROS 産生を誘導できないレベルまで発現量が低下してしまった。これは励起光照射がない状態においても MitoSuperNove が何かしらの細胞障害を引き起こしていることや、Gal4-UAS による発現が骨格筋以外においても誘導されていることなど様々な原因が考えられるが特定することは非常に困難である。

以上のことから、今後本研究に使用可能な骨格筋特異的にミトコンドリア局在型 SuperNova を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製するには、Gal4-UAS システムによる骨格筋特異的な発現制御だけではなく、遺伝学的（Cre-loxP など）および誘導的（Tet-On など）な発現制御により導入遺伝子の発現そのものを ON/OFF する操作を可能とするシステムを組み入れる必要があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hori Shimpei, Hiramuki Yosuke, Nishimura Daigo, Sato Fuminori, Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 33
2. 論文標題 PDH mediated metabolic flow is critical for skeletal muscle stem cell differentiation and myotube formation during regeneration in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8094 ~ 8109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802479R	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 Arai Hiroyuki N., Sato Fuminori, Yamamoto Takuya, Woltjen Knut, Kiyonari Hiroshi, Yoshimoto Yuki, Shukunami Chisa, Akiyama Haruhiko, Kist Ralf, Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 29
2. 論文標題 Metalloprotease-Dependent Attenuation of BMP Signaling Restricts Cardiac Neural Crest Cell Fate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 603 ~ 616.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.019	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 Kuriki Mao, Sato Fuminori, Arai Hiroyuki N., Sogabe Maina, Kaneko Mari, Kiyonari Hiroshi, Kawakami Koichi, Yoshimoto Yuki, Shukunami Chisa, Sehara-Fujisawa Atsuko	4. 巻 147
2. 論文標題 Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.186239	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 Furukawa Satoshi, Chatani Masahiro, Higashitani Atsushi, Higashibata Akira, Kawano Fuminori, Nikawa Takeshi, Numaga-Tomita Takuro, Ogura Toshihiko, Sato Fuminori, Sehara-Fujisawa Atsuko, Shinohara Masahiro, Shimazu Toru, Takahashi Satoru, Watanabe-Takano Haruko	4. 巻 7
2. 論文標題 Findings from recent studies by the Japan Aerospace Exploration Agency examining musculoskeletal atrophy in space and on Earth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-021-00145-9	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤文規, Choi Minyong, 王梓, 今村聖実, 堀内映美, 呉泉, 藤田生水, 内田智子, 加藤充康, 谷垣文章, 東端晃, 村谷匡史, 小林純也, 高橋昭久, 菅野純夫, 松崎文雄, 鈴木穰, 川上浩一, 瀬原淳子
2. 発表標題 人工重力発生装置を用いたゼブラフィッシュ宇宙滞在実験
3. 学会等名 宇宙生物科学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤文規, Choi Minyong, 王梓, 今村聖実, 堀内映美, 呉泉, 藤田生水, 内田智子, 加藤充康, 谷垣文章, 東端晃, 村谷匡史, 小林純也, 高橋昭久, 菅野純夫, 松崎文雄, 鈴木穰, 川上浩一, 瀬原淳子
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ宇宙滞在実験から微小重力の骨格筋への影響とそのメカニズムを探る
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuminori Sato, Minyong Choi, Zi Wang, Kiyomi Imamura, Terumi Horiuchi, Wu Quan, Ikumi Fujita, Satoko Uchida, Mitsuyasu Kato, Fumiaki Tanigaki, Akira Higashibata, Masafumi Muratani, Junya Kobayashi, Akihisa Takahashi, Sumio Sugano, Fumio Matsuzaki, Yutaka Suzuki, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa
2. 発表標題 Study on gravity-dependent skeletal muscle maintenance mechanisms using Zebrafish, aquatic organisms
3. 学会等名 2018 ASCB   EMBO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	瀬原 淳子  (Sehara Atsuko)  (60209038)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・連携教授    (14301)	

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
---------	---------