

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12668

研究課題名(和文)骨格筋から分泌される全く新規なマイオカインの発見

研究課題名(英文)Hunting of novel myokines by RNAseq

研究代表者

藤井 宣晴 (Fujii, Nobuharu L)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40509296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト大腿より筋生検で得られた骨格筋からmRNAを抽出し、次世代シーケンスを用いて、遺伝子転写産物を網羅的に同定した。その結果を既知のヒト・ゲノムと比較し、新規転写産物を選別した。アミノ酸情報を得て、分泌様タンパク質の構造をもつ分子を探索した結果、全く未知の分子が3つ同定された。そのうちの1つにターゲットを絞り特異的抗体の作製を試みたが、上手く働かなかったため、この分子のHAタグ付き発現ベクターを作製し、培養骨格筋細胞に発現させた。培養上清を濃縮しHA抗体でウェスタンブロットティングを行ったところ特異的バンドが得られたため、この分子は全く新規のマイオカインであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Messenger RNA obtained from human skeletal muscle tissue was provided to Next Generation Sequence (RNAseq) to identify gene transcripts exhaustively. The transcripts were compared to human genome information to seek transcripts that had not reported yet. Then, secretion protein-like molecules were estimated from amino acid sequence of the transcripts. Finally, we found 3 secretion protein-like molecules expressed in skeletal muscle. One of the 3 was focused in the subsequent study. Unfortunately we did not achieve success to make a specific antibody for the molecule. Therefore HA-tagged expression vector of the molecule was generated and expressed in cultured skeletal muscle cells. The expressed protein was detected in conditioned culture medium by Western blotting used HA-antibody. These results suggest that the molecule is a novel myokine secured from skeletal muscle.

研究分野：代謝内分泌科学 運動分子生物学

キーワード：骨格筋 RNAseq マイオカイン

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト・ゲノム計画終了後は基本的に新規の遺伝子が発見されることは無いと考えられてきた。しかし次世代シーケンス解析の発展もあり、読み残した遺伝子や、組織特異的なスプライシング・ヴァリアントの探索の余地ができてきた。

### 2. 研究の目的

これまでに見逃されていた全く新規のマイオカインの発見に挑む。

### 3. 研究の方法

#### (1), 骨格筋の RNAseq

ヒトも外側広筋からニードル・バイオプシーにて骨格筋サンプルを得た。筋サンプルは採取後速やかに液体窒素で冷凍した。冷凍筋サンプルをホモジナイズし mRNA を回収した。クオリティーの高いものを 3 サンプル選出し、次世代シーケンス (RNAseq) に供した。次世代シーケンスはタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターに委託した。得られたシーケンス情報をヒト・ゲノムと比較し、これまでに報告の無い転写産物を同定した。

#### (2), バイオインフォマティクス解析

上記で得られた新規転写物の中からタンパク質をコードしている物を選ぶための解析プログラムを作成した。塩基配列の読み枠を 1 個ずらした計 3 つの読み枠でアミノ酸に変換し、明らかな cording sequence を持つ物、すなわち明確な Kozak 配列があり、かつ 24 アミノ酸に以上のタンパク質に変換される物を選出した。さらに、開始コドンの上流に同じ読み枠で終止コドンが確認できるものを優先的に選出した。得られた転写産物の中から既知の物を除外し、残ったものを未知の転写産物と定義した。

定義されたものの中から、分泌タンパク質を予測するプログラムを作成した。シグナルペプチドを有し、細胞膜貫通領域が無く、核・ミトコンドリア等の細胞内小器官への移行シグナルを持たない分子を選出させた。

#### (3), 新規マイオカインの存在の確認

mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの発現を確認した。

### 4. 研究成果

(1), RNAseq の結果、リード数は 2 億 6 千から 3 億 6 千の範囲にあった。全サンプルの transfig の和集合に対して cuffcompare を用いて基地遺伝子との対応付けを行ったところ、未知の転写産物と思われるケースが 7 千あった。また、新規アイソフォームの可能性がある物が 11680 得られた。

(2), 上記の新規転写産物をバイオインフォマティクス解析に供したところ、分泌タンパク質と予測された分子が 3 つあった。

(3), 3 つの候補タンパク質のうち、予測確度の最も高いと考えられた 1 つに集中して以後

の研究を進めた。新規分泌タンパク質の存在を証明するために、特異的抗体の作成をおこなったが、上手く作用するものは得られなかった。PCR 法でそのタンパク質をコードする cDNA が確認できたため、全長の cDNA をクローニングした。その cDNA の N-末端あるいは C-末端に HA タグを付加した発現ベクターを作成し、培養骨格筋細胞 C2C12 に発現させた。培養上清を回収・濃縮し、ウェスタン・ブロッティングに供したところ、HA 抗体にて予測されるサイズにバンドが確認された。これらの結果は、今回発見した新規転写産物が、新規マイオカインであることを示唆する。

### 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 9 件)

① Kitamura K, Takamura Y, Iwamoto T, Nomura M, Iwasaki H, Ohdera M, Murakoshi M, Sugiyama K, Matsuyama K, Manabe Y, Fujii NL, Fushiki T: Dammarane-type triterpene extracts of *Panax notoginseng* root ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity by enhancing glucose uptake in skeletal muscle, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017 in press. (査読有)

② Inagaki A, Maruo K, Furuichi Y, Miyatake S, Tamura K, Fujii NL, Manabe Y: An improved glucose transport assay system for isolated mouse skeletal muscle tissues, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017 in press. (査読有)

③ Inada A, Inada O, Fujii NL, Nagafuchi S, Katsuta H, Yasunami Y, Matsubara T, Arai H, Fukatsu A, Nabeshima Y: Adjusting the 17β-Estradiol-to-Androgen Ratio Ameliorates Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 27(10):3035-3050, 2016 (査読有)

④ Inada A, Fujii NL, Inada O, Higaki

Y, Furuichi Y, Nabeshima YI. Effects of 17 $\beta$ -Estradiol and Androgen on Glucose Metabolism in Skeletal Muscle.

Endocrinology. 157: 4691-4705. 2016.

⑤Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: Evaluation of an in vitro muscle contraction model in mouse primary cultured myotubes. Anal

Biochem, 497: 36-38, 2016. (査読有)

⑥Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: Evaluation of an in vitro muscle contraction model in mouse primary cultured myotubes. Anal Biochem, 497: 36-38, 2015. (査読有)

⑦Yu H, Fujii NL, Toyoda T, An D, Farese RV, Leitges M, Hirshman MF, Mul JD, Goodyear LJ: Contraction stimulates muscle glucose uptake independent of atypical PKC. Physiol Rep, 3: e12565, 2015. (査読有)

⑧Goto-Inoue N, Tamura K, Motai F, Ito M, Miyata K, Manabe Y, Fujii NL: A fragmented form of annexin A1 is secreted from C2C12 myotubes by electric pulse-induced contraction. Mol Cell Biochem, 411: 173-180, 2015. (査読有)

⑨Shoji E, Sakurai H, Nishino T, Nakahata T, Heike T, Awaya T, Fujii NL, Manabe Y, Matsuo M, Sehara-Fujisawa A: Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. Sci Rep, 5: 12831, 2015. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

①眞鍋康子: マイオカインは運動模倣薬となるか?. 日本薬学会第 137 年会 (シンポジウム招待講演), 2017 年 3 月 27 日, 仙台.

②藤井宣晴: 骨格筋から健康が生まれる仕組み. 第 8 回 区東部・区東北部ブロック学術集会 (特別講演). 2016 年 3 月 6 日, 東京.

③藤井宣晴: 骨格筋の新機能 - 糖輸送調節とマイオカイン分泌 -. 第 30 回循環・代謝セミナー. 北海道大学病院内科, 2016 年 3 月 4 日, 東京.

④藤井宣晴: 運動を科学するとは. 九州大学リサーチコアチーム 身体活動・座位行動の科学日本 (基調講演), 2016 年 2 月 11 日, 東京.

⑤藤井宣晴: 筋萎縮および筋肥大研究のための骨格筋培養細胞モデルの創出. 日本分子生物学会 (ワークショップ・招聘講演), 2015 年 12 月 2 日, 神戸.

⑥藤井宣晴: 骨格筋・リターンズ. 平成 27 年度国公立大学病院医療技術関係職員研修 (招聘講演), 2015 年 10 月 21 日, 東京

⑦古市泰郎, 眞鍋康子, 高木麻由美, 青木美穂, 藤井宣晴: IL-6 は筋収縮のカルシウム放出をトリガーとして分泌促進される. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015 年 9 月 18 日, 和歌山.

⑧Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: An in vitro contraction model in mouse primary cultured myotubes using satellite cells originated from EDL and soleus. 2<sup>nd</sup> Congress, International Academy of Sportology, 2015 年 9 月 12 日,

東京.

⑨眞鍋康子: 骨格筋から分泌されるホルモン (マイオカイン) の探索. 日本体育学会第 66 回大会 (シンポジウム), 2015 年 8 月 25 日, 東京.

⑩古市泰郎: 急性収縮によってマイオカインが分泌調節されることの証明. 日本体育学会第 66 回大会 (シンポジウム), 2015 年 8 月 25 日, 東京.

⑪古市泰郎, 眞鍋康子, 増田和実, 藤井宣晴: 筋収縮はカルニチンの取り込みとアセチル化を促進させる. 第 23 回日本運動生理学会大会, 2015 年 7 月 25 日, 東京.

⑫藤井宣晴: Secretion of Myokines Regulated by Contraction in C2C12 Myotubes. 第 48 回日本動脈硬化学会 (シンポジウム招待講演), 2015 年 7 月 14 日, 東京.

⑬眞鍋康子, 荻野慎也, 高木麻由美, 井上 (後藤) 菜穂子, 山田美緒, 小野悠介, 古市泰郎, 藤井宣晴: 骨格筋初代培養細胞と C2C12 細胞株の細胞特性の検証. 第 67 回日本細胞生物学会, 2015 年 6 月 30 日, 東京.

⑭藤井宣晴: 筋収縮に応じたマイオカイン分泌の証明. — バイオマーカーとしての可能性 —. 第 5 回 TOBIRA 研究交流フォーラム (主催者講演), 2015 年 5 月 23 日, 東京.

⑮藤井宣晴: 糖代謝調節に関わる筋収縮調節性マイオカインの探索ストラテジー. 日本糖尿病学会 (シンポジウム), 2015 年 5 月 22 日, 下関.

⑯Manabe Y, Inagaki A, Maruo K, Tamura K, Furuichi Y, Fujii NL: Development of a new in vitro skeletal muscle contraction system. 12th Asian Congress of Nutrition,

2015 年 5 月 15 日, 横浜.

[図書] (計 5 件)

①藤井宣晴: 6 章-1 運動生理学から身体不活動の生理・分子生物学へ. エビデンスに基づく身体活動の科学 (熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴 編集), 杏林書院, in Press.

②眞鍋康子, 古市泰郎: 7 章-1 身体運動に伴う生体機能適応を支える分子機構. エビデンスに基づく身体活動の科学 (熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴 編集), 杏林書院, in Press.

③Fujii NL: Overview. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 127-137, 2016.

④Manabe Y: Mechanism of skeletal muscle contraction: Intracellular signaling in skeletal muscle contraction. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 139-153, 2016.

⑤Furuichi Y: Mechanism of skeletal muscle contraction: Role of mechanical muscle contraction in glucose homeostasis. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 155-169, 2016.

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 宣晴 (NOBUHARU L FUJII)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授  
研究者番号: 40509296