

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12669

研究課題名(和文) 骨格筋の機能的性質を決定する分子機序としてのDNAメチル化制御の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of skeletal muscle function via DNA methylation-mediated gene expression change

研究代表者

亀井 康富 (Kamei, Yasutomi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70300829

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、骨格筋の性質の決定に遺伝子配列の変化を伴わないDNAメチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与する可能性の検証を目指した。PGC1 の過剰発現により骨格筋の顕著な赤筋化が生ずる。マイクロアレイによる網羅的発現解析の結果、TCA回路、酸化リン酸化、脂肪酸代謝、BCAA代謝などがPGC1 によって制御されることが判明した。メチル化シトシン抗体による免疫沈降と、独自に設計したプロモーターアレイを組み合わせ、網羅的解析手法を確立した。PGC1 過剰発現により一群の遺伝子プロモーターのメチル化変化が観察された。これは赤筋化によるDNAメチル化変化を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the involvement of epigenetic regulation (DNA methylation) in the determination of the constitution and metabolism of skeletal muscles. The overexpression of a transcriptional regulator PGC1a in skeletal muscles, typically observed following a long period of time-exercise, causes red fiber formation. Microarray analysis of the change in gene expression showed that PGC1a regulates the TCA cycle, oxidative phosphorylation, and fatty acid and branched-chain amino acid metabolism. We established a genome-wide DNA methylation analysis based on the combination of immunoprecipitation by a methyl-cytosine antibody and detection using a promoter genome array, which we originally designed. PGC1a overexpression in the skeletal muscle showed DNA methylation-mediated change in multiple gene promoters, possibly caused by red fiber formation.

研究分野：分子栄養学

キーワード：エピジェネティクス 骨格筋 DNAメチル化 サテライト細胞

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化はゲノム DNA の後天的な修飾であり、エピジェネティクス制御の代表的な機序である。遺伝子プロモーターの DNA メチル化により一般的に遺伝子発現の低下が観察される。研究代表者は以前、マウス新生仔の肝臓では、高脂肪組成である母乳の摂取に伴い、核内受容体 PPAR の標的遺伝子である酸化に関する一群の遺伝子の DNA メチル化が低下し、遺伝子発現が増加し、脂質利用が活発になることを見出した。すなわち、食事の変動に対する適応に核内受容体と DNA メチル化が機能することを報告した。PPAR にはアイソフォームが存在し、骨格筋においては PPAR が高発現し、その活性化によりミトコンドリアの増加と赤筋化が生ずることが報告されている (Cell Metab 4:407,2006)。PPAR を含む核内受容体は転写共役因子 PPAR co-activator 1 (PGC1) によって活性化され、PGC1 の発現によって赤筋化が生じる。単発の運動により PGC1 と PPAR 遺伝子の DNA メチル化のわずかな低下が報告されている (Cell Metab 15:405,2012)。また転写因子 Forkheadbox O1 (FOXO1) の過剰発現により、筋萎縮が生じると共に赤筋の遺伝子発現が減少する。研究代表者は、長期の運動継続によって生じる代謝適応に PGC1 や FOXO1 と DNA メチル化が関与するのではないかと予想した。一方、筋細胞および筋サテライト細胞 (筋再生に重要な幹細胞) の分化には DNA メチル化の関与が古くから示唆されている。このように骨格筋および筋サテライト細胞において DNA メチル化が変動し、骨格筋量や骨格筋機能に関与する可能性があるが、詳細は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

継続的な運動により骨格筋ではミトコンドリア量の増加・赤筋化が生じ、エネルギー代謝が活発になる。赤筋化には核内受容体の関与が報告されている。一方、加齢や寝たきりなどにより筋萎縮が生じ、同時に筋形成能が低下する。この分子メカニズムの詳細は不明である。このように、中長期的な環境変化に適応して、骨格筋の機能的性質 (「体質」) が決定される。本研究では、この骨格筋の「体質」の決定に遺伝子配列の変化を伴わない DNA メチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与する可能性の検証を目指した。具体的には、核内受容体および転写共役因子 PGC1 によって、継続的な持久運動への適応的に DNA メチル化により遺伝子発現制御される可能性を検証し、その分子機構を明らかにする試みである。また、DNA メチル化酵素の発現変動により、筋再生に重要な筋サテライト細胞の表現型への影響を解析し、その生理的・病態生理的意義を解明

するものである。

3. 研究の方法

1) PGC1 や FOXO1 の遺伝子改変マウスの骨格筋における DNA メチル化の生理的・病態生理的な変動を網羅的に解析する。また PGC1 および核内受容体と DNA 脱メチル化因子の相互作用を検討する。さらに 2) 筋サテライト細胞を用いて、筋障害時の筋再生の機序を解析し、骨格筋量の減少 (加齢によるサルコペニアなど) における DNA メチル化の病態生理的意義を検討し、DNA メチル化に着目した骨格筋代謝のエピジェネティクス制御を明らかにする。具体的には以下のような項目である。

遺伝子改変マウスの網羅的 DNA メチル化・発現解析

PGC1 過剰発現・KO マウスのマイクロアレイにおいて発現変化している遺伝子のバイオインフォマティクス解析を行う。MIAMI 法等により PGC1 ・FOXO1 遺伝子改変マウスでメチル化減少している遺伝子をリストアップする。

核内受容体を介した DNA 脱メチル化のメカニズム解析

骨格筋代謝で重要な核内受容体である PPAR 等について、DNA 脱メチル化関連因子類 (TDG, Tet, Dnmt など) とタンパク質相互作用するか否かを検討する。核内受容体 GST 融合タンパク質と in vitro 合成 35S ラベル DNA 脱メチル化関連因子類との相互作用を調べる。

老化などによる筋再生低下と Dnmt3a 機能の解析

(野生型マウスで) 筋再生が起きにくくなる場合の原因のひとつに Dnmt3a の機能低下があるのではないかという仮説を検証する。例えば、老化したマウスでは筋再性能が低下することが知られる。老化したマウスの骨格筋から筋サテライト細胞を単離し、筋再生に関連する遺伝子の DNA メチル化および発現を検討する。さらに、筋再生が低下した状態のモデルマウスとして、白筋化を伴う筋萎縮が生じる FOXO1 過剰発現マウスの骨格筋より筋サテライト細胞を単離し表現型と Dnmt3a および筋再生関連遺伝子の発現を検討する。

4. 研究成果

過剰発現マウスにおけるマイクロアレイ解析に関して (PGC1):

転写共役因子 PGC1 は、骨格筋等において運動により発現増加し、ミトコンドリアの合成・筋線維タイプの変化・脂肪酸酸化促進など、エネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化することが知られている。骨

格筋で特異的に PGC1 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (PGC1^{-Tg} マウス) は PGC1 の過剰発現により骨格筋の顕著な赤筋化が生じ、持久運動能力が向上する。本研究では、このマウスの表現型を説明する遺伝子発現変化を調べるためにマイクロアレイ法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、PGC1^{-Tg} マウスで発現増加した遺伝子についてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acids ; BCAA) 代謝経路、酸化的リン酸化、TCA 回路、脂肪酸代謝といったミトコンドリア機能に関わる経路が検出された。これらの結果から、運動により生じる PGC1 の発現増加は TCA 回路を中心としたエネルギー利用に参与している可能性が示唆された (PLOS ONE 2015)。バイオインフォマティクス解析により、PGC1^{-Tg} マウスの骨格筋において増加した、BCAA 代謝経路の遺伝子に結合しうる転写因子を調べた。その結果、PPAR そして ERR などを含むいくつかの核内受容体が検出された。それらのデータは、PGC1 が様々な核内受容体を介して代謝を亢進していることを示唆している。

PGC1 KO マウスを用いた解析 遺伝子発現変化マウスの網羅的手法による発現変動解析

PGC1 KO マウス骨格筋について、マイクロアレイおよび次世代シーケンサーの網羅的発現解析を行った。PGC1 は転写コアクチベーターであるため、KO で発現減少する遺伝子に着目した。KO で減少した 176 遺伝子がどのような機能をもった遺伝子群か調べるため、パスウェイ解析を行ったところ、TCA 回路、酸化的リン酸化、脂肪酸代謝、BCAA 代謝などが検出された。また我々の以前の研究で PGC1^{-Tg} により BCAA 代謝が活性化すること (PLOS ONE 2014)、TCA 回路が活性化すること (PLOS ONE 2015) を示しているが、KO は Tg と逆向きの表現型を示しており、gain of function だけでなく、loss of function の実験によって、PGC1 の機能が明らかになった。

FOXO1 過剰発現マウスの網羅的メチル化解析

FOXO1 の過剰発現マウスでは赤筋遺伝子の発現低下が観察される。このマウスの骨格筋に関して、CCGG 配列におけるメチル化感受性酵素 HpaII とゲノム DNA マイクロアレイの原理を利用した網羅的な DNA メチル化解析法である MIAMI 法 (Oncogene 25:3059-3064, 2006) を用いて、ゲノムワイドな DNA メチル化変化を解析した。その結果、1.5 倍以上メチル化増加したプローブが 26 個、半分以下に減少したプローブが 40 個検出された。しかし、通常の MIAMI 法の解析では 5 倍以上のメチル化増加、1/5 以下のメチル

化減少が見られるため、顕著な DNA メチル化変化は観察されなかったと判断した。

網羅的 DNA メチル化解析手法の確立

網羅的に DNA メチル化を解析する手法として、CCGG を認識するメチル化感受性酵素を利用した MIAMI 法がある。これに加えて、メチル化シトシン抗体による免疫沈降と、独自に設計したプロモーターアレイを組み合わせ、遺伝子のプロモーター部分のメチル化変化を網羅的に解析する手法を今回確立することができた。PGC1 過剰発現マウスと野生型コントロールマウスの骨格筋を比較すると、一群の遺伝子プロモーターのメチル化変化が観察された。これは赤筋化による DNA メチル化変化を示唆するものである。今後、これらの具体的な解析を進めることにより、持久的運動によるエピジェネティクス変化の全貌が明らかになることが期待される。

筋サテライト細胞における Dnmt3a の解析

老化などによる筋再生低下と Dnmt3a 機能の解析を試みた。そこで、老化したマウス (26 ヶ月令) の骨格筋から筋サテライト細胞を単離し、初代培養を行い、遺伝子発現を検討した。しかしながら、DNA メチル化酵素の発現変動は見られなかった。これはおそらく、培養を行うことによって細胞の性質が変化したのではないかと考えている。また、PGC1 の過剰発現マウスなどにおいても筋サテライト細胞の遺伝子発現を検討したが、筋サテライト細胞を初代培養することでトランスジーンが発現が見られなくなり、解析ができなかった。筋線維に付着した状態の筋サテライト細胞を解析する系の確立が必要であることが判明した。

FOXO1 過剰発現マウスの筋サテライト細胞の解析

骨格筋は人体の中で、最も優れた再生能力を有する組織の一つである。この再生を可能にしているのが骨格筋幹細胞の筋サテライト細胞である。筋分化と DNA メチル化制御は古くからその関連が示唆されている。本研究では、筋萎縮時に発現増加する FOXO1 が筋再生遅延の原因ではないかと考え、筋芽細胞と遺伝子発現マウスを用いて筋再生遅延における FOXO1 の寄与について調べた。その結果、C2C12 (FOXO1-3A-ER) 筋芽細胞の TAM 処理群で p57 及び Gadd45 の mRNA レベルが増加し、増殖能の低下が見られた。ゆえに、FOXO1 の活性化によって筋芽細胞の増殖が抑制されることが示された。次に不活動モデルとして FOXO1-Tg マウス及び野生型 (WT) マウスで筋損傷を誘導したところ、Tg マウスで筋重量、筋断面積の再生遅延が見られた。このことから、FOXO1 は骨格筋の再生を阻害している可能性が示唆された。C2C12 とマウス筋損傷実験の結果から、FOXO1 による筋芽細胞の増殖抑制が不活動時における骨

格筋再生遅延の原因のひとつである可能性が示唆されたFOXO1はGadd45の遺伝子発現を増加させることを見出しているが、Gadd45はDNA脱メチル化に関与するという報告があり、この関与を明らかにすることは今後の検討課題である。

核内受容体を介したDNA脱メチル化のメカニズム解析

骨格筋代謝で重要な核内受容体であるPPARと、DNA脱メチル化関連因子類(TDG, Tet, Dnmtなど)とタンパク質相互作用するか否かを検討した。PPARとGST融合タンパク質を大腸菌を用いてリコンビナントを作成した。また核内受容体の転写共役因子SRC1や、DNA脱メチル化関連因子類(TDG, Tet)やDNAメチル化酵素Dnmt3a, Dnmt3aをin vitroで合成し35Sラベルした。それらの相互作用を検討したところ、PPARとTDGの相互作用が観察された。またPPARとDnmt3aの相互作用も観察された。これらの結果は、核内受容体とDNAメチル化・脱メチル化関連因子類が複合体を形成して作用することを示唆している。さらなる詳細な分子機序の解明が必要である。

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 8 件)

1. T. Ishikawa, Y. Kitaura, Y. Kadota, Y. Morishita, M. Ota, F. Yamanaka, M. Xu, M. Ikawa, N. Inoue, F. Kawano, N. Nakai, T. Murakami, S. Miura, Y. Hatazawa, Y. Kamei, Y. Shimomura. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. **Scientific Reports** 7:39825, 2017 (査読有)
2. Y. Hatazawa, K. Minami, R. Yoshimura, T. Onishi, M.C. Manio, K. Inoue, N. Sawada, O. Suzuki, S. Miura, Y. Kamei*. Deletion of the transcriptional coactivator PGC1 α in skeletal muscles is associated with reduced expression of genes related to oxidative muscle function. **Biochem Biophys Res Commun** 481: 251-258, 2016 (*Corresponding Author) (査読有)
3. A. Yamashita, Y. Hatazawa, Y. Hirose, Y. Ono, Y. Kamei*. FOXO1 delays skeletal muscle regeneration and suppresses myoblast proliferation. **Biosci Biotechnol Biochem.**, 80:1531-5, 2016 (*Corresponding Author) (査読有)
4. S. Morita, K. Nakabayashi, T. Kawai,

K. Hayashi, T. Horii, M. Kimura, Y. Kamei, Y. Ogawa, K. Hata, I. Hatada. Gene expression profiling of white adipose tissue reveals paternal transmission of proneness to obesity. **Scientific Reports** 6:21693, 2016 (査読有)

5. R. Yoshimura, K. Minami, J. Matsuda, N. Sawada, S. Miura, Y. Kamei*. Phosphorylation of 4EBP by oral leucine administration was suppressed in the skeletal muscle of PGC-1 α knockout mice. **Biosci Biotechnol Biochem.** 80:288-90, 2016 (*Corresponding Author) (査読有)

6. Y. Hatazawa, N. Senoo, M. Tadaishi, Y. Ogawa, O. Ezaki, Y. Kamei*, S. Miura. Metabolomic Analysis of the Skeletal Muscle of Mice Overexpressing PGC-1 α . **PLoS One.** 10:e0129084, 2015. (*Corresponding author) (査読有)

7. N. Senoo, N. Miyoshi, N. Goto-Inoue, K. Minami, R. Yoshimura, A. Morita, N. Sawada, J. Matsuda, Y. Ogawa, M. Setou, Y. Kamei*, S. Miura*. PGC-1 α -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. **J Lipid Res.** 56:2286-96, 2015 (*Corresponding author) (査読有)

8. T. Ehara, Y. Kamei, X. Yuan, M. Takahashi, S. Kanai, K. Tsujimoto, T. Tamiya, Y. Nakagawa, H. Shimano, T. Takai-Igarashi, I. Hatada, T. Suganami, K. Hashimoto, Y. Ogawa. Ligand-activated PPAR α -dependent DNA demethylation regulates the fatty acid β -oxidation genes in the postnatal liver. **Diabetes** 64:775-84, 2015 (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. 亀井康富 農芸化学分野におけるエピジェネティクス研究 DNAメチル化による遺伝子発現調節を介した代謝制御 2017年3月17日~20日 京都女子大学(京都府京都市)
2. 亀井康富 骨格筋における核内受容体・転写共役因子と生活習慣病 第24回日本ステロイドホルモン学会 シンポジウム 2016年12月3日 ホルトホール大分(大分県大分市)
3. 亀井康富、三浦進司、小川佳宏 骨格筋機能と肥満改善における転写制御因子の役割 第37回日本肥満学会 シンポジウム 2016年10月7日~8日 東京ファッショントウン(東京都江東区)
4. 亀井康富、三浦進司 ロコモーティ

ブシンドロームと栄養：骨格筋機能における
アミノ酸代謝の役割と分子機序 第70回
日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム
2016年5月13日～15日 武庫川女子大学(兵
庫県西宮市)

5. 亀井康富 大豆イソフラボンによる
胎生期・新生仔期マウスの脂質代謝遺伝子の
エピジェネティクス制御 2016年度日本農芸
化学会大会 シンポジウム 2016年3月27日
～30日 札幌コンベンションセンター(北海
道札幌市)

6. Yasutomi Kamei, Shinji Miura,
Yoshihiro Ogawa Molecular mechanism of
gene expression in skeletal muscle function and
amino acid metabolism 12TH Asian Congress of
Nutrition 14-18 May 2015, パシフィコ横浜(神
奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nutrition.life.kpu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀井康富 (KAMEI, Yasutomi)

京都府立大学大学院 生命環境科学研究
科・教授

研究者番号：70300829