

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16501

研究課題名(和文) 転写共役因子Vgll2を介した新規遅筋化制御機構の基礎的解析

研究課題名(英文) the basic analysis of molecular mechanisms of novel fast-to-slow fiber type switching involved in transcriptional cofactor Vgll2.

研究代表者

本多 賢彦 (Honda, Masahiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：10455545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、転写コファクターVgll2が運動の刺激によって誘導される骨格筋の適応反応に必須の因子であること、そしてVgll2の活性化は筋活動量の増減に相関することが明らかになった。さらに、Vgll2の上流にはカルシニューリンシグナルが介在し、TEAD依存的転写活性化に寄与することも明らかとなった。Vgll2とNFATc1との相互作用も明らかになり、Vgll2による骨格筋機能調節が、先行研究で予想されたものよりも多岐にわたることも予想される。従って、本研究で示唆された新規の遅筋化機能調節機構は、運動模倣薬開発など臨床応用にも発展し得る可能性を秘めているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that transcriptional cofactor Vgll2 plays essential role in skeletal muscle remodeling induced by chronic functional overload (OVL). We observed wild type plantaris muscles exhibit slower muscle phenotype after 6-week OVL, while fiber type composition in Vgll2 knock-out (KO) plantaris was not affected. Moreover, Vgll2 protein is increased by OVL and decreased by denervation, suggesting Vgll2 protein levels correlated with muscle usage. We also found calcineurin signaling activates TEAD-dependent transcriptional activity via the nuclear transportation of Vgll2 in myogenic cell line C2C12. Unexpectedly, we found Vgll2 interacts with NFATc1 in OVL plantaris muscles in addition to well-known partner transcription factors like TEAD1 and MEF2c. Taken together, our results suggest Vgll2 is more multi-functional than previously thought. Therefore, molecular mechanisms involved in Vgll2 can be novel therapeutic target to improve skeletal muscle function.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：骨格筋 遅筋化 転写コファクター 運動刺激

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋はヒトの体重の40%を占める体内最大の臓器である。骨格筋を構成する筋線維は遅筋線維と速筋線維とに分類されるが、遅筋線維はミトコンドリアを豊富に含み、糖や脂質から効率的にATP産生を行うのに対し、速筋線維はミトコンドリア含有量が少なくATP産生効率が低い。骨格筋内の筋線維タイプの混在比は筋代謝の規定を通じて全身の代謝環境調節にも大きな役割を果たしている。骨格筋には外部環境への適応を行う可塑性が備わっており、筋線維タイプ混在比も筋使用量に応じて変動する。習慣的な運動による筋使用量の増加は、遅筋線維比率の増加（遅筋化）のほか、ミトコンドリア生成、エネルギー消費の亢進、インスリン感受性の増強などの効果をもたらす。このことから運動は、栄養の過剰摂取により生じる脂肪の過剰蓄積（肥満）や、二型糖尿病や脂質代謝異常などに代表される生活習慣病、さらには循環器疾患の最も基本的かつ効果的な治療および予防の方法となっている。

近年、運動の効果を模倣する薬剤の開発を行い、肥満の改善を目指す研究も盛んに行われており、その際、AMP感受性キナーゼ（AMPK）や核内受容体型転写因子PPARなど遅筋化の制御に関わる因子が分子標的とされている。しかしながら、実用化された薬剤は未だなく、さらなる標的分子の発掘や副作用を避けるための作用機序の解明などが必要とされている。

そのような状況の中、転写因子TEAD1が、運動に伴う遅筋化に関与していることが報告された。TEAD1単体では転写を活性化しないことは知られていたが、遅筋化制御に必須となる共役因子は不明であったため、我々は

既知のTEAD1共役因子の一つで骨格筋特異的に発現するVgll2に着目し、遺伝子欠損（以下、Vgll2 KO）マウスを独自に作出して解析を行ったところ、Vgll2 KOマウスの平常時の筋線維タイプ混在比は速筋化していることが判明した。このことから、このマウスにおいて運動に対する遅筋化適応が障害されていることを予想し、これを検討することで新規の遅筋化調節機構を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、習慣的な運動に伴う遅筋化に転写コファクターであるVgll2が関与し、さらに遺伝子発現から機能発現までのどの時点で修飾を受けてそれを制御するのかを明らかにすることである。まず、Vgll2 KOマウスに習慣的な運動を課し、遅筋化の度合いを対照群と比較する。次いで、運動によって刺激された骨格筋において、Vgll2やパートナーである転写因子がどのような細胞内動態を示すのかを検討する。さらに、運動刺激を薬剤に置き換えてVgll2の活性化を試みる。以上をもって、新規の遅筋化制御機構の解明とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 協働筋切除

マウスに習慣的に運動を行わせる方法として、協働筋切除による機能的過負荷を採用した。10週齢マウスに麻酔下で、両脚から腓腹筋およびヒラメ筋の完全切除を行ない、足底筋のみを残した。この後、6週間飼育を行い回復後の骨格筋を解析することとした。

### (2) 遅筋化の評価

協働筋切除より6週間後、対照群も含めて足底筋を採集し、遅筋特異的な遺伝子の発現解

析を qRT-PCR によって行った。そのほか、ミオシン重鎖アイソフォームに対するモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングや多重免疫染色を行い、遅筋化の度合いを評価した。

### (3) Vgll2 - 転写因子複合体の検出

Vgll2 との結合が予測される転写因子について、運動刺激の増加に伴う Vgll2 - 転写因子間の結合が変化するかを検討する目的で、Duolink PLA 法によって複合体形成を検出し非切除群との間で比較を行った。

### (4) Vgll2 活性化メカニズムの探索

運動刺激を薬剤で模倣する目的で、培養筋芽細胞 C2C12 の分化誘導時にカルシウムイオノフォアを作用させて、免疫染色による Vgll2 の細胞内局在を検討した。さらに、カルシニューリン阻害剤である FK506 を投与してカルシウムイオノフォアの効果を阻害できるか検討した。また、上記の培養条件の下で Vgll2 依存的な転写活性が変化するかを検討するためにルシフェラーゼアッセイを行った。リポータープラスミドには、ヒト MYH7 のプロモーター内の TEAD 結合領域直下にホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した MYH7 - Luc および、その変異体を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 運動刺激による骨格筋適応における Vgll2 の機能解析

協働筋切除から 6 週間後、骨格筋を採取したところ、野生型、KO マウスともに足底筋は肥大し、また赤みを増していた。筋重量の比較を行ったところ、ジェノタイプに関わらず約 2 倍程度に重量が増していた。筋線維数

の増加もジェノタイプに関わらず観察され、同程度の本数が認められた。運動刺激の有無で筋線維断面積の分布を比較したところ、野生型マウスでは運動によって断面積の大きい筋線維の比率が増加していたのに対し、Vgll2 KO マウスでは運動の有無によって筋線維断面積の分布に目立った変化は無く、Vgll2 が筋線維の肥大に関与している可能性が示唆された。次いで、肥大を制御する mTORC1 シグナル伝達経路の活性化をリン酸化レベルで観察したところ、Vgll2 KO マウスでのみ、mTORC1 標的タンパク質合成の促進因子である p70 S6K のリン酸化が亢進しており、代償的なシグナルの活性化が示唆された。

Vgll2 KO マウスの筋線維タイプ混在比は平常時において速筋化していることが明らかになっている、そこで、Vgll2 KO マウスについて、運動に対する遅筋化適応にも影響があるか否かを明らかにする目的で、遺伝子発現解析を行った結果、遅筋型ミオシン重鎖アイソフォームである Myh7 の発現量が野生型では対照群の約 25 倍に増加するのに対し、Vgll2 KO マウスでは発現量がほぼ変化せず、遅筋化適応が著しく障害されていることが示唆された。このほか、速筋型ミオシン重鎖アイソフォームの一つである Myh2 や、遅筋型の e-c カップリング関連因子である Tnni1 や SERCA2a の mRNA でも同様の傾向が観察された。他方、速筋型ミオシン重鎖アイソフォーム Myh4 の発現量は野生型、Vgll2 KO マウスともに発現量が低下していた。これらの結果は、ミオシン重鎖アイソフォーム特異的なモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによっても支持された。同様に、モノクローナル抗体を用いて足底筋切片を多重染色したところ、野生型マウスでは協

働筋切除を施したマウスに、切除を行わなかったマウスには見られない I 型線維が現れたのに対し、Vgll2 KO マウスでは協働筋切除を施しても I 型線維は見られなかった。

最後に、酸化的代謝に関連する因子についても検討を行った。遺伝子発現解析の結果、予想に反して、野生型、Vgll2 KO マウスともに酸化的代謝関連遺伝子の発現が、運動刺激によって低下していた。この結果は、協働筋切除の系では酸化的代謝に対する影響を観察するのが困難であることを示している。その中でも、脂質輸送に関連する MCAD や CPT1b、乳酸の取り込みや代謝に関与する MCT1、LDHb、さらにはそれらの上流因子である PGC-1 $\alpha$ 1 などの発現量は、協働筋切除後の野生型マウスと Vgll2 KO マウスの間で発現低下が認められ、Vgll2 の酸化的代謝制御への関与が疑われる。また、AMPK シグナルのリン酸化には野生型、Vgll2 KO マウス間で差は認められなかったが、SDH 染色像には明らかな差があり、協働筋切除後の野生型マウス切片が濃染されるのに対し、Vgll2 KO マウス切片は非常に淡く染色された。この結果も、Vgll2 の酸化的代謝への関与を示唆するものと考えられる。

## (2) 運動刺激による Vgll2 活性化メカニズムの骨格筋組織を用いた解析

これまでの結果は、運動に対する骨格筋の適応反応に Vgll2 が関与していることを示すものであったが、運動時に Vgll2 がいかに修飾を受けて活性化されるのかを明らかにする目的で、まず、Vgll2 転写産物の量を協働筋切除の有無で比較した。その結果、両者には有意な差は認められなかった。一過性の発現上昇の可能性も考え、切除後 48 時間で採取し

た足底筋における発現量の比較も行ったが、有意な差は認められなかった。しかしながら、タンパク質レベルをウエスタンブロッティングで比較したところ、協働筋切除によって Vgll2 タンパク質が増加することが明らかとなった。この増加は、免疫沈降による精製を行うことでより鮮明となった。他方、野生型マウスに坐骨神経切除を施し、24 時間後のヒラメ筋における Vgll2 タンパク質の量を、ウエスタンブロッティングを行って比較したところ、対照側と比較して明らかな減少を認めた。これらの結果は、筋活動の増減と Vgll2 タンパク質の量は相関することを示している。

Vgll2 が協働筋切除により増加したことで、転写因子との結合も促進されるのかを Duolink PLA 法で検討を行った。その結果、主要なパートナー転写因子である TEAD1 との結合は協働筋切除後に増加していた。さらに先行研究で結合が示唆されている Mef2C に関しても、結合の増加が認められた。驚いたことに、これまで結合が明らかでなかった NFATc1 との複合体も検出され、協働筋切除後に増加することが判明した。この結果は、Vgll2 が従来予想されたよりも広範な転写因子と相互作用して筋機能調節に関与していることを示唆している。

## (3) 培養細胞を用いた Vgll2 活性化メカニズムの探索

運動の刺激によって Vgll2 が活性化されることが明らかになったので、運動刺激を Vgll2 へと伝達する上流シグナルを明らかにするために、運動刺激を薬剤に置き換えて Vgll2 が活性化するか否か検討を行った。まず培養筋芽細胞 C2C12 を用いて、分化誘導時の Vgll2 の細胞内局在を免疫染色によって検討したところ、予想に反して Vgll2 は細胞質に局在す

ることが判明した。そこで分化誘導時にカルシウムイオノフォアを作用させることで Vgll2 の核移行が促進されるかを検討したところ、A23187 (1  $\mu$ M) を細胞に四日間投与したところ、核移行することが観察された。さらに、カルシウムイオノフォアに対する短期間の応答を観察する目的で三日間無添加の増殖培地で培養したのち、一日だけカルシウムイオノフォア投与を行ったところ、Vgll2 は核内に局在していた。次いで、カルシウムイオノフォアの作用が可逆的なものであるかを検討する目的で、三日間投与の後、無添加の分化培地で一日培養したところ Vgll2 は再び細胞質に局在した。最後に、カルシウムイオノフォアの効果が、カルシニューリン阻害剤である FK506 によって、阻害されるかを検討したところ、A23187 (1  $\mu$ M) に加えて FK506 を 100  $\mu$ M の濃度で投与したところ、Vgll2 は核外へと排出された。この結果を確認するためにルシフェラーゼアッセイを行ったところ、A23187 投与によって上昇した MYH7 Luc 活性は、FK506 添加によって低下することが明らかとなった。これらの結果は、運動による Vgll2 の活性化にはカルシニューリンシグナルが介在していることを示唆している。

カルシウムイオノフォア投与時の Vgll2 依存的な転写活性化に、TEAD ファミリー転写因子が関与するか否かの検討をルシフェラーゼアッセイによって行った。A23187 単独投与時に比べて、Vgll2 を遺伝子導入した際に、MYH7 - Luc 活性は上昇した。さらに TEAD1 を加えたところルシフェラーゼ活性は低下したが、TAED4 導入時には上昇することが判った。リポータープラスミドを MYH7 - Luc から、TEAD 結合配列変異体 (MutpMCAT -

Luc, MutATrich - Luc, MutdMCAT - Luc, MutMAM - Luc) に変えたところ、ルシフェラーゼの活性が著しく低下したことから、Vgll2 による転写活性化が TEAD 依存的であることが示された。

本研究によって、転写コファクター Vgll2 が、運動に対する骨格筋の遅筋化適応に必須の役割を果たすことが明らかになるとともに、従来感がられていたよりも多岐にわたる筋機能調節に関与する可能性が示された。従って、本研究で示唆された新規の遅筋化機能調節機構は、運動模倣薬開発など臨床応用にも発展し得る可能性を秘めているものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) [Honda M](#), Hidaka K, Fukada SI, Sugawa R, Shirai M, Ikawa M, Morisaki T. Vestigial-like 2 contributes to normal muscle fiber type distribution in mice. *Sci Rep*. 2017 Aug 2;7(1):7168. 査読あり  
DOI: 10.1038/s41598-017-07149-0.

(2) Hudoyo AW, Hirase T, Tandelillin A, [Honda M](#), Shirai M, Cheng J, Morisaki H, Morisaki T. Role of AMPD2 in impaired glucose tolerance induced by high fructose diet. *Mol Genet Metab Rep*. 2017 Jul 24;13:23-29. 査読あり  
DOI: 10.1016/j.ymgmr.2017.07.006.  
eCollection 2017 Dec.

[学会発表] (計 4 件)

(1) [本多賢彦](#)、[日高京子](#)、[須川涼](#)、[深田宗一朗](#)、[住江訓明](#)、[森崎隆幸](#)、Vgll2 欠損が胎仔

期骨格筋形成に及ぼす影響、BMB2015、2015年12月1日～4日、神戸ポートアイランド(兵庫)

(2) 本多賢彦、日高京子、深田宗一郎、森崎隆幸、マウスの遅筋表現型制御における Vgll2 の機能解析、第2回日本筋学会学術集会、2016年8月5日～8月6日、国立精神・神経医療研究センター(東京)

(3) 本多賢彦、日高京子、土持裕胤、森崎隆幸、慢性的な機械的過負荷によって生じる骨格筋リモデリングにおける Vgll2 の機能解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日～12月2日、パシフィコ横浜(神奈川)

(4) 本多賢彦、日高京子、土持裕胤、森崎隆幸、慢性的な機械的過負荷に対する骨格筋の適応における Vgll2 の機能解析、ConBio2017、2017年12月6日～9日、神戸ポートアイランド(兵庫)

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/bioscience/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本多 賢彦 (Honda, Masahiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センタ

ー・研究所・研究員

研究者番号： 10455545