

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19066

研究課題名（和文）筋ミトコンドリアダイナミクスを制御するセンサー転写因子の探索と抗老化食品研究

研究課題名（英文）Analysis of sensor proteins which regulates mitochondrial dynamics in skeletal muscle

研究代表者

清水 誠（Shimizu, Makoto）

お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授

研究者番号：40409008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋はミトコンドリアを豊富に含む組織であり、ミトコンドリアダイナミクス（ミトコンドリアの継続的な分裂・融合）は、その恒常性維持に重要であることが知られている。本研究では、骨格筋におけるミトコンドリアダイナミクス制御因子の新たなセンサー転写因子と、これらを制御し得る機能性食品成分の同定を試みた。ミトコンドリアダイナミクスの制御分子であるMFN2（ミトコンドリア融合を制御）の発現をモニター可能なレポーター細胞を構築し、shRNAライブラリーを用いたゲノムワイドなノックダウンスクリーニング実験により、MFN2の発現を制御する候補分子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋のミトコンドリアはエネルギー代謝や骨格筋量において重要であり、ミトコンドリアダイナミクスの制御機構の理解は、骨格筋のみならず身体機能の恒常性維持への貢献が期待される。MFN2をモデル遺伝子としてレポーター細胞とゲノムワイドなノックダウンスクリーニング実験により、MFN2の遺伝子発現を制御する候補因子の同定に成功した。この因子によるミトコンドリアダイナミクスの詳細な制御機構、骨格筋におけるエネルギー代謝や身体機能の解明をさらに進めることにより、骨格筋機能を改善する機能性食品成分の開発や、高齢者の健康寿命延伸に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle is a tissue rich in mitochondria. Mitochondrial dynamics, a continuous fission and fusion of mitochondria, are known to be important for maintaining its homeostasis. In this study, we tried to identify novel transcriptional regulators that regulate expression of mitochondrial dynamics gene in skeletal muscle and functional food components that can potentially control them. Reporter cells capable of monitoring the expression of MFN2, a molecule that controls mitochondrial fusion, were constructed. By the genome-wide knockdown screening using an shRNA library, we successfully identified potential candidate molecules that regulate MFN2 expression.

研究分野：食品科学

キーワード：骨格筋 ミトコンドリア ミトコンドリアダイナミクス 機能性食品成分

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国は超高齢社会であり、高齢者の身体機能をいかに維持し、健康寿命を延伸するかが喫緊の課題である。骨格筋は人体最大の運動器であり、加齢による身体的表現型(筋量・筋力の低下)が見られる主たる臓器である。筋量・筋力の低下が進行すると、運動器機能の低下、QOLの低下、さらには健康寿命の短縮という負の連鎖を招き、医療・介護費の膨大化に繋がる。これらの背景から、骨格筋機能低下の分子機序を理解し、新たな予防もしくは治療法の提案が重要であり、これらに繋がる基礎研究知見の蓄積が重要である。

(2) 骨格筋はミトコンドリアを豊富に含む組織である。ミトコンドリアは細胞内エネルギーの主要な産生オルガネラであり、継続的に融合(fusion)と分裂(fission)を繰り返している。この過程はミトコンドリアダイナミクスと呼ばれ、ミトコンドリアの恒常性維持に重要であることが知られている。すなわち、ミトコンドリアダイナミクスの破綻は細胞内エネルギー代謝の低下に繋がる。ミトコンドリアの融合はMFN1、MFN2、OPA1、分裂はDRP1により制御され、これらが主要なミトコンドリアダイナミクス制御因子であることが知られている。

(3) 加齢に伴う骨格筋萎縮は、筋タンパク質の合成・分解のバランスの破綻により惹起される。筋タンパク質の合成はインスリン・IGF-1経路、萎縮は骨格筋選択的なユビキチンE3リガーゼ(MURF1、Atrogin1)により制御される。一方、加齢に伴い骨格筋のミトコンドリア機能も低下することが知られている。また、ミトコンドリアダイナミクス制御因子の発現も低下する。ミトコンドリアダイナミクス制御因子は、翻訳後修飾による活性制御の知見は多いが、発現制御機構については不明な点が多い。

(4) ノックダウンスクリーニング法は、未知の遺伝子機能を解析するために用いられる手法の一つである。この手法では、各遺伝子に対するshRNA(short hairpin RNA)を発現させることにより、特定の遺伝子の発現を低下させ、その結果として生じる表現型を解析する。本手法を、数千から数万のshRNAを用いて全ゲノムワイドにスクリーニングすることにより、特定の表現型や機能に関連する重要な遺伝子を特定することが可能である。

### 2. 研究の目的

加齢に伴い骨格筋のミトコンドリア機能やミトコンドリアダイナミクス制御因子の発現が低下することが知られている。また、骨格筋特異的なミトコンドリアダイナミクス制御因子(DRP1など)の欠損マウスは骨格筋の萎縮を惹起することが報告されている。このことから、骨格筋におけるミトコンドリアダイナミクスは、エネルギー代謝のみならず、筋量・筋力に重要であることが想定される。一方で、ミトコンドリアダイナミクス制御因子の発現制御機構は不明な点が多い。

本研究では、加齢に伴う骨格筋の機能低下に対するミトコンドリアダイナミクスの役割を解明するため、ミトコンドリアダイナミクス制御因子の一つMFN2をモデル遺伝子とし、その遺伝子発現制御機構の解明を試みた。本制御機構は不明な点が多いため、shRNAを用いたゲノムワイドなノックダウンスクリーニング手法を採用した。

### 3. 研究の方法

*in silico*解析でMFN2のプロモーター・エンハンサー領域を推定し、これらの領域を含むレポータープラスミドを作製した。このプラスミドを恒常的に発現する骨格筋細胞株を構築した(以下、MFN2レポーター細胞)。レポーターとして、薬剤依存的に細胞死を惹起可能なジフテリア毒素の系を用いた。内在性のジフテリア毒素受容体が存在するため、ゲノム編集によりジフテリア毒素受容体のノックアウト細胞を樹立した。それから、この細胞を用いてレポーター遺伝子の恒常発現株を構築した。レンチウイルスによりshRNAライブラリーをMFN2レポーター細胞に導入した。ピューロマイシン処理によりshRNAが導入された細胞を選別した後、FACSを用いてレポーター活性の変動が認められる細胞を単離した。shRNAライブラリーのプラスミドには、各shRNAの標的遺伝子に対応するバーコード配列が含まれており、ゲノムDNAのシーケンスにより該当遺伝子の同定が可能である。単離した細胞よりゲノムDNAを回収し、次世代シーケンサー解析によりレポーター活性を変動させる遺伝子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) MFN2 レポーター細胞の樹立

培養骨格筋細胞を用いて、MFN2 のプロモーター・エンハンサー領域を含むレポーター細胞 (MFN2 レポーター細胞) の構築を試みた。細胞の生死でレポーター活性の変動が評価しやすいジフテリア毒素受容体をレポーターとして使用した。内在性のジフテリア毒素受容体 (HBEGF) のノックアウト細胞をゲノム編集により構築した。この細胞に上記のレポーターの恒常発現株を樹立し、既知の MFN2 制御因子によるレポーターの変動変動が確認できた。しかしながら、このレポーターの発現変動は、薬剤依存的な生存細胞の明確な単離をするには十分でないことが示された。このことから、蛍光強度により選別可能な緑色蛍光タンパク質を用いたレポーターに切り替えることとした。緑色発現タンパク質をレポーターとした恒常発現株を構築した。既知の MFN2 制御因子によりレポーターの蛍光強度の変動が確認され、スクリーニング実験に使用可能であることが示された。

### (2) shRNA ライブラリーを用いたノックダウンスクリーニング

本レポーター細胞にレンチウイルスを用いて shRNA ライブラリー (約 20000 遺伝子) を導入し、FACS を用いてレポーター活性の変動が認められる細胞を単離した。単離した細胞を増殖させた後にゲノム DNA を回収し、次世代シーケンサー解析によりレポーター活性を変動させる遺伝子を探索した。今回使用した shRNA ライブラリーは、各遺伝子について 8 種類の shRNA がデザインされており、各標的遺伝子に対応したバーコード配列が含まれており、この配列を次世代シーケンサーで解析することにより、単離した細胞に発現した shRNA 及びその標的遺伝子の同定が可能である。候補因子の選定では、バーコード配列の解析で得られた遺伝子に関して 2 つ以上の shRNA が得られたもの、公開データベース上で骨格筋での発現が推定されるもの、これら両者の条件を満たす 13 遺伝子を候補因子として抽出した。これらの候補因子の中には MFN2 の発現制御が報告される遺伝子が含まれていたことから、本スクリーニングは適切に実行されたことが確認できた。

### (3) 候補因子の選定・抽出

今回使用した shRNA ライブラリーは、各遺伝子について 8 種類の shRNA がデザインされている。このことから、ゲノム DNA 解析で得られた遺伝子に関して、2 つ以上の shRNA が得られたもの、公開データベース上で骨格筋に発現が認められるもの、これらの条件を満たす 13 遺伝子を候補因子として抽出した。この中には既に MFN2 の発現制御に関する遺伝子が含まれていたことから、本スクリーニングは適切に実行されたことが確認できた。レポーター細胞に用いた骨格筋細胞の RNA を用いた解析の結果、12 個の遺伝子の発現が認められた。

### (4) 候補因子による MFN2 遺伝子発現制御の解析

上記で選定した候補因子について、強制発現、ノックダウン、阻害剤のいずれかの方法を用いて MFN2 の発現制御を検討した。上記のレポーター細胞と同様のプロモーター・エンハンサー領域を含む MFN2 遺伝子のルシフェラーゼレポータープラスミドを構築した。MFN2 の既知の制御因子 (ERR $\alpha$ ) によるレポーター活性の増加が認められた。市販の阻害剤が存在しない因子については、FLAG などのタグを融合させた発現プラスミドを構築した。ウェスタンブロットによりタンパク質レベルでの発現が認められた因子について、レポーターアッセイを行った。その結果、複数の因子によるレポーター活性の変動が認められた (図 1)。

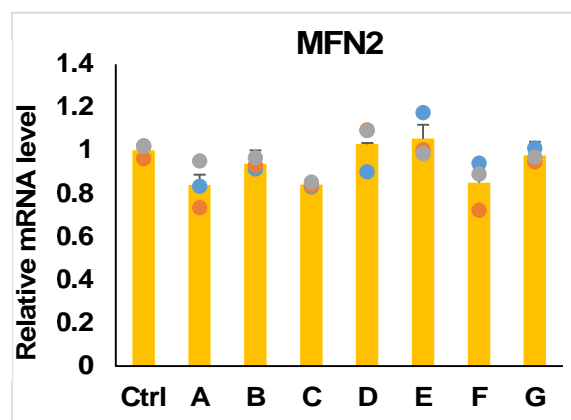


図 1 : 候補因子の強制発現による MFN2 の遺伝子発現

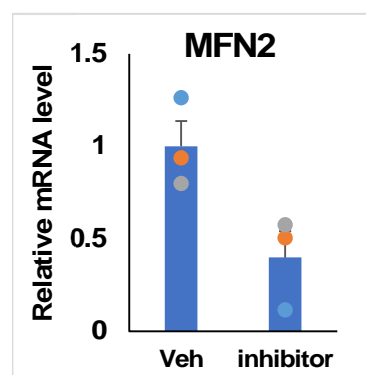


図 2 : 候補因子阻害剤による MFN2 の遺伝子発現

次に、変動が認められた因子もしくは阻害剤が存在する因子について、内在性 MFN2 の遺伝子発現変動を検討した。リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析の結果、1 つの因子が MFN2 の発現を制御することが示された (図 2)。ウェスタンブロットを用いて上記の候補因子についてタンパク質解析を実施した結果、該当因子による MFN2 タンパク質の変動が認められた。以上の結果より、MFN2 の発現制御候補因子の同定に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件/うち国際共著 12件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Takahashi Yu, Noguchi Makoto, Inoue Yu, Sato Shintaro, Shimizu Makoto, Kojima Hirotsu, Okabe Takayoshi, Kiyono Hiroshi, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104542 ~ 104542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104542	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 Suzuki Toshihide, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Nobiletin enhances plasma Interleukin 6 and CXCL12 motif chemokine ligand 1 levels that are increased by treadmill running	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Science & Nutrition	6. 最初と最後の頁 2360 ~ 2369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/fsn3.2844	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 Honda Mikako, Makino Takumi, Zhao Xiaolin, Matsuto Mariko, Sakurai Hidetoshi, Takahashi Yu, Shimizu Makoto, Sato Ryuichiro, Yamauchi Yoshio	4. 巻 323
2. 論文標題 Pathophysiological levels of GDF11 activate Smad2/Smad3 signaling and induce muscle atrophy in human iPSC-derived myocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1402 ~ C1409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00341.2022	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 Noguchi Makoto, Shimizu Makoto, Lu Peng, Takahashi Yu, Yamauchi Yoshio, Sato Shintaro, Kiyono Hiroshi, Kishino Shigenobu, Ogawa Jun, Nagata Koji, Sato Ryuichiro	4. 巻 298
2. 論文標題 Lactic acid bacteria-derived $\gamma$ -linolenic acid metabolites are PPAR $\alpha$ ligands that reduce lipid accumulation in human intestinal organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102534 ~ 102534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102534	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 Watanabe Sho, Sudo Yuri, Makino Takumi, Kimura Satoshi, Tomita Kenji, Noguchi Makoto, Sakurai Hidetoshi, Shimizu Makoto, Takahashi Yu, Sato Ryuichiro, Yamauchi Yoshio	4. 巻 1
2. 論文標題 Skeletal muscle releases extracellular vesicles with distinct protein and microRNA signatures that function in the muscle microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgac173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgac173	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 SASAKI Takashi, OKUDA Mako, HONG Tzu-Wen, WATANABE Yuichi, TAKAHASHI Yu, SHIMIZU Makoto, YAMAUCHI Yoshio, SATO Ryuichiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Sesamin and Hepatic Metabolites Derived from Sesamin and Episesamin Antagonize Farnesoid X Receptor and Reduce the Expression of Gluconeogenesis-Related Genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.68.55	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 Shimizu Makoto, Sato Ryuichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Endocrine Fibroblast Growth Factors in Relation to Stress Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 505 ~ 505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030505	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 Murata Shotaro, Sasaki Takashi, Yamauchi Yuki, Shimizu Makoto, Sato Ryuichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Maslinic acid activates mTORC1 and human TGR5 and induces skeletal muscle hypertrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2311 ~ 2321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Yuichi, Sasaki Takashi, Miyoshi Shoko, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 297
2. 論文標題 Insulin-induced genes INSIG1 and INSIG2 mediate oxysterol-dependent activation of the PERK/eIF2 ?ATF4 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100989 ~ 100989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100989	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 Takahashi Yu, Inoue Yu, Kuze Keitaro, Sato Shintaro, Shimizu Makoto, Kiyono Hiroshi, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Comparison of gene expression and activation of transcription factors in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells and organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2137 ~ 2144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Toshihide, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Orange peel extract reduces the inflammatory state of skeletal muscle after downhill running via an increase in IL-1RA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1506 ~ 1513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki Takashi, Watanabe Yuichi, Kuboyama Ayane, Oikawa Akira, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 296
2. 論文標題 Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose-intolerant mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100131 ~ 100131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.016203	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Makoto SHIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, and Ryuichiro SATO
2. 発表標題 Identification of a food-derived molecule which induces the anti-obese hormone FGF21
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN, Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 誠、鄭 力榕、山内 祥生、及川 彰、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 フルクトース誘導性脂肪肝におけるセリン生合成及び代謝経路の制御機構
3. 学会等名 日本アミノ酸学会 第16回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水誠
2. 発表標題 大豆タンパク質 コングリシニンによる代謝改善効果
3. 学会等名 第42回日本肥満学会・第39回日本肥満症治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水誠、鄭力榕、不野歩美、梅村真理子、高橋勇二、山内祥生、佐藤隆一郎
2. 発表標題 低タンパク質誘導性脂肪肝を制御する新たな転写因子の同定
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第15回学術大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	佐藤 隆一郎  (Sato Ryuichiro)		
研究協力者	松本 健  (Matsumoto Ken)		

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