

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292112

研究課題名(和文) 魚類が示す筋肉の高い再生能力と成長能力を可能にする分子メカニズムを探る

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms that enable high regenerative and growth potential of fish muscle

研究代表者

木下 滋晴 (Kinoshita, Shigeharu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40401179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの筋肉は加齢により減弱するが、魚類では、筋線維が生涯増え続ける。こうした魚の「終生成長」は、魚の成長と哺乳類の加齢性筋肉減弱を理解する上で重要だが、その機構は不明である。本研究では新生筋線維で発現する遺伝子に着目し、その発現には、筋修復に関わるNFATが寄与することを示した。また、加齢に伴い、魚類筋肉でMSTN/GDF11およびTORシグナルが低下することを示した。逆にTORの活性化は筋肉における老化を促進した。こうした結果は、TORシグナルによる老化抑制とNFATおよびMSTN / GDF11シグナルによる筋幹細胞の維持が、魚類筋肉の終生成長の分子基盤であることを示している。

研究成果の概要(英文)：In human, muscle strength declines as aging. This is called as sarcopenia, a decrease in muscle mass and a reduction in regenerative ability associated with aging. On the other hand, in fish, the number of muscle fibers is increased throughout lifespan and regenerative ability is maintained high. Such 'indeterminate growth' of fish is important in understanding fish growth and mammalian sarcopenia, its molecular mechanism is unknown. We focused on a torafugu gene which is expressed in neonatal muscle fibers. In vivo reporter assay of the gene revealed that a NFAT has a significant role in the indeterminate growth. Transcriptome analysis also showed age-related reduction of MSTN/GDF11 and TOR signal in zebrafish muscle. TOR activation in zebrafish caused accelerated aging in muscle. Our results indicate that senescence suppression by TOR signal and maintenance of muscle stem cell by NFAT and MSTN/GDF11 signal are the molecular basis of the indeterminate growth of fish muscle.

研究分野：水圏生物学

キーワード：筋肉 魚 終生成長 老化

1. 研究開始当初の背景

筋肉は成長に伴って大きくなり、また損傷を受けても再生する。ただし、哺乳類では出生後は既存の筋線維が太くなるだけで筋線維の数は増えず、大きな損傷を受けると完全には元に戻らない。また、老化に伴って筋量は減少し、筋肉の再生能力も衰える。これは加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）と呼ばれ、運動能の低下や代謝の低下による生活習慣病リスクの増大等、高齢者の健康に大きな影響を与える。一方、魚では、‘終生成長’とも表されるように、成魚でも筋線維の数が増え続け、再生能力も高く維持される。この違いはどこから生まれるのだろうか？筋肉の再生/成長は筋肉に存在する筋衛星細胞の働きによる。通常、未分化な状態で休眠している筋衛星細胞は、筋肉の損傷などの刺激で活性化して筋線維へと分化する。哺乳類において、老化による筋量の減少や再生能力の低下は筋衛星細胞の活性の低下によることが明らかになってきている。したがって、魚類と哺乳類の筋衛星細胞の違いが、再生/成長能力の違いにつながっていると予想できる。魚でも筋線維への分化能を有する筋衛星細胞様の細胞が報告されている。これらは筋衛星細胞に特有の Pax7 を発現し、筋肉の損傷に応答し、その部位に集合する。したがって魚類でも筋衛星細胞が筋肉の再生/成長に寄与すると考えられるが、哺乳類と比較した魚類筋衛星細胞の特徴は明らかでない。申請者は、筋衛星細胞が筋線維へと分化したマーカーであるミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MYH) の解析から、魚類の筋形成や成長に関する研究を進めてきた。種々の MYH の発現制御機構を解析し、多様な筋肉構造が作られる分子ネットワークの一部を解明すると共に、筋線維を速筋や遅筋といったタイプ別に可視化したトランスジェニック魚を作っている。また、魚類の特徴である成魚で筋線維数が増加する現象につき、新しく作られた筋線維で特異的に発現する MYH を発見し、その発現を制御するプロモーターを同定した。こうした技術と知識を生かし、筋衛星細胞やそこから新しく作られた筋線維を可視化し、その観察系や細胞内外で働く分子の網羅的解析系を立ち上げることで、魚類の筋衛星細胞の特徴を分子レベルで詳細にとらえられると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、魚類の筋衛星細胞の詳細な解析から、魚類の筋肉が示す強い再生と成長能力の秘密に迫ることを目的とする。具体的な項目は次の3点、1) 魚類筋衛星細胞の解析系を確立する、2) 魚類筋肉における遺伝子発現を網羅的に解析して、当該細胞の活性に影響を及ぼす因子を調べる、3) 得られた知見を哺乳類と比較し魚類の特徴を明らかにする、である。これら結果から、魚類筋肉の高い再生能力と成長能力を説明するモデルを構築

することを目指した。

3. 研究の方法

新生筋線維を可視化するトランスジェニック系統の作出

新しく作られた筋線維で特異的に発現する MYH である MYH_{M2528-1} につき、5'RACE を行って転写開始点を決定した。また、当該遺伝子のプロモーター領域 P2100 (翻訳開始点上流 2100bp) を PCR で増幅して緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 発現ベクターに挿入した。これをゼブラフィッシュ胚に顕微注入し、EGFP を発現する胚をスクリーニングした。発現ベクターはトランスポゼース Tol2 の認識配列を有するものを用い、顕微注入時に Tol2 mRNA を同時に注入することで、遺伝子導入効率を上げた。

欠損変異体を用いた *in vivo* プロモーターアッセイ

魚類の終生成長に関わる遺伝子発現に寄与する cis 制御因子を同定するため、P2100 コンストラクトを用いて欠損変異体を作成した。MYH_{M2528-1} のプロモーターである翻訳開始点上流 2100bp には MyoD、Pax3、MEF2、および NFAT の結合配列が予測されている。これら転写因子はいずれも、魚類を含む脊椎動物の筋形成や筋成長の筋特異的遺伝子の発現制御に関わることが知られる。これら転写因子の結合予測配列の機能を調べるため、P2100 コンストラクトを用いて inverse PCR により各部位を個別にあるいは複数部位を組み合わせて欠損させ、ゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入し、EGFP の発現パターンの変化を観察した。

ミオスタチン (MSTN) および GDF11 の発現解析

2 ヶ月齢 (幼魚) 7 ヶ月齢 (若齢魚) 16 ヶ月齢 (成魚) および 39 ヶ月齢 (老齢魚) のゼブラフィッシュ RW 系統につき、各月齢 5 個体から体幹部骨格筋を採取し全 RNA を抽出した。ゼブラフィッシュの GDF11、MSTNa、および MSTNb から遺伝子特異的プライマーを設計し、GAPDH を内部標準としてリアルタイム PCR による発現量の定量を行った。

トランスクリプトーム解析

2 ヶ月齢 (幼魚) 7 ヶ月齢 (若齢魚) 16 ヶ月齢 (成魚) および 39 ヶ月齢 (老齢魚) のゼブラフィッシュ RW 系統につき、各月齢 5 個体から体幹部骨格筋を採取し、Miseq および Hiseq シーケンサを用いて RNAseq を行った。リードは ensemble のゼブラフィッシュゲノムデータベース (GRCz10) にマッピングし、R を用いて発現パターンの解析を行った。また、ラット各組織における月齢別の RNAseq データ (Yu et al., 2013) を用い、ゼブラフィッシュと同様の解析を行った。

成長ホルモン(GH)を過剰発現するトランスジェニック系統の作出

Target of rapamycin(TOR)を活性化するため、成長ホルモン(GH)の過剰発現個体の作出を行った。EF-1 プロモーターの下流でテラピアのGHを発現する発現ベクターを構築し、ゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入した。マーカーとしてEF-1 プロモーターの下流でGFPを発現する発現コンストラクトも同時に注入し、GFP蛍光から遺伝子導入胚をスクリーニングした。野生型個体を掛け合わせ、生殖系列に外来遺伝子が導入された個体を選別し、トランスジェニック系統を確立した。トランスジェニック個体については、TORの活性化をマーカー遺伝子の発現や、シグナルカスケードにあるタンパク質のリン酸化レベルをウェスタンブロットで観察することで確認した。また、トランスジェニック魚における加齢の進行を、LC3抗体を用いたオートファジーの定量およびSA-β-Gal染色で検討した。

4. 研究成果

新生筋線維を可視化したトランスジェニック系統の確立

MYH_{M2528-1} プロモーターが仔魚期およびそれ以降のhyperplasiaによる筋形成に働くことを調べるため、P2100コンストラクトを用いてゼブラフィッシュでトランスジェニック系統Tg:MYH_{M2528-1}:EGFPを確立し、EGFPの時間的および空間的な発現パターンを解析した。Tg:MYH_{M2528-1}:EGFPにおいて、EGFPの発現は受精後1日から始まり、受精2日に孵化した後、その発現は体節部骨格筋全体に広がった。一般に、魚類においては、遅筋と速筋は体節部骨格筋で異なる位置を占めており、速筋は体節全体に分布するが遅筋は体節表層にのみ弓状に分布する。両筋肉は成長の様態も異なっており、仔魚期において、速筋では筋節表層側で活発にhyperplasiaによる筋線維の形成が起きる。一方、遅筋は仔魚期には体節表層に一層の細胞層として分布しており、背側および腹側の端からhyperplasiaにより新しい筋線維が作られる。Tg:MYH_{M2528-1}:EGFPの仔魚(受精後3日)におけるEGFPの発現を遅筋および速筋それぞれの免疫染色により観察したところ、EGFPを発現する筋線維の分布は上述の仔魚期においてhyperplasiaによる筋線維形成が行われる位置とよく一致した。一方、仔魚期以降は、遅筋においては筋前駆細胞が既存の筋線維の間に散在し、そこから新しい筋線維が形成されるため、新生筋線維の分布はモザイク状になる。仔魚期以降の遅筋においては、筋形成が行われる部位は速筋と遅筋を分ける筋隔膜付近にあり、そこから新生筋線維が生み出される。Tg:MYH_{M2528-1}:EGFPの幼魚期および成魚におけるEGFP陽性の筋線維の分布を明らかにするため免疫染色を行ったところ、幼魚期初期(受精後20日、体長10mm)の速

筋において、EGFPの発現は既存の太い筋線維の間にモザイク状に存在する小さい筋線維で観察された。また、遅筋においては、速筋と遅筋の間の筋隔膜近くの筋線維でEGFPの発現が観察された。こうした発現パターンは、上述の仔魚期以降の筋形成部位の位置とよく一致しており、また、トラフグにおける*MYH_{M2528-1}*の発現パターンとも一致した。ところで、遅筋と速筋では孵化後のhyperplasiaによる新生筋線維の形成が続く期間が異なることも知られる。速筋においては新生筋線維の付加はある体サイズになると止まるが、遅筋においては生涯に亘って新生筋線維が付加され続ける。こうした速筋と遅筋の成長様式の違いと一致して、Tg:MYH_{M2528-1}:EGFPにおける*MYH_{M2528-1}*プロモーターの活性(EGFPの発現)は、速筋において幼魚期後期(体長17mm)と成魚(体長25mm)では観察されなくなった。一方、遅筋においてはEGFPの発現が、幼魚期後期および成魚でも観察された。仔魚期およびそれ以降の筋成長と関連したEGFPの発現は、初期遅筋前駆細胞であるadaxial cellの観察やヘッジホッグシグナル阻害実験でも確認された。

新生筋線維形成におけるNFATの寄与

欠損変異体を用いた*in vivo*レポーターアッセイにより、MyoD、Pax3、MEF2、およびNFATの予測結合部位が*MYH_{M2528-1}*のプロモーター活性に寄与することが示された。また、本研究ではこれら4種の転写因子がゼブラフィッシュおよびトラフグの筋形成過程で実際に発現していることを、RT-PCRにより確認した。特にNFATは、ほ乳類骨格筋の再生時に働くことで注目される。ほ乳類では出生後に新生筋線維形成による筋成長(hyperplasia)はほとんど起きないが、怪我や病気で筋肉が損傷を受けた時には、新しい筋線維が作られ筋肉が再生する。この時、新生児型および胚型と呼ばれる*MYH*が特異的に発現するが、Daouら(2013)は新生児型および胚型*MYH*の発現誘導にNFATが重要であることを明らかにした。*MYH_{M2528-1}*プロモーター活性にもNFATの結合部位が寄与するという本研究の結果は、魚類の骨格筋においては筋再生時に働くシグナル経路が構成的に活性化しており、それが終生成長につながっている可能性を示す。ただし、これら転写因子の結合予測部位を全て欠損しても*MYH_{M2528-1}*のプロモーター活性は完全にはなくなり、他の因子も活性に寄与するものと考えられる。

ミオスタチン(MSTN)とGDF11の発現解析
筋肉の再生や成長に関わる筋衛星細胞の増殖、分化を制御しているのがTGFβファミリーに属するMSTNおよびGDF11である。MSTNとGDF11は同じレセプターを共有し、smad2/3経路を活性化することで、筋線維形成と筋肥大を負に制御する。当該経路はサルコペニアとの直接的な関連が議論されてお

り、老齡ラットの骨格筋では、mRNA レベルで MSTN は減少するものの GDF11 は顕著に増加し、総和としてレセプターへの結合が増え筋形成が抑制されると考えられている。ゼブラフィッシュゲノムには GDF11 遺伝子と 2 種類の MSTN 遺伝子 MSTNa および MSTNb が含まれるが、加齢によるこれらの発現変化は調べられていない。先で用いたゼブラフィッシュ各月齡区 3 個体につき、骨格筋における MSTNa、MSTNb および GDF11 の発現量を real-time PCR で定量した結果、MSTNa は各月齡区間で有意差はなかったが、MSTNb については 16 カ月齡から 39 カ月齡までは有意に減少し、既報のラットと同様の傾向を示した。一方、GDF11 の mRNA 量は、ラットでみられるような加齢に伴う発現量の増加は認められず、16 カ月齡以降むしろ減少する傾向が示された。これらの結果は、ゼブラフィッシュ骨格筋の GDF11 および MSTN 量が加齢に伴い総和として減少することを示す。哺乳類とは異なり、魚類では MSTN と GDF11 量を増加させないことで、老化に伴う骨格筋の減衰を抑制することが考えられた。

トランスクリプトーム解析

ゼブラフィッシュ骨格筋において、加齢に伴う発現変動遺伝子は 42 個検出されたが、これらはラット骨格筋の加齢に伴う発現変動遺伝子群とは一致せず、両者で加齢に伴う遺伝子発現変化が大きく異なると考えられた。また、これら遺伝子発現パターンを用いた階層的クラスター解析および主成分分析解析では、ゼブラフィッシュの若齡魚区と老齡魚区の各個体は混在し、両区の遺伝子発現パターンがよく類似することが示された。一方、マウス骨格筋においては、同様の解析で若齡個体と老齡個体が明確に区別された。ゼブラフィッシュとラットにおけるこうした違いは、魚類と哺乳類の骨格筋の老化の違いを反映する可能性がある。ただし、Miseq で行ったシーケンスでは低発現量遺伝子が検出できていないなど、魚類と哺乳類との違いについてはさらに検討が必要であると考えた。

そこで、骨格筋についてデータ量を増やすとともに、骨格筋以外の組織についても検討するため、先の 3 つの月齡に 7 カ月齡区を加え、4 つの月齡区各 5 個体から骨格筋、心臓、肝臓、鰓および脳を採取し、Hiseq シーケンスで RNAseq を行った。各リードにつき、前段と同様の処理で、各遺伝子の発現パターンの解析を行った。全遺伝子発現パターンの階層的クラスター解析の結果、データは組織別に区分された。心臓、肝臓、鰓および脳につき、各月齡区間での発現変動遺伝子はそれぞれ 1377、397、486、2596 個検出された。骨格筋においては 471 個検出され、このうち若齡魚区と老齡魚区間では 24 個であった。同様の解析でラット骨格筋において若齡区と老齡区間の発現変動遺伝子は 1191 個あり、このうちゼブラフィッシュの 24 個と共通す

るのは 2 個であった。ゼブラフィッシュでは加齢に伴い複数の HSP 遺伝子の発現が上昇していたが、シャペロン遺伝子は人為的な過剰発現処理による寿命延長効果が哺乳類を含む複数の生物種で報告されている。また、ゼブラフィッシュでは、複数のリボソームタンパク質が加齢に伴い減少したが、ラットではリボソームタンパク質が加齢に伴って増加し寿命を抑制すること、また魚類を含め MSTN は筋線維形成や筋肥大といった筋成長を抑制することが知られる。HSP およびリボソームタンパク質の発現は TOR シグナルの制御を受けることが知られる。TOR は酵母からヒトまで保存された、成長と寿命のバランスを制御するシグナルカスケードである。TOR が活性化されるとリボソームタンパク質の発現が上昇し成長が促進される一方、HSP の発現は低下し、細胞のストレス耐性が低下し、寿命は短くなる。魚類筋肉では、TOR の抑制による加齢の抑制が起きており、これが筋肉の終生成長や再生能力の高さに寄与していることが考えられた。

TOR の活性化による加齢の促進

GH の過剰に発現するゼブラフィッシュのトランスジェニック系統につき、TOR の活性化を S6 キナーゼのリン酸化レベルの上昇で確認した。この時、GH トランスジェニック系統では、筋肉でオートファジーが低下しており、SA-β-Gal により染色レベルが上昇するなど、ほ乳類等と同様の加齢の進行が認められた。以上の結果から、魚類骨格筋では TOR の抑制により、哺乳類でみられるような筋肉の加齢症状が抑制されていることが考えられた。

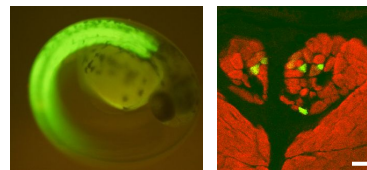


図 2. 新生筋線維を GFP で特異的に可視化したトランスジェニック魚。

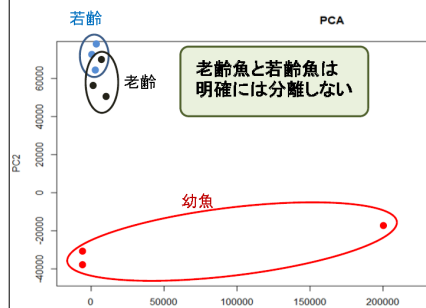


図 3. ゼブラフィッシュ筋肉における全発現遺伝子の PCA 解析。老齡魚と若齡魚が区別されず、老化による変化があまりないことがわかる。

まとめ

本研究では魚類筋肉示す終生成長や高い再生能力について、新生筋線維特異的に発現する遺伝子のプロモーター解析および TGF-ファミリーの発現解析を行い、ほ乳類で筋損傷時に活性化する経路の恒常的活性化が魚類の終生成長に寄与している可能性を示した。また、これには哺乳類と異なり、MSTN/GDF11 経路の発現レベルが加齢で上昇しないことが関連していることが考えられた。また、老齢魚骨格筋の発現遺伝子の網羅的解析および GH トランスジェニック魚の解析からは、TOR シグナルの活性抑制が老齢魚では起きており、これが HSP の発現上昇やリボソームタンパク質の発現低下など魚の筋肉の老化抑制につながる事が考えられた。以上より、魚類の骨格筋では MSTN/GDF11 の発現抑制による筋衛星細胞の活性維持と TOR の抑制による老化抑制が起きており、これらが魚類の終生成長および高い再生能力の分子的基盤と考えられる。

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 5 件)

Siddique BS, Kinoshita S, Wongkarangkana C, Asakawa S, Watabe S. Mar Biotechnol (NY). 2016 Jun;18(3):436-47. 査読あり

Asaduzzaman M, Shakur Ahammad AK, Asakawa S, Kinoshita S, Watabe S. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2016;191:1-12. 査読あり

Akolkar DB, Asaduzzaman M, Kinoshita S, Asakawa S, Watabe S. Gene. 2016;575:21-28. 査読あり

Asaduzzaman M, Ikeda D, Abol-Munafi AB, Bulbul M, Ali ME, Kinoshita S, Watabe S, Kader MA. Aquaculture 2016, 468:297-306. 査読あり

Ahammad AK, Asaduzzaman M, Asakawa S, Watabe S, Kinoshita S. Mech Dev. 2015;137:53-65.7 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

汪婉桐・木島祐輔・當間祥五・Abdallah Khairy Elbially・張翔・水越美咲・五十嵐洋治・木下滋晴・浅川修一・鈴木穰・渡部終五,魚類筋肉の終生成長と TOR およびミオスタチン/GDF11 シグナル,平成 29 年度日本水産学会春季大会,2017 年 3 月 26-30 日,東京海洋大学(東京)

Abdallah Khairy Elbially・WangTong Wang・Kinoshita S・Asakawa S・Watabe S, Increased TOR signaling and accelerated aging of growth-hormone transgenic zebrafish, 平成 29 年度日本水産学会春季大会,2017 年 3 月 26-30 日,東京海洋大学(東京)

Kinoshita S, Ahammad AK, Asaduzzaman M, Asakawa S, Watabe S, The implication of the

specific myosin heavy chain gene in indeterminate muscle growth in teleost, The 7th World Fisheries Congress, 2016 年 5 月 23 - 27 日,釜山(韓国)

汪婉桐・當間祥五・Abdallah Khairy Elbially・張翔・水越美咲・五十嵐洋治・木下滋晴・Md Shaheed Reza・渡部終五・浅川修一,加齢による骨格筋の遺伝子発現に関する哺乳類と魚類の違い,第十八回マリンバイオテクノロジー学会,2016 年 5 月 28-29 日,北海道大学(函館)

木下滋晴, Ahammad AK, 當間祥五, 汪婉桐, Abdallah Khairy Elbially, Asaduzzaman M, 浅川修一, 渡部終五, 魚類筋肉の終生成長と遺伝子発現制御,第十八回マリンバイオテクノロジー学会,2016 年 5 月 28-29 日,北海道大学(函館)

汪婉桐・當間祥五・Abdallah Khairy Elbially・張翔・水越美咲・五十嵐洋治・木下滋晴・Md Shaheed Reza・渡部終五・浅川修一,ゼブラフィッシュ骨格筋における加齢に伴う遺伝子発現変化の検討,平成 28 年度日本水産学会春季大会,2016 年 3 月 26-30 日,東京海洋大学(東京)

木下滋晴, Ahammad AK, 當間祥五, 汪婉桐, Abdallah Khairy Elbially, Asaduzzaman M, 浅川修一, 渡部終五, 魚類筋肉の終生成長過程で遺伝子の発現を制御するプロモーターの活性について,平成 28 年度日本水産学会春季大会,2016 年 3 月 26-30 日,東京海洋大学(東京)

Kinoshita S, Ahammad AK, Asaduzzaman M, Asakawa S, Watabe S, The myosin heavy chain gene promoter associated with indeterminate muscle growth of teleost, 9th European zebrafish meeting, 2015 年 6 月 28 - 7 月 2 日,オスロ(ノルウェー)

Siddique BS, Kinoshita S, Wongkarangkana C, Asakawa S, Watabe S, Evolutional features and functions of teleost myomiRs, 平成 27 年度日本水産学会春季大会,2015 年 3 月 27 - 31 日,東京海洋大学(東京)

Ahammad AK, Asaduzzaman M, Kinoshita S, Asakawa S, Watabe S, Torafugu M2528-1 promoter in zebrafish: The regulatory mechanism of its expression in relation to indeterminate muscle growth, 第二十回小型魚類研究会,2014 年 9 月 20 - 21 日,慶應義塾大学(東京)

Ahammad AK, 木下滋晴, Asaduzzaman M, 浅川修一, 渡部終五, 魚類特有の筋成長過程で遺伝子の発現を誘導するプロモーターの活性について,平成 26 年度日本水産学会秋季大会,2014 年 9 月 19 - 21 日,九州大学(福岡)

Ahammad AK, 木下滋晴, Asaduzzaman M, 浅川修一, 渡部終五, 魚類にみられる骨格筋の終生成長と遺伝子発現制御,第 16 回マリンバイオテクノロジー学会,2014 年 5 月 31 日 6 月 1 日,三重大学(津)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

木下 滋晴（Kinoshita Shigeharu）

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40401179