

運動応答遺伝子の解明を通じて寝たきりを防ぐ — 廃用性筋萎縮を防ぐメカノバイオロジー —

東北大学 加齢医学研究所 神経機能情報研究分野

助教 久保 純

(共同研究者)

旭川医科大学	講師	井上 雄介
東北大学 加齢医学研究所	助教	山田 昭博
東北大学病院	医員	佐原 玄太
東北大学 生命科学研究科	大学院生	近藤 貴大
実験動物中央研究所	研究員	塚本 晃海
東北大学 加齢医学研究所	教授	小椋 利彦

はじめに

これまでに我々の研究グループでは、メカノバイオロジーの視点から運動の意義について解析を行ってきた。メカノバイオロジーとは運動などの力学的な刺激がどのように細胞・臓器・生体に影響するのかを遺伝子レベルで明らかにする学問である。運動は骨格筋の機能維持において重要な意味を持つ。極端な例を挙げれば、廃用性筋萎縮のように、長期間、体を動かさない状態が続くと、筋萎縮を起こしてしまうことさえある。このとき、Atrogenes (筋萎縮原因遺伝子群) と呼ばれる一群の遺伝子群が活性化している。運動や力学的刺激と Atrogenes といった遺伝子の活性化とは、どのような機構でつながっているのだろうか？本研究では力学的刺激に応答する転写因子に注目し、運動などの力学的刺激が骨格筋に及ぼす分子メカニズムを解析した。

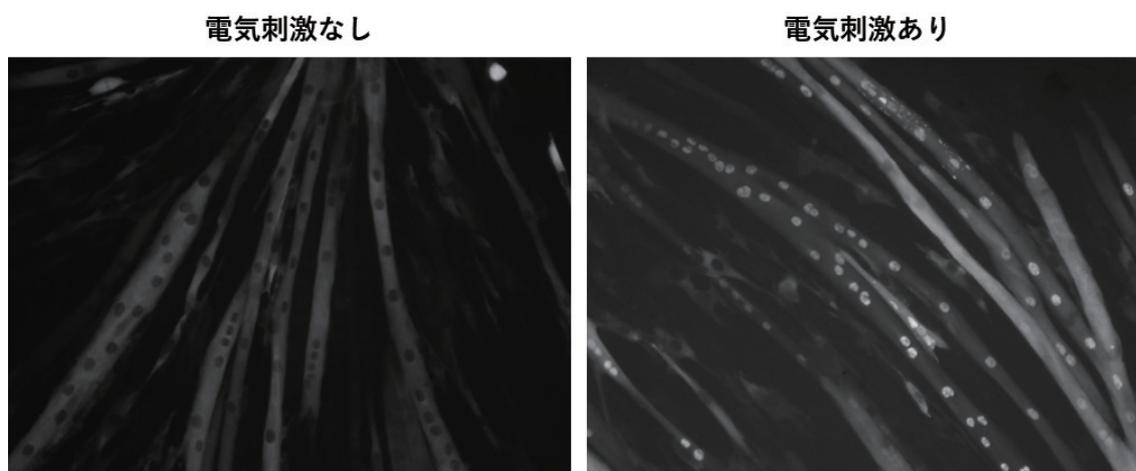
結 果

運動が骨格筋に与える影響を解析するために、運動によって活性化される転写制御因子を探索した。この目的のために、マウス (C57BL/6N、オス、9週齢) をトレッドミルによって強制的に走行させる実験を行った。走行時の傾斜角を10度とし、毎分15mの速度でマウスを3時間から5時間走らせた。走行実験後、後肢の筋肉(腓腹筋、ヒラメ筋、長趾伸筋)を単離し、遺伝子発現解析を行った。また腓腹筋については、細胞質と細胞核に分画した後、それぞれのタンパク質を解析した。この解析により、運動に応答して、活性化する転写因子(本報告書ではTranscription Factor X: TF Xと呼ぶ)を発見した。

運動は様々な影響を個体レベルで及ぼすため、上記の運動に応答する転写因子TF Xの活

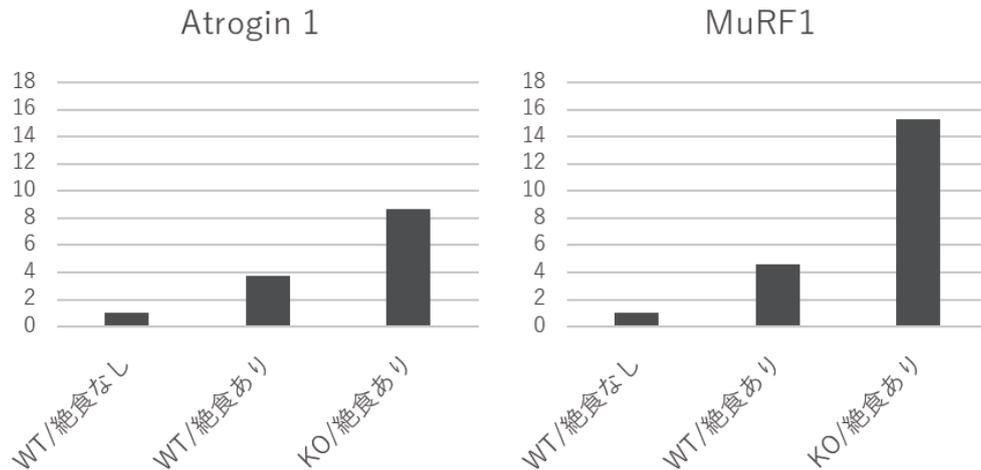
性化が、強制走行実験に伴う二次的な影響ではないことを確認した。そこで骨格筋における運動の影響をより直接的に解析することができる実験系の開発を行った。筋芽細胞株であるC2C12、あるいは生体より単離した筋衛生細胞を分化誘導し、培養皿上で骨格筋を形成させた。この培養骨格筋に対して、電気刺激を加えることで、強制的に培養骨格筋を収縮させ、擬似的な運動状態を作り出した。電気刺激負荷後に培養骨格筋からRNAを抽出して遺伝子発現解析を行った。また運動応答転写因子TF Xに緑色蛍光タンパク質GFPを付加し、アデノウイルスベクターを用いて、培養骨格筋に導入し、筋収縮中の挙動の変化を観察した。以上の解析の結果、培養骨格筋を電気刺激により直接、収縮させた場合でも、TF Xが活性化することが確認できた(図1)。

図1 電気刺激による運動応答転写因子の活性化



次にTF Xを欠損するマウスを作製し、生体の筋肉におけるTF Xの役割を解析した。まず通常状態(無負荷状態)で、後肢筋肉での遺伝子発現を解析したところ、腓腹筋において筋タンパク質の合成抑制因子である*Eif4ebp1*の発現が2倍程度に増加していたものの、その他の筋萎縮原因遺伝子群については変化が認められなかった。そこで次に、筋萎縮誘導条件下での解析を行った。筋萎縮誘導として、マウスを24時間から30時間絶食させ、後肢の筋肉の遺伝子発現を解析した。野生型のマウスでは、絶食によって速筋型である腓腹筋や長趾伸筋において、多数の筋萎縮原因遺伝子群の発現上昇が認められたが、遅筋であるヒラメ筋においては、筋萎縮原因遺伝子群の発現上昇はほとんど見られなかった。一方で、TF Xを欠損するマウスにおいても、野生型マウスと同様に筋萎縮原因遺伝子の発現上昇が見られたが、その発現上昇の程度は野生型マウスと比べてより強力であった(図2)。また、遅筋であるヒラメ筋は、野生型マウスではほとんど筋萎縮原因遺伝子群に変化が見られなかったのに対し、TF Xを欠損するマウスのヒラメ筋ではいくつかの筋萎縮原因遺伝子群の発現上昇が確認された。以上のことから、生体の筋肉において、TF Xは筋萎縮に予防的に働いていると考えられる。

図2 絶食によるAtrogenesの発現変化



最後に、TF Xが筋萎縮の抑制を実現するために、どのような分子と直接相互作用しているのか解析を行った。筋萎縮においては、Foxoファミリーの転写因子（Foxo1/3/4）が重要な役割を担っていることが知られている。そこで、TF XがFoxoに対して、直接結合し、機能を抑制している可能性を検討した。ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ、共免疫沈降、NanoBiT（スプリットルシフェラーゼ）を用いて、解析したところ、TF XがFoxo1、Foxo3、Foxo4のすべてに結合し、その転写活性を抑制していることがわかった。また培養骨格筋において、Foxo1やFoxo3を強制的に発現させると、筋萎縮原因遺伝子群の発現が誘導されるが、TF Xの存在下では、この筋萎縮原因遺伝子群の発現誘導を抑制できた。

考 察

本研究で同定した運動応答遺伝子TF XはFoxo1/3/4転写因子群の抑制を通じて、筋萎縮に予防的に働いていることがわかった。廃用性筋萎縮の予防において、運動が効果的であることを考えるとTF Xの運動に应答して活性化するという機能は合理的といえる。今回の研究では、絶食によって筋萎縮を誘導したが、加齢に伴って進行する筋萎縮を解析するためには、TF X遺伝子欠損マウスを数年に渡り経時的に観察していく必要がある。またFoxoファミリーの転写因子は筋萎縮以外にも様々な生命現象に関わっており、TF Xがそれらの生命現象にも関与している可能性についても今後検討していく必要がある。

要 約

本研究では、トレッドミルを用いたマウスの強制走行実験、我々が開発した培養骨格筋への電気刺激実験装置を用いて、運動に应答する因子の同定を行い、その機能を解析した。

同定された転写因子TF Xについて、生体の骨格筋での機能を解析したところ、通常時の遺伝子発現にはそれほど変化がなかったものの、筋萎縮の誘導に対しては筋萎縮原因遺伝子群の発現誘導に抵抗性を付与していることが明らかとなった。この筋萎縮への抑制効果は、Foxoファミリーの転写因子 (Foxo1/3/4) の転写活性を直接的に抑制していることによるものであることが示された。

文 献

1. 松本健、久保純、小椋利彦、エクササイズピル (運動模倣薬) -サルコペニア、フレイルと戦うための geroprotector(実験医学(増刊)疾患に挑むメカノバイオロジー)、vol.38-No.7, 88(1148)-92(1152)、2020年
2. 久保純、松本健、小椋利彦、早老症ラミン変異とメカノバイオロジー (医学のあゆみ)、272巻2号 152 ~ 156 ページ、2020年