

奨励賞受賞者論文

長鎖非コード RNA *Myoparr* による筋形成制御機構の解明と 筋萎縮病態に対する新たな治療法開発への応用

常陸圭介

(藤田医科大学・総合医科学研究所・難病治療学研究部門)

I. はじめに

長鎖非コード RNA (lncRNA) は、タンパク質に翻訳されない 100–200 塩基以上の RNA の総称である。lncRNA は、遺伝子間領域だけでなく、プロモーターやエンハンサーなどの転写調節領域、イントロン、3' 非翻訳領域にも存在し、転写因子、ヒストンタンパク質、RNA 結合タンパク質などの相互作用を介して様々な生命現象に関わることが明らかになりつつある。最新のデータベースに登録されているヒト lncRNA の数は 18 万以上にも及ぶが、その多くの役割は未解明である。著者らは最近、骨格筋細胞の正常な分化に必須な新規 lncRNA として *Myoparr* を発見しその分子機構を明らかにした¹。また、*Myoparr* が新たな骨格筋萎縮誘導因子として作用することも明らかにしている^{1,2}。本稿では *Myoparr* の分子機能を中心に、lncRNA による筋分化制御機構について概説し、lncRNA を標的とした筋萎縮に対する新たな治療法開発の可能性について述べる。

II. 背景

骨格筋は運動や姿勢の維持にのみ必要な組織という印象が強いが、実際には体温の恒常性維持やエネルギー・糖代謝にも関わる我々の健康維持に必須な組織である。そのため、がんを始めとする様々な疾患や、老化、外傷などで生じる骨格筋量の減少 (筋萎縮) は、患者や高齢者の生活の質や生存率を大きく低下させる主要因であると考えられている。しかしながら、筋萎縮に対する安全で有効な治療法は未だ確立されておらず、超高齢化社会を迎えた本邦において、骨格筋の形成 (筋形成) 機構や筋萎縮病態の発症機構を解明し筋萎縮に対する新たな治療法の開発につなげる研究への需要が非常に高まっている。

骨格筋を構成する筋繊維は、単核の筋芽細胞が増殖を停止後、分化 (筋分化)・融合し多核の筋管細胞となり成熟することで形成され、MyoD や myogenin と

いった塩基性ヘリックスループヘリックス型転写因子の協調的な作用によって制御されている。20–25 塩基長の小さな非コード RNA であるマイクロ RNA (miRNA) についても、標的遺伝子の発現制御を介して筋形成や筋量の調節に寄与していることが解明されている^{3,4}。

III. 新規 lncRNA *Myoparr* の発見

Myogenin 遺伝子を欠損したマウスは、横隔膜を含む骨格筋の形成不全により周産期致死に至ることから、*myogenin* 遺伝子は筋形成に必須な遺伝子として知られている^{5,6}。*Myogenin* は骨格筋特異的な発現を示し、骨格筋での高レベルな *myogenin* の発現には *myogenin* 遺伝子上流約 1,500 塩基の DNA 領域が必要である⁶。しかしながら、この DNA 領域が有する分子機能に関してはこれまで不明であった。

我々は、筋形成過程における RNA ポリメラーゼ II (Pol II) のクロマチン免疫沈降シーケンシングデータを解析することで、*myogenin* の上流約 1,500 塩基の DNA 領域にも Pol II の結合シグナルが存在することを発見した。そこでこの領域をカバーする複数のプライマーを設計し PCR 法により未知の転写産物の検出を試みた結果、逆転写反応に依存したシグナルが検出され転写産物の存在が示された。Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によるクローニングと全長配列の決定により、この転写産物が *myogenin* 遺伝子に対して反対方向に発現する単一エクソンから成る 1,172 塩基の RNA であることが明らかとなった (図 1)。In silico 塩基配列の解析、クロマチン画分への局在検定、in vitro 翻訳実験の結果から、我々は同定した RNA が lncRNA であると結論付け、*myogenin* promoter-associated myogenic regulatory anti-sense lncRNA (*Myoparr*) と命名した。

さらにヒトの骨格筋細胞を用いた解析から、ヒトの *myogenin* 遺伝子上流にも *Myoparr* 類似の RNA が発現していることを発見した。RACE 法による解析の

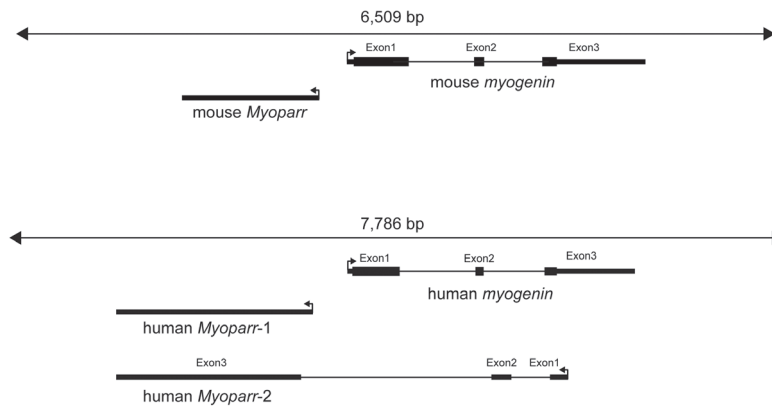


図1 マウスとヒト *Myoparr* と *myogenin* 遺伝子のゲノム構造

結果、ヒトでは2種類の *Myoparr* が発現していた(図1)。一つはマウス *Myoparr* と同様に *myogenin* 遺伝子の上流に存在する単一エクソンからなる転写産物であった。もう一つは、*myogenin* 遺伝子のエクソン3から *myogenin* 遺伝子の上流方向に向かって発現する3つのエクソンから成る転写産物であった。他の lncRNA と同様にマウスとヒトの *Myoparr* の塩基配列の進化的な保存性は低かったが、筋分化の誘導後に *myogenin* の発現と同時に *Myoparr* の発現が増加することは種間で共通であったことから、*myogenin* 遺伝子の発現制御への *Myoparr* の関与が示唆された。

IV. *Myoparr* による筋形成制御機構

Myoparr が *myogenin* 遺伝子の発現制御に関与しているかを明らかにするために、我々はまず *Myoparr* のノックダウン(KD)を試みた。*Myoparr* に対する siRNA の導入により、筋芽細胞株 C2C12 において *Myoparr* の発現のみならず、*myogenin* の発現の有意な低下が観察された。*Myoparr* の KD によって、*myogenin* のプロモーターにおける転写活性化の指標 (Pol II の会合, H3K4me3, H3K27ac) が低下することもクロマチン免疫沈降によって観察された。さらに、Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP) 法による解析から、*Myoparr* が *myogenin* のプロモーターへ直接結合していることが判明した。また、*Myoparr* の KD によって、筋分化マーカーであるミオシタンパク質の発現が大きく減少した。これらの結果から、*Myoparr* が転写レベルで *myogenin* の発現を活性化することが骨格筋細胞の正常な分化に必須であることが明らかとなった。

多くの lncRNA は転写因子や転写共役因子などのタンパク質と結合することで遺伝子の発現制御に関わる。そこで我々は、*Myoparr* による *myogenin* 遺伝子の発現活性化機構を明らかにするために、*Myoparr* と直接結合する RNA 結合タンパク質の同定を試みた。In

vitro で合成した *Myoparr* を骨格筋細胞の核抽出液と混合し RiboTrap 法を行うことで *Myoparr* 結合タンパク質を単離し、質量分析解析によって *Myoparr* 結合タンパク質として転写共役活性化因子 Ddx17 を同定した。内在性の *Myoparr* と Ddx17 の結合は、Ddx17 特異的抗体を用いた RNA 免疫沈降法によって確認された。Ddx17 と *Myoparr* の結合には *Myoparr* の中央付近に位置する約 300 塩基の領域が必要であり、この領域を欠損させることで *myogenin* 遺伝子のプロモーター活性が大きく低下した。また Ddx17 の KD により、*myogenin* の発現が減少し筋分化が抑制されたことから、*Myoparr* と Ddx17 の結合が *myogenin* の発現活性化と正常な筋分化に必要であることが示唆された。Ddx17 が転写共役活性化因子として作用するためには、ヒストンアセチル基転移酵素 PCAF と結合することが必要である⁸。興味深いことに、この Ddx17 と PCAF の結合は、*Myoparr* の KD によって有意に減少した。また、*Myoparr* 存在下では Ddx17 と PCAF の結合が強まることが確認された。一方で、*myogenin* のプロモーターに対する Ddx17 と PCAF それぞれの結合は *Myoparr* の KD では影響を受けないことから、*Myoparr* は *myogenin* のプロモーター上で Ddx17 と PCAF の結合を強めることで Pol II のリクルートを増加させ、*myogenin* の転写を活性化していると考えられる(図2)。

我々は次に *myogenin* 以外の *Myoparr* の標的遺伝子を明らかにするために、RNA-Seq 解析により *Myoparr*, *myogenin*, Ddx17 のそれぞれによって制御される遺伝子の比較を行った。*Myoparr*, *myogenin*, Ddx17 の KD によって、筋収縮や筋分化に関わる遺伝子群の発現に変化が見られた。その一方で、細胞分裂や細胞周期に関連する遺伝子の発現は、*Myoparr* と Ddx17 の KD によって増加したが、*myogenin* の KD では変化が見られなかった。骨格筋細胞は筋分化の誘導とともに細胞増殖を停止する。しかしながら、

Myoparr と *Ddx17* のそれぞれを KD した場合には、筋分化誘導以降も筋芽細胞の増殖が停止していないことが、ヌクレオシドアナログを用いた細胞増殖アッセイによって示され、*Myoparr* と *Ddx17* の両者が筋芽細胞の増殖停止に必須であることが明らかとなった。さらに RNA-Seq 解析により、*miR-133b* と *miR-206* の前駆体 RNA と lncRNA *H19* の発現が、*Myoparr* と *Ddx17* のそれぞれの KD によって大きく減少することを見出した。また *Myoparr* と *Ddx17* の KD により、*miR-133b* と *miR-206* の発現が減少することが確認された。*H19* は *miR-675* の前駆体としても知られているが、*Myoparr* と *Ddx17* の KD によって *miR-675* の発現も減少する傾向にあった。一方で、*myogenin* の KD によってこれらの miRNA の発現に変化は見られなかった。興味深いことに、*Myoparr* と *Ddx17* の KD によって、これらの miRNA の標的である ERK シグナルが活性化すること、*Cdc6* と DNA ポリメラーゼ 1 の発現が増加することが観察された。*miR-133b*、*miR-206*、*miR-675* は、ERK シグナルの抑制や、*Cdc6* や DNA ポリメラーゼ 1 の発現抑制を介して筋芽細胞の増殖停止に寄与している。よって *Myoparr* は *Ddx17* と共にこれらの miRNA の発現を活性化することで、*myogenin* の機能非依存的に筋芽細胞の増殖を停止していることが明らかとなった (図 2)。

ここまで本研究から得られた知見をまとめると、骨格筋が正常に形成されるためには、筋分化と筋芽細胞の増殖停止のタイミングが *Myoparr* によって絶妙に調節されることが必要であると考えられる。

V. *Myoparr* による筋萎縮誘導機構

骨格筋における *myogenin* の発現は、筋形成後に骨格筋が脊髄からの運動神経による支配を受けることで抑制される。しかしながら、除神経処置などにより神経支配が解除されると成熟した骨格筋組織においても *myogenin* の発現は再活性化し、MurF1 や Atrogin-1 といった E3 リガーゼの発現活性化を通じて *myogenin*

は筋萎縮誘導因子として作用する¹⁰。我々の解析により、除神経処置 3 日後と 7 日後のマウス前脛骨筋において、*Myoparr* の発現が *myogenin* と共に大きく増加していることが明らかとなった。そこで筋萎縮時における *myogenin* の発現の活性化に *Myoparr* が関与していると想定し、*Myoparr* に対する shRNA をマウスの前脛骨筋に注入し、エレクトロポレーションにより shRNA を筋肉へと遺伝子導入する RNA 干渉法を用いて in vivo での *Myoparr* の発現阻害を試みた。*Myoparr* の KD によって除神経処置によって増加した *myogenin* の発現が大きく低下したことから、生体内での筋萎縮時においても *Myoparr* が *myogenin* の発現活性化に必須であることが明らかとなった。*Myoparr* の KD は *myogenin* の発現を減少させるのみならず、除神経処置による前脛骨筋の筋重量減少を 30% も緩和した。*Myoparr* の KD による筋萎縮の緩和作用は、筋断面積の解析からも確認された。これらの解析により、我々は *Myoparr* が筋萎縮の新たな誘導因子であることを明らかにした。

さらに、筋萎縮過程における *myogenin* 以外の *Myoparr* の標的遺伝子を明らかにするために、RNA-Seq による網羅的な遺伝子発現変化の解析を行なった。除神経処置された前脛骨筋において、*Myoparr* の KD によって 423 種類の遺伝子の発現が増加し、425 種類の遺伝子の発現が減少した。その内の 1 つである *Gdf5* 遺伝子は別名 *BMP14* としても知られ、bone morphogenetic protein (BMP) シグナルを活性化することで、除神経処置で誘導される筋萎縮を緩和することが知られている¹¹。ウエスタンブロット法による解析から、*Myoparr* の KD は除神経処置後のマウス前脛骨筋における GDF5 の発現を増加させ、BMP シグナルを活性化させることが示された。また興味深いことに、*Myoparr* の KD によって BMP シグナルの構成因子である Smad5 の発現も増加することが観察された。これらの一連の解析から、*Myoparr* は *myogenin* 遺伝子の発現を活性化させるだけでなく、*Gdf5* 遺伝子の発現を抑

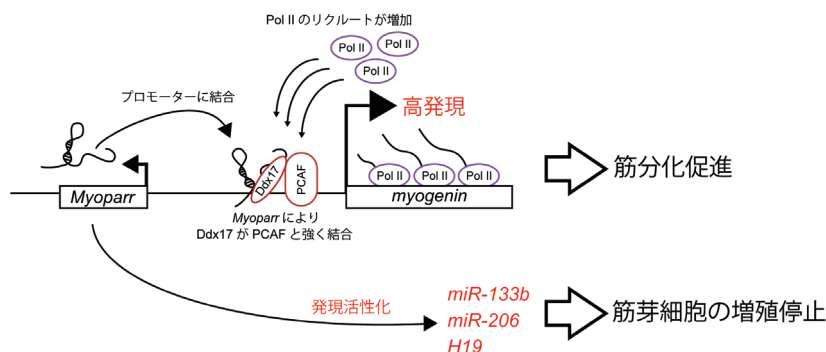


図 2 *Myoparr* による筋形成制御の分子機構

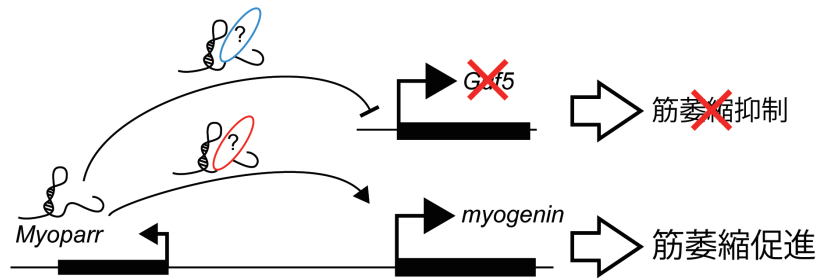


図3 Myoparrによる筋萎縮の誘導機構

制することでBMPシグナルを抑制し筋萎縮の誘導に関わることが明らかとなった(図3)。BMPシグナルは除神経処置により増加したmyogeninの発現を抑制する¹²。そのためMyoparr/myogenin/Gdf5による相互の発現制御機構が、除神経処置による筋萎縮の誘導に関与していると考えられ、今後包括的にMyoparrの結合分子を同定することでその分子機構の全容が明らかになることが期待される。

VI. 結 語

本研究により、Myoparrが近傍のmyogenin遺伝子だけでなく、遠位に存在する複数のmiRNAの発現制御にも関与していることが明らかとなり、lncRNAが有する遺伝子発現の制御機構が想像以上に巧妙かつ複雑であることが示された。多くのlncRNAの機能解析が培養細胞を用いたin vitroでの実験のみで示されてきた中で、骨格筋組織でのMyoparrの機能を明らかにした本研究成果はlncRNAの分子機能を解明する上での重要な知見を提供すると考えられる。

骨格筋でのmyogeninの発現増加は、除神経処置による筋萎縮以外にも筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病での筋萎縮時にも観察される¹⁴⁻¹⁶。そのためMyoparrの発現阻害は、神経原性の筋萎縮全般に対する治療法開発に応用可能であると考えられる。我々はMyoparrのみならず、LncMyodやlincMDIなど複数のlncRNAの発現が様々な筋萎縮病態下で大きく変化することを発見し報告している¹⁷。また、RNA-Seq解析により筋萎縮に関わる複数の新規lncRNAを同定することにも既に成功しており、現在その詳細な分子基盤の解析を進めている。疾患におけるlncRNAの役割はまだ不明点が多く、lncRNAの持つ未知の機能を理解することは、各種疾患に対する新たな治療法の確立にもつながることが期待される。今後は、Myoparrのノックアウトマウスの作製や筋萎縮モデルマウスとの交配により、筋萎縮に対するMyoparrの阻害効果をより詳細に検証し、Myoparrを標的とした新たな筋萎縮治療法の開発につなげたいと考えている。

文 献

- 1) Hitachi K, Nakatani M, Takasaki A, Ouchi Y, Uezumi A, Ageta H, Inagaki H, Kurahashi H, and Tsuchida K : *Myogenin* promoter-associated lncRNA *Myoparr* is essential for myogenic differentiation. *EMBO Rep.* 2019 ; 20 : e47468.
- 2) Hitachi K, Nakatani M, and Tsuchida K : Long non-coding RNA *Myoparr* regulates GDF5 expression in denervated mouse skeletal muscle. *Noncoding RNA.* 2019 ; 5 : 33.
- 3) Hitachi K, Nakatani M, and Tsuchida K : Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014 ; 47 : 93 – 103.
- 4) Hitachi K and Tsuchida K : Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front. Physiol.* 2014 ; 4 : 408.
- 5) Hastly P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, and Klein WH : Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the *myogenin* gene. *Nature.* 1993 ; 364 : 501 – 506.
- 6) Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, and Nonaka I : *Myogenin* gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature.* 1993 ; 364 : 532 – 535.
- 7) Ransohoff J, Wei Y, and Khavari P : The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 ; 19 : 143 – 157.
- 8) Shin S and Janknecht R : Concerted activation of the Mdm2 promoter by p72 RNA helicase and the coactivators p300 and P/CAF. *J. Cell Biochem.* 2007 ; 101 : 1252 – 1265.
- 9) Hitachi K and Tsuchida K : Data describing the effects of depletion of *Myoparr*, *myogenin*, *Ddx17*, and *hnRNPK* in differentiating C2C12 cells. *Data*

- Brief.* 2019 ; 25 : 104172.
- 10) Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, Shelton JM, Backs J, Klein WH, Richardson JA, Bassel-Duby R, and Olson EN : Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell.* 2010 ; 143 : 35 – 45.
 - 11) Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, Stantzou A, Mouisel E, Toniolo L, Ferry A, Stricker S, Goldberg A, Dupont S, Piccolo S, Amthor H, and Sandri M : BMP signaling controls muscle mass. *Nat. Genet.* 2013 ; 45 : 1309 – 1318.
 - 12) Winbanks C, Chen J, Qian H, Liu Y, Bernardo B, Beyer C, Watt K, Thomson R, Conor T, Turner B, McMullen J, Larsson L, McGee S, Harrison C, and Gregorevic P : The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J. Cell Biol.* 2013 ; 203 : 345 – 357.
 - 13) Hitachi K and Tsuchida K : Regulatory Roles of Long Non-coding RNAs in Skeletal Muscle Differentiation, Regeneration, and Disorders. The Chemical Biology of Long Noncoding RNAs. RNA Technologies. Jurga S and Barciszewski J (eds). Springer, Cham. 2020 ; pp.431 – 463.
 - 14) Galbiati M, Onesto E, Zito A, Crippa V, Rusmini P, Mariotti R, Bentivoglio M, Bendotti C, and Poletti A : The anabolic/androgenic steroid nandrolone exacerbates gene expression modifications induced by mutant SOD1 in muscles of mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol. Res.* 2012 ; 65 : 221 – 230.
 - 15) Bricceno K, Sampognaro P, Van Meerbeke J, Sumner C, Fischbeck K, and Burnett B : Histone deacetylase inhibition suppresses myogenin-dependent atrogenic activation in spinal muscular atrophy mice. *Hum. Mol. Genet.* 2012 ; 21 : 4448 – 4459.
 - 16) Mielcarek M, Toczek M, Smeets C, Franklin S, Bondulich M, Jolinon N, Muller T, Ahmed M, Dick J, Piotrowska I, Greensmith L, Smolenski R, and Bates G : HDAC4-myogenin axis as an important marker of HD-related skeletal muscle atrophy. *PLoS Genet.* 2015 ; 11 : e1005021.
 - 17) Hitachi K, Nakatani M, Funasaki S, Hijikata I, Maekawa M, Honda M, and Tsuchida K : Expression levels of long non-coding RNAs change in models of altered muscle activity and muscle mass. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 ; 21 : 1628.