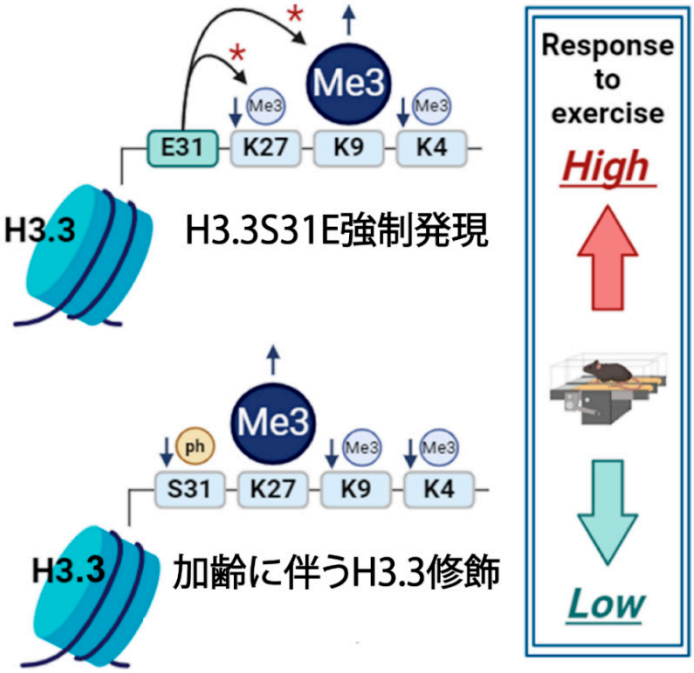
7　骨格筋におけるヒストンバリアントH3.3の機能解明	河野　史倫

【目的】エピジェネティクスは、ヒストンや DNA への化学修飾が遺伝子構造を変化させることで遺伝子を転写制御する仕組みである。ヌクレオソームを形成するコアヒストンのひとつであるヒストン H3 には、カノニカルな H3.1 および H3.2、ノンカノニカルな H3.3 のバリアントが知られており、出生後の臓器では加齢に伴い H3.1/3.2 から H3.3 に置き換わることが知られている。骨格筋においても加齢に伴い H3.3 の蓄積が起こるが、その役割は不明である。そこで本研究は、H3.3 特有の化学修飾である H3.3S31ph の加齢変化ならびにその機能を明らかにすることを目的として実施した。

【方法】C57BL/6J 雄マウスを用いて一連の実験を実施した。加齢に伴う変化を調べるために、8 週齢と 75 週齢の前脛骨筋において H3.3S31ph 発現を比較した。骨格筋特異的にリン酸化模倣 H3.3S31E を発現するウイルスベクターを作製し、30 週齢時に前脛骨筋へ注入した。40 週齢時および 50 週齢時に、骨格筋の運動応答機能を評価するため、トレッドミルを用いた急性走運動テストを実施した。前脛骨筋のサンプリングは運動終了 2 時間後に行った。これらの筋サンプルを用いて、ウェスタンブロットによるヒストン発現解析および運動応答性遺伝子群を対象として遺伝子発現解析を実施した。

【結果】H3.3S31ph 発現は、8 週齢に比べ 75 週齢で有意に減少した。ウイルスベクターを注入した筋では、50 週齢時に H3.3 自体の有意な発現増加が認められた。H3.3 発現増加に伴い H3.3S31ph、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3 いずれの化学修飾も増加したが、H3.3S31E 強制発現では H3K9me3 の有意な増加、H3K4me3 ならびに H3K27me3 の有意な低下が認められた。運動応答性遺伝子の発現量は、安静状態において H3.3S31E を強制発現した筋で有意に低下したものの、急性運動に対する応答性は空ベクターを注入した筋に比べ増大する傾向であった。加齢に伴い増加する H3.3 では、S31 リン酸化の低下に起因し H3K9me3 低下・H3K27me3 増加することが明らかとなった。

加齢に伴う骨格筋ヒストン H3.3 特有のヒストン修飾と S31 リン酸化の関係



7. 骨格筋におけるヒストンバリアント H3.3 の機能解明

河野　史倫

松本大学 健康科学研究科

Key words：骨格筋，エピジェネティクス，加齢，ヒストン，運動

緒　言

加齢に伴う骨格筋量・筋力の低下は、自立した身体活動を妨げ、QOL ならびに ADL の著しい低下を招く。ADL の低下は全身におけるエネルギー代謝を鈍化させるだけでなく、社会とのつながりを断絶し認知症や老後うつ発症のトリガーにもなる。したがって、加齢に伴う骨格筋機能低下を予防することが健康長寿社会実現の key となることに疑う余地は無い。加齢に伴う骨格筋の病態としてはサルコペニアがよく知られており、オートファジー異常や活性酸素によるミオシン等の酸化変性、サテライト細胞の減少および筋線維形成能力低下、運動神経剥離による筋線維壊死とそれに関連した筋組織の線維化などが原因とされている。しかしながら、これらは病態変容時に起こっている変化であり、骨格筋の加齢変化には未病状態が長いところにも特徴がある。現に、サルコペニアの有病率は 70 歳以降劇的に増加するが、骨格筋量低下は 40 代から既に起こっていることが報告されている［1］。しかしながら、加齢に伴う未病状態において骨格筋にどのような変化が起こっているのか詳細は不明である。

エピジェネティクスは、ヒストンや DNA への化学修飾が遺伝子構造を変化させることで遺伝子を転写制御する仕組みである。ヌクレオソームを形成するコアヒストンのひとつであるヒストン H3 には、カノニカルな H3.1 および H3.2、ノンカノニカルな H3.3 のバリアントが知られており、分化時における組織特異的遺伝子領域への H3.3 の挿入は筋分化過程において不可欠である［2］。出生後の臓器では H3.3 が増加し、加齢に伴い H3.1/3.2 から H3.3 に置き換わる［3］。マウス骨格筋でも同様に加齢に伴い H3.3 へ置き換わることが確認されている（Masuzawa et al.未発表データ）。しかしながら、加齢に伴う骨格筋における H3.3 の役割に関してはこれまで研究がなされていない。31 番目セリン（S31）は H3.3 特有のアミノ酸残基であり、リン酸化（H3.3S31ph）を受けることが知られている。そこで本研究は、加齢に伴う骨格筋 H3.3S31ph の変化ならびにその機能を明らかにすることを目的として実施した。

方　法

1. 実験動物

マウスを用いた全ての動物実験は、松本大学研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号：2023 動実-3）。実験には C57BL/6J 雄マウス（日本クレア）を使用し、搬入から実験開始まで 1 週間馴化させた。若齢・高齢マウスの比較研究には、8 週齢 3 匹、75 週齢 3 匹を用いた。ウイルスベクター投与実験には 30 週齢 36 匹を用いた。餌および水は自由摂取とした。飼育室は室温 23℃、湿度 40～60%、12 時間毎の明暗サイクルを維持した。筋サンプリングは炭酸ガス処理による安楽死直後に行い、摘出筋は液体窒素で凍結した後、解析まで－80℃下で保存した。

2. ウイルスベクター

H3.3S31 を E31 に置換することでリン酸化模倣する変異ヒストン発現モデルを作製した。骨格筋特異的 ACTA1 プロモーターの制御下において HA タグ付き H3.3 または H3.3S31E を発現するアデノ随伴ウイルス（血清型 9）ベクターを構築・パッケージング（VectorBuilder 受託サービス）し、両側前脛骨筋に 1×1,011 ゲノムコピー筋注した。コントロール群には ACTA1 プロモーターの下流に非コード配列（stuffer）を有するベクターを注入した。ベクター注入は 30 週齢時に実施し、その後 10 週間毎に急性運動テストを行い前脛骨筋サンプリングを実施した（各時点 n＝18）。

3. 急性走運動テスト

骨格筋の運動応答機能を評価するため、各時点でトレッドミルを用いた急性走運動テストを実施した。Stuffer 群、H3.3 群、H3.3S31E 群をそれぞれ非運動群（各 n＝3）と運動群（各 n＝3）に分け、運動群には 30 分間の走運動（15 m/min）を実施した。運動終了 2 時間後に両群から前脛骨筋をサンプリングした。

4. ウェスタンブロット

凍結筋の一部から EpiQuik Total Histone Extraction Kit（Epigentek）を用いて総ヒストン分画を抽出した。ウェスタンブロットによるタンパク質発現の定量法は先行研究［4］と同様に実施し、特異的抗体を用いて HA タグ、H3.3、H3.3S31ph、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3 を検出した。バンドの定量には Image J を用い、面積×濃度の値により発現量を評価した。

5. 遺伝子発現解析

凍結筋の一部から Isogen（ニッポンジーン）を用いて総 RNA を抽出し、SuperScript VILO master mix（Invitrogen）を用いて cDNA 合成した。先行研究［4］によって急性運動に対する増加応答が報告されている遺伝子群を解析対象とした。遺伝子発現の定量にはリアルタイム PCR 法を用い、内部標準因子 Gapdh の Ct に対する相対発現量として算出した。

6. 統計処理

データの比較には一次元配置分散分析を行い、2 群間の比較には Scheffe's post hoc test を用いた。実験群が 2 群のみの場合は、対応の無い t 検定により評価した。有意水準は $p<0.05$ とした。

結果および考察

総 H3.3 に対する H3.3S31ph の相対発現量は、若齢（8 週齢）に比べ高齢（75 週齢）で有意に減少した（図 1）。ウイルスベクターにより H3.3 を強制発現した場合、50 週齢（投与 20 週間後）で有意な H3.3 発現の増加が認められた（図 2）。内因性 H3.3 発現が多いため、導入遺伝子に由来するタンパク質発現が高まるまでに長期間を要したと考えられる。H3.3 発現増加に伴い、H3.3S31ph 発現が有意に増加した。このことから、H3.3S31ph 修飾は上流パスウェイの活性に依存することが示唆された。H3.3S31E を強制発現した場合、50 週齢時点において H3K9me3 の有意な増加、H3K4me3 ならびに H3K27me3 の有意な低下が認められた（図 2）。これらの変化は、H3.3S31ph が他の残基におけるヒストン修飾に影響を与えたことを示す。加齢に伴う前脛骨筋の H3.3 増加は、H3K27me3 修飾変化と正の相関を有する。逆に、H3K4me3 や H3K9me3 は H3.1/3.2 と相関し、加齢に伴い減少することが先行研究の結果から明らかになっている（Masuzawa et al.未発表データ）。以上の事象を踏まえると、H3.3S31ph が H3K9me3 と H3K27me3 の切り替えに役割を果たしていることが示唆できる。ヘテロクロマチンは凝集した遺伝子構造であり、遺伝子転写を抑制またはサイレンシングする役割を持つことが知られている。H3K9me3 は構成的ヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾であり、テロメアやセント

ロメアのような遺伝子転写がサイレンシングされている領域に多く見られる［5］。H3K27me3 は条件的ヘテロクロマチンを形成し、遺伝子転写を抑制することが知られている［6］。したがって、加齢に伴う H3K9me3 から H3K27me3 へのシフト、H3.3S31ph 模倣による H3K27me3 から H3K9me3 への変化は、H3.3S31ph が構成的ヘテロクロマチンの維持に役割を果たしている可能性を示唆する。

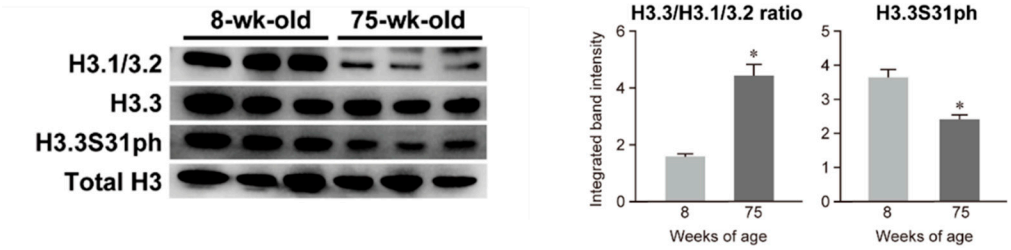


図 1. 加齢に伴うヒストン H3.3 のリン酸化変化

8 週齢および 73 週齢マウスの前脛骨筋を用いて発現を比較した。H3.3 は若齢性のバリアント H3.1/3.2 の発現量に対する相対値とした。H3.3S31ph はそれぞれの総 H3.3 量で補正した。*：p＜0.05 vs. 8 週齢。

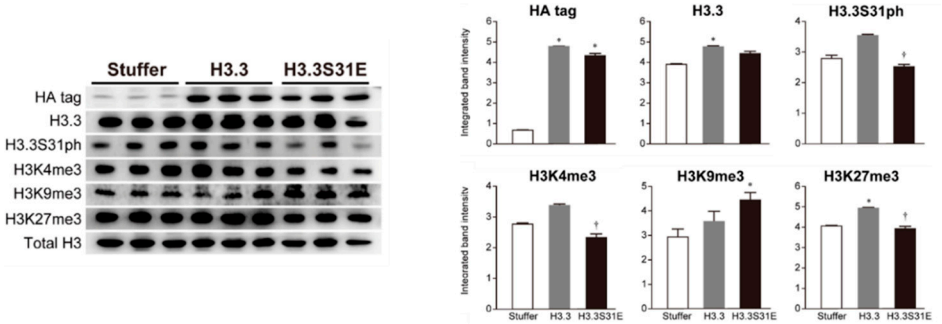


図 2. H3.3S31E 変異体の強制発現によるヒストン修飾変化

総 H3 に対する相対発現量。*：p＜0.05 vs. stuffer。†：p＜0.05 vs. H3.3。

標的遺伝子群の発現量は、安静状態において H3.3S31E 群（50 週齢）で有意に低下した（図 3）。遺伝子転写制御がより抑制的な機構にシフトしたことが考えられ、先述したヒストン修飾変化の結果とも合致する。一方で、急性運動に対する遺伝子発現応答は、H3.3S31E 群（50 週齢）において Stuffer 群よりも増大する傾向が認められた。これらの結果から、安静状態における遺伝子発現を抑えることで生理刺激への応答性を高める仕組みが存在する可能性も推察できる。我々は先行研究［7］において、H3K4me3 と H3K27me3 の共修飾が運動に対する骨格筋の遺伝子応答性ならびに運動適応に重要であることを報告した。クロマチンをコンデンスし凝集構造をとることが、生理刺激に対する応答性を高めるのに重要であることが示唆される。

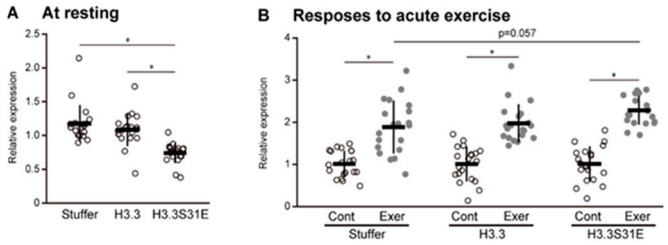


図 3. H3.3S31E 変異体の強制発現による遺伝子発現変化

急性運動に対して発現増加応答を示す 20 種の遺伝子を解析対象とした。

A）安静状態における遺伝子発現の比較。ドットプロットは各遺伝子の発現量（群の平均値）を表す。データは遺伝子毎に全群の平均値で補正した。

B）急性運動 2 時間後（Exer）における遺伝子発現変化。非運動群（Cont）は同タイミングでサンプリングを実施した。データは各群の非運動群における平均値が 1 になるよう補正した。

*：$p<0.05$。

本研究では、骨格筋における H3.3 がどのような機能を有するのか追究した。H3.3S31ph は H3.3 特有の化学修飾であり、加齢に伴い低下することが明らかとなった。H3.3S31ph は構成的ヘテロクロマチンの特徴である H3K9me3 修飾を増加することも分かった。骨格筋において H3.3 は加齢に伴い蓄積するものの、付加される化学修飾には上流パスウェイが重要であり、ヒストン修飾パターンによって H3.3 そのものの機能を制御することが見えてきた。H3.3S31ph の上流・下流で起こっている細胞内イベントを明らかにするため、さらなる研究が必要である。

文　献

1） Lee MM, Jebb SA, Oke J, Piernas C. Reference values for skeletal muscle mass and fat mass measured by bioelectrical impedance in 390 565 UK adults. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2020 Apr;11(2):487-496. PMID: 31943835 DOI: 10.1002/jcsm.12523. Epub 2020 Jan 13.

2） Harada A, Maehara K, Sato Y, Konno D, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y. Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(2):775-86. PMID: 25539924 DOI: 10.1093/nar/gku1346. Epub 2014 Dec 24.

3） Tvardovskiy A, Schwammle V, Kempf SJ, Rogowska-Wrzesinska A, Jensen ON. Accumulation of histone variant H3.3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape. Nucleic Acids Res. 2017 Sep 19;45(16):9272-9289. PMID: 28934504 DOI: 10.1093/nar/gkx696.

4） Ohsawa I, Kawano F. Chronic exercise training activates histone turnover in mouse skeletal muscle fibers. FASEB J. 2021 Apr;35(4):e21453. PMID: 33749947 DOI: 10.1096/fj.202002027RR.

5） Saksouk N, Simboeck E, Dejardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. Epigenetics Chromatin. 2015 Jan 15:8:3. PMID: 25788984 DOI: 10.1186/1756-8935-8-3. eCollection 2015.

6） Trojer P, Reinberg D. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? Mol Cell. 2007 Oct 12;28(1):1-13. PMID: 17936700 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.09.011.

7） Shimizu J, Kawano F. Exercise-induced histone H3 trimethylation at lysine 27 facilitates the adaptation of skeletal muscle to exercise in mice. J Physiol. 2022 Jul;600(14):3331-3353. PMID: 35666835 DOI: 10.1113/JP282917. Epub 2022 Jun 12.