

研究結果報告書

2024年2月27日

<研究課題> 糖代謝酵素に着目した新たなサルコペニア予防法の提案

代表研究者 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教 正木 聡
共同研究者 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 片岡 直行

【抄録】

超高齢社会を迎えている我が国において、高齢者の骨格筋機能維持は、健康寿命の延伸に直結する重要な課題である。そのため、骨格筋の維持に関わる遺伝子を新たに見いだすことや、それらが制御する筋再生や筋分解のメカニズムを分子生物学的に解明することは、社会的ニーズの高い研究課題である。本研究では、解糖系酵素であるピルビン酸キナーゼ M (PKM) に焦点をあてる。選択的スプライシングによって PKM1 と PKM2 の2つのスプライシングアイソフォームが存在するが、骨格筋では PKM1 が優位に発現している。そこで、両者の発現バランスを制御する機構は骨格筋維持において重要な役割を担っているのではないかと仮説を立て、PKM1 の発現が優位となるスプライシングを誘導する化合物を同定することにした。スプライシングスイッチを検出するレポーターを用いて機能既知化合物をスクリーニングしたところ、いくつかの既承認薬をヒット化合物として得ることに成功した。

1. 研究の目的

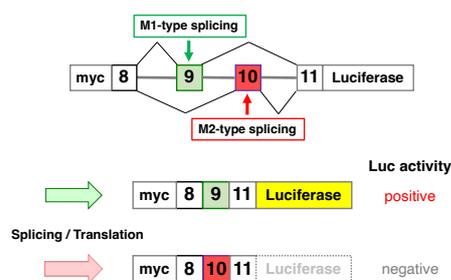
骨格筋は、成人の体積において約 40%を占める運動機能を担う最大の組織である。ヒトでは 30 歳を過ぎると、10 年毎に約 5%前後の割合で筋量が減少し、60 歳を超えるとその減少率はさらに加速する。加齢による骨格筋の退縮や運動機能の低下をサルコペニアと呼ぶが、サルコペニアは日常生活動作の障がいにつながり、生活の質を悪化させ、寝たきり状態に至る大きな要因となる。我が国の令和 5 年度の高齢化率（65 歳以上の人口が占める割合）は 29.0%、75 歳以上の人口割合は 15.5%に達している（令和 5 年版高齢社会白書）。世界に類を見ない超高齢社会を迎えている我が国のみならず、世界レベルで高齢化率が急速に進展しており、健康寿命延伸の観点からも骨格筋の機能維持は喫緊の社会課題である。

そのため、骨格筋の形成や維持に関わる遺伝子を新たに見いだすことや、それらが制御するメカニズムを解明することは、重要な研究課題である。骨格筋は「筋再生」と「筋分解」の精妙なバランスで制御されているが、加齢や疾病が要因となり、その均衡が崩れることで骨格筋の減少が惹起される。

我々はこれまでに解糖系酵素であるピルビン酸キナーゼ M (PKM) の機能解析に取り組んできたが、その研究過程において、PKM が筋分化を制御する重要な役割をもつことが示唆された。この PKM には相互排他的な選択的スプライシングによって Exon 9 を選択した M1 型 (PKM1) と Exon 10 を選択した M2 型 (PKM2) の2つのスプライシングアイソフォームが存在する。ヒトの正常組織では、骨格筋、脳、神経、心臓で PKM1 が優位に発現していたことから、我々は、PKM1 の発現量を低下させない、もしくは、増加させるような生理活性物質や化合物を見いだすことは、骨格筋維持を志向した創薬研究に有意義な知見をもたらすと考えた。

2. 研究方法と経過

本研究目的を達成するためには、簡便かつ高感度にスプライシングスイッチを検出することが重要となる。本研究代表者は Exon 9 を選択するスプライシング (M1 型スプライシング) を受けた場合のみルシフェラーゼに読み枠が合致するレポーター (PKM-alternative splicing (AS) reporter) を作製した（次頁に概念図を示す）。



前培養した HeLa 細胞に PKM-AS reporter をトランスフェクションし (96 well プレート)、24 時間後に機能既知化合物ライブラリーの薬剤を最終濃度 10 μM となるように細胞に添加した。その後、24 時間後に細胞溶解液と発光基質の混合液を各 well に加えてルミノメーターでルシフェラーゼ活性を計測した。なお、ポジティブコントロールとして、M1 型および M2 型スプライシングのどちらの場合でもルシフェラーゼにフレームが一致する発現するレポーターを用いた。

3. 研究の成果

約 1200 種類の化合物をスクリーニングした結果、計 23 種類の化合物がポジティブコントロール相当までルシフェラーゼ活性を増加させた。これらのヒット化合物を薬効別に整理すると、14 種類、2 種類がそれぞれ同一系統の既承認薬であった (以下、分類 A と分類 B とする)。残りの 7 種類については薬効分類の重複はなかった (論文未発表データのため、具体的な薬剤名の公表は控えたい)。分類 A は骨格筋に作用することが知られている薬剤群であること、また、分類 B は PKM1 が優位に発現する組織に作用する薬剤群であったことは興味深い結果である。

4. 今後の課題

貴財団の助成により、スプライシング調節を介して PKM1 の発現を誘導する候補化合物を得ることができた。PKM に限らず、これまでに相互排他的な選択的スプライシングを調節する化合物は発見されていないことから、さらなる解析を進めることで大きなインパクトをもつ成果になり得ると期待している。当初、これらのヒット化合物で様々な細胞を刺激し、内在性 PKM1 の mRNA 発現量が増加するか RT-PCR によって解析する予定であったが、代

表研究者の所属が移動したことにより、実験の遂行に遅れが生じた。今後、PKM スプライシングアイソフォームの発現量比の解析を含めた検証実験に取り組む。

一方、M1 型スプライシングを制御する因子 (トランス制御因子) を同定することも PKM pre-mRNA のスプライシング機構を解明するための重要な課題である。PKM-AS reporter 由来の転写物を解析することで感度よくスプライシングスイッチを検出することができるが、これはレポーターが導入される細胞でスプライシングに必要な制御因子が発現していることが前提となる。HeLa 細胞の核抽出液は *in vitro* でのスプライシング反応実験などで頻繁に使用されていること、本研究で実施したスクリーニングが HeLa 細胞を用いて成功したことから、少なくとも PKM の相互排他的スプライシングを制御する因子は HeLa 細胞では揃って発現していると推測される。条件検討の段階では、ルシフェラーゼ活性の増加を顕著に検出できるよう、PKM1 の発現量が極めて低い細胞 (悪性度の高いがん細胞株 X) を用いて同一の化合物ライブラリーをスクリーニングしたが、ルシフェラーゼ活性を増加させる化合物は皆無であった。このことから、細胞株 X では M1 型スプライシングに向かわせる制御因子の発現が強く抑制されていることが示唆される。これらを踏まえ、HeLa 細胞と細胞株 X の遺伝子発現パターンの違いを RNA シークエンスで網羅的に解析し、その中からスプライシング調節因子を選択することで PKM スプライシングのトランス制御因子を同定する予定である。さらに、本研究で得たヒット化合物がこれらの因子の発現や活性化に影響を及ぼすかについても検証したい。

5. 研究成果の公表方法

「今後の課題」で述べたような解析を実施し、得られた成果を日本 RNA 学会、日本分子生物学会、日本薬学会などの年会で発表したい。また、その研究成果については、生化学や分子生物学の分野をカバーする英文国際誌に原著論文として投稿し、公表する予定である。

以上

Development of cure for sarcopenia focusing on glycolytic enzymes

Primary Researcher: **So Masaki**
Assistant Professor
Graduate School of Agriculture and Life Sciences,
The University of Tokyo

Co-researchers: **Naoyuki Kataoka**
Associate Professor
Graduate School of Agriculture and Life Sciences,
The University of Tokyo

In Japan, which has been a super-aged society, to maintain the function of skeletal muscle is regarded as a primary concern that is directly related to the extension of healthy life expectancy. Therefore, the discovery of new genes involved in skeletal muscle regulation and the elucidation of the molecular mechanisms of muscle regeneration and degradation are important research subjects based on contemporary social needs.

In this study, we focus on pyruvate kinase M (PKM), a glycolytic enzyme. PKM has two splicing isoforms, PKM1 and PKM2, generated by alternative splicing, and PKM1 predominantly is expressed in skeletal muscle. Thus, we hypothesized that regulation of PKM1/PKM2 balance through modulating splicing could be one of the essential mechanisms in skeletal muscle, and then carried out a screening for identification of compounds inducing M1-type splicing with our original splicing reporter. Consequently, we obtained several approved drugs as candidates of PKM1 inducer.