

## ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

骨格筋の新たな分化制御機構  
— 高齢化社会における運動器障害の克服を目指して —

本田 健

山口大学大学院医学系研究科薬理学講座 (薬理学) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 筋分化, クロマチン再構成, 骨格筋, DNA鎖切断, non-coding RNA

## 和文抄録

骨格筋は成体幹細胞である筋衛星細胞から、筋芽細胞、筋管細胞を経て筋繊維へと成熟していく。病的な筋萎縮の要因として、筋再生の根幹を成す筋衛星細胞の自己複製能や分化能に着目した研究が多くなされているが、それだけでは説明できないこともあり、細胞非自律的な機構のほか、筋芽細胞以降の分化過程も重要視されている。しかし、骨格筋の分化には細胞融合を伴う複雑な行程があり、その制御機構においては未解明な部分が多く残されている。それらを紐解き、詳細な分子機構を把握することは、様々な筋疾患の病態解明や新規治療法の開発において重要な課題である。筋分化プロセスは、MyoDをはじめとする転写因子ネットワークが分化時系列に従って階層的に制御している。近年、それら転写因子の働きが、単にゲノムの塩基配列に規定されるだけでなく、クロマチンの立体構造に大きく影響を受けることが分かってきた。それに伴い、クロマチン構造制御に関わるエピジェネティック調節機構をはじめ、その機構を始動させる特殊な転写因子の存在、一過性の限定的DNA鎖切断や様々なnon-coding RNA種によるクロマチン再構成の調節機構など、多様な仕組みが次々と明らかにされてきている。このような基礎的知見の集積は、骨格筋における分化制御機構の統合的な理解に極めて重要である。骨格筋は健康のバロメーターとして注目されて

いるが、高齢者の多くがサルコペニア（筋量と筋力の病的な低下）を発症している。これは死亡や要介護化の危険因子となり、超高齢化社会を迎える本邦ではその対策が急務であるが、対症療法に頼るしかない現状がある。骨格筋形成における詳細な分子基盤の構築が進めば、サルコペニア等の病態を分子レベルで把握することが可能となる。また、それを踏まえた根本的治療法や予防法の開発が促進され、健康寿命の延伸につながる事が期待される。

## はじめに

骨格筋は、運動や姿勢保持を担う人体最大規模の臓器である。また、エネルギー代謝調節器官あるいは内分泌器官でもあり、サルコペニアのような骨格筋量および骨格筋力の病的な低下は、運動機能障害だけでなくメタボリックシンドロームなど全身性の病態を引き起こしやすくなる<sup>1, 2)</sup>。一方で、糖尿病など生活習慣病や慢性炎症が骨格筋を萎縮させる要因にもなっている<sup>2)</sup>。この悪循環で加速される筋機能障害は、特に高齢者では要介護化を促す危険因子となるため、超高齢化社会を迎える本邦ではその対策が急務となっている。

骨格筋は損傷を受けると、筋衛星細胞が筋芽細胞（筋前駆細胞）へと分化し、増殖、細胞融合を経て多核の筋管細胞、そして筋繊維へと成熟する。筋衛星細胞が筋再生の根幹を担うことから、その自己複製能や分化能の低下を、病的な筋萎縮の要因として紐づける報告が多くなされている<sup>3)</sup>。しかしながら、

筋衛星細胞だけでは説明できないことも多く<sup>4)</sup>、筋芽細胞以降の分化と病態との関わりも指摘されている。骨格筋における一連の筋分化制御機構は古くから研究されているが、未だに新たな知見が次々と報告され、その全容解明には至っていない。本稿では、骨格筋形成における筋衛星細胞および筋芽細胞の分化過程に焦点をあて、転写因子ネットワークによる分化制御をはじめ、特に近年盛んに研究されているクロマチン再構成に着目した筋分化の調節機構について概説する。これらの基礎的知見の集積は、様々な筋疾患の病態解明や新規治療法の開発、さらには再生医療における骨格筋作製の開発分野においても有意義な情報基盤をもたらすことが期待される。

### Muscle regulatory factors (MRFs) 転写因子群による骨格筋分化制御

筋線維は多核細胞から構成されており、その筋形質膜上には成体幹細胞である筋衛星細胞が基底膜に挟まれる形でわずかに存在する<sup>5, 6)</sup>。通常、筋衛星細胞は静止期にあり、筋衛星細胞特異的に発現する転写因子Pax7がその静止状態を維持し、幹細胞性を保っている。筋損傷等の刺激により、筋衛星細胞は活性化して筋芽細胞への分化を開始する。その刺激因子には、増殖因子やサイトカインが知られるが、最近、損傷筋組織から逸脱した酵素が寄与することも発見された<sup>7)</sup>。筋芽細胞への分化過程ではPax7発現の抑制と共に、筋分化制御因子MyoDが誘導される。MyoDは1986年にクローニングされ、非筋細胞にMyoDを強制発現させると筋細胞へ転換されるという重要な発見がなされ<sup>8)</sup>、その後の筋分化研究を大きく飛躍させた。MyoDは、共通構造を持つMyf-5, Myogenin, MRF-4とファミリーを形成しており、それらはMuscle regulatory factors (MRFs) と呼ばれている<sup>9)</sup>。MRFsは分化の各ステージにおいて、筋分化に関連する転写因子群を統制している<sup>10)</sup>。具体的には、筋衛星細胞の活性化初期にMyf-5が発現して、MyoDと共に筋芽細胞への分化を推進する。筋芽細胞への分化後は一旦細胞周期に入って増殖し、組織修復に必要な筋芽細胞数を確保する。その後、増殖が止まるとMyf-5とMyoDの下流遺伝子であるMyogeninが誘導され、筋分化への運命が決定的となり、単核筋芽細胞どうし（あるいは筋芽細胞

と筋繊維)の融合が促され、多核の筋管細胞が形成される。その後の終末分化や筋線維の維持には、MRF-4が重要な役割を果たしている。MRFsの周辺では、MRFsのDNA結合をサポートする転写因子E2A, 協調因子であるMEF2ファミリー転写因子群、また抑制因子であるIdファミリー、その他多くのシグナル経路が関与しており、MRFs機能を協調的に調節することで、骨格筋は適切に成熟していく<sup>10)</sup>。

### 骨格筋分化におけるクロマチン再構成

MRFsを中心とする転写因子群が標的配列にアクセスするには、凝集状態にあるクロマチン構造が“緩む”必要がある。この高次構造の変動は個体発生や細胞分化の過程では必須のイベントであり、その駆動システムとしてDNAやヒストンの化学修飾機構が有名である<sup>11)</sup>。骨格筋分化においても、各分化段階におけるDNA/ヒストン修飾のプロファイル変遷、担当転写因子のアクセシビリティや転写活性、病態との関わりについて、多くの知見が蓄積されている<sup>12-14)</sup>。このように筋分化におけるエピジェネティクスは近年広く議論されているが、例えば転写因子自体の働きかけ、DNA切断、RNAなど、DNA/ヒストン修飾以外の機構もクロマチン再構成において重要な役割を持つ。ここでは、それらの筋分化における役割について触れたい。

クロマチンの構成単位であるヌクレオソームはDNAとヒストンが強固に結合しているが、これを最初に緩めて細胞分化を導く分子に“パイオニア転写因子”がある。この因子はヌクレオソームDNAに直接結合できる点で他の転写因子とは一線を画し、結合後にはクロマチン修飾蛋白質群をリクルートしてクロマチン再構成を促し、最終的に分化関連転写因子群を呼び寄せる<sup>15-17)</sup>。運命決定に関わる転写因子群の中でほんの一握りしかないパイオニア因子は、強制発現によって遠縁の体細胞でも特定の分化へ向かわせるリプログラミング能を持つ<sup>16)</sup>。Pax7はその一つであり、ヌクレオソームDNAへの結合様式や、リクルートする蛋白質群、クロマチン再構成への分子機構など詳細な解析が進んでいる<sup>18, 19)</sup>。しかし、現時点では下垂体メラノトロープにおける解析が先行しており、筋衛星細胞におけるPax7のパイオニア作用の知見については今後の研究が待た

れる。そのほか、筋分化関連転写因子においてリプログラミング能を持つものにMyoDがある。特に中胚葉系細胞では強い活性が見られるが、非中胚葉系細胞においても補因子Pbx-Meisがあればリプログラミング能が発揮される<sup>20, 21)</sup>。この補因子要求性は骨格筋分化への特異性に関わることが示唆されている<sup>22)</sup>。MyoDのクロマチン再構成機能に関する知見は、1997年、MyoD発現後により骨格筋特異的な遺伝子座が“緩む”という発見に端を発する<sup>23)</sup>。以降、p300やPCAFなどのヒストン修飾酵素をはじめ<sup>24, 25)</sup>、クロマチン再構成因子複合体SWI/SNFがMyoDによって筋特異的な遺伝子座へリクルートされるなど<sup>26)</sup>、クロマチン再構成にかかる分子機序が解明されてきた。さらに最近、MyoDはシス調節因子の中でも特にインシュレーター構造（プロモーターやエンハンサーの立体配置を制御する領域）に対して、インシュレーター構成蛋白質であるCTCFを介して作用し、筋特異的な遺伝子を活性化することが示された<sup>27)</sup>。また、ゲノム内においてMyoDが結合する部位のうち、筋分化過程で変動する遺伝子のプロモーター領域に結合する割合はわずか5%であり、MyoDは従来のプロモーターを介した作用とは別の働き（クロマチン再構成の制御など）が大勢を占めることが推測されている<sup>27)</sup>。

### 筋芽細胞における特徴的なクロマチン動態制御機構

クロマチンの構造変動は、バイオニア因子のDNA結合やDNA/ヒストンの化学修飾などで生じる、分子間相互作用における物理化学的変化が駆動力となるが、クロマチンを緩める別の様式としてDNA鎖切断がある。これは不測のDNA損傷ではなく、制御された生理的機構である。例えば、減数分裂時の組換え<sup>28)</sup>、抗原受容体遺伝子に多様性を持たせるV(D)J組換え<sup>29)</sup>、B細胞におけるクラススイッチ組換え<sup>30)</sup>、複製時におけるDNAスーパーコイルの開放<sup>31)</sup>などで見られ、それらの制御機構は詳しく解析されている<sup>32)</sup>。また、性ホルモンや熱ショック、血清刺激、神経興奮剤など、個別の刺激に対応した転写標的部位において、限定的なDNA鎖切断が生じ、標的遺伝子発現が調節されるという報告もある<sup>33-35)</sup>。さらにメラニン芽形成細胞、白血病細胞、神経前駆細胞、筋芽細胞などでは、分化刺激による

DNA鎖切断が観測されており、それらが分化促進に寄与することが見出されている<sup>36-44)</sup>。骨格筋では40年ほど前から、培養細胞での分化や生体での筋再生時に出現する一過性DNA鎖切断が知られていた<sup>45-47)</sup>。その後、LarsenらによってDNA鎖切断は筋芽細胞から筋管細胞への移行時に見られ、Caspase-activated DNaseが切断を担い、それが筋分化関連遺伝子の発現に必須とする重要な知見が示された<sup>39)</sup>。しかしながら、具体的な切断部位に関する情報は依然として乏しい。神経細胞では、インシュレーター形成に重要な部位が切断され、エンハンサー/プロモーター間相互作用の位相的制約を解いて標的遺伝子発現を促すというモデルが提唱されている<sup>33)</sup>。ただし、その切断を担うのはトポイソメラーゼであり、筋芽細胞との共通性あるいは組織特異性を説明する仕組みの解明は今後の課題である。

健全な分化の進行には、切断後の修復が必須となる。筋芽細胞分化ではXRCC1の関わる修復機構が働くようだが、塩基除去修復か非相同端再結合かの結論は出ていない<sup>48)</sup>。著者らも、筋芽細胞分化の必須因子として着目してきたPDZRN3が<sup>49, 50)</sup>、筋芽細胞分化時のDNA鎖切断の修復に関わることを報告してきた。PDZRN3は筋衛星細胞から筋芽細胞への移行期に誘導され、その発現を抑制すると筋分化時のDNA鎖切断が過剰に起こって細胞死を招く。PDZRN3はサイクリンA2の発現を維持して筋芽細胞分化時のDNA鎖切断修復に寄与する仕組みを明らかとした<sup>51)</sup>。サイクリンA2は細胞周期調節以外に、DNA鎖切断の初期応答センサーでありDNA修復因子でもあるMre11のmRNAに結合し、その翻訳を促進する機能を持つ<sup>52)</sup>。しかしながら、詳しい修復機構や周辺制御機構に関する情報は未だ乏しく、DNA鎖切断の誘導因子や切断部位特異性なども含めて、今後の解明が待たれる。

### 骨格筋分化とnon-coding RNA

様々な細胞機能を調節するnon-coding RNA (ncRNA) は、骨格筋分化においても重要な役割を持つ。短鎖ncRNAのmiRNAでは、2000年中頃に骨格筋特異的なmiR-1やmiR-133が発見されて以降<sup>53, 54)</sup>、筋衛星細胞を含めて各分化段階にある細胞において、その増殖や分化を調節する多くのmiRNAが同

定された<sup>55)</sup>. miRNAにやや遅れて, Long ncRNA (lncRNA) の機能解明が目覚ましい進展を遂げ, 筋分化における役割も次々と明らかにされている. その機能は, miRNAに対するスポンジ (取込み抑制) 作用や, mRNAにおける安定性, 翻訳効率, スプライシングの制御, MRFsを含む様々な蛋白質への直接結合による機能制御, 標的クロマチン領域の構造制御など多岐に渡り, いずれも筋分化関連蛋白質の発現制御を通して筋分化を調節している<sup>56)</sup>. またnon-codingという名に反してペプチドをコードするlncRNAが発見され, SPARやMyomixerなどlncRNA由来ペプチドが骨格筋再生を促す例も知られている<sup>57, 58)</sup>. さらに, 1970年代に発見されていた環状RNA (circRNA) についても<sup>59)</sup>, 解析手法の進歩に伴い, lncRNA様の機能を持つことが解明され, 筋分化においても様々な作用が報告されている<sup>60)</sup>. 骨格筋細胞には多くのcircRNAが発現しているが, 未だ機能不明のものが多く, 今後, 筋形成におけるcircRNA群の全容が見えてくると思われる.

#### 最後に

本稿では骨格筋分化において, 転写因子ネットワークによる分化制御をはじめ, パイオニア因子やDNA鎖切断によるクロマチン再構成制御, ncRNAによる分化調節機構について概説した. 特に, クロマチン再構成やncRNAは目覚ましい進展を遂げている分野である. ここでは言及できなかったが, ncRNAは化学修飾 (特に最も一般的で豊富なRNA修飾形態であるアデノシン6位窒素メチル化) によって, さらに調節を受けている<sup>61, 62)</sup>. このエピトランスクリプトミクス研究は比較的新しい分野であるが, 筋分化においてもその役割が明らかにされつつある<sup>63)</sup>. また, RNAと蛋白質が細胞内で凝集して周囲と分離した相を形成する“液-液相分離体”が, 様々な細胞機能を調節するマシナリーとして大きな注目を集めている<sup>64)</sup>. 筋芽細胞分化においても, その相分離体 (myo-granulesと呼ばれる) が一過性に形成されることが最近発見された<sup>65)</sup>. myo-granulesには, 骨格筋形成に必須のサルコメア関連蛋白質群をコードする一連のmRNAが内包されており, 細胞質においてサルコメアが新たに構成される箇所, 新生サルコメア蛋白質を効率的に局在化すると

いうモデルが提案されている<sup>65)</sup>. このように, 新たな潮流が骨格筋分野に波及し, 多面的な知見が集積してきている. 様々な側面から骨格筋分化を制御する分子機構の理解が進めば, 筋疾患の根本にアプローチする新たな治療法や予防法開発の基盤情報となり, ひいては健全な骨格筋の維持, そして健康寿命の延伸に貢献することが期待される.

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導を頂いた山口大学大学院医学系研究科薬理学講座教授朝霧成拳先生をはじめ, 同講座スタッフの皆様, そして本研究をご指導頂いた薬理学講座前教授の乾誠先生に深く感謝致します. 本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業の支援を受けております.

#### 引用文献

- 1) Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, et al. Sarcopenia. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 231-243.
- 2) Rubio-Ruiz ME, Guarner-Lans V, Pérez-Torres I, et al. Mechanisms Underlying Metabolic Syndrome-Related Sarcopenia and Possible Therapeutic Measures. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 647.
- 3) Brack AS, and Rando TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 226-237.
- 4) Fry CS, Lee JD, Mula J, et al. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med* 2015; 21: 76-80.
- 5) Hawke TJ and Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91: 534-551.
- 6) Zammit PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci* 2008; 121: 2975-2982.
- 7) Tsuchiya Y, Kitajima Y, Masumoto H, et al.

- Damaged Myofiber-Derived Metabolic Enzymes Act as Activators of Muscle Satellite Cells. *Stem Cell Reports* 2020 ; 15 : 926-940.
- 8) Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1986 ; 47 : 649-656.
- 9) Moncaut N, Rigby PWJ, Carvajal JJ. Dial M (RF) for myogenesis. *FEBS J* 2013 ; 280 : 3980-3990.
- 10) Chal J, Pourquié O. Making muscle : skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 2017 ; 144 : 2104-2122.
- 11) Chiarella AM, Lu D, Hathaway NA. Epigenetic Control of a Local Chromatin Landscape. *Int J Mol Sci* 2020 ; 21 : 943.
- 12) Laker RC, Ryall JG. DNA Methylation in Skeletal Muscle Stem Cell Specification, Proliferation, and Differentiation. *Stem Cells Int* 2016 ; 2016 : 5725927.
- 13) Sincennes MC, Brun CE, Rudnicki MA. Concise Review : Epigenetic Regulation of Myogenesis in Health and Disease. *Stem Cells Transl Med* 2016 ; 5 : 282-290.
- 14) Hernández-Hernández O, Ávila-Avilés RD, Hernández-Hernández JM. Chromatin Landscape During Skeletal Muscle Differentiation. *Front Genet* 2020 ; 11 : 578712.
- 15) Adachi K, Kopp W, Wu G, et al. Esrrb Unlocks Silenced Enhancers for Reprogramming to Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* 2018 ; 23 : 266-275.
- 16) Zaret KS. Pioneer Transcription Factors Initiating Gene Network Changes. *Annu Rev Genet* 2020 ; 54 : 367-385.
- 17) Larson ED, Marsh AJ, Harrison MM. Pioneering the developmental frontier. *Mol Cell* 2021 ; 81 : 1640-1650.
- 18) Mayran A, Khetchoumian K, Hariri F, et al. Pioneer factor Pax7 deploys a stable enhancer repertoire for specification of cell fate. *Nat Genet* 2018 ; 50 : 259-269.
- 19) Pelletier A, Mayran A, Gouhier A, et al. Pax7 pioneer factor action requires both paired and homeo DNA binding domains. *Nucleic Acids Res* 2021 ; 49 : 7424-7436.
- 20) Berkes CA, Bergstrom DA, Penn BH, et al. Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol Cell* 2004 ; 14 : 465-477.
- 21) Maves L, Waskiewicz AJ, Paul B, et al. Pbx homeodomain proteins direct MyoD activity to promote fast-muscle differentiation. *Development* 2007 ; 134 : 3371-3382.
- 22) Lee QY, Mall M, Chanda S, et al. Pro-neuronal activity of Myod1 due to promiscuous binding to neuronal genes. *Nat Cell Biol* 2020 ; 22 : 401-411.
- 23) Gerber AN, Klesert TR, Bergstrom DA, et al. Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin : a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev* 1997 ; 11 : 436-450.
- 24) Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, et al. p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J* 1997 ; 16 : 369-383.
- 25) Puri PL, Sartorelli V, Yang XJ, et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* 1997 ; 1 : 35-45.
- 26) Simone C, Forcales SV, Hill DA, et al. p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat Genet* 2004 ; 36 : 738-743.
- 27) Dall'Agnese A, Caputo L, Nicoletti C, et al. Transcription Factor-Directed Re-wiring of Chromatin Architecture for Somatic Cell Nuclear Reprogramming toward trans-Differentiation. *Mol Cell* 2019 ; 76 : 453-472.
- 28) Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. *Cell* 1997 ; 88 : 375-384.

- 29) Bredemeyer AL, Helmink BA, Innes CL, et al. DNA double-strand breaks activate a multi-functional genetic program in developing lymphocytes. *Nature* 2008 ; **456** : 819-823.
- 30) Panchakshari RA, Zhang X, Kumar V, et al. DNA double-strand break response factors influence end-joining features of IgH class switch and general translocation junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; **115** : 762-767.
- 31) Pommier Y, Sun Y, Huang SYN, et al. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Boil* 2016 ; **17** : 703-721.
- 32) Oster S, Aqeilan RI. Programmed DNA Damage and Physiological DSBs : Mapping, Biological Significance and Perturbations in Disease States. *Cells* 2020 ; **9** : 1870.
- 33) Madabhushi R, Gao F, Pfenning AR, et al. Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* 2015 ; **161** : 1592-1605.
- 34) Bunch H, Lawney BP, Lin YF, et al. Transcriptional elongation requires DNA break-induced signalling. *Nat Commun* 2015 ; **6** : 10191.
- 35) Morimoto S, Tsuda M, Bunch H, et al. Type II DNA Topoisomerases Cause Spontaneous Double-Strand Breaks in Genomic DNA. *Genes* 2019 ; **10** : 868.
- 36) Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Rep* 2003 ; **2** : 955-969.
- 37) Narciso L, Fortini P, Pagalunga D, et al. Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; **104** : 17010-17015.
- 38) Inomata K, Aoto T, Binh NT, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell* 2009 ; **137** : 1088-1099.
- 39) Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, et al. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; **107** : 4230-4235.
- 40) Larsen BD, Megeney LA. Parole terms for a killer : directing caspase3/CAD induced DNA strand breaks to coordinate changes in gene expression. *Cell Cycle* 2010 ; **9** : 2940-2945.
- 41) Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, et al. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat Cell Biol* 2014 ; **16** : 201-207.
- 42) Houlihan SL, Feng Y. The scaffold protein Nde1 safeguards the brain genome during S phase of early neural progenitor differentiation. *eLife* 2014 ; **3** : e03297.
- 43) Santos MA, Faryabi RB, Ergen AV, et al. DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. *Nature* 2014 ; **514** : 107-111.
- 44) Sinha M, Jang YC, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 2014 ; **344** : 649-652.
- 45) Farzaneh F, Zalin R, Brill D, Shall S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation. *Nature* 1982 ; **300** : 362-366.
- 46) Dawson BA, Lough J. Immunocytochemical localization of transient DNA strand breaks in differentiating myotubes using in situ nick-translation. *Dev Biol* 1988 ; **127** : 362-367.
- 47) Coulton GR, Rogers B, Strutt P, et al. In situ localisation of single-stranded DNA breaks in nuclei of a subpopulation of cells within regenerating skeletal muscle of the dystrophic mdx mouse. *J Cell Sci* 1992 ; **102** : 653-662.
- 48) Al-Khalaf MH, Blake LE, Larsen BD. Temporal activation of XRCC1-mediated DNA repair is essential for muscle differentiation. *Cell Discov* 2016 ; **2** : 15041.
- 49) Ko JA, Kimura Y, Matsuura K. PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. *J Cell Sci* 2006 ; **119** : 5106-5113.

- 50) Honda T, Inui M. PDZRN3 regulates differentiation of myoblasts into myotubes through transcriptional and posttranslational control of Id2. *J Cell Physiol* 2019 ; **234** : 2963-2972.
- 51) Honda T, Inui M. PDZRN3 protects against apoptosis in myoblasts by maintaining cyclin A2 expression. *Sci Rep* 2020 ; **10** : 1140.
- 52) Kanakkanthara A, Jeganathan KB, Limzerwala JF, et al. Cyclin A2 is an RNA binding protein that controls Mre11 mRNA translation. *Science* 2016 ; **353** : 1549-1552.
- 53) Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005 ; **436** : 214-220.
- 54) Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006 ; **38** : 228-233.
- 55) Mok GF, Lozano-Velasco E, Münsterberg A. microRNAs in skeletal muscle development. *Semin Cell Dev Biol* 2017 ; **72** : 67-76.
- 56) Chen R, Lei S, Jiang T, et al. Roles of lncRNAs and circRNAs in regulating skeletal muscle development. *Acta Physiol (Oxf)* 2020 ; **228** : e13356.
- 57) Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto M, et al. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961 - encoded SPAR polypeptide. *Nature* 2017 ; **541** : 228-232.
- 58) Bi P, Ramirez - Martinez A, Li H, et al. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science* 2017 ; **356** : 323-327.
- 59) Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single - stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base - paired rod - like structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976 ; **73** : 3852-3856.
- 60) Das A, Das A, Das D, et al. Circular RNAs in myogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 2019 ; **1863** : 194372.
- 61) Liu J, Dou X, Chen C, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription. *Science* 2020 ; **367** : 580-586.
- 62) Yang C, Hu Y, Zhou B, et al. The role of m<sup>6</sup>A modification in physiology and disease. *Cell Death Dis* 2020 ; **11** : 960.
- 63) Li J, Pei Y, Zhou R, et al. Regulation of RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine modification and its emerging roles in skeletal muscle development. *Int J Biol Sci* 2021 ; **17** : 1682-1692.
- 64) Gomes E, Shorter J. The molecular language of membraneless organelles. *J Biol Chem* 2019 ; **294** : 7115-7127.
- 65) Vogler TO, Wheeler JR, Nguyen ED, et al. TDP-43 and RNA form amyloid-like myogranules in regenerating muscle. *Nature* 2018 ; **563** : 508-513.

## Novel Mechanisms Regulating Myogenic Differentiation in Skeletal Muscle

Takeshi HONDA

Department of Pharmacology (Pharmacology), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

### SUMMARY

Skeletal muscle has a characteristic differentiation process involving cell fusion. The molecular mechanisms that regulate this differentiation remain to be elucidated. Muscle differentiation starting from satellite cells is hierarchically regulated by a network of myogenic transcription factors (TFs) depending on the stage of differentiation. The function of these TFs has been found to be highly dependent on chromatin structure (i.e., chromatin remodeling),

which is altered various epigenetic regulatory mechanisms. Furthermore, novel mechanisms that regulate the chromatin remodeling, such as pioneer TFs, DNA strand breaks, and non-coding RNAs, are being elucidated to operate at each stage of muscle differentiation. The accumulation of such basic knowledge has contributed greatly to an integrated understanding of the regulatory mechanisms of differentiation in skeletal muscle.

The pathological deterioration of skeletal muscles, represented by sarcopenia, is a risk factor for death and need for nursing care in the elderly, but currently only symptomatic treatment is available. The establishment of a molecular basis underlying the muscle differentiation will accelerate the development of fundamental therapeutic and preventive measures based on such molecular pathogenesis.