

| | | | |
|------|----|---|---|
| 報告番号 | ※甲 | 第 | 号 |
|------|----|---|---|

主論文の要旨

論文題目 Analysis of the molecular mechanisms on myoblast cell fusion during myogenesis
(骨格筋分化における筋芽細胞の融合過程の解析)

氏名 磯部 茉莉

論文内容の要旨

【背景】骨格筋は身体運動の力源としての働きや、糖の貯蔵や内分泌など様々な生理機能を持った器官であり、打撲による外力、外科的手術、運動などにより損傷しても数週間で修復・再生される、可塑性に富んだ組織である。筋損傷後の筋線維再生期においては、筋衛星細胞が活性化、増殖、分化し筋芽細胞となった後、筋芽細胞同士あるいは筋芽細胞と筋管細胞との細胞融合を経て多核の筋細胞が形成されるが、この筋芽細胞同士の融合過程に関わる分子機序については未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究は筋管形成に必須な筋芽細胞の細胞膜融合過程に関わる分子機序を明らかにすることを目的とした。

研究 1：骨格筋の筋分化に関わる GGA1 分子の性状解析

【背景】筋芽細胞の融合に関わるメカニズムは細胞膜に発現する膜蛋白質が密接に関与していることが想定される。ゴルジ体から細胞膜へ向かう分子の選別輸送に関わる因子の予備的なスクリーニングおよび周辺領域の知見をもとに、ゴルジ体からの小胞輸送時に関わるクラスリンアダプター分子 GGA1 (Golgi-associated、Gamma ear-containing、Arf binding protein 1) に着目した。マウス培養筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を用い、GGA1 を RNA 干渉法 (RNAi 法) によりノックダウン (GGA1kd) した後 4 日間の筋分化誘導を行ったところ、GGA1kd により、筋管形成が阻害されることを見出した。

【方法と結果】

GGA1 が筋分化のどの過程に関わっているのかを調べるために Myogenin などの筋分化誘導マーカー遺伝子の発現を定量的 RT-PCR (qPCR) 法にて確認したところ、これらの遺伝子の発現誘導は GGA1kd 細胞においても正常に起こることが分かった。また、筋管細胞あたりの核の個数の分布を、GGA1kd 細胞において算出した結果、GGA1 発現抑制により多核の筋管細胞数が減少し、さらに骨格筋の主要な機能の一つであるインスリン依存的なブドウ糖の取り込み能が顕著に低下することが明らかとなった。以上の結果を踏まえてインスリン受容体の発現量を調べたところ、GGA1kd によりインスリン受容体の発現量が減少し、同時にインスリン刺激下での Akt のリン酸化が減少した。次に、GGA1kd によるイン

スリン受容体の現象がタンパク質分解によるものかどうかを検討する目的でプロテアソーム阻害剤およびライソソームプロテアーゼ阻害剤の効果を検討したところ、ライソソームプロテアーゼ阻害剤である Leupeptin/E64/PepstatinA 処理により GGA1kd によるインスリン受容体の減少が抑制されたことから、GGA1kd によりインスリン受容体がライソソームに誤輸送され分解されることが明らかとなった。以上の解析結果より、GGA1 は細胞内でインスリン受容体の細胞膜表面への輸送、あるいは細胞膜における同受容体の局在化、ひいては筋管細胞の成熟過程において重要な役割を担っていることが考えられる。

【考察】細胞内、特にゴルジ体における選別輸送は分泌蛋白質の細胞表面への輸送や、ポストゴルジの細胞内小器官への機能分子の分配に深く関わっていることが知られている。本研究によって得られた結果は、筋分化における筋管形成過程において GGA1 の関わる細胞内蛋白質輸送経路が必須な役割を担っていることを示唆している。また、GGA1 は骨格筋の重要な生理機能の一つであるインスリン依存的な血糖の取り込みを支えるインスリン受容体の細胞膜局在化に関与し、筋管細胞の成熟化に寄与していると考えられる。また GGA1 は膜蛋白質の細胞質側に存在する結合モチーフとの相互作用を介して特定の膜蛋白質をクラスリン被覆小胞へ積み込むことが知られていることから、GGA1 がインスリン受容体以外の分子、すなわち細胞融合装置などの輸送に直接的に関わっている可能性も考えられる。

研究 2: 新規筋芽細胞融合検出システム(HiMy assay)の構築とそれを用いたスクリーニングの実施

【背景】研究 1 において、GGA1 が骨格筋形成過程の中で、筋分化初期の細胞融合過程よりもむしろ筋管の成熟過程にみられるインスリン受容体の輸送に関与することが明らかになった。しかし当初の目的である細胞膜融合機構の解明のためには、膜融合現象に直接的にかかわる分子を同定する必要がある。そこでこれらの因子を網羅的に探索するために、細胞融合を簡便に検出する新規システムの作製が必要であると考えた。これまでに 2 つに分割した緑色蛍光蛋白質が再構成することで細胞融合を検出する GFP-split システムなどが報告されている。しかし、これらの系は顕微鏡下での観察を必要とするため筋分化後期の筋管形成でないと正確に評価できないため評価に時間を要し、定量性に欠けるなどの問題があった。そこで本研究においては、(i) 細胞融合を高感度、かつ定量的に検出する細胞融合検出システムを作製し、(ii) 作製した検出系を用いて新規細胞融合関連因子を探索することを目指した。

【方法と結果】(i) 近年、発光酵素であるルシフェラーゼを、発光活性のない 2 つの断片 (LgBiT™、HiBiT™) に分割し、それらが再構成した際に発光能が回復するという系が開発された (HiBiT™システム、Promega 社)。GFP-LgBiT、mCherry-HiBiT の融合蛋白質を発現するベクターを構築し、マウス培養筋芽細胞 C2C12 の安定発現株をそれぞれ単離した。GFP-LgBiT を発現させた細胞と mCherry-HiBiT を発現させた細胞を共培養し、筋分化を誘導した後、経時的に培地にルシフェラーゼ基質を添加し、ルミノメーターを用いて発光強度を測定したところ、分化誘導後 3-12 時間で発光強度の上昇が観察された。この発光は細胞融合に対して阻害効果が知られている化合物である Lysophosphatidylcholine (LPC) の添加により抑制されたことから、本系が筋芽細胞の細胞融合を鋭敏に検出できる新規アッセイ系として機能していると考え、HiMy (HiBiT-based myogenic cell fusion assay) 法と名付け、更に実験を行った。

(ii) 低分子量 G 蛋白質 Rab は細胞内蛋白質輸送の制御因子の中で最大のファミリーを形

成し、哺乳類では 60 種類以上あることが知られている。HiMy assay を用いてすべての Rab 分子を網羅的にノックダウンし、筋芽細胞融合に影響する Rab 蛋白質を探索した。その結果 Rab2B、Rab4A、Rab6A、Rab12 が増加傾向、Rab13、Rab35 などが減少傾向にあることが明らかとなった。

【考察】本研究で構築した HiMy 法により筋分化誘導後数時間後から細胞融合が始まっていることが初めて明らかとなった。また、ノックダウンにより膜融合が促進する Rab12 はこれまでに細胞膜に局在するトランスフェリン受容体をエンドサイトーシスにより細胞内に取り込む過程に機能していることが報告されているが、筋芽細胞においても同様の機構で細胞膜に発現する細胞融合装置のエンドサイトーシスに関与している可能性が想定される。Rab12 をノックダウンした筋芽細胞の細胞表面には細胞融合装置が蓄積している可能性が考えられることから、これらの結果は細胞膜融合装置の本体を同定するための一助となりうる。また、Rab12 を標的とした特異的阻害剤は筋芽細胞融合の促進剤としての効果が期待できることから、筋損傷からの回復を促進するための創薬シーズという観点からも重要な知見が得られたと考えられる。