

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07398

研究課題名(和文)筋分化過程に必須な小胞体カルシウム枯渇の分子基盤と細胞内情報伝達における役割

研究課題名(英文)The mechanism and the role of calcium depletion from the endoplasmic reticulum during myoblast differentiation

研究代表者

森島 信裕 (Morishima, Nobuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・客員研究員

研究者番号：40182232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋前駆細胞である筋芽細胞の融合過程において小胞体からカルシウムが漏出し、小胞体ストレスが生じる。小胞体カルシウム枯渇のマーカーとなるSTIM1の多量体形成をGFPを用いて視覚化し、分化誘導開始後24-48時間の間にカルシウム枯渇が起こること、その時期を経て細胞周期からの離脱が完了して筋芽細胞がG1期にとどまることを明らかにした。この細胞周期離脱から最終分化過程(細胞融合)への転換期に細胞増殖促進的な転写因子のいくつかが一過的に激減することを見出した。この減少がカルシウム依存性のプロテアーゼによる分解に依存することを示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この成果はカルシウム依存性プロテアーゼが筋分化過程に関わる可能性を示唆する点に学術的な意義がある。筋芽細胞の融合過程において小胞体からカルシウムが漏出する時期があり、小胞体カルシウムが枯渇して小胞体ストレスが生じることを私たちは以前見出した。ここで引き起こされる小胞体ストレス応答のうち、転写調節の変化は筋芽細胞の融合過程の進行にとって必須である。ここでのカルシウムの役割は筋分化の進行に対していわば間接的な影響を及ぼすことにあるが、本研究によってカルシウムが酵素活性化を通して直接的な影響を及ぼし、転写因子の量的コントロールに関与する可能性が出てきた点は新しい知見である。

研究成果の概要(英文)：Skeletal myoblast differentiation is accompanied by the fusion of muscle precursor cells (myoblasts). We have previously revealed that ER Ca²⁺ depletion occurs before myoblast fusion. The present study finds that ER Ca²⁺ depletion occurs between 24 and 48 hours after the initiation of differentiation induction, by detecting the cluster formation of an ER Ca²⁺ sensor protein. A cell cycle analysis suggests that the transition period from cell proliferation to differentiation is between differentiation days 1 and 3 during which almost all myoblasts exit from the cell cycle. This study has detected transient decreases in several transcription factors that are involved in cell cycle regulation. It is suggested that the decrease in the protein levels of these proteins is due to proteolysis by calcium-dependent proteases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨格筋分化 筋芽細胞 小胞体ストレス 小胞体カルシウム 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小胞体内で合成される新生タンパク質がその立体構造が正しく形成されずに蓄積した状態を小胞体ストレスと呼ぶ。その原因は一様ではなく、タンパク質合成量の増大や小胞体内環境の変化などがある。小胞体ストレスは小胞体にとっては負担となり、ストレスが過大な場合は小胞体ストレス特異的なカスパーゼ 12 を活性化させてアポトーシスを引き起こす(1)。しかし、細胞には転写調節を中心とするストレス応答、UPR (Unfolded Protein Response)によって小胞体ストレスに対処する仕組みがあり、このストレスとホメオスタシスの維持や疾病との関わりが盛んに研究されてきた(2)。ところが私たちは、マウス骨格筋の最終分化過程で小胞体ストレスが生じること、これが細胞分化の進行にとって必須な生理的現象であることを見出した(3)。筋分化における小胞体ストレスと UPR は特異的なものであり、分化促進の働きを持つ(4)。

骨格筋は前駆細胞(筋芽細胞)が融合して形成される多核細胞である。小胞体ストレスは細胞融合直前のステップで生じ、UPR を引き起こす。私たちは、このストレスの原因が小胞体からのカルシウム漏出によるカルシウム枯渇であることを突き止めた(5)。小胞体には細胞質ゾル中の約 1000 倍濃度(約 1 mM)のカルシウムが蓄えられているが、その濃度が低下するとカルシウム依存性分子シャペロンが機能しなくなるためタンパク質の立体構造形成不全が起こる。筋分化過程の細胞質ではカルシウムシグナル系が重要な働きをしていることが知られているがカルシウム枯渇との関係はほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

小胞体からのカルシウム漏出は細胞質ゾルにおけるカルシウム濃度上昇と表裏の関係にある。本研究では小胞体内から細胞質ゾルへ出たカルシウムが起動するシグナル伝達系を同定し、それが筋分化過程において果たす役割を示すことを目指した。また、カルシウム枯渇が引き起こされるメカニズムを分子レベルで明らかにすることも目的とした。筋分化過程における小胞体カルシウム枯渇がいつ始まり、どれくらい持続するかはその詳細が明らかでなかった。そこで、上記の目的を達成するために、小胞体カルシウム枯渇が起こる時期の特定をまず行った。本研究により、筋分化過程の小胞体カルシウム枯渇が起動するシグナル系を見出すとともに、生理的な小胞体ストレスが生じるメカニズムの分子基盤が明らかになることを期待した。

3. 研究の方法

骨格筋形成過程を *in vitro* で再現できる培養筋芽細胞 C2C12 を材料として用いた。この細胞の分化は、培地に添加する血清を 20%牛胎仔血清から 2%ウマ血清に変えると誘導することができる。細胞融合は 2、3 日のうちに始まり、少なくとも 1 週間程度続く。この期間を対象として種々の解析を行った。

(1) 小胞体カルシウム枯渇開始時期の特定

小胞体内のカルシウム濃度減少は直ちに小胞体膜上のカルシウムセンサー (STIM1) によって感知され、小胞体内へのカルシウム取り込みを増やす保障反応が引き起こされる(6)。従って、カルシウム枯渇及びそれに伴う細胞質ゾル中のシグナル伝達は比較的短時間の間、限定的に起こっている可能性が考えられた。STIM1 は小胞体カルシウム枯渇に応答して小胞体上で可逆的に凝集する。この凝集能を利用してカルシウム枯渇開始時期の特定を試みた。

* STIM1 の凝集を指標としてカルシウム枯渇を可視化するため、STIM1 と緑色蛍光タンパク質 GFP

の融合タンパク質を C2C12 細胞に安定的に発現させた。

* STIM1 の凝集はカルシウム枯渇が解消され次第解消される。分化過程にある GFP-STIM1 発現株の生細胞観察を行い、カルシウム枯渇の開始と持続時間を調べた。

* カルシウム枯渇開始時期にカルシウム制御タンパク質の発現上昇または減少が起こるかどうかを調べた。枯渇が細胞間で同調的に起こる場合にはウエスタンブロット法による定量解析を実施する。同調性が比較的低い場合には免疫細胞染色を行って、一細胞ごとの解析も併用する。リン酸化による活性制御を受けることが知られているタンパク質についてはウエスタンブロット解析にリン酸化特異的抗体を用いてリン酸化の程度も合わせて解析した。

(2) カルシウム漏出が起こる時期のカルシウム調節タンパク質の解析

分化過程にある C2C12 細胞で小胞体カルシウム枯渇が起こる期間に、小胞体のカルシウム動態を制御する可能性のあるタンパク質の増減や局在を調べた。解析対象の一例を下に示す。アポトーシス制御を行う Bcl-2 ファミリーの中で Bcl-2 は辻本らによって最初に同定された代表的な分子である。ファミリーの他のメンバーが主にミトコンドリアに局在しているのに対し、Bcl-2 は小胞体を含む細胞内膜系に広く存在するという特徴がある。

- * 小胞体カルシウムポンプまたは小胞体カルシウムチャンネルに結合するタンパク質
- * IP₃ 産生タンパク質
- * 小胞体膜脂質成分を変える酵素
- * Bcl-2

(3) カルシウム漏出によるカルシウム依存性タンパク質の活性化が筋分化過程で果たす役割

筋芽細胞融合過程ではカルシウム依存性タンパク質が重要な働きをしていることが知られているが、その活性化のきっかけとなる仕組みについてはあまり明らかになっていない。小胞体でカルシウム枯渇が起こる時期においてカルシウム依存性タンパク質の活性化状態とそれらが筋分化過程に与える影響を調べた。どのシグナル系がカルシウム枯渇によって制御されているかを確認しながら解析対象を絞り、筋分化過程の進行(細胞融合、筋特異的転写因子の活性化、筋特異的タンパク質の合成など)との関わりを検討した。筋分化過程に関わることが示唆されているタンパク質の中で小胞体からのカルシウム漏出によって活性化される可能性のあるタンパク質を中心に、それらの活性化状態を調べた。下に解析対象の例を示す。カルシニューリン(7)とカルパイン(8)は筋芽細胞融合の進行にとって重要であることが報告されていたが、活性化の仕組みは明らかではなく、活性化時期も 1 日単位程度の大まかな特定しかなされていない。また、カルパインはカスパーゼ 12 を活性化させる(9)ことから、分化過程の筋芽生細胞中でカスパーゼ 12 の一過的活性化を起こしている可能性が考えられた。マウス胚では骨格筋形成過程にある生細胞中でカスパーゼ 12 が活性化していることを示唆するデータを私たちは得ている(3)。

- * カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素 (CaMK)
- * カルシニューリン
- * カルパイン
- * カスパーゼ 12

上記タンパク質群の解析結果を踏まえて、小胞体のカルシウム枯渇が筋芽細胞の分化に与える影響を、ウエスタンブロット解析及びカルシウム依存性タンパク質やシグナル伝達因子の遺伝子ノックダウン、阻害実験により解析した。分化の度合いは多核細胞の形成率と細胞中の核の計数、筋特異的転写因子やミオシンなど筋特異的タンパク質の定量により解析した。

4. 研究成果

小胞体カルシウム枯渇時期を特定するため、GFP を利用した小胞体カルシウムセンサータンパク質 STIM の凝集可視化プローブを用いて C2C12 細胞を観察した。まず、STIM1-GFP を安定的に発現し、さらに分化能を保持した筋芽細胞株を作製した。当初は単量体型 GFP とされているものを用いたが、作製した STIM1-GFP プローブが小胞体カルシウム濃度変化非依存的に凝集しやすいことが判明した。そのため、プローブ発現量が低めで、カルシウム濃度非依存的な凝集を起こしにくい細胞を選んで解析対象とする必要があり、蛍光シグナル強度が十分ではなかった。また、プローブの凝集に関して、細胞間の同調性が低いという問題があった。

プローブ分子内の GFP 同士がカルシウム非依存的に相互作用する可能性が排除できないことから、単量体型 GFP の代わりに真性単量体型の Azami-Green タンパク質(mAG1)に切り替えた新たなプローブを作製した。このプローブは、小胞体ストレスが生じていない、すなわち小胞体カルシウム枯渇のない状態では凝集を起こさないため、分化誘導開始後のプローブ凝集時間帯が正確に捉えられるようになった。その結果、分化誘導条件下において約 24 時間から 30 時間経過した C2C12 細胞中でプローブの凝集が同調的に起こることが明確となった。さらに、凝集が開始する時期及び凝集の程度が増して蛍光シグナルが強くなる時期には小胞体ストレス応答が起きていることを、ストレス応答タンパク質の発現上昇によって明らかにした。また、小胞体ストレス応答の時期とほぼ同時に STIM1 の発現低下が起こることを見出した。STIM はカルシウム枯渇に対して抑制的に働くことから、STIM1 活性の低下がカルシウム枯渇を促進する可能性が出てきた。

次に、小胞体カルシウム枯渇の時期と筋芽細胞が細胞周期から離脱する時期の関係を調べた。GFP 類縁タンパク質で標識した細胞周期マーカータンパク質 (CDT1, geminin) を安定的に発現させた筋芽細胞株を作製して細胞周期の解析を行なった。カルシウム枯渇が生じてから約 24 時間経過した時点までにほぼ全ての細胞が G1 期にあることが明らかとなった。すなわち、カルシウム枯渇の時期は細胞周期離脱と最終分化過程 (細胞融合) の転換期に当たっていることが分かった。

この転換期における細胞増殖促進的な転写因子の増減についてウエスタンブロット解析を行った。細胞増殖促進的な転写因子のうちのいくつかは一過的に激減すること、その時期の後に細胞周期抑制タンパク質と筋特異的転写因子がアップレギュレートされることを見出した。そこで、細胞増殖促進的な因子を強制発現させた筋芽細胞株を作製して分化誘導を行なったところ、筋特異的転写因子の発現が抑制されるとともに、細胞死の誘導や筋芽細胞の融合不全が見られた。従って、転換期に特定の転写因子が正しく量的な調節を受けることが分化進行にとって重要であることが示唆された。

一過的に減少する転写因子の解析を進める過程で、カルシウム依存性のプロテアーゼによる分解を受ける因子があることを示唆するデータが得られた。小胞体からのカルシウム漏出を阻害する薬剤で処理した筋芽細胞中では転写因子の減少が起こらなかった。また、プ

ロテアーゼ阻害剤で処理した筋芽細胞中でも転写因子の激減が見られなくなった。従って、小胞体からのカルシウム漏出によるカルシウム動態の変化が、プロテアーゼの活性化を通して転写因子を切断させ、その量を調節している可能性が出てきた。これは、タンパク質分解が筋分化の調節機構の一部として働いていることを示唆している。

本研究課題は小胞体カルシウム枯渇が引き起こす効果とともに、カルシウム枯渇が起こる仕組みを調べることを柱としていた。このうち、枯渇の仕組みに関する説明は想定通りに進まなかった。その原因の一つは、小胞体カルシウム枯渇のプロープとして用いた STIM1 (GFP) の凝集、解離が予想に反して可逆的ではなかったことにある。このマーカーは筋分化過程で起こるカルシウム枯渇の始まりを捉えることに対しては有効であったが、その後多量体が 1 日以上維持されている細胞と多量体が解消された細胞が混在するようになり、同調性が見られなくなった。これが、小胞体カルシウム枯渇が比較的長時間継続することを反映しているのか、また、細胞間での同調性が低いことを表しているのかは不明である。ただし、カルシウムポンプ-GFP 融合体を強制発現させた細胞においては、小胞体ストレス応答が短時間で終了することが分かった。これは、ポンプタンパク質の量が親株細胞に比べて多いためにカルシウム枯渇が短時間で解消されてしまい、本来のカルシウム動態を反映しなくなっている可能性を示す。従って、カルシウム枯渇は比較的短時間で解消されているのにもかかわらず、STIM1 の凝集が解消されない場合があることを示唆している。

以上をまとめると、本研究により、分化誘導開始後 24~48 時間の間にカルシウム枯渇が起こること、その時期を経て細胞周期からの離脱が完了して筋芽細胞が G1 期にとどまることが明らかとなった。この細胞周期離脱から最終分化過程(細胞融合)への転換期に細胞増殖促進的な転写因子のいくつかが一過的に激減することを見出した。さらに、この減少がカルシウム依存性のプロテアーゼによる分解に依存することを示唆するデータを得た。

<引用文献>

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, Z., Yankner, B. A., and Yuan, J. *Nature*, 2000, 403, 98-103
- Walter, P., and Ron, D. *Science*, 2011, 334-1081-1086
- Nakanishi, K., Sudo, T., and Morishima, N. *J. Cell Biol.* 2005, 169, 555-560
- Nakanishi, K., Dohmae, N., and Morishima, N. *FASEB J.* 2007, 21, 2994-3003
- Nakanishi, K., Kakiguchi, K., Yonemura, S., Nakano, A., and Morishima, N. *FASEB J.* 2015, 29, 2137-2149
- Mancarella, S., Wang, Y., and Gill, D. L. *Nature Chem. Biol.* 2011, 7, 344-345
- Friday, B. B., Horsley, V., and Pavlath, G. K. *J. Cell Biol.* 2000, 149, 657-666
- Kwak, K. B., Chung, S. S., Kim, O. K., Kang, M. S., Ha, D. B., and Chung, C. H. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1175, 234-249
- Nakagawa, T., and Yuan, J. *J. Cell Biol.* 2000, 150, 887-894

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森島信裕	4. 巻 32
2. 論文標題 筋肉細胞の分化と小胞体ストレス	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 THE BONE	6. 最初と最後の頁 61, 65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森島信裕	4. 巻 41
2. 論文標題 カルシウムと筋肉	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nobuhiro Morishima, Hiromitsu Ogata, Junji Magae, Yoshihiro Ito, and Junya Kobayashi	4. 巻 28
2. 論文標題 Analysis method of cellular stress caused by intermediate dose-rate irradiation using a cell lysate array technique	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 288-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森島信裕、馬替純二、伊藤嘉浩、緒方裕光
2. 発表標題 小グループの選抜タンパク質を精密定量し、微弱で慢性的な細胞ストレスが細胞生理に与える影響を定量評価する
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筋肉を動かすカルシウムは筋肉を作る指令役も担う
http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150217_1/
止血役にはストレスが必要
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160614_2/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------