

平成21年6月22日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2006～2008年度
 課題番号： 18590966
 研究課題名（和文） 骨格筋細胞膜修復におけるディスフェルリンの生理的意義の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the physiological function of dysferlin in sarcolemmal repair.

研究代表者

松田 知栄 (MATSUDA CHIE)
 独立行政法人産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・主任研究員
 研究者番号： 50344099

研究成果の概要：

ディスフェルリンの生理的意義を解明するために、結合タンパク質の探索を行いアフィキシンを同定した。アフィキシンはヒト正常骨格筋の細胞膜でディスフェルリンと共局在しているが、ディスフェルリンを欠損する筋ジストロフィー患者骨格筋では、部分的に細胞膜から欠落することを見出した。培養細胞を用いてアフィキシンの生理的機能を解析したところ、アクチン細胞骨格系の再構成を行うことを見出した。細胞骨格系の再構成は細胞膜の修復過程でも観察されることから、アフィキシンもディスフェルリンと共に筋細胞膜の修復に関与することが予測される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学、臨床神経分子遺伝学

キーワード 脳神経疾患、タンパク質、生体分子

1. 研究開始当初の背景

平成10年から平成12年まで申請者はディスフェルリンをクローニングしたBrown教授（ハーバード大医学部・マサチューセッツ総合病院）の研究室に留学しディスフェルリンに関する研究を始めた。ディスフェルリンに対する抗体を作製し、筋細胞膜への局在、患者骨格筋における欠損を明らかにした。（Matsuda C et al. *Neurology* 1999）

平成12年に帰国後、ディスフェルリンの生理的機能を解明するため、ディスフェルリン結合タンパク質の同定を行った。免疫沈降法により心筋・骨格筋特異的カベオリン-3を同定し、ディスフェルリン結合タンパク質として初めて報告した（Matsuda C et al. *Human Molecular Genetics* 2001）。また、カベオリン-3遺伝子の異常により発症する肢帯型筋ジストロフィー1C型においてディスフェル

リンの発現レベルが2次的に低下し、異常な細胞内局在を示すことを見いだした。これはカベオリン-3がディスフェルリン結合タンパク質であることの裏付けとなる。ディスフェルリンは複数のC2ドメインを含むことから膜融合への関与が予想されていた。米国のグループはマウスから単離した筋線維の細胞膜にレーザーで損傷を与えると、損傷部位にディスフェルリンがパッチ状に凝集することを報告し (Bansal D et al. *Nature* 423, 168-172, 2003)、膜修復におけるディスフェルリンの生理的機能が注目されるようになった。

膜の修復機構はアフリカツメガエル卵母細胞で詳細に解析されており、細胞にレーザーを照射すると損傷部位においてアクチン細胞骨格系の再構成が起こり、アクチンとミオシンがリング状に集積することが知られている (Mandate A et al. *The Journal of Cell Biology* 154, 785-797, 2001)。膜修復の過程においてアクトミオシンリングは収縮しながら小さくなり、アクチンは損傷部位の中心に向かって突起を伸ばし、最終的にはresealingが観察される。申請者がディスフェルリン結合タンパク質として同定したアフィキシン・ β PIXは、アクチン細胞骨格の再構成において重要な役割を果たすことから、3者はアクチンリングの形成に関与することが予想される。卵母細胞の膜修復機構は骨格筋と比較して単純であると考えられ、ディスフェルリンの膜修復における生理的意義を解明する上で有利である。

2. 研究の目的

これまでジストロフィン遺伝子の異常により発症する筋ジストロフィー (Duchenne/Becker型) などでは細胞膜の脆弱化により筋線維が壊死を起こすと考えら

れてきた。一方、ディスフェルリンは筋細胞膜が損傷を受けるとその部位にパッチ状に凝集することから膜修復への関与が示唆されている。すなわちディスフェルリンの欠損は細胞膜の修復異常という新しい分子病態の筋ジストロフィーを引き起こすと考えられる。そこで本研究では骨格筋細胞膜修復におけるディスフェルリンの生理的意義を解明する。申請者は既にディスフェルリン結合タンパク質としてアフィキシン、(β -パルビン)、 β -PIX (PAK-interacting exchange factor)、活性型Rac1を同定している。このことからディスフェルリンがアフィキシン・ β -PIXを介してRac1を活性化することにより、膜修復のプロセスの1つであるアクチン細胞骨格系を行うことが予想される。細胞膜の修復過程はアフリカツメガエル卵母細胞で解析が進んでおり、損傷部位付近ではアクチンの再構成が活発に行われリング状に集積することが明らかにされている。そこでアフリカツメガエル卵母細胞の系を用いて膜損傷・修復時におけるディスフェルリン・アフィキシン・ β -PIXの動態とアクチンのダイナミクスの関係を解析する。次にマウス骨格筋細胞膜の損傷・修復時の分子動態について同様に解析し、これらの分子が哺乳類筋細胞膜の修復に関与する可能性を検証する。

3. 研究の方法

アフリカツメガエル卵母細胞にレーザーを照射し細胞膜に損傷を与えるとresealingが観察されることから、膜損傷・修復のモデル系として利用されている。損傷部位の周囲ではアクチン細胞骨格系の再構成が起こり、アクトミオシンがリング状に集積する。アクトミオシンリングは損傷部位の中心に向かって突起を伸ばし膜の修復を促進する。ディスフェルリンはアクチン細胞骨格の再構成に

関与するアフィキシンと結合することから、アクトミオシンリングの形成にも関与することが予想される。そこでアクトミオシンリングによる膜修復にディスフェルリン・アフィキシンが関与する可能性を検討する。アフリカツメガエル卵母細胞にはディスフェルリンだけでなくアフィキシン、 β PIXのホモログも発現しており、筋組織と共通の膜修復機構が存在することも予想される。現在までにグアニンヌクレオチド交換反応促進因子 (GEF) がアクチンリングの形成に関与するという報告はなく、 β PIX が関与する可能性についても検討する。

In vitro 転写系により合成したヒトディスフェルリンのmRNAを卵母細胞にインジェクションし発現させた後、フェムト秒パルスレーザーで細胞膜に直径50 μ mの傷をつける。損傷・修復の過程の試料をそれぞれ固定し、免疫組織化学法にてアクチンリングとディスフェルリンの細胞内分布を解析し、マウス筋細胞膜損傷時に見られるディスフェルリンパッチが卵母細胞においても観察されるか検証する。同様にヒトアフィキシンまたは β PIXを卵母細胞に発現させ、膜損傷・修復過程における分子挙動を免疫組織化学法にて明らかにする。また、GEF活性のないドミナントネガティブ型 β PIXを発現させ、膜損傷・修復過程を免疫組織化学にて解析し、GEFがアクトミオシンリング形成において果たす役割について検討する。

次に膜損傷・修復過程におけるディスフェルリン・アフィキシン・ β PIXの動態をリアルタイムで観察する。それぞれ波長特性の異なる蛍光タンパク質に融合させたディスフェルリン・アフィキシン・ β PIXのmRNAを卵母細胞にインジェクションし、フェムト秒パルスレーザーで損傷を与え、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行う。インジェクションの際

に蛍光標識したアクチンを加えれば、3者の挙動とアクチンのダイナミクスの関連を調べる事が可能である。

4. 研究成果

我々は筋ジストロフィーの責任遺伝子産物であるディスフェルリンがアフィキシンと正常骨格筋の細胞膜において共局在することを見出した。ヒトアフィキシンを恒常的に発現するマウス筋芽細胞のライン(C2C12-affixin)を確立し、その解析によりアフィキシンは α PIX, β PIXの双方を介してRac1を活性化し、アクチン細胞骨格系の再構成を行うことを見出した。細胞骨格系の再構成は細胞膜の修復過程でも観察されることが知られている。またディスフェルリンは筋細胞膜修復への関与が報告されていることから、アフィキシンも筋細胞膜の修復に関与することが予測される。そこでディスフェルリン、アフィキシンを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の膜をレーザーで損傷し、膜損傷回復時の分子挙動の解析を試みている。ディスフェルリン、アフィキシン、カベオリン-3に蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトを作製し、*in vitro*でmRNAを合成した。これを卵母細胞にマイクロインジェクションし、タンパク質の発現を免疫組織化学法と蛍光顕微鏡による観察で調べた。その結果ディスフェルリンは卵母細胞の細胞膜に、アフィキシンは細胞質に局在していた。我々がディスフェルリン結合タンパク質として報告したカベオリン-3も細胞質に発現していたが、アフィキシンより大きな粒子状であった。現在はレーザーによる膜損傷の実験条件の最適化を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1 Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma.

J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Apr;64(4):334-40.

Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I, Hayashi YK.

2 The gamma-parvin-integrin-linked kinase complex is critically involved in leukocyte-substrate interaction.

J Immunol. 2006 Mar 15; 176(6):3611-24.

Yoshimi R, Yamaji S, Suzuki A, Mishima W, Okamura M, Obana T, Matsuda C, Miwa Y, Ohno S, Ishigatsubo Y.

3 Two Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/Proteasome ERAD (I) and Autophagy/Lysosome ERAD (II).

Hum Mol Genet. 2007 16(5): 618-629.

Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Mizutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T.

4 Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness.

J Clin Invest. 2008 Apr;118(4):1437-49.

Lawrence J. Hayward, Joanna S. Kim, Ming-Yang Lee, Hongru Zhou, Ji W. Kim, Kumudini Misra, Mohammad Salajegheh, Fen-fen Wu, Chie Matsuda, Valerie Reid, Didier Cros, Eric P. Hoffman, Jean-Marc Renaud, Stephen C. Cannon, and Robert H. Brown, Jr.

5 Affixin activates Rac1 via aPIX and

bPIX in C2C12 myoblast.

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I and Hayashi YK

FEBS Letters. 2008 Apr 9;582(8):1189-96.

Epub 2008 Mar 4.

[学会発表] (計 3 件)

1 Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma.

Matsuda C, Kameyama K, Nishino I, Hayashi YK.

XI International Congress on Neuromuscular diseases, 2-7 July 2006, Istanbul, Turkey

2 Affixin activates Rac1 via aPIX and bPIX in C2C12 myoblast.

Matsuda C, Kameyama K, Suzuki A, Mishima W, Yamaji S, Okamoto H, Nishino I and Hayashi YK

12th International Congress of World Muscle Society, 17-20 Oct 2007, Taormina, Italy

3 Altered Interaction of mutant lamin A and barrier to autointegration factor (BAF).
Matsuda C, Kameyama K, Nishino I and Hayashi YK

12th International Congress of World Muscle Society, 29 Sep 2008, Newcastle upon Tyne, UK

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 知栄

独立行政法人産業技術総合研究所
脳神経情報研究部門 主任研究員

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし