

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03225

研究課題名(和文) ダイナミンの新規分子マシナリーによる細胞骨格と膜のダイナミクス制御の連携機構

研究課題名(英文) Cooperative regulation of cytoskeleton and membrane dynamics by novel mechanism of dynamin

研究代表者

竹居 孝二 (Takei, Kohji)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：40322226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ダイナミン2のCharcot-Marie-Tooth病変異によりストレスファイバーが異常になることを見出し、ダイナミンがストレスファイバーの形成、安定化に必要であることを示すと同時に、ダイナミンによるアクチン線維束形成をin vitroで再現した。また、ダイナミン1が微小管を束化することを見出し、この微小管束化が腎糸球体ポドサイトの一次突起の形成と安定化や、細胞形態の維持に必要であることを示すと同時に、ダイナミン1の微小管結合部位を同定した。さらに、膜ダイナミクス制御に関して、ダイナミン2とBARタンパクBIN1が協働して骨格筋細胞のT管の形成、安定化に機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイナミンの変異が、てんかん性脳症や末梢神経変性疾患Charcot-Marie-Tooth病、先天性筋疾患の一つである中心核ミオパチーの原因となることがわかり、それらの疾患に関連するダイナミン変異も多数報告されている。ダイナミン分子の生理的機能、作動機構を解明するとともに、変異に伴う機能破綻のメカニズムを明らかにすることは、これらの難治性疾患の分子病態の解明や新規の診断、治療の開発に不可欠である。

研究成果の概要(英文)：We found that Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutations of dynamin 2 cause aberrant stress fibers, showing that dynamin is required for the formation and stabilization of stress fibers. And we reconstituted in vitro the actin bundle formation by dynamin. We also found that dynamin 1 bundles microtubules, and showed that this bundling is necessary for the primary processes formation and stabilization of cell morphology of renal glomerular podocytes. The microtubule-binding site of dynamin 1 was identified. Furthermore, regarding the regulation of membrane dynamics, we demonstrated that dynamin 2 and BIN1, a BAR protein, cooperatively function in T-tubule formation and stabilization of skeletal muscle cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ダイナミン アクチン 微小管 細胞膜

1. 研究開始当初の背景

ダイナミンは生体膜を変形、切断し、細胞骨格のダイナミクスを制御するマルチ機能分子であるが、その作動機構については不明な部分が多く、ダイナミンの複数の機能が同一細胞内で統合制御される機構も未解明である。さらに、ダイナミンの変異がてんかん性脳症、Charcot-Marie-Tooth病(CMT)、中心核ミオパチー(CNM)など、脳神経、筋の機能障害や変性疾患の原因となることがわかり、疾患変異部位も多数報告されたが、それらの疾患の分子病態は未解明のままであった。このような状況であったことから、ダイナミンの作動機構、機能統合機構の解明、ダイナミン変異疾患の分子病態解明を目指す本研究を開始した。

2. 研究の目的

(1)細胞のアクチン細胞骨格、微小管、生体膜において、ダイナミンがそれぞれのダイナミクスをどのように制御するのかを明らかにするとともに、作動機構を分子レベルで解明する。様々な細胞やダイナミンアイソフォームについて解析することにより、各々の制御機構に共通するダイナミンの本質的な分子マシナリーを解き明かす。

(2) ダイナミン疾患変異に起因するダイナミンの分子機能の変化と、細胞レベルでの機能、形態変化を解明する。これにより、ダイナミン変異疾患の病態解明のための分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

まず、下記(1) - (3)の小題目に従って、研究をすすめた。

(1) ダイナミンによるアクチンダイナミクス制御機構の解明

(2) ダイナミンによる微小管ダイナミクス制御機構の解明

(3) ダイナミンによる膜ダイナミクスの制御機構の解明

実験は *in cellulo* および *in vitro* の解析を中心に進めた。*in cellulo* 解析にはポドサイト細胞株 MPC、HPC、および筋芽細胞株 C2C12 を用い、細胞骨格や細胞膜の形態、ダイナミンの局在を蛍光免疫染色法、電子顕微鏡により確認した後、蛍光ラベルした野生型および疾患変異ダイナミンの強制発現、RNAi によるノックダウンなどによる変化を観察、解析した。*in vitro* 解析のためには、小麦胚芽無細胞系、バキュロウイルス - 昆虫細胞系、あるいは大腸菌を用いて、野生型ダイナミン 1 およびダイナミン 2、各種の CMT 変異ダイナミン 2、CNM 変異ダイナミン 2 を発現、精製しアクチン線維、微小管、あるいはリポソーム (人工脂質膜) と反応させ、蛍光免疫染色法、電子顕微鏡により形態的变化を解析した。

4. 研究成果

(1) ダイナミンによるアクチンダイナミクス制御機構の解明

ダイナミン 2 によるアクチン制御機構を解明するため、ヒトポドサイト株 HPC に野生型ダイナミン 2 および CMT 変異ダイナミン 2 K562E を発現させ、アクチンの変化を調べたところ、ダイナミン 2 K562E 発現細胞ではストレスファイバーが減少し、異常なアクチンクラスターが形成された (図 1)。ダイナミン 2 を調製し、*in vitro* でアクチン、および膜に対する性状を調べたところ、野生型にくらべ K562E によるアクチン線維束化能はより少なかった。K562E は自己重合能、膜結合能、膜変形能も顕著に低かった。野生型ダイナミン 2 とアクチンをリポソーム存在下で反応させると、太いアクチン線維束を形成されたが、K562E ではその形成は少なかった。以上より、ダイナミン 2 の脂質膜に対する親和性と自己重合能がアクチン束化に必要であることが明らかにされた。これらの成果を学会発表するとともに (濱崎ら、第 62 回日本生化学会中国・四国支部例会、2021; 山田ら、第 6 回日ポドサイト研究会、2022)、論文として発表した (Hamasaki et al., *Front Cell Dev Biol.* 2022)。

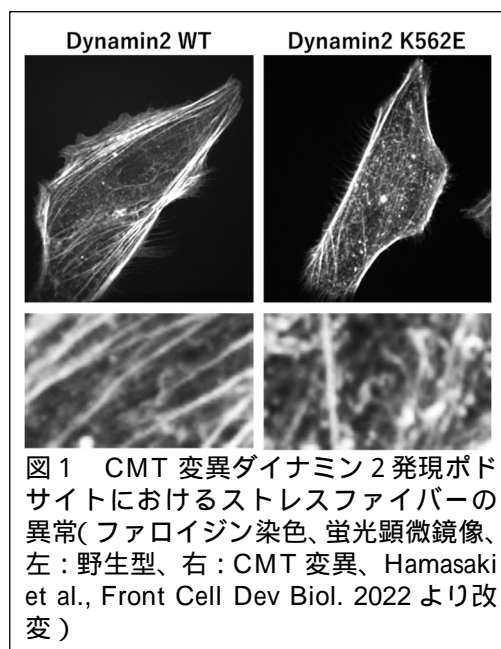


図 1 CMT 変異ダイナミン 2 発現ポドサイトにおけるストレスファイバーの異常 (ファロイジン染色、蛍光顕微鏡像、左: 野生型、右: CMT 変異、Hamasaki et al., *Front Cell Dev Biol.* 2022 より改変)

精製ダイナミンとアクチンを用いて、*in vitro* でアクチン線維束が形成されることを見出した。ネガティブ染色電子顕微鏡により超微構造を観察した結果、数本のアクチン線維束の周囲にダイナミンがらせん状に重合し、さらにはらせん状重合体の外側にもアクチン線維が結合することが判った。ダイナミン 2 はダイナミン 1 に比べ、アクチン線維との親和性が高く、線維束形成性能がより高いことが判明した。ダイナミンはリポソームと反応させると、チューブ状に変

形した膜周囲にらせん状に重合してダイナミンチューブを形成するが、アクチン存在下でダイナミンをリボゾームと反応させると、ダイナミンチューブに沿ってアクチン線維が形成され、さらにチューブに捻れが生じることを見出した。このことから、ダイナミンが膜とアクチン線維とをリンクさせることが判った。

(2) ダイナミンによる微小管ダイナミクス制御機構の解明

腎系球体ポドサイトを用いてダイナミンによる微小管制御機構を解析した。マウスポドサイト細胞株MPCを分化させると、細胞は顕著に伸展し、微小管は細胞中心部から辺縁部に向かって放射状に伸び、しばしば微小管束を形成していた。ダイナミン1がこの微小管束に共局在し、機能的にも微小管束の形成、安定化を担うことを明らかにした。さらにダイナミンノックアウトマウスからの初代培養ポドサイトを用いて、ダイナミンによる微小管制御がポドサイトの突起形成や細胞形態の安定化に必要なことを明らかにした。*in vivo*においてもダイナミン1と微小管との共局在することをラット腎切片を用いた免疫電子顕微鏡法により示すとともに、ダイナミン1が糸球体発生の初期に発現することを見出した。さらに、コムギ無細胞タンパク合成系にて発現、精製したダイナミン1と微小管を用いて、ダイナミン1による微小管の束化を*in vitro*で再現した(図2)。以上の成果を学会発表するとともに(竹居ら、第6回日ポドサイト研究会、2022)、論文として発表した(La, et al., FASEB J. 2020)。

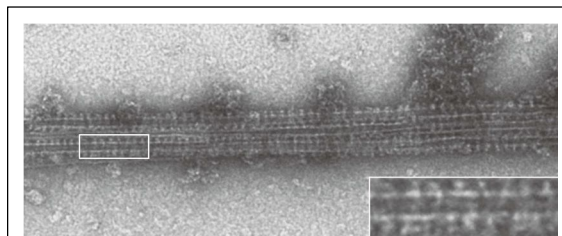


図2 ダイナミン1による微小管束の形成 (電子顕微鏡像、La, et al., FASEB J. 2020 より改変)

ダイナミン1と微小管との結合部位を決定するため、精製ダイナミン1による微小管束形成を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡により観察した。ダイナミン1のプレクストリン相同(PH)ドメインを用いた場合も、全長のダイナミン1の場合と同様に微小管の束化が認められた。さらに、ダイナミン1のPHドメイン、プロリンリッチ(PR)ドメインに対応する合成ドデカペプチドを用いた結合阻害実験により、ダイナミンの微小管結合部位がPHドメインに存在することを明らかにした。この研究成果を、ダイナミン1と微小管の結合阻害による神経シナプス機能の変化を神経電気生理学的に調べた高橋智幸教授、堀哲也博士(沖縄科学技術大学院大学)との共同研究として、論文発表した(Hori, et al., eLife. 2022)

ダイナミンによる微小管の安定化が微小管依存性小胞輸送に及ぼす影響を調べた。肺癌H1299細胞を血清刺激することによりラッフルを形成させ、細胞中心部からラッフル辺縁部に向かい微小管依存性に輸送されるカルシウムチャンネルTRPV2の細胞内局在を蛍光免疫染色により調べるとともに、ラッフル辺縁部に到達したTRPV2の量をカルシウムイオンの細胞内流入を指標に解析した。この解析系を用いて、ダイナミン1ノックダウン細胞では微小管束形成が減少するとともに、相関してTRPV2の細胞表面への移行が減少することを明らかにし、ダイナミン1による微小管安定化が微小管依存性小胞輸送に関与することを示した。この研究成果を学会発表した(藪ら、第62回日本生化学会中国・四国支部例会、2021)

(3) ダイナミンによる膜ダイナミクスの制御機構の解明

骨格筋細胞のT管形成におけるダイナミンの動態と機能を解明するために、培養筋芽細胞株C2C12にダイナミン2を発現させ、その影響を調べた。ダイナミン2は単独で強制発現した場合は細胞質内に均一に分布したが、BARタンパクBIN1と共発現させると、BIN1が形成するT管様構造に局在した(図3)。

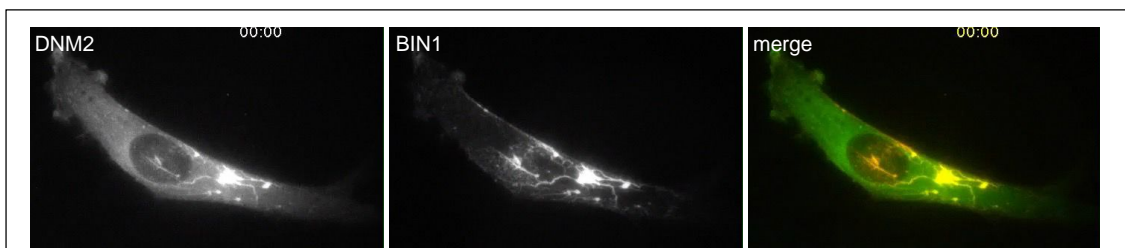


図3 筋芽細胞株C2C12におけるダイナミン2(DNM2-FLAG)とBIN1(BIN1-GFP)の共発現によるT管様構造の形成(蛍光顕微鏡像、Fujise, et al., J. Biol. Chem. 2021より改変)

野生型ダイナミン2はBIN1との結合を介してそのGTPアーゼ活性が抑制され、BIN1により形成されるT管様構造を安定化させた。一方、遺伝性筋疾患中心核ミオパチー(CNM)の変異を導入したダイナミン2はGTPアーゼ活性を上昇させ、T管様構造形成を減少させた。以上より、ダイナミン2がT管形成維持に必要であり、CNM変異によるT管形成維持の不全がCNMの分子病態機序である可能性を示し、学会発表するとともに論文として発表した(Fujise, et al.,

J. Biol. Chem. 2021; Fujise, et al., Hum Mutat. 2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hori, T., Eguchi, K., Wang, H.Y., Miyasaka, T., Guillaud, L., Taoufiq, Z., Mahapatra, S., Yamada, H., Takei, K., Takahashi, T. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Microtubule assembly by tau impairs endocytosis and neurotransmission via dynamin sequestration in Alzheimer's disease synapse model | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Elife | 6. 最初と最後の頁 e73542 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.73542. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Hamasaki, E., Wakita, N., Yasuoka H., Nagaoka, H., Morita, M., Takashim, E., Uchihashi, T., Takeda, T., Abe, T., Saleem, M.A., Ogo, N., Asai, A., Narita, A., Kohji Takei, K., Yamada, H. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 The lipid-binding defective dynamin 2 mutant in Charcot-Marie-Tooth disease impairs proper actin bundling and actin organization in glomerular podocytes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 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） 10.3389/fcell.2022.884509. eCollection 2022. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Fujise Kenshiro, Okubo Mariko, Abe Tadashi, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Nishino Ichizo, Takeda Tetsuya, Noguchi Satoru | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Imaging based evaluation of pathogenicity by novel DNM2 variants associated with centronuclear myopathy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Human Mutation | 6. 最初と最後の頁 169 ~ 179 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.24307 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Li Jianzhen, Fujise Kenshiro, Wint Haymar, Senju Yosuke, Suetsugu Shiro, Yamada Hiroshi, Takei Kohji, Takeda Tetsuya | 4. 巻 571 |
| 2. 論文標題 Dynamin 2 and BAR domain protein pacsin 2 cooperatively regulate formation and maturation of podosomes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 145 ~ 151 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.07.041 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Fujise Kenshiro, Okubo Mariko, Abe Tadashi, Yamada Hiroshi, Nishino Ichizo, Noguchi Satoru, Takei Kohji, Takeda Tetsuya | 4. 巻 296 |
| 2. 論文標題 Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 100077 ~ 100077 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015184 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 La The Mon, Tachibana Hiromi, Li Shun Ai, Abe Tadashi, Seiriki Sayaka, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Takeda Tetsuya, Ogawa Daisuke, Makino Shin ichi, Asanuma Katsuhiko, Watanabe Masami, Tian Xuefei, Ishibe Shuta, Sakane Ayuko, Sasaki Takuya, Wada Jun, Takei Kohji, Yamada Hiroshi | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Dynamin 1 is important for microtubule organization and stabilization in glomerular podocytes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The FASEB Journal | 6. 最初と最後の頁 16449 ~ 16463 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001240RR | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名 Lee, Y., Yamada, H., Pradipta, A., Ma, J.S., Okamoto, M., Nagaoka, H., Takashima, E., Standley, D.M., Sasai, M., Takei, K., and Yamamoto, M. | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Life Sci Alliance | 6. 最初と最後の頁 e201900549 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900549. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hirose, T., Cabrera-Socorro, A., Yamada, H., Lauterbach, M.A., Guillon, M., Kaneko, K., Norris, J.W., Siriwardena, K., Teillon, J., Ito, S, Takei, K., Emiliani, V., Bennaceur-Griscelli, A., Schwartz, C.E., Nguyen, G., Groszer, M. | 4. 巻 129 |
| 2. 論文標題 TP6AP2 variant impairs CNS development and neuronal survival to cause fulminant neurodegeneration | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Clin Invest. | 6. 最初と最後の頁 2145-2162 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI79990. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹居孝二 |
| 2. 発表標題 ダイナミンによる細胞骨格と膜のダイナミクス制御：新規分子マシナリーからダイナミン変異疾患の分子病態まで |
| 3. 学会等名 新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学分野セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤瀬賢志郎、山田浩司、竹居孝二、竹田哲也 |
| 2. 発表標題 中心核ミオパチー型BIN1 およびDNM2 変異体による膜リモデリング異常の解析 |
| 3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会・第19回日本蛋白質科学会年会合同大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 竹居孝二、内橋貴之、竹田哲也、山田浩司、安藤敏夫 |
| 2. 発表標題 ダイナミンの動的分子イメージング：in vitro 再構成系 × 高速AFM |
| 3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会・第19回日本蛋白質科学会年会合同大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤瀬賢志郎、山田浩司、竹居孝二、竹田哲也 |
| 2. 発表標題 筋細胞膜リモデリングにおけるメカニカルストレス応答の解析 |
| 3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田浩司、The Mon La、竹田哲也、阿部匡史、浅沼克彦、竹居孝二 |
| 2. 発表標題 腎系球体ポドサイトにおけるアンフィファイジン 1 の機能 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部匡史、The Mon La、橘洋美、竹田哲也、竹居孝二、山田浩司、 |
| 2. 発表標題 腎系球体ポドサイトにおけるダイナミンイソフォームの局在と機能 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹居孝二、テモンラ、阿部匡、竹田哲也、藤原郁子、成田哲博 |
| 2. 発表標題 ダイナミンGTPアーゼはアクチン線維の束化と分散を機械的に制御する |
| 3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohji Takei1, La The Mon, Tadashi Abe, Tetsuya Takeda, Ikuko Fujiwara, Akihiro Narita |
| 2. 発表標題 Dynamin GTPase mechanically regulates bundling and unbundling of actin filaments |
| 3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kenshiro Fujise, Hiroshi Yamada, Kohji Takei, Tetsuya Takeda |
| 2. 発表標題 Mechanical stress-responsive membrane remodeling in muscle cells |
| 3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kenshiro Fujise, Hiroshi Yamada, Kohji Takei, Tetsuya Takeda |
| 2. 発表標題 Regulation of skeletal muscle membrane robustness by membrane remodeling proteins BIN1 and Dynamin-2 |
| 3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山田 浩司 (Yamada Hiroshi) (80325092) | 岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301) | |
| 研究分担者 | 竹田 哲也 (Takeda Tetsuya) (30302368) | 岡山大学・医歯薬学域・研究准教授 (15301) | |
| 研究分担者 | 内橋 貴之 (Uchihashi Takayuki) (30326300) | 名古屋大学・理学研究科・教授 (13901) | |

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 | | | |
|---------|-------------|--|--|--|
| 米国 | Yale大学 | | | |
| 英国 | Bristol | | | |
| オーストリア | IST Austria | | | |