

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580320

研究課題名（和文） 旋毛虫由来転写関連因子 Rcd1 が筋肉細胞分化誘導に及ぼす影響の分子生物学的解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of Rcd1 protein as transcriptional cofactor, which may play an important role in the transformation of muscle cells

研究代表者

長野 功 (NAGANO ISAO)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40283296

研究成果の概要（和文）：

旋毛虫は、宿主に感染した後、筋肉細胞を変異させて寄生を続ける。我々はその筋肉細胞変異に重要と思われる Rcd1 と呼ばれる旋毛虫の分泌タンパク質をクローニングした。本研究では、Rcd1 が、旋毛虫感染による筋肉細胞を脱分化・再分化する現象にどのように関与しているかを分子生物学的に解析した。Rcd1 は筋芽細胞株である C2C12 細胞において、転写因子である AP-1、NF- $\kappa$ B の活性を増強させることにより筋肉細胞分化に重要である筋肉細胞分化関連遺伝子である myogenin, MyoD の発現を抑制し、筋肉細胞を脱分化・再分化する現象に関与していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

*Trichinella* spp. infection causes satellite cell proliferation and transformation of muscle cell to the nurse cell. Rcd1 is shown to be a transcriptional cofactor of the *c-myc* proto-oncogene product. Previously, we cloned *Rcd1* gene from the cDNA of *T. spiralis* muscle larvae, and confirmed that the Rcd1 protein is part of the E-S products. Therefore, the Rcd1 likely affects host cells and tissues for capsule formation. In the present study we investigated the effect by which the Rcd1 protein secreted from *T. spiralis* modulates myogenic differentiation in C2C12 myoblasts, and the role of the Rcd1 protein regulated NF- $\kappa$ B and AP-1 transcriptional pathway. The expression of *myogenin* and *MyoD* genes in C2C12 myoblasts transfected with Rcd1 gene was significantly lower than those in non-transfected C2C12 myoblasts. And we demonstrate that Rcd1 is a potent inhibitor of muscle differentiation through activation (C2C12 cells) of NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathway. It may be inferred from these results that the Rcd1 protein functions as a transcriptional factor or cofactor of satellite cell proliferation and muscle cell transformation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：旋毛虫、筋肉細胞変異、筋肉細胞分化、Rcd1、AP-1、NF- $\kappa$ B、myogenin, MyoD

## 1. 研究開始当初の背景

寄生性線虫である旋毛虫は、宿主筋肉細胞に感染した後、筋肉細胞を自己の生存に適した細胞（ナース細胞）に変異させて寄生を続ける。ナース細胞は形態学的にも機能的にも筋肉細胞とは全く異なる細胞である。我々は、この現象を解明するために、旋毛虫感染に伴う宿主側の遺伝子動態について検討を行い、筋肉細胞の再分化の経過にアポトーシスが重要な役割を有していることを明らかにした。一方、cDNA マイクロアレイを用いた検討では、感染により宿主細胞の細胞分化関連遺伝子、細胞成長関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子およびガン遺伝子に大きな変化が認められることを見出した。この筋肉細胞変異には旋毛虫が分泌するタンパク質が重要な役割を担っている可能性がすでに 10 年以上前から示唆されている。我々は国内外研究者に先駆け、筋肉細胞変異に重要と思われる旋毛虫特異的な分泌タンパク質を数種類同定し、報告してきた。これらの研究成果からも明らかかなように、旋毛虫感染の分子機構に関して、日本国内はもちろん、世界的に見ても我々が研究をリードしている状況であるが、変異を誘導する旋毛虫の分泌タンパク質についての本質についてはいまだ明らかではない。最近我々は、Rcd1(required cell differentiation 1) と呼ばれる分子を旋毛虫の cDNA ライブラリーからクローニングすることに成功した。Rcd1 は 1998 年に酵母の性分化に関連するタンパク質として初めて分離、同定されたものであるが、広く生物界にそのホモログが存在することが分かっている。また、最近 Rcd1 は F9 細胞を分化させる転写補助因子である可能性が示唆された。さらに Rcd1 は c-Myb (ガン遺伝子の細胞側相同遺伝子でその産物は転写活性化因子のひとつであるが、その細胞発現レベルは未分化状態の時に高く分化に従い低下する) と相互作用して、c-Myb 特異的プロモーターである mim-1 の活性化を抑制する。一方、興味深いことは旋毛虫の Rcd1 は筋肉内の幼虫(筋肉幼虫) から分泌されているということである。旋毛虫から分泌される転写関連因子としては初めての報告であり、「分泌される」ということは宿主細胞に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。このタンパク質の役割を解明することにより筋肉細胞の変異現象はより一層解明が進むものと思われる。また、旋毛虫感染の変異モデルは、現象論的な記載だけでも興味深いが、筋肉細胞の変異を誘導する生理活性タンパク質が解明されれば、筋肉細胞から他の細胞への分化誘導に結びつく。すなわち細胞生物学のみならず、再生医学へのキータンパク質として大いに期待でき、新しい次元の研究を可能にする

ものである。また、医薬品としての応用も十分に期待できるものと考ええる。

## 2. 研究の目的

本研究の目標は二つある。第一は我々が今までの研究の中でクローニングしてきた Rcd1 を含む旋毛虫の分泌タンパク質が、旋毛虫感染に特異的な現象である最終分化細胞である筋肉細胞を脱分化・再分化する現象にどのように関与しているかを分子生物学的に解明することである。第二はその解明により、これらのタンパク質が再生医学等への応用に可能かどうかを探ることである。

## 3. 研究の方法

### (1) Rcd1 の生理学的活性の解析

①哺乳類由来の Rcd1 は転写因子である c-Myb と相互作用して、c-Myb 特異的プロモーターである mim-1 の活性化を抑制する。しかし、旋毛虫 Rcd1 と哺乳類由来の Rcd1 のアミノ酸配列のホモロジーは約 60%であり、決して高いとはいえず、その生理学的活性は不明である。そこで、c-Myb と旋毛虫 Rcd1 との相互作用を検討した。すなわち真核細胞発現ベクター (pcDNA3.1) に旋毛虫 Rcd1 遺伝子と c-Myb 遺伝子をそれぞれ組み込み、HEK293 細胞に導入して強制発現させる。その後、c-Myb の mim-1 プロモーターを介する転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

②転写因子である AP-1、E2F および NF- $\kappa$ B は、細胞分化においても重要な役割を果たしていることが知られている。そこで旋毛虫 Rcd1 の AP-1、E2F および NF- $\kappa$ B の各特有な応答配列に対するそれぞれの転写活性に与える影響を前項と同様にルシフェラーゼアッセイによって解析した。導入細胞は HEK293 細胞 (AP-1、E2F および NF- $\kappa$ B 応答配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを導入した細胞をそれぞれ PMA、TNF $\alpha$  および FCS で刺激) および筋芽細胞株である C2C12 細胞 (無刺激) を用いた。

③Rcd1 遺伝子を C2C12 細胞に導入して種々遺伝子群の発現解析を行った。すなわち、pcDNA3.1 ベクターに旋毛虫 Rcd1 遺伝子を組み込み、C2C12 細胞へ導入して遺伝子の発現動態解析をリアルタイム PCR を用いて行った。発現解析した遺伝子群は我々がすでに旋毛虫感染により発現変化を確認した細胞分化関連遺伝子、細胞成長関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子、ガン遺伝子、アポトーシス関連遺伝子等である。

④筋肉細胞分化に重要である myogenin、MyoD および Myf5 の各遺伝子の発現についてさらに詳細に解析を行った。すなわち、C2C12

細胞、あるいは2%馬血清で分化誘導を行ったC2C12細胞にRcd1遺伝子を導入し、発現動態をリアルタイムPCRを用いて解析した。また、細胞におけるmyogenin、MyoD、Myf5タンパク質の発現量をウエスタンブロットで解析した。

⑤Rcd1遺伝子に対応するdsRNAを作製して種々の方法により旋毛虫の新生幼虫、筋肉幼虫および成虫に導入して、RNAi解析を行った。

## (2)新規タンパク質のクローニング

①旋毛虫による宿主筋肉細胞の変異誘導は多くの分泌タンパク質の相互作用によって行われると考えられる。よって、Rcd1以外で重要と思われる旋毛虫が分泌する新規のタンパク質のクローニングを試みた。すなわち、旋毛虫のcDNAライブラリーよりマウスの感染血清を用いて免疫スクリーニングを行った。その中から数クローンを抽出し、DNA塩基配列の解析を行い有望なクローンを選別した。

②上記によりクローニングしたクローンについてリアルタイムPCRにより発現解析を行った。また、組換えタンパク質を作成し、当タンパク質のウエスタンブロット解析および旋毛虫の虫体内分布解析を行った。また、当タンパク質と旋毛虫感染マウスの血清との反応性を経時的に観察した。

## 4. 研究成果

### (1)Rcd1の生理学的活性の解析

#### ①c-Mybと旋毛虫Rcd1との相互作用

旋毛虫Rcd1遺伝子のHEK293細胞への導入量が増えるのに従い、mim-1の転写活性の抑制は段階的に増加した。しかし、報告されている哺乳類由来のRcd1と比較すると抑制量は少なかった。

#### ②Rcd1のAP-1、E2FおよびNF- $\kappa$ Bの各特有用な応答配列に対する転写活性に与える影響

Rcd1遺伝子のHEK293細胞への導入量に比例してAP-1、NF- $\kappa$ Bに対する転写活性は低下したが、E2Fの転写活性は影響を受けなかった。一方、C2C12細胞を用いた場合（細胞は無刺激）はHEK293細胞の場合とは逆にAP-1、NF- $\kappa$ Bに対する転写の活性化が認められた（図1-1および1-2）。

#### ③Rcd1遺伝子をC2C12細胞に導入しての各遺伝子群の発現

筋肉細胞分化関連遺伝子のうちmyogeninおよびMyoDでRcd1導入による発現抑制が観察された。また、筋細胞分化の方向づけを行う因子であるPax7の発現も抑制が認められた。

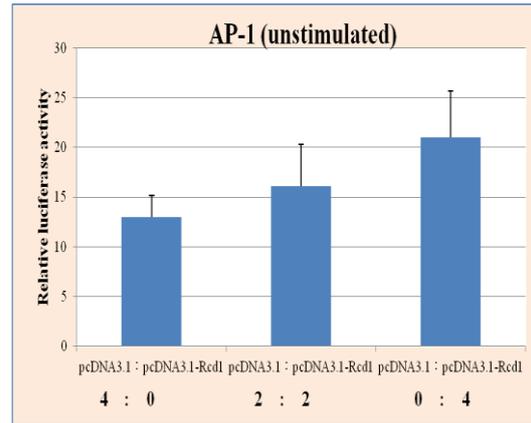


図1-1 C2C12細胞（無刺激）におけるRcd1のAP-1応答配列に対する転写活性に与える影響

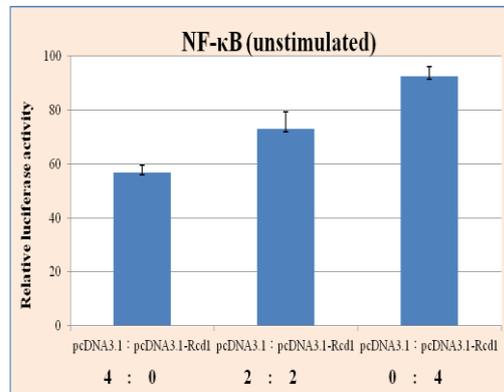


図1-2 C2C12細胞（無刺激）におけるRcd1のNF- $\kappa$ B応答配列に対する転写活性に与える影響

#### ④myogenin、MyoD、Myf5の発現解析

C2C12細胞は未分化時は紡錘形を呈しているが、分化誘導により細長く伸張し、互いに融合し筋管を形成する。MyoDあるいはMyf5の発現は分化誘導前から認められ、分化誘導によってmyogeninが発現し始める。リアルタイムPCRを用いた結果では、Rcd1を強制発現させたC2C12細胞においては、分化誘導前から分化誘導後のすべての段階において、myogenin、MyoDの発現が抑制されたが、Myf5では大きな影響を与えなかった（図2-1、2-2および2-3）。

また、ウエスタンブロットで行ったRcd1遺伝子を導入したC2C12細胞におけるmyogenin、MyoDおよびMyf5タンパク質の発現解析でもリアルタイムPCRとほぼ同様な結果であった（図3）。

#### ⑤RNAiによる解析

Rcd1遺伝子に対応するdsRNAを作製して旋毛虫の新生幼虫、筋肉幼虫、成虫に導入を試みたが、それぞれの遺伝子のノックダウンは

確認されなかった。

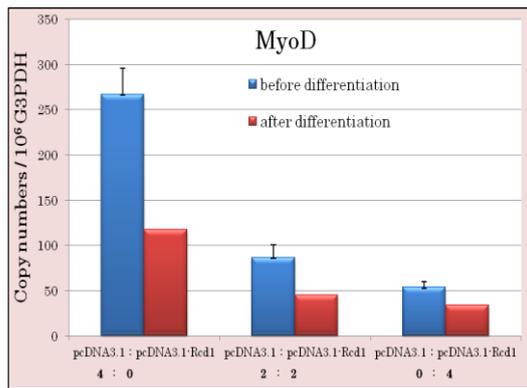


図 2-1 分化前、分化後の C2C12 細胞における Rcd1 の MyoD の発現に与える影響

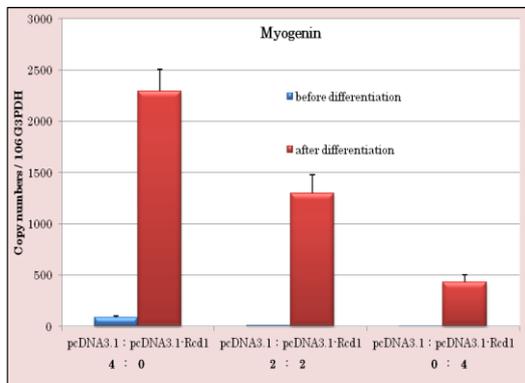


図 2-1 分化前、分化後の C2C12 細胞における Rcd1 の myogenin の発現に与える影響

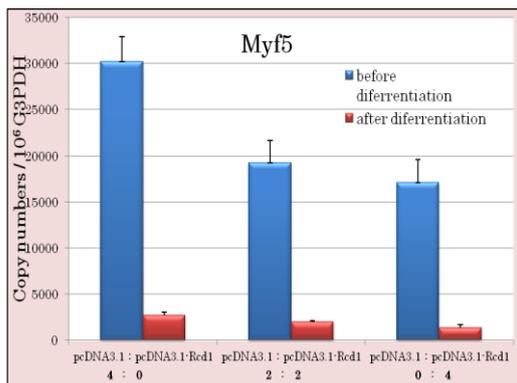


図 2-3 分化前、分化後の C2C12 細胞における Rcd1 の Myf5 の発現に与える影響

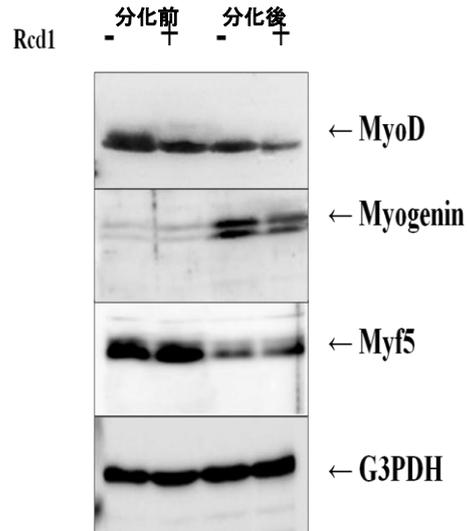


図 3 分化前、分化後の C2C12 細胞における Rcd1 の myogenin、MyoD および Myf5 タンパク質の発現に与える影響

転写因子 AP-1 および NF- $\kappa$ B の活性化によって myogenin、MyoD の発現は減弱し、その結果、筋形成が抑制されることはすでに報告されている。今回の結果から、筋芽細胞 C2C12 では、Rcd1 は転写因子 AP-1 および NF- $\kappa$ B を活性化させることによって myogenin および MyoD の発現を抑制している可能性が示唆された。今後はさらに myogenin、MyoD および Myf5 以外の細胞分化関連遺伝子（今回抑制が観察された筋細胞分化の方向づけを行う因子である Pax7 等）の発現と転写因子 AP-1 および NF- $\kappa$ B の活性化との関連性について検討を行いたい。

## (2) 新規タンパク質のクローニング

旋毛虫の cDNA ライブラリーより新規のタンパク質をクローニングした。このタンパク質はホモロジー検索から calponin-family である Transgelin に近い分子と考えられた。RT-PCR およびウエスタンブロットによって発現解析を行った結果、当該タンパク質は旋毛虫の各ステージのうち新生幼虫で最も高く発現していた。また、旋毛虫感染マウスの Transgelin 抗体は感染後極めて早期に上昇していた。新生幼虫は筋肉細胞に侵入する段階であり、筋肉細胞変異に最も重要な影響を与えるステージである。すなわち、当タンパク質は筋肉細胞変異の初期段階において何らかの役割を担っている可能性が示唆される。よって、今後は、Transgelin の筋肉細胞変異に関連する生理活性について詳細に検討を行いたい。

## 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 6 件)

- ① Nagano, I., Wu, Z., Asano, K. & Takahashi, Y. Molecular cloning and characterization of transgeline-like proteins mainly transcribed in newborn larvae of *Trichinella* spp. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2): 134-142. 2011. 査読有
- ② Wu, Z., Nagano, I., Asano, K., & Takahashi, Y. Infection of non-encapsulated species of *Trichinella* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response. *Parasitology Research*, 107 (5): 1173-1188, 2010. 査読有
- ③ Lo, Y. C., Hung, C. C., Lai, C. S., Wu, Z., Nagano, I., Maeda, T., Takahashi, Y., Chiu, C. H., & Shyong Jiang, D. D. Human trichinosis after consumption of soft-shelled turtles, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*. 15(12): 2056-2058, 2009. 査読有
- ④ Nagano, I., Wu, Z. & Takahashi, Y. Functional genes and proteins of *Trichinella* spp. *Parasitology Research*, 104 (2): 197-207, 2009. 査読有
- ⑤ Wu, Z., Nagano, I., Kajita, K., Nishida, M. & Takahashi, Y. Hypoglycaemia induced by *Trichinella* infection is due to the increase of glucose uptake in infected muscle cells. *International Journal for Parasitology*, 39(4):427-434, 2008. 査読有
- ⑥ Wu, Z., Nagano, I., & Takahashi, Y. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasite and vector*. 19 (1) 27, 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Isao Nagano, Rcd1 protein secreted from *Trichinella spiralis* down-regulates myogenin and MyoD proteins in C2C12 myoblasts, and inhibits binding activities of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. 13th

International Conference on Trichinellosis, August 16 2011, Changchun, China.

- ② 長野 功、種特異的組換え抗原を用いた旋毛虫症の血清学的診断法の検討、第 65 回日本寄生虫学会西日本支部総会、2009 年 11 月 7 日、大阪市
- ③ 長野 功、ELISA における *Trichinella* の 53kDa 組換えタンパク質と感染マウス血清との反応性の検討、第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27 日、東京都

[図書] (計 1 件)

- ① 長野 功、第 65 回日本寄生虫学会西日本支部大会事務局、Recent Advances in Medical Sciences (Parasites and their Human and Animal Hosts)、2010、111-114.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：旋毛虫の種特異的抗原；および該抗原を利用した旋毛虫感染の検査法  
発明者：長野 功、高橋優三  
権利者：国立大学法人岐阜大学  
種類：特許権  
番号：特許第 4830106 号  
取得年月日：平成 23 年 9 月 30 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等  
無

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 功 (NAGANO ISAO)  
岐阜大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：40283296

(2) 研究分担者

呉 志良 (WU ZHILIANG)  
岐阜大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90313874