

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590183

研究課題名（和文）骨格筋細胞膜関連機能分子に関する分子細胞生物学的研究

研究課題名（英文）Molecular cell biological studies on the functional molecules in skeletal muscle.

研究代表者

依藤 宏 (YORIFUJI HIROSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00158544

研究成果の概要（和文）：骨格筋は収縮時に細胞膜に張力がかかり、これは時に細胞膜を破綻させる。修復は小胞によるが、その小胞の由来は明らかではない。我々は骨格筋内の小胞の膜への融合にかかわる蛋白の検索と収縮性線維と細胞膜を繋ぐ線維系の一構成蛋白の β -シネミンを欠くマウスの作成・解析をおこなった。前者ではVAMP2という蛋白が、従来知られていなかった骨格筋の分化マーカーとなること、VAMP5が成熟後の骨格筋で働いていることを明らかにした。また、 β -シネミンは正常の骨格筋の発生、通常の飼育下や中程度の運動負荷時の骨格筋の維持には必須ではないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Sarcolemma is exposed to tensile strength when skeletal muscle fiber contracts and it sometimes makes tears in sarcolemma. The repair is carried out by the fusion of vesicles. But the origin of the vesicles for repair is not known. We studied VAMPs (vesicle associated membrane proteins) in skeletal muscles and found that VAMP2 is a unique marker for muscle differentiation and VAMP5 works in mature muscle fibers. In addition, we studied the functions of beta-synemin in skeletal muscles in vivo which is not only a constituent of intermediate filaments but also a link molecule between the filaments and sarcolemma. We found that beta-synemin is not necessary for muscle development and maintenance under usual breeding condition as well as moderate exercise loading.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：解剖学・細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：骨格筋、機能分子、小胞融合関連蛋白、細胞膜—細胞骨格連関

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋細胞は収縮に特殊化した細長い細胞であり、細胞内に収縮のための筋原線維と呼ばれる線維系を高度に発達させている。骨格筋細胞は収縮時に周囲を包む細胞膜に対して強い張力が働くと言われている。この張力に対して、骨格筋細胞は筋原線維と細胞膜の間をつなぐ細胞骨格系を発達させるとともに、張力による細胞膜の破綻に対する特殊な修復機構を持っている。細胞膜（筋形質膜）の修復については小胞によりおこなわれるとされているが、その小胞がどこからどのようにして運ばれてくるかについては明らかではない。我々の研究室では骨格筋の細胞内の小胞の繫留・融合をとおして膜のターンオーバーに関与するタンパク SNARE 複合体のうち、VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein) の系統的な解析を始め、骨格筋に発現する VAMP アイソフォームを調べた。VAMP は 7 種類アイソフォームが知られているが、VAMP1~3 については、成熟骨格筋では VAMP2 が筋衛星細胞に発現すること、VAMP1 は骨格筋内の神経に、VAMP3 は筋内の血管内皮に発現していることを見出し報告した。それ以外には文献的にイムノプロット法により VAMP5、培養下の筋細胞（生体内の筋細胞に比べ十分な分化度に到達しない）の免疫染色により VAMP5、7 の存在が示されているに過ぎない。

(2) 骨格筋の筋原線維と細胞膜間をつなぐ細胞骨格については、その一つに desmin, synemin, paranemin などによって構成されるヘテロ多量体の中間径フィラメントがあり、これら中間径フィラメントは筋原線維と細胞膜をつなぐことにより骨格筋細胞にかかる物理的負荷に対する筋形質膜の安定化にも寄与していると考えられている。中間径フィラメントがその機能を発揮するためには、中間径フィラメントを構成する分子と Z-disc や筋形質膜上でアンカーとなる分子の相互作用が重要である。しかしながら中間径フィラメントと Z-disc あるいは筋形質膜との分子的な連関についてはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 骨格筋の VAMP についてはこれまでの研究成果を基礎に生体内の骨格筋に発現しているアイソフォームの分布、機能を検討することを目的とする。具体的には VAMP2 と VAMP5 を対象を絞り、① VAMP2 については、その局

在が明らかになった筋衛星細胞は、成体の骨格筋が再生する際に、筋芽細胞として働く。そこで、本研究では、骨格筋の分化過程における VAMP2 発現と分布の変化を調べ、VAMP2 小胞の役割についても検討する。② VAMP5 については、生体内の骨格筋における分布、筋再生過程での発現状態の検討を通し、その機能を明らかにする。

(2) β -synemin は筋組織におけるヘテロ多量体の中間径フィラメント構成分子である。これまでに desmin, plectin といった中間径フィラメント構成分子・修飾タンパクや α -dystrobrevin といった形質膜の裏打ち分子と結合することが報告されている。このことから β -synemin は中間径フィラメントと dystrophin-糖タンパク複合体とを結び付け、中間径フィラメントを形質膜に繋ぎ止める役割を持っていることも推測されている。しかしこれらのデータは *in vitro* のものが多く β -synemin の生体における機能はいまだ明らかにはなっていない。本研究の β -synemin についての目的は、その機能を個体レベルおよび組織レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ① VAMP2 については以下の 3 つのモデルを用いた。ラット胚での筋発生、単離した筋衛星細胞の分化過程、および、培養筋芽細胞 C2C12 細胞の分化過程である。これらにおいて、抗体染色や RNA 干渉を行った。② VAMP5 については正常および筋ジストロフィーモデルマウスにおける組織切片の蛍光抗体染色、再生筋における抗体染色などにより解析をおこなった。

(2) β -synemin については、その機能を個体レベルおよび組織レベルで明らかにするため、遺伝子欠失マウス作成の定法に基づき β -synemin 欠失マウスを作製した。その表現型解析にはヘマトキシリン-エオジン染色 (HE 染色) による組織切片、血中クレアチンキナーゼ (CK) 値、凍結切片における蛍光抗体染色をおこなった。また、マウス用トレッドミルによる運動負荷をかけた後、血中 CK 値およびエバンス・ブルーの生体染色による骨格筋細胞膜傷害の検索、HE 染色による骨格筋組織像の検討をおこなった。

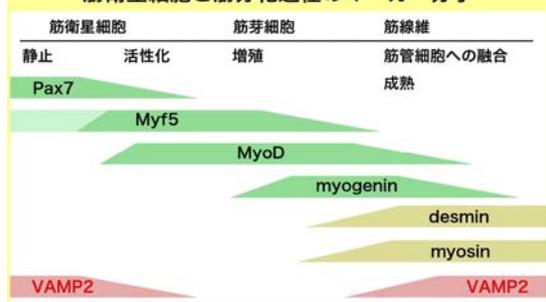
4. 研究成果

(1) ① VAMP2 について：胚における筋発生で

は、胎生 12 日目で筋節に VAMP2 陽性細胞があらわれた。16 日目および出生直後の未成熟な骨格筋では、筋管細胞が VAMP2 陽性であった (Tajika Y, et al 2008)。筋衛星細胞は、成熟骨格筋では静止状態にあり、単離すると活性化・増殖し、筋管細胞へと筋分化する。この過程において、VAMP2 は、静止期の筋衛星細胞と筋分化過程の筋管細胞に多く発現し、増殖期には検出されなかった。C2C12 細胞は、増殖と筋管細胞への分化を示すが、VAMP2 は増殖期には少なく、筋分化と共に増加することが分かった。静止期の筋衛星細胞のマーカーとして、Pax7 や M-cadherin などが知られているが、いずれの発現も静止期に限定され、筋分化が進むと減少する。VAMP2 は、静止期の衛星細胞にあるが、いったん減少し、筋分化と共に再び発現する。筋衛星細胞のマーカーとしては、これまでにないユニークな発現パターンを示すものである (図 1)。

VAMP2 の筋分化における役割を探るため、C2C12 細胞で RNA 干渉を行い、筋管細胞の形成を観察した。これまでのところ、VAMP2 の発現を抑制しても、筋管細胞は通常に形成されることまで確認した。現在、ジストログリカンやインテグリンなど、骨格筋に特徴的な膜タンパク質のソーティングへの影響について、解析を行っている。

図 1 筋衛星細胞と筋分化過程のマーカー分子



Zammit PS, 2006, JHC., Charge SBP, 2003, Physiol Rev. より改変

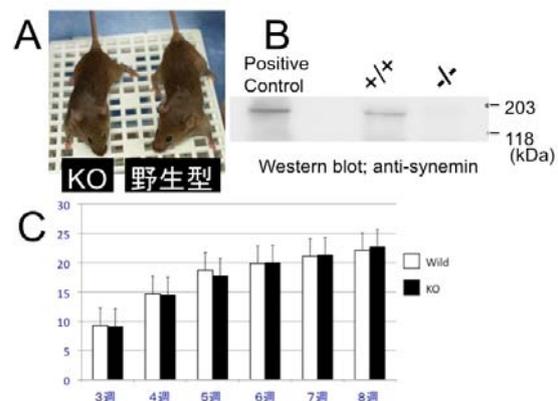
(図 1) 筋衛星細胞のマーカーとの比較 Pax7 は静止期の筋衛星細胞に発現し、その後の筋分化過程では、減少する。Myf5、MyoD、myogenin は、一過的に発現する。Desmin、myosin は、筋分化と共に増加する。一方、VAMP2 は、静止期の筋芽細胞と、筋管細胞に発現する。

②VAMP5 について：1) VAMP5 は蛍光抗体法によると野生型マウスに比べて筋ジストロフィーのモデルマウスの一つの mdx マウスで多く発現していた。2) VAMP5 の骨格筋線維内の発現は細胞膜に沿った細胞辺縁にやや多く、径の小さい筋線維でより強い発現がみられ、筋線維型との関係を調べたところ、タイプ II A 線維で強く発現していた。3) 筋分化との関係を見るために実験的筋再生過程を調べた

ところ、再生 7 日目まではほとんど発現はなく、3 週目で強く発現する線維が出現、6 週目で発現する線維数も増加するとともに、筋線維当たりの発現量も多くなった。以上から VAMP5 は骨格筋では成熟後の線維で何らかの膜小胞輸送に関与しその機能を果たしていることが考えられた。

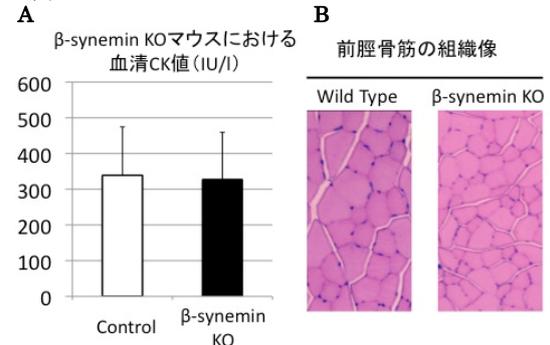
(2) β -synemin 欠失マウス (KO マウス) はメンデル比どおりに出生し、外見上明らかな異常は見られずこれまでのところ正常に発育している (図 2A、C)。 β -synemin タンパクの発現消失についてはウェスタンブロットにて確認した (図 2B)。

図 2



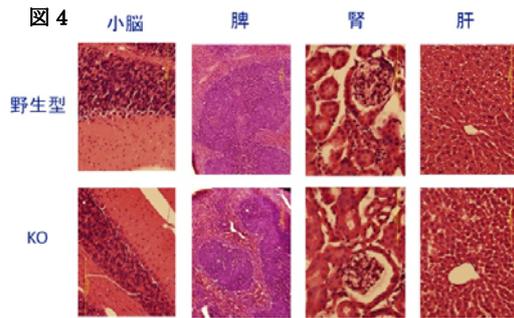
まず基本的な骨格筋における表現系を解析するため血清 CK 値および HE 染色による前脛骨筋の組織像の観察を行った。図 3A に示すように KO マウスの血清 CK 値は野生型マウスと比べて有意な差は認められなかった。また前脛骨筋の組織像についても野生型マウスと比べて有意な差は見られず、中心核や筋線維の大小不同といった骨格筋線維の破壊・再生像は観察されなかった (図 3B)。

図 3

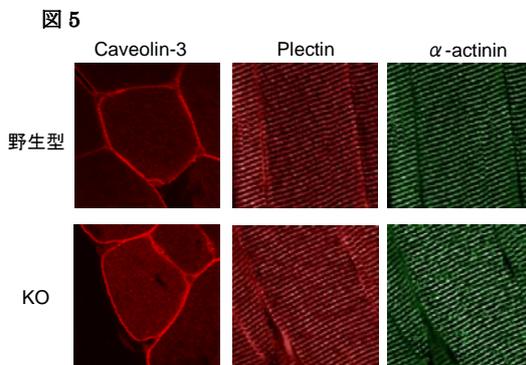


また骨格筋以外の表現型を検討するため、脳 (小脳)、脾、腎、肝についてパラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行って観察した。その結果、検討したいずれの臓器でも、野生型マウスと KO マウスの間に有意な差は認め

られなかった(図4)。



さらに詳しい組織学的解析をするため、骨格筋細胞膜局在分子である caveolin-3、中間径フィラメント構成分子である plectin、Z-disc 構成分子である α -actinin の免疫染色を行った。これらの分子の局在は野生型マウスと β -synemin 欠失マウスの間で有意な差を認めなかった(図5)。



β -synemin 欠失マウスに運動負荷をかけた際の筋損傷についてトレッドミルを使って、野生型との比較で検討した。血中 CK 値、エバンス・ブルーによる生体染色、組織像において、個体差はみられるものの、現在までに有意な細胞膜、筋線維損傷の所見は得られなかった。

これらの結果から β -synemin は正常な骨格筋の発生、通常飼育環境下、および中程度の運動負荷時における骨格筋組織の維持には必須でないことが明らかとなった。

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7件)

①Tajika Y, Takahashi M, Hino M, Murakami T, Yorifuji H: VAMP2 marks quiescent satellite cells and myotubes, but not activated myoblasts. *Acta Histochem Cytochem*, 43 (4) 107-114, 2010. (査読有)

②Hino M, Hamada N, Tajika Y, Funayama T, Morimura Y, Sakashita T, Yokota Y, Fukamoto K, Mutou Y, Kobayashi Y, Yorifuji H: Heavy ion irradiation induces autophagy in irradiated C2C12 myoblasts and their bystander cells. *J Electr Microsc*, 59 (6) 495-501, 2010. (査読有)

③Hino M, Hamada N, Tajika Y, Funayama T, Morimura Y, Sakashita T, Yokota Y, Fukamoto K, Kobayashi Y, Yorifuji H: Insufficient membrane fusion in dysferlin-deficient muscle fibers after heavy-ion irradiation. *Cell Struct Funct*, 34 (1) 11-15, 2009. (査読有)

④Tajika Y, Murakami T, Sato M, Kubota F, Yorifuji H: VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development. *Develop Dynam*, 237, (7) 1886-1892, 2008. (査読有)

⑤Hijikata T, Nakamura A, Isokawa K, Imamura M, Yuasa K, Ishikawa R, Kohama K, Takeda S, Yorifuji H: Plectin 1 links intermediate filaments to costameric sarcolemma through β -synemin, α -dystrobrevin and actin. *J Cell Sci*, 121 (12) 2062-2074, 2008. (査読有)

⑥Murakami T, Hijikata T, Yorifuji H: Staging of disuse atrophy of skeletal muscles on immunofluorescence microscopy. *Anat Sci Int*, 83 (2) 68-72, 2008. (査読有)

⑦Kubota F, Murakami T, Tajika Y, Yorifuji H: Expression of protocadherin 18 in the CNS and pharyngeal arches of zebrafish embryos. *Int J Develop Biol*, 52 (4) 397-405, 2008. (査読有)

[学会発表] (計5件)

①高橋麻衣子、多鹿友喜、Astrid F. K.、日野瑞城、上野仁之、村上徹、依藤宏：骨格筋における VAMP5 の発現レベルは、線維タイプにより異なる。第116回日本解剖学会 パシフィコ横浜 2011年3月30日 横浜

②多鹿友喜、高橋麻衣子、佐藤真人、村上徹、依藤宏：筋衛星細胞の活性化過程における

VAMP2の発現変化. 第115回日本解剖学会 岩手県民会館 2010年3月28日 盛岡

③高橋麻衣子、多鹿友喜、佐藤真人、村上徹、依藤宏：筋ジストロフィーマウス骨格筋におけるVAMP5の発現. 第115回日本解剖学会 岩手県民会館 2010年3月28日 盛岡

④多鹿友喜、佐藤真人、村上徹、依藤宏：小胞輸送関連タンパク VAMP2の細胞内分布に関する組織化学的検討. 第56回北関東医学会総会 群馬大学刀城会館 2009年10月8日 前橋

⑤多鹿友喜、佐藤真人、村上徹、依藤宏：筋管細胞におけるVAMP2の細胞内局在. 第114回日本解剖学会 岡山理科大学 2009年3月28日 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依藤 宏 (YORIFUJI HIROSHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00158544

(2) 研究分担者

多鹿 友喜 (TAJIKI YUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90400738

佐藤 真人 (SATO MAHITO)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60375532
(2008、2009年度)

上野 仁之 (UENO HITOSHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30586251
(2010年度)