

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590230

研究課題名(和文)骨格筋細胞骨格と裏打ち構造に関する形態学的、分子細胞生物学的研究

研究課題名(英文)Morphological and molecular cell biological study on cyto- and membrane-skeleton in skeletal muscle

研究代表者

依藤 宏 (Yorifuji, Hiroshi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00158544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の筋原線維を細胞膜につなぎ止める細胞骨格の電子顕微鏡による解析を、細胞内の可溶性蛋白を洗い流す等の処置により線維構造を見やすくしておこなった。アクチン線維および中間径線維が筋原線維と細胞膜をつないで走り、細胞膜では膜直下の暗調斑と連結する像が認められた。これらの繊維構造は筋ジストロフィーのモデルマウスでは減少していた。また骨格筋の中間径線維の構成要素であるシネミンについて、生体内での機能を調べた。マウスでは筋持久力、速筋・遅筋比率に関係すること、ジストロフィンとの二重欠損では生殖能力の落ちることが明らかになった。発生期の魚では受精後56～72時間の心臓に発現していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Using transmission electron microscope, we investigated anchoring system between myofibrils and sarcolemma by washing out cytoplasmic soluble proteins with various methods. Actin and intermediate filaments links between myofibrils and sarcolemma and many of them are anchored to the subsarcolemmal densities. These filamentous structures were less common in skeletal muscles of mdx mice. We also investigated the functions of synemin that is a component of intermediate filaments in skeletal muscle. Through experiments, it may relate to the endurance of skeletal muscle and the change of fiber types. Furthermore we investigated relationship of dystrophin and synemin. We found that deficiency of dystrophin and synemin affected fertility. During the development of Zebrafish embryo, it expressed in the heart from 56 to 72 hours after fertilization.

研究分野：医歯薬学

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 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋の筋原性と細胞膜をつなぐ細胞骨格についてはほとんどが蛍光抗体法による光学顕微鏡レベルのものであり、電子顕微鏡レベルの詳細な研究は細胞膜直下の特殊領域あるいは筋原線維の Z 盤周囲に限られ、またそれらが Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスの mdx マウスでどうなっているかの観察はおこなわれていない。

(2) 一方、細胞骨格の一種である中間径フィラメントは主として細胞形態の形成・維持に働く。synemin は骨格筋、心筋、神経細胞などに多く発現するタイプ IV 型の中間径フィラメントである。synemin は骨格筋では光学顕微鏡レベルで Z 盤に局在することが知られており、筋原線維の形成・維持に関与すると考えられていた。しかし synemin 単体ではフィラメントが形成できず、骨格筋内における生理的な機能についてはまだ解明されていない。そこで生理的な機能を解析するため、synemin ノックアウトマウスを作成するとともにゼブラフィッシュ胚での発現の検討をおこなった。

2. 研究の目的

(1) 骨格筋における筋原線維-細胞膜間をつなぐ細胞骨格要素および細胞膜裏打ちについて電子顕微鏡レベルで検討するとともに mdx マウスで変化が見られるかを解析する。

(2) γ -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 γ -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 γ -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 γ -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。また現在、シネミン・ノックアウトマウスは我々の研究室ですでに確立され、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することが分かっている。さらにシネミン・ノックアウトマウスでは、骨格筋の形態への影響は、光学顕微鏡レベルでは認められなかった。

そこで、本研究では、運動負荷時の骨格筋へ

の影響を調べる。さらに、裏打ちを形成するジストロフィンとの二重欠損マウスを作成し、骨格筋の形成や安定性に対する影響を解析する。それと同時に発生期におけるシネミンの役割を調べるためゼブラフィッシュにおいて、シネミンをクローニングし、胚における発現を検討する。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスあるいは mdx マウスについて急速凍結ディープエッチ法(QF-DE 法)あるいは超薄切片法で細胞膜-筋原線維をつなぐ細胞骨格要素および細胞膜裏打ちについて解析をおこなう。

(2) シネミン・ノックアウトマウスに関しては、まず形質膜の裏打ち構造に関連する蛋白質の発現量変化をウエスタンブロッティングにより解析した。つぎにトレッドミルを用いた運動負荷(図1)後にエバンス・ブルーを尾静注し筋損傷を調べた。トレッドミルを用いて持久力を野生型マウスと比較した。さらに筋繊維特異的な発現をするミオシンの抗体を用いて、遅筋・速筋の構成比の違いを調べた。



図1 トレッドミルと運動負荷方法

二重欠損マウスについては、まずジストロフィン欠損マウスである mdx マウスとシネミン・ノックアウトマウスを交配して作製した。さらに作製されたマウスを HE 染色及び電子顕微鏡による観察により形態観察を行った。ゼブラフィッシュについては哺乳類のシネミンと相同遺伝子の検索をおこない、そのクローニング後、*in situ hybridization* で胚における局在を経時的に検討した。

4. 研究成果

(1) QF-DE 法では筋形質膜のカベオラ周囲にアクチンと考えられる線維が走行し、細胞膜裏打ちとも結合するとともに、一部中間径線維も認めることができた。超薄切片法では筋原線維と細胞膜間にアクチン線維および中間径線維の存在が見られ、これらは細胞膜直下の発達した裏打ち、即ち暗調斑に接続する像も観察された。mdx マウスではこれらの線維の数の減少と試料処理によっては細胞膜-筋原線維間が離開する傾向が認められた。

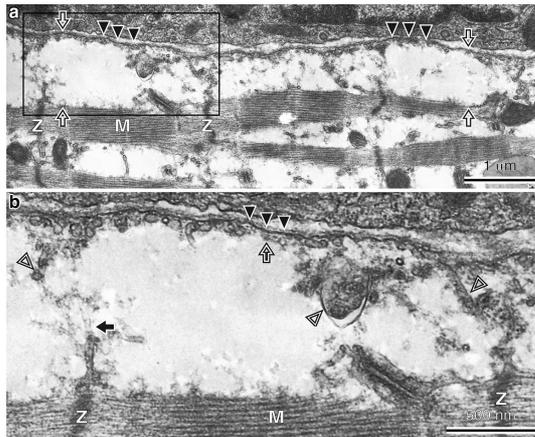
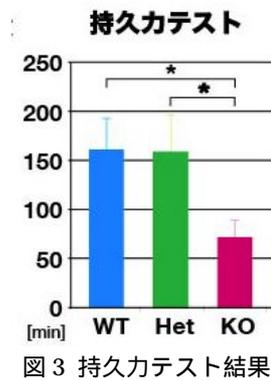


図2 mdx マウスの細胞膜-筋原線維間(Triton 処理後)

(2) シネミン・ノックアウトマウスの解析
シネミン・ノックアウトマウスの骨格筋の微細構造を観察するために電子顕微鏡による前脛骨筋の形態観察を行ったが、特に異常は見られなかった。
シネミン・ノックアウトマウスには表現型の異常が顕著に見られないことから、関連する蛋白質が機能補完している可能性を考え、前脛骨筋と脳を試料としてウエスタンブロッティング法を用いて野生型との比較を行った。しかし、蛋白の発現量に顕著な変化は見られなかった。
次いで、シネミン・ノックアウト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。エバンス・ブルーによる生体染色において有意な細胞膜損傷の所見は得られなかった。
さらにシネミン・ノックアウトマウスの持久力テストを野生型と比較して行ったところ、有意にシネミン・ノックアウトマウスの持久力が下がっていることが分かった(図3)。



次に持久力の低下は筋線維の違いにあると考え、速筋及び遅筋特異的な発現をするミオシンの抗体を用いて、遅筋・速筋の構成比の違いについてヒラメ筋を用いて調べた。ヒラメ筋においてはシネミン・ノックアウトマウスは野生型に比べ速筋が減っているということが分かった(図4)。速筋の割合が減少しているのに持久力が低下している理由としては、筋全体の減少や下り坂効果による速筋への負担増加が原因であると考えられる。

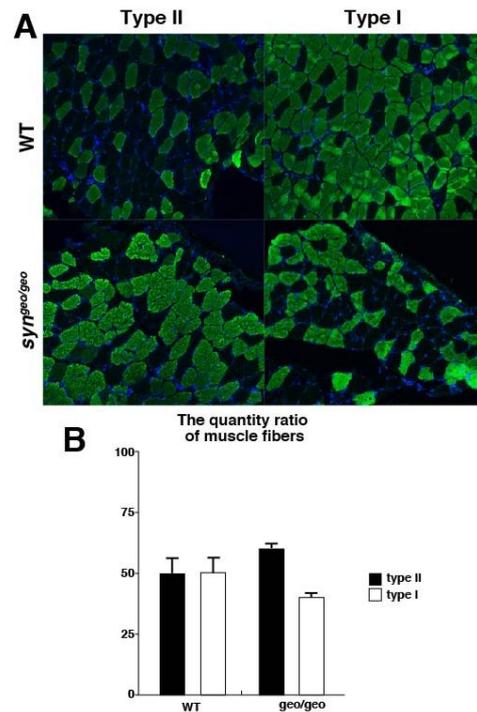


図4 野生型マウスとノックアウトマウスにおける筋線維型の相違

シネミンは筋原線維のZ盤や細胞膜直下のコスタメアに局在していることが知られているため、その欠損は骨格筋の維持や筋原線維の形態に影響すると考えられた。しかし運動負荷後にも特に顕著な変化は観察できなかった。これはシネミンが単体でフィラメントを形成できず、デスミンに付属してフィラメ

ントを形成する中間径フィラメントであるためと考えられる。

今回、シネミンが欠損することによりマウスの持久力が有意に低下することが分かった。さらに運動後に筋原線維の状態、筋損傷を比べても野生型と差がないことからシネミンは骨格筋及び筋原線維の形態・維持では無く、持久力に関する他のファクターに關与することが示唆された。

(3) ジストロフィン・シネミン・二重欠損マウスの解析

ジストロフィン及びシネミンの二重欠損マウスを得るため mdx マウスとシネミン・ノックアウトマウスを掛け合わせ、ダブルヘテロマウスを作成した。さらにダブルヘテロマウスを掛け合わせてジストロフィンとシネミンの二重欠損マウスを得ることに成功した。解析に必要な二重欠損マウスを効率よく得るため、得られた遺伝子欠損マウスを用い交配を続けた。 -シネミン及びジストロフィンがヘテロザイゴートのオスと二重欠損マウスのメスを一週間同じケージに入れ1年交配させたところ、1度だけ妊娠をした。さらにシネミン及びジストロフィンがヘテロザイゴートのオスとシネミン欠損・ジストロフィンのヘテロザイゴートのメス及び -シネミン及びジストロフィンがヘテロザイゴートのメスと1年交配させたが、1度だけしか妊娠は確認できなかった。これにより -シネミン及びジストロフィンの不全が生殖機能に影響するのではないかということが示唆された。

得られた6週齢の野生型、二重欠損マウス及びジストロフィンのノックアウト・シネミンヘテロザイゴートを用いて凍結切片を作成して生殖器、筋において HE 染色を行い観察した。しかし生殖器には特に差が認められなかった。骨格筋は二重欠損マウス及びジストロフィンのノックアウト・シネミンヘテロザイゴートにおいて野生型と比べ中心核が多いものの、二重欠損マウス及びジストロフィンのノックアウト・シネミンヘテロザイゴートに差が見られない事から特にシネミンの欠損による影響では無いと考えられる。

今回、ジストロフィン及びシネミンの二重欠損マウスを作る際、ジストロフィン及びシネミンの完全な欠損でなくても妊娠がしづらくなることが分かった。しかし HE 染色による生殖器の形態観察では特に異常は見られなかった。しかし、それぞれのシングルノッ

クアウトではこのようなことが起こらないことから、シネミンとジストロフィンには何らかの相互作用または相乗作用があると考えられる。

(4) ゼブラフィッシュ胚におけるシネミン発現の解析

ゼブラフィッシュ胚において、シネミン相同分子は受精後 56~72 時間後の心臓に発現し、骨格筋には発現していないことが明らかになった。

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4件)

Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, Arifin Soenggono, & Hiroshi Yorifuji: Filamentous structures in skeletal muscle: anchors for the subsarcolemmal space. Medical Molecular Morphology, 査読有 e-published 2014. DOI 10.1007/s00795-014-0070-3

Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Astrid Feinisa Khairani, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: Vesicular transport system in myotubes: ultrastructural study and signposting with vesicle-associated membrane proteins. Histochemistry and Cell Biology, 査読有, 141, 2014, 441-454. DOI 10.1007/s00418-013-1164-z

Tohru Murakami, Yuki Tajika, Hitoshi Ueno, Sachiko Awata, Satoshi Hirasawa, Maki Sugimoto, Yoshihiko Kominato, Yoshito Tsushima, Keigo Endo, & Hiroshi Yorifuji: An Integrated Teaching Method of Gross Anatomy and Computed Tomography Radiology, Anatomical Sciences Education, 査読有, e-published 2013. DOI 10.1002/ase.1430

Maiko Takahashi, Yuki Tajika, Astrid Feinisa Khairani, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami & Hiroshi Yorifuji: The localization of VAMP5 in skeletal and cardiac muscle. Histochemistry and Cell Biology, 査読有, 139, 2013, 573-582. DOI 10.1007/s00418-012-1050-0

[学会発表](計10件)

上野仁之、佐藤真人、高橋麻衣子、Astrid

F Khairani、多鹿友喜、村上 徹、依藤 宏: 骨格筋における中間径フィラメント synemin の役割 . 第 119 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 . 2014 年 3 月 27 日 ~29 日、栃木県下野市

多鹿友喜、高橋麻衣子、Astrid F. Khairani、上野仁之、村上 徹、依藤 宏: 筋管細胞に発現する VAMP 分布と発達過程 T 管との比較 . 第 119 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 . 2014 年 3 月 27 日 ~29 日、栃木県下野市

Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: The morphological study of transverse anchoring system between myofibril and sarcolemma. The 2013 Annual Meeting of American Society for Cell Biology. 2013 年 12 月 14 日 ~18 日. New Orleans, Indiana, USA.

Maiko Takahashi, Yuki Tajika, Astrid Feinisa Khairani, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, & Hiroshi Yorifuji: The localization of VAMP5 in skeletal and cardiac muscle. The 2013 Annual Meeting of American Society for Cell Biology. 2013 年 12 月 14 日 ~18 日. New Orleans, Indiana, USA.

Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami & Hiroshi Yorifuji: The morphological study of cytoskeletal organization of skeletal muscle. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2013 年 03 月 28 日 ~30 日 . 高松 .

多鹿友喜、高橋麻衣子、Astrid F Khairani、上野仁之、村上 徹、依藤 宏: 骨格筋形成過程における細胞内膜系の電子顕微鏡観察 . 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2013 年 03 月 28 日 ~30 日 . 高松 .

高橋麻衣子、多鹿友喜、Astrid F Khairani、上野仁之、村上 徹、依藤 宏: 心筋における VAMP アイソフォームの発現と分布 . 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2013 年 03 月 28 日 ~30 日 . 高松 .

上野仁之、佐藤真人、高橋麻衣子、Astrid F Khairani、多鹿友喜、村上 徹、依藤 宏: 中間径フィラメント synemin の分子

遺伝学的解析 . 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2013 年 03 月 28 日 ~30 日 . 高松 .

Astrid Feinisa Khairani, Yuki Tajika, Maiko Takahashi, Hitoshi Ueno, Tohru Murakami, Hiroshi Yorifuji: Transverse anchoring system of myofibril to sarcolemma: the morphological study. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2012 年 3 月 26 日 ~28 日 . 甲府 .

上野仁之、春原幸子、日野瑞城、高橋麻衣子、Astrid F Khairani、多鹿友喜、村上 徹、依藤 宏: mdx マウスの骨格筋におけるオートファジーの解析 . 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2012 年 3 月 26 日 ~28 日 . 甲府 .

多鹿友喜、高橋麻衣子、Astrid F Khairani、上野仁之、村上 徹、依藤 宏: 骨格筋に特徴的な膜小胞輸送システム . 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2012 年 3 月 26 日 ~28 日 . 甲府 .

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学大学院医学系研究科機能形態学ホームページ

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/bioreg-function/125.html>

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

村上 徹 (MURAKAMI, Tohru)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 10239494

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

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