

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790175

研究課題名（和文）骨格筋細胞における膜小胞輸送；VAMP5の形態学的解析

研究課題名（英文）Immunohistological analysis of VAMP5 in skeletal muscle

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：細胞内の小胞輸送は、細胞の形態形成や機能に重要な過程である。神経細胞や上皮細胞を用いた研究から、膜小胞の繫留と融合を制御する分子群として SNARE 蛋白質が知られている。そのうち、VAMP5 は、筋特異的なアイソフォームといわれているが、蛋白質レベルでの発現と分布は知られていない。そこで、抗体染色を行い、骨格筋をはじめとする各組織での発現と分布を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Membrane trafficking is a fundamental event for the life of cell. Previous studies using neuron and epithelial cells revealed its molecular mechanism, including SNARE proteins, which regulate membrane tethering and fusion process. VAMP5, a member of SNARE proteins, was found in transcripts from skeletal muscle, however, the protein levels in a whole body was not known. In this study, we performed immunostaining on skeletal muscle and other tissues, and clarified the expression pattern of VAMP5.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：骨格筋の細胞生物学

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、小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

膜小胞輸送は、神経細胞や上皮細胞において、その形態形成や機能に重要な現象であることが分かっている。しかしながら、骨格筋

細胞の形態形成においても、膜小胞輸送が働いていることが予想できるが、神経細胞や上皮細胞と比較して、過去の報告は非常に少な

い。骨格筋形成に関するこれまでの研究は、主に転写因子を対象としており (Charge SB and Rudnicki MA. 2004, *Physiol Rev* 84:209-38)、筋発生の初期に働く Pax ファミリーや、MRF ファミリーといった転写因子が同定された。しかし、それらの下流で発現制御される蛋白はほとんど分かっておらず、ジストログリカンやインテグリンなどの膜蛋白がどのように輸送されているかは全く分かっていない。

SNARE 蛋白質は、膜小胞輸送の過程のうち、小胞の繫留と融合に関わる (Hong W. 2005, *Biochim Biophys Acta* 1744:493-517)。SNARE 蛋白質は 3 つのサブファミリーに分類される。小胞には VAMP ファミリー、小胞が融合するターゲットの膜には Syntaxin ファミリーが存在し、両者の間に SNAP25 ファミリーが入り、3 者で複合体を形成する。複合体の形成により小胞を繫留し、その構造変化により膜の融合を促す。VAMP ファミリーの各メンバーは、それぞれ組織分布や細胞内局在が異なり、特定の細胞で、特定のオルガネラで機能すると考えられている。これまでに私は、骨格筋細胞における小胞輸送の全体像を把握するため、骨格筋組織に発現する SNARE 蛋白質を組織染色で検索してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨格筋で転写産物が見つかった SNARE 蛋白質である VAMP5 に着目した。VAMP5 は、筋の分化とともに転写産物が増加することが知られていたが、蛋白質としての発現量や、組織中の分布、細胞内の分布は、分かっていなかった。そこで、特異的抗体の作製をし、抗体染色により、VAMP5 蛋白質の発現と分布を明らかにすることを目指した。また、培養筋芽細胞を用いて、VAMP5 の機能を探った。

## 3. 研究の方法

<特異的抗体の作製と評価>

合成ペプチドをウサギ 4 匹に免疫し、4 種の抗血清を得た。抗体の評価は下記の方法で行った。抗体染色で、培養の筋芽細胞陰性、筋管細胞陽性になること、抗体染色ウェスタンブロッティングでシングルバンド (予想分子量約 11kDa) になることを確認した。さらに、抗原ペプチド阻害や、RNA 干渉によって、これらの染色像やバンドが消失することを確認した。計画当初にはなかった市販の抗体 2 種についても、のちに評価対象とした。

<マウス組織での抗体染色とウェスタンブロッティング>

マウスより骨格筋組織を採取し、凍結切片とホモジネートを得た。アルデヒドや有機溶媒による固定の有無について、染色性を検討し、抗体染色のプロトコルを最適化した。骨格筋組織以外では、心筋、肺、肝臓、脾臓、小腸から試料を得た。

<培養細胞>

培養筋芽細胞 C2C12 細胞を理研セルバンクから購入し、10%FBS/DMEM で維持培養した。筋管細胞への分化は、低血清培地 (2%HS/DMEM) に交換することで誘導した。固定した細胞で抗体染色、およびホモジネートでウェスタンブロッティングを行った。この細胞に siRNA をリポフェクション法で導入し、VAMP5 の発現を抑制した。

## 4. 研究成果

<抗体の作製と評価>

自作抗体は、抗体染色で筋管細胞陽性になるものが得られたが、ウェスタンブロッティングでシングルバンドにならず、VAMP5 のみを特異的に認識しない可能性があった。のちに市販抗体が得られ、そのうち 1 種のみがすべての評価系 (筋管細胞陽性、ウェスタンブロッティングでシングルバンド、抗原阻害や RNA 干渉によるシグナルの減弱) をクリアし、特異的に VAMP5 を認識していることを確認できた。

<マウス組織における発現と分布>

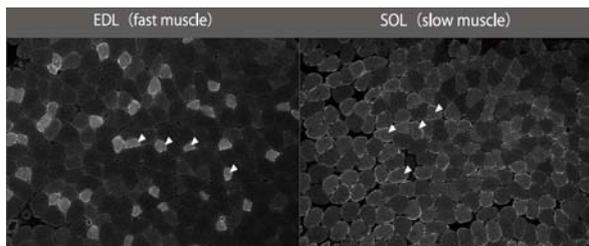


図1 長指伸筋 (EDL) と、ヒラメ筋 (SOL) における VAMP5 の発現。骨格筋の横断面で凍結切片を作製し、抗体染色を行った。矢頭で示した筋線維では、VAMP5 シグナルが比較的強い。

骨格筋は長指伸筋とヒラメ筋を用いた。それぞれ速筋線維、遅筋線維が豊富な筋として用いた。VAMP5 は、筋線維の形質膜直下に検出された (図1)。

また、筋線維によって VAMP5 のシグナル強度が異なっていることが分かった。また、断面積の小さい筋線維に強く発現する傾向がある。VAMP5 の発現量に違いが筋線維タイプによるのかを検証するため、ミオシン重鎖によって遅筋線維 (I 型) と速筋線維 (IIA、IIB、IIX 型) に分類し、VAMP5 のシグナル強度と比較した (図2)。VAMP5 は、IIA 型筋線維に多く発現することが分かった。同時に、断面積が比較的小さい筋線維は IIA 型であることも分かった。

VAMP5 の発現量の違いが、どのような経過で形成されるかを調べるため、カルジオトキシンによる障害後の再生筋を経時的に採取し、筋形成過程における VAMP5 を検出した。骨格筋の形成時には、胎児型のミオシンがはじめ

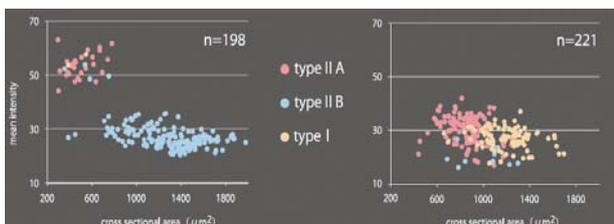


図2 長指伸筋 (EDL) と、ヒラメ筋 (SOL) で、各筋線維における VAMP5 シグナル強度 (縦軸) と筋線維断面積 (横軸) をグラフにした。また、連続切片において VAMP5 またはミオシン重鎖を検出し、I (黄)、IIA (赤)、IIB (青) に分類した。

に発現し、遅筋型ミオシン、速筋型ミオシンの順に置き換わっていくことが知られている。胎児型ミオシン陽性の幼若な筋線維には VAMP5 は検出されない。遅筋型、速筋型へと成熟した後に、VAMP5 が速筋型に発現した。以上より、VAMP5 は、筋形成時に速筋線維において増加することが分かった。

#### <培養筋芽細胞を用いた機能解析>

C2C12 筋芽細胞株を用いて、筋分化における VAMP5 の機能を探った。この細胞は低血清培地では、細胞同士が融合し多核の筋管細胞となる。この過程において、RNA 干渉法による VAMP5 の発現抑制を行った。筋管細胞の形成に影響はなく、分化の分子マーカーであるデスミンの発現も変わらなかった。よって細胞融合過程には大きな役割はないと考えられる。この培養細胞では多核細胞から後の、成熟過程を観ることは出来ない。今後のさらなる解析には、せいじゅく生体レベルの実験系が必要である。

#### <骨格筋以外での VAMP5 の発現>

ウェスタンブロッティングでは、心筋、肺、腎臓、小腸、脾臓、VAMP5 は検出される。これらの器官は、過去の報告で mRNA が検出された器官と一致する。現在、各器官について抗体染色を進めている。心筋では、心筋細胞に発現し、介在板付近の細胞質に偏在していることが分かった。また、肺では気管支の一部の上皮細胞のみ VAMP5 が存在した。一部の細胞のみに発現がみられることは、VAMP5 はあらゆる細胞に存在するユビキタスな蛋白質ではないらしい。今後、各器官における VAMP5 発現細胞の同定などを予定する。

#### 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3件)

① Tajika Y, Takahashi M, Hino M, Murakami T, Yorifuji H. VAMP2 marks quiescent

satellite cells and myotubes, but not activated myoblasts. Acta Histochemica et Cytochemica Vol. 43 (4), p. 107-114, 2010 (査読有り)

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. Journal of Electron Microscopy Vol. 59 (6), p. 495-501, 2010 (査読有り)

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 Structure and Function Vol. 34, p. 11-15, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計7件)

①多鹿友喜、高橋麻衣子、Astrid F. K.、上野仁之、村上徹、依藤宏 骨格筋細胞におけるSNARE蛋白質の発現パターン 第52回 日本組織細胞化学会 金沢大学 2011年9月24日 金沢

②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

③多鹿友喜、高橋麻衣子、Astrid F. K.、上野仁之、村上徹、依藤宏 骨格筋細胞に特徴的な膜小胞輸送システム 第117回 日本解剖学会 山梨大学 2011年3月27日 甲府

④高橋麻衣子、多鹿友喜、Astrid F. K.、上野仁之、村上徹、依藤宏 膜融合に関するVAMP5のマウス諸器官における発現と分布 第117回 日本解剖学会 山梨大学 2011年3月27日 甲府

⑤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

⑥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

⑦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 北関東医学学会総会 群馬大学刀城会館 2009年10月8日 前橋

[その他]

ホームページ等

<http://anatomy.dept.med.gunma-u.ac.jp/~taji/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：