

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12580

研究課題名(和文)筋芽細胞の膜融合過程を担う分子機構の解明 - 新たな筋障害治療ターゲットの探索

研究課題名(英文)Molecular analysis of cell fusion events during myogenesis

研究代表者

亀高 諭 (Kametaka, Satoshi)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授

研究者番号：10303950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞融合は、発生中の筋肉の成長と損傷時の筋線維の再生に寄与する、きわめて重要な過程である。本研究においては培養筋芽細胞株C2C12細胞を用いて、蛍光タンパク質を用いた簡便かつ感度の高い細胞融合検出系を構築し、骨格筋分化に関わる遺伝子および分化に影響を与える分子の探索を行った。その結果細胞内小胞輸送に関わるGGA1クラスリンアダプター分子をノックダウンすることで筋分化が阻害されること、さらにインスリン受容体の細胞膜表面での発現が低下することが示された。

研究成果の概要(英文)：To uncover the molecular mechanisms of myoblast fusion events, we firstly established a novel assay system to monitor the cell fusion of cultured myoblast C2C12 cells. Using this system, we searched for new genes and compounds that affects the cell fusion of C2C12, and GGA1, a clathrin adaptor commonly expressed in eukaryotic cells was identified. GGA1 expression was found to be up-regulated during myogenesis of C2C12. Silencing of GGA1 caused reduction of myotube formation and we found that depletion of GGA1 caused decrease of cell surface expression of insulin receptor. We also identified a compound that has a potential to inhibit myogenesis and its molecular action is under investigation.

研究分野：細胞生物学、解剖学

キーワード：骨格筋 再生 筋芽細胞 細胞膜融合 C2C12

1. 研究開始当初の背景

筋芽細胞融合は、発生中の筋肉の成長と損傷時の筋線維の再生に寄与する、きわめて重要な過程である。骨格筋の障害により筋の間隙に存在する静止期の衛星細胞が活性化、分化し筋芽細胞として機能するようになるが、最終的な筋再生のためには、筋芽細胞同士、或は筋芽細胞と筋肉細胞との融合現象が必須である。過去の研究から、筋芽細胞融合にはインテグリンファミリーに属する細胞膜蛋白質による繫留に始まり、細胞骨格の変化が必要であることが示されている。しかし、これらの膜融合過程に必要な膜融合装置の発現と細胞膜への局在化の分子機構は未だ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は、骨格筋の障害からの修復期における筋芽細胞の細胞膜融合の調節機構を分子レベルで明らかにし、骨格筋障害治療及びリハビリテーションを支える分子基盤を構築することを目指す。

傷害した骨格筋の治癒過程においては活性化した筋芽細胞の細胞膜融合が必須であるが、この膜融合の分子機序に関しては未だ不明な点が多い。私は近年細胞内で膜蛋白質の選別輸送に関わる分子群が筋芽細胞の膜融合過程に必要なことを見出し（未発表）、本研究ではこれらの分子に加え筋芽細胞膜融合に関わる新たな遺伝子群を探索し、その生理機能を培養細胞系および動物個体を用いて明らかにする。本研究により筋障害からの治癒過程およびリハビリテーションの効果に関して分子レベルでの理解が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、まず筋芽細胞の細胞膜融合のモニター系を開発することにより、これまで困難であった生細胞における細胞膜融合過程の定量的なアッセイ系を確立した。これにより、更に C2C12 培養細胞系を用いたゲノムワイド RNA 干渉法 (RNAi) スクリーニングを実施し、ノックダウンにより膜融合過程が特異的に阻害される遺伝子を同定する。これらの因子に関しては C2C12 細胞での細胞生物学的、生化学的解析、相互作用因子の探索および RNAi による表現型の詳細な解析などによりその分

子機能を明らかにする。本系により見出されたゴルジ体における膜蛋白質の選別に関わるクラスリンアダプター分子、GGA1 を膜融合機構に関わる候補因子として、さらにその分子機能解析を開始した（未発表）。

4. 研究成果

本研究においては培養筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて、蛍光タンパク質を用いた簡便かつ感度の高い細胞融合検出系を構築し、骨格筋分化に関わる遺伝子および分化に影響を与える分子の探索を行った。その結果細胞内小胞輸送に関わる GGA1 クラスリンアダプター分子をノックダウンすることで筋分化が阻害されることから、GGA1 の分子機能の解析を行った。GGA1 は C2C12 の筋分化に反応してその発現が転写レベルで上昇することが示された。GGA1 の発現を RNA 干渉法 (RNAi) により低下させることで筋管の形成効率が約 20% 低下した。しかし、多核筋管細胞の形成効率の低下はするものの、そのヒストグラム解析により、GGA1 は一次的な筋芽細胞融合過程よりも、むしろ後期の筋管細胞の成熟過程により重要な機能を担うことが示唆された。成熟した骨格筋の特徴の一つであるインスリン依存的なブドウ糖取り込み能を測定した結果、GGA1 ノックダウンによりその活性が低下していることが示された。インスリン受容体からの下流のシグナルは Akt, PI3K などのシグナル伝達経路を介して骨格筋分化過程において重要であることから、インスリンによる Akt のリン酸化の度合いを調べたところ、コントロールの細胞に比べ減少することが明らかとなった。さらにインスリン受容体の細胞膜表面での発現が低下することが細胞膜表面蛋白質のビオチン化実験により示された。これらの結果より、GGA1 がインスリン受容体などの膜蛋白質輸送を介して、骨格筋分化過程において重要な役割を担っている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2件)

1. Takefumi Uemura, Naoki Sawada¹, Takao Sakaba, Satoshi Kametaka, Masaya Yamamoto, Satoshi Waguri.

Intracellular localization of GGA accessory protein p56 in cell lines and central nervous system neurons. Biomedical Research (in press). (査読有り)

2. Uemura T, Kametaka S, Waguri S. GGA2 interacts with EGFR cytoplasmic domain to stabilize the receptor expression and promote cell growth. Sci Rep. 2018 Jan22;8(1):1368. doi: 10.1038/s41598-018-19542-4. PubMed PMID: 29358589 (査読有り)

[学会発表](計 17 件)

2017 年度

1. 高垣和輝、天川奈穂、森長真言、磯部茉莉、 亀高諭
遺伝性痙性対麻痺原因遺伝子、SPG 遺伝子群の機能解析 -小胞体形態形成と病態との関連を探る-
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会(東京都 2018 年 3 月)口述発表(シンポジウム)
2. 高垣和輝、和栗聡、○亀高諭
小胞体形態形成に関わる SPG 蛋白質群の相互作用ネットワーク
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)(兵庫県 2017 年 12 月)ポスター発表
3. ○山神絵未、山川めい、亀高諭
アディポネクチンのがん悪液質性筋萎縮に対する萎縮抑制効果の解析
第 5 回若手による骨格筋細胞研究会(兵庫県 2017 年 11 月)ポスター発表
4. 磯部茉莉、和栗聡、亀高諭
筋分化過程を支える細胞内輸送システムの分子機構
第 5 回若手による骨格筋細胞研究会(兵庫県 2017 年 11 月)口述発表
5. ○山神絵未、亀高諭
アディポネクチンのがん悪液質性筋萎縮に対する抑制効果の解析
コ・メディカル形態機能学会第 16 回学術集会(愛知県 2017 年 9 月)ポスター発表
6. ○高垣和輝、亀高諭
遺伝性痙性対麻痺に関わる Spg12/Reticulon2 の骨格筋における性状解析
コ・メディカル形態機能学会第 16 回学術集会(愛知県 2017 年 9 月)ポスター発表
7. ○磯部茉莉、亀高諭
骨格筋成熟過程における細胞内分子輸送関連因子 GGA1 の機能
コ・メディカル形態機能学会第 16 回学術集会(愛知県 2017 年 9 月)ポスター発表

8. ○磯部茉莉、亀高諭
筋管形成過程におけるクラスリンアダプター-GGA1 の分子機能
第 3 回日本筋学会学術集会(東京都 2017 年 8 月)ポスター発表

9. ○高垣和輝、亀高諭
小胞体形態形成に関わる SPG3A/Atlastin1 及び SPG12/Reticulon2 の相互作用解析
第 69 回日本細胞生物学会大会(宮城県 2017 年 6 月)ポスター発表
10. ○高垣和輝、亀高諭
遺伝性痙性対麻痺に関わる SPG 遺伝子の相互作用ネットワークの解析
第 81 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(愛知県 2017 年 5 月)ポスター発表
11. 磯部茉莉、亀高諭
クラスリンアダプター-GGA1 は筋管形成の成熟過程に関与する
第 81 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(愛知県 2017 年 5 月)ポスター発表

2016 年度

12. 磯部茉莉、亀高諭
骨格筋分化におけるクラスリンアダプター-GGA1 の機能解析
日本解剖学会第 76 回中部支部学術集会(長野県 2016 年 10 月)口述発表
13. 磯部茉莉、亀高諭
クラスリンアダプター-GGA1 の筋管形成における役割
第 68 回日本細胞生物学会大会(京都府 2016 年 6 月)ポスター発表
14. 磯部茉莉、亀高諭
クラスリンアダプター-GGA1 は培養筋芽細胞の筋管形成に関与する
第 80 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(三重県 2016 年 5 月)ポスター発表

2015 年度

15. 磯部茉莉、亀高諭
培養筋芽細胞を用いた細胞融合メカニズムの解明
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会(福島県 2016 年 3 月)口述発表
16. 磯部茉莉、亀高諭
培養筋芽細胞を用いた細胞融合メカニズムの解明
日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会(福井県 2015 年 10 月)口述発表
17. 磯部茉莉、亀高諭
培養筋芽細胞を用いた細胞融合機構の解析
名古屋大学若手女性研究者サイエンスフォーラム(愛知県 2015 年 8 月)ポスター発表(学内)

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~kametaka-lab/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

亀高 諭 (KAMETAKA SATOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10303950