

平成30年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14518

研究課題名(和文)小胞体カルシウム枯渇シグナル系の作動原理と筋分化における役割

研究課題名(英文) Signaling induced by calcium depletion from the endoplasmic reticulum: regulation mechanisms and its roles in myoblast differentiation

研究代表者

森島 信裕 (MORISHIMA, Nobuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・特別嘱託職員

研究者番号：40182232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体は細胞内のカルシウムストアとして働く。貯蔵されているカルシウムは細胞内外の様々な刺激にตอบสนองして細胞質ゾルに放出され、カルシウム依存性タンパク質を活性化する。カルシウムの放出は同時に小胞体内カルシウム濃度の低下を招く。私たちは骨格筋の前駆細胞(筋芽細胞)の分化過程において小胞体カルシウム濃度の低下が分化の進行にとって重要であることを示した。本研究課題においては、小胞体カルシウム濃度の低下が分化過程のどの時期に起こるかを特定し、低下が起こる仕組みと筋分化に果たす役割について手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) is the calcium store in cells. In response to various stimuli, the ER releases calcium into the cytosol where calcium dependent proteins are activated. On the other side of the coin, calcium depletion from the ER occurs. We have previously found that ER calcium depletion is critical for skeletal myoblast differentiation. In the present project, I have examined the precise timing of ER calcium depletion in differentiating myoblast cells. By analyzing the behaviors of proteins that regulate calcium dynamics in the ER, and those of calcium dependent proteins, I have gotten clues as to the regulation mechanism of ER calcium depletion and its roles in skeletal muscle differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体 カルシウム枯渇 細胞内シグナル伝達 筋芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞内のカルシウムストアとして働く。小胞体は細胞質ゾルに比べて約1000倍高い濃度のカルシウムを含んでいる。この濃度は小胞体膜上のカルシウムポンプタンパク質によるカルシウム汲み入れにより維持される。一方、貯蔵されているカルシウムは細胞内外の様々な刺激に応答する小胞体カルシウムチャンネルタンパク質を通して細胞質ゾルに放出され、カルシウム依存性タンパク質を活性化する。この現象は古くからよく研究されていて、小胞体外からの刺激がカルシウムチャンネルをどのように活性化し、放出されたカルシウムが最終的に小胞体外(細胞質ゾル)のどのタンパク質を活性化するかがかなり明らかになっている。例えば、筋肉においては小胞体からカルシウムが放出されることで筋タンパク質(トロポニン)が活性化され、これによって筋収縮が起こる。このように、小胞体から放出されるカルシウムが小胞体の外で起こす現象は重要視されてきた。一方で、小胞体からのカルシウム放出は同時に小胞体内カルシウム濃度の低下をもたらす。しかし、この濃度低下はこれまで必ずしも注目されてこなかった。小胞体カルシウム濃度の低下は小胞体ストレスと呼ばれる特別な状態を生む原因の一つとして近年研究が盛んになってきている。私たちは骨格筋の前駆細胞(筋芽細胞)の分化過程において小胞体カルシウム濃度の低下が一過的に起こることを見出し、これが分化の進行にとって重要であることを示した。生体内では筋芽細胞が数百以上細胞融合を起こして筋肉細胞に分化する。すなわち、正常な筋芽細胞の分化にとって小胞体カルシウムの枯渇による小胞体ストレスが必要であることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は骨格筋形成にとって重要な小胞体カルシウム枯渇が起こる仕組みとその意義を明らかにすることである。そのために小胞体カルシウム濃度の低下がいつ起こるかを特定することを目指した。細胞内で起こる現象を非破壊的にリアルタイムで捉えるためには工夫が必要である。小胞体カルシウム濃度の低下が起こる時期を特定することができれば、その直前にどのような仕組みが働いているか、また、そ

の時期にどのような変化が小胞体及びその周囲で見られるかが分かるようになることを期待した。

## 3. 研究の方法

分化過程における小胞体カルシウム枯渇を調べるために培養可能な筋芽細胞株(マウス由来C2C12細胞)を用いた。使用した細胞株は培地組成を変えることによって分化を誘導することができる。小胞体カルシウム濃度低下を視覚的に検出するために小胞体膜を貫通して存在する小胞体カルシウムセンサータンパク質STIM1に注目した。STIM1は小胞体のカルシウム枯渇に応答してクラスターを形成して活性化し、小胞体へのカルシウム再充填反応を促進する。従って、このタンパク質のクラスター形成を顕微鏡下で観察することにより、小胞体カルシウム枯渇を視覚的に捉えることが期待された。そこで、STIM1に緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein, GFP)の類縁体を人工的に融合させ、プローブとして用いることにした。

STIM1タンパク質はカルシウム結合部位を含むほか、クラスター形成に必要な領域、他のカルシウム制御タンパク質と相互作用する部位を含む。これらの機能部位やSTIM1の膜貫通に影響を与えないように、STIM1 cDNAの内部にGFP類縁体のcDNAを連結して蛍光性の改変STIM1 cDNAを作製した。トランスフェクションによって改変STIM1 cDNAをC2C12細胞に導入し、cDNAが染色体に組み込まれた安定発現株を薬剤選択を利用して作製した。このようにして得た改変STIM1安定発現株を用いて、分化誘導条件下でいつ、どのようにして小胞体カルシウム濃度の低下が起こるかを検討した。

カルシウム枯渇が起こるメカニズムを探るため、改変STIM1安定発現株の遺伝子導入実験を行った。これまでに小胞体カルシウムポンプやカルシウムチャンネルに結合するタンパク質が少なくとも計10種類以上報告されている。こうしたタンパク質の結合がポンプやチャンネルタンパク質の活性を調節することによって小胞体のカルシウムダイナミクスが変化する可能性に注目した。これらの結合タンパク質のcDNAをクローニングし、改変STIM1安定発現株へ導入することで強制発現させ、STIM1クラスター形成への影響を見た。

また、カルシウム枯渇のタイミングを中心とした時間帯に起こるタンパク質の変化(量的変化、活性化、翻訳後修飾など)をウエスタンブロット法により解析した。解析対象にはカルシウムポンプ結合タンパク質、カルシウムチャンネル結合タンパク質や細胞質ゾル中のカルシウム依存性タンパク質及び小胞体ストレスへの応答に関わるタンパク質群を含む。

#### 4. 研究成果

1) 改変 STIM1 安定発現株の作製は 2 段階のセレクションを経て行った。第一段階は改変 STIM1 の発現量が適当なレベルにある細胞株の選択である。一般に、小胞体膜タンパク質を強制発現させると膜上で凝集体を作ってしまう、内在性のタンパク質とは異なる振る舞いを示すことが少なくない。改変 STIM1 の発現レベルが比較的高い細胞株では改変 STIM1 が繊維状の凝集体を形成することが判明した。そこで、トランスフェクションの条件を変えて細胞あたりの cDNA 取り込み量を減らし、改変 STIM1 の発現量が比較的低いクローンが多く作られるようにした。

増殖中の筋芽細胞中において改変 STIM1 が網目状の分布パターンを示す株を約 30 クローン取得した。これらの細胞においては改変 STIM1 が小胞体膜全体にわたって偏在することなく同じ密度で存在しているため、小胞体自体の網目状構造を反映したパターンになっていると考えられた。

第二段階として細胞分化の効率が親株の C2C12 細胞と同程度に良好なものを選択した。分化効率の指標となるのは分化誘導後に見られるアポトーシス細胞の出現、細胞融合前の細胞整列、およそ 1.5 日後から顕著に見られる細胞融合、3 日から 5 日後に多数観察される筋管の形成である。このような選択を経て 4 クローンの優良な改変 STIM1 安定発現株を確立した。

培地成分を変えて改変 STIM1 安定発現株の分化誘導を開始すると、約 22 時間から 24 時間までは改変 STIM1 の分布パターンに変化は見られなかった。しかし、24 時間頃から改変 STIM1 のクラスター形成が開始し、一細胞内に数個から数十個のクラスターが検出された。24 時間以降、少なくとも数時間の間はクラスターが維持されていたが、その後次第にクラスターの数が減

少し、サイズも小さくなった。32 時間を過ぎるとクラスターはほぼ消失した。これらの結果は 24 時間頃から数時間の時期に小胞体カルシウム濃度の低下が起きていることを示唆する。

2) 小胞体カルシウムポンプや小胞体カルシウムチャンネルと相互作用するタンパク質群を筋芽細胞に遺伝子導入して改変 STIM1 の分布パターン変化を検討したところ、カルシウムポンプ結合タンパク質のうちの一つがクラスター形成を促進することが分かった。このタンパク質が筋分化過程で発現上昇や特異的修飾を起こすかをウエスタンブロット解析によって検討中である。予備的な解析ではあるが、小胞体カルシウム枯渇が始まる時期にこのタンパク質が増加し、その後はそのレベルを維持している結果が得られている。現在、このタンパク質の内在性発現をノックダウンするための siRNA を選別する作業を行っている。

3) 分化誘導開始から 24 時間後の時間帯において細胞質ゾル中に存在するカルシウム依存性プロテアーゼが活性化していることを示唆するデータを得た。カルシウム依存性プロテアーゼの活性化を調べるため、複数の基質タンパク質についてウエスタンブロット解析を行ったところ、そのうちの一つが同じ時間帯によく切断されているという結果が得られた。これは同時帯に細胞質ゾルのカルシウム濃度が上昇していることを示唆しており、小胞体カルシウム枯渇が起きていることを間接的に支持する結果である。こうした基質切断が筋芽細胞の分化に果たす役割について現在検討を続けている。

以上のように、小胞体からカルシウムが放出される時期を特定することができ、小胞体カルシウム枯渇を引き起こす因子の候補が得られた。また、細胞質ゾルに存在するカルシウム依存性プロテアーゼの活性化をこの時期に検出し、筋分化への関与の可能性を見出した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 森島信裕「筋肉細胞の分化と小胞体ストレス」THE BONE (査読なし)(印刷中)(2018)

2. N. Morishima and K. Nakanishi  
"Proplatelet formation in megakaryocytes is associated with endoplasmic reticulum stress" *Genes to Cells* (査読あり) 21, 798-806 (2016)  
DOI: 10.1111/gtc.12384.

3. N. Morishima and K. Nakanishi  
"Significance of ER Ca<sup>2+</sup> outflow during myogenesis" *Channels* (査読なし) 9, 173-174 (2015)  
DOI: 10.1080/19336950.2015.1069504

4. K. Nakanishi, K. Kakiguchi, S. Yonemura, A. Nakano, and N. Morishima  
"Transient Ca<sup>2+</sup> depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation" *FASEB J.* (査読あり) 29, 2137-2149 (2015)  
DOI: 10.1096/fj.14-261529

〔学会発表〕(計 1 件)

森島信裕、馬替純二、伊藤嘉浩、緒方裕光「小グループの選抜タンパク質を精密定量し、微弱で慢性的な細胞ストレスが細胞生理に与える影響を定量評価する」2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017.12.9 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

〔その他〕

科学技術振興機構サイエンスポータル  
"筋肉動かす Ca は筋肉作る司令役も担う"  
[http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash\\_review/newsflash/2015/02/20150218\\_03.html](http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2015/02/20150218_03.html)

医学生物学の総合ポータルサイト BioMed サーカス.com レビュー記事  
[http://biomedcircus.com/paper\\_03\\_39.html](http://biomedcircus.com/paper_03_39.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森島 信裕 (MORISHIMA Nobuhiro)  
国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・特別嘱託職員  
研究者番号：40182232