

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07328

研究課題名(和文)筋再生過程におけるN-WASPと膜変形タンパク質による核配置制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of the nuclear arrangement regulation by N-WASP and membrane deforming protein during skeletal muscle regeneration

研究代表者

高野 和儀 (Takano, Kazunori)

千葉大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：60466860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の成熟過程は筋再生や筋疾患発症のメカニズムを解明する上で重要な現象である。多核の骨格筋細胞では、その成熟過程において中心に並んだ核(中心核)が細胞膜直下へと移動するが、この周辺核化の仕組みは不明である。我々はN-WASPの周辺核化における役割を明らかにするため、骨格筋成熟過程におけるN-WASPの核外移行の制御機構およびN-WASPと膜変形タンパク質amphiphysin2/BIN1(Amph2)の協調作用による周辺核化の分子機構を調べた。その結果、N-WASP-Amph2軸によるアクチン制御が周辺核となる中心核の移動方向を決めるガイドとして機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの骨格筋形成に関わるタンパク質の遺伝子変異は中心核病などの筋疾患に直結する。しかしながら、中心核病の表現型は原因となる遺伝子変異の結果として起こるにも関わらず、中心核病の原因遺伝子であるAmph2とN-WASPの周辺核化機構に果たす役割は依然として不明のままである。このため、中心核病の病因がアクチン細胞骨格の制御と細胞膜の変形の協調作用の破綻である可能性を示した点で本研究は学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The skeletal muscle maturation process is an important phenomenon in elucidating the mechanism of muscle regeneration and disease development. In multinucleated skeletal muscle cells, the nuclei arranged in a line at the center (central nucleus) move to just near the plasma membrane (PM) during the maturation process, but the mechanism of this peripheral nucleation is unknown. To clarify the role of N-WASP in peripheral movement of nucleus, we investigated the regulatory mechanism of nuclear export of N-WASP during the skeletal muscle maturation and the molecular mechanism of the peripheral movement of nucleus by the cooperative action of N-WASP and Amph2. Our results suggest that actin regulation by the N-WASP-Amph2 axis may function as a guide for determining the direction of nucleus to move peripherally.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：筋再生 周辺核 N-WASP Amphiphysin2 核動態 膜変形 アクチン

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動や呼吸などの生命活動に必須な役割を果たす組織である。骨格筋の成熟過程において、多核の筋管細胞における中心核の整列が起こった後に、核の細胞膜近傍への移動(周辺核化)および筋線維内の筋原線維形成が起こる(図1A)。中心核の整列機構についてはキネシン依存的に微小管に沿った核の移動を引き起こすことが知られているが [Metzger, T., et al. *Nature* (2012) 484:120–124.], 周辺核化の駆動力については明らかにされていない。これまでに、我々は筋成熟過程においてアクチン制御タンパク質である N-WASP を介して筋原線維が形成される分子機構を解明した [Takano, K., et al. *Science* (2010) 330: 1536–1540.]. 成熟過程の骨格筋内部において中心核周囲は筋原線維で満たされる。すなわち、中心核が筋原線維の間をすり抜けて移動し、細胞膜近傍へと到達する核配置決定機構の存在が示唆された。そこで、我々は骨格筋の形成過程における上記の問題を解決するために、まず、筋再生過程における N-WASP の局在についての追試をおこなった。筋崩壊を引き起こした後の筋再生 7 日目では N-WASP は中心核と筋原線維に局在するのにに対し、周辺核化が引き起こされる筋再生 14 日目以降になると、N-WASP が核周囲と筋原線維へと移行することを明らかにした(図1B)。また、N-WASP の核外移行には Src ファミリーチロシンキナーゼである Fyn によって N-WASP の Y256 をリン酸化が関与しており、N-WASP(Y256)のリン酸化は N-WASP のアクチン重合活性を上昇させることが明らかになっている [Suetsugu, et al. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 42515–42523.].

一方、膜変形にかかわる GTPase である dynamin2 (Dnm2) や BAR ドメインをもつ膜変形タンパク質である amphiphysin2/BIN1 (Amph2) の遺伝子変異により中心核病がもたらされることが解明されている [Fugier, C., et al. *Nat. Med.* (2011) 17: 720–725.]. 中心核病では周辺核化が起こらずに中心核として留まることで筋成熟が抑制されることから、これらのタンパク質が周辺核化を引き起こすと推察される。また、Amph2 は骨格筋特有の巨大な細胞膜陥入構造である T 管の形成および N-WASP を介した T 管と筋小胞体の連結にかかわる [Lee, E., et al. *Science* (2002) 297:1193–1196.]. さらに、Dnm2 や Amph2 はいずれも N-WASP 結合タンパク質であり、我々は N-WASP と BAR ドメインをもつ膜変形タンパク質の協調作用により N-WASP のアクチン重合活性が上昇することを解明している [Takano, K., et al. *EMBO J.* (2008) 27: 2817–2828.]. したがって、細胞膜変形と N-WASP によるアクチン細胞骨格の制御が協調して中心核へ駆動力を供給して周辺核化を誘導する可能性が考えられた。

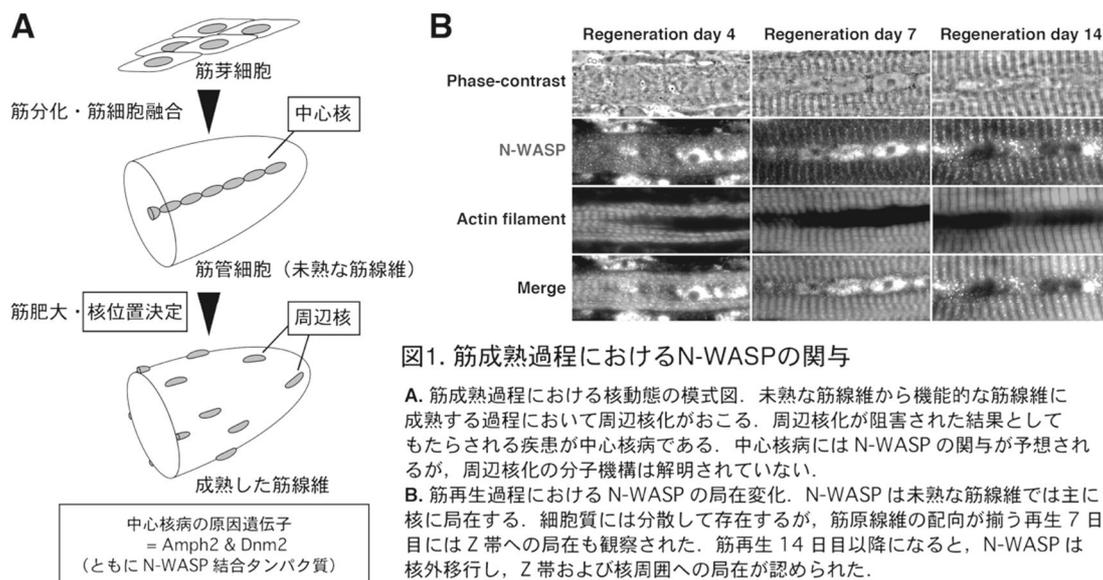


図1. 筋成熟過程におけるN-WASPの関与

A. 筋成熟過程における核動態の模式図。未熟な筋線維から機能的な筋線維に成熟する過程において周辺核化がおこる。周辺核化が阻害された結果としてもたらされる疾患が中心核病である。中心核病には N-WASP の関与が予想されるが、周辺核化の分子機構は解明されていない。

B. 筋再生過程における N-WASP の局在変化。N-WASP は未熟な筋線維では主に核に局在する。細胞質には分散して存在するが、筋原線維の配向が揃う再生 7 日目には Z 帯への局在も観察された。筋再生 14 日目以降になると、N-WASP は核外移行し、Z 帯および核周囲への局在が認められた。

2. 研究の目的

骨格筋の成熟過程において Fyn によるリン酸化を受けた N-WASP が核外移行し、T 管形成を伴った Amph2 や Dnm2 が N-WASP と結合し、N-WASP が作り出すアクチン細胞骨格を駆動力とした周辺核化を引き起こす可能性および T 管形成の周辺核化における意義について

検討する必要がある。以上のことから、本研究では骨格筋成熟過程における N-WASP のリン酸化修飾や膜変形タンパク質との相互作用を明らかにし、周辺核化を可能とする駆動力の供給機構を解明することを目的とした。

3 . 研究の方法

(プラスミド DNA)

pEGFP-C1, pmCherry-C1, pShuttle ベクターにそれぞれ N-WASP(Bt), Amph2(Hs)の全長を挿入し、それぞれの蛍光タグ融合タンパク質として培養細胞に発現させた。N-WASP(Y256E), N-WASP(Δ Pro), N-WASP(Pro), Amph2(D151N/R154Q), Amph2(K436X)変異体は PCR 法により作出し、同様に pEGFP-C1, pmCherry-C1, pShuttle ベクターに挿入した。プラスミド DNA のトランスフェクションには Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific)を用いた。

(骨格筋細胞の培養と観察)

マウス骨格筋由来細胞株 C2C12 細胞およびヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞は 10%FBS を含む DMEM (Sigma) を用いて培養した。C2C12 細胞の分化誘導には 5%ウマ血清を含む培地を用いた。マウス骨格筋初代培養には局所麻酔薬である塩酸ピバカインを前脛骨筋に注入することにより局所的な筋崩壊を誘導させた。初代培養には再生 3 日後の骨格筋を用いた。摘出した再生筋は 0.5 mg/ml コラゲナーゼ (Sigma), 3.5 mg/ml dispase (Gibco) を含む PBS により消化させたのちに、40- μ m セルストレーナー (BD Bioscience) を用いて未消化物をろ過した。増殖したサテライト細胞はガラスベース dish (IWAKI)にマトリゲル (Corning) をコートさせた平面上で増殖培地 (20%FBS, 1% chick embryo extract (MP Biomedical)を含む IMDM (Gibco)) を用いて 2 日間培養し、分化培地 (2%ウマ血清を含む IMDM) に溶かしたマトリゲルを重層することにより 2.5 次元培養を行った。FV1200 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) による観察には分化開始後 5 日目の細胞を用いた。トランスフェクションは初代培養開始 1 日後に行った。また、再生 4 日後、7 日後、14 日後の前脛骨筋はリン酸化タンパク質検出のためにウエスタンブロットティングに用いた。

(タンパク質リン酸化解析)

リン酸化タンパク質の解析において上記の組織抽出物に対し、抗リン酸化 N-WASP(Y256)特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングを行った。

(タンパク質精製とタンパク質間相互作用)

GST-N-WASP(FL), (Δ Pro), (Pro)は Sf21 昆虫細胞株に発現させて精製した。これらの GST 融合タンパク質を用いて C2C12 細胞に発現させた EGFP-Amph2 との結合を pull-down assay により検出した。GST-Amph2(wt)および Amph2(D151N/R154Q), (K575X)変異体については精製したのちにアクチン重合アッセイに用いた。

(アクチン重合アッセイ)

GST タグを PreScission protease (GE healthcare)で切断し、精製した N-WASP と Amph2 を用いた。最終濃度はそれぞれ 25 nM Arp2/3 複合体, 100 nM N-WASP, 100 nM Amph2, 2 μ M G-actin, 0.2 μ M pyrene-labeled G-actin とし、XB(10 mM Hepes-KOH(pH7.5), 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 100 nM EDTA, 200 nM ATP)中で反応させた。励起波長 365 nm, 蛍光波長 415 nm に設定し、アクチン重合の様子を蛍光分光光度計により検出した。

4 . 研究成果

(1) N-WASP(Y256)のリン酸化状態は核内-核外シャトルを制御する

筋再生過程においてウエスタンブロットティングを行ったところ、N-WASP(Y256)のリン酸化は筋再生の過程で亢進しており、さらに再生筋において疑似リン酸化変異体 N-WASP(Y256E)を発現させた場合、中心核へ局在しないことを確認した。一方で、我々は筋再生過程において周辺核化が起こる時期に、N-WASP による筋原線維形成を介した筋肥大が起こることや [Takano, K., et al. *Science* (2010) 330: 1536–1540.], C2C12 筋芽細胞の分化過程において筋原線維自体が核膜を変形させる現象を報告している [Abe, T., Takano, K., et al. *J. Cell Sci.* (2004) 117: 6523–6534.]. したがって、周辺核化の駆動力の供給には N-WASP によるアクチンフィラメント形成がかかわる可能性が考えられた。

(2) N-WASP と Amph2 の結合は中心核病の原因となる変異により阻害される

中心核病の原因遺伝子である Amph2 が N-WASP との結合性に異常をきたしている可能性を検討するために pull-down assay を行なった。精製した GST-N-WASP(FL),(Pro)と HeLa 細胞に発現させた EGFP-Amph2(wt)は結合したが、N-WASP(Δ Pro)とは結合しなかった(図2)。したがって、N-WASP は Pro-rich 領域を介して Amph2 の SH3 ドメインと結合することが示唆された。一方、

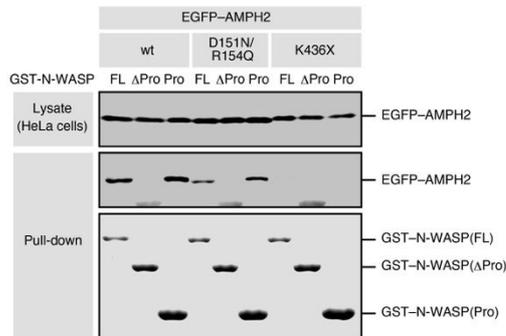


図2. N-WASP と Amph2 の結合

中心核病の原因となる Amph2(D151N/R154Q), (K436X)変異体 [Claeys, et al., (2010) *Neurology* 74: 519–521., Nicot, et al., (2007) *Nat. Genet.* 39: 1134–1139.] では N-WASP との結合が減弱している, または, その結合が完全に抑制されていることが明らかになった。すなわち, 中心核から周辺核への移行には両者の結合が必須である可能性が考えられた。

(3) Amph2 は T 管および周辺核周囲に濃縮する

初代培養骨格筋細胞を2.5次元培養に供し, 詳細な条件検討の結果, 培養下において周辺核化を観察することが可能になった。共焦点レーザー顕微鏡による立体構築画像解析により核動態を調べた結果, 培養5日目以降では周辺核化が生じることが観察された。この過程において, 発現させた EGFP-Amph2 がT管および周辺核周囲に存在することを確認した。さらにその一部ではmCherry-N-WASPとの共存も認められた。つまり, Amph2 の膜変形活性により生じたT管が N-WASPと共に核の移動方向を決めるガイドとして機能することにより周辺核化を制御する可能性が示唆された。

(4) 中心核病性Amph2変異体はN-WASP-Arp2/3複合体によるアクチン重合活性を抑制する

中心核から周辺核への移行にアクチン重合による動力が関わる可能性を検討するためにアクチン重合アッセイを行なった。Amph2とN-WASPの結合によりArp2/3複合体によるアクチン重合が促進されたが, 中心核病の原因となる Amph2(D151N/R154Q), および(K436X)変異体は野生型Amph2 に比べて N-WASP-Arp2/3複合体 によるアクチン重合の促進が抑制されることが明らかになった。したがって, N-WASP は Amph2 と協調して周辺核化に関与する可能性が考えられた。

これらの結果をまとめると, N-WASP は筋再生過程において Fyn によりリン酸化を受けることにより核外に留まることで Amph2 と協調し, Arp2/3 複合体を活性化してアクチン重合を引き起こす。これらの機構が周辺核となる中心核の移動方向を決めるガイドとして機能する可能性が考えられる。一方で Amph2 は T 管の形成および N-WASP を介した T 管と筋小胞体の連結にかかわる [Lee, E., et al. *Science* (2002) 297:1193–1196.] ため, これらの構造の形成以降に起こる周辺核化の具体的な分子機構に N-WASP が関与することを確認することは実験的に困難を極めた。単一細胞レベルで Amph2 や N-WASP の即時的な機能阻害が可能になれば, これらの疑問は解消されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Kazuya, Itakura Eisuke, Takano Kazunori, Endo Takeshi	4. 巻 376
2. 論文標題 DA-Raf, a dominant-negative regulator of the Ras-ERK pathway, is essential for skeletal myocyte differentiation including myoblast fusion and apoptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 168 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Emiri, Kawasaki Osamu, Takahashi Kazuya, Takano Kazunori, Endo Takeshi	4. 巻 362
2. 論文標題 DA-Raf, a dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is a putative tumor suppressor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp. Cell Res.	6. 最初と最後の頁 111 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田碧, 川崎修, 千倉佳吾, 高野和儀, 遠藤剛
2. 発表標題 DA-Rafによるがん化抑制におけるストレスファイバー回復の分子機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増澤龍一, 永野貴大, 高野和儀, 遠藤剛
2. 発表標題 Ras-ERK経路に拮抗するDX-Raf蛋白質群の機能の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋和也, 高野和儀, 遠藤剛
2. 発表標題 Ras-ERK経路拮抗因子DA-Rafは骨格筋細胞分化とアポトーシスに必須である
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野和儀, 栗原優介, 辻田和也, 遠藤剛
2. 発表標題 筋再生過程の核配置におけるN-WASPとamphiphysin-2の役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野和儀, 辻田和也, 菅野英美里, 菅波晃子, 遠藤剛
2. 発表標題 DA-Rafはリン脂質とRasの両方に結合することでRas-ERKカスケードを抑制する
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野和儀, 栗原優介, 辻田和也, 遠藤剛
2. 発表標題 横紋筋肥大・再生時の筋原繊維形成および核配置におけるN-WASPの役割
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学理学部生物学科遠藤研究室
http://life.s.chiba-u.jp/telab/
千葉大学 理学部 生物学科 遠藤研究室
http://life.s.chiba-u.jp/telab/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	栗原 優介 (Kurihara Yusuke)		
連携研究者	遠藤 剛 (Endo Takeshi) (30194038)	千葉大学・理学研究院・教授 (12501)	
連携研究者	辻田 和也 (Tsujiita Kazuya) (10457054)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・講師 (14501)	