

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006~2008
 課題番号：18590082
 研究課題名（和文） 筋芽細胞の分化に関与する新規微小管結合蛋白質の特性
 研究課題名（英文） Characterization of a novel microtubule-associated protein that is related to myoblast differentiation.
 研究代表者
 平山 恵津子（HIRAYAMA ETSUKO）
 京都薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：10247786

研究成果の概要：ウズラ胚筋芽細胞が筋管を形成する時に、発現量が増加する一遺伝子（AB128922）を得、その遺伝子産物の特性を調べたところ、本遺伝子産物が、細胞接着分子で脳や筋肉の発生に関係する NCAM (neural cell adhesion molecule) という蛋白質に結合する事が明らかになった為、これを MYONAP (myogenesis-related and NCAM-associated protein) と命名した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞分化 骨格筋 筋芽細胞 筋管形成 微小管 神経細胞様突起 NCAM

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の分化形成過程では、前駆細胞の筋芽細胞が細胞間認識や増殖停止等一連の素反応を経た後、分化のある段階に達すると一斉に融合し多核の筋管を形成する。この細胞融合による筋管形成は“fusion burst”と呼ばれる程、筋芽細胞の分化過程で最も顕著な現象であるにも拘わらず、その機構については2, 3の分子の関与を除いて未だほとんど解明されていない。私達は筋芽細胞の分化機構、特に筋芽細胞の融合による筋管形成機構を解明すべく、従来の株化筋芽細胞による実験系とは

異なるQM-RSV細胞を確立している[Kim et al., Cell Struct. Funct., **17**, 237-247, 1992; Kim et al., Cell Struct. Funct., **17**, 249-255, 1992]。QM-RSV細胞はウズラ胚筋芽細胞をラウス肉腫ウイルス(RSV)の温度感受性変異株で形質転換し、培養温度の転換のみで分化反応を制御可能にした細胞系で、RSVの許容温度(35.5℃)では癌細胞の性質を示し、分化せず増殖を繰り返すが、RSVの非許容温度(41℃)では分化過程に入り、16~18時間で融合を開始し24時間以内に細胞融合により筋管を形成する。従来の筋芽細胞の実験系は筋管形成に要する時間が

長い(48~72時間)ばかりでなく、培地中のCa²⁺濃度の調節により分化を制御するという大きな欠点があった。Ca²⁺は多くの生体反応に関与する為、その濃度を人為的に調節する事は実験結果の解析を困難にする。QM-RSV細胞はCa²⁺に関係なく培養温度のみで分化反応を制御できる事、更に筋管形成が比較的短時間に同調して起こる事から筋芽細胞の融合による筋管形成機構を解析する上で優れた系である。

QM-RSV 細胞系の性格付けの一環として、幾つかの阻害剤について筋管形成に対する影響を検討したところ、アクチノマイシン D 等の蛋白合成阻害剤が筋管形成を阻害することを観察した[Hirayama et al., Cell Struct. Funct., 20, 377-386, 1995]。この事は何らかの蛋白質の合成が筋管形成に必要である事を示唆している。私は、筋管形成が短時間に終了するという QM-RSV 細胞の特徴から、この細胞では筋管形成に必要な蛋白質の合成が筋管形成時に集中して起こるのではないかと考え、その様な蛋白質をコードする遺伝子を単離することを試みた。即ち、未だ筋管形成には至らない QM-RSV 細胞と筋管形成を開始した QM-RSV 細胞の各々で発現している遺伝子集団を用い Subtraction 法を行った。その結果、筋管を形成している QM-RSV 細胞で発現量が増加する遺伝子クローン 11 種を得た。この内の 1 クローンは、ヒト胎盤栄養膜細胞(cytotrophoblast)の分化過程で発現量が増加する遺伝子(PL48) [Dakour et al., Gene, 185, 153-157, 1997; Morrish et al., Placenta, 17, 431-441, 1996]や、ヒト脳で発現する遺伝子(KIAA0386) [Nagase et al., DNA Research, 4, 141-150, 1997]と相同性を有するものであったが、その機能や骨格筋分化との関連性は全く不明であった。胎盤の栄養膜細胞も分化過程で融合により多核細胞を形成する事から、このクローンに特に注目し、筋分化との関連性を中心にその遺伝子産物の細胞内での機能を解析する事にした。

2. 研究の目的

上記遺伝子クローンについて全長 cDNA を得、そのアンチセンス DNA を QM-RSV 細胞に導入し、分化過程での発現を抑制したところ筋管形成が阻害され、この遺伝子産物が筋管形成に関与する事が示唆された。

また、単クローン抗体を作製し蛍光染色法でその細胞内分布を観察したところ、微

小管の分布とほぼ一致すると共に、*in vitro* の結合実験等から本遺伝子産物が微小管結合蛋白質だと示唆する結果も得た。

更に、本蛋白質は筋細胞だけでなく脳等其他の臓器にも発現しており、その機能は筋分化への関与ばかりでなく多岐にわたると考えられた。

その全長 cDNA は約 4kb で推定分子量は約 120kDa であるが、ノーザンブロッティングでは、サブライシングの違いから大きさの異なる 3 本のバンドが検出され、非常に複雑な発現様式を有する事も示唆された。

ところが、この蛋白質には一般に微小管結合蛋白質が持つ微小管結合領域ばかりでなく、他の既知の機能ドメインも全く見出せない。複雑な発現様式をとる上に、その機能を類推し得る様な分子的な特性についても何ら手がかりを見出せない事は、解析を進める上で非常に不都合である。そこで本研究課題では、本蛋白質について更なる解析を行うべく、その分子特性を解明し、細胞内における機能との関連性を解析する事を目的とした。

尚、骨格筋分化の研究は国内外共に、筋特異的転写因子群である MyoD ファミリーを中心にした分化上流での分子生物学的研究が主流であり、本研究課題の様に分化の下流にあたる筋管形成機構に焦点を当て分子生物学的解析を行い、新規遺伝子を単離した研究はほとんどない。また、微小管結合蛋白質が筋分化に関与する事はこれまで幾つか報告があるものの、筋管形成に直接関与するという報告はない。

3. 研究の方法

本蛋白質を詳しく調べる道具としてまず抗体作製を行った。本蛋白質の様々なエピトープに対するポリクローナル及び単クローナル抗体を作製すれば、免疫ブロッティングや間接蛍光抗体法で本蛋白質についての情報をより多く得る事が出来る。抗体作製の為の抗原は大腸菌に cDNA 断片を導入し蛋白合成させる事で得た。即ち、cDNA を 3 断片に分け、各々を pGEX-5X-1 ベクターに組み込み大腸菌 DH5 α に導入後、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) で大腸菌内で GST (glutathione-S-transferase) との融合蛋白質として合成させ、精製後、抗原としてマウスに免疫した。これらマウスの抗血清

をポリクローナル抗体とした。単クローナル抗体の作製には免疫マウスの脾臓細胞を用いた。脾臓細胞をマウスミエローマ（骨髄腫）細胞とポリエチレングリコールで細胞融合させ HAT 選択培地で培養後、限界希釈法でハイブリドーマを得、その培養上清を単クローナル抗体とした。

更に、本蛋白質に結合する蛋白質を検索する為、酵母 Two-hybrid 法を行った。酵母 Two-hybrid 法には BD Matchmarker library Construction & Screening kit (BD Biosciences Clontech 社製、USA)を用いた。

また、本遺伝子に変異を入れ、変異蛋白質を細胞内で発現させ、本遺伝子産物の機能や細胞内分布の変化を観察した。変異遺伝子の調製には、QuickChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene 社製、USA)を用いた。

4. 研究成果

本遺伝子産物 [以下 MYONAP と記す；本研究課題で本遺伝子産物は NCAM 結合蛋白質と判明し、MYONAP (myogenesis-related and NCAM-associated protein)と命名した為]の分子特性について情報を得る為、まず MYONAP の様々なエピトープに対するポリクローナル抗体及び単クローナル抗体を作製した。作製したポリクローナル抗体で免疫ブロッティングを行い、QM-RSV 細胞の分化過程における MYONAP の発現を経時的に調べたところ、分子量約 120 kDa, 80 kDa, 及び 30 kDa の 3 本のバンドが検出された。また、これら蛋白質の発現量としては、120 kDa と 80 kDa の蛋白質は分化誘導 24 時間目まで増加し、筋管が充分形成される 48 時間目には減少する事が分かった。一方、30 kDa 蛋白質は分化誘導 48 時間目まで徐々に増加し続けた。ノーザンブロッティングにおいても 3 種の転写産物が検出されるが、これらは分化誘導 48 時間目まで増加し続ける。従って、MYONAP の発現量は翻訳後分解等で調節される事が示唆された。

次に、作製したポリクローナル抗体を用い間接蛍光染色法で QM-RSV 細胞内でその抗原の分布を観察したところ、細胞質全体に粒子状の分布を観察した。一方、単クローナル抗体で同様にその細胞内分布を観察すると、数種の単クローナル抗体では微小管の分布と一致する染色像が見られ、これ

はポリクローナル抗体での結果と異なるものであった。微小管様の染色像を示す単クローナル抗体が抗原である MYONAP を認識する事は確認したが、単クローナル抗体は極めて限られたエピトープのみを認識する為、抗原と異なる蛋白質でもエピトープと似た構造があれば認識する可能性がある。そこで、微小管様の染色像を示す単クローナル抗体が MYONAP の他に微小管の構成因子であるチューブリンをも認識する可能性を考え、チューブリンに対しこれら単クローナル抗体を用いた免疫ブロッティングを行ってみた。その結果、これら抗体はチューブリンと反応する事が判明し、MYONAP はチューブリンと似た構造を有すると考えられた。更に、チューブリンと反応する単クローナル抗体のエピトープが 1072 アミノ酸より成る MYONAP の第 179 から第 187 番目の 9 アミノ酸であった事から、この 9 アミノ酸周辺の構造がチューブリン様の構造をとると思われた。

未分化 QM-RSV 細胞に MYONAP を強制発現させると神経細胞様の突起を形成した (図 1 A-a, 矢印。A-b は遺伝子を導入していないコントロール細胞)。また、アクチン重合阻害剤サイトカラシン D 存在下でもこの突起形成は見られるのに対し (図 1B-b)、微小管重合阻害剤であるノコダゾール存在下では突起形成が抑制された。従って、MYONAP が微小管の動態に関与する事も示唆された (図 1 B-a)。

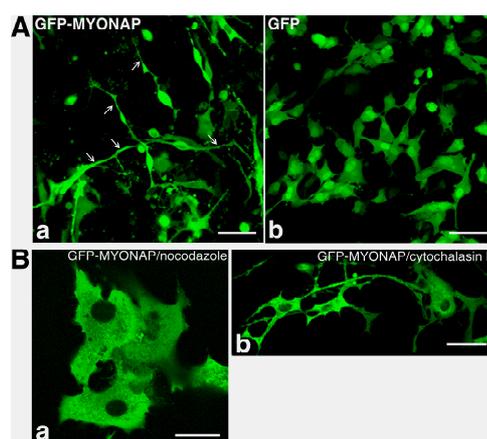


図 1 MYONAP による神経細胞様突起の形成と細胞骨格重合阻害剤の影響。A-a; MYONAP を緑色蛍光タンパク質(EGFP)との融合蛋白質として強制発現させた QM-RSV 細胞 (遺伝子導入後 24 時間目)。A-b; A-a のコントロール。EGFP のみを発現させたもの。

B-a; A-a と同様に MYONAP を強制発現させた QM-RSV 細胞を 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ノコダゾール(微小管重合阻害剤)で 4 時間処理したもの。B-b; MYONAP を強制発現させた QM-RSV 細胞を 0.25 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシン D (アクチン重合阻害剤)で 4 時間処理したもの。Scale bar; A-a, -b, 50 μm ; B-a, 20 μm ; B-b, 15.4 μm .

更に MYONAP の特性を調べる一環として、酵母 two-hybrid 法を用い MYONAP と結合する蛋白質を探索した。分化誘導 24 時間目の QM-RSV 細胞から調製した cDNA ライブラリーより、MYONAP の全長 cDNA を bait として、酵母の栄養要求性と α -galactosidase 活性を指標に結合蛋白質を検索したところ、NCAM (neural cell adhesion molecule) と結合する事が示唆された。また、MYONAP の NCAM 結合部位を酵母 Two-hybrid 法を利用し特定した。MYONAP の全長 cDNA を幾つかの断片に分け、各々がコードする蛋白質を酵母内で発現させ、NCAM との結合性の有無を酵母の栄養要求性と α -galactosidase 活性を指標に検討した結果、MYONAP の第 173 から第 207 番目のアミノ酸領域が NCAM と強い結合性を有する事が分かった。また、第 315 から第 470 番アミノ酸領域も NCAM と弱い結合性を示した。第 173 から第 207 番目アミノ酸領域を欠損する MYONAP を QM-RSV 細胞に強制発現させたところ、神経細胞様の突起は形成されず (図 2A)、MYONAP による神経細胞様突起形成には NCAM との結合が関与する事が示唆された。更に、第 173 から第 470 番目のアミノ酸領域 (NCAM と結合する可能性のあるすべての領域) を欠いた MYONAP の強制発現では、神経細胞様突起が形成されないのに加え (図 2B-a, 矢印)、強制発現させた変異 MYONAP が微小管と共局在する事を観察し (図 2B-a, b, d)、MYONAP が一時的或いは条件的に微小管と結合する可能性も示唆された。更に、この NCAM 結合領域には、上記したチューブリン様構造 (第 179 から第 187 番目の 9 アミノ酸) が含まれている事も興味深い。

NCAM は、脳と筋肉に発現する細胞接着分子であり、神経細胞の突起形成や筋管形成に関与する事が知られている [Moore et al., *J. Cell Biol.*, **105**, 1377-1386, 1987; Dickson et al., *Nature*, **344**, 348-351, 1990; Knudsen et al., *Dev. Biol.*, **138**, 159-168, 1990; McDonald et al., *Semin. Dev. Biol.*, **6**, 105-116, 1995; Charlton et

al., *Dev. Biol.*, **221**, 112-119, 2000; Edelman, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 135-169, 1985; Takei et al., *J. Neurosci.*, **19**, 9469-9479, 1999; Kolkova et al., *J. Neurochem.*, **75**, 1274-1282, 2000]。また、微小管や微小管結合蛋白質が筋分化や神経細胞の突起形成に関与する事も報告がある [Okazaki and Holtzer, *J. Cytochem. Histochem.*, **13**, 726-739, 1965; Fischman, *J. Cell Biol.*, **32**, 557-575, 1967; Bischoff and Holtzer, *J. Cell Biol.*, **36**, 111-127, 1968; Antin et al., *J. Cell Biol.*, **90**, 300-308, 1981; Toyama et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6556-6560, 1982; Gundersen et al., *J. Cell Biol.*, **109**, 2275-2288, 1989; Mangan and Olmsted, *Development*, **122**, 771-781, 1996; Spencer et al., *J. Cell Biol.*, **150**, 771-784, 2000; Chang et al., *J. Biol. Chem.*, **277**, 30690-30698, 2002; Tucker, *Brain. Res. Rev.*, **15**, 101-120, 1990; Chen et al., *Nature*, **360**, 674-677, 1992]。従って、MYONAP は NCAM と連関して微小管の動態等に関与し、神経細胞の突起形成や筋管形成に関与する事が示唆される。

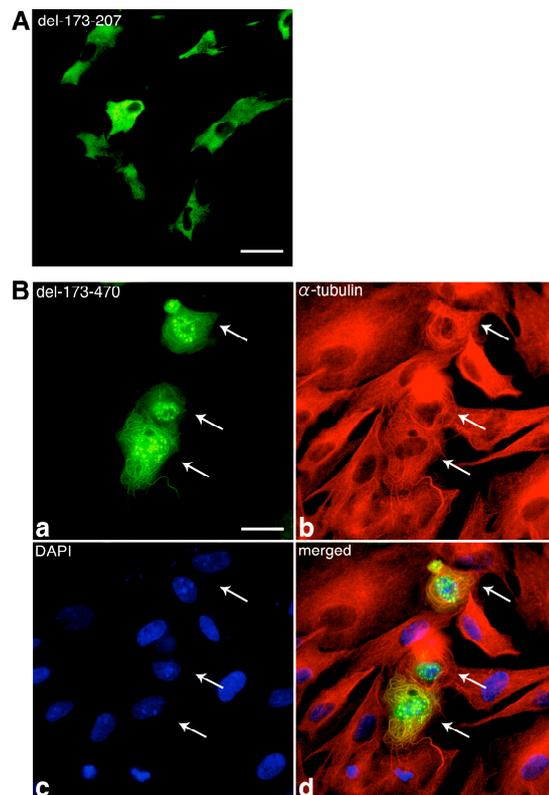


図 2 変異 MYONAP を強制発現させた QM-RSV 細胞 A;第 173 から第 207 番目のアミノ酸領域を欠損した MYONAP を EGFP との融合蛋白質として強制発現させた QM-RSV 細胞。B;第 173 から第 470 番目のアミノ酸領

域を欠損した MYONAP を EGFP との融合蛋白質として強制発現させた QM-RSV 細胞 (矢印)。a は変異 MYONAP の分布、b は α -チューブリンの分布、c は核の分布、d は a, b, c の重ね合わせ像を示す。Scale bar, 35 μ m; B, 21 μ m.

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 1 件)

- ① Etsuko Hirayama and Jeman Kim, Identification and characterization of a novel cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts: relationship to myotube formation and induction of neurite-like protrusions., *Differentiation*, 76, 253-266, 2008, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Etsuko Hirayama and Jeman Kim, A novel neural cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts is related to myotube formation and induction of neurite-like protrusions., *The 9th International Congress on Cell Biology*, 2008 年 10 月 10 日, COEX (ソウル、大韓民国)
- ② 平山恵津子、ウズラ胚筋芽細胞由来 NCAM 結合蛋白質の同定とその特性：筋管形成への関与と神経細胞様突起の誘導、第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、2007 年 5 月 30 日、福岡国際会館 (福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 恵津子 (HIRAYAMA ETSUKO)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10247786