

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19747

研究課題名（和文）廃用性萎縮筋モデルとなるハイブリット細胞系の創出

研究課題名（英文）Establishment of in vivo and in vitro systems to study the pathophysiology of disuse muscle atrophy

研究代表者

金子 弥生（Kaneko, Yayoi）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20647482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：廃用性筋萎縮における酸化ストレスの筋萎縮促進機序を明らかにすべく、細胞生物学的な観点から研究を進めた。廃用性筋萎縮における細胞内構造の変化の一つとして、ゴルジ体の小胞化を観察している。ゴルジ体の高次構造は機能のために重要だと考えられており、ゴルジ体の小胞化はその機能が損なわれていることを示唆している。ゴルジ体の小胞化には、膜融合の阻害が機序に考えられる。本研究では、膜融合の選択性に最も重要と考えられている【小胞とゴルジ体膜を繋ぎとめる係留装置】に焦点を当てた。その成果として、新規の膜係留因子FTCDの発見と膜係留の観察を可能にするin vivo, in vitro両系の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の日本では急速に高齢化が進み、世界に類を見ない高齢化社会となりつつある。高齢者は何らかの理由でいったん寝たきりになると、骨格筋の萎縮が進んで寝たきり状態からの離脱が出来なくなる。寝たきり状態になると代謝系はもとより循環器や呼吸器系にも種々の問題が生じてくる。これが寝たきり問題であり、現代日本における喫緊の医療上の大問題となっている。本研究での成果により、廃用性萎縮において生じる酸化ストレスが細胞内小器官ゴルジ体を小胞化する分子機構を明らかに出来ると考えている。そして引いては、萎縮筋において生じる細胞内小器官の異常を防ぐ糸口が得られ、新たな治療法に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：We aim to clarify the pathological role of the oxidative stress in disuse muscle atrophy from a cell biological point of view. We previously observed the fragmentation of the Golgi apparatus in atrophied cells, which suggesting the dysfunction of the intracellular transport system. One possible mechanism of the Golgi fragmentation is the inhibition of membrane fusion. In this study, we focused on a membrane tethering machinery required for the membrane fusion, especially for its specificity, in the Golgi. We have identified a novel membrane tethering factor, FTCD, in the Golgi and have succeeded in establishing both in vivo and in vitro systems which enable us to monitor the assembly/disassembly of the Golgi membrane tethering machinery in living cells and a test tube.

研究分野：細胞生物学

キーワード：廃用性筋萎縮 ゴルジ体 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代の日本では急速に高齢化が進み、世界に類を見ない高齢化社会となりつつある。高齢者は何らかの理由でいったん寝たきりになると、骨格筋の萎縮が進んで寝たきり状態からの離脱が出来なくなる。寝たきり状態になると代謝系はもとより循環器や呼吸器系にも種々の問題が生じてくる。これが寝たきり問題であり、現代日本における喫緊の医療上の大問題となっている。この寝たきり問題の解決のためには、骨格筋の萎縮を如何に防ぎ、リハビリテーションの効率を上げることが重要である。

申請者は先に、廃用性筋萎縮の過程で酸化ストレスが生じていることを世界で初めて報告している。さらに、この酸化ストレスの産生機序としては、従来から知られているミトコンドリア由来ではなく、細胞質その中でも特にミクロゾーム(小胞体やゴルジ体など)に蓄積した鉄によるヒドロキシルラジカル(OHラジカル)によるものであることを示した。実際に、ラットを用いたモデル動物に於いて、萎縮筋のミクロゾームに蓄積した鉄を鉄キレート剤で除去することによって、また脂質二重膜に対して抗酸化作用のある α -トコフェノールを投与することによって、酸化ストレスを減らすと同時に筋肉の萎縮をも減弱できることを確かめている。さらに、筋萎縮からのリハビリ過程においても、脂質二重膜に対して抗酸化作用のある α -トコフェノールは有効であり、リハビリの効果が上がっている。

以上の成果は申請者らによる動物実験によるものであるが、その後、国立循環器病センター・大阪大学・岩手医科大学・富山大学・奈良県立医科大学を中心とする研究グループによりヒトにおける臨床研究がなされた。結果、脳梗塞急性期における筋萎縮において抗酸化剤であるラジカットが有効であるという成果が得られ、今では保険適用も認められるようになってきている。しかしながら、廃用性筋萎縮における酸化ストレスがどのような機序で筋萎縮を促進しているかについては、依然として不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、廃用性筋萎縮における酸化ストレスの筋萎縮促進機序を明らかにすべく、細胞生物学的な観点から研究を進めることを目的とした。具体的には以下の通りである。

廃用性筋萎縮においては、ミクロゾーム(小胞体やゴルジ体など)に蓄積した鉄による OHラジカルが重要な病理的な役割を果たしていることを我々は先に報告している。OHラジカルは非常に反応性が高く、よってその攻撃対象は細胞内小器官の脂質二重膜であると考えられる。実際に、廃用性筋萎縮における細胞内構造の特徴的変化の1つとして、我々はゴルジ体の小胞化を観察している。

ゴルジ体は、蛋白質や脂質の細胞内輸送の中心に位置する重要な細胞内小器官であり、通常は扁平膜が積層した構造を取っている。このゴルジ体の精緻な高次構造は機能のために重要だと考えられており、廃用性筋萎縮で認められるゴルジ体の小胞化はゴルジ体の機能が損なわれていることを強く示している。一般に、廃用性筋萎縮に限らず、他の酸化ストレス下でもゴルジ体が小胞化することが知られている。ただ、酸化ストレスによってゴルジ体が小胞化する機序は全く不明のままである。

ゴルジ体は動的な細胞内小器官であり、小胞の出芽と融合のバランスによりその構造が保たれている。従ってゴルジ体が小胞化するためには、膜融合が阻害されることがその機序にあると考えられる。ここで最新の細胞生物学の知見に照らして、膜融合を素過程に分けて考えて考察すると、膜融合は主に3つの段階からなる。

小胞がゴルジ体膜に係留装置によりつなぎ止められる。

小胞とゴルジ膜上の SNARE が SNAREpin を形成して、小胞とゴルジ体膜が近接する。

最後に、小胞とゴルジ体膜の間で脂質二重膜の融合が起こる。

そこで本研究では、上記の三つの過程の中で膜融合の選択性において最も重要と考えられている段階に焦点を当てて研究を進めることを計画し、そのために以下の二段階に分けて研究を遂行することを当初の目的とした。

I. 先ず、小胞とゴルジ体膜の係留を観察することを可能にする *in vivo* と *in vitro* 両系を確立する。

II. 次に、それらの系を用いて、酸化ストレス下における膜係留装置の動態を観察する。同時に、廃用性筋萎縮筋の細胞上清を用いて、萎縮下にある細胞内での膜係留装置の形成を観察する。ただ残念ながら本研究では、上記のうち段階 I は達成できたものの、次の段階 II まで進むことは出来なかったため今後引き続き研究を進めるつもりである。

3. 研究の方法

【分子生物学的方法】

リコンビナント蛋白作製のために、目的の蛋白質の N 末端に GST タグや His タグを付加したものの cDNA をサブクローニングした。変異体作製のために、PCR を用いて mutagenesis を行った。

【生化学的方法】

リコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ、タグを用いて精製し、ゲル濾過やスクロース密度勾配遠心を用いてさらに精製した。生化学的結合実験は原則 0.1M KCl 存在下で行った。FTCD の単離同定は以下のように行った。ラット肝臓からポストミトコンドリア画分を調整し 0.5% Tx100 で可溶化したものを材料にして、p47(1-170aa)-beads を加えて結合タンパク質を単離し、質量分析で同定した。

【細胞生物学的方法】

ミトコンドリア凝集 *in vivo* アッセイは FTCD-HA-MAO を HeLa tet-off cell line に組み込んだものを用いた。DNA 発現や siRNA はそれぞれ Lipofectamine3000 と RNAiMAX を用いて行った。

4. 研究成果

本研究での成果は、新規の膜係留因子 Formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) の発見と膜融合の前段階である膜係留の観察を可能にする *in vivo*, *in vitro* 両系の確立、の 2 つに分けられるので、それぞれについて分けて述べる。

【新規の膜係留因子 FTCD の発見】

我々は以前より、ゴルジ体の形成維持に働く膜融合経路として、p97/p47 経路と p97/p37 経路を発見している。これらの膜融合機構において、p97/p37 経路では既知の Giantin-p115-GM130 複合体が膜係留装置として働くことを明らかにしているが、もう一方の p97/p47 経路では膜係留装置が不明のままであったのでその解明を目的として研究を行った。

まず、p97/p47 経路の新規因子として FTCD を単離した経緯について説明する。p47 と p37 は、両方とも p97 結合領域を C 末端側に持ち、C 末端側の相同性は高い。一方で p47 の N 末端側は、p37 とは相同性が低く特異的なアミノ酸配列を示すので、p47(1-170a.a.) に特異的に結合する蛋白質を探索した。具体的には、リコンビナント蛋白質として作成した p47(1-170a.a.) をビオチン化して、アビジン-ビーズに固定化した。このビーズをラット肝臓上清に加えて、特異的に結合する蛋白質を単離し、SDS-PAGE 法で分離の後に質量分析法で FTCD を同定した。

FTCD は、p47 と結合するだけでなく、p97 とも結合した。FTCD の結合は p47 と p97 の poly E 領域に対してなされていることを明らかにして、FTCD と p47 ないし p97 の間の結合が見られない FTCD, p47, p97 のそれぞれの変異体を創出することが出来た。

さらに興味深いのは、p47 が p97 の N 末端に結合するのに対して、FTCD は p97 の C 末端に結合することであった。ここで、p97 が p47 の C 末端に結合し FTCD は p47 の N 末端に結合することを考え合わせると、巨大複合体 FTCD-p47/p97-FTCD が形成されることが予想された。事実、negative staining 用いた分析によりその巨大複合体の存在は確かめられた。

この FTCD は免疫蛍光抗体法でゴルジ体に局在することが示された。そこで FTCD のゴルジ体に対する機能を siRNA 法を用いて検討した。FTCD の発現を培養細胞で抑制すると、顕微鏡ではゴルジ体は分散して広がり、電子顕微鏡ではゴルジ体は小胞化していた。さらにゴルジ体の試験管内再構成系により、FTCD は p97/p47 によるゴルジ体膜融合系の必須因子であると判明した。

【膜融合の前段階である膜係留の観察を可能にする *in vivo*, *in vitro* 両系の確立】

FTCD はゴルジ体に局在し、さらに細胞分裂期でもゴルジ体から外れないことを見いだした。このことは、細胞分裂期に於いて生じるゴルジ体小胞上に FTCD が存在しており、この FTCD を p97/p47 が繋ぐような形で巨大複合体 FTCD-p97/p47-FTCD を形成して、結果ゴルジ体小胞が互いに係留される可能性を提示している。

そこで、FTCD を異所性にミトコンドリアに発現させる系を考案した。即ち、FTCD にミトコンドリア移行シグナルを付加したものを発現させて、内在性 p97/p47 によりミトコンドリアが互いに係留されるかどうか検討した。野生型 FTCD を異所性にミトコンドリアに発現させた細胞では、ミトコンドリアが凝集する表現型が認められミトコンドリア膜同士の係留が確認された。このとき、野生型 FTCD の代わりに p97/p47 に結合できない変異型 FTCD を異所性に発現させた細胞ではミトコンドリアの凝集は見られなかった。野生型 FTCD を異所性に発現させていても、p97 ないしは p47 の発現を抑制すると、ミトコンドリアの凝集は見られなくなった。以上から、巨大複合体 FTCD-p97/p47-FTCD は膜係留装置として機能することが *in vivo* で証明された。

前段で述べたように、ゴルジ体の形成維持に必要な p97/p47 経路の新規膜係留装置 FTCD-p97/p47-FTCD を *in vivo* で観察することを可能にした培養細胞系を確立することに成功した。そこで今度は、膜融合に必要な膜係留をより詳細に観察するための *in vitro* 系の確立を試みた。そのために取った方法は、生体膜を使う代わりにビーズを使う方策である。即ち、FTCD をビオチン化してアビジンビーズに固定化したものを用いて、これに p97 や p47 を加えた。膜係留複合体が形成されるとビーズ凝集が生じるので、光学顕微鏡で観察することによりリアルタイムで膜係留複合体の動態を *in vitro* で追跡することが出来るようになった。

【今後継続して行う研究について】

本研究では時間的制約のために出来なかったが、上記で確立した *in vivo* と *in vitro* の両系を用いて、酸化ストレス下における膜係留装置の動態を観察する。具体的には、酸化ストレス

スの誘導のためには、過酸化水素や鉄の投与を考えている。ちなみに、今回発見した新規膜係留装置 FTCD-p97/p47-FTCD の一因子である p97 は、-SH 基の modulator である NEM 剤に感受性であることが知られていることから、十分に酸化ストレスのターゲットたり得る。

さらに、廃用性筋萎縮筋の細胞上清を用いて、萎縮下にある細胞内での膜係留装置の形成を観察する。これは、上記の *in vivo* 系に細胞膜を透過性にして細胞質の交換を可能にした *semi-intact cell* の技法を導入して行う。

これらの研究により、廃用性萎縮において生じる酸化ストレスが細胞内小器官ゴルジ体を小胞化する分子機構を明らかに出来ると考えている。そして引いては、萎縮筋において生じる細胞内小器官の異常を防ぐ糸口が得られ、新たな治療法に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yayoi Kaneko, Kyohei Shimoda, Rafael Ayala, Yukina Goto, Silvia Panico, Xiaodong Zhang, Hisao Kondo	4. 巻 40
2. 論文標題 p97 and p47 function in membrane tethering in cooperation with FTCD during mitotic Golgi reassembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	近藤 久雄 (Kondo Hisao) (20205561)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------