

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791059  
 研究課題名（和文）初期発生・筋再生過程に高発現する新規プロテアーゼ RAMP の生理的役割  
 研究課題名（英文）The physiological function of RAMP whose expression is enhanced during embryogenesis and muscle regeneration.

研究代表者  
 中山 由紀（NAKAYAMA YUKI）  
 熊本大学・大学院先端機構・特定事業教員  
 研究者番号：30332381

研究成果の概要（和文）：筋再生時に発現が誘導される新規の分子 RAMP の生理的役割を明らかにすることを目標としている。本研究では、RAMP の機能を明らかにするために、RAMP 結合分子の同定を yeast two-hybrid アッセイにより行い、その候補として 7 分子の同定に至った。さらに、骨格筋再生過程における RAMP の機能を明らかにする為に、骨格筋特異的に RAMP 遺伝子を欠損するマウスの作製に着手した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to investigate the physiological function of RAMP whose expression is enhanced in skeletal muscles after injury. To elucidate the function of RAMP, I conducted a yeast two-hybrid screen to identify its interacting partners and isolated 7 clones. Furthermore, to elucidate the physiological function of RAMP in regenerating muscle, I started to produce the mice conditionally inactivated RAMP in skeletal muscle.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：筋ジストロフィー、筋再生、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーとは、骨格筋の変成・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下をきたす遺伝性の疾患である。筋ジストロフィーには様々な型が報告されている。中でも最も重篤な病状を示すのはDuchenne型筋ジストロフィ

ー(DMD)であり、その責任遺伝子はジストロフィン遺伝子である。骨格筋では、ジストロフィンタンパク質は基底膜、細胞膜と細胞骨格を結びつける働きをしている。ジストロフィンとその複合体の異常により筋肉細胞が脆弱になり、骨格筋の変成・萎縮がおこる。

さらに、ジストロフィンとその複合体タンパク質の異常が、がん患者にみられる骨格筋萎縮（悪液質）の原因であることが報告された(Acharyyaら、*Cancer Cell*, 2005)。がん患者の20%以上が悪液質により亡くなっていることから、悪液質の改善・治療は深刻かつ早急な対応が迫られる問題である。以上から、筋ジストロフィーやがん患者にみられる骨格筋萎縮の進行を抑える、あるいは進行の原因となる因子の同定は極めて重要な研究課題と考えられる。

申請者はDMD患者に筋萎縮や筋力低下をもたらす因子やmdxマウスの筋再生を促進する因子を同定するために、mdxマウスと正常マウス骨格筋由来の細胞株を作成し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、機能不明のRAMP (regeneration-associated muscle protease) をmdxマウス筋細胞株よりクローニングした。RAMPはCUBドメイン、Sushiドメイン、トリプシン様セリンプロテアーゼドメインを持つ、720アミノ酸からなる分泌タンパク質である。RAMP mRNAは正常マウスの脳と骨格筋に発現し、薬剤処理により損傷した骨格筋の再生時に発現が誘導された。さらに、ヒト正常筋由来の筋細胞株に比べ、6人のDMD患者由来の筋細胞株でRAMP mRNAの発現が低下していた。これらの結果は、骨格筋の再生過程にRAMPが関与する可能性を示唆している(Nakayama *et al.*, *Am J Pathol*, 2004)。RAMPの生理的機能を明らかにするために、RAMP遺伝子欠損マウスの作成を試みたところ、RAMP遺伝子ホモ欠損(RAMP-KO)マウスは胎生致死であった。RAMP-KO胚は胎生8.5日で、野生型胚に比べて発生が遅れていることが分かった。以上のことは、RAMPがマウス初期発生過程に必須であることを示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、RAMPがマウス初期発生過程と筋再生過程にどのように関与しているのか、その実態を明らかにすることを目的とする。

RAMPは筋再生時に発現が誘導されることが分かっているが、その機能はこれまで明らかにされていない。そこで、その機能を明らかにするために、RAMP結合分子の同定を行い、RAMP-KOマウスが胎生致死になる原因を明らかにする。さらに、RAMP-KOでは筋再生時のRAMPの機能を解明できない。そこで、Cre/loxP標的遺伝子組換え法を用いて、骨格筋特異的にRAMPを欠損したコンディショナルRAMP-KOマウスの作製を行い、その表現型を解析することにより、筋再生時におけるRAMPの機能を明らかにすること目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)MEF細胞を用いたRAMPの機能解析

RAMP遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であるため、筋再生時におけるRAMPの機能を明らかにすることはできない。また、in situ hybridizationの結果より、RAMP mRNAは再生筋に発現していることが分かっているためC2C12筋芽細胞の分化誘導系を用いたRAMPの機能解析を試みてきた。しかし、C2C12にRAMPを強制発現させても、筋分化に影響は全く見られなかった。また、siRNAをC2C12に導入しても、その影響はこれまで得られていない。C2C12細胞ではRAMP mRNAの発現は非常に少ないためと考えられた。RAMP遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であること、さらに、RAMP mRNAはMEF細胞で高発現していることから、mouse embryonic fibroblast(MEF)細胞を用いて、RAMPの機能を検討することとした。MEF細胞にsiRNAを導入し、細胞の増殖に影響があるか検討する。

### (2)RAMPに結合する因子の解析

RAMPに結合する分子を明らかにするために、RAMPを発現している初代筋芽細胞あるいは薬剤処理により損傷を起こした骨格筋を用いて免疫共沈降により同定する。それらを純化後、TOF/MASによりアミノ酸配列を決定し、マウス骨格筋cDNAライブラリーをスクリーニングしてクローニングする。得られた分子にタグを付けて強制発現し、免疫沈降、およびプルダウンアッセイによりRAMPへの結合を証明する。免疫共沈降で同定できない場合は、yeastあるいはmammalian two-hybrid assayを行う。得られた分子に対する抗体を作成し、生体内における局在を蛍光免疫染色により調べる。

### (3)コンディショナルノックアウトマウスの作成

成体ではRAMPは骨格筋と脳に強く発現していることがこれまでの研究で明らかになった。しかし、RAMP遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であるため、筋再生時における機能を明らかにすることはできない。そこで、筋組織特異的にRAMPの機能を明らかにするために、コンディショナルターゲティング法により、組織特異的にRAMPを欠損したマウスを作成する。まず、loxPを用いたコンディショナルベクターを作成し、ES細胞に導入して組換え体ES細胞を得る。ES細胞をマウス初期胚に導入し、キメラマウスを作成し、flox-RAMPマウスを得る。また、筋肉特異的にCreリコンビナーゼ発現するトランスジェニックマウスを作成し、flox-RAMPマウスと交配させて、コンディショナルノックアウトマウスを作成する。

#### 4. 研究成果

##### (1) MEF細胞を用いたRAMPの機能解析

mouse embryonic fibroblast (MEF)細胞に RAMP siRNA を導入し、細胞増殖への影響を検討した。まず、3種類の RAMP siRNA を MEF 細胞に導入し、RAMP mRNA の発現が抑制されているか RT-PCR により検討したところ、2種類の siRNA で発現抑制効果が見られた。そこで、この効果が得られた2種類の RAMP siRNA を用いて、増殖への影響を調べた。その結果、siRNA を導入していない control およびすべての遺伝子の発現に影響しないと分かっている negative siRNA と比較して、2種類の RAMP siRNA を導入した MEF 細胞では、細胞増殖活性が減少していることが分かった(図1)。また、siRNA 導入して24時間後には増殖に影響がみられないが、48時間後には増殖が抑制され、72時間後には negative と比較して、約30・60%にまで増殖が抑制されていた。

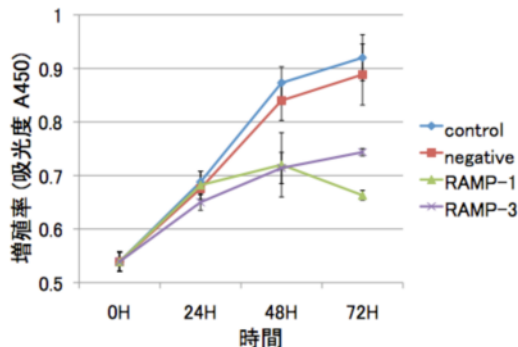


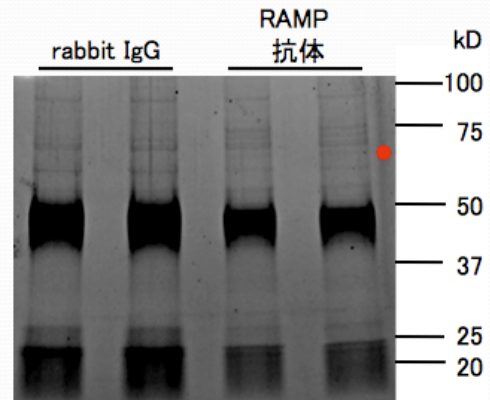
図1

今後、この増殖抑制がおこるメカニズムを明らかにし、RAMP 遺伝子欠損マウスが胎生致死になる原因を明らかにしたいと考えている。

##### (2) RAMPに結合する因子の解析

RAMP に結合する因子を同定するため、損傷を与えた骨格筋を用いて、RAMP 抗体による免疫沈降実験をおこなった。Protein A agarose に RAMP 抗体を固定し、損傷筋のライセートを流し、洗浄後、溶出液で RAMP 複合体を回収した。Western blot 解析を行い、RAMP が回収されていることを確認した。得られた RAMP 複合体を用いて SDS-PAGE 後、高感度タンパク質染色試薬 SYPRO Ruby にて染色し、バリアブルイメージアナライザー Typhoon9400 にて検出を行った。その結果、コントロールとなる IgG を固定化後、回収したものと比較して、RAMP 抗体により回収した方に約65 kD のバンドを検出することができた(図2)。この実験の再現性を確認する為に、再実験を行ったが、同じ大きさのバンドを得ることができなかった。

次に、RAMP C 末のトリプシン様セリンプロテアーゼドメインを欠失した RAMP を bait と



して、マウス由来 cDNA ライブラリーを用いた

図2

yeast two-hybrid assay を行った。2×10<sup>6</sup>個のクローンをスクリーニングし、得られたクローンの塩基配列を決定した頃、タンパク質をコードする配列を持つクローンを11個得ることができた。RAMP 抗体を用いた免疫染色の結果では RAMP は細胞外マトリックスに局在していることがわかっているので、細胞外領域を持つ7クローンに注目することにした。今後この7クローンの発現ベクターを作製し、RAMP 発現ベクターと co-transfection し、ほ乳類の培養細胞に導入後、共免疫沈降実験を行い、RAMP 結合分子の同定を行う予定である。

##### (3) コンディショナルノックアウトマウスの作成

RAMP コンディショナルノックアウトマウスを作製するために、exon1 および exon2 を loxP で挟んだターゲティングベクターの構築をおこなった。また、ES細胞のスクリーニングシステムが働くことを、コントロールベクターを ES 細胞に導入し、得られたクローンを PCR により検討した。ターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、組換え体 ES 細胞のスクリーニングを終えたところである。今後、この ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、既に購入している骨格筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現する MCK-Cre マウスを交配し、骨格筋における RAMP の機能を解析する予定である。

#### 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. Hara T. and Nakayama Y. (2009) CXCL14 and insulin action. *Vitamins and Hormones*, 80: 107-123. 査読有り

2.Oral O., Uchida I., Eto K., Nakayama Y., Nishimura O., Hirao Y., Ueda J., Tarui H., Agata K. Abé S. (2008) Promotion of spermatogonial proliferation by neuregulin 1 in newt (*Cynops pyrrhogaster*) testis. *Mech Dev*, 125 (9-10): 906-917. 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

1.中山 由紀、原孝彦 The expression and function of Brinp3 during skeletal muscle regeneration. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、パシフィコ横浜

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

1.名称：抗 BRAK (CXCL14)ヒトモノクローナル抗体及びその用途  
発明者：原 孝彦、寺沢(中山) 由紀、波佐間 正聡  
権利者：東京都医学研究機構 原 孝彦、寺沢(中山) 由紀  
種類：特許権  
番号：PCT/JP2008/052603  
出願年月日：2008年12月2日  
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://sendou.kuma-u.jp/research/nakayama.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 由紀 (NAKAYAMA YUKI)

熊本大学・大学院先端機構・特定事業教員  
研究者番号：30332381

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：