

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号： 82626

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2009～2011

課題番号： 21591105

研究課題名（和文） ディスフェルリン欠損症の治療を目的とした骨格筋の細胞膜修復機構の
解明研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanism of sarcolemmal repair system
for the therapy for dysferlinopathy

研究代表者 松田 知栄 (MATSUDA CHIE)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号： 50344099

研究成果の概要（和文）：

ディスフェルリン(dysferlin)は筋細胞膜の修復に関与し、その遺伝子変異は筋ジストロフィーを引き起こす。本研究ではディスフェルリン結合タンパク質(MG53、カベオリン-3、アフィキシン/ β -パルビン)が筋細胞膜の修復に関与する可能性を検討した。蛍光タンパク質を融合したディスフェルリン結合タンパク質を発現させたマウスの筋線維の細胞膜を、2光子レーザー顕微鏡を用いて損傷し、細胞膜の修復過程をリアルタイムで観察した。その結果、MG53とアフィキシンは細胞膜損傷部に凝集することを見出した。この結果はMG53とアフィキシンが筋細胞膜の修復に関与することを示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Dysferlin is involved in plasma membrane repair in skeletal muscle, and mutations in the dysferlin gene cause muscular dystrophy (Miyoshi Myopathy and LGMD2B). We examined the possibility whether dysferlin-binding protein (MG53, caveolin-3 and affixin/ β -parvin) participate in sarcolemmal repair by membrane-repair assay using two-photon laser microscope. We found that MG53 and affixin accumulate at the wounded site of sarcolemma. This result suggests the involvement of MG53 and affixin in sarcolemmal repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学、臨床神経分子遺伝学

キーワード：脳神経疾患、タンパク質、生体分子

1. 研究開始当初の背景

ディスフェルリン(dysferlin)の欠損は臨床的に異なる2つの遺伝性筋疾患である三好型遠位型筋ジストロフィー(Miyoshi myopathy, MM)と肢帯型筋ジストロフィー

2B型(LGMD2B)を引き起こす。ディスフェルリンは損傷した筋細胞膜の修復に関与することが示唆されている。ディスフェルリンはCa²⁺感受性とリン脂質感受性を担うC2ドメインを複数含むフェルリン(ferlin)ファミリー

一に属し、膜融合への関与が線虫のホモログで報告されている(Achanzar E *et al. J Cell Sci* 1997)。一般的にジストロフィンやジストロフィン複合体の遺伝子変異により発症する筋ジストロフィーでは、細胞膜の脆弱化により筋線維が変性・壊死すると考えられている。これに対しディスフェルリンは筋細胞膜の損傷部位でパッチ状に集積する(ディスフェルリンパッチ)ことから、筋細胞膜修復への関与が注目されるようになった(Bansal D *et al. Nature* 2003)。すなわちディスフェルリンの欠損は筋細胞膜の修復異常という新しい分子病態の筋ジストロフィーを引き起こすと考えられる。我々はディスフェルリンの生理的機能を解明する目的でディスフェルリン結合タンパク質を探索し、カベオリン-3(心筋・骨格筋特異的カベオリン)がディスフェルリンに結合することを見出した(Matsuda C *et al. Hum Mol Genet* 2001)。カベオリン-3はシグナル伝達や細胞内コレステロール輸送に関与し、筋細胞膜に局在する。カベオリン-3の遺伝子変異により発症する肢帯型筋ジストロフィー1C型罹患筋においては、ディスフェルリンの発現レベルが2次的に低下して細胞質でspeckleを形成することを見出した。

次に我々はディスフェルリン欠損症の分子病態を解明するため、患者骨格筋において2次的な細胞内局在異常を示すタンパク質を免疫組織化学法にて探索し、アフィキシンを同定した(Matsuda C *et al. J Neuropathol Exp Neurol.* 2005)。アフィキシンはfocal adhesionタンパク質であり、インテグリンを介したシグナルをアクチン細胞骨格系に繋げ、細胞接着・細胞運動において重要な役割を担う。正常骨格筋においてアフィキシンはディスフェルリンと複合体を形成し細胞膜に局在することを免疫沈降法、免疫組織化学法で確認した。これに対しディスフェルリン欠損症の患者骨格筋においてアフィキシンは細胞膜から部分的に欠落していた。この結果からアフィキシンも骨格筋細胞膜の修復に関与すること、そのプロセスにはアクチン細胞骨格系が関与することが予測される。アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜修復、では細胞膜自体がresealingされるだけでなく、損傷部位付近の細胞質においてアクチン細胞骨格系が再構成されることが報告されている(Bement W *et al. Curr Opin Cell Biol* 2007)。

2. 研究の目的

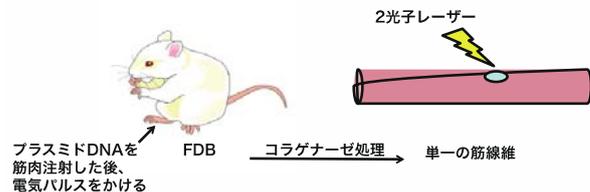
本研究ではディスフェルリン結合タンパク質が骨格筋細胞膜修復に関与する可能性について検討し、骨格筋細胞膜修復機構の解明を目指す。さらに筋細胞膜の修復機構の解明により、ディスフェルリン欠損症の治療薬と

して利用可能な、膜修復を回復・促進する分子の探索を目指す

3. 研究の方法

dysferlin 結合タンパク質に GFP または RFP を付加した培養細胞用プラスミド 10-20 μ g をマウスの足底筋に注射し、エレクトロポレーション法で遺伝子導入を行う。7-10 日後、マウスより足底筋を単離し、コラゲナーゼ I で処理することにより単一の筋線維を得る。導入した遺伝子の発現している筋線維の細胞膜を 2 光子レーザーで損傷し、修復過程を共焦点レーザー顕微鏡を用いてリアルタイムで観察する。

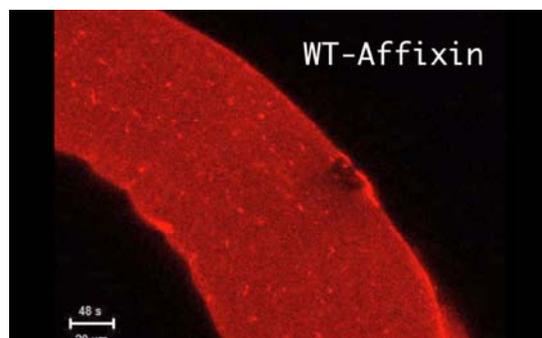
骨格筋細胞膜修復時の caveolin-3、affixin の分子挙動をリアルタイムで調べる



4. 研究成果

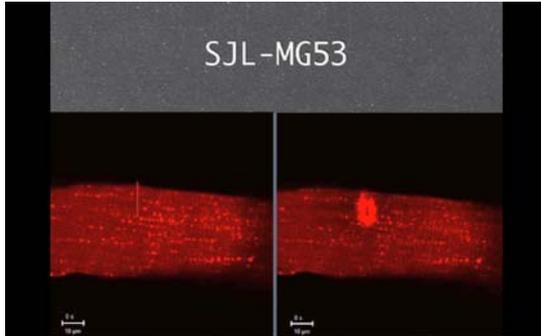
野生型、SJL マウス筋線維の筋線維において mCherry-カベオリン-3 は細かい細胞内粒子として発現しており、細胞膜損傷時にカベオリン-3 の顕著な動きは観察されなかった。mCherry-アフィキシンも野生型、SJL マウス筋線維において細かい細胞内粒子として発現していたが、膜損傷部への凝集が確認された。この結果からアフィキシンは骨格筋の細胞膜修復に関与することが予想される。ディスフェルリン遺伝子に変異を持ち、筋ジストロフィー様症状を呈する SJL マウスにおける細胞膜損傷時のアフィキシンの動態を検討中である。

野生型マウス筋線維において affixin は細胞膜損傷部において凝集する



次に SJL マウス筋線維の細胞膜損傷時における MG53 の動きを観察した。MG53 は野生型マウス骨格筋の細胞膜損傷部に酸化シグナル依存的に凝集することが報告されているが、SJL マウスにおいても MG53 の損傷部への凝集が確認された。

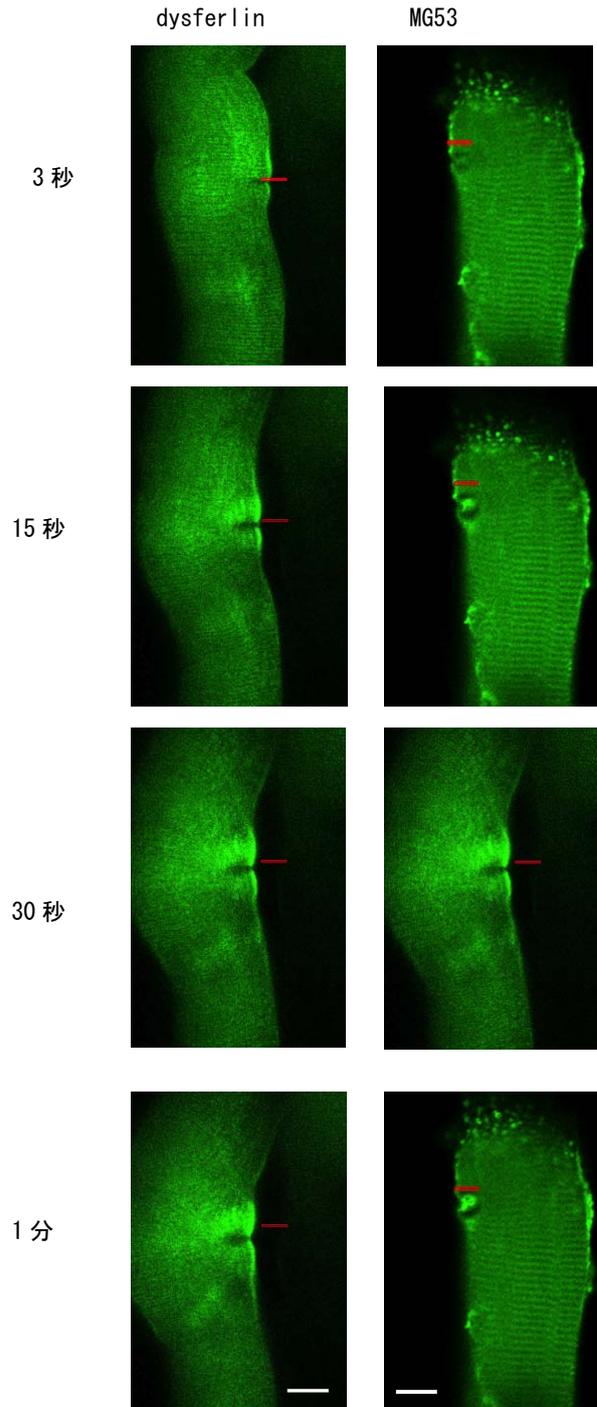
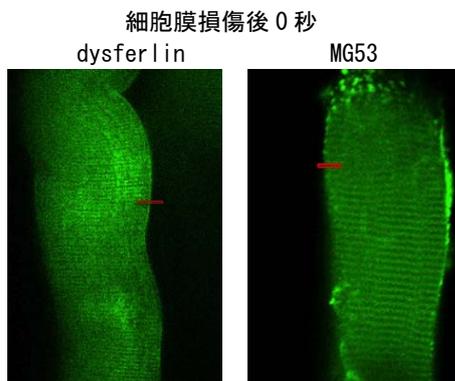
SJL マウス筋線維において MG53 は細胞膜損傷部において凝集する



SJL マウスは筋ジストロフィー様の症状を呈するが、野生型マウスと同様に MG53 の筋線維細胞膜損傷部への凝集が認められる。したがって骨格筋細胞膜の修復には dysferlin と MG53 の両方が必要であることが予想される。

骨格筋細胞膜修復において中心的な役割を担うディスフェルリンは損傷後1秒以内に膜損傷部に凝集するが、MG53 はディスフェルリンよりもゆっくりと損傷部に凝集し、損傷部への凝集は5分後も続いていた。これらの結果は MG53 とディスフェルリンが骨格筋の細胞膜修復において異なる役割を担っていることを示唆する。

野生型マウスにおける骨格筋細胞膜修復時の dysferlin、MG53 の動き



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 3 件)

- ① Sakai H, Furihata M, Matsuda C, Takahashi M, Miyazaki H, Konakahara T, Imamura T, Okada T. Augmented autocrine bone morphogenic protein (BMP) 7 signaling increases the metastatic

potential of mouse breast cancer cells.

Clin Exp Metastasis. 査読あり Apr;29(4), 2012, 327-38.

DOI:なし

② Mitsuhashi H, Hayashi YK, Matsuda C, Noguchi S, Wakatsuki S, Araki T, and Nishino I
Specific phosphorylation on Ser458 of A-type lamins in *LMNA* associated myopathy patients
J Cell Sci. 査読あり 2010, 123(Pt 22)2010, 3893-900.

DOI:なし

③ Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I.
Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy.

J Clin Invest. 査読あり 2009, 119(9):2623-33.
DOI: 10.1172/JCI38660.

[学会発表] (計 4 件)

① Chie Matsuda, Katsuya Miyake, Kimihiko Kameyama, Hiroshi Takeshima, Etsuko Keduka, Nobukazu Arakai, Ichizo Nishino and Yukiko K. Hayashi

Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53

16th International WMS Congress, 2011/10/19
Ria Park Hotel, Almancil, Algarve, Portugal

② Chie Matsuda, Kimihiko Kameyama, Hiroshi Takeshima, Ichizo Nishino and Yukiko K. Hayashi

Dysferlin C2A domain is important for association with MG53 (TRIM72)

the XII International Congress of Neuromuscular Dystrophy 2010/7/19
Monte S. Angelo University Campus, Naples,

Italy,

③ Chie Matsuda, Katsuya Miyake, Kimihiko Kameyama, Hiroshi Takeshima, Nobukazu Arakai, Ichizo Nishino and Yukiko K. Hayashi
Dysferlin C2A domain is important for association with MG53 (TRIM72)

9th Annual Meeting of Asian and Oceanian Myology Center, 2010/3/25
Millennium Seoul Hilton hotel, Seoul, Korea

④ Chie Matsuda, Katsuya Miyake, Kimihiko Kameyama, Hiroshi Takeshima, Nobukazu Arakai, Ichizo Nishino and Yukiko K. Hayashi

The association of dysferlin and affixin is regulated by calcium concentration

14th International WMS Congress, 2009/9/10
Uni-Mail, Geneva, Switzerland,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 知栄 (MATSUDA CHIE)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50344099