

令和 6 年 9 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06078

研究課題名(和文) BARタンパク質とN-WASPを介する細胞遊走に連動した筋細胞融合の制御機構

研究課題名(英文) BAR protein and N-WASP-mediated regulation of skeletal muscle fusion by cooperating with cell migration

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は多核の細胞から構成されており、単に運動器としてだけではなく生体の中で最も大きなエネルギー代謝器官としての役割を果たしている。骨格筋は加齢と共に減少する事が知られているため、骨格筋量の増加(筋肥大)機構の解明は我が国の高齢化社会を支える上で重要な課題である。筋細胞融合のしくみを解明することによりこの問題に対処できると考えた。本研究により、筋細胞融合における細胞膜融合には細胞膜の張力低下が必要であることや筋細胞融合過程における細胞表面アクチン動態、およびBARタンパク質やN-WASP-Arp2/3複合体やRac1-WAVE軸が筋細胞遊走と筋細胞融合のどちらにも関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢正筋肉減少症(サルコペニア)は「筋量と筋力の進行性かつ全身性の減少に特徴づけられる症状で、身体機能障害や生活の質の低下、死のリスクを伴うもの」と定義されている。サルコペニアは寝たきりの原因にもなるため、高齢化社会において筋量の維持は重要な研究課題である。本研究により細胞膜制御と細胞骨格の制御が細胞遊走だけでなく筋細胞融合とも連動して制御されることを明らかにした点は学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle is composed of multinucleated cells and plays a role not only as a locomotor but also as the largest energy-metabolizing organ in the body. Skeletal muscle is known to decrease with age, so elucidating the mechanism of increase in skeletal muscle mass (muscle hypertrophy) is an important issue in supporting Japan's aging society. We thought this problem could be addressed by elucidating the mechanism of skeletal muscle cell fusion. This study revealed that membrane fusion during skeletal muscle cell fusion requires a decrease in membrane tension, and that cell surface actin filament dynamics during the muscle cell fusion process. Furthermore, BAR proteins, N-WASP-Arp2/3 complexes, and the Rac1-WAVE axis were revealed to be involved in both muscle cell migration and fusion.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：アクチン細胞骨格 筋細胞融合 細胞運動 細胞表面アクチン 筋原繊維形成

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は多核の細胞から構成されており、単に運動器としてだけではなく生体の中で最も大きなエネルギー代謝器官としての役割を果たしている。骨格筋は加齢と共に減少する事が知られているため、骨格筋量の増加(筋肥大)機構の解明は我が国の高齢化社会を支える上で重要な課題である。骨格筋は多段階の制御を受けて形成される。骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞が筋芽細胞として増殖し、筋形成が必要な部位へ遊走し、分化したのちに細胞融合し、筋肥大を引き起こす。我々はこれまでにアクチン重合を担う N-WASP が筋再生における筋芽細胞の遊走に関わることや、N-WASP と nebulin が協調して筋原線維アクチンを形成することで筋肥大に関与することを明らかにしてきた[a],[b]。一方、細胞融合を介して多核化する機構については長年にわたり筋細胞融合に関わるタンパク質の探索が行われてきた。近年では、Myomaker、Myomerger といった膜貫通タンパク質が筋細胞融合に関わる事が示され、筋細胞の融合能獲得機構が明らかにされつつある[c],[d]。その機構としては、分化決定した筋芽細胞同士が互いに接着した際に、細胞膜同士を近接させることにより半融合(hemi-fusion)状態を作ることにより Myomaker が機能し、Myomerger が細胞膜の張力を変化させて膜融合を引き起こすという仮説が提唱されている[a]。しかしながら、筋細胞融合における細胞膜の物理的形態変化を可能とする細胞膜の状態変化については議論の余地が残されている。例えば、細胞膜の張力は細胞膜と細胞膜直下のアクチンフィラメント束(cortical actin bundle)との連結が関わっている事が示されており、cortical actin bundle は細胞遊走などの細胞膜の形態変化を伴う現象に先立って柔軟に細胞膜との連結が制御される事が明らかにされた[e]。このため、hemi-fusion における Myomaker-Myomerger 軸による細胞表層からの細胞膜制御に先立って起こる、細胞内からの物理的機構の存在が示唆された。これらのことから、細胞膜と cortical actin bundle との連結が解かれることにより細胞膜の張力が下がることで、細胞膜の形態変化を伴う筋細胞融合が可能になるという仮説を立てた。

(引用文献)

[a] *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 54862–54871. [b] *Science* (2010) 330: 1536–1540.

[c] *Dev. Cell* (2018) 46: 767–780. [d] *Nature* (2013) 499: 301–305.

[e] *Science* (2020) 368: 1205–1210.

### 2. 研究の目的

これまでの骨格筋研究において筋細胞遊走と筋細胞融合はそれぞれ独立に研究されており、これらの相互の連関を視点を研究された例は少なく、Myomaker-Myomerger 軸による筋細胞融合に必要な細胞膜の物理的性状についての研究はなされていない。突き詰めると本研究により得られる成果は、細胞膜と細胞骨格の制御が細胞遊走を制御するのみではなく、これらに連動して Myomaker-Myomerger 軸による筋細胞融合を発動する原理の解明に繋がると期待された。そこで本研究では、骨格筋形成の過程における筋細胞遊走と筋細胞融合の過程が密接に連関し合った制御を受けていることや、その分子機構を明らかに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 に N-WASP や Amphiphysin-2, Toca-1, Lifeact cDNA を挿入した。また、PCR 法によりクローニングした Myomaker cDNA も同様に pEGFP-C1 へ

クターへ挿入した。Lyn10-utrophin(ABD)は共同研究者の辻田和也博士より供与された。ラバマイシン依存的細胞膜局在型 Ezrin(T567E)や PMact は Addgene より入手した。

**細胞培養** マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 細胞を骨格筋細胞融合のモデルとして用い、10% FBS を含む DMEM( Sigma )を用いて培養した。5%非動化ウマ血清(HIHS)(Thermo Fischer Scientific)を含む DMEM を通常の半量にすることで筋細胞分化を誘導した。なお、この方法で分化させる際には、ミネラルオイル(MP biomedical) を重層することで培養中の培地の液量低下を防止した。筋細胞融合は分化培地交換後 48 時間後から起こり始め、96 時間まで段階的に融合した多核の筋管細胞が検出できる。Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)あるいはレトロウイルスを用いた遺伝子導入は分化培地交換 1 日前に行った。恒常的安定発現株の樹立にはプラスミドベクター単独あるいは Linear Puromycin marker (Takara) と共導入した後に puromycin により選別を行い、得られたクローンのうち蛍光を発するものを蛍光顕微鏡により選択した細胞株を用いた。

**顕微鏡観察** ガラスベース dish (IWAKI) やカバースリップにマトリゲル (Corning) をコートさせた平面上で培養した C2C12 細胞について、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1200 (Olympus) あるいは 蛍光顕微鏡 Axio Observer (Zeiss) によりタイムラプスイメージングや静止画の撮影を行った。細胞膜張力測定は光ピンセット JPK nanoTracker (BRUKER) により実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 筋細胞融合過程における細胞膜張力の変化

筋細胞分化前後における単核細胞の細胞膜張力を測定したところ、分化前のやや丸みのある筋芽細胞でおよそ 32 pN/μm であり、分化誘導後の細胞遊走と細胞融合を引き起こしつつある筋芽細胞ではおよそ 26 pN/μm であった。このことから、筋細胞分化に伴い、筋細胞膜の張力が低下して柔軟性を増すことが示された。細胞膜は細胞表層アクチンと連結が制御されることによりその柔軟性が変化することがわかっている。そこで、ERM のリン酸化状態をウェスタンブロッティングにより確認したところ、ERM のリン酸化は分化過程においてやや増加していることが示された(図 1)。このことは ERM のリン酸化が筋細胞融合を引き起こす細胞では局所的に低下し、筋管細胞ではそのリン酸化が高まることを示唆している。そこで、細胞膜直下のアクチンフィラメントを可視化するプローブである PMact を恒常的に発現する C2C12 細胞株 (C2/PMact 細胞) を得た。この C2/PMact 細胞は分化前には細胞形態に影響を与えないが、分化誘導後に細胞形態に顕著な影響を与えて、細胞がやや丸みを帯びた細胞膜張力が高くなる形態をとっていた(図 2)。さらに筋特異的ミオシン重鎖の発現には影響を与えなかったことから筋細胞分化が進行しているにも関わらず、筋細胞融合が阻害されていることが明らかになった。同様に、Lyn10-Ezrin(T657E)や Lyn10-utrophin(ABD)もアクチン細胞骨格を細胞膜直下に引き寄せるが、これらを発現させた場合においても筋細胞融合は阻害された。すなわち、PMact は細胞膜直下にアクチンを集積させてしまうことで細胞膜張力を上昇させてしまい、細胞融合に必要な細胞膜の柔軟性がなくなると考えられる。したがって、筋細胞融合における細胞膜融合には表層アクチンの制御下での細胞膜張力の低下が必要であることが示された。

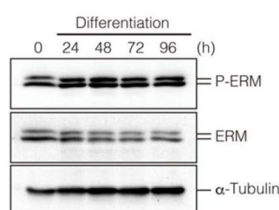


図 1 筋細胞分化過程における ERM のリン酸化

ERM タンパク質の量が低下しているが、リン酸化 ERM の量は筋細胞分化で全体的に上昇している

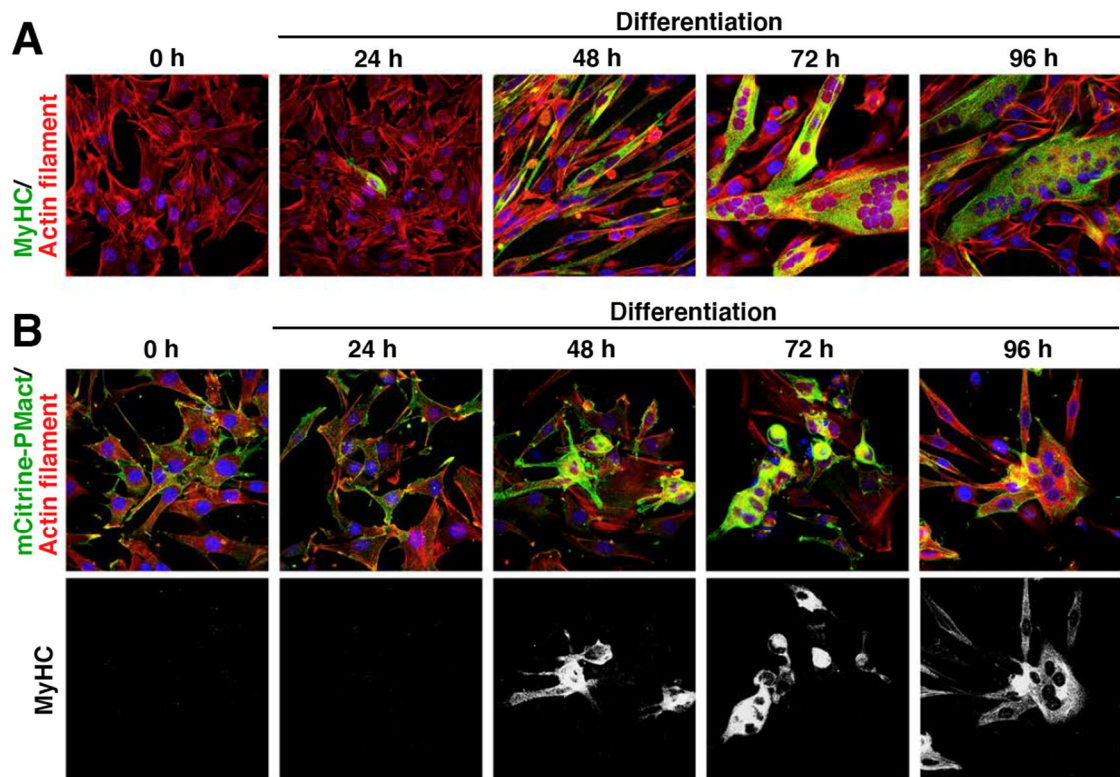


図 2 筋細胞融合過程における細胞表層アクチン動態の阻害の影響

A. C2C12 細胞の分化過程における筋細胞融合 (control)。

B. C2/PMact 細胞における筋細胞融合の阻害。筋特異的ミオシン重鎖の発現が確認できるが、核の数が control に比べて少ない。

## (2) 筋細胞膜の融合時における細胞表層アクチンの動態

図 2 より、C2/PMact 細胞は全く融合しないわけではないことがわかる。つまり、効率とはともかく細胞融合時の細胞表層アクチンの動態について C2/PMact 細胞を用いることで確認できる可能性がある。そこで、共焦点レーザー顕微鏡によるライブセルイメージングにより筋細胞融合の過程における膜融合時の細胞表層アクチンの動態を確認した。その結果、近接した細胞間での細胞表層アクチンが一過的に消え、その後、筋細胞融合が起こることが明らかになった (図 3)。また、融合していない部位においても PMact の局在が一部消失して lamellipodia 様の形態が検出できたことから、筋細胞融合において、細胞表層アクチンの崩壊が引き起こされることが明らかになった。すなわち、筋細胞融合の過程において近接した細胞間では局所的に細胞表層アクチンの崩壊を伴って細胞膜の張力低下を引き起こす機構が存在することが示唆された。

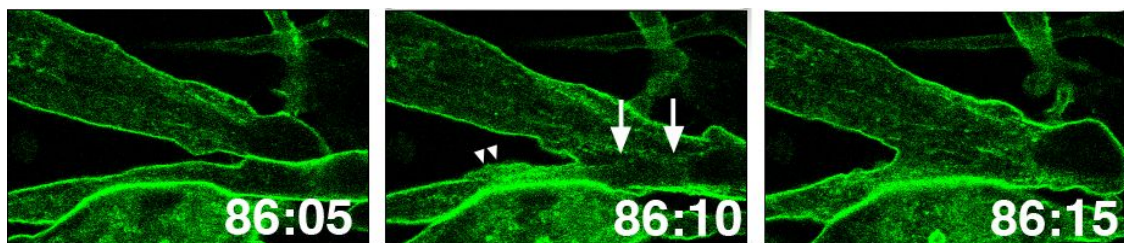


図 3 筋細胞融合時の細胞表層アクチン動態

矢印: 筋細胞融合における細胞表層アクチンの分散。PMact が分散してから膜融合している。  
矢じり: Lamellipodia 様の形態が検出されており、この領域では PMact の局在が分散している。

分化培地へ交換後の経過時間を 時間 : 分 と示している。



#### (4) 筋細胞融合に先立つ細胞遊走の促進

同様に筋細胞融合を引き起こす際には N-WASP や Toca-1 も融合面に局在していることが明らかになった。一方、ライブセルイメージングの結果より、筋細胞分化を誘導すると筋細胞融合が起こり始める分化誘導後 48 時間後において細胞遊走速度が促進した。また、この際に N-WASP 阻害剤や Arp2/3 阻害剤、Rac1 阻害剤、アクチン重合阻害剤である latrunculin B を分化誘導後に添加すると筋細胞融合が抑制された。さらに、Myomaker の過剰発現では非筋細胞である NIH3T3 細胞のみでは細胞融合は十分に誘導できなかったため、骨格筋では細胞表層アクチン制御のしくみが非筋細胞とは異なっていることが示唆された。したがって、lamellipodia 形成に関与する N-WASP-Arp2/3 複合体や Rac1-WAVE 軸は細胞表層アクチンおよび細胞膜の張力を制御するとともに myomaker と協調して筋細胞融合に関与することや、筋特異的な細胞表層アクチン制御機構の存在が示唆された。

#### (5) 今後の展望

本研究により、細胞表層アクチンの制御が筋細胞融合の過程で起こることが明らかになり、細胞遊走を制御する N-WASP などもこの過程に関与することが示された。筋細胞融合の過程で N-WASP が実際に活性を持つかどうかは非常に興味深いため、N-WASP の活性化を検出するために N-WASP cDNA の N 末端に YFP、C 末端に CFP を付加したプラスミドを作成し導入したところ、導入した細胞へのダメージが大きいと、融合時までは観察することができなかったが、現在はゲノム編集により N-WASP 遺伝子座において組換えを行うことで内在性 N-WASP を FRET バイオセンサーとして発現する C2C12 細胞を樹立しているところである。この N-WASP ゲノム編集細胞株を用いて筋細胞融合過程の FRET イメージングを行うことにより、N-WASP の活性化と筋細胞融合が連動することがさらに明らかになるといえる。一方で、Ras-ERK 経路を完全に抑制すると、細胞分化は促進するものの筋細胞融合が抑えられるというデータを得ている。この結果は、N-WASP と協調して働く cortactin や N-WASP 自身および WAVE2 が ERK によりリン酸化制御を受けることで筋細胞遊走を制御し、これが破綻したことで筋細胞融合が抑制された可能性が考えられる(この内容の一部は 5. 主な発表論文等の 雑誌論文 1 件、学会発表 1 件に含めた)。したがって、筋細胞融合機構に ERK シグナルが関わると想定し、筋細胞遊走と筋細胞融合の関係をさらに明らかにする必要がある。このように本研究はシグナルクロストークを広く考えつつ解く必要がある課題へと変遷の様相を示している。また、筋特異的な細胞表層アクチン制御のしくみがあることは他の組織では細胞融合が盛んに起こらないことの説明にもつながるため学術的に非常に興味深い課題である。Myomaker や myomixer と合わせて最近発見された minion も筋細胞融合に関与することが示されていることや上の(4)に記したようにアクチン動態を阻害すると筋細胞融合は抑制される。このため、今後はこれら筋特異的膜タンパク質が N-WASP や BAR タンパク質と協調することで細胞表層アクチンを局所的に制御して細胞膜の柔軟性を獲得する可能性についてシグナルクロストークも踏まえつつ検討していく。

骨格筋細胞の融合はいまだに完全には解き明かされていない未知の領域であり、高齢者では筋衛星細胞が低下するなどの問題もあるため、骨格筋量の増大を目指した治療に向けた基盤構築が進んでいない現状がある。本研究を含めた骨格筋の基礎研究の成果の蓄積によってロコモティブシンドロームなどの介護が必要となるような重篤な筋量低下の改善に繋がることが期待される。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuzawa Ryuichi, Takahashi Kazuya, Takano Kazunori, Nishino Ichizo, Sakai Toshiyuki, Endo Takeshi	4. 巻 171
2. 論文標題 DA-Raf and the MEK inhibitor trametinib reverse skeletal myocyte differentiation inhibition or muscle atrophy caused by myostatin and GDF11 through the non-Smad Ras/ERK pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 109 ~ 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab116	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野 和儀, 辻田 和也, 伊藤 俊樹, 遠藤 剛
2. 発表標題 DA-Rafは細胞膜と活性化Rasに結合することによりRas-ERK経路の全体的抑制因子として機能する
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Research map（高野 和儀） <a href="https://researchmap.jp/kazunori_takano">https://researchmap.jp/kazunori_takano</a>  バイオシグナル研究室 <a href="https://biosignaltelab.wordpress.com">https://biosignaltelab.wordpress.com</a>
---

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	浅野 雄貴  (Yuuki Asano)		

6. 研究組織（つづき）

	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	辻田 和也  (Tsuji ta Kazuya)  (10457054)	神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授    (14501)	

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