

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06750

研究課題名(和文) 蛍光偏光イメージングによる筋芽細胞融合の分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism for myoblast fusion using fluorescence polarization imaging

研究代表者

佐藤 啓介 (Sato, Keisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60644044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞の融合過程におけるアクチンの動態と機能を明らかにすることを目的に、申請者らが独自に開発したPOLARIS法を用いたアクチンの蛍光偏光イメージングにより、マウス筋芽細胞株C2C12細胞融合過程のリアルタイム解析を目指した。そのために、F-actinに特異的に結合する蛍光偏光イメージング用プローブを複数の異なる蛍光色で作成し、これらを安定発現する細胞株を樹立した。さらに細胞融合の蛍光イメージングに適した培養条件を検討、確立した。作成した細胞株と確立した培養条件を用いて、C2C12細胞融合過程のアクチン動態を蛍光偏光顕微鏡観察し、融合過程で形成されるアクチン高次構造に関する所見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴い骨格筋量が低下するサルコペニアは、超高齢化社会を迎えた日本が抱える大きな問題の一つであり、関連した骨格筋研究が近年隆盛をみせている。筋ジストロフィーやミオパチー等の筋疾患の臨床研究はもちろん、筋損傷を伴う怪我からのリハビリテーションや、アスリートのトレーニングなどのスポーツ科学分野においても、骨格筋は研究の対象になっている。本研究の成果は、骨格筋形成・修復過程の基礎的な理解を向上するもので、今後さらに研究を進展させることで、将来的に基礎・臨床を問わず様々な広範な骨格筋研究の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We tried to analyze actin dynamics during the C2C12 cell fusion process by fluorescence polarization imaging of F-actin using the originally-developed POLARIS method to elucidate the dynamics and function of F-actin in the myoblast fusion. For this purpose, we developed POLARIS probes that specifically label F-actin with different fluorescence colors and created C2C12 cells that stably express these probes. We also established the culture condition suitable for the fluorescence imaging of C2C12 cell fusion. Using the cell lines and culture conditions, we successfully observed F-actin dynamics during cell-cell fusion using fluorescence polarization microscopy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アクチン 筋芽細胞 細胞融合 蛍光偏光 蛍光顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は発生過程において、間葉系幹細胞から分化した筋芽細胞が融合して筋線維を形成することで作られる。筋特異的転写因子の発見に代表されるように、細胞の分化状態を制御するメカニズムについては多くの知見が得られている。一方で、筋芽細胞融合の分子メカニズムについては、特に哺乳類においてはほとんど理解が進んでいない。最近、分化には関与せず、筋芽細胞融合に特異的に働く分子として、Myomaker と Myomixer が同定された。両者とも、単独の遺伝子欠損により、筋分化マーカーの発現には影響を与えずに筋芽細胞の融合が阻害される。さらに、細胞融合能を持たないマウス線維芽細胞に両者を同時に強制発現すると、発現細胞同士が融合する。興味深いことに、線維芽細胞での Myomaker/Myomixer 強制発現時に、アクチン繊維の細胞内局在の劇的な変化が観察されている。アクチン重合を薬理的に攪乱すると、線維芽細胞に両者を強制発現しても細胞融合は起こらない。

以上の知見から、細胞融合の過程で、アクチンが直接的な役割を果たしている可能性が示唆されるが、その動態や機能は明らかではない。また、細胞融合において、Myomaker や Myomixer はアクチンと何らかの構造的・機能的関連を持っていると考えられるが、詳細は全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

前述のような状況を踏まえ、本研究では、筋芽細胞融合過程において、アクチンがどのような高次構造を取るか、その高次構造が融合においてどのような機能を持つか、さらに Myomaker/Myomixer とアクチン高次構造形成の構造的・機能的関連について解明することを目的とした。そのために、(1)細胞融合時のアクチン高次構造の詳細な解析、(2)アクチンが細胞融合過程で果たす役割の解明、(3)Myomaker/Myomixer とアクチンの構造的・機能的関連の解明、を目指した。実際には、使用予定だったアクチンプローブの改良が必要であることが判明し、その完了に時間を要したこと、従来用いられてきた培養条件が蛍光イメージングに適していなかったために、新たな培養条件を確立する必要があったこと、さらに COVID-19 の影響により研究が滞ったこと、の影響があり、(1)に注力することになった。(2)(3)については、研究期間終了後も引き続き研究を継続する予定である。

## 3. 研究の方法

筋芽細胞融合時のアクチン高次構造の解析は、従来、電子顕微鏡での観察が主流であった。しかし、電子顕微鏡で得られる画像は、スナップショットであり、得られた画像が融合のどの段階を反映しているのか、正確に知ることはできない。そこで本研究では、ライブセルイメージングで実際に融合が起きていることを確認しつつ、アクチン高次構造を解析できる方法として、蛍光偏光顕微鏡によるイメージングに取り組んだ。アクチンの標識には、申請者らが開発したユニバーサル蛍光偏光標識技術 POLARIS 法を用いた。融合中の二つの細胞のアクチンを区別して観察できるようにするため、F-actin を特異的に標識するプローブ (POLARIS<sup>act</sup>) を、異なる蛍光色で作成した。これらのプローブを、マウス筋芽細胞 C2C12 に導入し、安定発現株を樹立した。顕微鏡で効率よく融合過程を観察するために、培養条件の検討を行った。確立した条件で蛍光偏光顕微鏡観察を行った。

## 4. 研究成果

まず、GFP、RFP、miRFP をベースとした POLARIS<sup>act</sup> プローブの作成に取り組み、これに成

功した。これらのプローブを、トランスポゾンを用いて C2C12 細胞に導入して安定発現株を作成した。ところが、POLARIS<sup>act</sup> プローブを発現する C2C12 細胞は元の C2C12 細胞と比べて融合能が低下していた。POLARIS<sup>act</sup> にはアクチン繊維の安定化作用があり、これが影響している可能性が考えられた。また、本研究を進めていくなかで、POLARIS<sup>act</sup> プローブは、静的なアクチン構造はよく標識するが、動的なアクチン構造の標識能が低いことが判明した。そこで、クライオ電顕を用いて POLARIS<sup>act</sup> と F-actin の結合の構造的基盤を明らかにし、結合界面周辺に変異導入をすることによって、安定化作用が抑えられ、かつ動的なアクチン構造を効率よく標識する改良型 POLARIS<sup>act</sup> の開発に成功した。改良型 POLARIS<sup>act</sup> を使って改めて C2C12 安定発現株を作成したところ、今度は元の C2C12 細胞と同等の融合能を持つ安定発現株を作成することができた。

これらの細胞株を用いて、蛍光偏光イメージングを行ったが、「細胞密度が高すぎて細胞が重なってしまい、観察しているアクチンがどの細胞由来かわからない」「励起光照射の影響で融合頻度が大きく下がるため、従来の分化誘導法による融合効率では、細胞融合する過程をイメージングするのが非常に難しい」という問題に直面した。そのため、「細胞密度が低くても細胞融合すること」「従来法と比べて効率よく細胞融合すること」を達成する分化誘導法（培養条件）の検討を行った。その結果、血清の代わりに無血清培養用サプリメントを用いた培養条件で、従来法と比較して低細胞密度・高効率での細胞融合を達成することができた。

以上で作成した細胞株と培養条件を用いて、細胞融合過程の蛍光偏光顕微鏡による観察を行った。最も細胞融合頻度が高いと考えられるタイミングで 12 時間程度タイムラプス観察を行った結果、細胞融合の過程を撮影することができ、アクチン高次構造について所見を得ることができた。しかし、現在のところ、5 分間よりも短い時間のインターバルでは融合が観察できておらず、融合過程におけるアクチン高次構造動態の詳細を明らかにするためには、時間分解能が不足している。また、イメージングしていない場合と比べると融合の効率も非常に低く、励起光照射の最適化など、撮影条件のさらなる最適化が必要である。融合が効率よく観察できるようになれば、融合にどのようなアクチン高次構造の形成が必要で、それがどのような機能的意義を持つかについての手がかりを得ることができると期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nori Nakai, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Masahiko Kawagishi, Hiromasa Ka, Kenta Saito, Sumio Terada	4. 巻 565
2. 論文標題 Development of nanobody-based POLARIS orientation probes enabled multi-color/multi-target orientation imaging in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.088.	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 千葉 和義, 齊藤 健太, 川岸 将彦, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
2. 発表標題 ユニバーサル分子配向プローブPOLARISの開発と生細胞内アクチン動態解析への応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 千葉 和義, 齊藤 健太, 川岸 将彦, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
2. 発表標題 ユニバーサル分子配向プローブPOLARISの開発と生細胞内アクチン動態解析への応用
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇（中井） 紀, 佐藤 啓介, 谷 知己, 川岸 将彦, 夏 博正, 齊藤 健太, 寺田 純雄
2. 発表標題 分子配向プローブNanobody-based POLARISの開発と、それによる多色/多標的の分子配向イメージング
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Sato, Nori Nakai-Kadowaki, Ayana Sugizaki, Kazuyoshi Chiba, Kenta Saito, Masahiko Kawagishi, Yuri Tomabechi, Shalin B. Mehta, Hirokazu Ishii, Naoki Sakai, Hiromasa Ka, Mikako Shirouzu, Tomomi Tani, Sumio Terada
2. 発表標題 Development of POLARIS, a versatile probe for multi-color/multi-target orientation imaging in living cells
3. 学会等名 Cell Bio 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 千葉 和義, 齊藤 健太, 川岸 将彦, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
2. 発表標題 ユニバーサル分子配向プローブPOLARISの開発と細胞骨格動態解析への応用
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井紀, 佐藤啓介, 谷知己, 川岸将彦, 夏博正, 齊藤健太, 寺田純雄
2. 発表標題 Nanobodyを利用した蛍光偏光ライブイメージングのためのプローブNanobody-based POLARISの開発
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nori Nakai, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Masahiko Kawagishi, Hiromasa Ka, Kenta Saito, Sumio Terada
2. 発表標題 EXPANDED REPERTOIRE OF POLARIS, A VERSATILE FLUORESCENT PROBE FOR MOLECULAR ORIENTATION
3. 学会等名 Biophysical Society 66th Annual Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井-門脇紀, 佐藤啓介, 谷知己, 川岸将彦, 夏博正, 齊藤健太, 寺田純雄
2. 発表標題 蛍光色や偏光方向を選択可能な汎用的分子配向プローブ Nanobody-based POLArIS の開発
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 啓介
2. 発表標題 生体分子の配向を可視化する蛍光標識技術の開発と応用
3. 学会等名 第10回 蛍光イメージング ミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 鎌田 勝彦, 久野 玉雄, 桂 一茂, 白水 美香子, 寺田 純雄
2. 発表標題 F-actin配向プローブPOLArISactとF-actin複合体のクライオ電子顕微鏡解析と、それに基づく改良型POLArISactの開発
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田 毅, 川原 月, 佐藤 啓介, 寺田 純雄
2. 発表標題 蛍光偏光顕微鏡観察を目的とした簡便かつ汎用的標識法の開発
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤 真理子、姜 ヨハネ、石田 裕也、佐藤 啓介、寺田 純雄
2. 発表標題 筋芽細胞の融合時におけるアクチン動態の蛍光偏光イメージング法の確立
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

TMDU Research Activities 2021-2022 <a href="https://www.youtube.com/watch?v=6V5Y59CUZV0">https://www.youtube.com/watch?v=6V5Y59CUZV0</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
研究分担者	寺田 純雄  (Terada Sumio)  (00262022)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	
研究分担者	川岸 将彦  (Kawagishi Masahiko)  (60323606)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	
研究分担者	齋藤 健太  (Saito Kenta)  (60374659)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師   (12602)	

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
---------	---------