

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791389

研究課題名（和文）筋再生過程に関与する新規分子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel proteins associated with muscle regeneration.

研究代表者

中山 由紀 (NAKAYAMA YUKI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

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 および Brinp3 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、これらの機能を明らかにする為に、結合分子の同定を yeast two-hybrid アッセイにより行った。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成を行った。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to investigate the physiological function of RAMP and Brinp3 whose expression is enhanced in skeletal muscles after injury. To elucidate the function of RAMP and Brinp3, I tried a yeast two-hybrid screen to identify its interacting partners. Furthermore, to elucidate the physiological function of RAMP in regenerating muscle, I produced 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
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：筋・神経病学

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

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)、

および細胞周期進行抑制能を有すると報告されている Brinp (BMP/RA-inducible neural-specific protein) 3 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ることを明らかにした。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為に、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。さらに、マウス線維芽細胞にRAMP siRNAを導入し、RAMP遺伝子の発現を抑制すると、細胞増殖が抑えられた。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。現在、筋再生時におけるRAMPの機能を明らかにするために、筋特異的RAMP遺伝子欠損マウスの作製を行っている。現時点までに、キメラマウスを得ることができた。骨格筋特異的にCreリコンビナーゼを発現する、MCK-Creマウスを熊本大学動物飼育施設に導入済みである。加えて、RAMPに結合する分子を同定するため、RAMP抗体を作成し、マウス損傷筋抽出液を用いて共免疫沈降実験を行った。得られた溶出物をSDS-PAGE後、ゲル染色を行ったところ、約65 kDの分子を検出した。このことはRAMPが他の分子と結合し、機能していることを示している。

Brinp3はBrinp1-3から成るBrinpファミリーの一つで、神経分化過程で特異的に発現誘導されることが報告されているが、その機能は明らかになっていない。薬剤処理により損傷したマウス骨格筋の再生時におけるBrinp3 mRNAの発現を検討したところ、筋損傷後5日目をピークに発現が誘導されることが明らかになった。さらに、マウス筋芽細胞株C2C12への筋分化誘導によりBrinp3 mRNAの発現が亢進することが分かった。筋分化におけるBrinp3の機能を明らかにするため、C2C12にBrinp3 siRNA導入後、筋分化を誘導したところ、Brinp3の発現抑制により筋分化決定に関与する転写因子の一つであるmyogeninの発現が減少することがわかった。これらの結果は、Brinp3が骨格筋再生過程に関与することを示している。

## 2. 研究の目的

RAMPおよびBrinp3が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。

## 3. 研究の方法

### (1) RAMP遺伝子ホモ欠損マウス死因の特定

RAMP遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であり、その原因は不明である。原因となる臓器の発生

以上を同定するため、以下の実験方法を用いる。

a) 野生型マウス発生胚発生段階におけるRAMP mRNAの発現解析を行う。また、RAMPタンパク質に対する抗体を作成し、RAMPタンパク質の発現時期、場所を特定する。

b) RAMP遺伝子ヘテロ欠損マウスの交配を行い、組織切片を作成し、発生中のRAMP遺伝子ホモ欠損胚のどこに以上があるのかを検討する。

### (2) RAMP 結合分子の同定

RAMP タンパク質はトリプシン様セリンプロテアーゼドメイン、CUBドメイン、Sushiドメインなどを持つ。このことは、他の分子とRAMPは相互作用し、その機能を制御していると考えられる。RAMP 結合分子を同定し、発生や筋再生時におけるRAMPの作用機構を明らかにする。

### (3) 筋再生時における RAMP の機能解明

RAMP は筋再生過程で発現が誘導されることから、何らかの機能を果たしていると考えられる。筋再生過程における RAMP の機能を明らかにするため、RAMP と結合すると同定した分子が、筋再生過程においても結合しているのかを検討する。また、結合している分子が筋再生過程のどの時期発現しているのかを *in situ hybridization* や抗体を用いた組織化学的解析により検討する。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 RAMP 遺伝子欠損マウスの作成を行う。

## 4. 研究成果

### (1) RAMP遺伝子ホモ欠損マウス死因の特定

RAMP遺伝子ホモ欠損胚は胎生8.5日以降に致死となる。致死となる原因を明らかにするため、マウス初期発生におけるRAMPタンパク質の発現の解析を行った。その結果、8.5日胚では、神経系にRAMPタンパク質の発現が観察された(図1)。このことは、RAMPが神経系の発生に関与し、神経系の発達異常によりRAMP遺伝子ホモ欠損胚が胎生致死になった可能性を示唆している。



図 1

### (2) RAMP 結合分子の同定

RAMP の機能を明らかにする為に、RAMP 結合タンパク質の同定を yeast two-hybrid アッセイを用いて試みた。その結果、候補因

子が数分子得られた。これらの候補分子との結合を培養細胞にて検討したところ、一分子のみ RAMP と結合し、その結合は RAMPC 末側のトリプシン様セリンプロテアーゼドメインを介していることが明らかになった (図 2)。

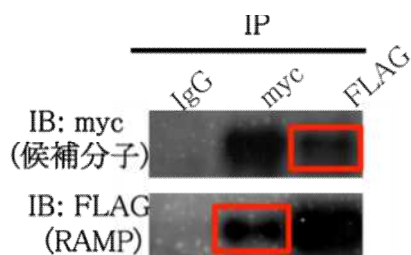


図 2

さらに、再生中の骨格筋における候補分子の発現を RT-PCR および免疫染色で検討したところ、局在を免疫染色により検討したところ、RAMP と同様に再生中の骨格筋でその発現が上昇することがわかった。そこで、再生筋を用いて免疫染色を行ったところ、一部分ではあるが RAMP とその結合分子は共局在することが明らかになった。現在、RAMP がどのように候補分子の機能や安定化に関与するのかを検討している。候補分子は膜タンパク質であるが、RAMP 存在下では候補分子は発現の安定化が観察された。RAMP は C 末にトリプシン様セリンプロテアーゼドメインを持っているが、活性に必要なセリン残基を欠いていることからプロテアーゼとしての活性は持たないと考えられ、現在のところプロテアーゼ活性は得られていない。そこで、RAMP は結合分子の分解を抑制するプロテアーゼ阻害剤としての働きがあるのではないかと考えている (図 3)。今後、RAMP のプロテアーゼ阻害剤としての働きがないかどうか検討していきたい。

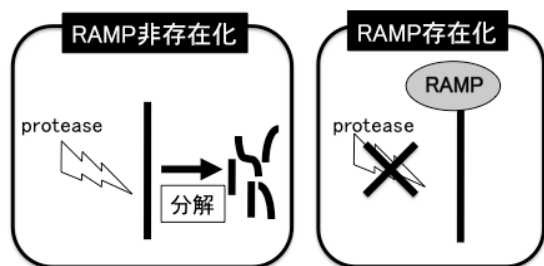


図 3

### (3) 筋再生時における RAMP の機能解明

RAMP 遺伝子ホモ欠損胚は胎生致死のため、マウス筋再生時における RAMP の機能を明らかにすることは難しい。そこで、骨格筋特異的に RAMP 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作成を行った。マウスの作成を終えたので、今後得られたマウスの表現型解析を行う予定である。

### (4) Brinp3 結合分子の同定

Brinp3 は MACPF (membrane-attack complex/ perforin) ドメイン、EGF ドメインなどのドメインを持っている。このことは、Brinp3 が他のタンパク質と相互作用し、機能している可能性を示唆している。そこで、yeast two hybrid assay 法により、Brinp3 に結合するタンパク質の同定を試みた。候補因子が得られたので、培養細胞を用いてさらに絞り込みを行ったが、Brinp3 と結合する分子は得られなかった。今後、さらに検討を行う予定である。

RAMP は、2004 年の申請者の報告以外に情報はなく、未だ機能不明である。RAMP は筋再生過程のみならず、マウスの発生過程にも重要な働きをしていることがこれまでの研究により示唆されている。一方、Brinp3 は心筋梗塞と遺伝的相関があること、および、舌ガン細胞で Brinp3 mRNA の発現が減少していることから癌抑制遺伝子として働く可能性が報告されているが、その機能は明らかになっていない。本研究で RAMP および Brinp3 の機能を明らかにすることにより、筋ジストロフィーの進行や筋再生過程の分子機構の一端を明らかにすることができると考えられる。また、申請者は筋ジストロフィー患者由来の筋細胞株の作製に成功しており、RAMP や Brinp3 の機能をヒト細胞株で解析することにより、筋ジストロフィー治療標的分子としても可能性も検討できる (図 4)。本研究から得られる成果は、新規かつ多大な意義を有すると思われる。

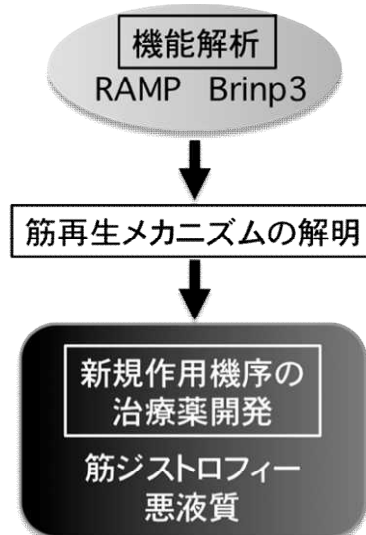


図 4

## 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 4 件)

① <sup>§</sup>Tokura Y., <sup>§</sup>Nakayama Y., Fukuda S., Nara N., Yamamoto H., Matsuda R., Hara T. (2011) Muscle injury-induced thymosin  $\beta$ 4 acts as a chemoattractant for myoblasts. *J Biochem*, 149(1): 43-48. (<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work) 査読有

② Tanegashima K., Okamoto S., Nakayama Y., Taya C., Shitara H., Ishii R., Yonekawa H., Minokoshi Y., Hara T. (2010) CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment. *PLoS ONE*, 5(4): e10321. 査読有

③ Tanegashima K., Suzuki K., Nakayama Y., Hara T. (2010) Antibody-assisted enhancement of biological activities of CXCL14 in human monocytic leukemia-derived THP-1 cells and high fat diet-induced obese mice. *Exp Cell Res*, 316(7): 1263-1270. 査読有

④ 原孝彦、種子島幸祐、岡本土毅、中山由紀、箕越靖彦 (2010) ケモカイン CXCL14 を介した摂食と糖代謝の調節「自律神経」47: 248-251. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

① 中山由紀、猿渡麻由 筋再生促進候補因子 RAMP の結合分子の同定 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 11-16 日 パシフィコ横浜(神奈川)

② 鈴木健司、種子島幸祐、中山由紀、重永章、長澤丘司、大高章、森正明、原孝彦 CXCL14 受容体を構成する G タンパク共役型受容体の同定 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 11-16 日 パシフィコ横浜(神奈川)

③ 植村彩乃、中山由紀、江頭恒、安部眞一 マウスセルトリ細胞におけるレチノイン酸を介したニューレギュリン発現機構の解析 第 35 回比較内分泌学会、2010 年 11 月 18-20 日、静岡県コンベンションアーツセンター(静岡)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 由紀 (NAKAYAMA YUKI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

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：