

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300144

研究課題名(和文)筋再生と筋肥大・心肥大を担う筋原線維形成のシグナル伝達機構と分子機構の解明

研究課題名(英文) Signaling and molecular mechanisms of myofibrillogenesis participating in muscle regeneration and muscle and cardiac hypertrophy

研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Takeshi)

千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30194038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋原線維のアクチン線維形成のシグナル伝達機構と分子機構を解明することを目的とした。心筋筋原線維においては、nebulinにN-WASPが結合し、この複合体によりZ帯からアクチン線維が形成されることが明らかになった。またこのようにして形成されたアクチン線維の伸長に、Lmod2がかかわっていることが示唆された。さらにIGF-1シグナリングにより活性化されたN-WASPを介するアクチン線維形成が、病理的な心肥大を抑制し、正常な心機能の維持に働いていることが示された。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to elucidate signaling and molecular mechanisms of myofibrillar actin filament formation. We found that N-WASP bound to the SH3 domain of nebulin (Nebt) in the Z bands of cardiac myofibrils. The Nebt-N-WASP complex nucleated actin to form actin filaments from the Z-bands. Furthermore, Lmod2 bound to N-terminal region of Nebt and seemed to extend short actin filaments preformed by the Nebt-N-WASP complex. GSK-3beta phosphorylated Nebt C-terminal region, N-WASP, and Lmod2, possibly resulting in their inactivation or degradation. Transverse aortic constriction caused pathological cardiac hypertrophy, fibrosis, and deterioration of cardiac function in mice. Administration of IGF-1 to mice ameliorated these symptoms, whereas that of an N-WASP inhibitor worsened them. Thus, actin filament formation induced by N-WASP activated by IGF-1 signaling is required for normal cardiac functions by interfering with pathological cardiac phenotypes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：シグナル伝達 IGF-1シグナリング 筋原線維 アクチン線維 N-WASP サルコメア蛋白質 筋疾患 心肥大

1. 研究開始当初の背景

骨格筋や心筋の収縮は生存に不可欠であり、これらの収縮を担う筋原線維の形成異常は、筋疾患や心筋症につながる。また筋原線維は、おもに長さ約 1 μm のアクチン線維と約 1.6 μm のミオシン線維から成り、最も整然とした細胞内構造の一つである。筋原線維形成の分子機構については、これまでに多くの研究者が取り組んできたが、ほとんど不明であった。

インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) は筋再生や筋肥大・心肥大を誘導する作用をもっている。筋再生や筋肥大・心肥大においては筋原線維形成が不可欠である。そこで私たちは IGF-1 による筋肥大の過程で起こる筋原線維形成に着目し、次のようなシグナル伝達機構と分子機構により、骨格筋筋原線維のアクチン線維が形成されることを明らかにした (Takano et al., *Science* 2010)。IGF-1 により活性化されたホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K)-Akt シグナリングにより GSK-3 β が阻害される。その結果、GSK-3 β による筋原線維蛋白質 nebulin (Neb) のリン酸化が起こらない。非リン酸化 Neb の C 末端の SH3 ドメインに N-WASP が結合し、N-WASP が筋原線維の Z 帯に局在化する。この Neb-N-WASP 複合体によりアクチン重合核が形成され、Z 帯から Neb (長さ約 1 μm) に沿ってアクチンが重合して、約 1 μm の長さのアクチン線維が形成される。またこのアクチン線維形成が、さらに筋再生や筋肥大に必要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

上述のように、骨格筋筋原線維のアクチン線維形成は IGF-1-PI3K-Akt シグナリングにより形成された Neb-N-WASP 複合体によりもたらされることをこれまでに解明した。一方、心筋には Neb は存在せず、代わりに長さがわずかに約 0.15 μm の nebulette (Nebt) が存在する。それにもかかわらず、心筋筋原線維のアクチン線維の長さも、骨格筋の場合と同様に約 1 μm である。そこで本研究ではまず、心筋筋原線維のアクチン線維形成のシグナル伝達機構と分子機構を解明することを目的とした。

ヒトでは *NEB* 遺伝子の突然変異により先天性筋疾患ネマリンミオパチー (NM) が発症する。これらの突然変異の中では、特に SH3 ドメインを含む C 末端側の欠損につながるものが多い。しかし NM の発症につながる分子機構は不明である。そこで Neb C 末端の SH3 ドメインの機能的な役割と NM の発症との関係を明らかにするために、SH3 ドメインを欠損させた *Neb Δ SH3* ノックイン (KI) マウスの解析を行った。

また *NEBT* 遺伝子の突然変異により拡張型心筋症 (DCM) が発症する。そこでさらに、マウスにおける心筋筋原線維のアクチン線維形成と心筋症や心機能との関係を明らか

にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫蛍光顕微鏡法： 生後 6-9 週の ICR マウスを 48 時間絶食させ、0.1 $\mu\text{g/g}$ 体重の IGF-1 を尾静脈から投与した。還流固定した後に、心臓を摘出して、左心室心筋の凍結切片を作成した。N-WASP と Lmod2 の局在を免疫蛍光染色により共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

(2) 免疫共沈アッセイと pull-down アッセイ： COS-1 細胞に Myc-Nebt とその変異体および EGFP-N-WASP とその変異体を、トランスフェクションにより発現させた。細胞を可溶化して、anti-Myc 抗体または anti-GFP 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈した N-WASP または Nebt をイムノブロッティングにより検出した。COS-1 細胞に EGFP-Lmod2 または mOrange2-Nebt とその変異体を、トランスフェクションにより発現させた。Baculovirus の系で発現させた GST-Nebt または GST-Lmod2 を用いて、結合した Lmod2 または Nebt を pull-down アッセイにより解析した。

(3) アクチン重合アッセイ： Baculovirus の系で発現させた GST-Nebt と GST-N-WASP の GST-tag を、PreScission protease で切断し除去した。これらの蛋白質を pyrene 標識 G-アクチンに加えて、アクチン重合を分光蛍光光度計で解析した。

(4) In vitro キナーゼアッセイ： 上記のように、baculovirus の系で発現させ GST-tag を除去した蛋白質に、GSK-3 β を加え、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で反応させた。リン酸化をオートラジオグラフィーにより検出した。

(5) 心筋症と心機能の解析： ICR マウスに大動脈縮窄術 (TAC) を施して、左心室に圧負荷をかけた。これらのマウスに IGF-1 または N-WASP 阻害剤の wiskostatin を投与した。4 週間後に心肥大の状態、線維化、および左心室から単離した心筋細胞の肥大を解析した。また心臓カテーテルを用いて、左心室の圧と容積を解析した。

4. 研究成果

(1) 心筋筋原線維のアクチン線維形成のシグナル伝達機構と分子機構

骨格筋の筋原線維においては、IGF-1 によって活性化された PI3K-Akt シグナリングによる GSK-3 β の阻害を通して、N-WASP が Neb C 末端の SH3 ドメインに結合した。この Neb-N-WASP 複合体によりアクチン重合核が形成され、Z 帯から Neb に沿ってアクチンが重合して、約 1 μm の長さのアクチン線維が形成されることを明らかにした。そこでさらに、依然として不明である心筋筋原線維のアクチン線維形成の分子機構の解明に取り組んだ。心筋筋原線維では骨格筋の場合とは異なり、N-WASP は IGF-1 刺激の有無にかかわらず、心筋筋原線維の Z 帯

に恒常的に局在していた。この N-WASP の Z 帯への局在は、IGF-1 刺激に非依存的に Nebt C 末端に結合することによるものであることが、pull-down アッセイと免疫共沈アッセイにより示された。またこの結合は、N-WASP の Pro-rich 領域と Nebt の SH3 ドメインの特異的な結合によるものであった。Nebt にはアクチン重合を促進する作用があったが、さらに N-WASP が共存すると顕著なアクチン重合が起こることが、pyrene-アクチン重合アッセイにより示された。すなわち Nebt と N-WASP は共同してアクチン重合を促進することが明らかになった。また電気穿孔法によりマウス心筋に EGFP-アクチンを発現させると、EGFP-アクチンはまず Z 帯に取り込まれ、Z 帯から伸長することが示された。したがって Nebt-N-WASP 複合体が Z 帯でアクチン重合核を形成し、続いて Z 帯から Nebt に沿ってアクチンが伸長し、長さ約 0.15 μm のアクチン線維が形成されると考えられる (図 1)。

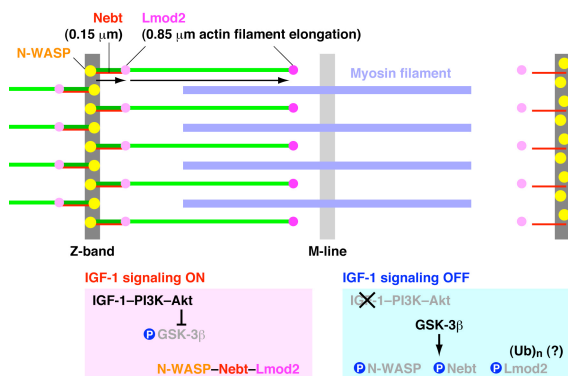


図 1 心筋筋原線維のアクチン線維形成の分子機構とシグナル伝達機構

しかし心筋筋原線維のアクチン線維の長さは、骨格筋の場合と同様に約 1 μm である。そこで Nebt-N-WASP 複合体により形成された短いアクチン線維を伸長させる機構を明らかにするために、心筋培養細胞においてアクチン重合核形成因子またはアクチン伸長因子として機能することが報告されている leiomodulin 2 (Lmod2) に着目した。Lmod2 は Nebt に結合することが、pull-down アッセイにより示された。しかし N 末端側のアクチン結合モジュール 1-3 を欠損させた Nebt と Lmod2 との結合は低下したことから、Lmod2 は Nebt N 末端側に結合すると考えられる。また絶食させたマウスの心筋筋原線維では、Lmod2 は Z 帯付近に局在していたが、マウスに IGF-1 を投与すると、Lmod2 はさらに 1 μm のアクチン線維の先端にも局在化するようになった。これらの結果から、Nebt の N 末端側に結合した Lmod2 は、IGF-1 シグナリングによりアクチン線維を伸長させて、1 μm のアクチン線維を形成することが示唆された (図 1)。一方、骨格筋のアクチン線維の長さは 1.1-1.3 μm (骨格筋のタイプ

により異なる) であり、約 1 μm の Neb よりも長い。上記の結果を考慮すると、骨格筋においては、Neb-N-WASP 複合体により形成された約 1 μm のアクチン線維の先端 0.1-0.3 μm の伸長を、Lmod2 が担っている可能性が考えられる。

さらに Neb C 末端は GSK-3 β によりリン酸化されたが、Nebt C 末端、N-WASP、Lmod2 も GSK-3 β により顕著にリン酸化された。Lmod2 には GSK-3 β によりリン酸化されると考えられるアミノ酸が複数存在するが、これらのリン酸化のプライミングキナーゼとして、CK2, CDK1, CaMKII が働いていることが示された。Neb C 末端は GSK-3 β によりリン酸化されると N-WASP と結合できなくなる。したがって Nebt C 末端、N-WASP、Lmod2 も GSK-3 β によりリン酸化されると、機能が抑制されるか、またはポリユビキチン化されてプロテアソームで分解される可能性が考えられる。しかし IGF-1 が作用すると、PI3K-Akt シグナリングを介した GSK-3 β のリン酸化による阻害を通して、Nebt-N-WASP および Nebt-Lmod2 が活性化や安定化するようになり、アクチン線維形成が起こると考えられる (図 1)。

(2) Neb C 末端 SH3 ドメインの機能的な役割と筋疾患との関係

ヒトでは *NEB* 遺伝子の突然変異により先天性筋疾患 NM が発症する。また Neb KO マウスの骨格筋では、筋原線維アクチン線維の長さが短く不揃いで、ネマリン小体が形成され、張力が顕著に低下するなどの、NM 様の表現型が現れる。ヒト *NEB* 遺伝子の突然変異の中では、特に N-WASP との結合にかかわる SH3 ドメインを含む C 末端側の欠損につながるものが多い。そこで Neb C 末端の SH3 ドメインの機能的な役割と NM の発症との関係を明らかにするために、SH3 ドメインを欠損させた Neb Δ SH3 KI マウスの解析を行った。これらのマウスでは、一見したところアクチン線維や筋原線維および骨格筋の異常はみられなかった。また N-WASP も Z 帯に局在していた。しかし KI マウスの骨格筋では、伸張性収縮を反復して行った後の等尺性張力が低下していた。すなわち伸張性収縮による筋損傷を受けやすくなっていた (論文 2)。この筋損傷が NM につながる可能性が考えられる。したがってこれらの KI マウスの骨格筋に大きな負荷を長期間にわたってかけた場合には、典型的な NM 様の表現型が現れる可能性が考えられる。

(3) N-WASP を介する筋原線維アクチン線維形成と心疾患・心機能との関係

大動脈縮窄術 (TAC) を施して左心室に圧負荷をかけたマウスの心臓では、病理的な心肥大が起こっており、Masson trichrome 染色で検出される線維化がみられた。さらに

圧・容積比で示される心機能が低下していた。しかし IGF-1 を作用させると、心肥大と線維化が抑制されるとともに、生理的な心筋細胞の肥大がもたらされ、心機能が回復した。一方、N-WASP 阻害剤の wiskostatin を作用させると、心肥大と線維化が促進されるとともに、心筋細胞の肥大が抑制され、心機能が顕著に低下した。したがって、IGF-1 シグナリングにより活性化または安定化された N-WASP を介する筋原線維のアクチン線維形成が、正常な心機能に働いているとともに、心筋細胞の肥大をもたらすと考えられる。

さらに、骨格筋と心筋における N-WASP を介したアクチン線維形成の破綻が、筋疾患や心筋症につながることを実証するために、骨格筋や心筋特異的な誘導性 N-WASP コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製を進めている。既に、floxed N-WASP ヘテロ接合マウスを作製した。これらのヘテロ接合マウスと骨格筋特異的 MCK-Cre-ERT2 トランスジェニック (Tg) マウスおよび心筋特異的 MyHC-Cre-ERT2 Tg マウスを交配させて、それぞれ骨格筋と心筋特異的な誘導性 N-WASP cKO マウスを得る。これらの cKO マウスにおいて、それぞれ NM や DCM の表現型が現れるかどうかを解析する。

(4) 新規のアクチン線維形成機構とそれらの機能

これまでは、N-WASP は Arp2/3 複合体の活性化を介して樹枝状のアクチン線維を形成することが知られていた。しかし私たちの先行研究 (Takano et al., 2010) および本研究により、N-WASP は Neb または Nebt と結合して、アクチン重合核形成因子として機能し、枝分かれのない直鎖状のアクチン線維を形成することが明らかになった。一方、直鎖状のアクチン線維を形成する因子として、mDia などを含む formin ファミリー蛋白質が知られている。私たちは、低分子量 G 蛋白質の RhoD により活性化された mDia3C が、直鎖状のアクチン線維を形成することにより、細胞間シグナル伝達に働く特殊な細胞突起 cytonemes (CyN) の形成を引き起こすことを明らかにした (論文 3)。CyN による細胞間シグナル伝達は、paracrine と juxtacrine を補完する、離れた細胞間でも効率よく働く新たなシグナル伝達の様式である。CyN は多様な細胞外シグナル分子とそれらの受容体を介した細胞間シグナル伝達において、広く働いている可能性が考えられる。いずれの CyN においても RhoD-mDia3C によるアクチン線維形成が働いているのか、それとも各 CyN によって異なったアクチン線維形成機構が働いているのかを解明することが重要である。

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 4 件)

- (1) Watanabe-Takano, H., Takano, K., Sakamoto, A., Matsumoto, K., Tokuhisa, T., Endo, T.*, and Hatano M.*: DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: in press (2014). (査読有)
* Corresponding authors
<http://www.pnas.org/>
- (2) Yamamoto, D. L., Vitiello, C., Zhang, J., Gokhin, D. S., Castaldi, A., Coulis, G., Piaser, F., Filomena, M. C., Eggenhuizen, P. J., Kunderfranco, P., Camerini, S., Takano, K., Endo, T., Crescenzi, M., Luther, P., Lieber, R. L., Chen, J., and Bang, M.-L.: The nebulin SH3 domain is dispensable for normal skeletal muscle structure but is required for effective active load bearing in mouse. *J. Cell Sci.* 126: 5477-5489 (2013). (査読有)
DOI: 10.1242/jcs
- (3) Koizumi, K., Takano, K., Kaneyasu, A., Watanabe-Takano, H., Tokuda, E., Abe, T., Watanabe, N., Takenawa, T., and Endo, T.: RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Mol. Biol. Cell* 23: 4647-4661 (2012). (査読有)
DOI: 10.1091/mbc
- (4) Mayer, S. I., Müller, I., Mannebach, S., Endo, T., and Thiel, G.: Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J. Biol. Chem.* 286: 10084-10096 (2011). (査読有)
DOI: 10.1074/jbc

[学会発表] (計 17 件)

うち招待講演

- (1) 遠藤 剛, 高野和儀: 筋収縮および細胞間・細胞内シグナル伝達を担うアクチン線維の形成機構. 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム. (2013.9.11) パシフィコ横浜 (横浜市).
- (2) Takano, K., Endo T.: Nebulette and N-WASP participate in cardiac myofibrillar actin filament formation and cardiomyocyte hypertrophy. 第 65 回日本細胞生物学会大会シンポジウム. (2013.6.21) ウィンクあいち (名古屋市).
- (3) 遠藤 剛: IGF-1 による筋再生・筋肥大の分子機構とその破綻による筋疾患. New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders. (2012.7.14) 富士ソフト

アキバプラザ（東京）。

- (4) 遠藤 剛, 高野和儀: 筋収縮と筋再生・筋肥大を担う筋原線維のアクチン線維形成機構. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム. (2011.9.21) 国立京都国際会館 (京都市)。

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) 遠藤 剛: IGF-1 シグナリングによる筋形成とその破綻による筋疾患. 実験医学増刊号「シグナル伝達研究最前線 2012」(井上純一郎, 武川睦寛, 徳永文稔, 今井浩三 編) 羊土社. (2012) pp. 148–156.
(2) 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 遠藤 剛: Nebulin と N-WASP の複合体が IGF-1 による筋原線維のアクチン線維形成を担う. 実験医学 Vol. 29, No. 8. 羊土社. (2011) pp. 1273–1276.

〔その他〕

ホームページ

<http://life.s.chiba-u.jp/telab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 剛 (ENDO, Takeshi)

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 30194038

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高野 和儀 (TAKANO, Kazunori)

千葉大学・大学院融合科学研究科・助教

研究者番号: 60466860

高野 晴子 (TAKANO, Haruko)

千葉大学・大学院医学研究院・日本学術

振興会特別研究員 (PD)

研究者番号: 40532891