

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500470

研究課題名(和文)小胞体タンパク質ミツグミン56の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of MG56: sarcoplasmic reticulum-resident protein

研究代表者

西 美幸(Nishi, Miyuki)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・准教授

研究者番号：60183894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体タンパク質MG56はHHATL(Hedgehog acyltransferase-like)とも呼ばれ、発現は成獣マウスでは骨格筋、心筋に、発生学的には生後1週目から爆発的に上昇し維持される。MG56はヘッジホッグタンパク質パルミチン酸転移酵素と相同性が高いので脂肪酸転移酵素活性の有無を検討したが検出することはできなかった。

MG56ノックアウトマウスは正常に生まれ7日までは他の遺伝子型マウスと変わらず発育するが、その後は体重増加がなく2週以内に死亡する。死因としてミルク欠乏による飢餓が考えられ、骨格筋で重篤なERストレスの発症を見出し、MG56が筋成熟過程に必須であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：Mitsugumin 56 (MG56), also known as the membrane-bound O-acyl-transferase family member hedgehog acyltransferase-like, was identified as a new sarcoplasmic reticulum component in striated muscle. Mg56-knockout mice grew normally for a week after birth, but shortly thereafter exhibited a suckling defect and died under starvation conditions. In the knockout skeletal muscle, regular contractile features were largely preserved, but sarcoplasmic reticulum elements swelled and further developed enormous vacuoles. In parallel, the unfolded protein response was severely activated in the knockout muscle, and presumably disrupted muscle development leading to the suckling failure. Therefore, MG56 seems essential for postnatal skeletal muscle maturation.

研究分野：生化学

キーワード：骨格筋 カルシウム 小胞体

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の興奮-収縮連関に関係するタンパク質はまだ全てが分かっていない。そのため研究代表者が属している研究室では、興奮-収縮連関に重要な役割をはたしている筋小胞体終末部から機能不明なタンパク質を同定し、その機能を解明することを長年行ってきた。これまでに新規同定したタンパク質は、MG29, ジャンクトフィリン、MG53, TRIC などがある。今回新たに MG56/HHATL を見出しその解析を行なった。

2. 研究の目的

カルシウムは、細胞内濃度が厳密に制御され様々な生物現象に重要な役割を果たしている。骨格筋のカルシウム動態を研究し解明することで、骨格筋だけでなく細胞不変的カルシウムシグナリングの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発現パターンの解析

組織学的、発生学的に MG56 の発現パターンを調べた。

(2) MG56 ノックアウト(KO)マウスを作製し、その表現型から MG56 の機能を解析した。

(3) 組換え MG56 タンパク質をコムギ無細胞系で合成、培養細胞への強制発現で調整し、候補と考えられるタンパク質へのパルミチン酸転移活性を検討した。

4. 研究成果

(1) 発現パターンの解析

MG56 は、成獣マウスでは骨格筋、心筋に高発現していたが機能は不明なタンパク質である。発生学的には、生後1週あたりから発現が確認され以後爆発的に増加しそのまま維持される。従って、骨格筋や心臓の変化を中心に KO マウスの解析を実施した。

(2) MG56 KO マウスの解析: MG56KO マウスは正常に生まれ1週間あたりまでは他の遺伝子型と変わらず発育する。しかしながら1週を過ぎる頃から体重増加がなくなり2週経過できずに死亡する。

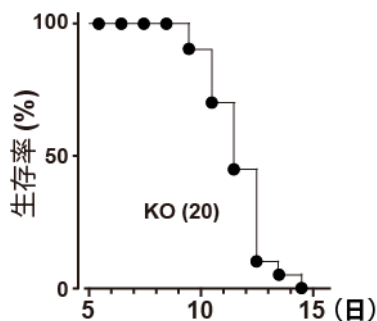


図1 KO マウスの生後生存率

死因としては、胃のミルク量が7日目あたりから減少し、11日目以降にはほとんどみら

れなくなることから飢餓による死、が考えられた。この考えを支持するデータとして血中のグルコース濃度の減少、トリグリセライド

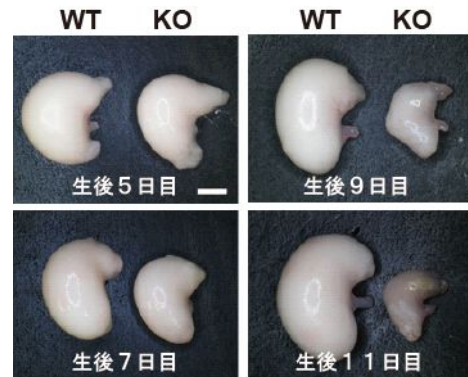


図2 野生型(WT)とKOマウスの胃の減少、ケトン体の上昇が確認された。

組織学的所見を調べてみると、驚いたことに心臓は生後9日目でも目立った所見が見られないのに対して、骨格筋では5日目で既に空胞編成を含む異常所見が認められた。従って以後骨格筋を中心に解析を行なった。生後9日目の骨格筋をジーンチップ解析し、ERストレス関連遺伝子の発現上昇を見出し、RT-PCRにより、同様の結果を得た。主要なタンパク質に関してはウエスタンブロットをおこないタンパク質レベルでの発現上昇やリン酸化の増加を確認した。

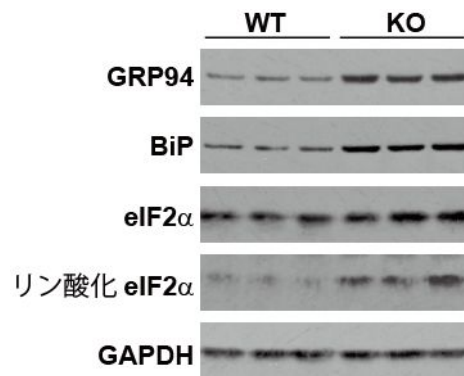


図3 ER ストレス関連タンパク質の発現量、リン酸化の増加

以上のことから、MG56 は生後筋肉が成熟していく過程で重要な役割を果たしており、その欠損は生存に不可欠である、ということを見出した。

(3) 組換え MG56 タンパク質による酵素活性の検討

MG56 タンパク質をコムギ無細胞系、培養細胞で発現させその酵素活性を検討した。放射能活性のあるパルミチン酸の取り込みを、同じくコムギ無細胞系で合成したリアノジン受容体、ジャンクトフィリン、カルセクエス

トリンタンパク質について調べた。しかしながらどのタンパク質へもパルミチン酸の取り込みを確認できなかった。今後は、1. パルミチン酸以外の脂肪酸、2. リアノジン受容体、ジャンクトフィリン、カルセクエストリン以外のタンパク質、についても検討をしたいと考えている。

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 8件) 全て査読あり

1. Van B, Nishi M, Komazaki S, Ichimura A, Kakizawa S, Nakanaga K, Aoki J, Park KH, Ma J, Ueyama T, Ogata T, Maruyama N, Takeshima H. Mitsugumin 56 (hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation. *FEBS Lett.* **589**, 1095-104. 2015 doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.028.
2. TRIM72 is required for effective repair of alveolar epithelial cell wounding. Kim SC, Kellett T, Wang S, Nishi M, Nagre N, Zhou B, Flodby P, Shilo K, Ghadiali SN, Takeshima H, Hubmayr RD, Zhao X. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014 **307**, L449-59. doi: 10.1152/ajplung.00172.2014.
3. Jia Y, Chen K, Lin P, Lieber G, Nishi M, Yan R, Wang Z, Yao Y, Li Y, Whitson BA, Duann P, Li H, Zhou X, Zhu H, Takeshima H, Hunter JC, McLeod RL, Weisleder N, Zeng C, Ma J. Treatment of acute lung injury by targeting MG53-mediated cell membrane repair. *Nat Commun.* 2014 Jul 18;5:4387. doi: 10.1038/ncomms5387
4. Mosca B, Delbono O, Laura Messi M, Bergamelli L, Wang ZM, Vukcevic M, Lopez R, Treves S, Nishi M, Takeshima H, Paolini C, Martini M, Rispoli G, Protasi F, Zorzato F. Enhanced dihydropyridine receptor calcium channel activity restores muscle strength in JP45/CASQ1 double knockout mice. *Nat Commun.* 2013 Feb 26;4:1541. doi:

10.1038/ncomms2496.

5. Venturi, E., Matyjaszekewicz A. Pitt, S.J., Tsanrva-Atanasova K., Nishi, M., Yamazaki D., Takeshima, H. & Sitsapesan R. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. *Pflugers Arch* **465**, 1135-1148, 2013 DOI 10.1007/s00424-013-1251-y
6. Delbono, O., Messi M. L., Wang, Z., Treves, S., Mosca, B., Bergamelli, L., Nishi, M., Takeshima, H., Shi H., Xue B. & Zorzato, F. Endogenously determined restriction of food intake overcomes excitation-contraction uncoupling in JP45KO mice with aging. *Exp. Gerontol.* **4**, 304-316, 2012. doi: 10.1016/j.exger.2012.01.004.
7. Weisleder, N., Takizawa, N., Y., Lin, P., Wang, X., Cao, C., Zhang, Y., Tan, T., Ferrante, C., Zhu, H., Chen, PJ., Yan, R., Sterling, M., Zhao, X., Hwang, M., Takeshima, M., Cai, C., Cheng, H., Takeshima, H., Xiao, RP & Ma, J. Recombinant MG53 protein modulates therapeutic cell membrane repair in treatment of muscular dystrophy. *Sc. Transl. Med.* **4**, 1-10, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003921
8. Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta, H., Van, Bo., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A., & Takeshima, H. TRIM50 regulates ventricular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 37523-33531, 2012. doi:10.1074/jbc.M112.370551

[学会発表](計 3件)

Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Van, Bo., Ma, J., Sawaguchi, A & Takeshima, H. TRIM50 regulates ventricular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. Biophysical Society 57th annual meeting, 2013年2月2日~2月6日 Philadelphia, USA

Van, Bo., Nishi, M., Komazaki, S., Park, KH., Yamazaki, D., Ma, J. & Takeshima, H. The MBOAT family protein Mitsugumin 56 contributes to postnatal maturation in the

muscle sarcoplasmic reticulum.
Biophysical Society 58th annual meeting,
2014年2月15日~2月19日
San Francisco, USA

Nishi, M., Van, Bo., Komazaki, S.,
Yamazaki, D., Park, KH., Ma, J. & Takeshima,
H. Mitsugumin 56 is an MBOAT family member
and contributes to postnatal muscle
maturation. Biophysical Society 59th
annual meeting, 2015年2月7日~2月11
日 Baltimore, USA

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 美幸 (NISHI, Miyuki)
京都大学・学内共同利用施設等・准教授
研究者番号：60183894

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：