

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770118

研究課題名(和文) 生理的な神経支配下での骨格筋アクチン線維形成の動態制御機構

研究課題名(英文) Dynamic regulation of actin filament formation in the innervated skeletal muscle

研究代表者

高野 和儀 (Takano, Kazunori)

千葉大学・融合科学研究科(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) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋は筋収縮により呼吸や運動、心臓の拍動など生命の維持に必須の役割を果たしている。しかし、成長などの過程において筋肥大を制御する分子機構はこれまで不明であった。本研究では、除神経を施した骨格筋と心筋において、骨格筋とは異なる機構によってN-WASPを介したアクチン重合が制御されている可能性を見いだした。また、圧負荷条件下の心筋肥大においてN-WASPの活性化が心機能の維持に必須の役割を果たしていることを解明した。したがって、骨格筋とは異なる未知の機構により心筋肥大においてN-WASPの活性は調節されており、またこの機構は生理的な心機能の維持に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Striated muscle plays a fundamental role in maintenance of life depending on breathing, exercise and beating of heart by its contractile activity. However, the molecular mechanism how muscle hypertrophy is regulated during growth or pathological processes remains obscure. In denervated skeletal muscle and heart in vivo, this study showed that the N-WASP-mediated actin polymerization activity might be controlled by different mechanisms from that in intact skeletal muscle. In addition, the activity of N-WASP is indispensable for maintenance of heart function during cardiac hypertrophy by pressure-overload. Taken together, these results imply that the regulation of N-WASP activity may be controlled by unknown mechanisms during cardiac hypertrophy and is involved in the maintenance of physiological heart function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 筋原線維形成 アクチン重合 神経支配 筋肥大

1. 研究開始当初の背景

骨格筋や心筋といった横紋筋は、呼吸や嚥下、運動、心臓の拍動など生命の維持に必須な役割を果たしている。横紋筋の筋収縮を担う筋原線維は、アクチン線維とミオシン線維が整然と配列した構造であり、これまでに多くの構成因子が同定されている。一方、横紋筋は筋原線維が密に存在しているため、IGF-1による筋肥大では筋原線維の形成が不可欠である。しかしこれまでに筋肥大における筋原線維を形成する機構は不明であった。私たちはこれまでに、IGF-1 - PI3 キナーゼ (PI3K)-Akt シグナリングの下流で、N-WASP は Pro-rich ドメインを介して nebulin の SH3 ドメインに結合して筋原線維の Z 帯に局在し、この N-WASP と nebulin が協調して Z 帯からアクチン線維形成を誘導することを *in vivo* において解明した。さらに、筋原線維のアクチン線維形成が骨格筋肥大に必要であることを生理的条件下において解明した (Takano, et al. (2010) *Science*, 330: 1536-1540.)。

一方、骨格筋における筋原線維のアクチン線維は約 1 mm の長さを維持している。このため、筋肥大において新規に形成したアクチン線維にはその長さを揃える機構が必要である。筋原線維において leiomod2 (Lmod2) がアクチン線維の先端に局在することから、その長さを調節する可能性が考えられる (Tsukada, et al. (2010) *J. Cell Sci.*, 123: 3136-3145.)。そこで、Lmod2 による未知の機構が、アクチン線維の長さを揃える可能性について検討するため、申請者はまず、骨格筋に高発現している Lmod2 が IGF-1 シグナルの下流で制御されるかを調べた。Lmod2 タンパク質のリン酸化部位の予測を行った結果、GSK-3 β によりリン酸化を受ける Ser/Thr 残基が多数存在しており、*in vitro* において実際にリン酸化された。したがって、Lmod2 が nebulin と同様に、IGF-1 の下流において PI3K-Akt-GSK-3 β の経路により制御される可能性が考えられる。すなわち、IGF-1 の下流において、筋原線維アクチンの重合と長さの調節という一連の過程が制御されると考えられた。そこで、申請者は筋肥大におけるアクチン動態を可視化するために、骨格筋の初代培養系を用いてライブイメージングをおこなった。しかし、骨格筋の初代培養細胞系を用いた場合は、IGF-1 によっても N-WASP が Z 帯に局在せず、過去の報告と一致してアクチンは Z 帯から重合しなかった (Littlefield, et al. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3: 544-551.)。したがって、純粋な骨格筋の初代培養細胞系は、

生理的な IGF-1 による筋原線維形成の機構を再現できない。このことは生理的な筋原線維形成の制御機構を解明する上で非常に重要な問題である。

そこで申請者は、マウス骨格筋を用いた除神経モデルにおいて IGF-1 シグナリングが抑制されることに着目した。その根拠として、除神経により IGF-1 受容体の下流において IRS-1 のリン酸化が抑えられた結果、Akt 活性と筋肥大の抑制がおこる (Guth, et al. (1968) *Physiol. Rev.*, 48: 645-687., Bertelli, et al. (2003) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284: E679-E687., Xhao, et al. (2008) *Muscle Nerve*, 37: 42-49.)。逆に、活性型 Akt 変異体を骨格筋に発現させた場合は、除神経による筋萎縮が抑制された結果、筋肥大がおこることが報告されている (Moresi, et al. (2010) *Cell*, 143: 35-45.; Bodine, et al. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3: 1014-1019.)。すなわち、純粋な骨格筋の初代培養系では、神経支配がないために IGF-1-Akt 経路が阻害された結果、筋肥大が抑制されると考えられた。実際に、筋再生過程において神経支配されていない幼若な筋管細胞では N-WASP は細胞質に分散して筋原線維に局在せず、筋肥大の過程において N-WASP が Z 帯に局在する (Takano, et al. (2010) *Science*, 330: 1536-1540.)。この結果は、神経支配が生理的にも筋肥大の引き金になることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、生理的な筋肥大を神経の制御下で再現し、筋原線維のアクチン動態を可視化することにより、IGF-1 によるアクチン線維の形成機構を包括的に解明する。まず、筋原線維のアクチン線維形成における神経支配の必要性を生体内と初代培養系において明らかにし、この原理に基づいて、筋肥大とそれとともに筋原線維形成を骨格筋と神経細胞の共培養系により再現する。

さらに、神経の制御下で筋原線維形成のアクチン線維形成におけるアクチン動態をライブイメージングにより明らかにし、筋原線維のアクチン線維の重合と長さの調節における N-WASP-nebulin と Lmod2 の役割を解明する。

また、Akt 活性は神経の制御下での骨格筋肥大における筋原線維のアクチン線維形成に必要な十分な役割を果たすかを解明する。

これらの解析により、神経の制御下での生理的な筋肥大において、筋原線維アクチン重合と長さの調節という一連のアクチン動態

を N-WASP-nebulin と Lmod2 が協調して制御することを解明する。

3. 研究の方法

(マウス骨格筋の除神経)

マウス前脛骨筋 (TA 筋) を支配している神経の支配を骨格筋から除くために、座骨神経の切除を行った。除神経を誘導してから経時的にサンプリングを行い、凍結切片および組織抽出物を得た。

(タンパク質リン酸化解析)

リン酸化タンパク質の解析において上記の組織抽出物や凍結切片に対し、抗リン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色を行った。

(凍結切片の免疫蛍光染色)

除神経を施したマウス骨格筋およびマウス心筋は 3.7%ホルムアルデヒド溶液により固定した後に、5- μm 厚の凍結切片を作製した。得られた切片は特異的抗体およびその 2 次抗体によりタンパク質の局在をラベルし、共焦点レーザー顕微鏡により検出した。

(マウス骨格筋・心筋への遺伝子導入)

マウス骨格筋へはエレクトロポレーション法により遺伝子導入を行った。一方、心筋への遺伝子導入はイソフルランによる麻酔下かつ人工呼吸器による呼吸制御下において開胸手術を行い、心筋壁にアデノ随伴ウイルス(AAV)を注入することにより行った。

(マウス大動脈の結紮術)

マウス大動脈の結紮では上記のとおり開胸し、上行大動脈を 27G 針の太さとなるように 7-0 ナイロン糸で結紮した。結紮後は速やかに閉胸し、心肥大が誘導されるまでの期間、通常に飼育した。大動脈結紮による心機能の低下は心カテテル電極による左心室 P-V ループにより評価した。

4. 研究成果

まず、マウス骨格筋の除神経を坐骨神経切除により行った。凍結切片を作製後、骨格筋の断面積を測定した結果、除神経により骨格筋の萎縮が経時的に起こっている様子を認めた。また、Akt のリン酸化状態についても検討したところ、Akt の局在は筋原線維 Z 帯から変わることはなかったが、除神経を施した骨格筋において Akt のリン酸化が抑制されていることを見いだした。しかしながら、N-WASP の局在は依然として Z 帯に検出される筋線維も検出されたことから、神経支配は IGF-1 シグナルだけでなく、N-WASP の局在の制御にも独立に影響を与える可能性が考

えられた。このことは、活性型 Akt のみを過剰発現させた除神経筋において生理的レベルの筋肥大にまでは回復しないことから裏付けられる (Moresi, et al. (2010) *Cell*, 143: 35-45., Bodine, et al. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3: 1014-1019.)。この点について詳細な解析のために、除神経筋に対してエレクトロポレーションにより遺伝子導入を試みたが、生理的な骨格筋の条件では除神経筋が壊死することが判明した。また、生理的条件を反映させるための骨格筋-神経共培養系の確立には至らず、共培養系のどちらの細胞も *in vivo* でみられるような生理的な状態まで発達させることは出来なかった。これらの問題点は今後条件を改善して解決するように努めていく。

そこで、神経支配に依らない N-WASP の Z 帯への局在制御を明らかにするため、不随意筋でもある心筋において、N-WASP の局在を確認した。心筋においても N-WASP は筋原線維 Z 帯に局在するが、IGF-1 刺激や大動脈結紮における心肥大を誘導しても Z 帯に局在した。N-WASP の Z 帯への局在化は AAV を用いて EGFP-N-WASP(FL)を発現させた時も同様に観察された。また、N-WASP は心筋特異的 nebulin ファミリーである nebulin と結合することが明らかになった。心筋において N-WASP の局在が変化しないことを裏付けるように、N-WASP は IGF-1 に依存することなく、nebulin と恒常的に結合した。両者の結合様式は N-WASP-nebulin の結合と同様に Pro rich 領域と SH3 ドメインの直接的な結合であった。さらに、両者の結合により試験管内においてアクチン重合を引き起こした。しかしながら、AAV を用いて心臓に EGFP-アクチンを発現させたところ、アクチンは Z 帯に取り込まれたものの、少なくとも 3 日間の生理的条件では Z 帯から伸長しなかった。また、アクチン線維の先端をキャップする Lmod2 に対する抗体を作製し、心筋においてこれを染色したところ、Lmod2 も主に Z 帯の両脇に局在していた。したがって、心筋における N-WASP-nebulin によるアクチン重合の活性化と Lmod2 によるその協調作用は生理的条件下では抑制性のシグナリングにより制御される可能性が考えられた。

一方、N-WASP が心筋においてどのような役割を果たしているかを検討する目的で、N-WASP 阻害剤である wiskostatin を作用させた。その結果、wiskostatin 存在下では大動脈結紮後の心機能の悪化が促進された。したがって、除神経骨格筋および心筋の定常状態における N-WASP 依存的なアクチン線維形成

は抑制されているものの、N-WASP-nebuletteの活性は心肥大時の心機能の維持に必須の役割を果たす可能性が示唆された。

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 2 件)

- (1) 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. K., Lieber, R. L., Chen, J., and Bang, M. L. (2013) 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.

Doi: 10.1242/jcs.137026

(査読有り)

- (2) Koizumi K. *, Takano K. *, Kaneyasu A., Watanabe-Takano H., Tokuda E., Abe T., Watanabe N., Takenawa T. and Endo T. (2012) RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Mol. Biol. Cell* 23:4647–4661. * **Equal contribution.**

Doi: 10.1091/mbc.E12-04-0315

(査読有り)

[学会発表](計 7 件)

- (1) 高野和儀, 遠藤剛 N-WASP と nebulette は筋原線維アクチン重合核形成と心肥大にかかわる
第 86 回 日本生化学会大会 ポスター
(パシフィコ横浜, 2013 年 9 月 12 日)
- (2) 高野和儀, 遠藤剛 Nebulette と N-WASP は心筋筋原線維のアクチンフィラメント形成と心肥大にかかわる
第 65 回 日本細胞生物学会大会 シンポジウム (S23 細胞骨格の新しい局面)
(ウインクあいち, 2013 年 6 月 21 日)
- (3) 高野和儀, 遠藤剛 Nebulette と N-WASP は心筋筋原線維のアクチンフィラメント形成と心肥大にかかわる
第 65 回 日本細胞生物学会大会 ポスター
(ウインクあいち, 2013 年 6 月 21 日)

- (4) 高野和儀, 遠藤剛 心筋における筋原線維アクチンの重合核形成と伸長の分子機構

第 85 回 日本生化学会大会 ポスター

(マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 15 日)

- (5) 小泉和久, 高野和儀, 金安顕子, 渡邊-高野晴子, 遠藤剛 FGF により活性化された RhoD は mDia3C を介して cytonemes を形成する

第 85 回 日本生化学会大会 ポスター

(マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 16 日)

- (6) 渡邊善仁, 木本創, 松岡慧, 渡邊-高野晴子, 高野和儀, 遠藤剛 M-Ras は無機リン酸により発現誘導・活性化され細胞外基質の石灰化を引き起こす

第 85 回 日本生化学会大会 ポスター

(マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 16 日)

- (7) 渡邊-高野晴子, 幡野雅彦, 坂本明美, 高野和儀, 徳久剛志, 遠藤剛 Ras-ERK カスケードのアンタゴニスト DA-Raf は肺胞形成を制御している

第 85 回 日本生化学会大会 ポスター

(マリンメッセ福岡, 2012 年 12 月 16 日)

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ

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

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

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

- (2) 研究分担者

()

研究者番号:

- (3) 連携研究者

()

研究者番号: