

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440081

研究課題名(和文) 核骨格による筋肉組織構造形成・維持の機構解明

研究課題名(英文) Analysis of A-type lamin functions in muscular development in Drosophila.

## 研究代表者

古川 和広 (Kazuhiro, Furukawa)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：40229109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトにおいてはラミンの一種であり分化特異的に発現するA-type laminに変異が入ることにより、Hutchinson-Gilford早期老化症やEmery-Dreifuss型筋ジストロフィー(EDMD)を含む多様な遺伝子疾患が引き起こされることが示されている。A-type laminの組織形成における役割を明らかにするため、モデル動物であるショウジョウバエを利用し解析を進めた結果、筋肉組織の腱細胞で著しい構造異常が生じることを見出し、さらに腱細胞内のスペクトラプラキンファミリー細胞骨格タンパク質であるShort stopの核膜周辺での構造が顕著に不安定化していることを特定した。

研究成果の概要(英文)：Functions of A-type lamin were analyzed because of knowing to cause various muscle dystrophies including cardiomyopathy. The loss of the A-type lamin gene in Drosophila resulted in pupal metamorphic lethality caused by tendon defects. In tendon cells lacking lamin C activity, overall cell morphology was affected and organization of the spectraplakin family cytoskeletal protein Short stop which is prominently expressed in tendon cells gradually disintegrated, notably around the nucleus and in a manner correlating well with the degradation of musculature. Furthermore, lamin C null mutants were efficiently rescued by restoring lamin C expression to shortstop-expressing cells, which include tendon cells but exclude skeletal muscle cells. Thus the critical function of A-type lamin C proteins in Drosophila musculature is to maintain proper function and morphology of tendon cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：筋肉

## 1. 研究開始当初の背景

A タイプラミンの遺伝子に変異が入ると、筋ジストロフィーに加え、拡張型心筋症、脂肪異栄養症、および早期老化症など、組織に対応した、Laminopathy (ラミノパシー)と呼ばれる多様なヒト遺伝病が発症することが近年の医学的研究により示されている。しかし、A タイプラミンが多くの細胞に存在する核タンパク質であることから、これまでは主に培養細胞を用いて研究が進められており、それらの研究成果を直接組織形成に反映させることはできず、核にあるA タイプラミンが異なる組織の細胞で、どのように特定の細胞機能を発現させているかは謎のままであった。私たちはこの謎にせまるため、モデル動物であるショウジョウバエで変異体を作成し、組織・個体レベルで研究を進める。

## 2. 研究の目的

A タイプラミンは多細胞動物の分化した細胞の核内に存在する中間径フィラメントタンパク質である。ラミンタンパク質はその重合特性とクロマチン結合機能から、核の構造と情報の両機能を制御していることが既に知られている。最近さらに、“LINC 複合体 (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton complex)” の核内側の受容体 (Nucleoskeleton) であることが示され、核機能だけでなく、細胞質の骨格の構造形成と機能制御にも重要であると考えられるようになりつつある。本研究では、A タイプラミンによる筋肉組織の構造形成と維持の制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエの A タイプラミン遺伝子をノックアウトした変異体 (A タイプラミン null 変異体) また誘導的 A タイプラミン RNAi 変異体を用い、免疫組織学および分子遺伝学的手法を用い解析を行い、タンパク質のドメイン機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1). lamin C タンパク質要求性細胞の同定

A タイプラミン null (LC58) 変異体に見出された筋肉形成異常の標的細胞を明らかにするため、23 種類の GAL4 ドライバーを用いて lamin C タンパク質を人為的に発現させ変異体の異常回復の実験を行うとともに、さらに特定の細胞で lamin C タンパク質の発現を人為的に抑制する RNAi 法を用い野生体の組織形成がどのような異常を生じるかも解析した。その結果、lamin C タンパク質の機能を要求する細胞が筋肉組織内の腱細胞であることを特定した。

### (2). 筋肉組織形成における lamin C の機能解析

腱細胞特異的な *lamC RNAi* (*Stripe/lamC RNAi*) を用いて、筋肉組織で生じている異常を詳細に解析した。腱細胞は筋肉細胞を外骨格である表皮に結合させている。筋肉細胞を緑色蛍光タンパク質 (GFP) で、腱細胞核を赤色蛍光タンパク質 (RFP) で標識し解析した。胚期の筋肉組織形成ではほとんど異常が見られなかったが、孵化後、幼虫の発育とともに腱細胞の配置が乱れ、幼虫後期では規則的な配置がほぼ完全に失われていた。この時期の筋肉組織を高倍率で解析すると、RNAi 体では、野生体腱細胞の核の直線上の配置が失われ、核の形態も潰れたように異常になっていた。さらに、腱細胞全体の形態を、RFP タンパク質を用いて解析すると、野生体の半月状の腱細胞形態が、RNAi 体では著しく伸びたように変形し、また腱細胞が外骨格より剥離していた。LC58 変異体における腱細胞の分化マーカータンパク質の発現には異常は見出されていないので、LC58 変異体に見出された筋肉組織形成の異常は腱細胞の分化異常が原因でなく、筋肉細胞の収縮弛緩による物理的な障害が腱細胞に生じていることが考えられた。

### (3). 腱細胞の核膜および骨格構造の解析

Shot タンパク質は腱細胞で細胞骨格ベルトを形成するだけでなく、核を含む細胞体領域では細い繊維網目状のネットワークを形成していることが報告されている。そこで、核周辺の細胞質の Shot タンパク質の構造を GFP-Shot で、核膜構造を lamin Dm<sub>0</sub> 抗体を用いて解析した。野生体では Shot は、核膜に隣接し層状に分布するとともに、そこから放射状に繊維状のネットワークを細胞質に形成していた。LC58 変異体の幼虫初期では、lamin Dm<sub>0</sub> による核膜構造に異常が見られない細胞でも、Shot の繊維網目状の構造と核膜に隣接する層状構造が異常になっていた。さらに形態がやや歪になった核膜が見られる腱細胞では、Shot による細胞質の繊維網目状の構造と核膜領域での層状構造が明らかに断片化して破壊されている異常が見いだされた。Shot 重合体の可塑性がなくなっているようであった。

これらの結果から、lamin C タンパク質の消失により、幼虫の生育初期の腱細胞で核膜構造に異常が起こる前に細胞質の骨格構造である Shot の構造が異常になっていることが明らかになった。

### (4). 骨格構造形成における shot ドメインの解析

Shot の細胞質ネットワークが不安定化していることを明らかになった。そこで Shot タンパク質の機能ドメインを明らかにする研究を行った。

はじめに選択的スプライシングにより生じる Shot A および C タンパク質を、熱処理により発現が誘導できるシステムを用い細胞内動態を解析した。その結果 Short A および C タンパク質は発現初期に核膜周辺に出現し、細胞質へ繊維状に重合していくことがわかった。このことから Short タンパク質は核膜と選択的に相互作用している可能性が

高まった。そこでチューブリンやカルシウムに結合するドメインや、他の骨格と相互作用すると考えられている plakin または spectrin repeat ドメインと呼ばれる機能ドメインを欠失させた Shot C タンパク質を人為的に発現させ、細胞内での動態を解析した。チューブリン、カルシウム、plakin ドメインを欠失させた Shot C タンパク質は核膜上に沿った強い蓄積と細胞質に繊維状の骨格を形成した。しかし、spectrin repeat を欠いた Shot C タンパク質は核膜および細胞質には分布せず核内に異常に蓄積するようになった。このことから核膜との相互作用は spectrin repeat 周辺のドメインが重要であると考えられた。

(5). その他に、lamin C のドメインシャッフル解析を行い tail ドメインが細胞骨格との相互作用に重要であることも見いだしている。これについてもタンパク質ドメインの特定を進めている。

### 5. 主な発表論文等

(1). Uchino, R., Sugiyama, S., Katagiri, M., Yoshiro, C., Furukawa, K.

Non-farnesylated B-type lamin can tether chromatin inside the nucleus and its chromatin interaction requires the Ig-fold region. Chromosoma. 2016, in press. (査読有)

(2). Kanno, T., Furukawa, K., Horigome, T.; Exploring the phosphoproteome profiles during Xenopus egg activation by calcium stimulation using a fully automated phosphopeptide purification system. J. Biochem., 159, 407-419, 2016 (査読有)

(3). Wada, K., Sato, M., Araki, N., Kumeta, M., Hirai, Y., Takeyasu, K., Furukawa, K., Horigome, T.; Dynamics of WD-repeat containing proteins in SSU processome

components. Biochem Cell Biol. 92, 191-199, 2014 (査読有)

(4). Uchino,R., Nonaka,Y., Horigome,T., Sugiyama,S., Furukawa,K.; Loss of Drosophila A-type lamin C initially causes tendon abnormality including disintegration of cytoskeleton and nuclear lamina in muscular defects. Dev. Biol. , 373, 216-227, 2013 (査読有)

(5). Sato,M., Araki,N., Kumeta,M., Takeyasu,T., Taguchi,T., Asai,T., Furukawa,K., and Horigome,T.; Interaction, mobility, and phosphorylation of human orthologues of WD repeat-containing components of the yeast SSU processome t-UTP sub-complex. Biochem Cell Biol. 91, 466-475, 2013 (査読有)

(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 5件)

〔学会発表〕(計 9件)

〔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  
古川 和広 (Kazuhiro Furukawa)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：40229109

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：