

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860138

研究課題名(和文)骨格筋の形態形成と維持における小胞輸送関連蛋白質VAMP5の機能解析

研究課題名(英文)Role of membrane traffic in the development and maintenance of skeletal muscle.

研究代表者

多鹿 友喜(Tajika, Yuki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90400738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋細胞は、多核の長大な細胞である。この細胞の形態形成や維持に関わる小胞輸送システムを解析する。骨格筋細胞に発現する、小胞輸送関連蛋白質のひとつに着目し、ノックアウトマウスを作成した。遺伝子を欠損したヘテロ接合体やホモ接合体は、死産が多く見られた。骨格筋では、明確な形態異常は見つからなかったが、肺を観察したところ、完全な無気肺もあれば、一部領域が無気肺で、死亡している例が見つかった。さらに、脳では、脳室の閉鎖や拡張といった形態異常が見つかった。通常の解剖作業では見つけにくい形態異常が見つかった。ノックアウトした分子が骨格筋以外の組織で形態形成に関わることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle cells have long, cylindrical shape. Development of the skeletal muscle cells is thought to be regulated by the intracellular membrane traffic, however, the membrane trafficking system in skeletal muscle cells is not fully understood. To gain an insight, I generated the knock-out mice lacking a member of SNARE proteins. The heterozygote and homozygote mice were often died around the birth. Skeletal muscles in mice lacking the molecule of interest seem to be normal. I found morphological defect in respiratory system and nervous system. These findings suggest that a member of SNARE proteins function in the development of respiratory system and nervous system, but not in skeletal muscles.

研究分野：骨格筋の細胞生物学

キーワード：骨格筋 SNARE蛋白質

1. 研究開始当初の背景

骨格筋細胞は、細胞内に筋小胞体、T管系といった特有な内膜系を発達させ、筋原線維による運動を調節している。筋形質膜は一様でなく、神経筋接合部や筋腱結合部といった特殊な領域がある。また、筋形質膜のジストログリカンやインテグリンなどの膜蛋白質は、収縮運動での形質膜損傷を防いでいる。このような骨格筋細胞の形態形成や膜蛋白質のターンオーバーの際に、膜小胞輸送が働いていると考えられるが、それらを解析した報告はない。そこで、私は、骨格筋細胞における膜小胞輸送の全体像を明らかにしようと、SNARE蛋白質のVAMPファミリーに注目し、研究を進めている。

SNARE蛋白質は、膜小胞の繫留と融合を担う蛋白質群である。3つのサブファミリー(膜小胞のVAMPファミリー、ターゲット膜のSyntaxinファミリー、細胞質のSNAP25ファミリー)が複合体を形成し、膜小胞とターゲット膜を引き寄せる。SNARE蛋白質の発現パターンは、細胞種によって異なり、個々のSNARE蛋白質は、細胞内で特定の膜輸送過程に働くと考えられている。

本申請研究で解析するVAMP5は、1998年にESTデータベース上で発見され、クローニングされた(Zeng Q, Mol Biol Cell, 1998)。mRNAが骨格筋と心筋に多く検出されたことから、VAMP5は筋特異的なメンバーと位置づけられた。しかし、これ以降、VAMP5の蛋白質発現や機能を解析した報告はない。なお、VAMPファミリーは、全7種類のメンバーからなる。VAMP1、2、3、7、8に関しては、欠損マウスを使った解析が行われ、神経系、泌尿器系、内分泌系、免疫系などでの機能が知られている(Nystuen AM, Neurogenetics, 2006; Schoch S, Science, 2001; Yang C, Mol Cell Biol, 2001; Sato M, Traffic, 2011; Wang, C, Dev Cell, 2004)。

これまでに私は、VAMP2、3、4、5、7および8が、成熟骨格筋細胞もしくは分化途中の骨格筋細胞に発現することを明らかにし、順次解析をすすめている。VAMP5に関しては、組織分布と細胞内局在を明らかにした。VAMP5蛋白質は、骨格筋および心筋において筋形質膜直下に多く分布することや、骨格筋では筋線維タイプによって発現量が異なり、速筋線維により多いといった特徴を見出した。

さらに、培養筋芽細胞株C2C12細胞を用いて、筋分化初期におけるVAMP5の役割と分布を解

析した。VAMP5の発現は、単核の筋芽細胞ではなく、細胞融合の後、多核の筋管細胞で見られる。RNA干渉法でVAMP5の発現抑制をしても、細胞融合過程には影響しなかった。VAMP5の細胞内分布を二重染色法で解析したところ、VAMP5の一部は、形成途中のT管に分布することや、三つ組を構成する分子(ジヒドロピリジン受容体、リアノジン受容体)と共存することを見出した(未発表)。

これらより、VAMP5は筋分化初期には働かず、成熟骨格筋および筋管細胞以降の分化過程において、筋形質膜の安定性や細胞内膜系の形成に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

VAMP5ノックアウトマウスの作製と解析を計画する。先述の培養細胞では、筋管細胞形成までの筋分化初期しか解析できない。ノックアウトマウスを用いることで、筋分化後期の成熟過程や、成熟骨格筋を解析することができる。VAMP5ノックアウトが、骨格筋細胞の内膜系形成や、筋形質膜の安定性に、どのような影響を及ぼすかを明らかにする。

3. 研究の方法

コンベンショナル・ノックアウトマウスを作出した。国際プロジェクト(International Knockout Mouse Consortium)より、相同組換えをおこしたES細胞クローン、4クローンを入手した。このES細胞は、VAMP5のすべてのエクソンを含む約11 kbpの領域を欠損する。胚盤胞にインジェクションすることで、キメラマウスを得た。交配を経て、ヘテロ接合体欠損マウスが出生した。続いて、ヘテロ接合体同士の交配を行った。野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体マウスを得た。肉眼レベルでの観察に加え、主要臓器の切片を用いた顕微鏡観察を行った。全身を網羅的に形態観察するため、ブロックフェースイメージング装置の開発を開始した。

4. 研究成果

キメラマウス作出と、ヘテロ接合体の作出に成功し、ヘテロ接合体同士の交配から、73匹のマウス仔を得た。遺伝子型は、野生型:ヘテロ接合体:ホモ接合体の比が、10:13:1であり、メンデル比(1:2:1)から大きく外れた結果になった。また死産が多く、胎生期には発達しているが、出生前後で死亡することが考えられた。死因を究明するため、

肉眼レベルの解剖と、臓器切片の顕微鏡観察を行った。骨格筋組織では肉眼レベルでの形成異常は認められなかった。出生時に呼吸をはじめない個体や、不規則呼吸がみられたことから、肺の切片を作成し、観察したところ、完全な無気肺もあれば、一部領域が無気肺で、死亡している例が見つかった。肺以外でも、全身をくまなく形態形成の成否を観察できるように、ブロックフェースイメージング装置の新規開発をすすめている。マウス個体をまるごと 3D データとし、パソコン上で解剖できる手法である。現在、装置は試作の段階であるが、脳室の閉鎖や拡張といった、通常の解剖作業では見つけにくい形態異常が見つかった。今後は、呼吸器系、神経系以外での形態異常についても明らかにしていく。また、装置をハイスループットにするための改良に取り組み、形態異常の程度や頻度を明らかにする予定である。

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 6 件)

1) Tajika Y, Takahashi M, Ueno H, Murakami T, Yorifuji H.

Organization of organelles and VAMP-associated vesicular transport systems in differentiating skeletal muscle cells.

Anat Sci Int. 2015 Vol. 90 (1), p. 33-39. doi: 10.1007/s12565-014-0266-6. (査読有り)

2) Astrid FK, Tajika Y, Takahashi M, Ueno H, Murakami T, Yorifuji H.

Filamentous structures in skeletal muscle: anchors for the subsarcolemmal space.

Med Mol Morphol. 2015 Mar;48(1):1-12. doi: 10.1007/s00795-014-0070-3. Epub 2014 Feb 12. (査読有り)

3) 多鹿友喜

筋管細胞における小胞輸送システムの形態学的解析

解剖学雑誌 2014 Sep; 89(4): 35-36.

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=du2kaibo/2014/008904/004&name=0035-0036j&UserID=133.8.240.34> (査読有

り)

4) Murakami T, Tajika Y, Ueno H, Awata S, Hirasawa S, Sugimoto M, Kominato Y, Tsushima Y, Endo K, Yorifuji H.

An integrated teaching method of gross anatomy and CT radiology.

Anat Sci Educ. 2014 Nov-Dec;7(6):438-49. doi: 10.1002/ase.1430. Epub 2014 Jan 17 (査読有り)

5) Tajika Y, Takahashi M, Astrid FK, Ueno H, Murakami T, Yorifuji H.

Vesicular transport system in myotubes: ultrastructural study and signposting with vesicle-associated membrane proteins.

Histochem Cell Biol. 2014 Apr;141(4):441-54. doi: 10.1007/s00418-013-1164-z. Epub 2013 Nov 22. (査読有り)

6) Iriuchishima T, Yorifuji H, Aizawa S, Tajika Y, Murakami T, Fu FH

Evaluation of ACL mid-substance cross-sectional area for reconstructed autograft selection.

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2014 Jan;22(1):207-13. doi: 10.1007/s00167-012-2356-0. Epub 2012 Dec 22. (査読有り)

[学会発表](計 8 件)

1) 多鹿友喜、村上徹、高橋-池澤麻衣子、上野仁之、依藤宏 新生仔マウスの全身 3D 形態解析法 第 121 回 日本解剖学会 2016 年 3 月 30 日 ビッグパレットふくしま 福島

2) 村上徹、多鹿友喜、高橋-池澤麻衣子、上野仁之、依藤宏 Visible Fish Danio rerio 第 121 回 日本解剖学会 2016 年 3 月 30 日 ビッグパレットふくしま福島

3) Tajika Y, Murakami T, Takahashi M, Ueno H, Yorifuji H. Serial block-face imaging system for both 3D morphology and section histology. 2015 American Society of Cell Biology Annual Meeting, San Diego, CA, USA 2015 年 12 月 15 日

4) 飯島圭哉、多鹿友喜、宮城島孝昭、依藤宏、

好本裕平 顔面神経根周囲の三次元的解析
日本脳神経外科学会第74回学術総会 2015
年10月16日 ロイトン札幌 札幌

5) 高橋麻衣子、多鹿友喜、上野仁之、村上徹、
依藤宏 腎臓におけるVAMP5の発現と分布
第120回 日本解剖学会 2015年3月21日
神戸国際展示場 神戸

6) 多鹿友喜、高橋麻衣子、上野仁之、村上徹、
依藤宏 ゼブラフィッシュ成魚の3Dアトラス作成
第120回 日本解剖学会 2015年3月21日
神戸国際展示場 神戸

7) 多鹿友喜、高橋麻衣子、Astrid F. K.、上野
仁之、村上徹、依藤宏 筋管細胞に発現する
VAMPの分布と発達過程T管との比較 第119
回 日本解剖学会 2014年3月28日 自治医
科大学 栃木

8) 高橋麻衣子、多鹿友喜、Astrid F. K.、上野
仁之、村上徹、依藤宏 気管支におけるVAMP5
の発現と分布 第119回 日本解剖学会 2014
年3月27日 自治医科大学 栃木

[図書](計 1 件)

1) 村上徹、多鹿友喜、上野仁之、依藤宏 オート
プシー・イメージング(Ai)第三弾—さらなる普及
と教育・研修への取り組み— オートプシーイメ
ージング(Ai)における教育・研修の取り組み—
人体解剖とCTの統合による先駆的医学教育
Innervision Vol 29 (1), p. 39-42, 2014

[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

群馬大学大学院医学系研究科・機能形態学分
野のホームページ

<http://anatomy.med.gunma-u.ac.jp/anatomy/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

多鹿 友喜 (TAJIKI, Yuki)

群馬大学大学院医学系研究科・機能形態学
分野・講師

研究者番号:90400738

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし