

平成 29 年 12 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871124

研究課題名(和文)小胞体ストレス特異的な小胞体膜動態を介した細胞分化制御

研究課題名(英文) Regulation of myoblast differentiation through the endoplasmic reticulum (ER) membrane dynamics caused by ER stress

研究代表者

中西 慶子 (Nakanishi, Keiko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30415252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはこれまでの研究から、筋肉の幹細胞である筋芽細胞が筋管細胞に分化する過程で小胞体ストレス応答が発生し、これが細胞分化にポジティブな働きをしていることを示してきた。しかし細胞分化という生理的状況下においてどのようにストレス応答が生じるのかは不明であった。本研究では、小胞体の膜動態と小胞体内で生じるイベントとの相関から、筋分化の際に生じる小胞体ストレスの原因が小胞体内カルシウム枯渇であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We previously reported that endoplasmic reticulum (ER) stress signaling caused physiologically during myoblast differentiation plays important roles for the differentiation. However, the mechanism which causes the ER stress signaling was unknown. We investigated correlation between ER membrane dynamics and alterations in ER homeostasis, and revealed that ER calcium depletion is the cause of ER stress during myotube formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞分化 小胞体ストレス オルガネラ動態 筋芽細胞 カルシウム STIM1

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは筋前駆細胞である筋芽細胞が、筋蛋白質を発現する筋管細胞へと分化する筋最終分化過程において、一過的に小胞体ストレス応答が生じることを見出した。更にこの小胞体ストレス応答の遮断によって分化が抑制されること、逆に小胞体ストレスを増大させた場合には分化効率が上昇することを明らかにしてきた。これらの結果は小胞体ストレス応答が分化の仕組みに組み込まれていることを示唆しているが、分化という生理的状況下において、小胞体ストレス応答の上流に位置する小胞体ストレスの発生と、下流に位置する分化過程を制御する仕組みは不明であった。

小胞体は膜蛋白質や分泌蛋白質の修飾、立体構造形成の場であり、完成した蛋白質は小胞輸送によって運ばれる。立体構造形成に失敗した蛋白質が小胞体内に蓄積すると、小胞体の正常な機能が阻害される(この状態を小胞体ストレスと呼ぶ)。小胞体ストレスに対する防御システムが小胞体ストレス応答であり、小胞体膜上に局在するストレスセンサー蛋白質は小胞体ストレスを感知すると活性化し、その結果転写調節、翻訳調節が起こる。小胞体ストレスの原因として、分泌蛋白質の過剰生産や不良蛋白質形成、小胞体内カルシウム涸渇、小胞体からの蛋白質輸送阻害等が知られている。

小胞体の機能は多岐に渡り、蛋白質合成の他に脂質合成やカルシウム貯蔵の場でもある。細胞が担う役割によって小胞体の主たる機能は異なる。小胞体の働きが活発な細胞では、それぞれの機能に適した形に小胞体構造が発達しており、筋細胞はその好例である。筋細胞の小胞体は筋小胞体と呼ばれる特殊な構造を呈し、カルシウムの出し入れによる筋収縮の制御を担う。それに適した形態への変化、即ち小胞体-筋小胞体変換が分化過程で起こり、小胞体は筋原繊維を包みこむような

ネット状の筋小胞体となる。小胞体-筋小胞体変換というダイナミックなイベントの存在は良く知られているが、構造変換過程の詳細についてはほとんど分かっていない。小胞体ストレスは小胞体内で起こるイベントであること、筋分化時には小胞体の再構築(小胞体-筋小胞体変換)が行われることから、私たちは小胞体の形態変化が小胞体ストレスと関係があるという着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では分化において小胞体ストレスを引き起こすストレス源を明らかにし、これに対する小胞体ストレス応答が細胞分化過程のシグナル系や細胞構造の変換とどう関わるかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

光学顕微鏡を用いた事前の解析から、筋分化過程と小胞体内カルシウム枯渇誘導時において、類似した小胞体膜構造が生じる事を見出していた。筋分化過程で生じる小胞体ストレスの原因が小胞体内カルシウム涸渇であるかどうかを検証するための解析を行った。

また、筋分化過程における小胞体ストレス応答と細胞分化とを繋ぐ因子をマイクロアレイ解析によって同定することを試みた。

### 「小胞体形態変化の詳細な解析」

光学顕微鏡を用いた事前の解析から、小胞体ストレスが引き起こす小胞体の形態的な変化はストレス源の種類によって異なることが強く示唆されていた。作用機序の異なる各種薬剤を用いて筋芽細胞に小胞体ストレスを発生させた際及び筋分化過程における小胞体膜の微細構造について、透過電子顕微鏡を用いて詳細な解析を行った。

「小胞体内カルシウム涸渇によって変化する

#### る小胞体膜上蛋白質の観察」

小胞体膜貫通蛋白質 STIM1 は小胞体内カルシウム濃度低下によって構造変化を起こし、小胞体膜の一部とともに細胞膜直下へと移動する。蛍光蛋白質を付加した STIM1 を筋芽細胞に導入し、小胞体内カルシウム涸渇による細胞膜への移動が観察できるようにし、小胞体内カルシウム濃度変化のライブイメージング系を確立した。STIM1 発現ベクターを導入した筋芽細胞に対して分化誘導を行い、筋分化初期過程において小胞体内カルシウム濃度低下が生じるかどうか観察を行った。

#### 「小胞体内カルシウム濃度の制御による小胞体膜変化と小胞体ストレス応答の解析」

小胞体からのカルシウム放出を抑制する薬剤の投与により、筋分化時の小胞体膜構造変化及び小胞体ストレス応答が抑制されるかを確認した。小胞体膜の構造は小胞体膜に特異的に結合するライブイメージング用蛍光色素で染色したり、蛍光蛋白質を付加した小胞体膜蛋白質を発現させることにより経時的に観察した。小胞体ストレス応答の有無は小胞体ストレスによって発現が誘導される転写因子 (CHOP や ATF4) の細胞染色等によって確認した。

#### 「筋分化過程における小胞体ストレス応答と筋分化制御系を繋ぐ分子の同定」

これまでの研究から、小胞体ストレス応答が筋分化にも関与していることが示唆されている。小胞体ストレス応答は主に転写制御から成り立っていることから、小胞体ストレスによって発現が変化する遺伝子の中に、筋分化に関与するものが含まれていることが想定される。また、この小胞体ストレスの実体が小胞体内カルシウム濃度低下である可能性が高いことから、薬剤による小胞体内カルシウム涸渇時に起こる転写調節によって

も同じ遺伝子セットの発現が変化する可能性がある。未処理の筋芽細胞を基準として、小胞体内カルシウム涸渇を引き起こす小胞体ストレス誘導剤で処理した試料と筋分化誘導を行った試料、それぞれの遺伝子発現の変化を抽出した後、両者で共通して変化する遺伝子群を同定することを試みた。

#### 4. 研究成果

##### 「小胞体形態変化の詳細な解析」

筋管細胞は多数の筋芽細胞が融合する事により形成される。細胞融合に先立ち、筋芽細胞内に小胞体由来の特殊な膜構造が出現することを私たちは見出した。そしてこれと類似した構造が、薬剤処理により小胞体内のカルシウムを涸渇させた際に特異的に形成された (この際小胞体ストレスも誘導される)。これらの構造を透過電子顕微鏡を用いて解析した結果、この膜構造体はシート状の粗面小胞体由来であり、両者に共通する以下のような特徴が見出された。

1. 小胞体膜が同心球状に層状に積み重なる。
2. 小胞体内腔幅が狭くなる又は消失する。
3. リボソームが脱離する。

これらの特徴は、小胞体内カルシウム涸渇以外の原因による小胞体ストレスを誘導した際には見られなかった。小胞体ストレスは小胞体内にアンフォールドしたタンパク質が蓄積した状態と定義され、タンパク質のジスルフィド結合阻害剤であるジチオスレイトール処理などを用いて小胞体ストレスを誘導した際には小胞体内腔の増大が報告されていた。今回、ツニカマイシン (タンパク質の糖鎖修飾阻害剤) 及びブレフェルディン A (小胞体-ゴルジ体間タンパク質輸送阻害剤) を用いて小胞体ストレスを誘導した結果、小胞体内腔の増大が確認され、小胞体内カルシウム涸渇による小胞体ストレス時にのみ特異的な小胞体膜構造変化が生じることが明らかになった。

「小胞体内カルシウム涸渇によって変化する小胞体膜上蛋白質の観察」

蛍光蛋白質を付加したSTIM1を筋芽細胞に導入し、小胞体内カルシウム涸渇による細胞膜への移動を観察した結果、筋分化誘導後約1日(24時間前後)において、小胞体内カルシウム枯渇特異的に生じるSTIM1のドットパターンが観察された。また、薬剤を用いて小胞体内カルシウム枯渇を人為的に誘導した際には、1時間以内に同様のドットパターンが観察され、この系が正しく機能していることも確認された。これにより、筋分化時に小胞体内カルシウム枯渇が確かに生じることと、そのタイミングが明らかになった。

「小胞体内カルシウム濃度の制御による小胞体膜変化と小胞体ストレス応答の解析」

小胞体からのカルシウム放出を担う主要なカルシウムチャネルであるイノシトール3リン酸受容体(IP3R)と、筋分化に依存して発現が上昇するカルシウムチャネルであるリアノジン受容体(RyR)の阻害剤存在下では、薬剤を用いて筋芽細胞のカルシウムポンプを阻害して細胞内へのカルシウム流入を抑制した際にも、小胞体内カルシウム濃度低下による特異的な小胞体膜構造変化が起こらないことを確認した。IP3R及びRyR阻害剤下で筋分化誘導を行った結果、小胞体内カルシウム枯渇特異的な小胞体膜構造変化、小胞体ストレス応答、筋分化進行がいずれも抑制された。このことから、筋分化に伴って生じる小胞体内カルシウム枯渇が、小胞体ストレス応答及び筋分化の進行を引き起こしていることが明らかになった。

「筋分化過程における小胞体ストレス応答と筋分化制御系を繋ぐ分子の同定」

STIM1のイメージングによる結果から、小胞体内カルシウム枯渇が生じるタイムボイ

ントが筋分化誘導後24時間から48時間の間であることが明らかとなったことから、筋分化誘導後36時間の細胞サンプルを用いてマイクロアレイ解析を行った。同時にコントロールである未処理の細胞と、比較のための2種類の小胞体ストレス誘導剤(小胞体内カルシウム枯渇を誘導するタイプ、小胞体内タンパク質糖鎖修飾を阻害するタイプ)で処理した細胞の解析を行った。その結果、筋分化誘導及び2種類の小胞体ストレス誘導剤とで共通に変化する遺伝子群として、上皮間葉転換関連因子が見出された。上皮間葉転換のマスター遺伝子の一つに関して、筋分化誘導及び小胞体ストレス誘導下においてタンパク質レベルで発現上昇が起こっている事を、細胞免疫染色及びウエスタンブロット法により確認した。また筋分化誘導に特異的な遺伝子変化としては、コレステロール合成経路の遺伝子群の著しい上昇が見られた。

## 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3件)

1. Keiko Nakanishi, Kisa Kakiguchi, Shigenobu Yonemura, Akihiko Nakano, and Nobuhiro Morishima "Transient Ca<sup>2+</sup> depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation" *FASEB J.* **29** (5), 2137-2149 (2015).
2. Nobuhiro Morishima and Keiko Nakanishi "Significance of ER Ca<sup>2+</sup> outflow during myogenesis" *Channels* **9** (4), 173-174 (2015).
3. Nobuhiro Morishima and Keiko Nakanishi "Proplatelet formation from megakaryocytes is associated with endoplasmic reticulum stress" *Genes Cells*

21 (7), 798-806 (2016).

〔学会発表〕(計2件)

1. 中西慶子、垣口貴沙、米村重信、小林秀俊、中野明彦、森島信裕「筋分化過程における生理的な小胞体ストレスが引き起こす特異的な小胞体構造変化」第66回日本細胞生物学会大会、発表番号1P-11、2014年6月(奈良)
2. 森島信裕、中西慶子「巨核球の最終分化過程における小胞体ストレスの発生」第87回日本生化学会大会、発表番号3T08a-18(一般口頭発表)・2P-523(ポスター)、2014年10月(京都)

〔その他〕

〔プレスリリース〕

2015年2月17日 筋肉を動かすカルシウムは筋肉を作る指令役も担う -カルシウム枯渇の指標となる多層化した小胞体膜構造を発見-

[http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150217\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150217_1/)

2016年6月14日 止血役にはストレスが必要 - 巨核球細胞での小胞体ストレスが血小板を有無 -

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160614\\_2/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160614_2/)

〔新聞報道〕

2015年3月9日 化学工業日報 「カルシウム枯渇で筋繊維細胞分化 -理研が発見-

2015年3月13日 科学新聞 「カルシウムは筋肉つくる指令役 -理研が解明-

〔WEBニュース及び記事〕

2015年2月18日 サイエンスポータル(科学技術振興機構運営サイト) ニュース速報記事 「筋肉動かすCaは筋肉作る指令役も担う」

[http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash\\_h\\_review/newsflash/2015/02/20150218\\_03.html#](http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_h_review/newsflash/2015/02/20150218_03.html#)

2015年2月26日 理化学研究所ホームページ内ニュース記事 「SARC bodies: markers of cellular stress needed for muscle cell differentiation」

[http://www.riken.jp/en/pr/topics/2015/20150226\\_1/](http://www.riken.jp/en/pr/topics/2015/20150226_1/)

〔レビュー〕

2015年7月22日 医学生物学の総合ポータルサイト BioMedサーカス.com レビュー記事 「小胞体内カルシウムの減少に依存した筋分化制御機構」

[http://biomedcircus.com/paper\\_03\\_39.html](http://biomedcircus.com/paper_03_39.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 慶子 ( NAKANISHI KEIKO )

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・応用免疫学研究室・助教

研究者番号：30415252

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

森島 信裕 ( MORISHIMA NOBUHIRO )

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号・40182232