

骨格筋疾患における膜伸展カチオンチャネルの役割解明

原 雄二, 土谷 正樹, 西岡 諒太郎, 梅田 真郷

京都大学大学院工学研究科

概要 骨格筋線維は筋収縮・弛緩に伴い絶えずダメージを受けている。正常な筋線維では様々な内在的保護機構により筋線維の機能が保持されると考えられている。一方筋ジストロフィーをはじめとする骨格筋疾患では、筋線維の異常な変性および未成熟な再生が繰り返され、最終的には運動機能・呼吸能の破綻に至る。骨格筋線維における内在的修復機構の一つとして、①形質膜の損傷を感知することによる骨格筋幹細胞(サテライト細胞)活性化、および②カルシウムイオン存在下に行なわれる小胞依存的な膜修復機構が主に想定されている。これらの経路による筋線維修復機構が破たんした場合、筋疾患が惹起される。しかし、同修復機構における分子基盤、例えば膜伸展を感知する機構、どのようなシグナル因子が筋線維損傷時に放出され、分化誘導につながるのか等は依然明らかではない。そこで、本研究では膜伸展や損傷を感知する中心分子である「膜伸展活性化チャネル」に焦点をあてた。

研究対象として、膜伸展により活性化されるうるチャネル分子、特に TRP (Transient Receptor Potential) チャネルに着目した。これまでの報告をもとに、膜伸展により活性化する TRP チャネルの発現を検討したところ、マウス骨格筋および筋芽細胞株 C2C12 において TRPM7 を始め複数の膜伸展活性化チャネルの発現が認められた。筋芽細胞株の活性化は膜伸展や膜へのダメージによりもたらされることが知られるから、筋管形成における膜伸展活性化チャネルの寄与を RNA 干渉法により検討した。しかし、当初の予想に反して siRNA 適用により筋管形成が促進された。この結果から、膜伸展チャネルは筋芽細胞活性化だけでなく、分化制御をもたらす可能性が示唆された。

また、膜伸展活性化チャネルは形質膜の状態を感知することから、本研究では形質膜構成因子であるリン脂質についても着目した。具体的にはリン脂質局在制御因子群の骨格筋における役割について解明を進めており、本発表ではこれまでに得られた知見についても併せて報告したい。

1. はじめに

骨格筋疾患に対するこれまでの主な研究対象は、膜タンパク質や細胞骨格系タンパク質などの筋線維構造タンパク質群であった。しかし筋ジストロフィーの概念が報告されてから 150 年以上経つにも関わらず、未だ根本的な治療法が確立されていないのが現状である。その原因の一つとして、筋収縮・弛緩に伴う筋形質膜へのダメージという骨格筋疾患の直接的傷害原因に対して、保護・修復する分子機構の解明が大きく立ち遅れていることが挙げられる。膜伸展イオンチャネルは形質膜の形態変化と密接に関連することから、筋ジストロフィーをはじめ様々な病態との関連が古くから示唆されてきた(文献 5)。しかしその分子実

体は未だ明らかではない。

そこで本研究では、

- どのように骨格筋は膜伸展や膜ダメージを認識できるのか？
 - 膜伸展、膜ダメージ後、どのような筋線維内応答がもたらされるのか？
- という点に着目し、特に形質膜上に存在するイオンチャネルを本研究の中心テーマと定めた。

形質膜の状態変化は筋ジストロフィーをはじめとする様々な疾患との関連だけでなく、イオンチャネル等をはじめ様々な膜タンパク質の活性を制御することが考えられている(文献 6)。形質膜構成因子であるリン脂質は、その頭

部の違いによりホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジリエタノールアミン(PE)、ホスファチジン酸(PA)、ホスホイノシタイド(PI)等に分類される(文献7)。これらリン脂質分子種は動物細胞においては不均一に存在することが知られている。例えば PE、PS は形質膜内層に存在する。一方細胞死のシグナル伝達経路活性化により、PS が細胞表層に露出することで、アポトーシス細胞がマクロファージによる貪食を受けることが知られている。さらに骨格筋では筋芽細胞ではその分化過程でPSが表層に露出することが報告されている(文献7, 8)。しかし骨格筋において、PS が表層に露出するメカニズムやその生理的意義は未だ明らかではない。そこで本研究では膜リン脂質局在決定機構の骨格筋での役割についても併せて検討することで、膜伸展チャンネルとの関連を検討することとした。

2. 実験方法

2.1 実験リソース

実験用マウスとして C57BL/6、筋細胞モデル系としてマウス筋芽細胞株 C2C12(ATCC)を使用した。マウス筋芽細胞の培養については増殖培地(Growth medium; 20% FBS 含有)を使用し、分化誘導時には分化培地(Differentiation medium; 2% horse serum 含有)を使用した。

2.2 骨格筋および骨格筋モデル細胞における遺伝子プロファイリング

本研究では研究対象として、膜伸展活性化チャンネルの候補因子として知られている TRP チャンネル、および膜リン脂質の局在を制御するリン脂質トランスロカーゼについて着目した。マウス骨格筋および骨格筋細胞での発現を検討するために、RT-PCR 法により解析を行った。また筋細胞分化前後における発現変化については、既知の発現データベース(NCBI GEO profiles)も併せて参考にした。

2.3 RNA 干渉法および遺伝子編集

上記実験で得られた結果をもとに、RNA 干渉法により骨格筋モデル細胞における役割の検討を行った。各遺伝子についてシグマ社およびライフテクノロジーズ社の設計済 siRNA を使用し、Lipofectamine RNAiMAX(ライフテクノロジーズ社)を用いて導入し、C2C12 細胞における遺伝子ノックダウンの効果を検討した。また、一部の候補遺伝

子については CRISPR/Cas9 法による遺伝子編集を行ない、C2C12 における遺伝子欠損細胞株の樹立を行なった。その際に pX330(Addgene #42330)に各遺伝子のターゲット配列を挿入した。尚ターゲット配列は CRISPRdirect(<http://crispr.dbcls.jp/>)にて選定を行った。

2.4 膜ダメージアッセイ

各候補因子について GFP 融合タンパク質の発現ベクターを構築し、C2C12 細胞に一過的発現を行なった。発現後、微細ガラスにて膜ダメージを導入し、蛍光顕微鏡(Axioobserver-Z1; Zeiss 社)にて GFP 融合タンパク質群の挙動について経時変化を観察した。

3. 結果

3.1 膜伸展活性化チャンネル候補因子としてのイオンチャンネル

マウス骨格筋、マウス筋芽細胞株 C2C12 に発現するイオンチャンネル候補分子として、これまでの報告および RT-PCR により発現確認を行った。その結果、膜伸展活性化チャンネルとして報告されている分子のうち、TRPV2、TRPM7、TRPP2 等の発現を確認した。これらイオンチャンネルのうち特に TRPM7 については、RT-PCR にて非常に高い発現が認められた。

3.2 siRNA 適用によるマウス筋芽細胞株への効果

上記結果を基に、各イオンチャンネルの筋芽細胞株での役割を検討するため、siRNA 適用による形態・分化等への影響を検討した。筋芽細胞は筋線維の近傍に存在し、筋線維の膜伸展により分化誘導されることが知られている。そこで「膜伸展イオンチャンネルの発現減少に伴い、分化誘導が阻害される」という作業仮説の元、検証を行った。その結果、当初の予想に反して分化誘導に大きな違いは見られず、むしろ TRPM7 siRNA 適用により、融合が促進される結果となった。一方、対照実験として用いた他のイオンチャンネル関連因子(STIM)については、融合を抑制する結果となった。この結果から、TRPM7 に関しては筋分化を制御する因子として働くことが示唆された。現在 TRPM7 についてはその分子メカニズム解明を目指して研究を進めている。

3.3 膜伸展活性化チャンネルにおける形質膜損傷への応答

前述の通り、骨格筋には形質膜を修復する分子機構が

存在する。そのうち膜直下の小胞が膜ダメージ部位に集積する機構が着目されている。その分子のうち、Dysferlin 遺伝子が三好型筋ジストロフィーの原因遺伝子として同定されており(文献 3)、上記修復機構は筋疾患と密接な関連があることが知られている。そこで、本研究では膜伸展活性化チャンネルが形質膜損傷部位に集積する可能性を追究するため、GFP タグを付着した各チャンネル発現ベクターを C2C12 細胞へトランスフェクションし、膜ダメージ後誘導後の各イオンチャンネルの動態を検討した。その結果、TRPM7 をはじめとする各チャンネルについては、初期段階での局在変化は認められなかった。一方、膜修復関連因子である TRIM72(MG53)については、膜ダメージ部位への蓄積が認められた。以上のことから、今回着目した膜伸展チャンネルについては、膜損傷後の急性応答時にはその局在は変化しないことが明らかになった。

3. 4 膜リン脂質局在を制御する因子における骨格筋細胞での役割説明

本研究では、膜を基軸とした機構の骨格筋での役割を

検討することを目的としている。そこで我々は膜リン脂質の動態、特にリン脂質の局在を規定する因子に着目した。形質膜内層・外層間のリン脂質局在を制御する因子リン脂質トランスロカーゼ(外層→内層, 内層→外層, あるいは両方向への移動)の機能追究のため、筋芽細胞株 C2C12 における分化前後の発現変化を確認した。その結果いくつかのトランスロカーゼが分化後に発現上昇が認められた(図 1)。

発現上昇が認められた因子について、その骨格筋形成における役割検討のため、siRNA 適用を行った。分化誘導を、筋管形成能および分化マーカー(ミオシン重鎖)にて評価したところ、興味深いことにリン脂質トランスロカーゼの一部について、筋分化を抑制するもの、あるいは逆に促進する分子の存在を明らかにした(図 2)。さらにこれらの因子について遺伝子ノックダウンを行なった後、リン脂質局在を特異的プローブにて検討したところ、通常内層に存在するリン脂質分子種が外層に多く存在することが示された(図 3)。

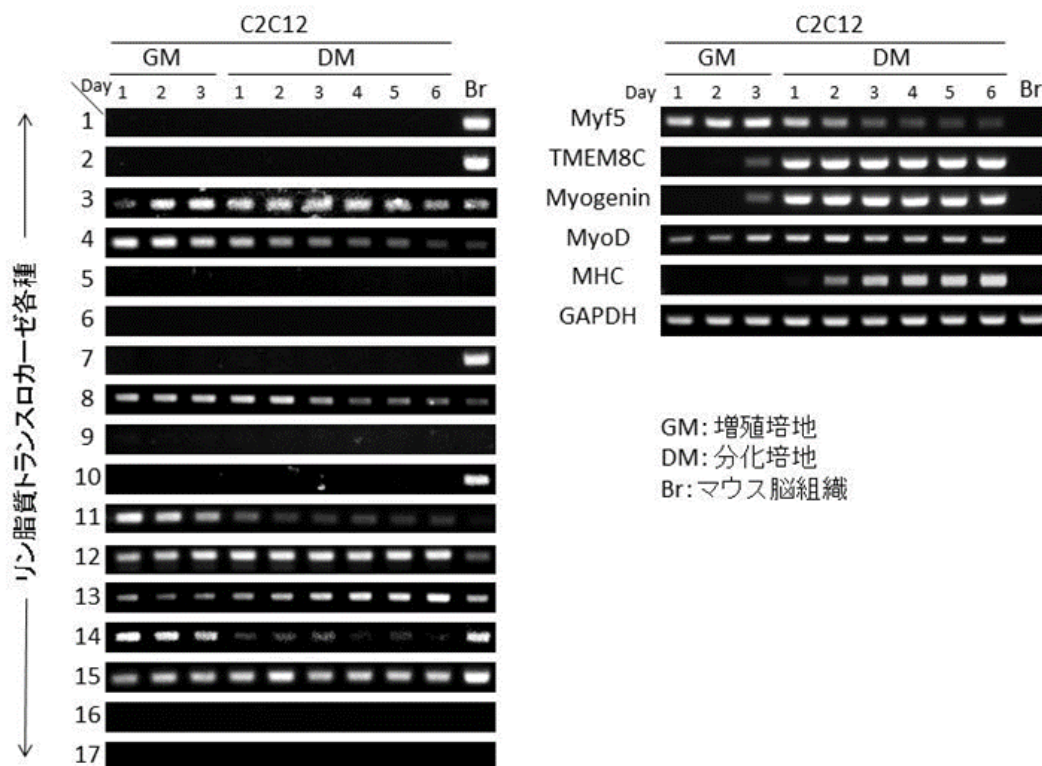


図 1. 分化誘導した C2C12 細胞における RT-PCR 解析

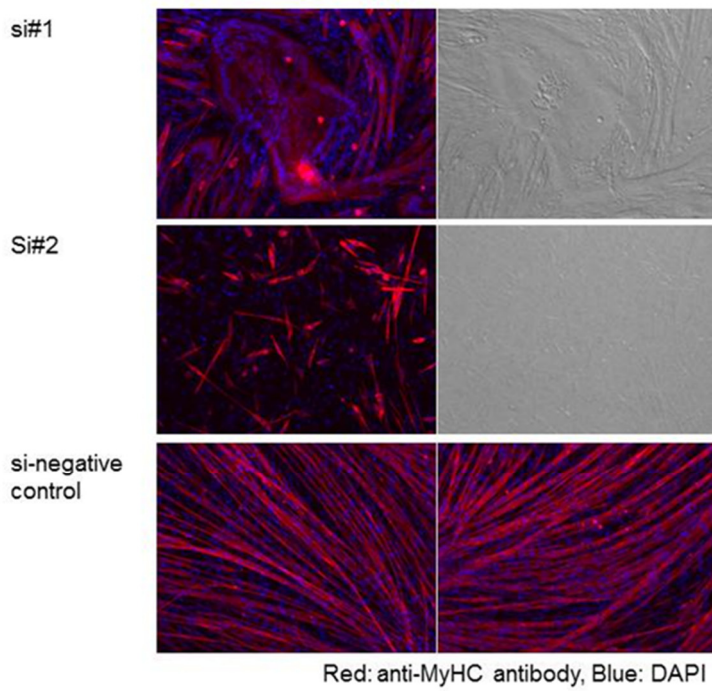


図 2. リン脂質トランスロカーゼに対する siRNA 導入による分化誘導の変化

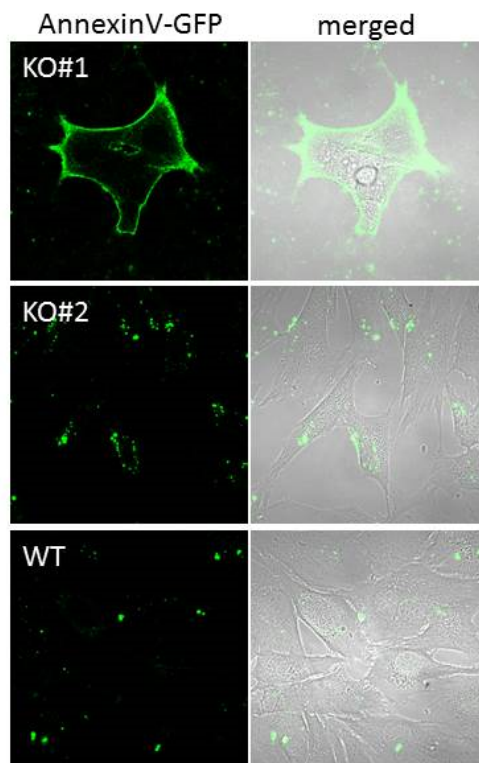


図 3. リン脂質トランスロカーゼ遺伝子欠損細胞におけるホスファチジルセリンの局在観察

4. 今後の研究課題について

以上の結果から、これまで SAC として報告されてきた TRP チャネル群については、骨格筋細胞分化の過程における明確な役割は明らかに出来なかった。可能性として (a) 遺伝子ノックダウン法では微量に発現が残るため、表現型が出現しなかったこと、あるいは、(b) 他の膜進展チャネルが機能することで、遺伝子ノックダウンの寄与を打ち消してしまうことなどが考えられる。最近新たな膜伸展チャネルとして PIEZO チャネルが発見された。骨格筋でも発現が見られることから、同チャネルについても併せて検討していきたい。

また、本研究では膜構成因子であるリン脂質について着目し、リン脂質局在制御に関わる因子の骨格筋での役割について検討した。その結果、リン脂質トランスロカーゼの一つは分化誘導に重要な役割を果たすことが示された。現在、これらの分子について、筋特異的な遺伝子改変マウスの解析を進めており、生理的意義の解明を目指している。また、リン脂質局在変化における膜伸展チャネルの活性変化に興味を持っており、膜伸展チャネル活性化制御機構の解明も併せて進めているところである。

最後になりましたが、本研究遂行にあたり多大なるご援助を賜りましたソルト・サイエンス研究財団に心から御礼申し上げます。

5. 文献

- 1) Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2015) 7, 762-773.
- 2) Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* (2015) 142, 1572-1581.
- 3) Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Hamida MB, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* (1998) 20, 31-36.
- 4) Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* (2003) 423, 168-172.
- 5) Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, Gottlieb PA, Sachs F, Allen DG. Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the mdx mouse. *J Physiol.* (2005) 562, 367-380.
- 6) Schmidt D, Jiang QX, MacKinnon R. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* (2006) 444, 775-779.
- 7) Drin G. Topological regulation of lipid balance in cells. *Annu Rev Biochem.* (2014) 83, 51-77.
- 8) Leventis PA, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys.* (2010) 39, 407-427.

Roles of Stretch-Activated Cation Channels in Neuromuscular Diseases

Yuji Hara, Masaki Tsuchiya, Ryotaro Nishioka, Masato Umeda

Graduate School of Engineering, Kyoto University,

Summary

Stretch-activated channels are known to be involved in various cellular processes including shear stress responses. Previous literatures have shown that However, it is still unclear how SACs are activated in response to changes in the membrane status, and how SACs regulate downstream pathways. In this study, we have carried out the following projects: (1) Elucidation of the role of SACs in maintenance of the membrane structure in skeletal muscle and (2) Identification of phospholipid translocases that regulate differentiation of myoblast cells into myotubes. In the first project, we have focused on several SACs including TRP (Transient Receptor Potential) channels that are expressed in mouse skeletal muscle and mouse myoblast cell line C2C12. Our studies along with previous literatures showed that several TRP channels are predominantly expressed in muscle tissue and cells. We hypothesized that SACs in muscle cells could be involved in muscle differentiation; however, gene knockdown of one of SACs rather promoted myotube formation, implying that the SACs could act as a regulator for myotube formation. In the second project, we have focused on phospholipid translocases that possess the ability to translocate phospholipids between inner and outer leaflets of the plasma membrane. We conducted siRNA-mediated gene knockdown studies based on our gene expression profiles, and showed that several phospholipid translocases play important roles in myotube formation. Thus our results shed light on the importance of phospholipids' distribution in skeletal muscle.