

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 26 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 千葉大学・大学院理学研究院生物学研究部門
職 名 助教
研究代表者名 高野 和儀

下記のとおり平成28年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 282007)

1. 共同利用研究 課題名	筋再生過程の核位置決定における膜変形タンパク質の役割			
2. 共同利用研究 目的	細胞膜を変形させる BAR タンパク質およびアクチン制御因子 N-WASP に着目して, 核位置決定機構をライブセルイメージングにより明らかにする。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 高野 和儀	千葉大学・大学院融合科学 研究科	助教	計画, 実験, 論文執筆等, 研究全般 を総括する	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御部門 生体膜機能研究分野	氏 名	辻田 和也

※ 次の6, 7, 8の項目は, 枠幅を自由に変更できます。但し, 6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:282007)

6. 共同利用研究計画

骨格筋の再生過程において多核となった筋細胞の核は中心に一直列に整列してから細胞膜直下へ移動するが、この仕組みは不明である。重要なことに、この過程の異常は筋原性疾患である中心核病 (centronuclear myopathy) を引き起こす。BAR タンパク質である Amphiphysin2/BIN1(Amph2) が本疾患の原因タンパク質であることが知られており、その BAR ドメインを介した生体膜変形活性が、核の位置決定において重要な役割を果たしていると考えられている。申請者はこれまで、筋原繊維・筋発生においてアクチン制御因子である N-WASP の重要性を明らかにしてきた(Takano, et al, Science, 2010)。さらに申請者らの研究により、Amph2 は N-WASP に結合し、そのアクチン重合活性を制御することが示唆されている(Takano, et al, EMBO J, 2008)。これらの知見から、Amph2 は核膜や細胞膜の変形とアクチン重合を協調させて、細胞膜直下への核の移動を制御している可能性がある。そこで本共同利用研究では、Amph2とN-WASPがどのように核位置を決定するかについて、核の位置と両者のタンパク質の動きをライブセルイメージングにより可視化することでその仕組みを解明することを目指す。

プラスミド構築は千葉大学で承認された計画に基づいておこなう、細胞培養は神戸大学バイオシグナル総合研究センター内でおこなう。筋芽細胞株 C2C12 細胞に EGFP-N-WASP および, mCherry-Amph2 をトランスフェクションし、核を Hoechst33342 でラベルすることにより可視化する。筋芽細胞を分化誘導させた後に、中心核および細胞膜上における N-WASP および Amph2 の動態をライブセルイメージングにより検出する。ライブセルイメージングには共焦点レーザー顕微鏡および全反射顕微鏡を用いる。ライブセルイメージング後に画像解析ソフト MetaMorph により、両者の関係と核位置の関係を定量的に評価する。また、随時シグナル解析から得た変異体を構築して、本実験に用いる。これにより得た仮説による筋肉内での検証実験は千葉大学で承認された計画に従っておこなう。

7. 共同利用研究の成果

平成 28 年度の研究では、まず N-WASP と Amph2 の結合について検討した。中心核病の原因となる Amph2 BAR ドメイン内の変異である D151N/R154Q および SH3 ドメイン内の欠失変異である K436X を作製し、それぞれ N-WASP との結合を pull-down assay により検出したところ、Amph2(D151N/R154Q)では N-WASP との結合が減弱しており、Amph2(K436X)では N-WASP との結合が検出されなかった。したがって、Amph2 の変異が原因で起こる中心核病には N-WASP との結合が関わることや、N-WASP が Amph2 を介した周辺核化に関わる可能性が示唆された。

次に、ライブセルイメージングを行うために筋芽細胞株 C2C12 細胞の周辺核化を誘導するための培養条件を検討した。4 mg/ml アテロコラーゲンゲル/DMEM により表面処理を行なった培養皿に C2C12 細胞を播種し、分化培地 (5% horse serum/DMEM) により分化を誘導したが、中心核は整列するものの周辺核化には至らなかった。このため、文献検索を行なったところ、3 mg/ml マトリゲルによるサンドイッチ培養を行なった上で、アセチルコリン受容体の集積やサルコグリカンに結合することで MuSK の活性化を誘導する Agrin を添加することにより周辺核化を誘導できる可能性を見出した。このことは Agrin 刺激の下流では未知のシグナル伝達により、Amph2 の活性化や N-WASP の活性化を誘導できる可能性が示唆された。そこで、平成 29 年度の共同利用研究では、受け入れ研究者である辻田博士が発見した細胞膜の張力変化による BAR タンパク質および N-WASP の活性化の原理が周辺核化においても関わる可能性も併せて検討することとしたい。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

なし

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

なし