

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 30 年 5 月 1 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
 職 名 助教
 研究代表者名 高野 和儀

下記のとおり平成29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 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 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・大学院理学研究院	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 29 年度の共同利用研究では、まず昨年度に引き続きマウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 細胞を用いて周辺核化に至らしめるための培養条件の検討を行った。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 を添加して培養したが、周辺核化には至らなかった。そこで、マウスに塩酸プピバカインを筋注することによる筋崩壊により誘導される筋再生過程において再生筋より単離した筋芽細胞を初代培養したところ、上記の培養条件下で明瞭な中心核から周辺核への移行を観察することができた。さらに、この過程において発現させた mCherry-Amph2 の動態について共焦点レーザー顕微鏡によるライブセルイメージングを行ったところ、Amph2 は T 管に局在する他には、中心核周囲には局在せず周辺核周囲の細胞膜に集合してくることを明らかにした。したがって、Amph2 が周辺核の位置の決定あるいは膜-核インターフェース形成に関わる可能性が示唆された。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は昨年度は検討できなかったため、引き続き条件を検討し測定の準備を行う。また、遺伝子導入の効率化を計るために、骨格筋特異的 α -actin promoter を単離し、この promoter 下流で分化した骨格筋特異的に EGFP-N-WASP および mCherry-Amph2 を発現するアデノウイルスの作製を行った。今後はこれらのウイルスを用いて効率的に N-WASP や Amph2 の動態イメージングを行う。

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。)

○高野和儀, 栗原優介, 辻田和也, 遠藤剛 「横紋筋肥大・再生時の筋原繊維形成および核配置における N-WASP の役割」 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 12 月 7 日 (2P-0343)

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