

ミツグミン 53 の生理機能と筋疾患

京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学

竹島 浩

1. 背景

細胞膜は細胞と外界との障壁であり、その破綻は細胞死を意味する。細胞壁を持たない動物細胞は物理的または化学的的刺激に脆弱であり、組成が厳格に制御された細胞外液中において細胞活動が保証されている。ただし、細胞外液流によるシアーストレスや近隣細胞の過酸化物質産生などにより、リン脂質を主成分とする細胞膜は頻繁に障害されるものと想像される。偶発的な膜損傷による細胞死から回避するために、動物細胞では普遍的に膜修復の機能が付与されている。しかしながら、膜修復の分子機序については多くの点で不明のままである。運動機能を担う筋細胞では、絶えず局所的な細胞膜損傷が予想されるため、効率的な膜修復機能が完備されていることも想定される。骨格筋の膜修復機構における鍵分子として、ジスフェルリン(dysferlin, Dfl)が約5年前に報告され、ミツグミン53(mitsugumin53, MG53)が最近我々により見出された。またまだ全容解明にはほど遠い細胞機能ではあるが、MG53の機能解析を中心に骨格筋膜修復機構の実体に迫る研究を計画した。

2. 方法

既に樹立した MG53 欠損マウスおよびその単離筋細胞において、蛍光共焦点顕微鏡を用いて細胞膜損傷・修復を定量解析する細胞生理学実験を立案した。また、GFP 標識 MG53 などの発現実験により、筋細胞内の MG53 動態検討も企画した。

3. 研究成果

我々のグループでは筋細胞の内膜系に分布する膜タンパク質群を新規同定して、それらの小胞体 Ca^{2+} ハンドリングや膜形態の形成に関する生理機能を解明する研究を手掛けている(文献1)。骨格筋と心筋に特異的に発現している MG53 は、細胞表層膜の直下に分布する小胞に主に分布する。その分子内にはアミノ末端側より Ring, B-box, Coiled-coil, PRY, SPRY ドメインが配置されている。Ring, B-box, Coiled-coil ドメインを共有するタンパク質は現在データベース上に 80 以上登録されており、RBCC または TRIM ファミリーを形成しているが、それらの一般的な機能についてはまったく不明である。従って、MG53 は RBCC/TRIM ファミリーの新規メンバーである。膜タンパク質として挙動する MG53 ではあるが、その一次構造中には膜貫通セグメントや脂質修飾モチーフは見出せない。MG53 が有するホスファチジルセリン結合活性により (PRY-SPRY ドメインの役割によると思われる)、細胞膜や小胞に接着して分布しているものと考えられる。また、数種の RBCC/TRIM ファミリーメンバーにてユビキチン E3 リガーゼとしての酵素活性が報告されているが、擬似基質による人工的な実験系で MG53 の RBCC ドメインには E3 リガーゼ活性が観察された(筆者ら未発表データ)。この観察結果から、MG53 は筋細胞内にて新規な E3 酵素として機能することが示唆されるが、生理的な基質が分子同定されな

れば、その推論を確定することは出来ない。一方、両生類初期胚を用いた実験系では、MG53 の過剰発現により細胞内小胞の増加が観察された。また、培養動物細胞での実験では、MG53 の過剰発現により細胞内小胞の開口分泌の促進が観察された。この cDNA 発現実験や細胞内局在からは、細胞膜-小胞の動態制御への MG53 の寄与が推定される (文献 2)。

MG53 の生理機能を解明するため、翻訳開始コドンを含むアミノ末端配列のコード領域を欠失した変異を有する MG53 遺伝子変異マウスを作製した。得られた MG53 欠損マウスはほぼ正常に成長・繁殖するものの、進行性筋ジストロフィー様の表現形を示した (文献 3)。蛍光色素エバンスブルーを体内注入し、運動負荷を与えると、MG53 欠損マウスの筋細胞では大量の色素の流入が観察された。これらの観察から、MG53 欠損骨格筋は細胞損傷に脆弱であり、筋再生能が減衰する加齢条件において筋細胞の成熟障害が顕著に現れることが予想される。MG53 欠損骨格筋の膜修復活性を検討するため、以下の単離筋細胞を用いた実験を遂行した。まず、微小ガラス電極により単離骨格筋細胞に穿孔刺激を与えると、正常筋では 90%以上の確率で膜修復されて細胞死から逃れる。同様の刺激において、MG53 骨格筋は膜修復されることなく、ほぼ全例で細胞死に至ることが観察された。また、膜挿入型蛍光色素である FM1-43 を細胞外液に添加した条件で、強力なレーザー紫外光の照射により定量的な膜損傷を与えると、正常筋細胞では FM1-43 流入による蛍光強度の上昇は最小限に抑えられる。同一条件の実験にて、MG53 欠損筋細胞では顕著に増強した蛍光強度の上昇が観察された (文献 3)。さらに、蛍光タンパク質 GFP と MG53 の融合タンパク質を筋細胞に発現させて、膜障害時の挙動を観察する実験を行なった。GFP-MG53 は筋細胞の小胞上と細胞膜に分布するが、膜損傷に伴い、障害部位への GFP-MG53 小胞の素早い集積が観察された (文献 3, 4)。これらの観察から、MG53 はパッチ小胞の形成に向けた小胞集積の活性化に寄与しており、骨格筋の膜修復機構の構築に必須な分子であることが推察される。

大腸菌より調製した組換え MG53 タンパク質は、自己酸化により Cys242 が仲介する SS 結合により、保存中に多量体形成することが見出された。一方、細胞外液に還元剤である DTT を添加すると骨格筋膜修復は抑制される。GFP-MG53 を培養筋細胞に発現させて、その膜損傷部位への集積をイメージング解析すると、細胞外液への還元剤 DTT の添加は GFP-MG53 の集積を抑制し、酸化剤である thimerosal の添加は集積を促進することが判明した (文献 3)。さらに、この膜損傷部位への集積活性は Cys242 への変異導入により完全に失われることも判明した。これらの観察結果は、膜損傷に伴う細胞外液の酸化状態の流入に応答して、細胞内小胞に分布する MG53 は Cys242 を介して多量体となり、損傷部位に集結することを示唆する。

骨格筋膜修復においてデスフェルリン (Df1) とカベオリンタイプ 3 (Cav3) が重要であることは既に明らかにされているため、両タンパク質と MG53 の関係についても検討を加えた (文献 5)。まずは三者の相互作用の有無を調べるため、タグ標識タンパク質を培養細胞に発現させて抗タグ抗体を用いた共免疫沈降実験を遂行したところ、お互いに共沈降することが確認された。ヒト筋ジストロフィーを引き起こす Cav3 のアミノ酸変異として P104L が知られており、この変異タンパク質を筋細胞で過剰発現するトランスジェニックマウスはジストロフィー様の病状を示す。このトランスジェニックマウス由来の筋細胞では予想どおり膜修復機能の減弱が観察され、P104L 変異がドミナントネガティブ効果となり正常な Cav3 の機能までも阻害することで膜修復機構を阻害しているものと考えられる。そこで、培養筋細胞における GFP-MG53 と正常型および P104L 変異型 Cav3 の共発現実験を行なった。正常型 Cav3 発現細胞においては GFP-MG53 の膜障害部位への集積が通常どおり観察されるのに対して、P104L 変異

型 Cav3 発現細胞においてはその集積が顕著に阻害されていた。従って、膜修復に向けた MG53 小胞の障害部位への集積には Cav3 の機能が必須であると結論される。一方、膜修復時の Df1 の動態を解析するため、GFP-Df1 を通常の培養細胞に導入したところ、膜障害部位への集積は観察されなかった。この細胞に GFP-Df1 と MG53 を共発現させたところ、明瞭な障害部位への集積が観察された。従って、細胞内小胞を膜障害部位に集積させる機序には、Df1 の関与は無いと考えられる。

骨格筋細胞で得られた実験結果とほぼ同様の結果は心筋細胞においても確認されており（文献 6, 7）、MG53 は横紋筋細胞に共通する膜修復機構の鍵分子であることが判明している。心筋細胞では短時間の虚血前処理により、細胞死に対する抵抗性が強化されることが知られている。興味深いことに、MG53 欠損心筋細胞は虚血前処理の効果を示さないことから、その抵抗性強化において MG53 は中心的な役割を有することも示された。

4. 考察

冒頭でも述べたように、膜修復機構の存在は古くから観察されているものの、未だに不明な点が多く残されており、全容解明には程遠い現状である。我々の研究にて膜修復機構の新たな鍵分子である MG53 が見出されたことが突破口となり、近未来にその詳細な分子機序が解き明かされることを期待したい。特に、in vitro の人工的条件下での実験ではあるものの、MG53 のユビキチン E3 リガーゼとしての酵素活性が示されており、どのような基質にユビキチンを導入するのかが、膜修復機構の解明において最大の関心事となるものと思える。また、MG53 欠損マウスが筋ジストロフィー様症状を示すことから、原因不明のヒト筋ジストロフィー患者における MG53 遺伝子変異の有無についても臨床医学研究上の問題となっており、その検索実験が世界各地で着手されている。

5. 発表文献

- 1) Yamazaki, T., Yamazaki, D., & Takeshima, H. *Pharmacol. Ther.* 121, 265-272 (2009).
- 2) Masumiya, H., Asami, Y., Nishi, M., Minamisawa, S., Adachi-Akahane, S., Yoshida, M., Kangawa, K., Ito, K., Kagaya, Y., Yanagisawa, T., Yamazaki, T., Ma, J., & Takeshima, H. *Channels* 3, 6-11 (2009).
- 3) Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J-K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., Pan, Z., Komazaki, S., Brotto, M., Takeshima, H., & Ma, J. *Nature Cell Biol.* 11, 56-64 (2009).
- 4) Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Pan, Z., Nishi, M., Ko, J-K., Komazaki, S., Takeshima, H., & Ma, J. *J. Biol. Chem.* 284, 3314-3322 (2009).
- 5) Cai, C., Weisleder, N., Ko, J-K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., & Ma, J. *J. Biol. Chem.* 284, 15894-15902 (2009).
- 6) Cao, C-M., Zhang, Y., Weisleder, N., Ferrante, C., Wang, X., Lv, F., Zhang, Y., Song, R., Moon, H., Jin, L., Guo, J., Peng, W., Li, G., Nishi, M., Takeshima, H., Ma, J. & Xiao, R-P. *Circulation* 121, 2565-2574, 2010.
- 7) Wang, X., Xie, W., Zhang, Y., Lin, P., Han, L., Han, P., Wang, Y., Chen, Z., Ji, G., Zheng, M., Weisleder, N., Xiao, R-P., Takeshima, H., Ma, J. & Cheng, H. *Circ. Res.* 107, 76-83, 2010.