

はしがき

筋形成に関わる膜分子の網羅的検索と
RNAi による機能解明・遺伝的疾患との関連

(課題番号 15390089)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））
研究成果報告書

平成 17 年 4 月

研究代表者

瀬原 淳子（京都大学 再生医科学研究所 教授）

京 都 大 学 図 書



1050577456

瀬原淳子氏寄贈

附 属 図 書 館

はしがき

本研究は骨格筋形成の形成機構を、その過程にかかわる膜分子および細胞内極性を有する分子を網羅的に検索し、新しい筋形成機構の解明をめざしたものである。

骨格筋の形成には大きくわけて（１）筋芽細胞の増殖と遊走のプロセス（２）分化と凝集のプロセス、（３）細胞同士の融合のプロセス、（４）腱や神経との結合による成熟・維持のプロセスとがある。しかし、それぞれのプロセスの分子機構のみならず、それらが形態形成過程でどの程度独立あるいはリンクしたプロセスなのかすら、現在のところ解明されていないのが現状である。その理由のひとつは、そのいずれの過程においても、細胞間の相互作用が大切な要素であるにもかかわらず、そこにかかわる膜分子、細胞膜および細胞内極性にかかわる細胞内小胞膜などに局在する分子の同定がほとんどできていないことにあると考えられる。

そこで本研究は、骨格筋形成を理解する鍵となる膜分子と細胞内で極性をもって局在する分子の同定に焦点をあてて研究してきた。

研究は主に、（１）自立的に筋管を形成するマウス筋芽細胞株を用いて、分化に伴って活性化されるmRNAを濃縮したサブトラクションライブラリーを作成。その網羅的な検索の中から新しい膜蛋白質を見つけ出す、（２）筋形成に必須の転写因子マイオジェニンのプロモーターにGFPをつないだレポーター遺伝子を作成し、分化後GFP陽性細胞をセルソーターで濃縮し、その細胞のポピュレーションに特異的に反応するモノクローナル抗体を単離する、（３）これまでに見つけた膜型プロテアーゼメルトリンを中心に、筋形成のプロテアーゼ制御に関する研究を進める、という３つのストラテジーを採り、いくつか新規遺伝子の単離やモノクローナル抗体の作成に成功した。この報告書では、その研究経過と成果を報告する。

研究組織

研究代表者：瀬原 淳子（京都大学再生医科学研究所 教授）

研究分担者：栗崎 知浩（京都大学再生医科学研究所 助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	7,900	0	7,900
平成 16 年度	5,900	0	5,900
総 計	13,800	0	13,800

研究発表

（1）口頭発表

Atsuko Fujisawa-Sehara : Roles of ADAMs in ErbB Signalling, Second International Workshop of the SFB549 on Signalling from the ECM to the Nucleus in Animals and Plants 2003 年 2 月 20 日（ドイツ）

Kazuto Kurohara, Tomohiro Kurisaki, Aki Masuda, Shuji Wakatsuki, Yo-ichi Nabeshima, Yoichiro Iwakura, and Atsuko Fujisawa-Sehara : ROLES OF MELTRIN BETA/ADAM19 IN HEART DEVELOPMENT, 第 1 回 CDB シンポジウム－The Origin and Formation of Multicellular Systems 2003 年 3 月 25 日（神戸）

瀬原淳子：細胞間シグナルを制御する ADAM プロテアーゼ、第 56 回日本細胞生物学会大会 2003 年 5 月 16 日（大津）

瀬原淳子：ADAM ファミリープロテアーゼ：形態形成・疾患との関わり、医学研究講義（大学院 Weekly Seminar イブニングセミナー）2003 年 5 月 26 日（鹿児島）

Tomohiro Kurisaki, Kazuto Kurohara, Shuji Wakatsuki, Aki Masuda, Mitsuko Uchida, Kyoko Shirakabe, Kohji Komatsu, Masateru Endo, Naoki Irie, Norihiro Yumoto, Yoichiro Iwakura, Yo-ichi Nabeshima, Atsuko Sehara-Fujisawa : Roles of Meltrins in Morphogenesis, ワークショップ「発生・疾患にかかわる ADAM・ADAMTS プロテアーゼ研究の現状」（オーガナイザー宮田敏行、瀬原淳子）、第 76 回日本生化学会大会 2003 年 10 月 15 日（横浜）

Kazuto Kurohara, Koji Komatsu, Tomohiro Kurisaki, Shuji Wakatsuki, Atsuko Sehara-Fujisawa : ROLES OF MELTRIN BETA IN HEART, シンポジウム「ADAM Family」、3rd General Meeting of the International Ploteolysis Society（第 3 回国際蛋白分解学

会) 2003 年 11 月 11 日 (名古屋)

瀬原淳子：細胞間相互作用における ADAM プロテアーゼ メルトリンの役割と機能、平成 15 年度日本生化学会近畿支部シンポジウム「脂質・糖鎖 vs タンパク質相互作用により制御される細胞内品質管理のダイナミズム」 2003 年 11 月 21 日 (京都)

瀬原淳子：組織構築における膜型 ADAM プロテアーゼの役割、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「細胞分化における細胞間相互作用の変換機構」平成 15 年公開シンポジウム「細胞の分化と組織構築のダイナミズム」 2003 年 12 月 9 日 (京都)

黒原一人、小松紘司、若月修二、富田幸子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鍋島陽一、瀬原淳子：心臓形成におけるメルトリン β /ADAM19 の役割、第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10 日 (神戸)

小松紘司、黒原一人、若月修二、岩倉洋一郎、瀬原淳子：心臓の形態形成における Meltrin β /ADAM19 の機能解析、第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 12 日 (神戸)

湯本法弘、若月修二、瀬原淳子：骨格筋型 AchR サブユニット変換を指標とした筋成熟機構の解析と in vitro における解析系の確率、第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 12 日 (神戸)

Kazuto Kurohara, Kouji Komatsu, Tomohiro Kurisaki, Aki Masuda, Naoki Irie, and Atsuko Sehara-Fujisawa : Essential roles of Meltrin b (ADAM19) in endocardial cushion development, 2004 Keystone Symposia 2004 年 3 月 10 日 (USA)

瀬原淳子：形態形成における ADAM プロテアーゼの役割と機能、第 9 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会 2004 年 7 月 31 日 (名古屋)

瀬原淳子：細胞増殖・分化制御における ADAM プロテアーゼ、メルトリンの役割、平成 16 年度特定領域研究・第 5 回公開シンポジウム「蛋白質分解：新たな展開をめざして」、2004 年 9 月 3 日 (札幌)

Atsuko Sehara : Roles of ADAM proteases in Morphogenesis, Joint Forum IFMS(京大再生研), IMEG(熊大発生研), CDB 2004 年 11 月 22 日 (神戸)

正木めぐみ、栗崎知浩、瀬原淳子；Meltrin α の脂肪細胞分化における機能の解析、第 27 回日本分子生物学会年会 2004 年 12 月 9 日 (神戸)

正木めぐみ、栗崎知浩、若月修二、小松紘司、湯本法弘、増田亜紀、東利圭、

横関智一、黒原一人、富田幸子、瀬原（藤沢）淳子：細胞増殖・分化における ADAM プロテアーゼの役割、第 27 回日本分子生物学会年会 2004 年 12 月 10 日（神戸）

瀬原淳子：形態形成における ADAM プロテアーゼの役割、京都大学再生医科学研究所平成 16 年度学術講演会 2004 年 12 月 17 日（京都）

瀬原淳子：形態形成における ADAM プロテアーゼの役割、臨床研 30 周年記念シンポジウム：新しい生命科学の潮流－臨床研 OB を招いて－ 2005 年 1 月 21 日（東京）

Shuji Wakatsuki, Kazuto Kurohara, Norihiro Yumoto, Koji Komatsu, Atsuko Sehara-Fujisawa : Roles of meltrin beta (ADAM19) in the ectodomain Shedding of neuregulin beta1, a membrane anchored glial growth factor, 2005 Keystone Symposia 2005 年 4 月 1 日（USA）

（2）論文発表

Yumoto, N., Wakatsuki, S., Sehara-Fujisawa, A.. The acetylcholine receptor γ -to- ϵ switch occurs in individual endplates. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2005 (in Press)

Masaki, M., Kurisaki, T., Shirakawa, K., Sehara-Fujisawa, A. Role of Meltrin α (ADAM12) in obesity induced by high-fat diet. *Endocrinology*, 2005; 146(4): 1752-63

Watabe-Uchida, M., Masuda, A., Shimada, N., Endo, M., Shimamura, K., Yasuda, K., and Sehara-Fujisawa A.. Novel Metalloprotease-Disintegrin, Meltrin ϵ (ADAM35), Expressed in Epithelial Tissues during Chick Embryogenesis. *Dev. Dynamics*, 2004; 230: 557-568

Wakatsuki, S., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A.. Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated Meltrin β /ADAM19 *J. Neurochemistry*, 2004; 89(1): 119-23

Kurohara, K., Komatsu, K., Kurisaki, T., Masuda, A., Irie, N., Asano, M., Sudo, K., Nabeshima, Y., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A. Essential Roles of Meltrin β / ADAM19 in Heart Development. *Developmental Biol.* 2004; 267: 14-28

Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Nabeshima, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Sehara-Fujisawa, A.. Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(1): 55-61.

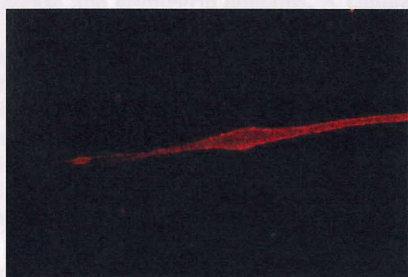
Kurisaki, T., Wakatsuki, S., Sehara-Fujisawa, A.. Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. *FEBS Lett.* 2002; 532(3): 419-22.

Meltrin β mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells

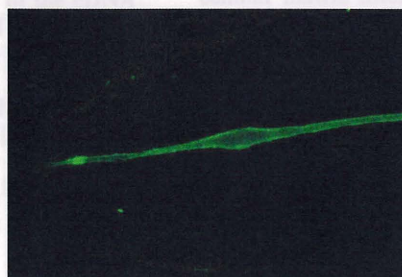
Tomohiro Kurisaki¹, Shuji Wakatsuki², Atsuko Sehara-Fujisawa¹

研究成果

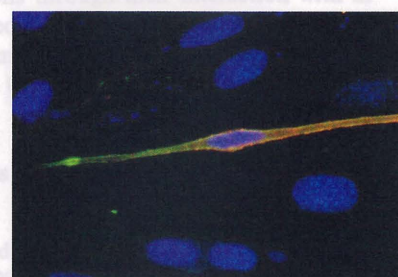
(1) マウス筋芽細胞株の分化に伴って活性化される遺伝子の同定
マウス筋芽細胞と、分化初期細胞を用いて、サブトラクションライブラリーを作成。その網羅的な検索の中から新しい膜蛋白質を見つけ出した。それらの膜蛋白質の中から特に新規性の高いものを選んで、現在、過剰発現や siRNA による機能解析と、ノックアウトマウスの作成を行っている。



新規膜蛋白質に対する抗体による筋細胞の染色



HA-タグに対する抗体染色



重ね合わせた染色像
(青は DAPI)

(2) 分化初期膜蛋白質を認識するモノクローナル抗体の作成

筋形成に必須の転写因子マイオジェニンのプロモーターに GFP をつないだレポーター遺伝子を作成し、分化後 GFP 陽性細胞が効率的に筋形成を行うことを見いだすと同時に、筋分化細胞にきわめて特異的な表面マーカーを見つけ出し、この表面マーカー陽性、マイオジェニンプロモーターGFP 陽性細胞をセルソーターで濃縮した。そして、その細胞のポピュレーションに特異的に反応するモノクローナル抗体を単離した。

その中で、発生過程で筋形成に伴って活性化される膜分子を認識する抗体をスクリーニングし、約 30 クローンに絞った。さらに、上記細胞のソーティングの系で、筋形成効率を著しく上昇させるモノクローナル抗体 3 クローンを選び出した。現在、その同定と機能を解析している。

(3) ADAM ファミリープロテアーゼによる筋形成制御

また、筋分化誘導系を作成し、それを用いてクローニングした ADAM ファミリーに属する膜分子メルトリン α 、 β に関して、メルトリン α は筋形成および脂肪組織形成にかかわり、細胞増殖を制御する因子であることを見だし、(Kurisaki *et al.*, *Mol.Cell.Biol.*, 2003; Masaki *et al.*, *Endocrinol.*, 2005)、メルトリン β もそのプロテアーゼドメインを介して筋形成に関わる

ことなどを明らかにした (Kurohara *et al.* *Developmental Biol.*, 2004)。さらに、筋節・レンズ・耳胞上皮に特異的活性化される ADAM ϵ のクローニングに成功し (Watabe-Uchida *et al.*, *Dev Dynamics*, 2004)、この分子が筋節上皮などのbasal側に局在することを見いだした。