

# 心筋細胞におけるタンパク質凝集体の構成分子と形成機序の解明

吉岡 望

日本歯科大学 新潟生命歯学部 解剖学第1講座

## 【研究の背景】

Dystonin (DST) は、細胞構造の維持や細胞接着に寄与する細胞骨格連結タンパク質であり、神経型の DST-a、筋肉型の DST-b、皮膚型の DST-e という3種類のアイズフォームが存在する (Yoshioka et al., Anat Sci Int, 2024)。DST-a/b 遺伝子変異により発症する遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー6型 (HSAN-VI) や、DST-e 遺伝子変異により発症する単純型表皮水疱症などが知られていたが、筋組織における DST-b の役割については不明であった。これまでに研究代表者は、筋肉型の Dst-b アイズフォームに特異的な遺伝子変異マウスを作製して、高齢の Dst-b 変異マウスにおいて p62 やユビキチンを含むタンパク質凝集体の形成を伴うミオパチーと心筋症を見出し、Dst-b が横紋筋の維持に必須である事を報告した (Yoshioka et al., eLife, 2022)。一方で、Dst-b 変異マウスの心筋細胞に形成される蛋白質凝集体の形成機序や構成分子については不明であり、DST 遺伝子変異による遺伝性心疾患の病態解明に向けた研究が求められている。

## 【目 的】

我々は、高齢の Dst-b 変異マウスの心筋細胞において p62 やユビキチンを含むタンパク質凝集体が形成されることを見出し、Dst-b 変異マウスの心筋細胞でのトランスクリプトーム解析により、小胞体ストレス応答に関わる遺伝子群の発現上昇が示されている。本研究では、異常タンパク質のリフォールディングに関わる小胞体ストレス応答や、分解処理に関わるオートファジーに着目し、Dst-b 変異マウスの心筋細胞に形成される蛋白質凝集体の形成機序と構成分子の検証することで、遺伝性心疾患の病態機序の解明を目的とした。

## 【方 法】

### 【① Dst-b 変異マウスの心筋組織における分子発現解析】

4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定した Dst-b 変異マウスの心臓をパラフィン包埋して、ロータリーマイクロームを用いて 10  $\mu$  m 厚のパラフィン切片を作成した。脱パラしたパラフィン切片に対して、抗 p62 抗体、抗 HspA1L 抗体、抗 Hsp25 抗体、抗 MVP 抗体などの一次抗体を反応させて免疫組織化学を実施した。

### 【② Dst-b 変異マウスの心筋組織からの核分画の調整】

タンパク質凝集体を含む核分画を精製するために、Dst-b 変異マウスの心筋組織から Nuclear Extract Kit (Active Motif) を使用して、細胞質分画と核分画を調整した。ウェスタンブロットにより核分画の純度を検証した上で、プレパラート上に核分画を固定して、p62 や Sumo2/3、LaminA/Cなどを免疫染色することで、タンパク質凝集体が核分画に含まれるかを検証した。

## 【結 果】

### 【① Dst-b 変異マウスの心筋組織における分子発現解析】

Dst-b 変異マウスの心筋組織において発現上昇する小胞体ストレス応答関連遺伝子のうち、熱ショックタンパク質の Hsp25

と HspA1L の分布を調べたところ、Hsp25 が細胞質に凝集するのに対して、HspA1L が核内に凝集した(図 1)。また p62 の核内凝集体と HspA1L は完全には一致しないことから、HspA1L 凝集体は p62 凝集体とは別の構造として形成された。

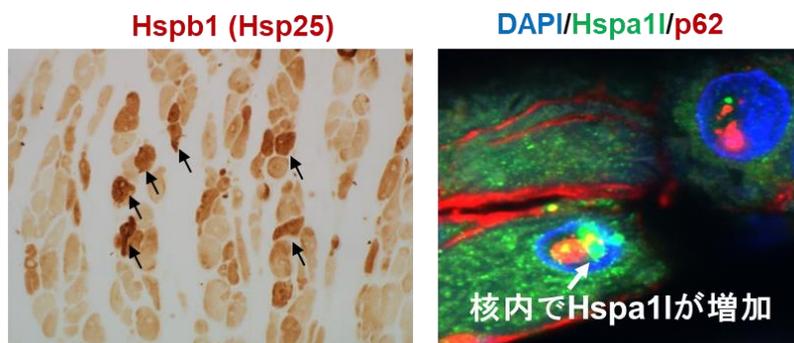


図1:Hsp25とHspA1Lが心筋細胞に凝集した。

次に、オートファジー関連分子の発現解析を行った。過去の報告から p62 体を介した選択的オートファジーの基質として細胞内小器官のヴォルト(vault)が知られており、オートファジー機能低下によって、ヴォルトが異常に蓄積することが報告されている(Kurusu et al., Dev Cell, 2023)。今回、ヴォルトの主要構成分子である MVP (Major vault protein)が、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞に異常に蓄積した(図 2)。この結果は、p62 体を介した選択的オートファジーの機能不全を示唆している。

### MVP(major vault protein)

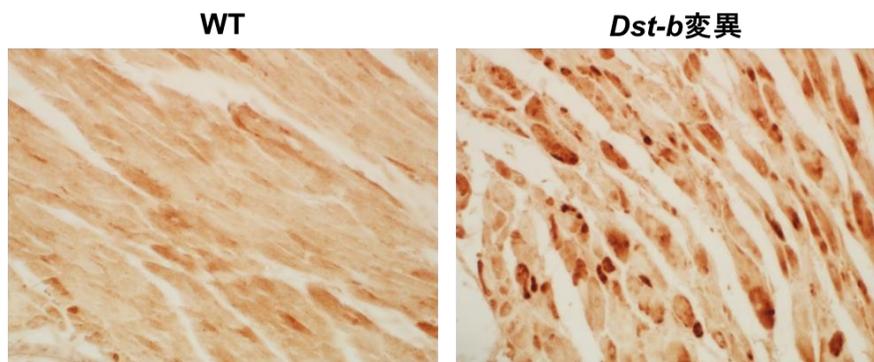


図2: *Dst-b*変異マウスの心筋細胞では、選択的オートファジーによるヴォールの分解処理不全が示唆された。

#### 【② *Dst-b* 変異マウスの心筋組織からの核分画の調整】

また細胞質と核内に凝集するタンパク質を区別して解析するために、心筋組織から細胞質分画と核分画を調整した。*Dst-b* 変異マウスの心筋組織から調整した核分画内では、組織切片と同様に p62 ならび Sumo2/3 陽性の凝集体が観察された(図 3)。この結果から、タンパク質凝集体を有した状態の核分画の調整法を確立できた。

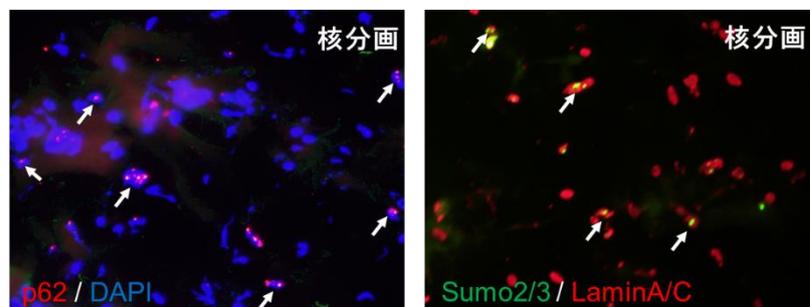


図3: *Dst-b*変異マウスの心筋組織の核分画において p62とSumo2/3陽性のタンパク質凝集体が検出された

## 【考 察】

研究代表者が解析している *Dst-b* 変異マウスは、*Dst-b* アイソフォームのみを選択的に欠失する世界で唯一のモデル動物であり、骨格筋と心筋の変性を伴うミオパチーと心筋症を発症することから横紋筋の維持における *Dst-b* アイソフォームの重要性が明らかになっていたが(Yoshioka et al., eLife, 2022)、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞に形成されるタンパク質凝集体については、その形成機序や構成分子などは十分に分かっていない。

本研究において、心筋細胞におけるタンパク質凝集体の構成分子として、MVP を初めて同定した。MVP は選択的オートファジーの基質である細胞内小器官のヴォルトの構成分子であり、オートファジー機能不全によって組織内に蓄積することが報告されている(Kurusu et al., Dev Cell, 2023)。MVP 以外にもオートファジーに関連する幾つかの分子が蓄積することも確認しており、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞ではオートファジー機能不全がタンパク質凝集体の形成に関与すると考えられた。

さらに本研究では、熱ショックタンパク質である Hsp25 と HspA1L の其々が *Dst-b* 変異マウスの細胞質と核内に凝集することを示した。熱ショックタンパク質は、不良タンパク質の蓄積による小胞体ストレス応答により誘導されることで、不良タンパク質のリフォールディングにより細胞生存に関与する。今回の結果は、不良タンパク質の増加に対する補償的な作用と考えられる。

今回、心筋組織から細胞質と核を分画することで、タンパク質凝集体を持つ核分画の精製に成功した。

核内に p62 や Sumo の蓄積を伴う疾患として、核内封入体病(NIID:Neuronal intranuclear inclusion disease)がある。この疾患では、質量分析による蛋白質解析から、核内封入体病の核内で発現上昇する分子が報告されている(Park et al., Acta Neuropathol Comm, 2022, Kurihara et al., Neurobiol Dis, 2023)。今後、核分画の更なる解析や論文報告によって核内封入体に蓄積する分子について、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞に形成される蛋白質凝集体の分子の実体や生理的意義などの解明が期待される。今後、細胞質と核分画における不溶性画分からのタンパク質精製などにより、細胞質と核内のタンパク質凝集体の性状の違いや形成機序についてより詳細な解析が必要となる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回、*Dst-b* 変異マウスにおいて、オートファジーによる自食作用や小胞体ストレス応答による不良タンパク質のリフォールディングの変化が、心筋細胞でのタンパク質凝集体の形成に寄与することが示唆された。これまでにオートファジーの機能亢進によって、タンパク質凝集体の形成に付随した心筋細胞変性が軽減することが知られている(Tannous et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008)。またシャペロン分子の *Cryab* 遺伝子変異によって、タンパク質凝集を伴う心筋症を発症することも報告されており、小胞体ストレス応答の変化が、タンパク質凝集の中核をなす機序として働く可能性がある(Wang et al., Circ Res, 2003)。将来、オートファジーや小胞体ストレス応答を亢進することでタンパク質凝集を防止することが出来れば、タンパク質凝集体の形成を伴う心筋症に対する革新的な治療法に繋がると期待される。*DST* 遺伝子からは、神経型の *DST-a* と筋肉型の *DST-b* が産生されることが知られており、これまでに *DST-a* の欠失による遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー 6 型(HSAN-VI)の患者では、心血管系の反射異常などが報告されている(Manganelli et al., Neurology, 2017)。研究代表者は、神経回路選択的に *Dst* 発現を操作できる条件付き遺伝子トラップマウスにおいて末梢神経選択的な *Dst* cKO マウスを作製している(Yoshioka et al., Sci Adv, 2024)。末梢神経選択的な *Dst* cKO マウスにおいて心拍調節異常などを確認している。これらの動物モデルを包括的に解析することで、神経系と筋肉系に発現する各々の *DST* アイソフォームがどの様に心血管系の維持に寄与しているかを解明し、*DST* 遺伝子変異に起因する多様な疾患の病態を明らかにしていく。

## 【参考・引用文献】

- ① Kurusu R, Fujimoto Y, Morishita H, Noshiro D, Takada S, Yamano K, Tanaka H, Arai R, Kageyama S, Funakoshi T, Komatsu-Hirota S, Taka H, Kazuno S, Miura Y, Koike M, Wakai T, Waguri S, Noda NN, Komatsu M. Integrated proteomics identifies p62-dependent selective autophagy of the supramolecular vault complex. *Dev Cell*. 2023 58(13):1189-1205.e11.
- ② Manganelli F, Parisi S, Nolano M, Tao F, Paladino S, Pisciotta C, Tozza S, Nesti C, Rebelo AP, Provitera V, Santorelli

- FM, Shy ME, Russo T, Zuchner S, Santoro L. Novel mutations in dystonin provide clues to the pathomechanisms of HSAN-VI. *Neurology*. 2017 30;88(22):2132–2140.
- ③ Park H, Yamanaka T, Toyama Y, Fujita A, Doi H, Nirasawa T, Murayama S, Matsumoto N, Shimogori T, Ikegawa M, Haltia MJ, Nukina N. Hornerin deposits in neuronal intranuclear inclusion disease: direct identification of proteins with compositionally biased regions in inclusions. *Acta Neuropathol Commun*. 2022 4;10(1):28.
- ④ Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, Shelton JM, Rajasekaran NS, Benjamin IJ, Nguyen L, Gerard RD, Levine B, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 15;105(28):9745–9750.
- ⑤ Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J. AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ Res*. 2003 14;93(10):998–1005.
- ⑥ Yoshioka N, Kurose M, Yano M, Tran DM, Okuda S, Mori-Ochiai Y, Horie M, Nagai T, Nishino I, Shibata S, Takebayashi H: Isoform-specific mutation in Dystonin-b gene causes late-onset protein aggregate myopathy and cardiomyopathy. *eLife*, 9;11:e78419. doi: 10.7554/elife.78419, 2022.
- ⑦ Yoshioka N: Roles of Dystonin isoforms in the maintenance of neural, muscle, and cutaneous tissues. *Anat Sci Int*. 99(1):7–16, 2024.
- ⑧ Yoshioka N, Kurose M, Sano H, Tran DM, Chiken S, Tainaka K, Yamamura K, Kobayashi K, Nambu A, Takebayashi H: Sensory-motor circuit is a therapeutic target for dystonia musculorum mice, a model of hereditary sensory and autonomic neuropathy 6. *Sci Adv*. 26;10(30):eadj9335. 2024.