

## 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*) 遺伝子は、神経型の *DST-a*、筋肉型の *DST-b*、皮膚型の *DST-e* という 3 種類のアリソフォームを発現し、各々のアリソフォームは細胞骨格連結タンパク質として細胞接着や細胞構造を維持する (Yoshioka et al., *Anat Sci Int*, 2024)。これまでに *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 VI 型 (HSAN-VI) や、*DST-e* 遺伝子変異により発症する表皮水疱症が報告されていたが、筋肉型の *DST-b* アリソフォームの機能については不明であった (Edvardson et al., *Ann Neurol*, 2012; Groves et al., *J Invest Dermatol*, 2010)。これまでに我々は、筋肉型の *Dst-b* アリソフォームに特異的な遺伝子変異マウスにおいて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* が筋線維の長期的な維持に寄与する事を初めて報告した (Yoshioka et al., *eLife*, 2022)。今年となり *DST-b* 遺伝子変異に起因する先天性ミオパチーと心筋症が初めて報告されたことで、主要な *DST* アリソフォームの全てが、何らかの疾患と関連することが示された (Jacob et al., *Brain*, 2025)。この論文では我々が報告した *Dst-b* 変異マウスの知見に基づいて *DST-b* 変異に起因する筋病理が解明された。この様に我々のモデル動物を用いた研究が、新たな遺伝性筋疾患の発見に繋がっている。一方で、我々が *Dst-b* 変異マウスの心筋細胞で見出した蛋白質凝集体については、*DST-b* 変異を有する患者において心筋組織の病理解析が行われていないために詳細は不明である。

### 【目 的】

我々は、高齢の *Dst-b* 変異マウスの心筋細胞の核において p62、ユビキチン、Sumo を含むタンパク質凝集体が形成されることを報告している。前年度までに *Dst-b* 変異マウスの心筋細胞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異常によってタンパク質凝集体が形成されることを示唆する結果を得た。今年度は、*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の構成分子や凝集体形成に寄与する分子経路を解明するために、*Dst-b* 変異マウスの心筋組織から調整した細胞質分画および核分画における LC-MS/MS での質量分析データを解析した。これにより *DST-b* 変異によるヒトの先天性心筋症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からの核分画の調整】

心筋組織から細胞質分画と核分画を精製するために、野生型 (WT) マウスと *Dst-b* 変異マウスの心筋組織から Nuclear Extract Kit (Active Motif) を用いて、細胞質分画と核分画を調整した。各々の分画からタンパク質を抽出し、①ウェスタンブロットリングによるタンパク質発現解析ならびに②トリプシン消化した精製ペプチドの質量分析装置による LC-MS/MS 分析を実施した。更に、得られたデータを用いて遺伝子オントロジー解析を実施した。

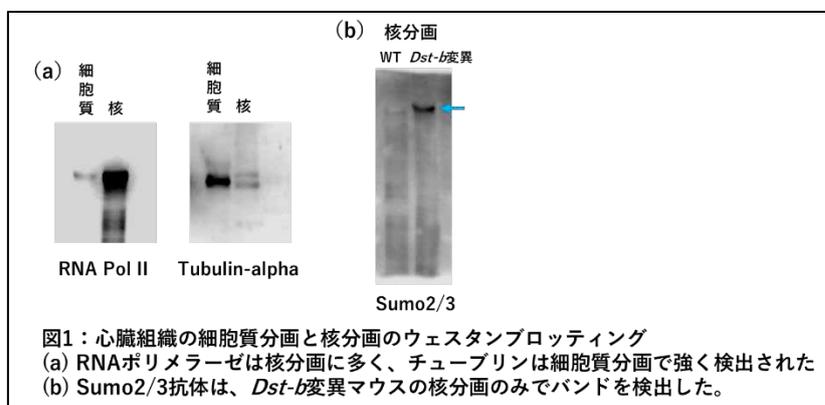
#### 【② *Dst-b* 変異マウスの心臓組織の形態解析】

WT マウスと *Dst-b* 変異マウスの心臓組織から作製したパラフィン切片において免疫組織化学を実施した。

## 【結 果】

【① *Dst-b* 変異マウスの心筋組織からの細胞質分画と核分画を用いたタンパク質発現解析】

ウェスタンブロッティングの結果、心筋組織の細胞質分画と核分画では、細胞骨格の Tubulin は細胞質分画に多く存在し、RNA ポリメラーゼは核分画に多く存在することが確認された(図 1a)。この結果から、細胞質成分と核成分を分画ごとに分離できていることを確認した。さらに *Dst-b* 変異マウスの心筋細胞の核内に形成されるタンパク質凝集体に含まれる Sumo2/3 の発現をウェスタンブロッティングで検出すると、*Dst-b* 変異マウスの核分画のみでバンドが検出された(図 1b)。



質量分析によって定量したペプチド存在量をもとに細胞質分画と核分画でのペプチドの存在比を調べた結果、WT マウスと *Dst-b* 変異マウスの両方で、リボソーム構成蛋白質である Rps と Rpl が細胞質分画と比べて、核分画に豊富に存在した。Rps と Rpl は核小体に豊富に存在するため、質量分析の結果からも細胞質成分と核成分が分画ごとに分離できていることを確認できた。次に *Dst-b* 変異マウスと WT マウスの間で、細胞質分画と核分画の其々に含まれるペプチドの存在比を比較した。

前年度には、小胞体ストレス応答に関与する熱ショックタンパク質のなかでも低分子量ストレスタンパク質の Hspb1 (Hsp25) が *Dst-b* 変異マウスの細胞質に凝集することを見出していた。質量分析の結果では、WT の細胞質分画と比べて *Dst-b* 変異マウスの細胞質分画で Hspb1 の存在量が多かった。さらに、その他の低分子量ストレスタンパク質である Hspb3、Hspb5、Hspb6、Hspb7 の存在量も *Dst-b* 変異マウスで多かった。さらに、*Dst-b* 変異マウスの筋線維に凝集体を形成する Desmin の存在量も WT の細胞質分画と比べて *Dst-b* 変異マウスの細胞質分画において多かった。

次に核分画において、WT よりも *Dst-b* 変異マウスで存在量の多いタンパク質を調べたところ、細胞質分画において存在比が大きかった低分子量ストレスタンパク質を含めた Hsp 分子は、核分画では WT と *Dst-b* 変異で大きな違いは見られなかった。一方で現在までの筋線維においてタンパク質凝集体の構成分子として報告のある Myotilin の存在量が WT の核分画と比べて *Dst-b* 変異マウスの核分画で多かった。また *Dst-b* 変異マウスの核分画には WT の核分画と比べて、ミトコンドリアでの電子伝達経路に関係するタンパク質が豊富に存在した。

【② *Dst-b* 変異マウスの心臓組織の形態解析】

細胞質分画での質量分析によって WT よりも *Dst-b* 変異マウスで存在量が多かった分子 (Hspb1 と Desmin) については、前年度までの解析結果によって *Dst-b* 変異マウスの心筋細胞の細胞質において凝集することを明らかにしている。一方で、核分画に多く存在した Myotilin の免疫染色では、心筋細胞の核内に形成されるタンパク質凝集体は染色されなかった。

## 【考 察】

本解析によって、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞の細胞質では、Hspb1、Hspb3、Hspb5、Hspb6、Hspb7 の存在量が増加することが示された。これらの低分子量ストレスタンパク質は、様々なストレスにより発現上昇することが知られており、心筋細胞におけるタンパク質凝集体の軽減に寄与すると報告されている。従って、これらの熱ショックタンパク質の発現亢進は、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞におけるタンパク質凝集体の形成に対して補償的に作用すると考えられる。昨年度の解析によって、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞において小胞体ストレス応答と自食反応(オートファジー)に関連したタンパク質の凝集が確認さ

れていた。今回の解析結果からも、オートファジーまたはリフォールディングによって異常タンパク質を処理することで、*Dst-b* 変異マウスの心筋細胞におけるタンパク質凝集体の形成を抑えていると考えられた。今回の質量分析によって、細胞質に凝集することが分かっている幾つかのタンパク質 (Hspb1, Desmin) の細胞質分画での存在量の増加が示されたことは、細胞質に形成されるタンパク質凝集体の構成分子の同定ならび作用機序の解明において、質量分析を用いたプロテオーム解析の有効性を示唆している。一方で核分画の質量分析の結果からは、心筋細胞の核内に形成されるタンパク質凝集体の構成分子を同定するには至っていないが、現在も核内凝集体の形成に寄与する構成分子を探索している。現在までに核内凝集体に蓄積することが分かっている p62 と Sumo2/3 については核分画で存在量の変化は認められておらず、単純な存在量の変化ではなく、タンパク質修飾による質的な変化が核内凝集体の形成に寄与する可能性がある。Sumo2/3 抗体によるウェスタンブロットングでは、*Dst-b* 変異マウスの核分画のみで検出されるバンドも見つかっており、切り出したバンド領域の質量分析によって、Sumo 修飾を受けたタンパク質を同定することで、核内凝集体の構成分子が明らかになると期待される。今後、*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の更なる解明が必要である。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

我々が作製した *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を世界で初めて明らかにした (Yoshioka et al., eLife, 2022)。この研究は、今年となってヒトでの *DST-b* 変異により発症する先天性ミオパチーと拡張型心筋症の患者の発見にも繋がった (Jacob et al., Brain, 2025)。*DST* 遺伝子は、転写開始点の違いと選択的スプライシングによって、神経型の *DST-a*、筋肉型の *DST-b*、皮膚型の *DST-e* の 3 種類の主要なアイソフォームが知られており、神経疾患の遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー VI 型 (HSAN-VI) と皮膚疾患の表皮水疱症が報告されたが、筋疾患のみは未報告であった。我々のモデル動物の研究が切っ掛けとなり、ヒトでの先天性ミオパチーと拡張型心筋症が発見されたことは、我々の研究が臨床へ大きな貢献をしたと言える。今後、*DST-b* 変異に起因するミオパチーと心筋症の病態機序を理解する上で、我々の所有する *Dst-b* 変異マウスの果たす役割は大きい。今回の研究によって、心筋組織におけるオートファジーや小胞体ストレス応答の異常を見つけることが出来た。今後、ヒトでも同様の分子経路に着目した病態解明や治療法の開発が期待される。

### 【参考・引用文献】

- ① Edvardson S, Cinnamon Y, Jalas C, Shaag A, Maayan C, Axelrod FB, Elpeleg O. Hereditary sensory autonomic neuropathy caused by a mutation in dystonin. *Ann Neurol*. 2012. 71(4):569-572.
- ② Groves RW, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Markus HS, Lovell PA, Ozoemena L, Lai-Cheong JE, Gawler J, Owaribe K, Hashimoto T, Mellerio JE, Mee JB, McGrath JA. *J Invest Dermatol*. 2010. Jun;130(6):1551-1557.
- ③ Jacob M, Kölbl H, Harrer P, Kopajtich R, Munot P, Achleitner MT, Badmann S, Brugger M, Brunet T, Bonne G, Codina M, Ebner L, Eshraghi P, Eyring K, Farhat AS, Feichtinger RG, Graf E, Marcé-Grau A, Hahn A, Houlden H, Karimiani EG, Manel V, Mayerhanser K, Nectoux J, Nelson I, Phadke R, Prokisch H, Sadeghian S, Saparov A, Schänzer A, Schara-Schmidt U, Schmidt J, Schuler R, Sewry C, Shariati G, Slanz S, Smirnov D, Sukenik-Halevy R, Tajsharghi H, Toosi MB, Trujillano L, Weis J, Wilson LC, Ben Yaou R, Zamani M, Zech M, Zschüntzsch J, Kornak U, Gómez-Andrés D, Maroofian R, Winkelmann J, Roos A, Distelmaier F, Mayr JA, Wagner M. Deciphering *DST*-associated disorders: biallelic variants affecting *DST-b* cause a congenital myopathy. *Brain*. 2025. 11:awaf227. doi: 10.1093/brain/awaf227.
- ④ 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*, 2022. 9;11:e78419. doi: 10.7554/elife.78419.
- ⑤ Yoshioka N: Roles of *Dystonin* isoforms in the maintenance of neural, muscle, and cutaneous tissues. *Anat Sci Int*. 2024. 99(1):7-16.
- ⑥ 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.* 2024. 26;10(30):eadj9335.