

博士論文

論文題目 筋強直性ジストロフィーにおける
筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 1 のスプライシング異常

氏名 趙 一夢

目次

I. 略語	3
II. 序章	5
III. 第一章 <i>SERCA1</i> の選択的スプライシング制御機構解析	
1.1 序論	9
1.2 方法	12
1.3 結果	14
1.4 考察	20
IV. 第二章 <i>SERCA1</i> スプライスバリエントの機能解析	
2.1 序論	23
2.2 手法	34
2.3 結果	43
2.4 考察	55
V. まとめ	60
VI. 参考文献	61
VII. 謝辞	69

I . 略語

AcGFP	Aequorea coerulescens Green Fluorescent Protein
ADP	Adenosine diphosphate
AMPPCP	Adenylyl imidodiphosphate, adenylylimidodiphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair(s)
C	Cytosine
Ca _v 1.1	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CDM	Congenital myotonic dystrophy
cDNA	Complementary DNA
CELF	CUG-BP and ETR-3-like factor
CMV	Cytomegalovirus
DM	Myotonic dystrophy (<i>Dytrophia Myotonica</i>)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMPK	Dystrophia myotonica protein kinase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
Fw	Forward
G	Guanine
HSA	Human skeletal α -actin gene
HRP	Horseradish peroxidase
IRES	Internal ribosome entry sites
kDa	kiloDalton
M	mol/L
MBNL1	Muscle blind-like protein 1

MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
PKC	Protein kinase C
pH	Potential Hydrogen
PLN	Phospholamban
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
Rv	Reverse
RyR1	Ryanodine receptor 1
SERCA1	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase1
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
SLN	Sarcolipin
T	Tyrosine
TEV	Tobacco Etch Virus
TG	Thapsigargin
Tris	Hydroxymethyl aminomethane
U	Urasil
UTR	Untransted region

表 1 アミノ酸略称まとめ

略		略		略	
A	alanine	I	isoleucine	R	arginine
C	cysteine	K	lysine	S	serine
D	aspartic acid	L	leucine	T	threonine
E	glutamic acid	N	asparagine	V	valine
F	phenylalanine	P	proline	Y	tyrosine
G	glycine	Q	glutamine		

II. 序章

・はじめに

Ca^{2+} は我々体内で炭素、酸素、窒素、水素に次いで五番目に多い元素で、最も大量に存在する金属元素である。体重のおよそ 2%を占め、その内 99%は骨や歯として存在する。残りの 1%は、筋収縮、分泌、細胞増殖や細胞死において、極めて重要なセカンドメッセンジャーとして働く。

厳密な細胞質内 Ca^{2+} 濃度制御を可能とするため、平時、細胞内の Ca^{2+} は低く抑えられている(1×10^{-7} M)。骨格筋においては、放出シグナルが伝わって来た時のみ、小胞体/筋小胞体に蓄えられた Ca^{2+} は、細胞質内に放出され、タンパク質と相互作用して機能する。

・筋収縮における Ca^{2+} の役割

筋収縮において Ca^{2+} は欠かせない陽イオンである。筋収縮の際、シナプスから伝わって来た興奮は、T管を介して電位依存性 Ca^{2+} チャネル Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit ($\text{Cav}1.1$)に伝わる。すると、 $\text{Cav}1.1$ と機械的に結合している筋小胞体上のリアノジン受容体 Ryanodine receptor 1 (RyR1)が活性化され、筋小胞体内に貯蔵されている大量の Ca^{2+} が細胞質に流入する。放出された Ca^{2+} は細胞質 Ca^{2+} 濃度を 10^{-6} M以上にまで増大させる。結果、 Ca^{2+} とトロポニン Cとの結合が起こり、抑制されていたミオシン・アクチンの相互作用が引き起こされ、筋肉が収縮する。細胞質中に放出された大量の Ca^{2+} は、次の収縮に備えて速やかに筋小胞体内へ、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)によって取り込まれる。これにより、細胞質中の Ca^{2+} 濃度は元のレベルまで減少し、筋肉は弛緩する。

・ SERCA ファミリー

SERCA は、 Ca^{2+} の濃度勾配に逆らって、ATP の加水分解により、能動的に Ca^{2+} を筋小胞体内に汲み上げる P 型イオンポンプである。大量の Ca^{2+} を速やかに汲み上げる必要があるため、筋小胞体膜タンパク質中、最も大量に存在し、筋収縮において重要な役割を果たす。

SERCA ファミリーは、三つの遺伝子から成り、それぞれ更に選択的スプライシングによっていくつかのアイソフォームに分けられる。SERCA1~3 は相同性が 75~85%と高い。SERCA1 は骨格筋速筋の筋小胞体に発現し、成人型の SERCA1a と幼若型の SERCA1b が存在する。SERCA2 には、骨格筋遅筋と心筋に発現する SERCA2a とユビキタスに発現する SERCA2b がある。SERCA3 にはいくつかのアイソフォームがあり、主に上皮や血管内皮細胞などの Ca^{2+} の細かい濃度調節が必要な非筋肉細胞の小胞体に発現している。

・ SERCA1

SERCA1 は、エクソン 22 の選択的スプライシングによって、SERCA1a と SERCA1b の二つのアイソフォームに転写される。両アイソフォームはそれぞれタンパク質に翻訳され、SERCA1a はエクソン 22 上のストップコドンにより、994 アミノ酸、SERCA1b はそれより 7 アミノ酸長く、8 アミノ酸異なった 1001 アミノ酸から成り、C 末に特異的な親水性尾部を持つ(図 1)。1986 年の論文では、先に幼若型の SERCA1b が報告され (Brandl *et al.*, 1986)、その約半年後に SERCA1a がクローニングされた (Brandl *et al.*, 1987)。両アイソフォームの発現が時期特異的に制御されていること、つまり新生児では、SERCA1b が主として発現し、発生過程において、成人型の SERCA1a に移行することも 1987 年に報告された (Brandl *et al.*, 1987)。しかしながら、SERCA1b 尾部のわずか 8 アミノ酸の機能や両アイソフォームの機能的差異に関しては、最初のクローニングの論文で SERCA1b の特徴的な親水性尾部が言及されながらも、1988 年の論文では活性差を確認することが出来なかったと報告されている (Maruyama *et al.*, 1988)。

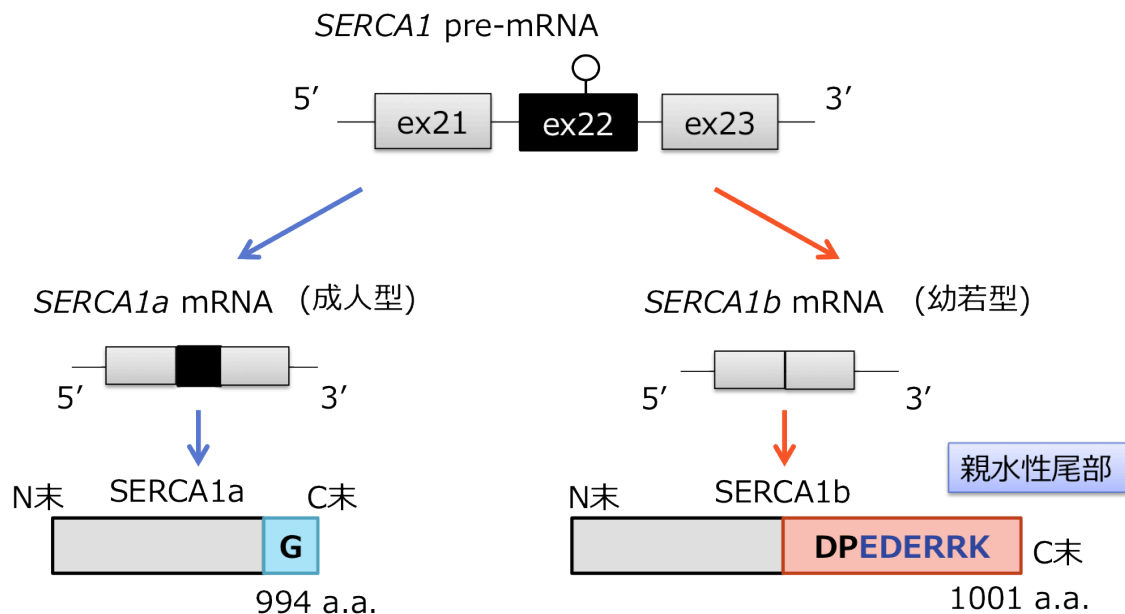


図 1 *SERCA1* のスプライスバリエント

SERCA1 の最終エクソンはエクソン 23。*SERCA1a* の G は 994 番目のアミノ酸のグリシンを表す。*SERCA1b* の一番左側の D は 994 番目のアミノ酸のアスパラギン酸を表す。ex はエクソン、a.a. はアミノ酸、青文字は親水性アミノ酸を表す。

これ以降、*SERCA1a* に関してはウサギの大腿筋から大量かつ簡便に精製されることから、数多くの生化学的・構造学的解析がなされ、機能が詳細に解析されてきた(Wuytack *et al.*, 2002, Kosk-Kosicka, 2005)。一方、*SERCA1b* は大きく注目されることなく、年に 1 報程、論文が発表されるのみで、また、*SERCA1a* との比較が再びなされることはなかった。

• *SERCA1b*

SERCA1b が再び注目されるようになったのは、筋強直性ジストロフィー(DM)という遺伝性筋疾患の研究による。DM の歴史や詳細は第一章の序論で記述するが、2005 年、この病気で *SERCA1* のスプライシング異常(mRNA レベルでの *SERCA1b* の異常発現)が見つかった(Kimura *et al.*, 2005)。DM の分子機構が研究されていく過程で、*SERCA1* のスプライシング制御機構についても理解が深まり、健常者の成人骨格筋では、*SERCA1a* のみが発現するよう、厳密に制御されていることが分かった(Hino *et al.*, 2007)。

また、DM では *SERCA1* 以外にも、 Ca^{2+} ホメオスタシスに関わる重要な遺伝子(*RyR1*, *Ca_v1.1*)のスプライシング異常が報告されており(Kimura *et al.*, 2005, Tang *et al.*, 2012)、患者筋においても、細胞質内の Ca^{2+} 濃度の上昇が報告された(Jacobs *et al.*, 1991)。複数の Ca^{2+} に関わる遺伝子のスプライシング異常が発見されたため、*SERCA1* のスプライシング異常と筋症状とを短絡的に結びつけることは出来ないが、症状に寄与している可能性が高まった。

しかしながら、上記の DM における Ca^{2+} ホメオスタシスの乱れに関する論文では、*SERCA1* のスプライシング異常には言及するものの、タンパク質レベルでの *SERCA1b* の発現や、両アイソフォームの活性差を示すデータはなかった。

・ 本論文の概要

本論文で私は、以上の背景を踏まえ、*SERCA1* のスプライシングがどのように制御されているのか、なぜ制御される必要があるのかに興味を持ち、研究を行った。第一章では、*SERCA1* の選択的スプライシングの制御機構の解明を試みた。その結果、タンパク質キナーゼ C(PKC)や DM 病態に深く関わるスプライシング制御因子(CELF1)による制御機構の一部を明らかにした。第二章では、DM 患者において、*SERCA1b* のタンパク質レベルでの発現異常を確認した上で、哺乳類で両アイソフォームが厳密に保存されていること、発生特異的に発現が認められること、更に *SERCA1b* の C 末端にある特異的な親水性アミノ酸が集まった尾部の存在から、*SERCA1* のタンパク質そのものに着目した。30 年近く機能が等しいとされてきた *SERCA1* の二つのスプライスバリエント、*SERCA1a* と *SERCA1b*、の機能を生化学的手法によって比較したところ、両アイソフォームにおける大きな活性の差異を見出し、その差異をもたらす機構についても、若干の示唆を加えることが出来た。

Ⅲ. 第一章

1.1 序論

1.1.1 はじめに

筋強直性ジストロフィーという病気では、*SERCA1* のスプライシング異常が報告されている。本章では、そのスプライシング制御機構の解明を試みた。

1.1.2 筋強直性ジストロフィー

筋強直性ジストロフィー(Myotonic Dystrophy, DM)は、進行性の筋症状を主とする全身性の遺伝病(常染色体優性遺伝)である。主症状は、筋緊張(筋収縮後の弛緩障害、ミオトニア)、進行性筋萎縮による筋力低下であるが、これ以外にも白内障、耐糖能障害や心伝導障害、内分泌・免疫系異常、知能障害、中枢神経障害(性格変化・認知障害・過眠)等、症状は多岐にわたる。筋病理では中心核、筋線維の小径化(タイプ1、赤筋に顕著)等が見られるが、他の筋疾患に多く見られる顕著な筋肉の壊死や線維化は見られない。そのかわり、タンパク質の合成が減少することによる、筋線維の小径化が認められており(Halliday *et al.*, 1985, Griggs *et al.*, 1990)、これは、筋同化が阻害されていることを意味する。患者は特徴的な筋萎縮によって斧様顔貌を呈する。DMの罹患率は、成人型筋ジストロフィーで最多の、10万人に約5人(日本)である。

1992年、DM患者では、第19番染色体長腕(19q13.3)に位置する *Dystrophia Myotonica Protein Kinase (DMPK)* 遺伝子の3'末端非翻訳領域(3'-UTR)内のCTG反復配列に異常伸長が見られることが分かり、責任遺伝子が判明した(Brook *et al.*, 1992)。健常者では、CTGの反復回数が5から35回であるが、DM患者では、50回から数千回前後まで増大する。この反復回数と病状には明白な相関があり、反復回数の増大に比例して病状は深刻化し、発症年齢も若齢化する。また、世代を経るごとに反復回数の増大が見られ、1000回以上の患者では非常に重篤な症状を示す先天性DM(CDM)が認められる。

1.1.3 DM の分子機構

タンパク質に翻訳されないゲノム部分の異常伸長が病気を引き起こし、更に全身に影響を及ぼす機構について、1990年代半ばより研究が進み、異常伸長した CTG 反復配列が転写されて、RNA 毒性を示すことが明らかとなった。変異 RNA は凝集しやすく、核内で安定な構造である foci を形成する (Taneja *et al.*, 1995, Michalowski *et al.*, 1999)。このため、分解されにくく、細胞内に蓄積し、親和性の高い RNA 結合タンパク質の局在に影響を及ぼし、その正常機能を攪乱する。

変異 RNA に結合する二つの代表的な RNA 結合タンパク質として、Muscle blind-like protein 1 (MBNL1) と CUGBP/Elav-like family member 1 (CELF1) が知られている。核内において、MBNL1 と CELF1 はそれぞれ、成人型、幼若型スプライシングを促進するスプライシング制御因子として相反する機能を持つ。DM において、MBNL1 は、凝集した変異 RNA に捕捉され、foci と共局在する。そのため、スプライシングに必要な MBNL1 量が減少し、選択的スプライシング異常が引き起こされる (Ho *et al.*, 2005)。一方、CELF1 は選択的スプライシング以外にも RNA 安定性・翻訳の各段階で制御する多機能タンパク質である。すなわち、スプライシング異常以外の機構でも DM の症状に寄与すると考えられている。反復配列存在下で CELF1 は、PKC によって強くリン酸化され、安定化して、機能が促進されることが知られている (Savkur *et al.*, 2001)。しかし、反復配列が存在するとなぜ PKC による CELF1 のリン酸化が起こるのか、この強度のリン酸化と呼ばれる状態の CELF1 の詳細なリン酸化プロファイルについては明らかとなっていない。

1.1.4 DM における *SERCA1*

2001年、DM では、*SERCA1* のスプライシングが異常となっており、成人骨格筋では本来発現しないはずの *SERCA1b* が検出されることが報告された (Kimura *et al.*, 2005)。その後の研究により、*SERCA1* のエクソン 22 の選択的スプライシングは、MBNL1 によって制御されることが分かった (Hino *et al.*, 2007)。

現在の DM 研究では、*SERCA1* の選択的スプライシング型を調べることで、そのまま DM 症状の改善指標の一つとして使われることが多い。これは、*SERCA1b* の発現量が対照群では全く見られないため、容易に DM かどうかの判別がつくためである。また、*SERCA1* のスプライシング異常は、全ての DM モデル系 (マウス、培養細胞など) で見

られ(Kimura *et al.*, 2005, Lin *et al.*, 2006, Ward *et al.*, 2010)、DM 病理の第一次段階の応答だと考えられている。従って、*SERCA1* のスプライシング制御機構の解明は、直接 DM 病理の解明につながる可能性が大きい。

1.1.5 第一章の目的

SERCA1 の選択的スプライシングの制御機構については、MBNL1 によって制御されることが知られているが、MBNL1 のみでは、100%*SERCA1a* のみが発現するように制御することは出来ない(Hino *et al.*, 2007)。従って、他の制御因子が存在する可能性が考えられた。そこで、DM におけるもう一つの重要なスプライシング制御因子である CELF1 による *SERCA1* の選択的スプライシングの制御機構の検証からその機構解明に取り組んだ。

1.2 方法

1.2.1 内在性 *SERCA1* のスプライシング型の検出 (RT-PCR)

HEK293(ヒト胎児腎臓)細胞は、10% FBS-DMEM、37 °C、5 % CO₂ の環境下で培養した。規定時間培養後の培養細胞から、GenElute Mammalian Total RNA Extraction Kit (Sigma-Aldrich 社) を用いて total RNA を抽出した。DNase 処理は行わなかった。逆転写には PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社) を用いた。抽出した total RNA 2500 ng をテンプレートとして逆転写を行った。プライマーには oligo dT primer (50 μM) を用いた。逆転写産物は MilliQ 水で 5 倍希釈して cDNA サンプルとした。

SERCA1 のエクソン 21 とエクソン 23 に設計したプライマー(Fw: ATCTTCAAGCTCC GGGCCCT; Rv: CAGCTCTGCCTGAAGATGTG、Greiner bio-one 社) を用いて、PCR を行った。サイクル数は PCR 産物が指数関数的に増幅される範囲に設定した。これは、29 サイクルに相当した。PCR 産物は 8 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色液で 10 分間染色した。泳動像は LAS-3000 (FUJIFILM 社) で観察・記録し、Multi Gauge(FUJIFILM 社) でそれぞれのバンドの輝度を定量した。統計処理は、GraphPad Prism 4 (GraphPad Software 社) を使用した。

2.2. CELF1 の強制発現

当研究室で使用されていた pSecDK(横浜市立大学大野茂男教授よりご提供いただいた) に CELF1 が挿入されたプラスミド(Kino *et al.*, 2009) を Lipofectamine LTX (Invitrogen 社) を用いて HEK293 細胞に形質導入した。その後、48 時間後に細胞を回収し、RNA を抽出して解析を行った。なお、強制発現は、ウェスタンブロット解析を行って確かめた。

2.3 RNA 干渉

CELF1 の RNA 干渉については、CELF1 に特異的な Stealth-siRNA (siCELF1: UGAACAGGUUGGCUCUCCUCUGGACC、センス鎖) を RNAi MAX(Invitrogen 社) を用いて HEK293 細胞にトランスフェクションした。Phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) との

相互作用を見る実験では、十分に CELF1 を発現抑制するため、RNAi のトランスフェクション後から 48 時間後に PMA を添加し、更に 48 時間後に細胞を回収した。なお、CELF1 の RNAi による発現抑制効果があることがトランスフェクション後 96 時間まで継続することは、ウェスタンブロット解析を行って確かめた。

PKC アイソザイムの RNA 干渉については、PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ , PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ , PKC μ , PKC ν に特異的な siRNA (Invitrogen 社、配列は表 2) を RNAi MAX を用いて HEK293 細胞にトランスフェクションした。なお、PKC アイソザイムの RNAi は、RT-PCR によって、mRNA レベルでの発現抑制効果を確認した。

表 2 PKC アイソザイムの siRNA の配列

siPKCs の配列は以下の通りである (いずれもセンス鎖)。この配列は Invitrogen 社の BLOCK-iT™ RNAi Designer を使用して得られたものである。

PKC isozyme	Sequence
PKC α	5'-AAA GGC UGA GGU UGC UGA UTT-3'
PKC β I,	5'-GCU GGC UUC UCU UAU ACU ATT-3'
PKC β II	5'-CCA GGA AGU CAU CAG GAA UTT-3'
PKC γ	5'-GCA GAU GAG AUC CAC GUA ATT-3'
PKC δ	5'-GCA UCG CCU UCA ACU CCU ATT-3'
PKC ϵ	5'-CCA CUU CGA GGA CUG GAU UTT-3'
PKC η	5'-GCA CCU GUG UCG UCC AUA ATT-3'
PKC θ	5'-GGA GAU CAA CUG GGA GGA ATT-3'
PKC μ	5'-GCU GGU ACG UCA AGG UCU UTT-3'
PKC ν	5'-GCC CGA CUC UCU AAU GGA ATT-3'

1.3 結果

1.3.1 CELF1 は *SERCA1b* の選択的スプライシングを促進する

CELF1 が *SERCA1* の選択的スプライシングを制御するかどうかを確かめるために、HEK293 細胞を用いて、CELF1 を CELF1/pSecDK ベクター、或は CELF1 の siRNA のトランスフェクションによって強制発現、又は発現抑制し、内在 *SERCA1* の選択的スプライシングに及ぼす影響を、RT-PCR を行って確かめた。なお、HEK293 細胞に *SERCA1* が発現しているという報告はないものの、mRNA レベルでの発現は報告されている (Hino *et al.*, 2007)。

RT-PCR によってスプライス型を調べた結果、CELF1 の強制発現は *SERCA1* のエクソン 22 の挿入率を減少させ、*SERCA1b* のスプライシングを促進した(図 2A)。また、CELF1 の発現抑制は、逆にエクソン 22 の挿入率を増大させ、*SERCA1a* のスプライシングを促進することが分かった(図 2B)。従って、MBNL1 だけでなく、CELF1 も *SERCA1* の選択的スプライシングを制御しており、エクソン 22 の挿入を増加させ、*SERCA1b* の発現を促進することが示された。

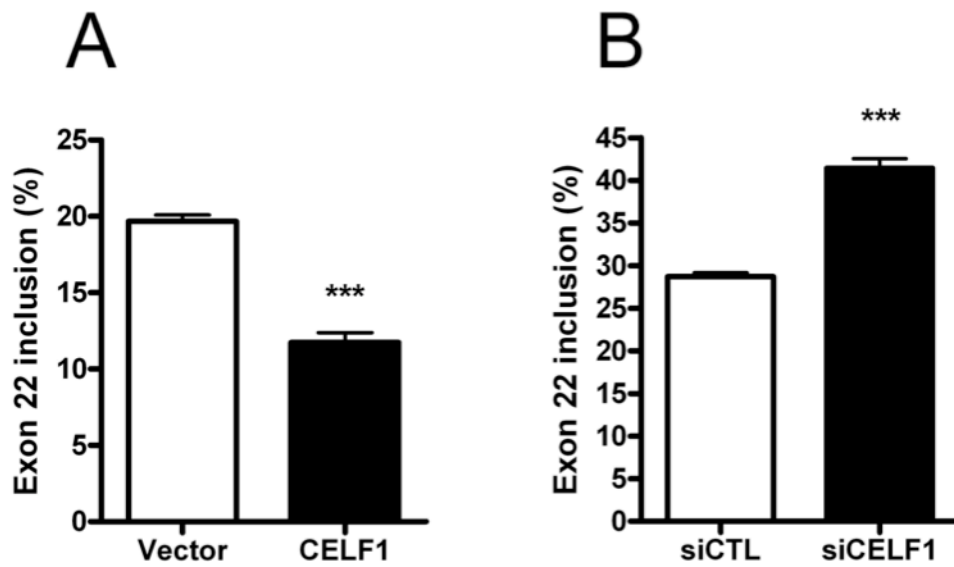


図 2 CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御

(A) CELF1 を強制発現させた時の内在 *SERCA1* のエクソン 22 の挿入率(%). Vector は空ベクターをトランスフェクションしたもの。(B) HEK293 の内在 CELF1 を RNA 干渉によって発現抑制した時の内在 *SERCA1* のエクソン 22 の挿入率(%). siCTL はコントロールのランダム siRNA を、siCELF1 は CELF1 の siRNA をトランスフェクションしたことを表す。*** $p < 0.001$ ($n=3$, Student's t -test, mean \pm S.E.)。

1.3.2 PMA は *SERCA1* の選択的スプライシングを制御する

CELF1 は PKC によってリン酸化され、分解されにくくなる結果、CELF1 の総量が増加し、活性が増大することが知られている。そこで、CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御の詳細を調べるため、PKC の活性化剤として知られている PMA を添加して、HEK293 細胞の内在 *SERCA1* のスプライシングに及ぼす影響を調べた。PMA を 500 nM, 48 時間 HEK293 細胞に添加した後、RNA 抽出をして RT-PCR を行った結果、当初の予想とは反して、エクソン 22 の挿入、*SERCA1a* の選択的スプライシングが促進された(図 3A)。

PMA は添加後 5 分以内に PKC を活性化する(Ohmori *et al.*, 1998)が、長時間の PMA 添加では、PKC が分解されてしまうことが知られている(Hossain *et al.*, 1998)。そこで、PMA 添加による内在性 *SERCA1* のスプライシングに及ぼす影響を、タイムコースを取得して調べた。すると、1.5 時間の PMA 添加では、エクソン 22 の挿入率(%)が有意に下がり、*SERCA1b* の発現が促進されることが分かった(図 3B, C)。

次に、PMA による *SERCA1* スプライシングの変化が濃度依存的であるかどうか調べた。すると、PMA で 1.5 時間刺激した時、48 時間刺激した時共に、*SERCA1* の選択的スプライシングに及ぼす影響は濃度依存的であることが分かった(図 3D, E)。

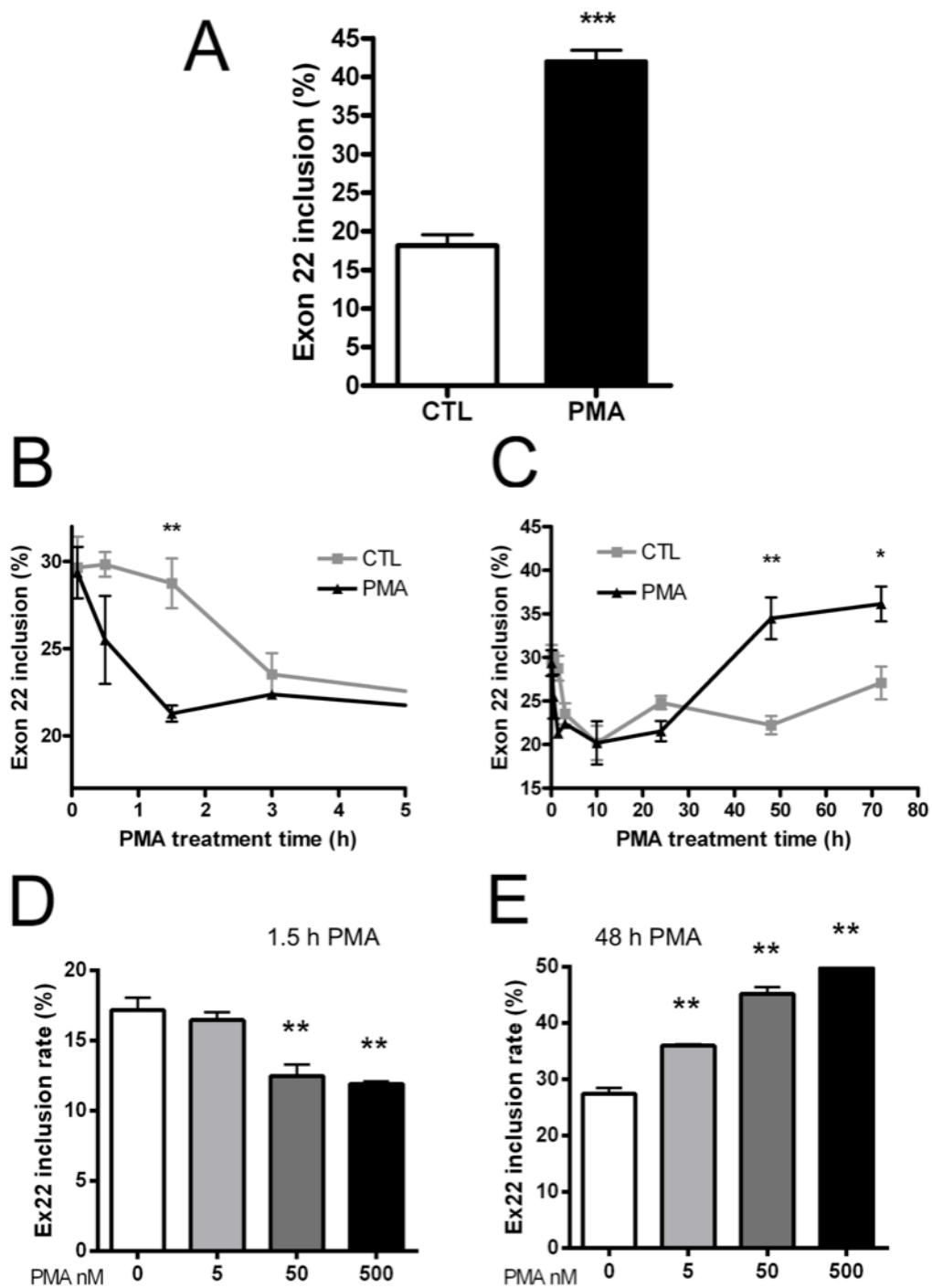


図3 PMAによるSERCA1の選択的スプライシング制御

(A) 500 nM PMA の48時間刺激はエクソン22の挿入を促進した。*** $p < 0.001$ ($n=3$, Student's t -test, mean \pm S.E.). (B, C) 500 nM PMA 刺激によるSERCA1スプライシング型への影響を見たタイムコースのグラフ。(B)は(C)の0~5時間までの拡大図。(D) 1.5時間PMA刺激, (E) 48時間PMA刺激の濃度依存性を確認した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n=3$, Dunnett's test, mean \pm S.E.).

1.3.3 PKC は *SERCA1* の選択的スプライシングを制御する

SERCA1 の選択的スプライシングが、PMA によってリン酸化された PKC によって制御されているかを確かめるために、PKC の阻害剤である Ro 31-8220 を同時添加して調べた。結果、1.5 時間、48 時間の PMA 刺激共に、Ro 31-8220 (1 μ M) によって阻害されることが分かった(図 4A,B)。

次に、直接 PKC のアイソザイムを同定するために、PKC アイソザイム特異的な siRNA をトランスフェクションして、PKC アイソザイムをそれぞれ発現抑制し、PMA の 1.5 時間の効果を再現するものがないか調べた。すると、PKC β II と PKC θ を発現抑制した時、PMA の 1.5 時間の効果であるエクソン 22 の挿入が促進された(図 4C)。

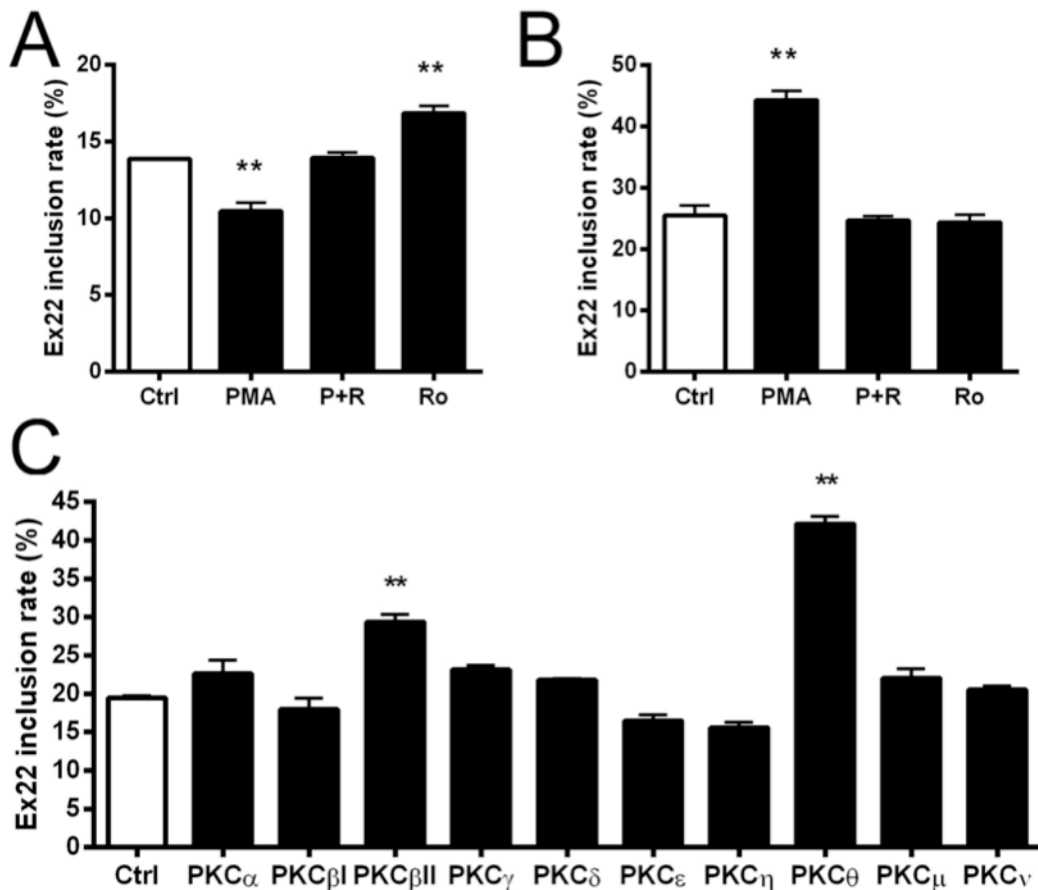


図 4 PKC による *SERCA1* のスプライシング制御

(A, B) PMA(PKC 活性化剤, P)と Ro 31-8220 (PKC 阻害剤, R, Ro)を 1.5 時間(A), 48 時間(B)添加した時の *SERCA1* のエクソン 22 の挿入率を示す。(C) PKC アイソザイムをそれぞれ RNAi によって発現抑制した時の *SERCA1* のエクソン 22 の挿入率。** $p < 0.01$ ($n=3$, Dunnett's test, mean \pm S.E.)

1.3.4 PMA と CELF1 は同一経路で *SERCA1* の選択的スプライシングを制御する

CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御が、PMA による PKC リン酸化経路の下流に存在するかどうかを確かめるため、CELF1 の発現抑制と PMA の添加の関係を調べた。その結果、DMSO 対照群では、CELF1 の発現抑制により、エクソン 22 の挿入が促進されたのに対し、PMA を添加すると、CELF1 の発現抑制効果がなくなった (図 5A, B)。従って、CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御は、PMA と同一経路であることが分かった。

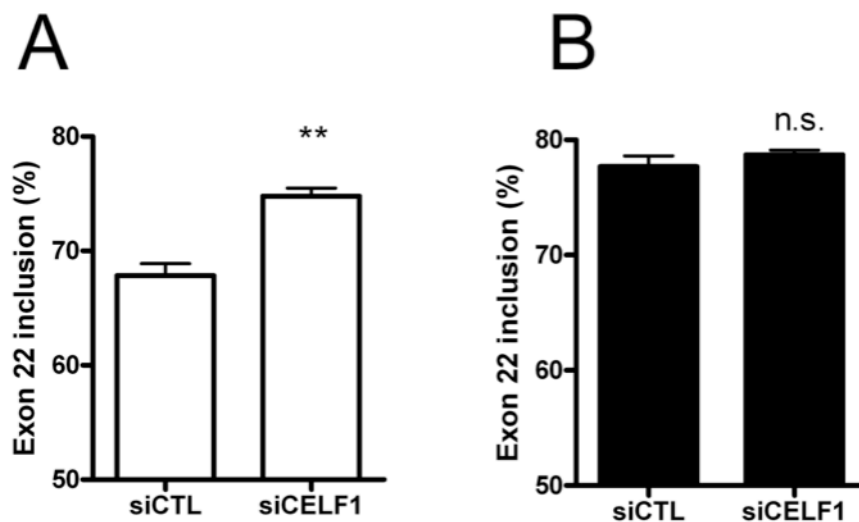


図 5 CELF1 と PMA の *SERCA1* スプライシング制御における相互作用
(A) CELF1 を発現抑制した HEK293 細胞に DMSO(対照)を添加した時の、*SERCA1* のエクソン 22 の挿入率。(B) CELF1 を発現抑制した HEK293 細胞に、500 nM PMA を 48 時間添加した時の、*SERCA1* のエクソン 22 の挿入率。 ** $p < 0.01$ ($n=3$, Student's t -test, mean \pm S.E.)

1.4 考察

1.4.1 CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御

CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御は、その強制発現と発現抑制とで逆の結果を示したことから、CELF1 によって、*SERCA1b* の発現が促進されることが確かめられた。

これまで、*SERCA1* の選択的スプライシングは、エクソン 22 の下流部位に結合して、エクソン 22 の挿入を促進する MBNL1 によって行われることが知られていた(Hino *et al.*, 2007)。同じ論文で、DM におけるもう一つの重要なスプライシング制御因子である CELF1 に関しても、強制発現によって、HEK293 細胞における *SERCA1* の mini-gene のスプライシングへの影響を調べている。しかし、その時は影響は見られなかった。これは、本章の 1.3.1 と異なる結果である。では、この相違はどこから来るのだろうか。

そもそも、Hino らの論文では、HEK293 細胞における内在性 *SERCA1* のスプライシングは、*SERCA1b* が 100%となっており、*SERCA1b* への促進作用が検出出来ない(本論文で使用した HEK293 細胞の 80~85%とは異なる)。そこで、彼らは *SERCA1* の mini-gene を細胞に導入することによって、両方向へのスプライシングシフトを検出可能にしていた。Mini-gene を使用したスプライシング解析は、組み込まれなかったゲノム部位によるスプライシング制御を排除してしまうため、CELF1 の関与を検出出来なかったものと考えられる。また、逆に考えれば、CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御は、Hino らが Mini-gene に組み入れたエクソン 21 からエクソン 23 までの部位以外の部分が必須である可能性が高い。

ちなみに、Hino らの Mini-gene では、マウス *SERCA1* の配列を使用している。本章では示していないが、マウス由来の筋芽細胞の C2C12 細胞で、1.3.1 と同様の結果が得られていることから、生物種による違いが CELF1 に対する応答性の違いをもたらした可能性は否定されている。

1.4.2 PKC による *SERCA1* のスプライシング制御

CELF1 の強度のリン酸化が DM 患者で見られることや、それが PKC によって引き起こされること(Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007)が知られていたため、CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御も、PKC によるリン酸化経路によって制御されているのではないかと考えた。本章の図 3 や図 4A, B では、PMA や PKC 阻害剤等による間接的な PKC の関与が示された。また、図 4C では、RNAi によって特定の PKC アイソザイムの発現を抑制することが出来たので、確かに PKC による *SERCA1* のスプライシング制御を確認することが出来た。

一見して、全ての結果は矛盾ないように見える。しかし、注意してみると、図 4A の 1.5 時間の刺激では、PKC 阻害剤である Ro 31-8220 が単独でスプライシングを変化させた。一方、48 時間添加時では、スプライシングを変化させなかった(図 4B)。この違いはどこから来るのだろうか。

Ro 31-8220 による、PKC を介さない *SERCA1* のスプライシング制御機構があるかどうかについては、今後、両時間における PKC のリン酸化具合を調べることで、明らかに出来るが、2014 年、これに関連した興味深い論文が発表された。Ketley らによれば、Ro 31-8220 の添加によって、DM に特徴的な核内 foci が解消し(これによって MBNL1 が核内から解放される)、CELF1 のタンパク質量が減少し、そしてわずかながら、*SERCA1* のスプライシングが改善されるという(Ketley *et al.*, 2014)。*SERCA1* のスプライシングの改善が、MBNL1 によるものなのか、CELF1 によるものなのかは検討されていないが、PKC α を発現抑制した細胞では、PKC 阻害剤である Ro 31-8220 の効果を再現出来なかったとしている。つまり、Ro 31-8220 による *SERCA1* のスプライシング変化をもたらす一連の現象は、PKC を介さないというのである。この論文での Ro 31-8220 の使用量は、培養細胞を用いて 10 μ M で、1.3.3 の 10 倍の濃度である。また、発現抑制した PKC アイソザイムも、PKC α のみであることから、必ずしも PKC の関与が否定された訳ではない。しかし、事実 Ro 31-8220 は PKC 以外にも多くのタンパク質に作用することが知られているため(Standaert *et al.*, 1999, Han *et al.*, 2000)、阻害剤や活性化剤のみでは PKC の関与を示すには不十分であった。

そこで、図 4C では、個々の発現抑制の実験により、PKC の関与を直接調べる実験を行い、同時に関与する PKC アイソザイムの同定を行った。同定された PKC β II については、過去の文献でも CELF1 を強くリン酸化する PKC アイソザイムとして報告されている(Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007)。PKC θ については、初めての報告となる。逆の結果が得られることを期待して行った PKC β II と PKC θ の強制発現実験では、*SERCA1* のス

プライシングを変化させることが出来なかった。今後、恒常的活性化型の PKC を作製し、結果を確かめる必要がある。現段階では、PKC は *SERCA1* のプライシングを制御するための必須条件ではあるが、十分条件ではない可能性が考えられる。

1.4.3 CELF1 と PKC の *SERCA1* スプライシング制御における相互作用

CELF1 による *SERCA1* のプライシング制御は、PKC 経路と同一のものだろうか。CELF1 を発現抑制した細胞が PMA 刺激に応答しないことから、PMA から PKC と、CELF1 による *SERCA1* のプライシング制御が同一経路であることが分かった。PMA による PKC のリン酸化(Huberman *et al.*, 1979)、PKC による CELF1 のリン酸化(Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007)を考慮すると、PKC のリン酸化は、CELF1 のリン酸化をもたらし、それが *SERCA1* のエクソン 22 の排除、*SERCA1b* の発現を促進することが考えられる。

この結果を確かめるためには、CELF1 のリン酸化状態を等電点電気泳動によって把握し、PMA 刺激を、直接 PKC 発現抑制に置き換えた実験が必要となる。また、これと同時に CELF1 のリン酸化プロファイルを調べることも DM 病理を理解する上で重要な情報である。

1.4.4 DM 病理との関連

SERCA1 のプライシングは、MBNL1 が核内の foci に捕捉されることにより、異常型に傾く。そのプライシングが、更に PKC、CELF1 によって制御されることは、DM 病理の理解にどのように役立つのだろうか。タンパク質レベルでの *SERCA1* の機能解析を踏まえ、第二章で詳細に検討する。

IV. 第二章

2.1 序論

2.1.1 はじめに

SERCA1 には二つのスプライスアイソフォームがあり、その違いは C 末端のわずか 8 アミノ酸である。本章では、これまで同じと考えられてきた両アイソフォームの機能について、生化学的・構造生物学的解析を行った。

2.1.2 SERCA1

SERCA1a は、1 分子の ATP を加水分解して、2 分子の Ca^{2+} を運搬する P 型 Ca^{2+} ポンプである。筋小胞体膜に局在し、筋肉を収縮させるために細胞質中に放出された大量の Ca^{2+} を再び筋小胞体内に取り込む働きを担っている。筋小胞体の SDS-PAGE を行うと、CBB 染色で一番濃く、太く見えるバンドが SERCA1 で、全筋小胞体膜タンパク質の約 6 割（実際に調べたウサギの SERCA1 では 8 割）を占める非常に重要なタンパク質である。

SERCA1a の研究は、序章でも記したように、1986 年から始まった。同じ SERCA ファミリーの SERCA2、SERCA3 と相同性が約 8 割と高く、詳細な活性比較がなされている。その結果、至適 pH や Ca^{2+} との親和性に大きな違いが見られることが分かった(Lytton *et al.*, 1992)。また、SERCA 特異的な阻害剤であるタプシガルギン(TG)の発見(Lytton *et al.*, 1991)により、混在している内在性 ATPase、 Ca^{2+} 輸送チャネルやポンプの影響が軽減され、最も研究が進んでいるイオンポンプとなった。

2.1.3 SERCA1 の機能

SERCA1 は筋小胞体において、筋収縮の際に放出された大量の Ca^{2+} を筋小胞体内に汲み上げることで、筋肉を弛緩させる働きを担っている。SERCA1 に関連した疾患としては、*SERCA1* の遺伝子変異によって引き起こされる運動後の筋弛緩異常を示す常染色体劣性遺伝である Brody 病 (Brody *et al.*, 1969) が報告されている (Odermatt *et al.*, 1996)。Brody 病患者の筋小胞体における Ca^{2+} 依存的な ATPase 活性や、 Ca^{2+} 輸送活性は正常に比べて 50% 以下である。同疾患を引き起こす *SERCA1* 遺伝子の変異や変異箇所は様々だが、SERCA1 のタンパク質レベルでの減少やリン酸化レベルの減少が報告されている (Odermatt *et al.*, 1996, Drogemuller *et al.*, 2008, Guglielmi *et al.*, 2013)。より詳細な解析のため、Brody 病の病態モデルとして、*SERCA1* の null 変異マウスが作製された (Pan *et al.*, 2003) が、ヒトの Brody 病とは異なり、出生後 2 時間以内に死亡することが分かった。解剖により、横隔膜における過剰収縮や肺にうっ血が見られ、死因は呼吸不全であることが分かった。その他の臓器は正常であったことや、胎児では、形態や体重ともに正常マウスと変わらないことから、SERCA1 はマウス発生のごく後期で必須であることが明らかになった。しかしながら、未だ SERCA1 の発生過程における役割ははっきりとは分かっていない。

近年注目されつつある SERCA1 のもう一つの役割である、熱産生に関しては、その重要な制御タンパク質であるサルコリピン (SLN) の紹介と共に、後述の 2.1.6 の項にまとめた。

2.1.4 SERCA1a の反応サイクル

SERCA1に限らず、P型イオンポンプの反応機構は古くから詳細に調べられて来ており、輸送イオンとの親和性の高さによって、E1状態(親和性が高い)とE2状態(親和性が低い)の二つの状態に分けられている。P型イオンポンプは、ATPの加水分解によって、両状態を行き来することによってイオンを輸送する。E1状態のSERCA1は、その高い親和性から、二つの Ca^{2+} が立て続けに細胞質側からポンプ内部に配位する(図6A)。すると、ATPが結合しやすくなり、その加水分解が起きる(図6B)。ADPが放出されると(図6C)、この変化によって、二つの Ca^{2+} はルーメン側に放出され、SERCA1は Ca^{2+} と親和性が低いE2状態になる(図6D)。次に遊離リン酸も放出されて(図6E)、 Ca^{2+} の代わりにSERCA1に入り込んだ2~3個の H^+ がルーメン側から細胞質側に放出されて(図6F)、再びはじめのE1状態に戻る。

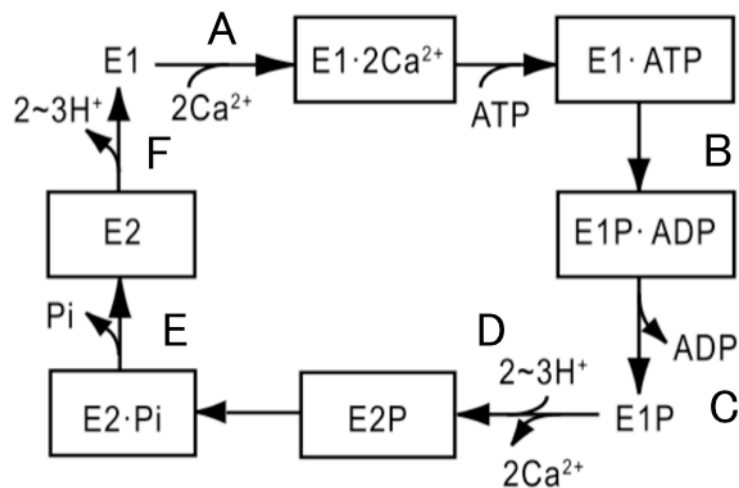


図6 SERCA1の反応サイクル(杉田, 2008より改変)

A~Fはそれぞれの反応経路を示す。

2.1.5 SERCA1a の構造解析

SERCA1a は単一ポリペプチド鎖より成り、10本の膜貫通ヘリックスと、細胞質側に大きな三つのドメイン(A, P, N)がある(図7)。10本の膜貫通ヘリックスのうち、M1~M6は Ca^{2+} や Mg^{2+} 、 H^+ などと相互作用し、大きく動いて輸送に関与する。一方、M7~M10ヘリックスは比較的動きが少なく、SERCA1を膜に固定する錨の役割を果たすと考えられている。細胞質ドメインに関しては、Aドメインはイオン通路のゲートとなっており、連動してM1、M2ヘリックスを上下に動かすことによって、 Ca^{2+} の流入を制御する。Pドメインには、P型イオンポンプの名前の由来となる、リン酸化部位(アスパラギン酸351)があり、ATPの加水分解によって、リン酸化され、ルーメン側からの Ca^{2+} の出入りを制御している。NドメインはATPのアデニン環が結合する部位で、細胞質側からの Ca^{2+} の出入りを制御している(図8)。

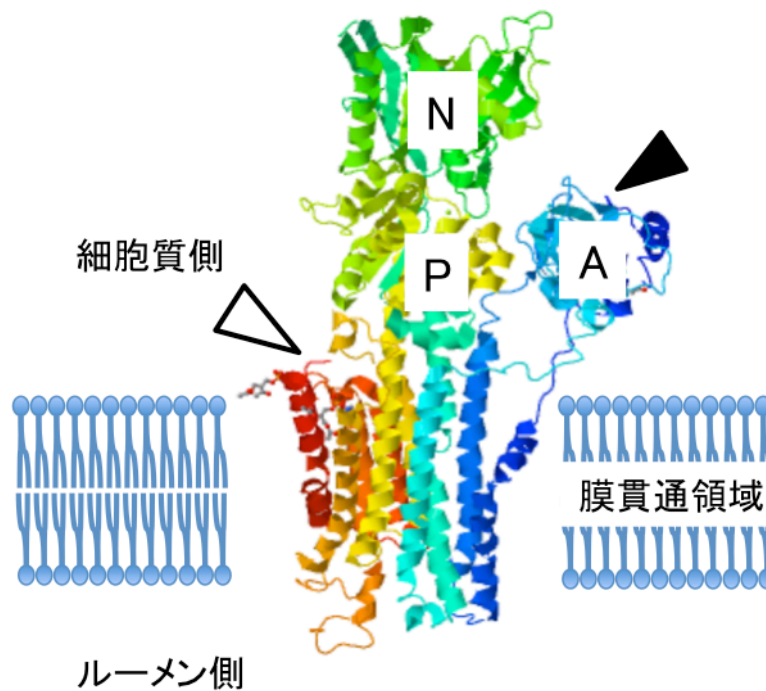


図7 SERCA1の立体構造(Protein data bank ID: 3W5A)

黒矢頭：N末端、白矢頭：C末端、A：Aドメイン(細胞質側の青色部分)、P：Pドメイン(細胞質側の黄色部分)、N：Nドメイン(細胞質側の緑色部分)を表す。ヘリックスは、青からM1ヘリックス、最後の赤がM10ヘリックス。

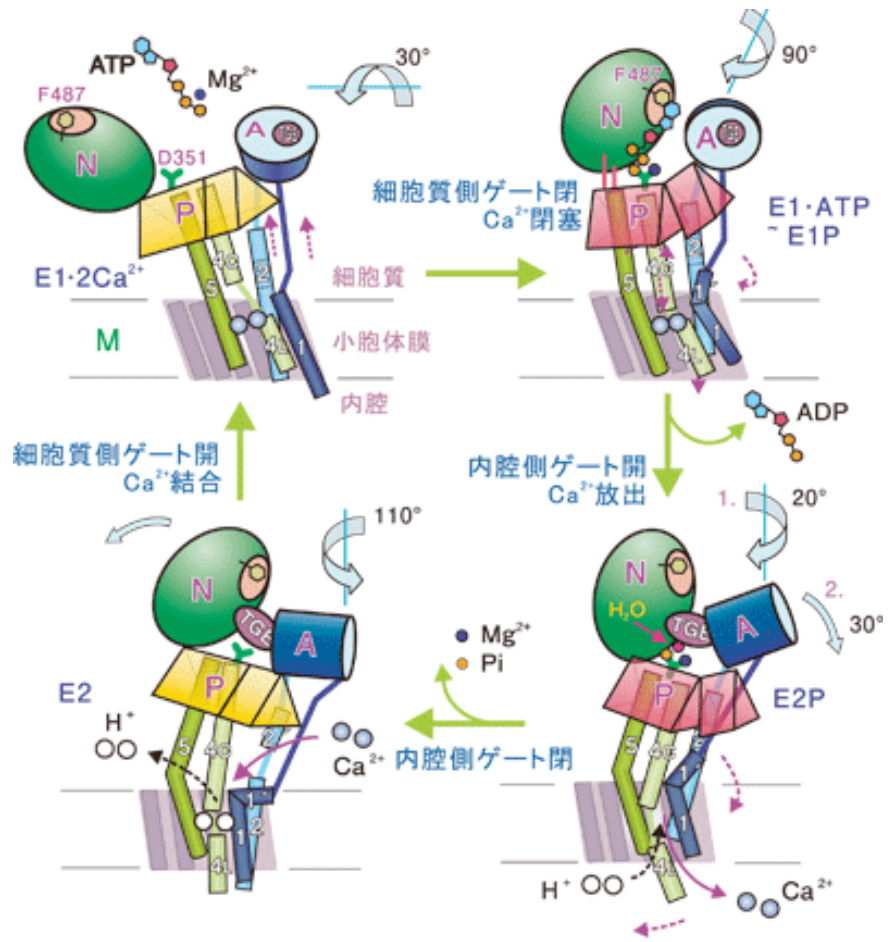


図 8 SERCA1a の反応サイクルにおける立体構造模式図(池田, 2010)

SERCA1 は細胞質側ゲートとルーメン側ゲートを交互に開閉して、濃度勾配に逆らって Ca²⁺を輸送する。

SERCA1 という 110 kDa の大きな構造変化を引き起こしているのは、 Ca^{2+} や Mg^{2+} の配位によるヘリックスを構成するアミノ酸のバックボーンへの、働きかけによる。この電気的相互作用が膜貫通領域中心部に及ぼす小さな動き(数Åレベル)が、110 kDa という巨大な膜タンパク質の離れた部位に伝わった時、A ドメインの $30^\circ \sim 110^\circ$ の大きな回転や、N ドメインの大きな開閉運動等につながるのである。これらの解釈は、SERCA1a の反応中間体の立体構造が、丁寧に X 線結晶構造解析によって一つずつ解かれたことによる(Toyoshima *et al.*, 2000, 2002, 2004, 2013, Sorenson *et al.*, 2004)。SERCA1 の反応に Mg^{2+} が必須である理由、最初の Ca^{2+} の配位によって次の Ca^{2+} の配位が促進される理由、 Ca^{2+} 二個の配位によって初めて ATP 加水分解が可能となる理由など、ここまではっきりと立体構造と反応様式が意味づけられた酵素は他に類を見ない。

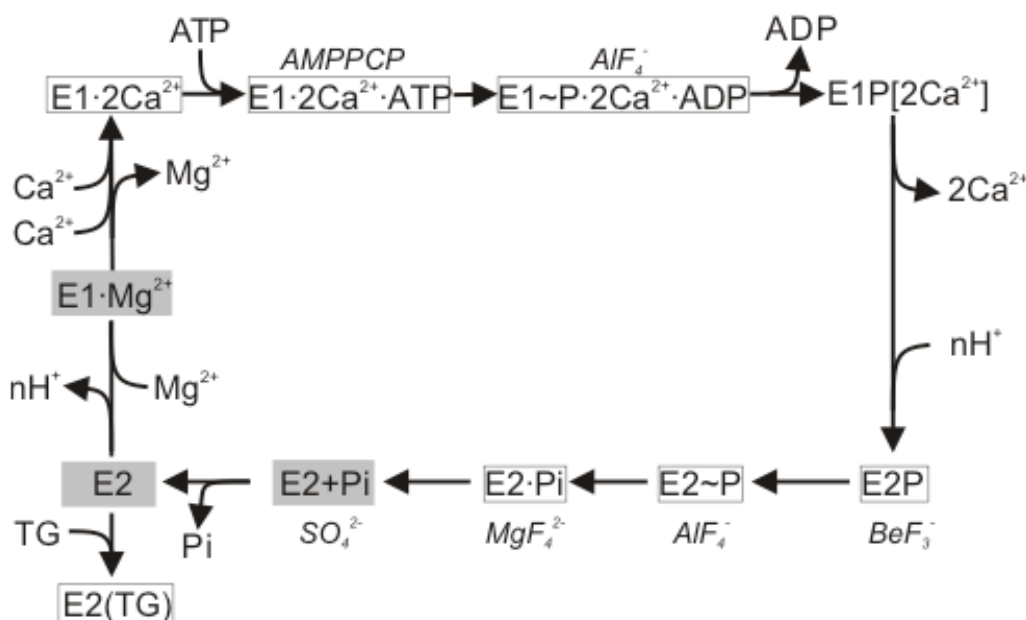


図 9 SERCA1 の反応サイクル(Toyoshima *et al.*, 2013)

SERCA1 の反応サイクルにおいて、既に結晶構造が解かれたものは□や■で囲まれている。また、斜体の AMPPCP は ATP のアナログ、 AlF_4^- 、 BeF_3^- 、 MgF_4^{2-} 、 SO_4^{2-} は、リン酸化アナログで、その反応中間体を維持するため添加される物質である。

2.1.6 SERCA1 を制御するタンパク質

SERCA1 の制御タンパク質として、ホスホランバン (PLN) とサルコリピン (SLN) が知られている。

PLN は 52 アミノ酸から成る 1 回膜貫通型タンパク質で、主に心筋や遅筋で発現することが知られている。SERCA に結合して Ca^{2+} との親和性を低くすることでその働きを阻害するが、リン酸化されると SERCA と結合出来なくなり、阻害作用を失う (Kimura *et al.*, 1996)。主に心筋における働きが多く研究されてきており、心筋における PLN による SERCA2a の活性阻害は、PLN のリン酸化異常によって、心不全につながる事が知られている (Schmitt *et al.*, 2003, Gianni *et al.*, 2005)。PLN は、SERCA1 にも結合してその働きを阻害する (MacLennan *et al.*, 2003) が、発現部位の違いにより、生体内で SERCA1 に作用する可能性は低い。

一方、SLN は 31 アミノ酸から成る PLN に似た構造を持つ 1 回膜貫通型タンパク質で、主に速筋に発現し、SERCA1 に結合してその働きを阻害する (Odermatt *et al.*, 1998)。2012 年、SLN による SERCA1 の機能阻害は、非震え熱産生 (non-shivering thermogenesis) に寄与することが報告された (Bal *et al.*, 2012)。SLN は、SERCA1 の ATPase 活性と Ca^{2+} 輸送活性の脱共役を引き起こし、ATP の加水分解によって得られたエネルギーが、熱産生に関わるというのである。その後の詳細な解析によって、SLN は SERCA1 の Ca^{2+} 輸送活性の V_{\max} を阻害するが、 Ca^{2+} との親和性は変化させないことが分かった (Sahoo *et al.*, 2013)。また、PLN は非震え熱産生には関与しないことも同論文で示されており、良く似たタンパク質である PLN と SLN は、SERCA1 の同じ溝 (M2, 6, 9 ヘルックスによって構成される) に結合しながらも、異なった阻害様式を取ることが分かった。

2.1.7 SERCA1b

1986年にクローニングされ、1988年にSERCA1aとの活性差が認められなかったSERCA1bについては、それ以降10年近く報告がなかった。1996年、ラットのヒラメ筋をノテキシン(神経毒)で壊死させた後、再生筋において、SERCA1aとSERCA2aの発現が一旦下がり、代わりにSERCA1bの発現がmRNAレベルで上昇することが報告された(Zador *et al.*, 1996)。これにより、SERCA1bが再生に関わる可能性が示唆された。

その後、mRNAの上昇が必ずしもタンパク質レベルに反映されないことが示され(Zador *et al.*, 2007)、SERCA1bの発現解析は、SERCA1b特異的抗体(Zador *et al.*, 2007)を用いたタンパク質レベルでのウェスタンブロット解析が必須であることが分かった。

2006年に、SERCA1aとSERCA1bのTGに対する感受性の違いを調べた論文が発表され、いずれもKi値が0.21 nMで相違ないことが分かった(Wootton *et al.*, 2006)。これが、1988年以降に発表された唯一の両アイソフォームを比較した論文となる。

以上が、SERCA1bについて分かっている全ての内容である。従って、最も研究されているイオンポンプであるSERCA1aとは対照的に、SERCA1bについての知見はほとんど得られていない。

2.1.8 SERCA1 のスプライシングは哺乳類で厳密に保存されている

SERCA1 の尾部構造は、スプライスバリエーション間の機能的差異が見られなかったとの過去の報告を受けて、研究されて来なかった。SERCA1 の配列を NCBI で検索してみると、1001 アミノ酸と 994 アミノ酸の報告が入り乱れて報告されており、SERCA1a と SERCA1b が区別されているのは、ヒトのみであった。しかし、SERCA1b を生じ得る配列は、マウスやウサギ、ウシ (表 3) はもちろん、ホッキョクグマからアフリカゾウ、ミンククジラやコウモリなどの哺乳類でも厳密に保存されていることが分かった (NCBI Protein BLAST を使用した、SERCA1b 尾部 8 アミノ酸のホモロジー検索による)。

更に調べてみると、既に数多くの X 線結晶構造解析が行われているウサギ SERCA1a の配列は、実際は NCBI に登録されておらず、1001 アミノ酸のウサギ SERCA1b しか登録がなかった。これは、両アイソフォームが別物として意識されていないためであろう。

表 3 哺乳類における SERCA1 アイソフォームの C 末端配列

赤文字は SERCA1a 特異的な尾部、青文字は SERCA1b 特異的な尾部のアミノ酸を示す。

Isoform	生物種	Ref Number	C 末端配列
SERCA1a	ウサギ	P04191-2	LDEILKFIARNYLEG
SERCA1b	ウサギ	NP_001082787.1	LDEILKFIARNYLEDPEDERRK
SERCA1a	ウシ	NP_001069235	LDEILKFVARNYLEG
SERCA1b	ウシ	XP_006070599.1	LDEILKFVARNYLEDPEDERRKQPGLLPSLPTP
SERCA1a	ヒト	NP_004311.1	LDEILKFVARNYLEG
SERCA1b	ヒト	NP_775293.1	LDEILKFVARNYLEDPEDERRK
SERCA1a	マウス	NP_031530.2	LDELLKFIARNYLEG
SERCA1b	マウス	XP_006507331.1	LDELLKFIARNYLEDPEDERRK

2.1.9 DMにおけるCa²⁺ホメオスタシスの乱れ

DMにおけるCa²⁺ホメオスタシスの乱れは、DM研究の初期から報告があったが、今でもその分子機構は十分に明らかになっていない。mRNAレベルでは、序章で述べた細胞質Ca²⁺濃度調節に関わる重要な三遺伝子(*SERCA1*, *RyR1*, *Cav1.1*)全てにおいて、選択的スプライシングの異常が報告されている。しかし、(ア) *SERCA1* においては、アイソフォームの違いがもたらす機能的差異についての解析がないこと、(イ) DMの特徴として、mRNAレベルでの発現量とタンパク質レベルでの発現量が大きく異なる現象が報告されていること、(ウ) DM患者由来の培養細胞を用いたとしても、DM患者生検筋と選択的スプライシングのパターンが異なり、患者生体内の細胞質内Ca²⁺濃度の測定が困難であること等によって、精確な解析が困難となっている。

以下に、既知とされるDMに関連したCa²⁺濃度調節機構をまとめているが、(ア)~(ウ)の現状を踏まえ、大いに異なった現象が生体内で起きている可能性も十分考慮の余地がある。

まず、DM患者由来の培養筋管細胞における細胞質Ca²⁺の上昇 (Jacobs *et al.*, 1991)は、2012年にCav1.1のスプライシング異常によって活性が上がったためだということが明らかにされた(Tang *et al.*, 2011)。そして、慢性的な高濃度の細胞質内Ca²⁺が維持された結果、小胞体ストレスが引き起こされ、興奮収縮連関の乱れやタンパク質の発現異常、細胞死などにつながるのではないかと考えられている(Botta *et al.*, 2013)。また、RyR1のタンパク質レベルでの発現量減少の結果、筋小胞体からのCa²⁺の放出が低くなっているという報告もある(Santoro *et al.*, 2014)。

DM患者では、本来*SERCA1a*しか発現しない成人骨格筋において、*SERCA1b*のmRNAが検出される(Kimura *et al.*, 2005)。しかし、タンパク質レベルでの発現や、そもそも*SERCA1*のスプライシング自体の意義、つまりスプライスバリエーション間の機能的差異に関しては全く調べられて来なかった。

2.1.10 第二章の目的

前述の通り、SERCA1a に関しては数多くの生化学的・構造生物学的知見が得られているが、SERCA1b に関しては、ほとんど何も知られていない。しかしながら、DM において Ca^{2+} 恒常性の異常が報告されており、SERCA1 がその恒常性維持に非常に重要なタンパク質であること、SERCA1 の選択的スプライシング異常によって、SERCA1b の異常発現が mRNA レベルで報告されていることから、まず、DM における SERCA1b のタンパク質レベルでの異常発現の検証を目指した。そして、SERCA1 のスプライスアイソフォームである、SERCA1a と SERCA1b の機能的差異の再検証を行い、その違いをもたらす機構についても、明らかにすることを目指した。

2.2 方法

2.2.1 DM モデルマウス (HSA^{LR} マウス)

HSA^{LR} マウスはロチェスター大学の Charles A. Thornton 教授が作製し、大阪大学大学院医学部研究科、高橋正紀助教から当研究室に提供されたトランスジェニックマウス (Mankodi *et al.*, 2000) である。ヒト骨格筋アクチンプロモーター (Human Skeletal α -Actin gene promoter) の下流に (CTG)₂₅₀ が挿入された遺伝子が発現するようになっており、骨格筋において、DM 様症状 (筋強直、筋力低下など) が見られる。対照群として使用した野生型マウスには、FVB/NJc1 (日本クレア社) を用いた。

2.2.2 SERCA1b 尾部特異的抗体の作製

Zádor *et al.*, 2007 を参考に、SERCA1b の特異的尾部を含んだ CLEDPEDERRK を抗原とし、株式会社医学生物学研究所にウサギ 2 頭を使用してのポリクローナル抗体作製を依頼した。その後、血清からアフィニティーカラムクロマトグラフィーにて抗体を精製したが、血清をそのまま使用しても検出感度が変わらず非特異的なバンドが見られなかったことから、以下の実験では、血清をそのまま使用した。

2.2.3 ウェスタンブロット解析

マウス組織のウェスタンブロット解析では、筋肉組織 10 倍量の骨格筋抽出 Buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1% Protease inhibitor mix) を加えて破砕し、1 時間 4°C で転倒混合した後、8,000 rpm, 4°C, 10 分遠心したものの上清をタンパク質定量した。その後、サンプルバッファー (198-13282, 和光純薬工業社) を添加し、泳動サンプルとしたものを、石浦研究室所属小穴康介氏から提供頂いた。患者生検筋のウェスタンブロット解析では、10% Sucrose, 10 mM MOPS-KOH (pH7.0), 0.1 mM EDTA, 0.1% protease inhibitor mix を加えて破砕し、15,000×g, 20 分 4°C で遠心し、上清をタンパク質定量した。その後、サンプルバッファーを添加し、泳動サンプルとした。SERCA1 を強制発現させた細胞を用いる場合は、マイクロソ-

ム精製(後述 2.2.7)したサンプルに直接サンプルバッファーを添加し、泳動サンプルとし、12.5 % SDS-PAGE にて泳動した。PVDF 膜にウェット式転写装置(ミニトランスブロット[®]セル、Bio-Rad 社)で 400 mA、4℃、1 時間定電流で転写した後、5 %スキムミルク(TBST)に入れて 30 分ブロッキングし、5% スキムミルク(TBST)に溶解した一次抗体(希釈倍率は各図参照、SERCA1b: 自作のウサギのポリクローナル抗体、actin-1: A2066, Sigma-Aldrich 社)に浸して、低温室で一晩振とうした。翌日は一次抗体の抗原に合った HRP 付きの二次抗体(Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 7074, Cell Signaling 社)を 1000 倍、5%スキムミルクで希釈し、1 時間室温で振とうさせた。検出は、Luminata Forte Western HRP 基質(ミリポア社)を使用して化学発光させ、LAS-3000 (FUJIFILM 社)で検出した。

なお、TBST の組成は 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20 である。

2.2.4 培養細胞における SERCA1 の強制発現系の構築

Kazusa DNA Res. Inst から購入したヒト *SERCA1* の遺伝子(pFN21AE0051)は、ヒト *SERCA1b* であった。これを pIRES2-AcGFP ベクター (Clontech 社)に組み入れて増幅した(primer sets : Fw: 5'-gcggatcGCTAGCagggagcacaATGGAGGCCGCTCATGCT-3'; Rv: 5'-GGATCCgtcgacTCACTTCCTTCTTTCATCTTCTGGATCCT-3'、ファスマックバイオ社)。ヒト *SERCA1a* の遺伝子は、ヒト *SERCA1b* の遺伝子の C 末端を Rv: 5'-GGATCCgtcgac TTATCCCTCTAGG TAGTTCGAGCAACGAA-3'(ファスマックバイオ社)で増幅して作製し、同様に pIRES2-AcGFP ベクターに組み入れた(図 10)。SERCA1 に関する全配列をシーケンスして確かめた。

得られた発現プラスミドは、QIAGEN Plasmid Mega Kit (QIAGEN 社)を用いて精製し、収量は、LB 培地 1 L から 0.6 μ g 程度であった。これを、CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech 社)を用いて、80 %コンフルエントにまいた HEK293 細胞にトランスフェクションした(細胞の培養方法については、第一章の方法参照)。48 時間後、蛍光で十分に IRES 配列を介した GFP の発現が見られたことを確認して、細胞を回収した。1 回の実験で、HEK293 細胞は、1 遺伝子につき、15 cm dish で 5~20 枚使用した。



図 10 SERCA1a/b の発現ベクターの模式図

SERCA1 遺伝子にはタグがなく、上流側に CMV プロモーターと下流側に IRES 配列を介した AcGFP を持つ。

2.2.5 ミクロソーム画分の調整

ミクロソーム画分は、ミクロソームの小胞が破れにくい、Resh *et al.*, 1985; Maruyama *et al.*, 1988 の手法に従って精製を行った。活性測定時に反応溶液中に極力 Ca^{2+} が混入しないようにするため、最終的にミクロソームは、Final バッファー(20 mM MOPS-NaOH, pH 7.0, 250 mM Sucrose, 1 mM MgCl_2)中に懸濁した。この時、総タンパク質量を定量すると、5 mg/ml 程度であった。精製したミクロソームが破れていないことを示すため、ATPase 活性測定を行い、 Ca^{2+} イオノフォアである A23187 の有無によって活性が変化するかを調べたところ、A23187 の添加(10 μM)によって活性差が生じたため、 Ca^{2+} 輸送活性の測定にも適していることを確かめた。精製ミクロソームは、液体窒素中で保存し、実験に使用する時は、10 μl ずつ小分けで、 -80°C で保存したものを使用した。凍結融解の回数も厳密にそろえた。

精製したミクロソーム画分中に含まれる SERCA1a と SERCA1b の量比は、精製日ごとにウェスタンブロット解析で定量した。

2.2.6 ATPase 活性測定

ATPase 活性測定は、Maruyama *et al.*, 1988 の手法を参照した。反応溶液中の Ca^{2+} 濃度を精確に把握するため、全ての添加溶液に含まれる Ca^{2+} 濃度は、原子吸光法にて定量した。また、全ての溶液の保存容器も Ca^{2+} が溶け出さないプラスチック製品を使用した。なお、添加する ATP 溶液も、カラム精製を行い、Ca-free の ATP 溶液を調整して使用した (Ca-free の ATP 溶液に関しても Ca^{2+} 定量を行い、わずかに含まれる Ca^{2+} も考慮して活性測定を行った)。

-80°C で保存していた小分けのミクロソームを氷上で溶かし、 37°C にあたためた反応溶液 (40 mM MOPS-KOH, pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM NaN_3 , 5 mM MgCl_2 , 15 μM thapsigargin(+/-), 0.1 mM ouabain, pCa=5.0, 1 mM EGTA) に、80~100 $\mu\text{g/ml}$ (総タンパク質量ではなく、添加する SERCA1 量をそろえた)で溶かした。5 mM oxalate-KOH, 4 mM ATP となるようにシュウ酸と ATP を加え、反応を開始させた。2, 4, 6, 8, 10, 15 分時(ATPase によって加水分解された生成物、遊離リン酸の量が直線的に増える範囲)に 15 μl ずつサンプリングし、終濃度 0.05%となるように TCA を添加して反応を停止させた。サンプルは測定まで氷上に静置した。Malachite Green Phosphate Assay Kit (BioAssay systems 社)を用いて、Microplate reader, SH-8100 lab (コロナ社)を用いて 620 nm の吸光度を測定し

て、遊離リン酸の量を定量した。時間あたりの遊離リン酸生成量を活性とし、SERCA1aの活性を100%とした。また、A23187を添加した実験では、最初の反応溶液に oxalateの代わりに A23187を添加した。

ATP 依存的な ATPase 測定では、ATP 濃度を細かく振り、50 μM から 4 mM まで測定した。また Ca^{2+} 依存的な ATPase 測定では、 Ca^{2+} は WinMAXC32 v2.51 (C. Patton, Stanford University) を用いて反応溶液中の free Ca^{2+} 濃度を計算して、 $\text{pCa}=5\sim 8$ の範囲を測定した。

2.2.7 Ca^{2+} 輸送活性測定

Ca^{2+} 輸送活性を測定するため、ATPase 活性測定と同じ反応溶液中に同様に添加 SERCA1 量をそろえてタンパク質を溶かし、5 mM oxalate-KOH, 4 mM ATP となるようにシュウ酸と ATP を加え、反応を開始させた。0, 2, 5 分時に 50 μl ずつサンプリングし、フィルター(HAWP01300, メルクミリポア社)に陰圧をかけて、マイクロソームをトラップした。マイクロソームの周りに付着した Ca^{2+} を Wash 溶液 (40 mM MOPS-KOH, pH 7.0, 100 mM KCl, 2 mM LaCl_3) で洗い流し、500 μl 4% TCA に溶かして原子吸光光度計(Z2710, 日立ハイテクノロジーズ社)でマイクロソーム中の Ca^{2+} 量を測定した。

従来の生化学的実験では、 Ca^{2+} の定量には、放射性同位体を使用した方法が主流だが、放射性物質の使用を極力控えたいという動機から、原子吸光分析法を用いることにした。原子はそれぞれ特定の波長の光を吸収するが、原子吸光分析法では、試料を原子化し、そこに特定波長、今回は、239.9 nm の光を Ca^{2+} 原子に照射して、吸収された分を測定し、その濃度を定量した。これまでの生化学的実験では、試料の原子化にフレイム法を用いるが、必要試料が多く、今回の測定には適さなかった。そこで、必要試料の少ない、電流で原子化するグラファイト炉を用いた方法を採用した。

グラファイト炉を用いた手法では、感度がフレイム法より約 1000 倍高いため、わずかな Ca^{2+} の混入でも測定結果を大きく左右してしまう。そこで、様々な条件検討 (グラファイト炉の種類、時定数(システム応答性の早さを表す))を行い、グラファイト炉を感度が低いもの(PyroTubeC HR, 日立ハイテクノロジーズ社)、時定数も大きく設定して感度を低くし(1.0 sec)、残像が残るように設定した結果、グラファイト炉による実用的な μM オーダーの Ca^{2+} 定量法を構築した (東京大学分子細胞生物学研究所、助教米倉慎一郎先生と共同で行った)。

2.2.8 アデノウイルスの構築

2.2.8.1 目的遺伝子のアデノウイルス骨格への導入

ウサギ *SERCA1b* を発現するアデノウイルスは、AdEasy™ XL Adenoviral Vector System (Agilent Technology 社) を用いて作製した。東京大学分子細胞生物学研究所、准教授小川治夫先生からご提供いただいた pIRES2-AcGFP ベクター (Clontech 社) に組み込まれたウサギ *SERCA1b* 遺伝子を、pFN21K ベクター (Promega 社)、pShuttle ベクター (Agilent Technology 社) の順に *SERCA1b* を組み込み、それぞれのベクターから、IRES 配列を介した AcGFP 配列、Halo タグ配列を *SERCA1b* の前後に配置した。各ベクターに組み込んだ時に、*SERCA1* 全配列をシーケンスし、変異が導入されていないものを選んで次の操作に移った。配列が確かめられた pShuttle ベクターに組み込まれた *SERCA1* を、Pme I (New England Biolabs 社) でリニアライズした後、ウイルス骨格ベクターである pAdEasy-1 ベクターを保持している BJ5183-AD-1 株の大腸菌 (Agilent Technology 社) にエレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser Xcell, 200 Ω、2.5 kV, 25 μF) で形質転換させた。pShuttle ベクターと pAdEasy-1 ベクターとで相同組み換えが起きるよう設計されているので、形質転換を起こしたコロニーを選別して、目的遺伝子が入ったアデノウイルスベクターを構築した。この段階でプラスミドは 40 kbp を超えているため、プラスミドサイズが大きくても安定に形質転換、増幅することが出来る大腸菌 XL-10 Gold ウルトラコンピテントセル (Agilent Technology 社) に形質転換して、目的ベクターを増やした。プラスミドは、QIAGEN Plasmid Mega Kit (QIAGEN 社) を用いて精製を行った。収量は、LB 培地 1 L から 0.6 μg 程度であった。

2.2.8.2 目的遺伝子を発現するアデノウイルスの増幅

ウイルスの増幅には、HEK293 細胞より接着性を高めた AD293 細胞(Agilent Technology 社)を用いた。最初に、Pac I(New England Biolabs 社)でリニアライズした目的アデノウイルスベクターを CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech 社)を用いてトランスフェクションした後、IRES 配列を介して発現している GFP タンパク質の蛍光でトランスフェクションの成功を確認し(SZX16, OLYMPUS 社, ECLIPSE TE2000-U, Nikon 社)、10 日ほど置いて、ウイルスの近隣細胞への感染が確認出来た段階で、培地と細胞を共に回収した(P1 ウイルス)。液体窒素と 37°C 恒温槽を用いて凍結融解によって細胞を破碎し、ウイルスを上清に移動させた。この溶液を遠心し(4000 rpm, 5 min, himac CF16RXII, HITACHI 社)、上清のみを次の AD293 細胞に感染させた。これを P9 ウイルスまで繰り返した。途中、P3 ウイルスの段階でプラーク純化を行い、COS7(アフリカミドリザル腎)細胞に感染させて、発現量が多く、細胞毒性の少ないウイルス株をウェスタンブロット解析で選別した。

X 線結晶構造解析には 5 mg/mL 程度の純度の高いタンパク質溶液が必要であったため、大量の SERCA1b を得る必要があった。大量の SERCA1b を得るためには、大量の SERCA1b を発現するアデノウイルスが必要であった。そのため、15 cm dish を 120 皿、80%コンフルエントにまいた AD293 細胞を用意し、P9 ウイルスを感染させて、ウイルスを精製した。COS7 細胞に小スケールで量を振って精製ウイルスを感染させ、ウェスタンブロット解析を行って最適な添加量を決定した(ロットによって異なるが、およそ 20 μ l/6 cm dish)。

2.2.9 結晶化条件の検討

2.2.9.1 COS7 細胞からのマイクロソーム画分調製

構築した SERCA1b を発現するアデノウイルスを、80%コンフルエントにまいた COS7 細胞 15 cm dish×120 皿に添加して感染させた。三日後、細胞を回収し、Autry *et al.*, 1997 の方法に従ってマイクロソーム画分を精製した。得られたマイクロソームは、精製回によって違うが、おおよそ 25 mg/mL で 8 mL 程度であった。

2.2.9.2 ミクロソーム画分からの SERCA1b の可溶化

Toyoshima *et al.*, 2013 の方法に従って SERCA1b を可溶化した。2 ml の精製マイクロソームから得られた精製 SERCA1b は、最終的に、約 5 mg/ml で 250 μ L 程度であった。

2.2.9.3 SERCA1b の結晶化

結晶化条件はそれぞれの結晶の横に記載した通りである。タンパク質溶液とリザーバー溶液を別々に作製し、室温で 1:1 で混ぜ、96 well プレート(VCP-1, VIOLAMO 社)の場合は、シッティングドロップ法で、24 well プレート (HR3-306, HAMOTON Research 社) の場合は、ハンギングドロップ法を用いて結晶化を行った。得られた結晶は、ドロップ溶液中にフリーズ用試薬 (液体窒素に結晶を入れた時に凍らない様にするため、ドロップの組成にスクロースを添加したもの) を 2 μ l 添加し、2 mm のナイロンループ(HR4-957, HAMPTON Research 社)ですくって液体窒素中に入れ、瞬間凍結した(東京大学、分子細胞生物学研究所の豊島近教授、同研究所椛島佳樹助教との共同作業)。これを、同研究所の小川治夫准教授・米倉慎一郎助教・金井勇太助教に SPring-8(兵庫県)のビームライン(BL41XU, 100 K, Rayonix MX225HE CCD detector)で結晶の回折データを収集頂き、解析頂いた。

2.2.10 DM 患者生検筋

ウェスタンブロット解析に用いた患者生検筋は、2名のDM患者、2名の非DM患者から採取されたものである。全て男性のもので、年齢は8ヶ月齢から2歳齢であった。Total RNA 抽出に使用した患者生検筋は、5名のDM患者、5名の非DM患者から、採取されたものである。DM患者、対照群としての非DM患者は共に4名が男性、1名が女性で、年齢は2ヶ月齢から31歳であった。全ての生検筋は、インフォームドコンセントを得て、国立精神・神経医療研究センターで採取されたものである。非DM患者は、患者本人は何らかの病識はあるものの、DMではないことが確認されている。すべてのDM患者は、遺伝子診断により *DMPK* 遺伝子の3' UTR 上のCTGリピートの伸長を確認しているが、具体的なリピート数は明らかとなっていない。

2.2.11 生検筋からの total RNA 抽出

患者生検筋の *SERCA1a/b* の mRNA レベルでの発現解析では、国立精神・神経医療研究センターから頂いたDM・非DMの生検筋(-80℃にて保存していた)を、500 μ l の TRIzol Reagent (Life Technologies 社)に加えて、ペッスルで粉碎した。その後、300 μ l TRIzol Reagent を加えて混ぜ合わせ、室温で5分間静置した。12,000 \times g、4℃で10分間遠心して上清を回収した後、クロロホルム 160 μ l 加えて、Vortex で15秒間激しく混合した。室温で3分間放置した後、12,000 \times g、4℃で15分間遠心、上層を回収した。そこへ、2-プロパノール 400 μ l、グリコーゲン 10 μ g を加えて転倒混和し、室温で10分間放置した。12,000 \times g で4℃、10分間遠心した。その後、75%エタノールで洗い、ペレットを風乾してから、12 μ l の RNase フリーの純水に懸濁した。このうち0.5 μ l を用いて total RNA の濃度を決定した。逆転写には、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ社)を用いた。生検筋から抽出した total RNA は、500 ng をテンプレートとし、20 μ l スケールで逆転写した。プライマーには Random 6mers (50 μ M) を2 μ l 用いた。以降は、第一章の手法(1.2.1)参照。SLNのリアルタイムPCR用プライマーは、Fw: 5'-ATG GTC CTG GGA TTG ACT GAG-3', Rv: 5'-GTG CCC TCG GAT GGA GAA TG -3'(ファスマックバイオ社)を使用した。リアルタイムPCRでは、SYBR Premix Ex TaqTM(タカラバイオ社)を使い、7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems 社)で行った。データの標準化には β -actin を使用した(Primer sets: Fw 5'-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC -3', Rv 5'-AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA -3')。

2.3 結果

2.3.1 DM モデルマウス(HSA^{LR}マウス)における SERCA1b の発現解析

mRNA レベルで知られている *SERCA1b* の異常発現をタンパク質レベルで確かめるために、DM モデルマウス(HSA^{LR}マウス)の骨格筋サンプルのウェスタンブロット解析を行った。*SERCA1b* 尾部の特異的 C 末端の 8 アミノ酸を抗原とした抗体を作製し、*SERCA1b* タンパク質を特異的に検出した結果、HSA^{LR}マウスからのみ、バンドを検出した(図 11A, B)。この時、対照群として用いた野生型マウスの骨格筋からは、*SERCA1b* が全く検出されなかった。

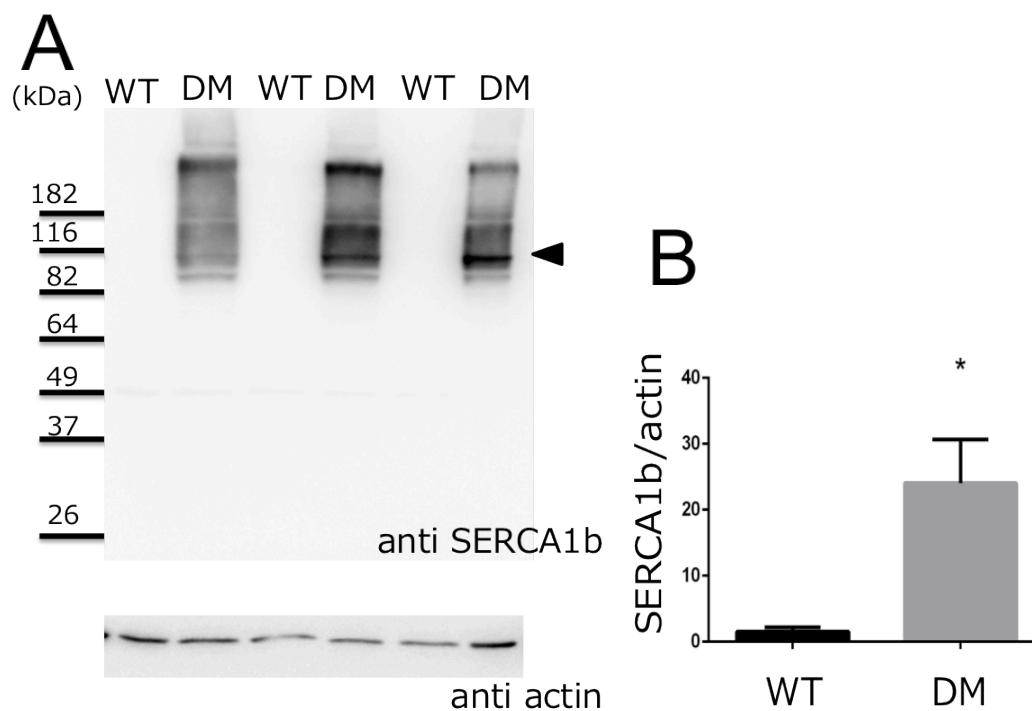


図 11 HSA^{LR}マウスにおける *SERCA1b* の異常発現

(A) マウス骨格筋における *SERCA1b* のウェスタンブロットによる発現解析。*SERCA1b* 抗体、 β -actin 抗体いずれも 2500 倍希釈。WT:野生型マウス、DM: DM モデルマウス、HSA^{LR}マウスの骨格筋サンプル。レーンごとにマウスが異なる。(B) ウェスタンブロット解析の結果をグラフ化したもの。* $p < 0.05$ ($n=3$, Student's *t*-test, mean \pm S.D.)。

2.3.2 DM 患者における SERCA1b の発現解析

DM モデルマウスを使って確かめられたタンパク質レベルでの SERCA1b の発現が、ヒト DM 患者で実際に検出されるかどうかを、患者生検筋のウェスタンブロット解析を行って確かめた。DM モデルマウス同様、SERCA1b 尾部の特異的 C 末端の 8 アミノ酸を抗原とした抗体を用いて、SERCA1b タンパク質を特異的に検出した結果、DM 患者からのみ、バンドを検出した(図 12)。この時、対照群として用いた非 DM 患者の生検筋からは、SERCA1b が全く検出されなかった。なお、SERCA1 自体は全ての生検筋サンプルから検出された。

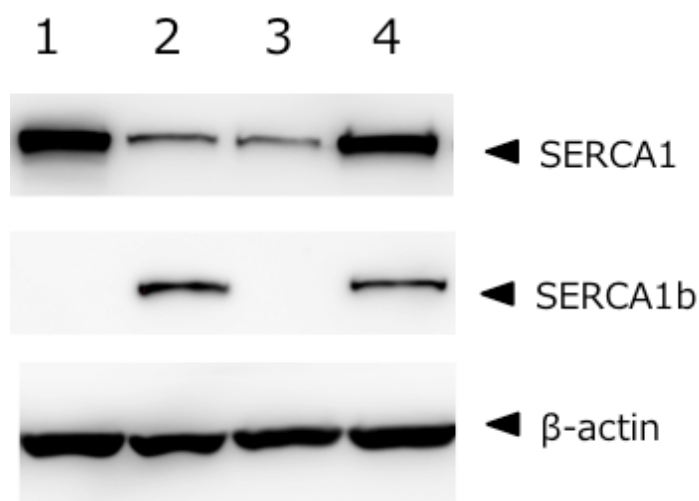


図 12 DM 患者における SERCA1b の異常発現

DM 患者生検筋における SERCA1b のウェスタンブロットによる発現解析。1, 3:非 DM 患者、2, 4: DM 患者。SERCA1 は SERCA1 抗体、SERCA1b は SERCA1b 抗体、ローディングコントロールとして β -actin 抗体で検出を行った。一次抗体は全て 2500 倍希釈した。10 μ g タンパク質/レーン。

2.3.3 SERCA1a と SERCA1b の活性比較

HEK293 細胞に SERCA1a 或は SERCA1b が挿入された pIRES-AcGFP2 ベクターをトランスフェクションし、強制発現させた。

SERCA1 を強制発現させた細胞を回収し、ミクロソーム画分を精製した。これを用いて ATPase 活性測定(遊離リン定量)を行ったところ、SERCA1b は SERCA1a の約半分の活性であった(図 13A)。この時、内在性 ATPase 活性の影響を取り除くために、SERCA 特異的阻害剤である TG を使用し、その感受性の部分を SERCA1 の活性とした。また、SERCA1 を発現させていない HEK293 から調製したミクロソーム画分からは、TG 感受性 ATPase 活性が測定出来ないほど低いことを確認した。

次に、原子吸光法を用いて、Ca²⁺輸送活性を調べたところ、ATPase 活性同様に、SERCA1b は SERCA1a の約半分の活性であった(図 13B)。なお、この時も、内在性 Ca²⁺輸送活性の影響を取り除くために、TG 感受性活性を SERCA1 の活性とした。

以上より、SERCA1b は SERCA1a の約半分の ATPase 活性を持ち、これに依存して Ca²⁺輸送活性も約半分になっていることが分かった。

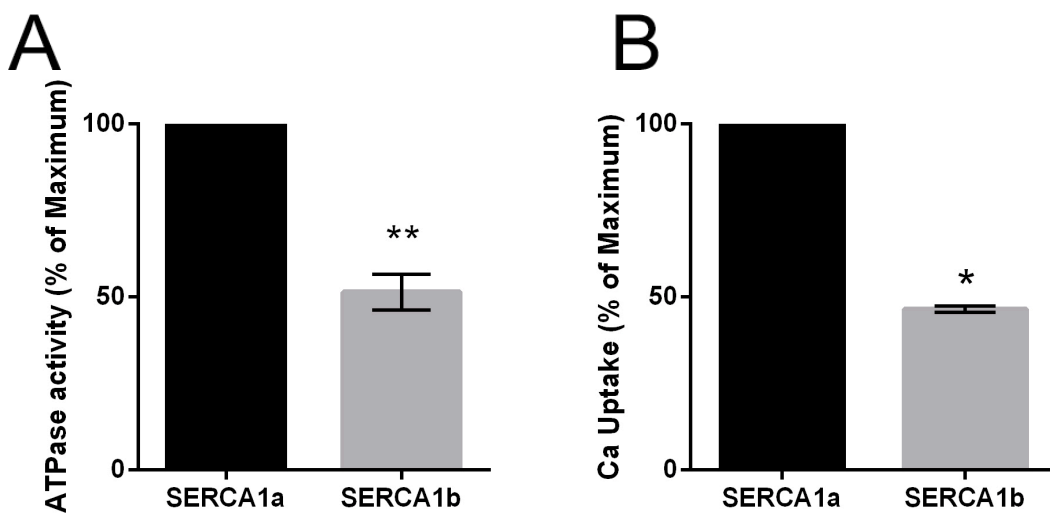


図 13 SERCA1a と SERCA1b の活性比較

SERCA1a と SERCA1b の ATPase 活性(A)、Ca²⁺輸送活性 (B)比較。いずれも SERCA1a の活性を 100%とした時の SERCA1b の活性(%)を算出した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n=3$, Student's t -test, mean \pm S.E.)。

2.3.4 SERCA1a/b の ATP に対する見かけの親和性比較

ATP 濃度依存的な ATPase 活性を比較するため、ATP 濃度を変えて測定したところ、どの ATP 濃度でも SERCA1b は SERCA1a の約半分の活性を持っていた。それぞれの ATP 濃度に対する活性をプロットすると、両酵素の ATP との親和性はそれぞれ、 K_d 値、 0.35 ± 0.05 mM (SERCA1a)と 0.32 ± 0.04 mM (SERCA1b)であった(図 14)。従って、SERCA1 の二つのスプライスバリエーションは ATP に対する見かけの親和性に大きな違いは見られないことが分かった。 V_{max} の値のみ、SERCA1a に対して SERCA1b は、約半分の 52%であった。

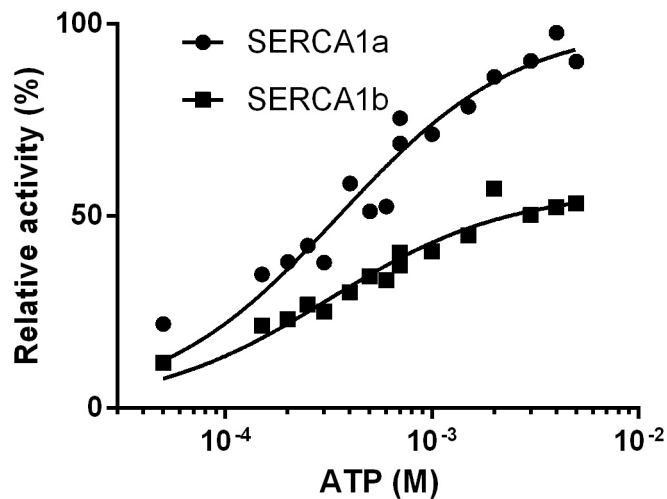


図 14 ATP 濃度依存的な ATPase 活性の比較

ATP 濃度を振り、同条件で測定した。SERCA1a(●), SERCA1b(■)。非線形 $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$ にフィット、最小二乗法、 $R^2 = 0.94$, $n = 16$, V_{max} S.E.: SERCA1a, $\pm 4.1\%$; SERCA1b, $\pm 2.0\%$ 。

2.3.5 SERCA1a/b の Ca^{2+} に対する見かけの親和性比較

次に、 Ca^{2+} 濃度依存的な ATPase 活性を比較するため、 Ca^{2+} 濃度を変えて測定したところ、ATP 濃度依存的な活性同様、どの Ca^{2+} 濃度でも SERCA1b は SERCA1a の約半分の活性を持っていた。それぞれの Ca^{2+} 濃度の時の活性をプロットすると、両酵素の Ca^{2+} との親和性はそれぞれ、 $K_{0.5}$ 値、 $0.22 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (SERCA1a) と $0.22 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (SERCA1b) であった(図 15)。従って、SERCA1 の両アイソフォームは Ca^{2+} に対する見かけの親和性に大きな違いは見られないことが分かった。 V_{max} の値は、SERCA1a に対して SERCA1b は、約半分の 57% であった。

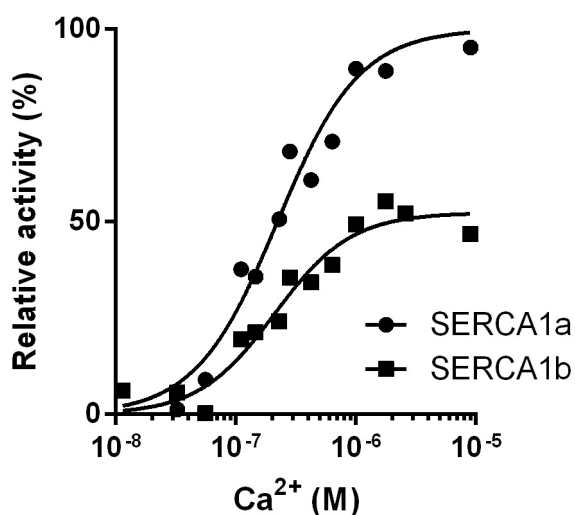


図 15 Ca^{2+} 依存的な ATPase 活性の比較

Ca^{2+} 濃度を振り、同条件で測定した。SERCA1a(●), SERCA1b(■)。非線形 $Y = V_{max} * X^h / (K_{0.5}^h + X^h)$ にフィット ($h = 1.3 \pm 0.2$)、最小二乗法、 $R^2 = 0.96$ (SERCA1a), 0.95 (SERCA1b), $n = 13$, V_{max} S.E.: SERCA1a, $\pm 6.1\%$; SERCA1b, $\pm 3.4\%$ 。

2.3.6 A23187 添加時の SERCA1a と SERCA1b の活性比較

SERCA1 の働きによって小胞体内部の Ca^{2+} 濃度は上昇し、そのままでは測定時間中に高過ぎる Ca^{2+} 濃度によって反応が阻害されてしまう。そこで、2.3.3 の活性測定では、反応溶液にシュウ酸を添加し、小胞体内でシュウ酸カルシウムが沈殿することで、 Ca^{2+} を一定濃度(5 mM, Hokin *et al.*, 1972)以下に維持していた。この Ca^{2+} 濃度は、測定時間中に ATPase 活性が一定値には達しないが、SERCA1 の活性に影響を及ぼす可能性があった。そこで、カルシウムイオノフォアである A23187 (10 μM) を添加し、改めて SERCA1a と SERCA1b の ATPase 活性を比較した。すると、両活性には活性差が見られなくなった(図 16)。

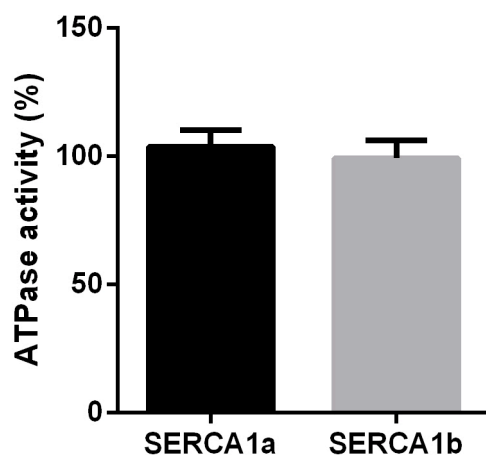


図 16 A23187 添加時の SERCA1a と SERCA1b の ATPase 活性比較

A23187(10 μM)を添加した時の SERCA1a と SERCA1b の ATPase 活性比較。いずれも SERCA1a の活性を 100%とした時の SERCA1b の活性(%)を算出した。 $p=0.45$ ($n=3$, Student' s *t*-test, mean \pm S.E.)。

2.3.7 アデノウイルスを用いた SERCA1b の大量発現系の構築

SERCA1b の尾部の構造解析を行うため、SERCA1b の結晶化を目指すことにした。そのため、高次構造が正しいタンパク質が大量に必要であった。そこで、アデノウイルスを用いた哺乳類細胞における大量発現系を構築することにした。詳細な作製方法は、方法 2.2.8 に記載した。アデノウイルスは、ヒト SERCA1a/b とウサギの SERCA1b の作製に取り組んだ。はじめに、ヒトの SERCA1a/b をコードするアデノウイルスに取り組んだが、タンパク質を発現させると、ウイルスの代を重ねるごとに分解が進み、全長タンパク質が作られなくなった。全てのウイルス作製は同時進行であり、ヒト SERCA1a/b のアデノウイルスともに同様の現象が見られた。ウサギ SERCA1b については、ウイルス構築に成功した。ヒト *SERCA1* の配列に、アデノウイルスが排除しやすい配列が含まれていた可能性が考えられる。

ヒトとウサギの SERCA1b の配列の相等性は非常に高く、97%である。また、ATPase 活性は、ウサギ SERCA1a/b でもヒト同様に SERCA1b が SERCA1a の約半分の活性であった。そこで、ウサギ SERCA1b をコードするアデノウイルスを使用して、結晶解析を行うことにした。最終的にリコンビナントのウサギ SERCA1b を精製した方法については、方法 2.2.9 に記載した(図 17)。

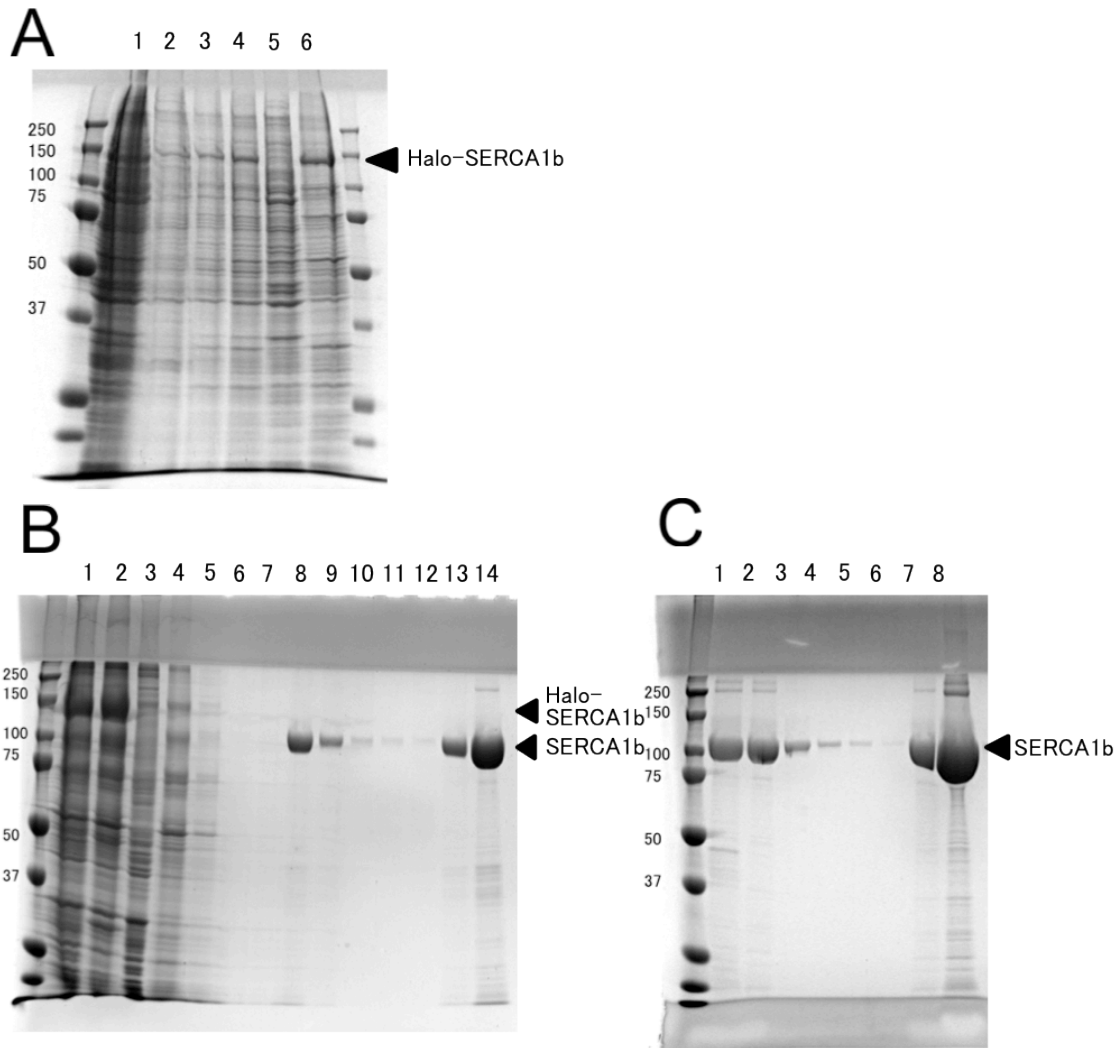


図 17 COS7 細胞から SERCA1b の精製

番号は各ゲルのレーン番号。(A) SERCA1b をアデノウイルス感染によって発現させた COS7 細胞(1)からマイクロソーム(6)を精製する過程の CBB 染色像(5 μ l/lane)。(2)~(4) : マイクロソームより軽い分画、(5) : マイクロソームより重い分画。(B) SERCA1b(14)をマイクロソーム(1)から Halo タグのアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した過程の CBB 染色像(7.5 μ l/lane)。(2) : 可溶化 SERCA1b、(3) : SERCA1b 可溶化条件における不溶分画、(4) : フロースルー、(5)~(7) : Wash 画分、(8)~(12) : TEV プロテアーゼ切断溶出液、(13) : 溶出液中 SERCA1b 画分(8+9)、(14) : (13) 濃縮液。(C) 精製 SERCA1b(1)から TEV プロテアーゼ(His タグを持つ)除去のための Ni ベースアフィニティーカラムクロマトグラフィー過程の CBB 染色像(5 μ l/lane)。(2)~(6) : SERCA1b 溶出液、(7) : 溶出液中 SERCA1b 画分(2+3)、(8) : 濃縮精製 SERCA1b(結晶化に使用したサンプル)。

2.3.8 SERCA1b の結晶化条件の検討

SERCA1b の X 線結晶構造は、全く知られておらず、結晶化を試みられたこともなかったため、SERCA1a の結晶化条件を参考にした(Toyoshima *et al.*, 2004, Sorenson *et al.*, 2004)。結晶化する SERCA1 の反応中間体は、SERCA1a の結晶構造解析の結果から、C 末端尾部が本体と近いことが予想される、E1P・2Ca²⁺・ADP 状態から始めることにした。

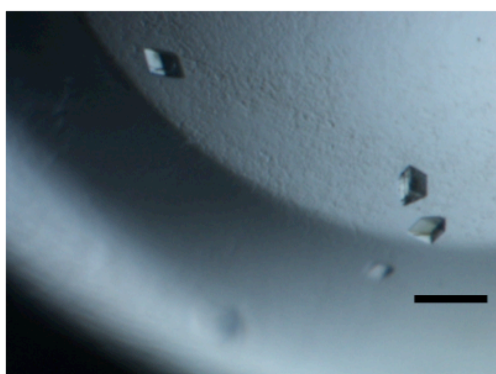
E1P・2Ca²⁺・ADP 状態は、SERCA1 と、十分な Ca²⁺、ADP と、リン酸化アナログであるフッ化アルミニウムを添加した溶液中で安定であるため、それらを添加して結晶化を試みた。沈殿剤の種類や濃度が不明であったため、広く条件を変えた(図 18A)。その結果、棒状の結晶と三角柱状の結晶が得られた(図 18B, C)。E12 で得られた三角柱の結晶が比較的大きく、厚みもあったため、SPring-8 で回折データを取得したところ、リン酸化アナログであるフッ化アルミニウムの電子密度が見えたことや、既知の SERCA1a の E1P・2Ca²⁺・ADP 状態と良く似た電子密度が見えたことから、目指す E1P・2Ca²⁺・ADP 状態であることが分かった。最大解像度は 4.0 Åであったが、結晶が小さく、SERCA1b 尾部の構造を決定するまで至らなかった(図 18D. E12 の結晶化条件のみ詳細に掲載)。

A

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	PEG(%)	4	8	12	16	20	24	4	8	12	16	20	24
A	α, γ												
B	0.35, 1.7											粒	針
C	α, γ												
D	0.35, 2.0											粒	粒
E	α, γ												△
F	0.6, 2.0											粒	針
G	α, γ												
H	0.6, 2.4											粒	針

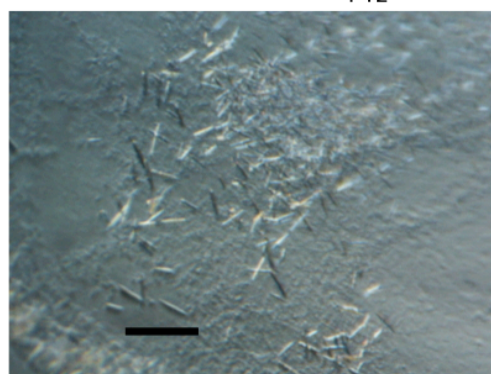
B

E12



C

F12



D

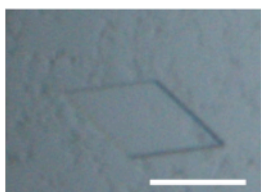
well	仕込日	Reservoir	Drop	
			α / γ	組成
E12	29-Sep-14	24% PEG1000 16% Glycerol 20 mM MES-NaOH, pH 6.1 2.5 mM NaN_3 1 mM MgCl_2	0.6/2.0	12% PEG1000 18% Glycerol 10 mM MES-NaOH, pH 6.1 1.25 mM NaN_3 1 mM MgCl_2 2 mM CaCl_2 10 mM MOPS-NaOH, pH 7.0 0.15 mM ADP 4 mM NaF 1 mM AlCl_3 0.1 % protease inhibitor

図 18 SERCA1b 三角柱結晶の結晶化条件

(A) 96 well プレートにおける PEG の種類と濃度の振り方。桃色 : PEG400, 緑色 : PEG1000, 黄色 : PEG2000, 水色 : PEG4000。 α は脂質(PC) : タンパク質(SERCA1)のモル比を表す。 γ は界面活性剤(C12E8) : 脂質(PC)の重量比を表す。 E12(三角柱結晶, B), F12(棒状結晶, C)に出来た結晶の实体顕微鏡写真。スケールバーは 100 μm 。(D) E12(三角柱結晶)の結晶化条件。

次に、結晶を大きくするべく、結晶化速度を低下させる目的で、酢酸塩やプロピオン酸塩を添加し結果、直径が 100 μm 前後の菱形の結晶を得ることが出来た(図 19)。しかし、この結晶は薄く、ループ壁に張り付き、拾い上げることが出来なかった。結晶化速度を緩めるため、スケールも大きくして 24 well プレートで結晶化を試みたが、ごく薄い結晶しか出来なかった。

A



B

<仕込条件>

well	仕込日	Reservoir	Drop	
			α/γ	組成
C12	29-Oct-14	24% PEG400 25% Glycerol 40 mM MES-NaOH, pH6.1 2.5 mM NaN_3 1 mM MgCl_2 3 mM CaCl_2 0.6 M NaOAc	0.6/2.0	12% PEG400 22.5% Glycerol 20 mM MES-NaOH, pH6.1 1.25 mM NaN_3 1 mM MgCl_2 3 mM CaCl_2 10 mM MOPS-NaOH, pH7.0 0.15 mM ADP 8 mM NaF 2 mM AlCl_3 0.1 % protease inhibitor

図 19 SERCA1b 菱形結晶の結晶化条件

(A) 酢酸塩を添加して得られた 100 μm の菱形結晶の実体顕微鏡写真。スケールバーは 50 μm 。

(B) 菱形結晶の結晶化条件。

2.3.9 DM 患者における SLN の発現

DM 患者では SERCA1 の制御タンパク質である SLN の発現が上昇しているという報告があった。それでは、SLN の発現と SERCA1 のスプライシング異常にはどのような関係があるのだろうか。DM 患者における mRNA レベルでの SLN の発現量を定量的 PCR(リアルタイム PCR)で調べてみると、個人差が大きく、有意差は得られなかったが SLN の発現が上昇している傾向にあることが確かめられた(図 20A)。次に SLN の発現量と SERCA1 全体における SERCA1b の発現量(%)を調べてみると、正の相関関係にあることが分かった(図 20B)。

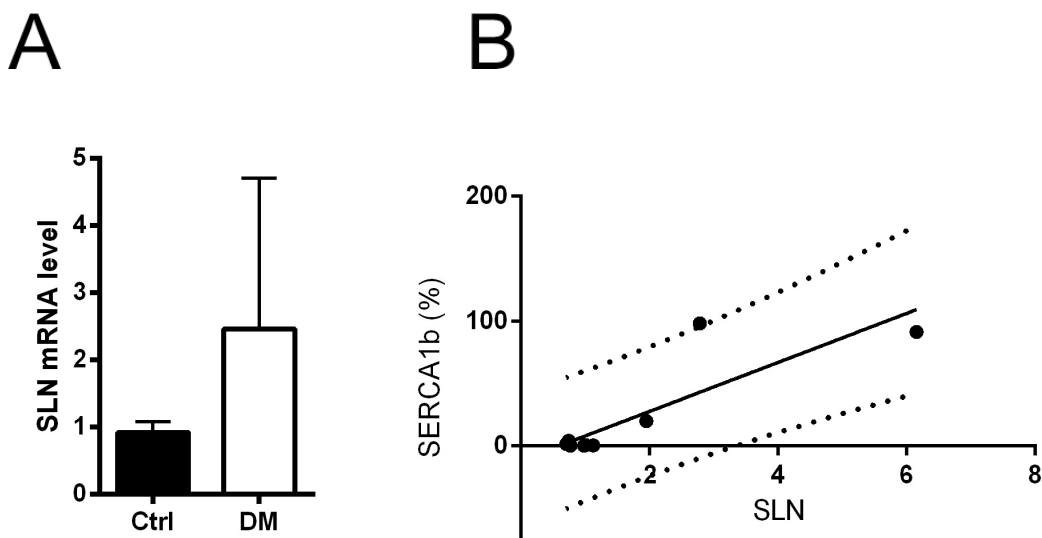


図 20 DM 患者における SLN の発現と SERCA1b(%)との相関

(A) DM 患者における SLN の mRNA レベルでの発現解析(定量的 PCR による)。 $p=0.16$ ($n=5$, Student' s *t*-test, mean \pm S.D.)。 (B) SLN の mRNA レベルでの発現と、同患者での SERCA1b の発現(%、SERCA1 全体の発現に占める割合)の相関を調べた図。 $**p<0.01$ ($n=10$, Pearson' s test, $R^2=0.73$)。実線は線形近似, $Y = 19.65 * X - 11.76$ 。点線は 95% の予測帯を表す。

2.4 考察

2.4.1 何が SERCA1a と SERCA1b の活性差をもたらすのか

SERCA1a と SERCA1b の違いは、C 末端のわずか 8 アミノ酸である。しかしながら、両アイソフォームには、結果 2.3.2 に示したように、明らかな活性差が存在する。その原因は、結果 2.3.3 と 2.3.4 が示すように、ATP との親和性や Ca^{2+} との親和性の違いである可能性は低い。結果 2.3.5 から、 Ca^{2+} イオノフォアである A23187 の添加で活性差がなくなるということ分かった。A23187 は膜に穴を開けるが通すのは Ca^{2+} だけである。従って、両アイソフォームの活性差は、小胞体内の Ca^{2+} 濃度に大きく依存することが分かった。つまり、小胞体内の Ca^{2+} 濃度が高い時(Hokin *et al.*, 1972 より、5 mM 程度だと考えられる)、SERCA1b は SERCA1a の半分の活性しか持たない。一方で、小胞体内の Ca^{2+} 濃度が低い時（反応溶液中に添加した Ca^{2+} 濃度とほぼ同じだと予想され、約 10 μM 前後）は、両アイソフォームの活性差がなくなった。これは、高い小胞体内の Ca^{2+} 濃度が、SERCA1b の活性を阻害する可能性を示唆している。

それでは、8 アミノ酸はどのようにして SERCA1b の活性を阻害するのだろうか。結果 2.3.7 では、SERCA1b の結晶化には成功したものの、X 線結晶構造解析の結果、まだ尾部構造を明らかにするほど解像度が高くないことが分かった。小胞体内の Ca^{2+} 濃度が SERCA1b の活性を阻害することは明らかになったが、SERCA1b の C 末端は細胞質側を向いており、小胞体内の Ca^{2+} と直接相互作用する可能性は低いと考えられる。そこで考えられることは、以下の二つである。まず、SERCA1b 尾部が SERCA1 本体と相互作用してその反応サイクルを阻害するという可能性が考えられる。或は、SERCA1b が何か別のタンパク質と相互作用して、SERCA1 の反応サイクルを阻害するという可能性である。この二つの可能性を確かめるためには、より大きな結晶が出来る結晶化条件を探索し、構造解析を進める手法が最も直接的であろう。現在、結晶の大きさは酢酸塩の添加により大きくなったが、まだ結晶核が多い。今後、結晶核の形成を抑え、結晶の成長に適した結晶化条件にする必要がある。

仮に SERCA1b 尾部が結晶化しても電子密度が見える性質でない場合（後述の特定の立体構造を取らないという予測結果から、この可能性はある程度考慮する必要がある）、尾部の 8 アミノ酸と SERCA1 本体のみを、*in vitro* で混ぜ、プルダウンアッセイを行う実験も想定しておくべきである。これは、SERCA1b 尾部と SERCA1 本体との相互作用の有無を見るものである。但し、仮に SERCA1b 尾部が SERCA1 の反応中間体の一部と

しか相互作用しない場合は、理想的な結果が得られないかもしれない。未知のタンパク質との相互作用は、細胞質液と混ぜて、プルダウンアッセイを行い、結合すると考えられるタンパク質を、質量分析によって同定すれば良い。

ところで、SERCA1b 尾部の 8 アミノ酸は、そのほとんどが親水性アミノ酸で構成されており、特徴的である。タンパク質は一般的にその立体構造によって機能を維持している。しかし、この 8 アミノ酸に関しては、いくつかの予測ソフトウェア (DICHOT, IUPred, POODLE, PSIPRED) により、特定の立体構造を取らないことが予測された。近年、天然変性タンパク質と呼ばれる不規則領域を持つタンパク質の機能が注目されている (Wright *et al.*, 1999)。構造を取らない不規則領域部分が、タンパク質間相互作用やタンパク質と核酸との相互作用を仲介し、転写因子や RNA 結合タンパク質に見られることが多い。これらのタンパク質では、30 残基以上の天然変性部位を持つことが多いため、SERCA1b の尾部にはあてはまらない可能性があるが、親水性アミノ酸に富んでいることは共通している。そのため、SERCA1b 尾部が特定の構造を取らないが (或は取らないがために)、SERCA1 の他の部分や他のタンパク質と相互作用している可能性は高い。

2.4.2 SERCA1b の異常発現が DM 病態にどこまで寄与するか

SERCA1b が SERCA1a の半分の活性を持つということは、DM の病態にどこまで寄与するのだろうか。DM における SERCA1a と SERCA1b のタンパク質レベルでの発現比を調べることは難しい。SERCA1a 特異的なアミノ酸残基がわずか1アミノ酸で、それに対する特異的な抗体を作製することが困難だからである。mRNA レベルでの発現比をそのままタンパク質レベルにおける発現比ととらえることは危険だが、両比が等しいと仮定すると、SERCA1b の異常発現で Brody 病のように、ミオトニアの症状が引き起こされる可能性は十分に考えられる。ちなみに、SERCA1 の発現総量は、30~40%減少するという説 (Benders *et al.*, 1997) と、変わらない (Kimura *et al.*, 2005) という説とで結論はまだ出ていない。

また、DM でスプライシングが異常になり、本来発現しないはずのタンパク質が多く発現している。Ca²⁺の恒常性維持に直接関わる RyR1, Ca_v1.1 などについては既に序論で記述した通りであるが、これらのタンパク質の異常と SERCA1b の異常発現が全て同時発生した時、症状が悪化することは容易に推測される。また、SERCA1 の活性を阻害する SLN が DM において異常発現していることが報告されている (Du *et al.*, 2010)。実際、DM 患者において、SLN の発現レベルの上昇と SERCA1b の発現レベルの上昇が正の相関関係にあることが分かった (結果 2.3.9)。SLN は SERCA1 の活性を阻害する方向に働くので、ただでさえ SERCA1b の発現により、活性が低くなった Ca²⁺の輸送活性が、更に SLN によって阻害される可能性が強まった。但し、これを確かめるためには、SLN のウェスタンブロット解析は欠かかせないだろう。

2.4.3 SERCA1b の活性を考慮した新たな DM 病態仮説の提唱

未だ支持するデータが不十分なため、提唱するには尚早ではあるが、今回の結果から、これまで分子機構が不明であった変異 RNA の存在によって CELF1 が強くリン酸化される現象を説明出来る仮説が考えられる(図 21)。

まず CUG リピートが長くのびた変異 RNA の存在によって、MBNL1 が核内に捕捉され、その本来の働きが阻害されている。そのため、*SERCA1* のスプライシングが異常となり(図 21E)、*SERCA1b* の低い Ca^{2+} 輸送活性によって小胞体に取り込まれる Ca^{2+} の量が減り、細胞質における Ca^{2+} 濃度が上昇する(図 21C)。一般に、細胞質における Ca^{2+} 濃度の上昇は、様々な経路によって数多くの異常を引き起こすが、その中には、複数のタンパク質をリン酸化する PKC も含まれる(図 21D)。 Ca^{2+} によって活性化された PKC は、これまでの報告通り、CELF1 を強くリン酸化するのではないだろうか(図 21A)。これによって、長年謎であった変異 RNA の存在によって CELF1 が強くリン酸化される理由が説明出来る。また、CELF1 に関しては、第一章で記したように、更なる *SERCA1* のスプライシング異常を引き起こしており、負の循環が形作られている可能性も考えられる(図 21B)。

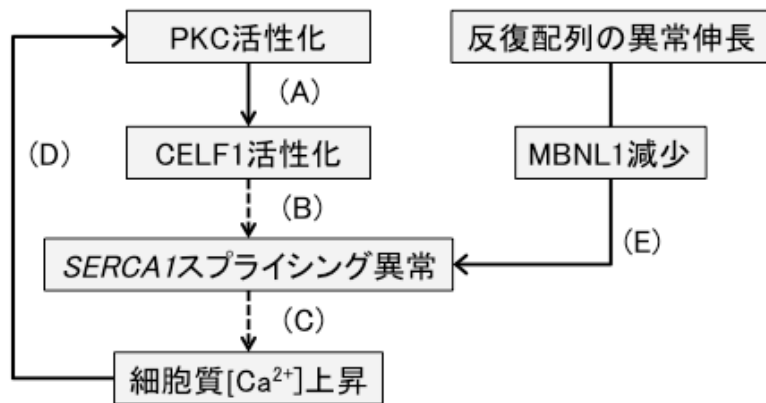


図 21 *SERCA1* スプライシング異常を介した DM の病態仮説

実線は既に報告されている関係、点線は未検証の関係を示す。

2.4.4 筋発生・筋分化における考察

本論文で明らかにした、CELF1 や PKC による *SERCA1* のスプライシング制御は、これまで知られていた新生児から成人に向かって *SERCA1b* から *SERCA1a* に発現が移行するしくみと同じなのだろうか。

SERCA1b から *SERCA1a* に発現が移行することについては、まだ十分な研究がなされておらず、*SERCA1* 欠損時の表現系が異なるヒトとマウスの比較やその他生物における発現、発現移行の理由については謎が多い。一方で、CELF1 や PKC、MBNL1 と言った *SERCA1* のスプライシング制御因子、DM でその正常な機能が阻害されている因子に関しては、発生過程においてある程度情報は得られている。

まず CELF1 や MBNL1 に関してであるが、*SERCA1b* の発現を促進する CELF1 は、出生後 2 週間ほどかけて発現が減少し、その代わりに MBNL1 の発現が増加する (Kalsotra *et al.*, 2008)。これは、今回の結果や、DM 病理と矛盾しない。また、筋分化の過程においては選択的スプライシングによる発現制御は重要なイベントであり、更にその遺伝子の多くに CELF1 と MBNL1 の制御配列が存在していること (Kalsotra *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006; Bland *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014) からも、先行研究や本論文から明らかとなった MBNL1 や CELF1 による *SERCA1* のスプライシング制御が、実際の発生・分化過程においても行われていると予想される。

PKC に関しては、本研究では、*SERCA1* のスプライシング制御に十分な条件であるとは証明出来なかったが、必須条件であることは分かった。先行研究で判明した PKC α や PKC β II による CELF1 制御 (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007) を期待しての RNA 干渉実験であったが、PKC θ が新たに *SERCA1* のスプライシングを制御していることが分かった。PKC α や PKC β II は筋肉以外でも広く発現している PKC アイソザイムであるが、PKC θ は T 細胞での発現を除けば、筋肉で多く発現することが知られており、更に筋分化の過程で発現の減少が報告されている (Boczán *et al.*, 1999)。また、先行研究でも報告された PKC β II に関しては、その異常な活性化が、筋力低下を及ぼす (Heinngge *et al.*, 2010) ことが知られている。これらの PKC に関する報告は、いずれも、本研究で得られた *SERCA1* スプライシングへの関与と矛盾しない結果であり、実際の発生・分化過程において、PKC についても同様の制御が行われていることが予想される。

従って、本研究における *SERCA1* の選択的スプライシングの制御とその結果は、実際の筋発生や筋分化の機構を一部解明したことになる。

V. まとめ

本研究では、*SERCA1* の選択的スプライシングの制御について、また、その結果のスプライスバリエーション間の機能的差異について解析を行った。

SERCA1 の選択的スプライシング制御の機構解析を行った第一章では、CELFI(図 2)、PKC(図 3, 4) (PKC β II と PKC θ)のリン酸化による *SERCA1* のエクソン 22 の挿入促進効果、PKC 分解による排除促進効果が明らかとなった。また、CELFI と PKC の関係については、PKC が CELFI を介して *SERCA1* のスプライシング制御を行うことが分かった (図 5)。

SERCA1 の機能解析を行った第二章では、筋強直性ジストロフィーにおける *SERCA1b* の異常発現(図 11、図 12)を確かめ、*SERCA1b* では、ATPase 活性 (図 13A)、それに依存して Ca^{2+} 輸送活性 (図 13B)が *SERCA1a* の約半分であることが分かった。生化学的実験により、その活性差異は、ATP (図 14)或は Ca^{2+} (図 15)に対する親和性によるものではなく、小胞体内の Ca^{2+} 濃度に左右され、低 Ca^{2+} 濃度では活性差が見られないことが分かった (図 16)。また、立体構造解析を行うため、高次構造が正しい大量の *SERCA1b* を得るために、(結果 2.3.7)アデノウイルスによる発現系を構築した。そして、発現精製した大量の *SERCA1b*(図 17)を使用して $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \cdot \text{ADP}$ 状態の *SERCA1b* の結晶化に成功した (図 18, 19)。最後に、*SERCA1* の制御因子である SLN の mRNA レベルでの発現量と *SERCA1b* の発現促進の間に正の相関関係があることを見出した(図 20)。

本研究によって、これまで注目されてこなかった *SERCA1b* が、実は *SERCA1a* と異なる性質を持ち、その異常発現が疾患に関わっている可能性が示された。*SERCA1b* をはじめとする幼若型のスプライスバリエーションが、発生過程において成人型に切り替わることは多く知られているが、その調節機構や理由はまだはっきりと分かっていない。本研究や先行研究を踏まえると、おそらく発生過程では、細胞質における最適な Ca^{2+} 濃度が異なると推測される。*SERCA* に関しては、*SERCA1*~3 まで、生化学的手法で数多く研究されている。今後、*SERCA1b* に関しても更なる詳細な解析がなされるであろう。*SERCA* の立体構造解析は、現在のところ、自然界から大量に精製される *SERCA1a* を除いてまだ研究が進んでいない。しかし、これからは、本研究でも使用したアデノウイルスによる大量発現系の活用によって、*SERCA* のみでなく、膜タンパク質をはじめとする、従来高次構造が正しいものを大量に得ることが困難であったタンパク質の構造解析が加速していくと予想される。

VI. 参考文献

- Autry, J. M., Jones, L. R. (1997). Functional co-expression of the canine cardiac Ca^{2+} pump and phospholamban in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells reveals new insights on ATPase regulation. *Journal of biological chemistry*, 272(25), 15872-15880.
- Bal, N. C., Maurya, S. K., Sopariwala, D. H., Sahoo, S. K., Gupta, S. C., Shaikh, S.A., *et al.* (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nature medicine*, 18(10), 1575-1579.
- Benders, A. A., Groenen, P. J., Oerlemans, F. T., Veerkamp, J. H., Wieringa, B. (1997). Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca^{2+} homeostasis in skeletal muscle cells. *Journal of clinical investigation*, 100(6), 1440-1447.
- Bland, C. S., Wang, E. T., Vu, A., David, M. P., Castle, J. C., Johnson, J. M., *et al.* (2010). Global regulation of alternative splicing during myogenic differentiation. *Nucleic acids research*, 38(21), 7651-7664.
- Boczán, J., Boros, S., Mechler, F., Kovács, L., Bíró, T. (2000). Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta neuropathologica*, 99(2), 96-104.
- Botta, A., Malena, A., Loro, E., Del Moro, G., Suman, M., Pantic, B., *et al.* (2013). Altered Ca^{2+} homeostasis and endoplasmic reticulum stress in Myotonic Dystrophy Type 1 muscle cells. *Genes*, 4(2), 275-292.
- Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B., MacLennan, D. H. (1986). Two Ca^{2+} ATPase genes: Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell*, 44(4), 597-607.

Brandl, C. J., Martin, D. R., MacLennan, D. H. (1987). Adult forms of the Ca²⁺ ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *Journal of biological chemistry*, 262(8), 3768-3774.

Brody, I. A. (1969). Muscle contracture induced by exercise: a syndrome attributable to decreased relaxing factor. *New England Journal of Medicine*, 281(4), 187-192.

Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., *et al.* (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68(4), 799-808.

Drögemüller, C., Drögemüller, M., Leeb, T., Mascarello, F., Testoni, S., Rossi, M., *et al.* (2008). Identification of a missense mutation in the bovine *ATP2A1* gene in congenital pseudomyotonia of Chianina cattle: An animal model of human Brody disease. *Genomics*, 92(6), 474-477.

Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., *et al.* (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 187-193.

Gianni, D., Chan, J., Gwathmey, J. K., del Monte, F., Hajjar, R. J. (2005). SERCA2a in heart failure: role and therapeutic prospects. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6), 375-380.

Griggs, R. C., Jozefowicz, R., Kingston, W., Nair, K. S., Herr, B. E., Halliday, D. (1990). Mechanism of muscle wasting in myotonic dystrophy. *Annals of Neurology*, 27(5), 505-512.

Guglielmi, V., Vattemi, G., Gualandi, F., Voermans, N. C., Marini, M., Scotton, C., *et al.* (2013). SERCA1 protein expression in muscle of patients with Brody disease and Brody syndrome and in cultured human muscle fibers. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(1), 162-169.

Halliday, D., Ford, G. C., Edwards, R. H., Rennie, M. J., Griggs, R. C. (1985). In vivo estimation of muscle protein synthesis in myotonic dystrophy. *Annals of neurology*, 17(1), 65-69.

Han, Z., Pantazis, P., Lange, T. S., Wyche, J. H., Hendrickson, E. A. (2000). The staurosporine analog, Ro-31-8220, induces apoptosis independently of its ability to inhibit protein kinase C. *Cell death and differentiation*, 7(6), 521-530.

Hennige, A. M., Heni, M., Machann, J., Staiger, H., Sartorius, T., Hoene, M., *et al.* (2010). Enforced expression of protein kinase C in skeletal muscle causes physical inactivity, fatty liver and insulin resistance in the brain. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 903-913.

Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. A., Swanson, M. S., Cooper, T. A. (2005). Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *Journal of cell science*, 118(13), 2923-2933.

Hokin, L. E., Hokin, L. E. (1972). *Metabolic transport*. 327, Elsevier.

Hossain, M. Z., Ao, P., Boynton, A. L. (1998). Platelet - derived growth factor - induced disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 involves protein kinase C and mitogen - activated protein kinase. *Journal of cellular physiology*, 176(2), 332-341.

Huberman, E., Callahan, M. F. (1979). Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proceedings of the national academy of sciences*, 76(3), 1293-1297.

Jacobs, A. E., Benders, A. A., Oosterhof, A., Veerkamp, J. H., van Mier, P., Wevers, R. A., *et al.* (1990). The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular basis of disease*, 1096(1), 14-19.

Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A. J., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., *et al.* (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20333-20338.

Ketley, A., Chen, C. Z., Li, X., Arya, S., Robinson, T. E., Granados-Riveron, J., *et al.* (2014). High-content screening identifies small molecules that remove nuclear foci, affect MBNL distribution and CELF1 protein levels via a PKC-independent pathway in myotonic dystrophy cell lines. *Human molecular genetics*, 23(6), 1551-1562.

Kimura, Y., Kurzydowski, K., Tada, M., MacLennan, D. H. (1996). Phospholamban regulates the Ca²⁺-ATPase through intramembrane interactions. *Journal of biological chemistry*, 271(36), 21726-21731.

Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., *et al.* (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics*, 14(15), 2189-2200.

Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., *et al.* (2009). MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic acids research*, 37(19), 6477-6490.

Kosk-Kosicka, D. (2005). Measurement of Ca²⁺-ATPase activity (in PMCA and SERCA1). In *Calcium Signaling Protocols* (pp. 343-354). Humana press.

Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Molecular cell*, 28(1), 68-78.

Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., *et al.* (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human molecular genetics*, 15(13), 2087-2097.

Lytton, J., Westlin, M., Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Journal of biological chemistry*, 266(26), 17067-17071.

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E., MacLennan, D. H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14483-14489.

MacLennan, D. H., Kranias, E. G. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews molecular cell biology*, 4(7), 566-577.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., *et al.* (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, 289(5485), 1769-1772.

Maruyama, K., MacLennan, D. H. (1988). Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca²⁺ transport activity of the Ca²⁺-ATPase expressed in COS-1 cells. *Proceedings of the national academy of sciences*, 85(10), 3314-3318.

Michalowski, S., Miller, J. W., Urbinati, C. R., Paliouras, M., Swanson, M. S., *et al.* (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic acids research*, 27(17), 3534-3542.

Odermatt, A., Taschner, P. E., Khanna, V. K., Busch, H. F., Karpati, G., Jablecki, C. K., *et al.* (1996). Mutations in the gene–encoding SERCA1, the fast–twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nature genetics*, 14(2), 191-194.

Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., *et al.* (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Journal of biological chemistry*, 273(20), 12360-12369.

Ohmori, T., Arteaga, C. L. (1998). Protein kinase C epsilon translocation and phosphorylation by cis-diamminedichloroplatinum (II)(CDDP): potential role in CDDP-mediated cytotoxicity. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the american association for cancer research*, 9(4), 345-353.

Pan, Y., Zvaritch, E., Tupling, A. R., Rice, W. J., de Leon, S., Rudnicki, M., *et al.* (2003). Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice. *Journal of biological chemistry*, 278(15), 13367-13375.

Resh, M. D., Erikson, R. L. (1985). Highly specific antibody to Rous sarcoma virus src gene product recognizes a novel population of pp60v-src and pp60c-src molecules. *The journal of cell biology*, 100(2), 409-417.

Sahoo, S. K., Shaikh, S. A., Sopariwala, D. H., Bal, N. C., Periasamy, M. (2013). Sarcolipin protein interaction with sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is distinct from phospholamban protein, and only sarcolipin can promote uncoupling of the SERCA pump. *Journal of biological chemistry*, 288(10), 6881-6889.

Santoro, M., Piacentini, R., Masciullo, M., Bianchi, M. L. E., Modoni, A., Podda, M. V., *et al.* (2014). Alternative splicing alterations of Ca²⁺ handling genes are associated with Ca²⁺ signal dysregulation in myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) myotubes. *Neuropathology and applied neurobiology*, 40(4), 464-476.

Savkur, R. S., Philips, A. V., Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature genetics*, 29(1), 40-47.

Schmitt, J. P., Kamisago, M., Asahi, M., Li, G. H., Ahmad, F., Mende, U., *et al.* (2003). Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*, 299(5611), 1410-1413.

Sørensen, T. L. M., Møller, J. V., Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science*, 304(5677), 1672-1675.

Standaert, M. L., Bandyopadhyay, G., Antwi, E. K., Farese, R. V. (1999). RO 31-8220 Activates c-Jun N-terminal kinase and glycogen synthase in rat adipocytes and L6 myotubes. comparison to actions of insulin 1. *Endocrinology*, 140(5), 2145-2151.

Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *The journal of cell biology*, 128(6), 995-1002.

Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., *et al.* (2011). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca_v1.1 calcium channel. *Human molecular genetics*, ddr568.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405(6787), 647-655.

Toyoshima, C., Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898), 605-611.

Toyoshima, C., Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430(6999), 529-535.

Toyoshima, C., Nomura, H., Tsuda, T. (2004). Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature*, 432(7015), 361-368.

Toyoshima, C., Iwasawa, S., Ogawa, H., Hirata, A., Tsueda, J., Inesi, G. (2013). Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺-bound E1 state. *Nature*, 495(7440), 260-264.

Wang, E. T., Ward, A. J., Cherone, J., Wang, T. T., Giudice, J., Cooper, T. A., *et al.* (2014). Functional Antagonism Between CELF and Mbnl Proteins in the Cytoplasm. *bioRxiv*, 009183.

Ward, A. J., Rimer, M., Killian, J. M., Dowling, J. J., Cooper, T. A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Human molecular genetics*, 19(18), 3614-3622.

Wootton, L. L., Michelangeli, F. (2006). The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) Ca^{2+} pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors. *Journal of biological chemistry*, 281(11), 6970-6976.

Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology*, 293(2), 321-331.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell calcium*, 32(5), 279-305.

Zador, E., Mendler, L., Ver Heyen, M., Dux, L., Wuytack, F. (1996). Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem. J*, 320, 107-113.

Zádor, E., Vangheluwe, P., Wuytack, F. (2007). The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. *Cell calcium*, 41(4), 379-388.

Zádor, E., Owsianik, G., Wuytack, F. (2011). Silencing SERCA1b in a few fibers stimulates growth in the entire regenerating soleus muscle. *Histochemistry and cell biology*, 135(1), 11-20.

杉田亜希子. (2010). カルシウムポンプのダイナミックな構造変化を解明. 研究成果を優しく解説. SPring8.

杉田有治. (2008). カルシウムポンプの機能制御機構. *生化学*, 80(10), 917-924.

VII. 謝辞

本研究の *in vivo* での意味合いや実体を知る上で欠かせることの出来ない貴重な患者生検筋サンプルは国立精神・神経医療研究センター部長、西野一三先生、元室長、林由起子先生（現東京医科大学主任教授）にご提供いただきました。また、筋強直性ジストロフィーモデルマウス (HSA^{LR} マウス) に関しては、ロチェスター大学教授、Charles A. Thornton 先生、大阪大学助教、高橋正紀先生にご提供いただきました。pSecDK ベクターは、横浜市立大学教授、大野茂男先生よりご提供いただきました。心より御礼申し上げます。

本研究は、東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 石浦章一研究室ならびに東京大学 分子細胞生物学研究所 豊島近研究室にて行われました。

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻教授、石浦章一先生には学部からお世話になり、修士課程からの五年間は研究室に所属して、研究課題の選定から数多くのご指導を賜りました。東京大学 分子細胞生物学研究所教授、豊島近先生には SERCA1 の活性測定・結晶化実験において、実験環境のご提供、熱心なご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

同研究所准教授、小川治夫先生には、SERCA1b のアデノウイルス発現系の構築に関して、ご指導を賜りました。同研究所助教、米倉慎一郎先生には SERCA1 の活性測定全般に関して、ご指導を賜りました。リコンビナント SERCA1b の精製・結晶化では、同研究所助教、椛島佳樹先生にご指導を賜りました。様々な実験手法の指導や、試料をご提供頂きました。元石浦研究室の紀嘉浩先生（現明治薬科大学）、古戎道典先生（現東京大学）、石浦研究室の三橋弘明先生、大澤奈摘さん、小穴康介さん、豊島研究室の杖田淳子さん、平田絢美さん、中島理恵さん、元山かん奈さん、東京大学分子細胞生物学研究所の藤木克則博士をはじめ、日頃のご討論いただいた石浦研究室の皆様、豊島研究室の皆様にご心から御礼申し上げます。

なお、本研究の資金的援助は部分的に日本学術振興会特別研究員奨励費 No. 13J08957 によって賄われています。

本研究の全ての段階において、常に私と共に考えることを強いられ、実験計画の吟味からデータの考察や発表練習の付き添い、うまく行かなかった実験（基本的に全ての実験がそうですが）後の精神的・技術的フォローをして下さった同期の市川宗厳さんには、感謝の言葉ありません。当然、在从我出生后的一个日日夜夜里，父母对我不断无私的关爱也是无法用语言来感谢的。同时，对于在异乡生活的兔子来说，老爹恩纳、爷爷奶奶、姨妈姨夫、小哥、还有其他亲戚的存在一直都是坚强的后盾，给予我自己本身的存在意义，好让我放心的奋斗，遇到困难时也可不完全失去自信。

博士課程が容易だった人はおそらくいないでしょう。私自身においても、それは全く例外ではありません。私は特に、客観的に見ても主観的に見ても研究者としても人間としても力不足で、出来損ないであり、時にはこの世に存在を許してもらえるかどうかすら、疑問に思います。しかし、それでも今日ここに謝辞を書ける状態で存在していることは、一概に上記の皆様の存在によります。

私はこれまで幾度となく、人間は社会の中に生きるのだと教えられてきましたが、正直その言葉の意味についてはいまひとつ理解していませんでした。遅ればせながら、この博士課程を通じて、初めて、人間とは他の人間に助けられて生活しているのだということを実感し、先の言葉の意味を正しく理解したと思っております。本研究に携わった全ての人が、例え一人だけでも、手を差し伸べてくれなかったら、本研究は存在し得なかったでしょう。

最後に、本研究が、人類が生きていくこの社会の、いつか遠い未来でも、ほんのわずかだけでも、役に立つことがあれば、それ以上嬉しいことは、ありません。

2015年1月27日

趙 一夢