

谷本 あゆ子 論文内容の要旨

主　論　文

Rab44 negatively regulates myoblast differentiation by controlling fusogenic protein transport and mTORC1 signaling

(Rab44 は細胞融合タンパク質輸送と mTORC1 シグナル伝達を制御することにより筋芽細胞の分化を負に制御する)

谷本 あゆ子、山口 優、門脇 知子、坂井 詠子、親川 駿、
小野 悠介、吉田 教明、筑波 隆幸

(Journal of Cellular Biochemistry, in press)

DOI: 10.1002/jcb.30457

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：吉田 教明 教授)

緒　　言

骨格筋は咬合や咀嚼だけでなく、輪郭の改善の観点からも歯科矯正領域の重要な組織である。骨格筋は様々な刺激に反応しながら強力な可塑性を有する組織であり、単核筋芽細胞の融合によって形成された多核の筋管で構成され、最終的に筋線維へと成熟する。この筋管形成の *in vitro* の研究にはマウス骨格筋芽細胞株 C2C12 が多用される。これまで筋芽細胞に関する低分子量 Rab タンパク質の機能について C2C12 細胞を用いて解析してきた。しかしながら、高分子量 Rab タンパク質については全く行われていない。そこで本研究では C2C12 細胞の筋管へ分化過程において、高分子量 Rab タンパク質の 1 つである Rab44 の機能について解析を行った。Rab44 は筋管への分化過程で発現量が増大し、Rab44 をノックダウンした筋芽細胞は分化が促進し、逆に Rab44 を過剰発現した筋芽細胞では分化と筋管形成が阻害されることを示す。

対象と方法

C2C12 細胞の増殖実験では、10%ウシ胎児血清(FBS)含有の DMEM で培養した。筋芽細胞から筋管への分化実験では、2%ウマ血清含有 DMEM に置き換えた。血清飢餓および再刺激実験では、C2C12 細胞を無血清ハンクス平衡塩類溶液(HBSS)で 1 時間飢餓状態にし、その後 10%FBS を含む DMEM で再刺激するか、継続して HBSS 中でさらに 15 分間培養した。細胞の増殖能や分化時の遺伝子発現などの解析を行うため、定量性 real-time PCR(qRT-PCR)法や Western blot を行った。また細胞表面のタンパク質解析のため、免疫蛍光染色による顕微鏡観察を行った。リソソームを特異的に蛍光染色する LysoTracker を用いてライブイメージングを行

いリソームの大きさを測定した。

結 果

マウスの Rab44 は 2 つのアイソフォームが存在するが、C2C12 細胞や骨格筋には short form のみが検出された。Rab44 は筋芽細胞分化に伴って発現量が増大することが分かった。siRNA を用いて Rab44 をノックダウンすると、筋芽細胞の筋管への分化と筋管形成が促進された。Rab44 ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて、筋管マーカーであるミオシン重鎖 1 (MyHC) タンパクの発現レベルが上昇した。同様に筋原性マーカーである *Myf5*, *Myod*, *Myog* の mRNA レベルも一部上昇していた。次に、Rab44 が筋細胞の細胞融合に必要不可欠なタンパク質である myomaker および myomixer の輸送に関与している可能性を検討した。免疫蛍光染色の解析を行うと、myomaker および myomixer のノックダウン細胞における細胞表面の発現量は、コントロール細胞と比較して有意に増強していた。これらの結果は Rab44 が欠損すると細胞融合因子が膜表面に蓄積することで筋管への細胞分化が進むことを意味する。

一方、Rab44 を過剰発現させると、C2C12 筋芽細胞の細胞増殖が抑制し、筋管への分化と管形成も阻害した。過剰発現により、筋原性マーカーの mRNA レベルも一部減少した。Rab44 過剰発現細胞に Rab44 のノックダウン処理をすると細胞増殖の増加が抑えられた。さらに、蛍光顕微鏡で局在を調べてみると、Rab44 はリソームに局在しており、Rab44 をノックダウンすると C2C12 細胞でのリソームの数が減り、リソームのサイズが大きくなつた。Rab44 を過剰発現するとその逆になった。分子メカニズムの 1 つとして、Rab44 の過剰発現は、C2C12 細胞における mTORC1 シグナル伝達経路を抑制することが分かった。すなわち、Rab44 過剰発現細胞では mTORC1 とその下流分子である P70-S6K や S6 は血清刺激により、リン酸化レベルが低下したが、4EBP1 は逆にリン酸化レベルが増大した。従って、Rab44 はリソームに結合する mTORC1 のシグナル伝達を介して筋管形成の分化に関与することが示された。

考 察

本研究では、C2C12 細胞を用いて Rab44 が融合タンパク質の細胞表面への輸送と mTORC1 シグナル伝達を制御することにより、筋芽細胞の筋管への分化を負に制御していることを示した。これら結果は、Rab44 欠損マウス由来の筋衛星細胞を用いた実験結果と一致していた。

さらに私達は個体レベルでも Rab44 が骨格筋の分化と再生に関与することを見出している。Rab44 ノックアウトマウスを使用して、筋再生を誘導すると、ノックアウトマウスの筋線維断面積は野生型マウスのそれよりも大きくなつた。これら結果は Rab44 欠損が筋損傷からの回復を促進することを示しており、本研究の結果と一致する。

以前研究から、Rab44 はマクロファージから破骨細胞の分化を負に制御していることが分かっている。Rab44 が筋芽細胞から筋管への分化過程を負に制御しているのであれば、筋管と破骨細胞は細胞融合を起こして分化するという共通点があり、本研究の結果は興味深い知見である。Rab44 は細胞が多核化するための共通の制御機構を有しているのかもしれない。