

インスリン様成長因子とビタミン C は低温における
骨格筋細胞の分化を促進する

島 亜衣

目 次

略語	3
要旨	5
序論	7
第 1 章 低温におけるマウスおよびヒト骨格筋細胞の分化	
背景	10
方法	12
結果	15
考察	20
図表	25
第 2 章 低温における骨格筋分化とミトコンドリア機能	
背景	36
方法	38
結果	39
考察	41
図表	44
総合考察	47
参考文献	48
謝辞	56

略 語

ATP	adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CIRP	cold-inducible RNA-binding protein
CM	conditioned medium (培養上清)
COX	cytochrome c oxidase (シトクロム c 酸化酵素)
CSP	cold shock protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DM	differentiation medium (分化培地)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ改変イーグル培地)
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDL	extensor digitorum longus (長趾伸筋)
FADH ₂	1,5-dihydro flavin-adenine dinucleotide
FBS	fetal bovine serum (胎児ウシ血清)
FCCP	carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
HS	horse serum (ウマ血清)
HSP	heat shock protein
IGF	insulin-like growth factor (インスリン様成長因子)
MEM	minimal essential medium (基礎培地)
miR	microRNA
MLC	myosin light chain (ミオシン軽鎖)
MRF	muscle regulatory factor (筋分化制御因子)
MyHC	myosin heavy chain (ミオシン重鎖)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
Rbm3	RNA-binding motif protein 3
T3	triiodothyronine
TCA	tricarboxylic acid (トリカルボン酸)
TGF	transforming growth factor (トランスフォーミング成長因子)
TRP (channel)	transient receptor potential (channel) (一過性受容器電位チャンネル)
VC	vitamin C
WT	wild-type (野生型)

要 旨

常時 37°C前後の深部体温を維持する恒温動物においても、体表面や四肢末端では体温が低下する。本研究では、このような低温環境が細胞の分化に与える影響について、骨格筋細胞を用いて調べた。骨格筋組織は全身に分布するため、生体内でも実際にさまざまな温度変化に曝されることが予想される。また、筋分化制御因子 (muscle regulatory factor; MRF) などの転写因子レベルで分化制御機構が明らかになっているため、細胞分化の温度感受性に関する研究モデルとして適当であると考えた。

マウス筋芽細胞株 C2C12 を 38°Cで増殖させた後、分化を誘導して 30°Cで培養すると、筋管形成が抑制された。30°Cでは MRF のうち MyoD は発現していたが、myogenin の発現が転写段階で大幅に抑制されていた。30°Cで培養すると、MRF の正の制御因子である E2A は 38°Cと同様に発現したが、38°Cでは分化に伴って減少する MRF の負の制御因子、分化抑制因子 Id3 の発現が高レベルで維持されていた。また、38°Cでは分化に伴って発現が増加する、骨格筋分化の制御に関与するマイクロ RNA (miR-1, -133a, -181a, -206) が 30°Cではほとんど発現しなかった。すなわち、30°Cでは骨格筋細胞の分化が著しく抑制されることが示された。

そこで、30°Cでも Id3 の発現が低下して筋分化が進行する条件を探索した。通常培養温度で myogenin 発現を促進させることが報告されているインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; IGF) -I とビタミン C をそれぞれ 100 ng/ml と 200 μ M で培養液に添加したところ、30°Cでも Id3 の発現が低下し、myogenin が発現して 38°Cと同様に多核の筋管細胞が形成された。IGF-I は 30°Cでの myogenin 発現に対して濃度依存的に作用した。ただし、分化初期のみではなく、長期的な添加を必要とした。なお、IGF-II も 30°Cでの myogenin 発現と筋管形成を促進した。IGF-I とビタミン C の添加は骨格筋分化に関与するマイクロ RNA の発現も増加させた。これらの結果は、30°Cにおける筋分化抑制の原因が IGF とビタミン C によってレスキュー可能な特定段階の阻害であることを示唆する。IGF-I とビタミン C による筋分化促進作用は 30°C以下でも認められ、これらを同時に添加すると C2C12 はマウス深部体温より約 10°C低い 28°Cでも筋管細胞を形成し、25°Cでも myogenin を発現した。

次に、IGF-I 過剰発現マウス (以下 IGF-I Tg マウス) の長趾伸筋を用いて単一筋線維培養を

行ない、筋衛星細胞の分化に対する低温の影響を調べた。IGF-I Tg マウスと野生型マウスから単離した筋線維をビタミン C は加えずに 38°C と 30°C で培養すると、どちらの温度でも IGF-I Tg マウス筋衛星細胞の myogenin 発現は野生型マウスよりも促進された。ただし、30°C ではほとんど myogenin を発現しなかった C2C12 とは異なり、30°C で培養した野生型マウス筋衛星細胞は一定の割合で myogenin を発現していた。これは、分化した筋細胞自身が IGF やビタミン C のように低温でも myogenin 発現を促進する因子を分泌したためではないかと考えた。そこで、38°C で分化させた C2C12 の培養上清を用いて 30°C で C2C12 を培養したところ、myogenin の発現が促進されることを認めた。これらの結果から、生体内には、局所的に体温が低下しても筋分化が阻害されないように、温度低下に対する耐性を高めるメカニズムが存在することが示唆された。

これらの 30°C における筋分化抑制と、IGF-I とビタミン C によるレスキュー効果は、マウス骨格筋細胞だけではなくヒト骨格筋細胞でも同様に認められた。従って、哺乳類の筋細胞に共通した現象である可能性が高いと考えられる。

最後に、低温での筋分化におけるミトコンドリアの役割について調べた。骨格筋細胞は分化に伴って酸化リン酸化依存的なエネルギー産生に移行することが報告されており、多くの先行研究がミトコンドリアの機能阻害によって筋分化が抑制されることを示している。電子伝達系のシトクロム c 酸化酵素 (cytochrome c oxidase; COX) サブユニット I の発現を調べると、38°C では分化に伴って発現が増加したが、30°C では発現が低かった。また、蛍光試薬 JC-1 を用いてミトコンドリア膜電位を可視化したところ、30°C では膜電位の低い細胞が多かった。しかし、IGF-I とビタミン C を培養液に添加すると COX サブユニット I の発現とミトコンドリアの膜電位が回復したことから、低温におけるこれらの筋分化促進作用がミトコンドリアの機能回復を介することが示唆された。

本研究は、骨格筋細胞の分化に必須である筋分化制御因子の発現やミトコンドリアの機能に、温度が大きな影響を与えることを明らかにした。骨格筋細胞が温度を感知する機構や下流の情報伝達経路については未だ明らかになっていないが、IGF やビタミン C などの生体因子が低温の影響をキャンセルすると示したことは、今後、温度という物理的シグナルがいかにして化学的シグナルに変換されるのかを知る上で、大きな手掛かりとなると考える。本研究が、これから発展するであろう「温度生物学」の端緒となることを期待したい。

序 論

脊椎動物の進化の過程で、恒温動物の出現は非常に画期的な出来事であったと言える。恒温動物は、外気温の変化にかかわらず体温を約 36-39°C で一定に保つことができる [1]。そのため、常に安定した代謝を行なって高いパフォーマンスを維持することができ、外気温に行動が左右される変温動物と比較して生息域を拡大させてきた [2]。このように、恒温動物の常時高い体温が、動物の行動や生理機能に及ぼす影響については多くの研究が為されてきた一方、体温が個々の細胞に与える影響については、これまであまり注目されてこなかった。実際には、恒温動物においても、体幹深部や体表面、四肢末端など身体の部位により体温は変動している。例えばヒトは、室温 20°C において、指先が深部体温 (37°C) よりも約 9°C 低いことが報告されている (図 1) [3]。私は、このような低温環境が動物の行動や代謝だけではなく、組織や細胞の挙動にも影響を与えている可能性はないだろうかと考えた。

一般に、細胞は環境の変化に速やかに対応して適応する能力を持つ。外部環境の温度変化は、細胞が経験する最も一般的なストレスの一つであり、特に高温環境に対する細胞の適応については、分子シャペロンとしてタンパク質変性を抑制する heat shock protein (HSP) の発現誘導が知られている。低温環境においても、RNA-binding motif protein 3 (Rbm3) や cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) といったいわゆる cold shock protein (CSP) の発現が誘導され、mRNA の安定化に寄与する [4]。恒温動物の細胞は 25-30°C 程度のマイルドな低温環境に曝されると CSP 以外のタンパク質合成が抑制され、代謝の低下や増殖抑制、アポトーシスの遅延、細胞骨格の変化等を引き起こすことが報告されているが [4]、細胞の分化に対する低温の影響については未だ十分に検討されていない。

そこで私は、筋分化制御因子 (MRF) 等の転写因子レベルで分化制御機構が詳細に解明されている [5] 骨格筋細胞を用いて、低温が細胞分化に与える影響について研究を行なった。骨格筋組織では、MyoD, myf-5, myogenin, MRF4 を含む MRF の制御によって筋前駆細胞 (muscle progenitor cell) が筋芽細胞 (myoblast) へと分化し、筋芽細胞が融合して多核の筋管細胞 (myotube) を形成する (図 2)。筋管細胞はその後、さらに成熟して収縮能を持つ筋線維となる。この過程で MRF と協調して働く転写因子群 [5] や、MRF の発現を調節する成長因子・細胞外基質などの情報伝達

経路についても多くの先行研究があり、骨格筋細胞は細胞分化の研究モデルとして確立されている。そのうえ、全身に分布しているために生体内でも実際にさまざまな温度変化に曝されていることが予想され、細胞分化の温度感受性に関する研究には適切であると考えた。

また私は、低温におけるミトコンドリアの変化に注目した。ミトコンドリアは酸化的リン酸化による ATP 産生を行ない、細胞の種々の活動に必要なエネルギーを供給する。骨格筋組織においては、分化に伴ってミトコンドリアの数や体積が変化することが報告されており、筋管細胞では筋芽細胞と比較してミトコンドリア数が増加するほか、個々のミトコンドリアの体積増加やクリステの発達が認められる [6]。また、ミトコンドリア DNA 量は分化に伴って約 4 倍に増加する [7]。マウス筋芽細胞株 C2C12 では、増殖中は解糖系によって ATP を産生するが、分化誘導後はエネルギー産生の中心が酸化的リン酸化へと移行することも報告されている [8]。ただし、ウズラ筋芽細胞株 QM7 では、クロラムフェニコールによってミトコンドリアのタンパク質合成を阻害すると、解糖系の亢進により ATP 産生量は維持されるにも関わらず、myogenin の発現が大幅に低下して筋分化が抑制された [9]。このことから、筋分化におけるミトコンドリアの役割は単なるエネルギー供給だけではなく、MRF の発現を介した分化制御機構にも影響を与えることが示唆された。すなわち、MRF の発現と筋分化の進行には、ミトコンドリアが正常に機能することが必要であると考えられる。

本研究では恒温動物の骨格筋細胞分化に対する低温の影響を調べるため、マウスおよびヒト骨格筋細胞を 30°C で培養して分化を誘導し、MRF 発現とミトコンドリアの変化を 38°C と比較した。MRF および MRF の機能を調節する転写因子やマイクロ RNA の発現変化については第 1 章「低温におけるマウスおよびヒト骨格筋細胞の分化」に、ミトコンドリアの変化については第 2 章「低温における骨格筋分化とミトコンドリア機能」にまとめた。なお、筋分化における MRF の発現様式やミトコンドリアの機能、またこれらを調節する種々の要因については各章の「背景」でより詳細に述べる。

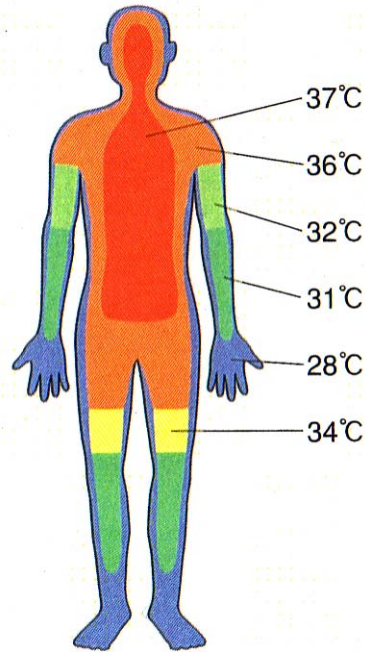


図1 室温20°Cにおけるヒトの体温分布

(J. Aschoff and R. Wever. Naturwissenschaften 45:477-485 (1958) より改変)

四肢末端や体表面では、体幹深部より体温が大幅に低い。

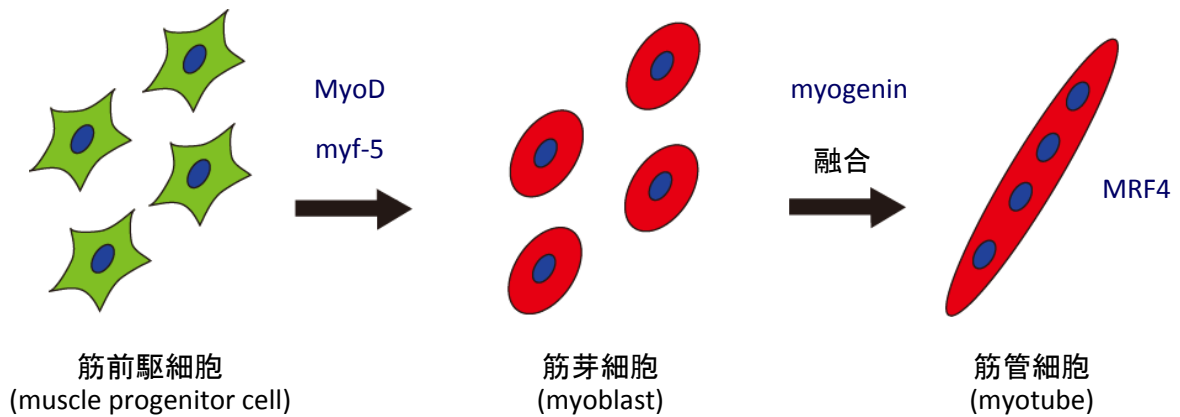


図2 骨格筋細胞の分化

筋前駆細胞から筋芽細胞へと分化し、融合して筋管細胞を形成する過程はMRFであるMyoD, myf-5, myogenin, MRF4によって、調節される。

第1章 低温におけるマウスおよびヒト骨格筋細胞の分化

背景

骨格筋細胞の分化を制御する MRF のうち、MyoD と myf-5 は骨格筋細胞への分化運命決定初期に作用する。両者の機能は重複しており[10]、MyoD [11] または myf-5 [12] のシングルノックアウトマウスは、骨格筋組織に異常を示さない。しかし、MyoD/myf-5 ダブルノックアウトマウスでは、筋芽細胞の形成が抑制される [13]。一方、myogenin と MRF4 は分化後期や骨格筋の成熟に関与し、myogenin ノックアウトマウスは正常な筋芽細胞を持つものの、それらが融合して筋管細胞を形成することはない [14, 15]。ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型の転写因子である MRF は、単独では DNA に結合できず機能しない。組織非特異的に存在する bHLH 型の転写因子 E2A (スプライシングバリエントとして E12 と E47 を含む [16]) とヘテロダイマーを形成して初めて、筋特異的遺伝子上流に存在する E-box 配列(CANNTG)[17] に結合して標的遺伝子の転写を活性化する。ただし、分化誘導前には E2A は高い親和性で分化抑制因子 Id と結合しており、MRF と結合することができない [5]。Id はドミナントネガティブ型 HLH タンパク質で、HLH 二量体ドメインを持つが DNA 結合部位を欠く [18]。骨格筋組織には Id1, Id2, Id3 が存在し、いずれも過剰発現させると筋分化を抑制すると報告されている [19-21]。これらの Id は通常、筋分化に従って発現が低下するため [18]、E2A は MRF と結合できるようになり、MRF による筋特異的遺伝子の発現が促進される。

MRF の発現や筋分化の進行は、成長因子や細胞外基質など様々なシグナルによって影響を受ける。例えば、インスリン様成長因子 (IGF)-I は骨格筋細胞の増殖と分化の両方を促進する[22]。このうち分化促進作用については、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt シグナルを介して myogenin の発現を増加させる結果であることが報告されている [23]。骨格筋組織で IGF-I を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、体重や筋重量の増加、筋線維肥大、筋力向上、筋衛星細胞の活性化を介した筋再生の促進が認められた [24]。同様に IGF-I レセプターに結合する [25] IGF-II も、過剰発現させると筋分化を促進することが報告されている [26]。また細胞外基質では、筋細胞のコラーゲン合成を阻害すると筋分化が抑制されることが報告されている [27]。コラーゲン

の合成・分泌にはプロリンとリシンの水酸化が必須であることから、これらの水酸化酵素の補因子として機能する L-アスコルビン酸リン酸（ビタミン C; VC）は myogenin の発現を促進して、筋分化に寄与する [28, 29]。

また、マイクロ RNA も筋分化制御に関与するが報告されている [30]。マイクロ RNA は非翻訳型の低分子 RNA で、動物細胞では標的 RNA に結合して翻訳抑制を引き起こす。これまでに、様々な組織で細胞の増殖、分化、アポトーシスなどの制御に関与することが示されており、近年注目される制御因子である。骨格筋組織特異的に発現するのは miR-1, -133, -206 で、3 種類とも分化誘導後に発現が増加する [31]。このうち miR-1 と miR-206 は筋分化促進的に、miR-133 は筋分化抑制的に作用することが報告されているが [30]、標的遺伝子や作用機構については明らかになっていない部分が多い。ただし、miR-1, -133, -206 の上流には MyoD や myogenin の結合サイトが存在することがわかっており [32]、MRF によって発現を調節されている可能性が高い。また、骨格筋以外の組織（脳、肺、腎臓、脾臓、胸腺、骨髄）でも発現が確認されている miR-181 も、マウス損傷筋の再生過程や分化を誘導した培養骨格筋細胞で発現が増加することが報告されており、筋分化制御への関与が示唆された [33]。miR-181 は miR-1, -133, -206 とは異なり、MyoD よりも上流で機能し、MyoD の発現を抑制する Hox-A11 の発現を抑制して、結果的に MyoD の発現促進に寄与することが示されている [33]。

第 1 章では、恒温動物の細胞分化に対する低温の影響を調べるため、マウス筋芽細胞株 C2C12 をマウス深部体温（38℃）より低い温度で培養した。筋管細胞の形成および MRF, E2A, Id や筋分化制御に関与するマイクロ RNA の発現を免疫組織染色と RT-PCR で調べたところ、低温では筋分化の抑制が認められた。そこで、通常培養温度で筋分化促進作用が報告されている IGF-I, IGF-II, VC を培養液に添加して、低温でも筋分化が回復するかどうかを検討した。また、株細胞ではない生体由来の細胞培養系として、単一筋線維培養におけるマウス筋衛星細胞について C2C12 と同様の現象が観察されるかどうかを検討した。さらに、ヒトの株細胞を用いて同様の実験を行なった。

方 法

細胞培養

成体 C3H マウス大腿部由来の筋芽細胞株 C2 [34] のサブクローンである C2C12 (ATCC, VA) [35] を 1% ゼラチン (ウシ皮膚由来; Sigma-Aldrich, MO) を塗布した培養皿 (AGC テクノグラス, 千葉) に播種し、20%胎児ウシ血清 (fetal bovine serum; FBS) (SAFC Biosciences, KS) を含む high-glucose (4.5 g/l) ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM) (ナカライテスク, 京都) を用いて 38°C, 5% 二酸化炭素で増殖させた。細胞密度がサブコンフルエントに達した段階で、筋分化を誘導するために 10% ウマ血清 (horse serum; HS) (Invitrogen, CA) を含む基礎培地 (minimal essential medium; MEM) (Invitrogen) に交換し、25, 28, 30, 35 または 38°Cで培養した。分化培地 (differentiation medium; DM) は 1 日おきに交換した。なお、培養液はいずれも 50 U/ml ペニシリンと 50 µg/ml ストレプトマイシンを含む (以下同様)。

IGF-I (R&D Systems, MN) は最終濃度 10, 50, 100 ng/ml、IGF-II (R&D Systems) は 100 ng/ml、安定化型 VC である L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (和光純薬, 大阪) (以下 VC と表記) は 200 µM で DM に加えた。

DM を用いて 38°Cで培養した C2C12 の培養上清 (conditioned medium; CM) は 1 日おきに回収し、細胞を除くために 0.22 µm のフィルターを通した後、すぐに 30°Cでの培養に使用した。培養液は 1 日おきに交換した。

ヒト骨格筋細胞はペンシルベニア大学 (医学部, 生理学教室) の H. L. Sweeney 教授より恵与された。この細胞は、フィラデルフィア小児病院の倫理委員会承認のもとに健常人から筋生検を行ない、Decary らの方法 [36] で組織片培養し、Zhu らの方法 [37] で株化したものである。ここでは、コラーゲン I を塗布した培養皿 (AGC テクノグラス) に播種して 20% FBS を含む F-10 培地 (Invitrogen) を用いて 38°Cで増殖させた。サブコンフルエントになった段階で、C2C12 と同様の DM を用いて 30°Cまたは 38°Cで分化を誘導した。IGF-I は最終濃度 100 ng/ml、VC は 200 µM で DM に加えた。

マウス単一筋線維培養 (single-fiber culture)

MLC/mIgf-1 トランスジェニックマウス [24] (以下 IGF-I Tg マウスと表記) を用いた単一筋線維培養は、このマウスを開発したペンシルベニア大学の H. L. Sweeney 教授、E. R. Barton 教授 (歯学部、解剖学・細胞生物学教室) の協力のもと、同大学で行なった。培養は Nagata らの方法 [38] を参照した。IGF-I Tg マウスと C57BL/6 野生型マウス (以下 WT マウスと表記) の長趾伸筋 (extensor digitorum longus; EDL) を、腱を切断して採取し、DMEM に溶解した 0.1% コラゲナーゼ タイプ I (Sigma-Aldrich) で、37°C で 2 時間処理した。筋線維は 20% FBS (Thermo Fisher Scientific, MA) を含む high-glucose, GlutaMAX-I 含有の DMEM (Invitrogen) を用いて 37°C で 3 日間 (以下「37°C 培養」と表記) または、37°C で 1 日培養した後 30°C でさらに 3 日間 (以下「30°C 培養」と表記) 培養した。マウスは全て成体オスを用い、解剖前に二酸化炭素により安楽死させた。この実験は、ペンシルベニア大学の動物実験委員会のガイドラインに基づいて行なった。

免疫組織染色

培養細胞またはマウス筋線維は、10% ホルマリン/PBS で固定後 100% メタノールで処理した。ブロッキングには 10% HS, 3% BSA/PBS を用いた。1 次抗体は、マウス抗 MyoD 抗体 (clone 5.8A, 1:50, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), マウス抗 myogenin 抗体 F5D (1:1, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA), マウス抗横紋型ミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MyHC) 抗体 MF20 (1:2, Developmental Studies Hybridoma Bank), ウサギ抗 E2A.E12 抗体 (V-18, 1:50, Sanra Cruz Biotechnology, CA), ウサギ抗 MyoD 抗体 (C-20, 1:50, Sanra Cruz Biotechnology) を、2 次抗体は Alexa Fluor 標識抗体 (1:400, Invitrogen) を用いた。抗体は 3% BSA/PBS に希釈し、いずれも室温で 1 時間反応させた。細胞核はヘキスト 33258 (Sigma-Aldrich) または DAPI (Vector Laboratories, CA) で標識した。

試料は蛍光顕微鏡 Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察し、画像はデジタルカメラ VB-7000 (キーエンス, 大阪) で撮影した。

mRNA の RT-PCR

トータル RNA は RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Crawley, UK) を用いて、分化誘導前または分化誘導後 1-4 日目の C2C12 から抽出した。得られた RNA100 ng から、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) を用いて逆転写反応と cDNA の増幅を行なった。PCR 条件は先行研究に準拠し、94°C15 秒, 60°C30 秒, 55°C45 秒で 20 (図 12A), 22 (図 12B), 23 (図 9, 10), 25 (図 5), 28 (図 8) サイクルとした。プライマー配列は次の通り: MyoD 5'-AGG CTC TGC TGC GCG ACC-3' および 5'-TGC AGT CGA TCT CTC AAA GCA CC-3' [39]; myogenin 5'-GAG CTG TAT GAG ACA TCC CC-3' および 5'-GTA AGG GAG TGC AGA TTG TG-3' [40]; E2A 5'-TAC CCC TCC GCC AAG ACC-3' および 5'-TTG GGG GAT AAG GCA CTG-3' [41]; Id1 5'-GTC CTG CTC TAC GAC ATG AAC G-3' および 5'-GAT CAA ACC CTC TAC CCA CTG G-3' [42]; Id2 5'-AAA ACA GCC TGT CGG ACC AC-3' および 5'-CTG GGC ACC AGT TCC TTG AG-3' [43]; Id3 5'-AAG GCG CTG AGC CCG GTG C -3' および 5'-TCG GGA GGT GCC AGG ACG-3' [44] (図 9) または 5'-ACT CAG CTT AGC CAG GTG GA-3' および 5'-CAT TCT CGG AAA AGC CAG TC-3' (図 10); IGF-II 5'-TCA AGC CGT GCC AAC CGT CGC-3' および 5'-CTC CGA AGA GGC TCC CCC GTG-3' [45]; β -actin 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' および 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' [44] (図 5, 8, 10, 12) または 5'-AGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3' および 5'-CTA GAA GCA CTT GCG GTG CAC GAT GGA AGG G-3' [39] (図 9)。PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離後、1 μ M SYTO60 赤色蛍光核酸染色試薬 (Invitrogen) で 20 分間染色した。各バンドの蛍光強度は近赤外画像解析装置 Odyssey (LI-COR, NE) で測定し、 β -actin のバンド強度で標準化した。

マイクロ RNA の RT-PCR

低分子 RNA は *mirVana* miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) を用いて、分化誘導後 4 日目の C2C12 から抽出した。得られた RNA10 ng から *mirVana* qRT-PCR miRNA Detection Kit (Ambion) を用いて逆転写反応と cDNA の増幅を行なった。PCR 条件は 95°C15 秒, 60°C30 秒で 20 サイクルとした。プライマーは *mirVana* qRT-PCR プライマーセット (Ambion)

から、マイクロ RNA(miR)-1, miR-133a, miR-181a, miR-206, 5S rRNA に対してそれぞれ hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-181a, hsa-miR-206, 5s を用いた。PCR 産物は 3.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離後、1 μ M SYTO60 赤色蛍光核酸染色試薬で 20 分間染色した。各バンドの蛍光強度は近赤外画像解析装置 Odyssey で測定し、5S rRNA のバンド強度で標準化した。

統計解析

C2C12 とヒト骨格筋細胞の myogenin 発現核については、それぞれの条件について異なる 3 視野以上で計数し、全体の細胞核数 (計 600 核以上) に対する割合を求めた。MyHC を発現した細胞内の核については、異なる 4 視野以上で計数し、全体の細胞核数 (計 400 核以上) に対する割合を求めた。マウス単一筋線維培養については、筋線維ごとに MyoD 発現核に対する myogenin 発現核の割合を求めた。解析に用いた筋線維数は次の通り : 37°C培養 IGF-I Tg=52, WT=34 (2 日目), IGF-I Tg=46, WT=37 (3 日目); 30°C培養 IGF-I Tg=61, WT=37 (3 日目), IGF-I Tg=45, WT=29 (4 日目)。得られた割合は平均値 \pm 標準誤差で示す。Student t 検定により有意差を評価した。

結果

C2C12 は 30°Cでは myogenin を発現しない

マウス筋芽細胞株 C2C12 を 38°Cで増殖させた後、培養液中の血清濃度低下により分化を誘導して 30, 35 または 38°Cで培養した。38°Cで培養すると、分化誘導後 4 日目には細胞は融合して筋管細胞を形成していた。35°Cでは分化の進行が 1 日遅れ、5 日目に筋管形成が認められた。しかし、30°Cでは 10 日間培養しても筋管形成は認められなかった。30°Cで 4 日間培養した細胞を 38°Cに戻して培養を続けると、4 日後に筋管形成が認められた (図 3)。

分化誘導後 4 日目に免疫組織染色を行ない、MRF のうち MyoD と myogenin の発現を調べたところ、MyoD は 38°Cと 30°Cで同程度発現していたが (38°C : 70 \pm 0.9 %, 30°C : 72 \pm 3.6 %)、30°Cでは myogenin の発現が大幅に抑制されていた (38°C : 54 \pm 2.1 %, 30°C : 0.5 \pm 0.02 %) (図 4)。同様に、分化誘導後 4 日目の細胞から RNA を抽出して RT-PCR を行なったところ、myogenin の発現は転写段階で抑制されていた (図 5, 表 1)。

IGF-I と VC は 30°Cにおける C2C12 の筋分化を促進する

30°Cではこれらの筋芽細胞の分化能が完全に失われているのか、あるいは、30°Cでも分化する条件が存在するのかを調べるために、先行研究によって **myogenin** の発現促進作用が報告されている IGF-I と VC を DM に添加して、C2C12 を 30°Cで培養した。ただし、VC すなわち L-アスコルビン酸は不安定で培養液中ですぐに分解されるため [46]、本実験では安定性の高いリン酸型ビタミン C 誘導体 (L-アスコルビン酸リン酸) を用いた。L-アスコルビン酸リン酸は 37°Cで培養した場合、1 週間後でも 85%が分解されずに維持されることが確認されている [47]。

100 ng/ml IGF-I と 200 μ M VC を DM に添加して 30°Cで培養したところ、分化誘導後 4 日目における **myogenin** の発現は大幅に増加し、6 日目には 38°Cで培養した場合と同様の外観を持つ多核の筋管細胞が形成された (図 6 A, C)。100 ng/ml IGF-I か 200 μ M VC のどちらか一方を加えて培養した場合でも **myogenin** の発現は促進されたものの、その効果は両方を加えた場合の半分程度だった。また、全体の核数に対する MyHC を発現した細胞内の核の割合についても、IGF-I か VC のどちらか一方を加えた場合では、両方を加えた場合よりも効果が低かった (図 6B)。両方を添加した場合は、分化誘導後 6 日目までに多核で太い筋管細胞が形成されたのに対し、IGF-I か VC だけでは、MyHCは発現したものの単核細胞や二核の細い筋管細胞しか観察されなかった (図 6C)。

VC を常に 200 μ M 加えたうえで IGF-I 濃度を変化させて、分化誘導後 4 日目の **myogenin** 発現を比較したところ、10 ng/ml IGF-I は効果を示さなかったが、50, 100 ng/ml では濃度依存的な効果が認められた (図 6D)。また同様に、常に 200 μ M VC を加えたうえで 100 ng/ml IGF-I を添加する期間を変化させたところ、分化誘導後 1 日あるいは 2 日間だけ IGF-I を添加した場合には、分化誘導後 4 日目における **myogenin** 発現を促進する効果は認められず、4 日間連続して IGF-I を添加した場合にのみ **myogenin** の発現は増加した (図 6E)。

IGF-II も 30°Cにおける C2C12 の筋分化を促進する

IGF-I のホモログである IGF-II についても、IGF-I と同様に 30°Cでの筋分化を促進する効果があるかどうかを調べた。100 ng/ml IGF-II と 200 μ M VC を DM に添加して C2C12 を 30°Cで培養したところ、分化誘導後 4 日目における **myogenin** の発現が促進された (図 7A)。ただし VC の

有無にかかわらず、IGF-II を添加した場合の myogenin 発現の割合 (VC⁻ : 11±1.2 %, VC⁺ : 19±3.2 %) は、同濃度 (100 ng/ml) で IGF-I を添加した場合 (VC⁻ : 16±0.8 %, VC⁺ : 33±1.1 %) と比較して低かった。なお、myogenin 発現割合においても、MyHC 発現細胞に含まれる核の割合においても、IGF-II を単独で添加した場合よりも VC と同時に添加した場合の方が効果は高かった (図 7B)。IGF-I を添加した実験で得られた結果と同様に、分化誘導後 6 日目には、IGF-II と VC の両方を添加した場合は多核で太い筋管細胞が形成されたのに対し、IGF-II だけでは、MyHC は発現したものの単核細胞や二核の細い筋管細胞しか観察されなかった (図 7C)。

30°Cにおける Id3 の高発現は IGF-I と VC によって減少する

次に、MRF と相互作用する E2A と Id の 30°Cにおける発現を調べた。38°Cで増殖させて DM に交換する前 (分化誘導前, day0) と、38°Cまたは 30°Cで分化誘導後 4 日間培養した C2C12 から RNA を抽出して RT-PCR を行なったところ、E2A の発現は分化誘導前後を通していずれも少なく、30°Cでは 38°Cよりもわずかに発現が低いものの、大きな差は認められなかった (図 8A, 表 2)。免疫組織染色を行なって、30°Cでも E2A が細胞核に局在することを確認した (図 8B)。一方先行研究で示された通り [18]、Id1, Id2, Id3 の発現は分化誘導前に高く、38°Cでも 30°Cでも分化誘導後は発現が低下した (図 9, 表 3)。ただし Id3 は、38°Cと比較すると 30°Cでは分化誘導後の発現低下の割合が少なかった。

そこで、100 ng/ml IGF-I と 200 μM VC を DM に添加して、30°Cでの Id3 発現が変化するかどうかを調べた。分化誘導後 4 日目の C2C12 から RNA を抽出して RT-PCR を行なったところ、IGF-I と VC は 30°Cにおける Id3 の発現を低下させた (図 10, 表 4)。

30°Cにおける骨格筋特異的マイクロ RNA の発現は IGF-I と VC によって回復する

先行研究 [30] において筋分化制御に関与することが報告されているマイクロ RNA, miR-1, -133a, -181a, -206 について、30°Cで発現が変化するかどうかを調べた。分化誘導後 38°Cと 30°Cで 4 日間培養した C2C12 から RNA を抽出して RT-PCR を行なった。30°Cで培養した細胞については、100 ng/ml IGF-I と 200 μM VC を添加した群としていない群 (DM(-)と表記) を用意した。

内部標準として用いた 5S rRNA の発現は、38°Cと 30°Cで差は認められなかったが、調べたマイクロ RNA はいずれも 38°Cでは発現していたものの、DM(-)を用いて 30°Cで培養した細胞ではほとんど検出されなかった (図 11, 表 5)。しかし、IGF-I と VC の添加によってこれらのマイクロ RNA の発現は 30°Cでも 38°Cで分化させた場合と同程度まで回復した。

IGF-I と VC は 30°Cにおける C2C12 の IGF-II 自己分泌を促進する

骨格筋細胞は分化に伴って IGF-II を自己分泌することが報告されており [48]、アンチセンスオリゴ DNA [48] や中和抗体 [49] を用いてこれを阻害すると、筋分化が抑制される。そこで、30°Cで 4 日間培養した C2C12 における IGF-II の発現を RT-PCR で調べた。先行研究で述べられていた通り、38°Cでは IGF-II の発現が認められたが、30°Cでは発現が大幅に抑制されていた。しかし、100 ng/ml IGF-I と 200 μ M VC を添加すると、30°Cでも 38°Cと同程度に IGF-II を発現した (図 12A, 表 6)。IGF-I と VC を加えて 30°Cで分化誘導後、IGF-II と myogenin のどちらが先に発現しているかを RT-PCR で調べたところ、myogenin 発現の方が早かった (図 12B, 表 7)。

IGF-I と VC は 30°C以下でも C2C12 の筋分化を促進する

IGF-I と VC は、myogenin の発現だけではなく、Id3 の発現低下や IGF-II の自己分泌、マイクロ RNA の発現など、30°Cにおける筋分化抑制を全面的に解除することがこれまでの実験により示された。そこで、30°C以下でも IGF-I と VC の添加により筋分化が進行するかどうかを調べた。

100 ng/ml IGF-I と 200 μ M VC を含む DM を用いて、C2C12 を 25°Cまたは 28°Cで培養した。免疫組織染色により myogenin と MyHC の発現を調べたところ、25°Cと 28°Cどちらの温度においてもこれらの発現は促進された (図 13A, B)。myogenin の発現について、28°Cでは 30°Cで培養した場合と同様に分化誘導後 4 日目に調べたが、その割合 (21 \pm 1.3 %) は 30°C (33 \pm 1.1 %) よりも低かった。DM(-)を用いて培養した場合は、25°Cと 28°Cともに myogenin や MyHC を発現する細胞は全く観察されなかった (data not shown)。28°Cでも長期間培養すると、分化誘導後 10 日目には多核の筋管細胞が形成された。しかし 25°Cでは 11 日間培養しても MyHC を発現する細胞は単核細胞や二核の細い筋管細胞だけだった (図 13C)。

IGF-I Tg マウス由来の筋衛星細胞は WT マウスよりの分化の進行が速い

次に、骨格筋において IGF-I を過剰発現させたトランスジェニックマウス (IGF-I Tg マウスと表記) の筋衛星細胞 (muscle satellite cell) を用いて、株細胞である C2C12 と同様の結果が得られるかどうかを調べた。筋衛星細胞は骨格筋幹細胞であり [50]、筋線維の損傷によって放出されるシグナルによって活性化し [51]、分化を開始して、筋再生に寄与する [52]。本研究ではマウス後肢から筋線維を単離して、VC は加えずに 37°C または 30°C で培養し、筋線維上に存在する筋衛星細胞の分化過程における MyoD と myogenin の発現を免疫組織染色によって評価した。

IGF-I Tg マウスはミオシン軽鎖 (MLC) 1 プロモータと MLC エンハンサを用いてマウス IGF-I を導入しており、野生型 (WT) マウスと比較して、体重と筋重量の増加、筋線維肥大、筋力向上、筋損傷後の再生の促進が認められる [24]。MLC は速筋線維 (タイプ IIb 線維) で発現するため、これらの効果は長趾伸筋 (EDL) や腓腹筋で顕著だった [24]。そこで、本実験ではオス成体マウスから EDL を採取して培養を行なった。DAPI では筋衛星細胞の核だけでなく、筋線維内の核も全て染まったため、筋線維 1 本あたりの MyoD 発現核の数に対する myogenin 発現核の割合を求めて分化の指標とした。この値が 1.0 を超える場合は、分化が進行して MyoD の発現はすでに低下しているが、myogenin を発現している細胞が多いことを示す。

37°C 培養では、IGF-I Tg マウスの筋衛星細胞は、培養 2 日目に WT マウスより高い割合で myogenin を発現していた。しかし、3 日目には WT マウスでも同程度の発現が認められ、両者の差は失われた (図 14A)。一方、30°C 培養では IGF-I マウス、WT マウスの筋衛星細胞ともに 3 日目ではまだ myogenin は発現しておらず、4 日目になって myogenin の発現が認められた (図 14B)。その割合は IGF-I マウスの方が高かったが、C2C12 で得られた結果とは異なり、WT マウスの筋衛星細胞も一定の割合で myogenin を発現していた。

分化した C2C12 の培養上清は 30°C における myogenin 発現を促進する

IGF-I や VC を添加しなくても、単一筋線維培養において WT マウスの筋衛星細胞が 30°C で myogenin を発現したのはなぜだろうか。私は、筋芽細胞のみの均質な培養系である C2C12 の場合とは異なり、単一筋線維培養では筋線維やそれに付着した筋線維芽細胞 (myofibroblast) によって

低温でも筋分化を促進する因子が持ち込まれているのではないかと考えた。

分化した筋細胞がそのような因子を分泌しているかどうかを調べるために、38°Cで分化させたC2C12の培養上清 (conditioned medium; CM) を用いて30°CでC2C12を培養した。CMで6日間培養したところ、100 ng/ml IGF-Iと200 μM VCを含むDMで培養した場合と同程度の割合で、30°Cでもmyogeninを発現した (図15A)。CMで培養した筋細胞は培養10日目にはMyHCを発現していたが、融合して多核の筋幹細胞を形成することはなかった (図15B)。

IGF-IとVCは30°Cにおけるヒト骨格筋細胞の分化を促進する

最後に、ヒト骨格筋細胞でも同様の現象が観察されるかどうかを調べた。C2C12と同じ条件でヒト骨格筋細胞の分化を誘導すると、6日目のmyogeninの発現割合 (14±0.8%) は、38°Cでも4日目のC2C12の場合 (43±1.9%) より低かった。しかし、30°Cにおけるmyogenin発現の抑制 (1.1±0.3%) と、100 ng/ml IGF-Iと200 μM VCをDMに添加したことによるmyogenin発現の回復 (16±1.8%) は示された (図16)。

考 察

マウス筋芽細胞株C2C12は培養液中の血清濃度低下により速やかに分化し、38°Cで培養すると分化誘導後4日目には筋管細胞を形成した。3°C低い35°Cでは筋管形成が1日遅れたことから、培養温度は筋芽細胞の分化速度に影響を与えることが示唆された。しかし、30°Cでは筋芽細胞の融合に関与する転写因子myogeninが発現せず、筋管細胞が形成されなかったことから、筋管形成に必要な最低温度は30°Cより高いと考えられた。ただし、30°Cで培養した細胞を再び38°Cに戻すと筋管細胞を形成したことから、30°Cにおける分化抑制は可逆的であることが示された。

本研究では、30°Cで筋芽細胞が完全に分化能を失っているわけではないことを示すために、IGFとVCによるレスキュー実験を行なった。IGF-I [23] とVC [29] は通常培養温度でmyogeninの発現を促進することが報告されているが、低温における効果はこれまで検討されていなかった。私はIGF-I, IGF-IIとVCが30°Cで大幅にmyogeninの発現を促進し、筋芽細胞の融合を可能にすることを示した。すなわち、温度という物理的シグナルは細胞内で化学的シグナルに変換され、

その一部が IGF や VC によって制御されていることが示唆された。IGF と VC は各々単独でも myogenin 発現を促進したが、同時に用いることで初めて多核の筋管細胞が形成された。この相乗効果の要因として、一つには、VC がコラーゲンやプロテオグリカンの合成と分泌を促進するので [53]、細胞外基質が充実することによって IGF をより高濃度で細胞周囲に維持し、効果を高めた可能性が挙げられる。あるいは、還元剤である VC が IGF の下流シグナルを増強した可能性も考えられる。

本研究では、IGF-I 濃度と培養温度を変化させることで筋分化の進行の速度や程度 (myogenin や MyHC の発現割合、筋管形成の割合) が調節可能であることを示した。通常培養温度では、筋分化は数日以内に速やかに進行するため、その分子機構について詳細に追跡することは困難である。そこで、この低温における培養方法を、筋分化過程を引き延ばしてより詳しく解析することが可能な実験ツールとして提案したい。

myogenin は自身の配列上流にも E-box 配列を持ち、MRF によって発現を調節される [54]。C2C12 では、30°C で MyoD が発現していたにも関わらず、myogenin の転写が抑制されていたことから、MRF と相互作用する E2A と Id の発現について検討した。MRF の正の制御因子である E2A の発現を RT-PCR で調べたところ、分化誘導前後を通して発現は低く、ほとんど変化しなかった。これは、筋芽細胞と筋管細胞で E2A の発現量は変化しないが、分化前の筋芽細胞ではタンパク質の分解速度とターンオーバーが速い [41] という先行研究の報告と一致する。すなわち、分化前は E2A が不安定であるために、MRF と相互作用しにくいと考えられる。本研究では、免疫組織染色により 30°C でも E2A が核に局在することを確認したことから、E2A の不在が myogenin 発現抑制の原因ではないと考えた。そこで、MRF の負の制御因子である Id の発現を調べたところ、30°C では Id3 の発現が分化誘導後も高く維持されていた。Id3 を過剰発現させると筋分化が抑制されることから [21]、30°C で myogenin の発現が抑制されたのは Id3 の高発現による可能性が示唆された。ただし、30°C で Id3 が実際に E2A と結合し、MyoD との二量体形成を阻害しているかどうかは共免疫沈降法などで今後確認する必要がある。一方で、通常温度で培養したヒラメ筋由来のマウス筋芽細胞株 Sol8 で Id3 を過剰発現させると、MyoD の発現は抑制されるが myogenin は発現するという報告がある [21]。また、Sol8 では Id2 の過剰発現で myogenin 発現が抑制される [20]。従って、Id1 や Id2 も 30°C における myogenin 発現抑制の原因候補から除外されるわけではなく、30°C におけるタンパク

質レベルでの発現や E2A との結合能を更に調べる必要がある。本研究では、少なくとも Id3 の転写段階における高発現が 30°Cでの筋分化抑制で見られる特徴の一つであり、IGF-I と VC によってその発現が低下することを示した。

IGF-I と VC は 30°Cにおける IGF-II の自己分泌も回復させた。IGF は正のフィードバックにより自身の発現を増加させることから [55]、IGF-II の自己分泌が、添加した IGF-I によって直接的に促進されたのか、myogenin の発現が増加した結果、その下流で起こった筋分化の一現象なのかを調べるために、IGF-II と myogenin のどちらが先に発現するかを調べた。その結果、myogenin の発現開始の方が IGF-II の発現より早かった。なお、通常培養温度においても myogenin 発現の方が IGF-II の発現よりも早いことが報告されている [56]。また、分化誘導後 2 日間以内の IGF-I 添加では 30°Cにおける myogenin 発現を促進させる効果はなかったことから、30°Cでの筋分化において IGF-I は単にトリガーとして働くのではなく、長期的な作用が必要であることが示唆された。

本研究において発現を調べたマイクロ RNA のうち、miR-1, -133a, -206 は MyoD や myogenin の結合サイトを上流に持ち、これらによって発現が調節されていると考えられることから [32]、30°Cで IGF-I と VC によって発現が活性化されたのは myogenin の発現が促進された結果である可能性が高い。一方、miR-181 は MyoD よりも上流で機能すると報告されているが [33]、30°Cでは MyoD が発現するにも関わらず、miR-181a の発現が低下していた。これは、miR-181 が MyoD の発現を調節する唯一の経路ではないためだと考えられる。ただし、miR-181a の発現が 30°Cで抑制されており、IGF-I と VC によって回復したことは、低温における筋分化抑制が MRF とその下流のシグナルだけではなく、それ以外の調節因子も関与した現象であることを示唆する。近年、トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor; TGF)- β によって発現が抑制され、筋分化に関与する miR-24 [57] のように、成長因子によって発現が調節されるマイクロ RNA も報告されている。従って、未だ報告はないものの、ここで調べたマイクロ RNA 以外にも IGF によって骨格筋組織での発現が変化するマイクロ RNA が存在する可能性は高いと考えられる。

マウスの単一筋線維培養では、37°Cでは IGF-I Tg マウスの筋衛星細胞は培養 2 日目に myogenin の発現が増加し、WT マウスよりも分化の進行が速かった。30°Cでは、培養 3 日目においても IGF-I Tg マウス、WT マウスともに myogenin はほとんど発現しておらず、マウス筋衛星

細胞でも C2C12 と同様に、30℃では 38℃と比較して筋分化が抑制されることが示された。しかし、4 日目には IGF-I Tg マウスだけでなく、WT マウスの筋衛星細胞も myogenin を発現していた。これは、DM で 10 日間培養しても全く myogenin を発現しなかった C2C12 (data not shown) とは大きく異なる結果である。WT マウスの筋衛星細胞が、IGF-I や VC を添加しなくても 30℃で myogenin を発現したのは、筋線維自身や筋線維に付着した筋線維芽細胞が、IGF や VC と類似の作用を持つ因子を分泌したためではないかと考えた。そこで、C2C12 を用いて、38℃で分化させた筋細胞の培養上清 (CM) に、低温でも myogenin 発現を促進する作用があることを確認した。すなわち、分化した筋細胞は、低温でも筋分化を促進する因子を分泌することが示された。この因子の実体は同定できていないが、筋細胞では分化に伴って IGF-II の自己分泌が増加することから [48]、その一つが IGF-II である可能性は高い。つまり生体内では、局所的に体温が低下しても筋細胞分化が阻害されないように、温度低下に対する耐性を高めるメカニズムが存在していると考えられる。

ただし CM で培養すると 30℃での myogenin 発現は促進したものの、次第に細胞密度が低下し、筋管細胞は形成されなかった。これは、CM に細胞の生存や増殖、融合に必要な充分量の栄養が含まれていなかったためである可能性が高い。あるいは、分化した筋細胞は TGF- β のように筋分化を抑制する因子も分泌している [58] ために、筋管形成まで至らなかった可能性もある。

本研究では、マウス筋芽細胞と同様にヒト骨格筋細胞も 30℃では myogenin 発現が抑制され、IGF-I と VC の添加により筋分化が回復することを認めた。ただし、本研究で用いた C2C12 と同じ分化条件では、ヒト骨格筋細胞の筋管形成は認められなかったため、初期の分化マーカーである myogenin の発現のみで評価した。このように、IGF-I や VC が骨格筋分化の低温耐性を高めることをヒト細胞でも示せたことは、医学応用の面からも重要である。ヒトの身体が低温にさらされる一例として「脳低温療法 (hypothermia)」が挙げられる。この治療方法は、頭部外傷や脳出血、脳虚血などによる急性の脳障害 [59] や突然の心停止 [60] を起こした場合に用いられ、患者の体温を水冷ブランケットなどにより 32-34℃に数日間低下させる [60]。急性の脳障害では、カテコールアミンやフリーラジカルの放出により進行的に脳組織が破壊されるため、体温を下げることで脳の代謝を抑制し、酸化ストレスを軽減することは有効である。脳低温療法では、組織障害の進行を遅らせて細胞死を抑制することで救命率や機能予後の向上が見込まれるが、一方で、低体温による

種々の弊害も起こり得る。例えば、不整脈や免疫機能の低下による肺炎の併発により、患者の生命が危険にさらされる場合もある。そこで、体温を低くして全体の代謝を抑制しながらも、標的組織の機能だけを正常に維持できるような補助薬剤の利用を提案したい。本研究において骨格筋分化の低温耐性を高めることが示された IGF-I や VC は、このような補助薬剤の有力な候補であると考えている。

第 2 章では、骨格筋細胞の分化におけるミトコンドリアの機能に特に注目して、低温が細胞に与える影響を更に検討していく。

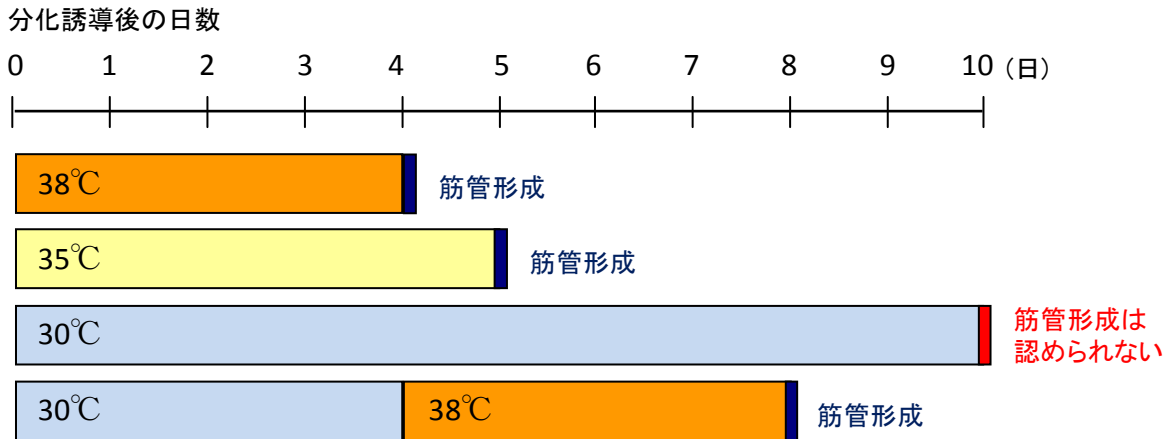


図3 30, 35, 38 °CにおけるC2C12の筋管形成

C2C12 を分化誘導後 30, 35, 38°Cで培養した. 38°Cでは4日目、35°Cでは1日遅れて5日目に筋管形成が認められたが、30°Cでは10日間培養しても筋管細胞は観察されなかった. ただし、30°Cで4日間培養した後に38°Cに戻すと、4日目に筋管形成が認められた.

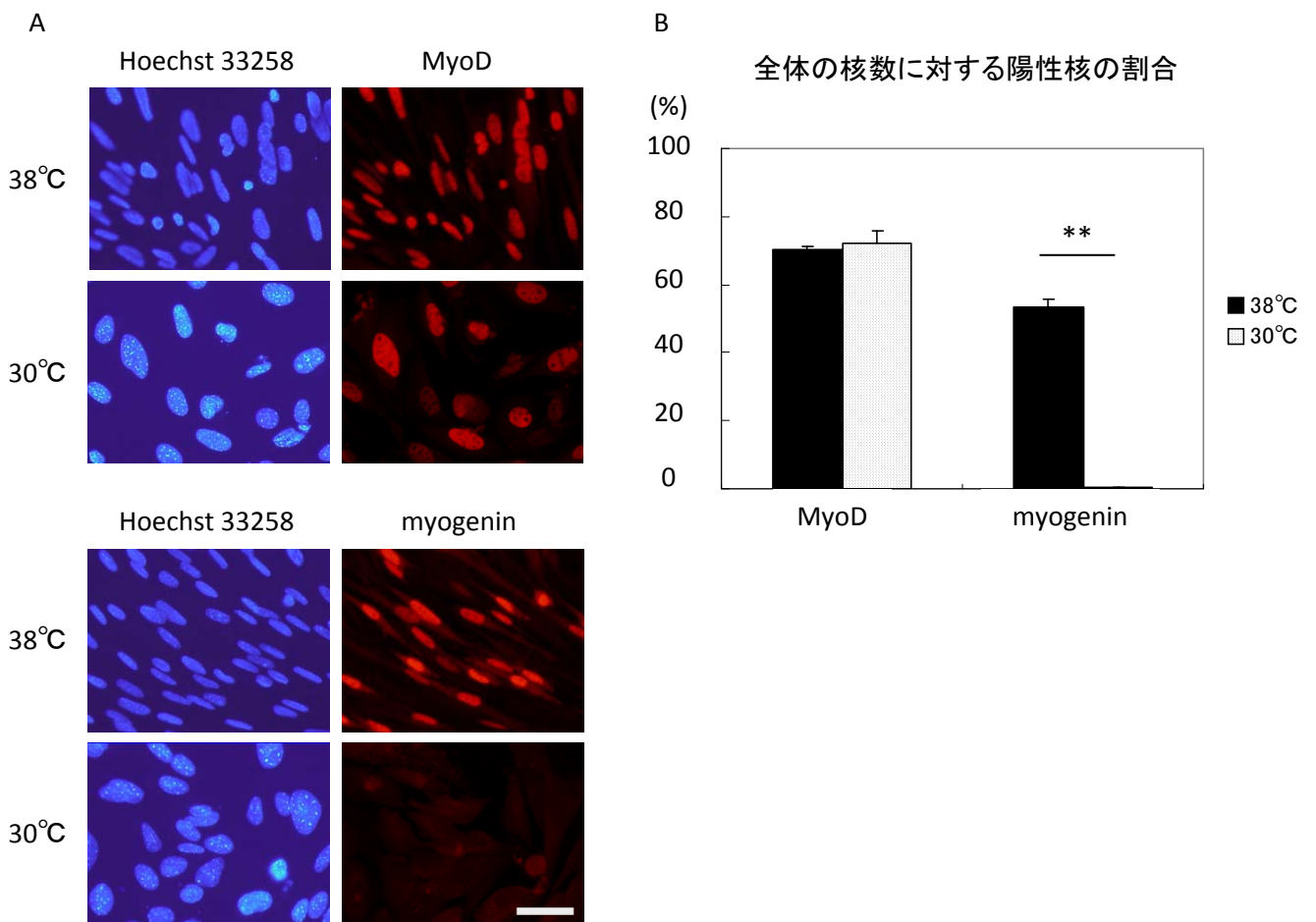


図4 38°Cと30°Cで4日間培養したC2C12のMyoDとmyogeninの発現

A: 免疫組織染色像, bar = 50 μm B: 陽性核の割合, **p<0.01

38°Cと30°CでMyoDの発現割合に差はなかったが、30°Cではmyogeninの発現が大幅に抑制された.

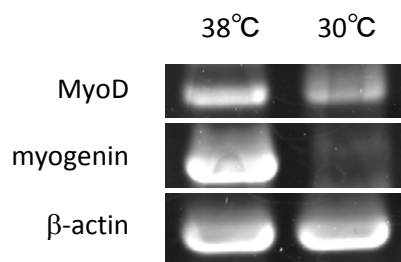


図5 MyoD と myogenin の RT-PCR

分化誘導後4日目のC2C12 を用いてRT-PCR を行なった. 30°Cでは、MyoD は発現していたが、myogeninの転写が抑制されていた.

表1. バンドの蛍光強度

	38°C	30°C
MyoD	0.48	0.37
myogenin	1.10	0.16

図5 の RT-PCR について β-actin で標準化した各バンドの蛍光強度を示す.

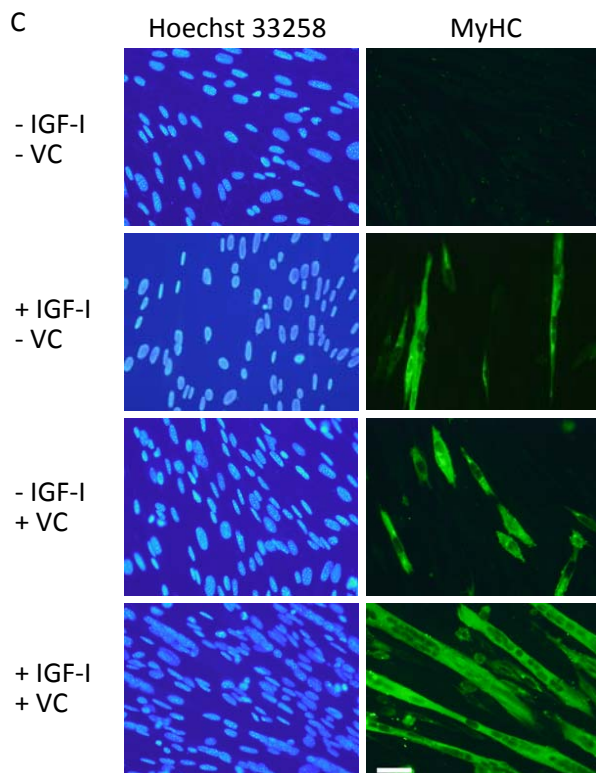
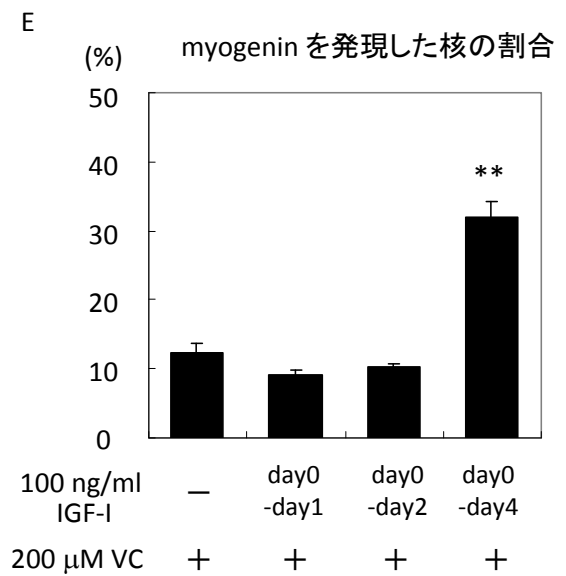
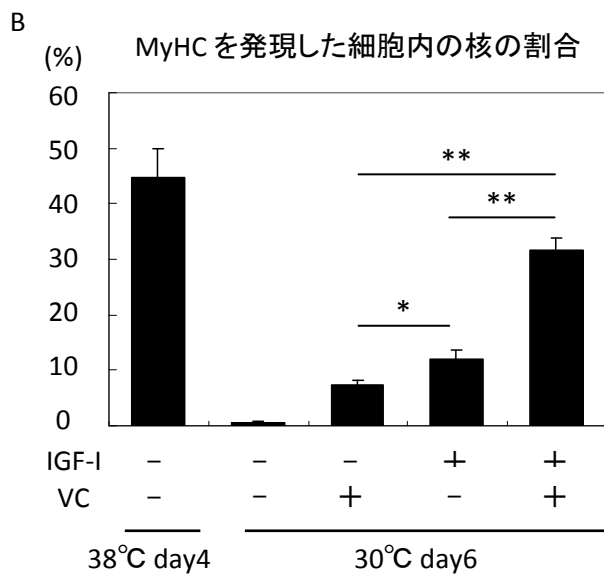
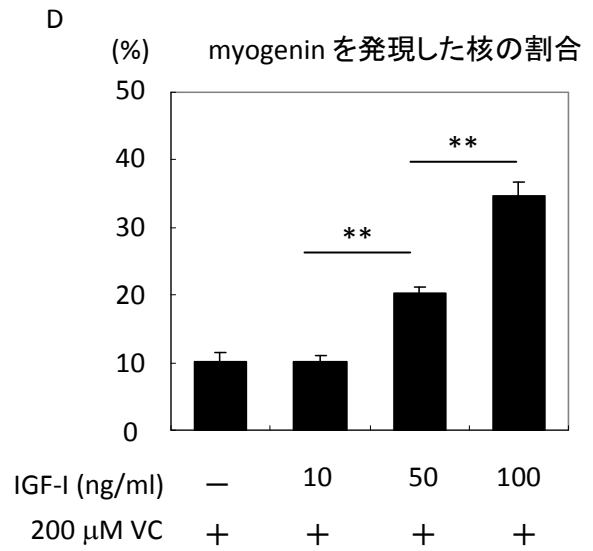
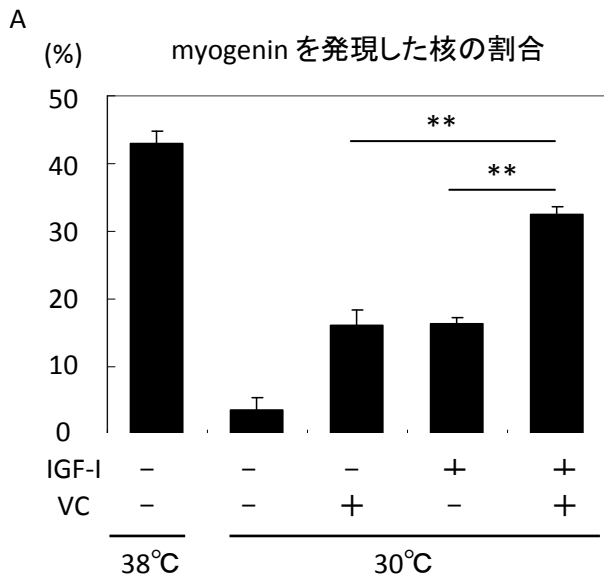


図6 30°CでのC2C12の分化に対するIGF-IとVCの効果

A: myogenin 発現の割合 B: MyHC 発現の割合

C: MyHC 免疫組織染色像, bar = 50 µm

D: IGF-I 濃度の検討 E: IGF-I 処理期間の検討

**p<0.01, *p<0.05

A, D, E は分化誘導後4日目, C は6日目

A-C は100 ng/ml IGF-I, 200 µM VC 添加

C-E は全て30°Cで培養

IGF-IとVCは30°Cにおけるmyogenin発現, MyHC発現, 筋管形成を促進した。IGF-IとVCは同時に添加した場合に効果が高く、多核の筋管細胞を形成した。IGF-Iは濃度依存的な効果を示し、長期的な添加が必要だった。

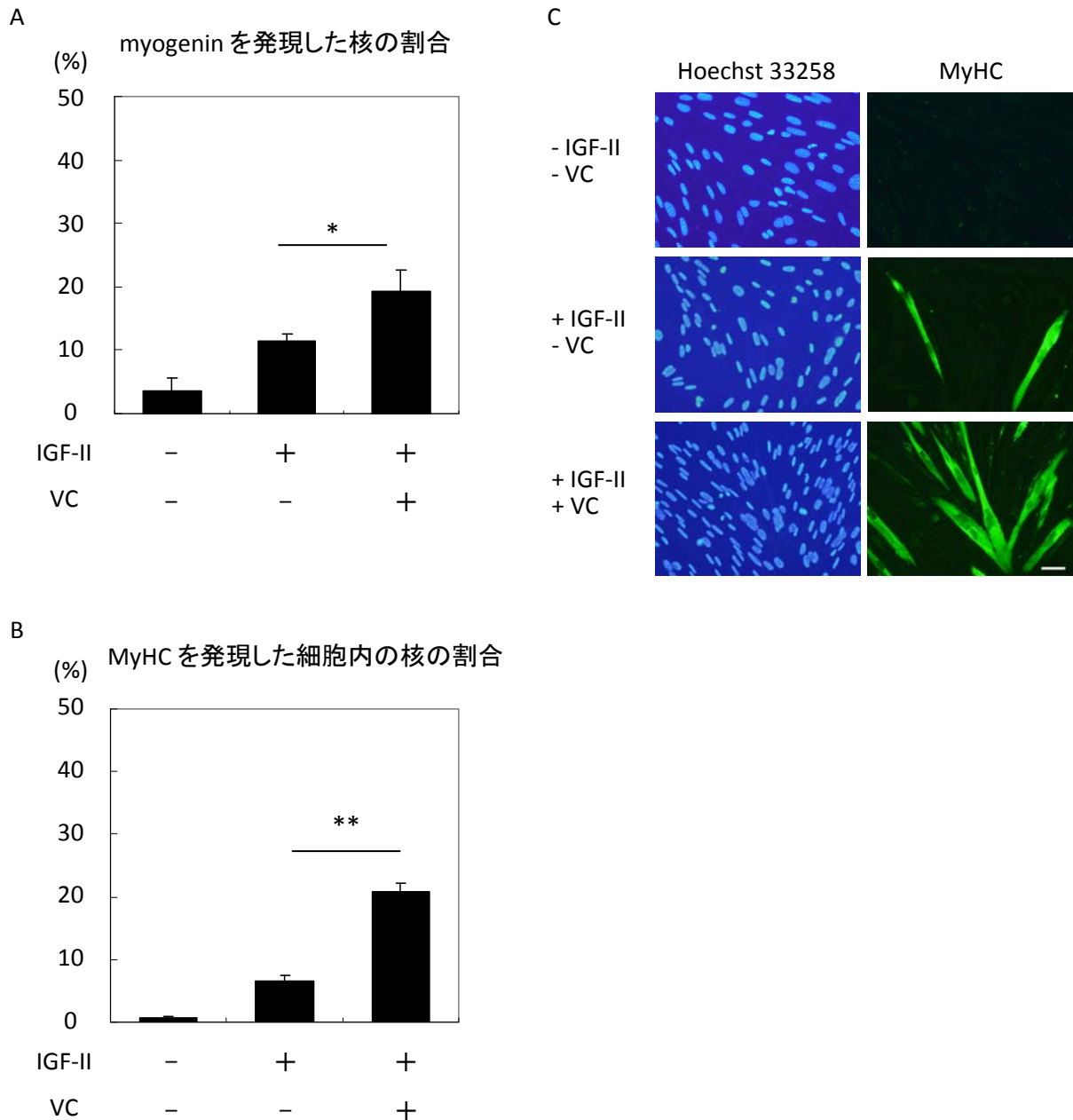


図7 30°CでのC2C12の分化に対するIGF-IIとVCの効果

A: myogenin 発現の割合 B: MyHC 発現の割合, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ C: MyHC 免疫組織染色像, bar = 50 μm
 Aは分化誘導後4日目, B, Cは6日目, 全て100 ng/ml IGF-II, 200 μM VCを添加して30°Cで培養

IGF-IIとVCは30°Cにおけるmyogenin発現, MyHC発現, 筋管形成を促進した. 多核の筋管細胞はIGF-IIとVCを同時に添加した場合にのみ観察された.

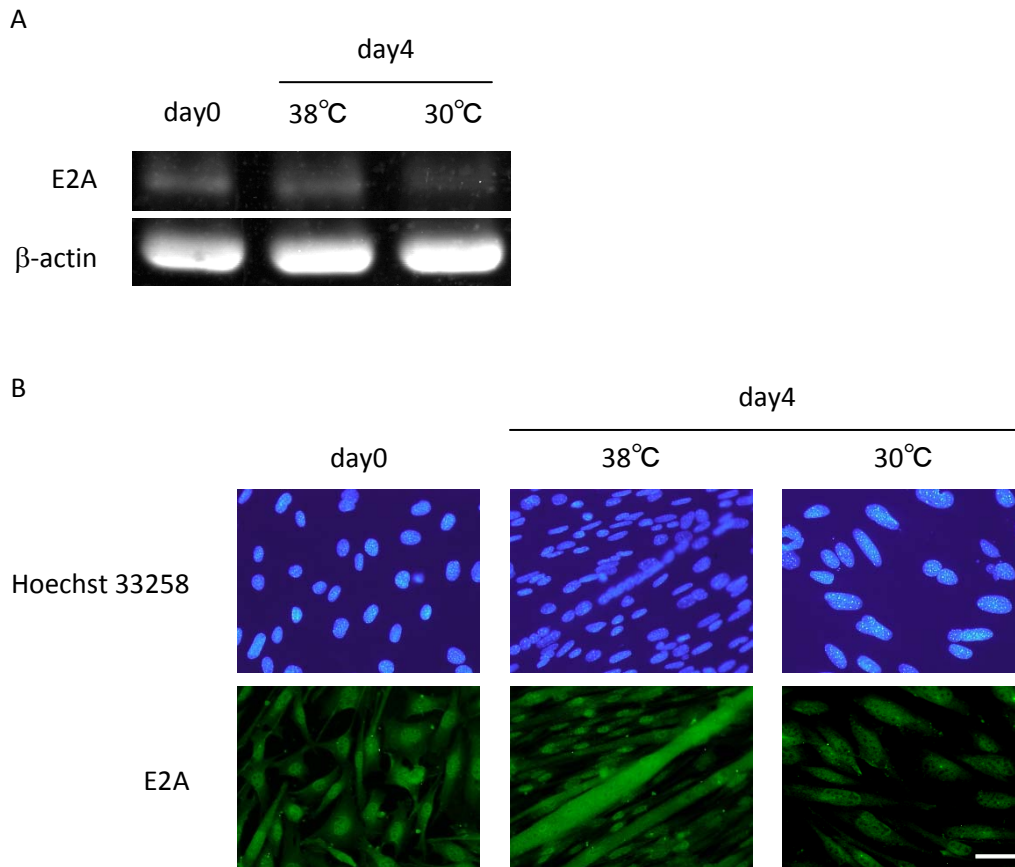


図8 E2A の発現

A: RT-PCR B: 免疫組織染色像, bar = 50 μm

分化誘導前 (day0) と分化誘導後38°C, 30°Cで4日間培養したC2C12における E2A の発現を比較した. 転写量は少なく、分化誘導前後で大きな差はなかった. 30°CでもE2A は発現し、核に局在していた.

表2. バンドの蛍光強度

	day0	day4	
		38°C	30°C
E2A	0.16	0.13	0.08

図8 A の RT-PCR について β-actin で標準化した各バンドの蛍光強度を示す.

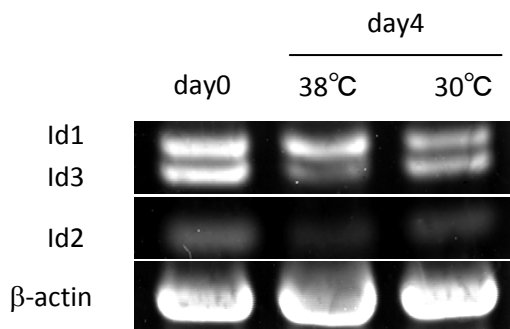


図9 Idの発現

分化誘導前 (day0) と分化誘導後38°C, 30°Cで4日間培養したC2C12における Id1, Id2, Id3 の発現を比較した. どの Id も day0 の発現が最も高く, 分化誘導後は発現が低下した. 38°Cと30°Cで比較すると, 30°Cでは Id3 の発現が高かった.

表3. バンドの蛍光強度

	day0	day4	
		38°C	30°C
Id1	0.43	0.31	0.20
Id2	0.12	0.04	0.06
Id3	0.36	0.16	0.22

図9の RT-PCR についてβ-actin で標準化した各バンドの蛍光強度を示す.

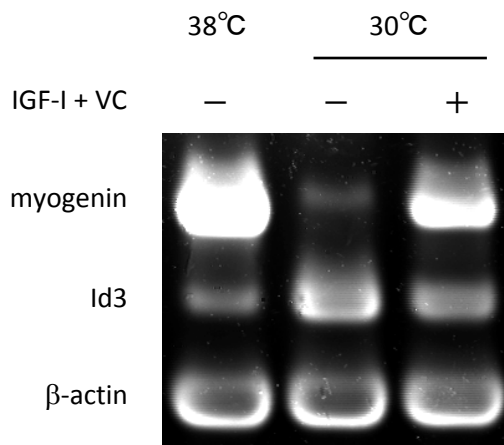


図10 Id3の発現に対するIGF-IとVCの効果

分化誘導後38°C, 30°Cで4日間培養したC2C12における Id3 の発現を比較した. 100 ng/ml IGF-I と 200 μM VC を添加して30°Cで培養すると, Id3 の発現が低下した.

表4. バンドの蛍光強度

	38°C		30°C	
	-	-	-	+
myogenin	3.13	0.21	1.43	
Id3	0.35	1.00	0.55	

図10の RT-PCR についてβ-actin で標準化した各バンドの蛍光強度を示す.

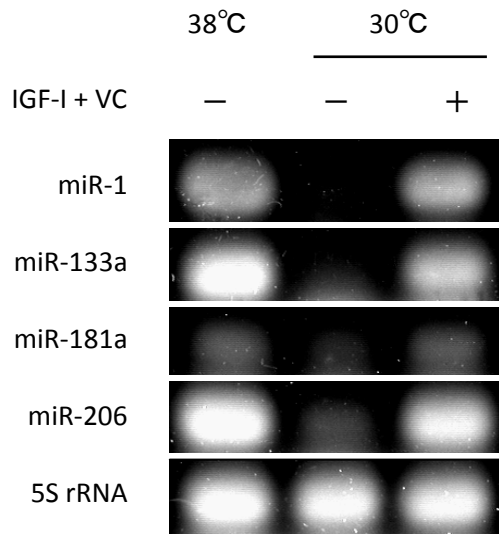


図11 筋分化制御に関与するマイクロRNAの発現に対するIGF-IとVCの効果

分化誘導後38°C、30°Cで4日間培養したC2C12におけるmiR-1、-133a、-181a、-206の発現を比較した。30°CではこれらのマイクロRNAはほとんど発現していなかったが、100 ng/ml IGF-Iと200 μM VCを添加すると発現が回復した。

表5. バンドの蛍光強度

	38°C	30°C	
IGF-I+VC	-	-	+
miR-1	0.87	0.17	0.83
miR-133a	1.11	0.21	0.80
miR-181a	0.36	0.16	0.36
miR-206	1.04	0.22	0.92

図11のRT-PCRについて5S rRNAで標準化した各バンドの蛍光強度を示す。

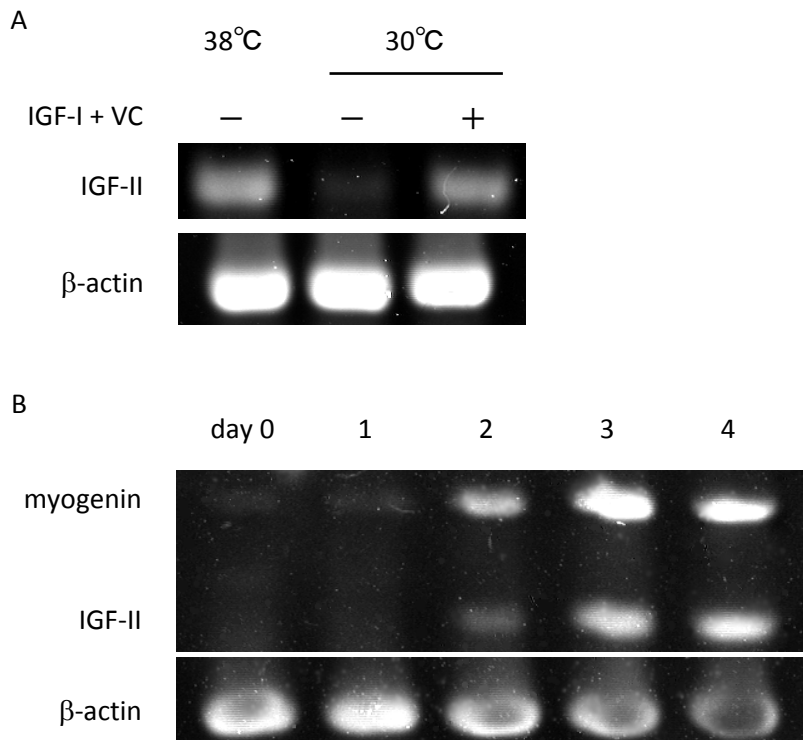


図12 C2C12 による IGF-II の発現

A: 38°C, 30°Cで分化誘導後4日目 B: 分化誘導前 (day0) と30°Cで分化誘導後1-4日目

38°Cで分化させたC2C12 はIGF-II を発現していた, 30°CではIGF-II の発現が抑制されたが、100 ng/ml IGF-I と200 μM VC を添加すると発現が回復した. 30°Cで分化を誘導すると、IGF-II の発現に先行して myogenin が発現した.

表6 バンドの蛍光強度

	38°C	30°C	
IGF-I+VC	-	-	+
IGF-II	0.23	0.05	0.19

図12A の RT-PCR について β-actin で標準化した各バンドの蛍光強度を示す.

表7 バンドの蛍光強度

	day 0	1	2	3	4
myogenin	0.01	0.02	0.43	1.08	1.69
IGF-II	0.00	0.01	0.13	0.56	1.12

図12B の RT-PCR について β-actin で標準化した各バンドの蛍光強度を示す.

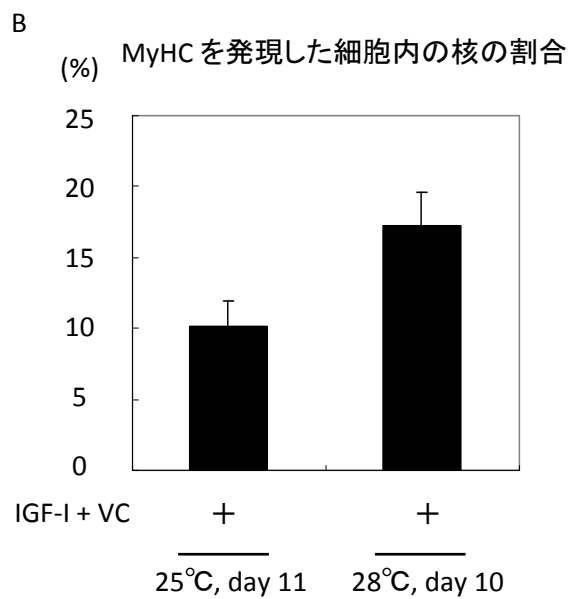
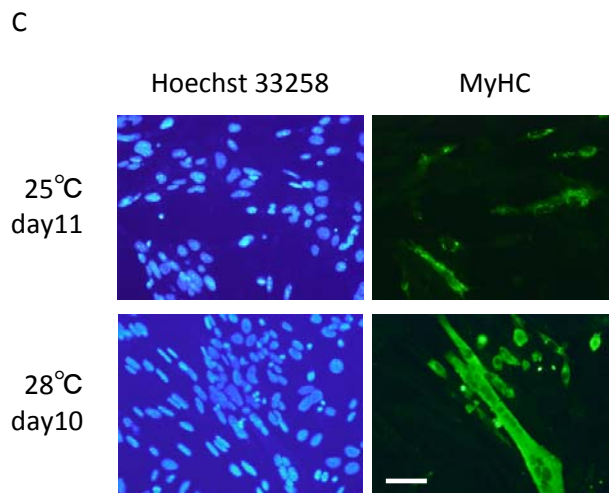
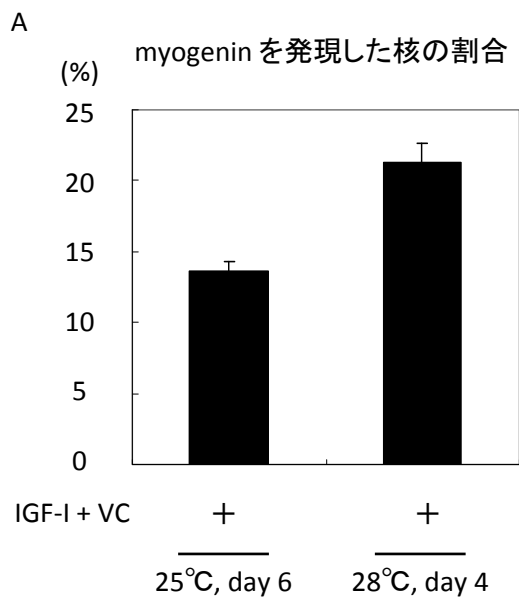


図13 25°C, 28°CでのC2C12の筋分化

A: myogenin 発現の割合 B: MyHC 発現の割合

C: IGF-I と VC を加えて 25°C と 28°C で培養した細胞の MyHC 免疫組織染色像, bar = 50 μm

IGF-I は100 ng/ml, VC は200 μM で添加した.

IGF-I と VC は30°C以下でも myogenin や MyHC の発現を促進した. 28°CではIGF-I と VC を添加して10日間培養すると、多核の筋管細胞が形成された.

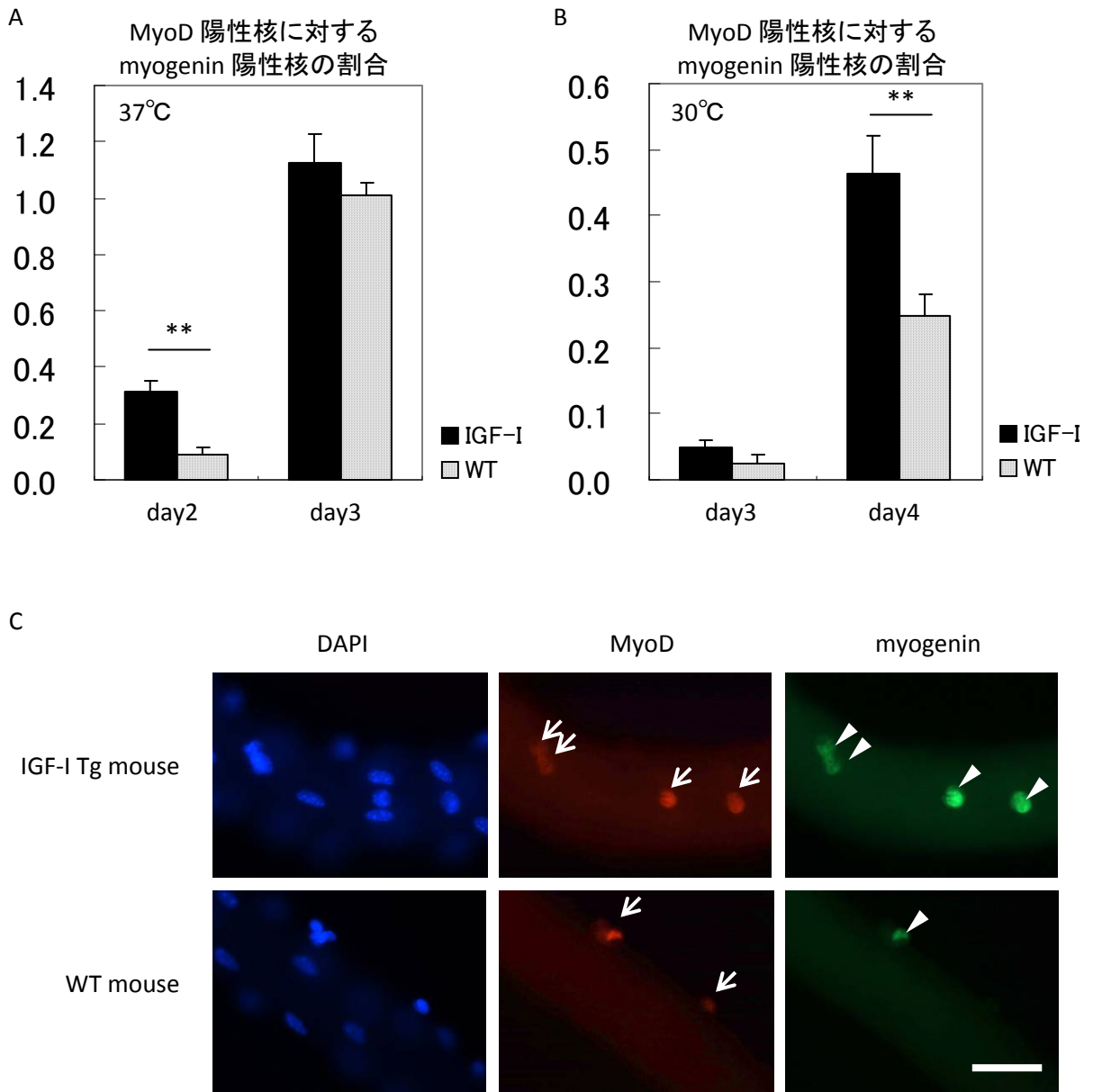


図14 IGF-I Tg マウス筋衛星細胞の分化

A: 37°Cで培養した場合のmyogenin 発現の割合 B: 30°Cで培養した場合のmyogenin 発現の割合, ** $p < 0.01$

C: 30°Cで培養4日目の MyoD (矢印), myogenin (矢頭) の免疫組織染色像, bar = 50 μm

37°Cでは培養2日目に, 30°Cでは培養4日目に IGF-I Tg マウスの筋衛星細胞はWT マウスよりも高い割合で myogenin を発現しており, 筋分化の進行が速かった. ただし, WT マウスの筋衛星細胞の一部は, 培養4日目に myogenin を発現していた.

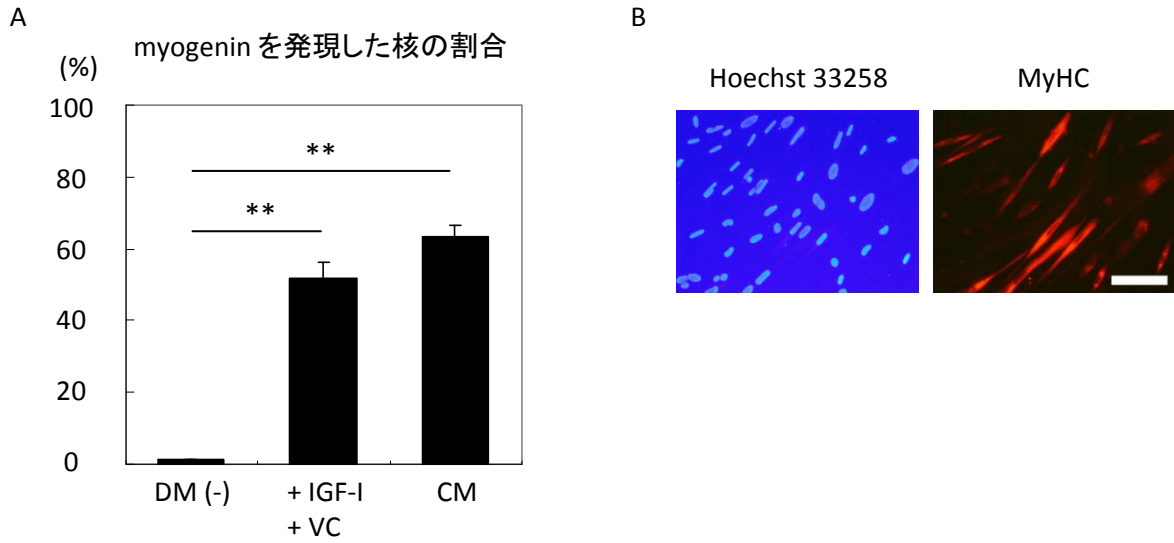


図15 30°CでのC2C12の分化に対する38°Cで分化させたC2C12の培養上清(CM)の効果

A: 培養6日目のmyogenin発現の割合, $**p < 0.01$ B: CMで培養10日目のMyHC免疫組織染色像, bar = 100 μm 全て30°Cで培養した. IGF-Iは100 ng/ml, VCは200 μM で添加した.

CMは30°CでmyogeninやMyHCの発現を促進したが、多核の筋管細胞は観察されなかった.

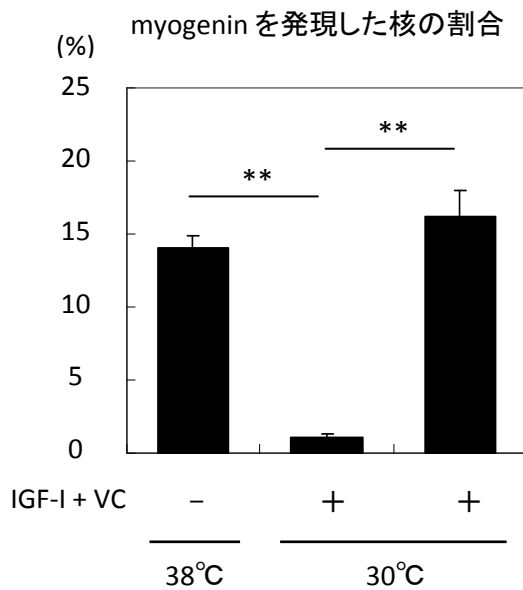


図16 30°Cでのヒト骨格筋細胞の分化に対するIGF-IとVCの効果

培養6日目におけるヒト骨格筋細胞のmyogenin発現は、30°Cでは大幅に抑制されていたが、100 ng/ml IGF-Iと200 μM VCの添加により回復した. $**p < 0.01$

第 2 章 低温における骨格筋分化とミトコンドリア機能

背景

ミトコンドリアは酸化的リン酸化による ATP 産生を行ない、細胞が種々の活動に必要とするエネルギーの大部分を供給している。細胞質に存在する解糖系においてグルコースの代謝により生じたピルビン酸や、脂肪酸は、ミトコンドリア・マトリクスにおいてアセチル CoA に変換される。アセチル CoA は TCA 回路 (クエン酸回路) で酸化され、生じた NADH や FADH₂ はミトコンドリア内膜に移行して、高エネルギー電子を電子伝達系に伝える。電子伝達系には複合体 I, II, III, IV が存在し、その分子実体はそれぞれ NADH 脱水素酵素複合体、コハク酸脱水素酵素複合体、シトクロム b-c₁ 複合体、シトクロム c 酸化酵素複合体である。高エネルギー電子が電子伝達系を移動することでこれらの複合体が駆動され、マトリクスから内膜の外へとプロトンをくみ出す。その結果、内膜を介して電気化学的プロトン勾配が形成され、そのエネルギーを利用して ATP 合成酵素により ATP が産生される。

電子伝達系の複合体 IV・シトクロム c 酸化酵素 (cytochrome c oxidase; COX) 複合体は二量体として機能するが、その単量体は、哺乳類では 13 種類のポリペプチド鎖と 2 種類のヘム (ヘム a, ヘム a₃)、2 種類の銅中心 (Cu_a, Cu_b) から構成される [61] (図 17)。ポリペプチド鎖のうちサブユニット I, II, III はミトコンドリアゲノムにコードされており、残りのサブユニット IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII は核ゲノムにコードされている [62]。これらのサブユニットが各々正常に発現して COX 複合体を形成することは、ミトコンドリアの機能を維持するうえで重要である。例えば、COX サブユニット I (以下 COX I と表記) 遺伝子に変異が起こると、ミトコンドリア筋症 (mitochondrial myopathy) や横紋筋融解症 (rhabdomyolysis) などを発症することが報告されている [63]。COX I 遺伝子にナンセンス変異を持つ患者の骨格筋では、COX I の発現だけでなく核にコードされた COX IV の発現も低下したことから、COX I は COX 複合体の形成に必須であることが示唆された [63]。また、COX II や COX III の変異が、脳筋症 (encephalomyopathy) の原因となることもある [64]。さらに、COX に銅中心を組み込んで安定化するのに必要な SCO2 のホモノックアウトマウスは胎生致死であり、SCO2 ホモノックインマウス、ヘテロノックイン/ノック

アウトマウスでは骨格筋組織における COX 活性と筋力の低下が認められた [65]。本研究では、13 種類のサブユニットのうち最も分子量が大きくてミトコンドリアで合成される COX I について、免疫組織染色で発現を調べた。

一方、筋分化に対してミトコンドリアが果たす役割は、単なるエネルギー供給に留まらないことが以下の研究によって示唆されている。まず、C2C12 を用いて、抗生物質であるテトラサイクリンでミトコンドリアのタンパク質合成を阻害すると、解糖系の亢進により ATP 産生量は減少しなかったにもかかわらず、筋管形成が抑制された [66]。このとき、ミトコンドリアの増殖や細胞の生存率には変化が見られなかった。また、ウズラ筋芽細胞株 QM7 を用いて、クロラムフェニコールでミトコンドリアのタンパク質合成を阻害した場合にも、解糖系の亢進により ATP が供給されるにも関わらず、筋分化が抑制されることが示された [9]。この研究では、甲状腺ホルモン受容体 (T3 受容体) p43 をミトコンドリアで過剰発現させてミトコンドリアを活性化することで、COX 活性の上昇や筋分化の促進を認めている。クロラムフェニコール処理や p43 の過剰発現により、それぞれ発現が変動するのは CMD1 (MyoD の鳥類ホモログ) や myf-5 ではなく myogenin だったこと、さらに、ミトコンドリアのタンパク質合成阻害以外に、脱共役剤 FCCP によるミトコンドリア膜電位の消失やオリゴマイシンによる ATP 合成酵素の阻害によっても myogenin の発現が低下したことから、ミトコンドリアの機能阻害は myogenin の発現に影響を与えることが示唆された [9]。

インスリンは、IGF-I と同様に PI3K シグナルを介して myogenin の発現を始めとする筋分化を促進するが、その作用は COX I と COX IV の発現上昇を介することが示されている [67]。また、IGF-I はラット心筋細胞においてミトコンドリア膜の脱分極を防ぎ、心筋細胞のアポトーシスを抑制した [68]。ラットの血中 IGF-I は加齢に伴って減少するが、IGF-I を投与した老齢ラットでは、肝臓ミトコンドリアにおいてフリーラジカルの産生やアポトーシスの減少、ATP 合成量の増加が認められた [69]。

以上の知見から、私は低温における骨格筋細胞の分化抑制と IGF-I と VC によるレスキューがミトコンドリアの機能変化を介した結果ではないかと仮説を立てた。そこで第 2 章では、30°C で筋分化が抑制された場合と IGF-I と VC によりレスキューされた場合の COX I 発現とミトコンドリア膜電位の変化について、マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて比較を行なった。

方 法

細胞培養

C2C12 (ATCC) を、1% ゼラチン (ウシ皮膚由来 ; Sigma-Aldrich) を塗布した培養皿 (AGC テクノグラス) 、後から取り出すためにゼラチンを塗布したカバーグラスを底に置いた培養皿、または Lab-Tek チャンバースライド (Thermo Fisher Scientific) に播種し、20%FBS (SAFC Biosciences) を含む high-glucose DMEM (ナカライテスク) を用いて 38°C, 5% 二酸化炭素で増殖させた。細胞密度がサブコンフルエントに達した段階で、筋分化を誘導するために 10% HS (Invitrogen) を含む MEM (Invitrogen) に交換し、30°Cまたは 38°Cで培養した。IGF-I (R&D Systems) は最終濃度 100 ng/ml、L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (和光純薬) (以下 VC と表記) は 200 μ M で分化培地 (DM) に加えた。DM は 1 日おきに交換した。

免疫組織染色

培養細胞は、10% ホルマリン/PBS で固定後 100% メタノールで処理した。ブロッッキングには 10% HS, 3% BSA/PBS を用いた。1 次抗体は、マウス抗 COX1 抗体 (1D6, 1:50, Sanra Cruz Biotechnology), ウサギ抗 MyoD 抗体 (C-20, 1:50, Sanra Cruz Biotechnology), ウサギ抗 myogenin 抗体 (M-225, 1:50, Sanra Cruz Biotechnology), マウス抗 myogenin 抗体 F5D (1:1, Developmental Studies Hybridoma Bank) を、2 次抗体は Alexa Fluor 標識抗体 (1:400, Invitrogen) を用いた。抗体は 3% BSA/PBS に希釈し、室温で 1 または 2 (抗 COX1 抗体のみ) 時間反応させた。細胞核はヘキスト 33258 (Sigma-Aldrich) で標識した。試料は蛍光顕微鏡 Axioplan (Carl Zeiss) で観察し、画像はデジタルカメラ VB-7000 (キーエンス) で撮影した。

ミトコンドリア膜電位の評価

ゼラチンを塗布したカバーグラスを底に置いた培養皿または Lab-Tek チャンバースライドで培養した細胞に、DMSO で希釈した JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide) (Invitrogen) を最終濃度 10 μ g/ml で加えて、それまでの培養条件通り 38°C または 30°C で 10 分間反応させた。あらかじめ温めておいた DM で一度洗った後、細胞を培養した

カバーガラスは裏返してスライドグラスに乗せ、チャンバースライドはカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡 Axioplan (Carl Zeiss) で観察した。画像はデジタルカメラ VB-7000 (キーエンス) で撮影した。その後、チャンバースライドで培養した細胞は固定して、上記の方法で **myogenin** に対する免疫組織染色を行なった。

統計解析

JC-1 で赤色蛍光を示した細胞内の核と **myogenin** 発現核については、異なる 3 視野以上で計数し、全体の細胞核数 (計 1000 核以上) に対する割合を求めた。得られた割合は平均値±標準誤差で示す。

結果

38°Cで培養した C2C12 において、COX1 は分化に伴って発現する

マウス筋芽細胞株 C2C12 を 38°Cで培養し、培養液中の血清濃度低下により分化を誘導した。免疫組織染色を行ない、分化誘導前 (day0) と分化誘導後 2, 4 日目の筋分化制御因子 (MRF)、MyoD と **myogenin**、および、ミトコンドリアゲノムにコードされている電子伝達系内の複合体の一つ、シトクロム c 酸化酵素サブユニット I (COX I) の発現を調べた。MyoD は分化誘導前から発現していたが (図 18A)、**myogenin** と COX I は分化誘導後 2 日目以降に発現していた (図 18B)。分化誘導後 2 日目では、MyoD や **myogenin** を発現した細胞のうちの一部が COX I を発現しており、COX I のみを発現した細胞は観察されなかった。また、分化誘導後 4 日目では、多核の筋管細胞で COX I が強く発現していた。

IGF-I と VC は 30°Cにおける C2C12 の COX1 発現を促進する

38°Cで MyoD や **myogenin** の発現と並行して COX I が発現したことから、COX I 発現は筋分化の進行を反映していると考えた。そこで、30°Cで培養した C2C12 について、分化誘導後 4 日目に免疫組織染色を行なって COX I の発現を調べた。IGF や VC を添加しない培養液 (DM(-)) で培養した場合と 100 ng/ml IGF-I と 200 μ M VC を添加した場合について比較したところ、DM(-)

で培養した場合は単核細胞の一部で弱い発現が認められたのみだったが、IGF-I と VC を添加すると単核細胞や融合した細胞などより多くの細胞で強い発現が観察された (図 19)。

IGF-I と VC は 30°Cにおける C2C12 のミトコンドリア膜電位を上昇させる

次に、ミトコンドリア機能の指標の一つとして、ミトコンドリア膜電位について評価した。カチオン性カルボシアニン色素 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide) は、単量体では緑色蛍光を発するが、凝集体を形成すると赤色蛍光を発する。JC-1 は生細胞に取り込まれると電位依存的にミトコンドリアに移動して蓄積されるため、膜電位の高いミトコンドリアでは赤色蛍光を呈する。一方、細胞質では低濃度のため、緑色蛍光を呈する。このようにミトコンドリア膜電位を可視化できる性質から、JC-1 はミトコンドリア活性や細胞のアポトーシスを評価する目的でよく用いられる。

ミトコンドリア膜電位を反映した JC-1 の赤色蛍光像は細胞を固定すると失われる。そこで、ゼラチンを塗布したカバーガラスを培養皿の底に置き、その上で C2C12 を培養して、生細胞をカバーガラスごと取り出して観察できるように工夫した。JC-1 を処理して観察すると、38°Cで分化させた場合は、全ての細胞ではないものの多核の筋管細胞や単核細胞の多くで、赤色蛍光を呈する顆粒状の像が観察された。これは、膜電位の高いミトコンドリアであると推定される。なお、細胞の存在は緑色蛍光で確認することができ、図ではこれら二色の蛍光像を重ねて表示している。一方、DM(-) を用いて 30°Cで培養した場合は、一部の細胞で点状に赤色蛍光像が観察されたが、その数は少なかった。また 100 ng/ml IGF-I と 200 μ M VC を添加した場合と比較すると、赤色蛍光を呈する顆粒は細胞全体に低密度で拡散していた。IGF-I と VC を添加した場合には、多くの細胞で強い赤色蛍光を呈する顆粒が観察された。顆粒の密度は高く、赤色蛍光のみでも細胞質の形状が明瞭に確認できた (図 20)。

IGF-I と VC により 30°Cで myogenin を発現した細胞はミトコンドリア膜電位が高い

JC-1 を用いることで、IGF-I と VC を添加して 30°Cで培養すると一部の細胞でミトコンドリア膜電位が高くなっていることが確認された。これらの細胞が、myogenin を発現して分化が進行

している細胞と一致するのかどうかを Lab-Tek チャンバースライドを用いて確認した。Lab-Tek チャンバースライドは、スライドガラス上に細胞培養用のウェルがあり、培養中から固定後まで特定の細胞を追跡すること可能である。私は、JC-1 を処理した生細胞を観察後、固定して myogenin に対する免疫組織染色を行ない、両者の像を比較した。

まず、DM(-) を用いて 30°C で培養した場合は、低密度に赤色蛍光を呈する顆粒を含んだ細胞は観察されたが、それらの細胞では全く myogenin を発現していなかった (図 21A)。一方、100 ng/ml IGF-I と 200 μ M VC を添加した場合には myogenin の発現が促進されており、myogenin を発現する細胞と JC-1 で強い赤色蛍光が観察される細胞の一部は一致していた (図 21B)。そこで、myogenin を発現した細胞と JC-1 で赤色蛍光を呈する細胞 (以下 JC-1+ と表記) の割合を求めた。なお、ここでは細胞質の形状が明確に観察できる程度に赤色蛍光を呈する細胞を JC-1+ とし、DM(-) を用いて 30°C で培養した場合に観察されるような低密度の赤色蛍光は除外した。myogenin を発現し、かつ JC-1+ の細胞は全体の 9.5 ± 0.8 % であり、myogenin の発現のみの細胞は 9.9 ± 1.1 % だった。一方、myogenin を発現せずに JC-1+ だった細胞は 0.6 ± 0.1 % と非常に少数だった。myogenin を発現した細胞のうち、JC-1+ だった細胞は 49.7 ± 3.2 % だった (図 21C)。

考 察

マウス筋芽細胞株 C2C12 を通常培養温度 (38°C) で分化させると、分化に伴ってシトクロム c 酸化酵素サブユニット I (COX I) の発現が増加した。とくに、分化誘導後 4 日目の多核の筋管細胞では COX I の発現が高かった。COX は電子伝達系複合体 IV に含まれることから、この結果は C2C12 が分化に伴って酸化的リン酸化依存的なエネルギー産生に移行するという先行研究 [8] と一致する。また、MRF の発現と比較すると、COX I は MyoD より発現開始が遅く、分化誘導後 2 日目においても myogenin より発現した細胞が少なかったことから、筋分化の中期以降に発現が増加すると考えられる。これまでのところ、筋分化に伴うミトコンドリアの種々の変化 [7, 8] を MRF が直接的に制御するという報告はないが、MRF の下流に、ミトコンドリアにコードされた COX I の発現調節機構が存在する可能性はある。あるいは、COX I の発現を含むミトコンドリアの活性化は MRF とは独立に制御されており、それぞれの条件が整って初めて筋分化が正常に進行するという可能性

も考えられる。なお、COX のサブユニットのなかには組織特異的に異なるアイソフォームを持つものがある。骨格筋や心筋特異的に発現する COX VIa-H や COX VIII-H はプロモータ領域に E-box 配列を含んでおり、MRF によって発現が調節されることが示唆されている [70, 71]。

DM(-) を用いて 30°C で C2C12 を培養したところ、38°C と比較して COX I の発現が減少した。COX I はミトコンドリアゲノムにコードされているため、この結果は、30°C ではミトコンドリアのタンパク合成が抑制されることを示唆する。COX の中で最も分子量が大きく、複合体の形成に必須 [63] なサブユニット I の発現減少は COX の形成や活性にも大きな影響を与えることが予想される。すなわち、30°C ではミトコンドリアが正常に機能していない可能性が高い。ただし、COX 活性や ATP 産生量については、実際に測定して検証する必要がある。IGF-I と VC の添加が COX I の発現を回復させたことは、筋分化に対するレスキュー効果と一致した。

ミトコンドリア膜電位についても、蛍光色素 JC-1 を用いて評価した。38°C で分化を誘導すると多くの細胞で赤色蛍光を呈する顆粒、すなわち膜電位の高いミトコンドリアが観察された。ただし、38°C でも一部の細胞では緑色蛍光しか観察されなかった。これは、JC-1 が生細胞の状況を反映するため、観察中に膜電位が下がってしまった可能性が考えられる。観察中はウォームプレートやカバーグラスを用いるなどして、細胞の温度低下や酸素との接触には充分留意したが、培養中の細胞状態とは異なる可能性は否定できない。ただし、38°C と 30°C の差は確認できたこと、および、ミトコンドリア膜電位の高い細胞と myogenin を発現する細胞との関係を明らかにすることが目的の一つだったことから、この方法を用いた。

DM(-) を用いて 30°C で培養した場合でも、赤色蛍光を呈する顆粒を低密度に含んだ細胞は観察されたが、IGF-I と VC を添加した場合の濃い赤色蛍光像とは明らかに異なっていた。このことから、DM(-) で培養した場合、30°C ではミトコンドリアの膜電位が低下することが示唆された。これは COX I 発現の傾向とも一致し、30°C ではミトコンドリアの機能が低下すること、さらに IGF-I と VC がこれを回復させることを示唆している。ミトコンドリアの機能低下が筋分化を抑制することは多くの先行研究 [9, 66] が示しており、30°C における筋分化抑制の原因の一つがミトコンドリアにある可能性は高い。

IGF-I と VC を加えて 30°C で培養した細胞でミトコンドリア膜電位の高い細胞と myogenin を

発現した細胞を比較すると、**myogenin** を発現した細胞の約半数 (49.7 ± 3.2 %) でミトコンドリア膜電位が高いという結果を得た。**myogenin** を発現せずにミトコンドリア膜電位が高いという細胞はほとんど存在しなかった (0.6 ± 0.1 %) ことから、ミトコンドリアの膜電位上昇は **myogenin** の発現以後に起こることが示唆された。わずかに存在した **myogenin** を発現せず **JC-1+** だった細胞についても、固定する以前に **myogenin** を発現した経験を持つ可能性は否定できない。この結果は、**COX I** の発現が **myogenin** の発現よりも遅いという結果とも一致し、筋分化の開始にはミトコンドリアの活性化よりも **MRF** の寄与が大きいと考えられる。ただし、**JC-1** によってミトコンドリア膜電位を評価した本実験の系では、上述のように **JC-1+** を過小評価している可能性は残る。なお、第 1 章で示した **IGF-I** と **VC** を加えて 30°C で培養した場合の **myogenin** の発現割合 (33 ± 1.1 %) よりも、**JC-1** の観察後に免疫組織染色を行なって求めた **myogenin** の発現割合 (19 ± 1.4 %) が低いのは、培養皿とチャンバースライドの差によるものと考えている。

筋分化においてミトコンドリアが重要な機能を果たしていることは間違いないが、その制御機構や **MRF** との関連については、通常培養条件においても未だ明らかになっていない部分が多い。本研究は、低温における筋分化抑制にミトコンドリアの機能低下が関連していることを示唆したのみではなく、低温での培養系を用いて **COX I** の発現やミトコンドリア膜電位の上昇が **myogenin** の発現と連動した現象であることを示した点に意義があると考えられる。

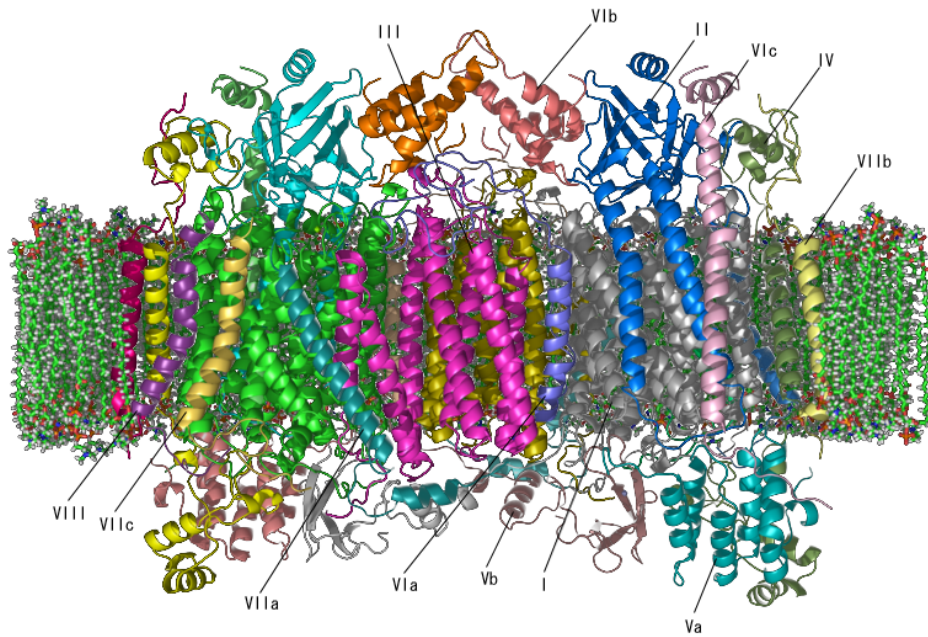


図17 シトクロム c 酸化酵素の構造 (PDB1OCC より改変)

図は二量体. 単量体は13種類のポリペプチド鎖から成る. 各サブユニットはローマ数字で示す.

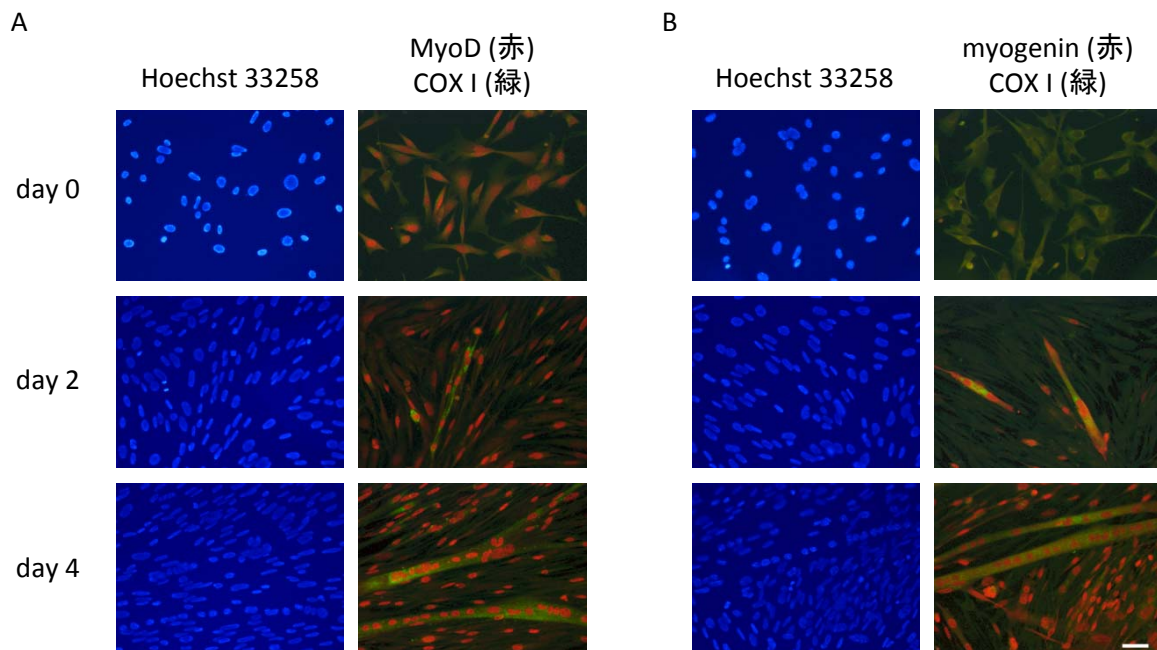


図18 38°Cで培養したC2C12におけるシトクロム c 酸化酵素 サブユニットI (COX I) の発現

A: MyoD と COX I の発現 B: myogenin と COX I の発現, bar = 50 μm

分化誘導前 (day 0) と分化誘導後2, 4日目について免疫組織染色を行なった. MyoD は分化誘導前から、myogenin と COX I は分化誘導後2日目から発現していた. COX I は2日目ではMyoD や myogenin を発現した細胞で、4日目では多核の筋管細胞で強く発現していた.

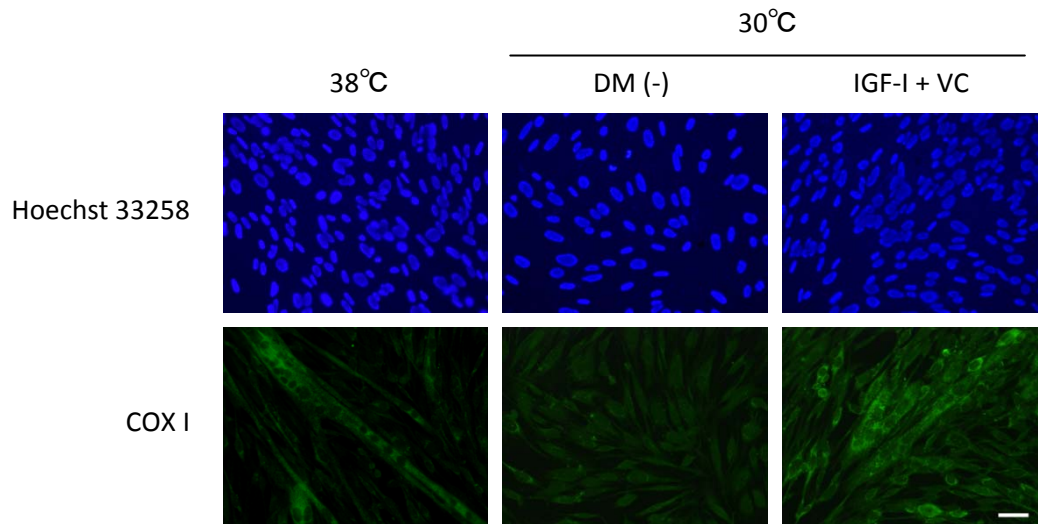


図19 分化誘導後4日目のC2C12におけるCOX Iの発現

IGF-I は100 ng/ml, VC は200 μ M で添加した. bar = 50 μ m

30°Cで培養すると、何も添加しない場合 (DM(-)) はCOX I の発現が弱かったが、IGF-I と VC を添加すると多くの細胞で強いCOX I 発現が認められた。

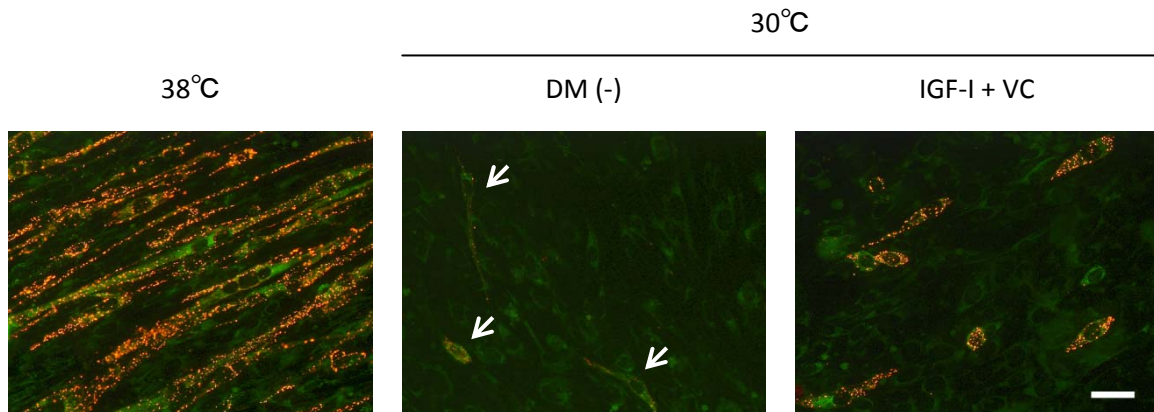


図20 JC-1 によるミトコンドリア膜電位の可視化

C2C12 を38°Cまたは30°Cで4日間培養した. IGF-I は100 ng/ml, VC は200 μ M で添加した.

細胞の存在を示す緑色蛍光画像と膜電位の高いミトコンドリアを示す赤色蛍光画像を重ねて示す.

bar = 50 μ m

38°Cでは多核の筋管細胞や単核細胞の多くで赤色蛍光を示す膜電位の高いミトコンドリアが観察された. 30°Cで培養すると、何も添加しない場合 (DM(-)) は一部の細胞 (矢印で示す) でわずかに赤色蛍光を示す 顆粒が認められたのみだったが、IGF-I と VC を添加すると膜電位の高いミトコンドリアを含む細胞が増加した。

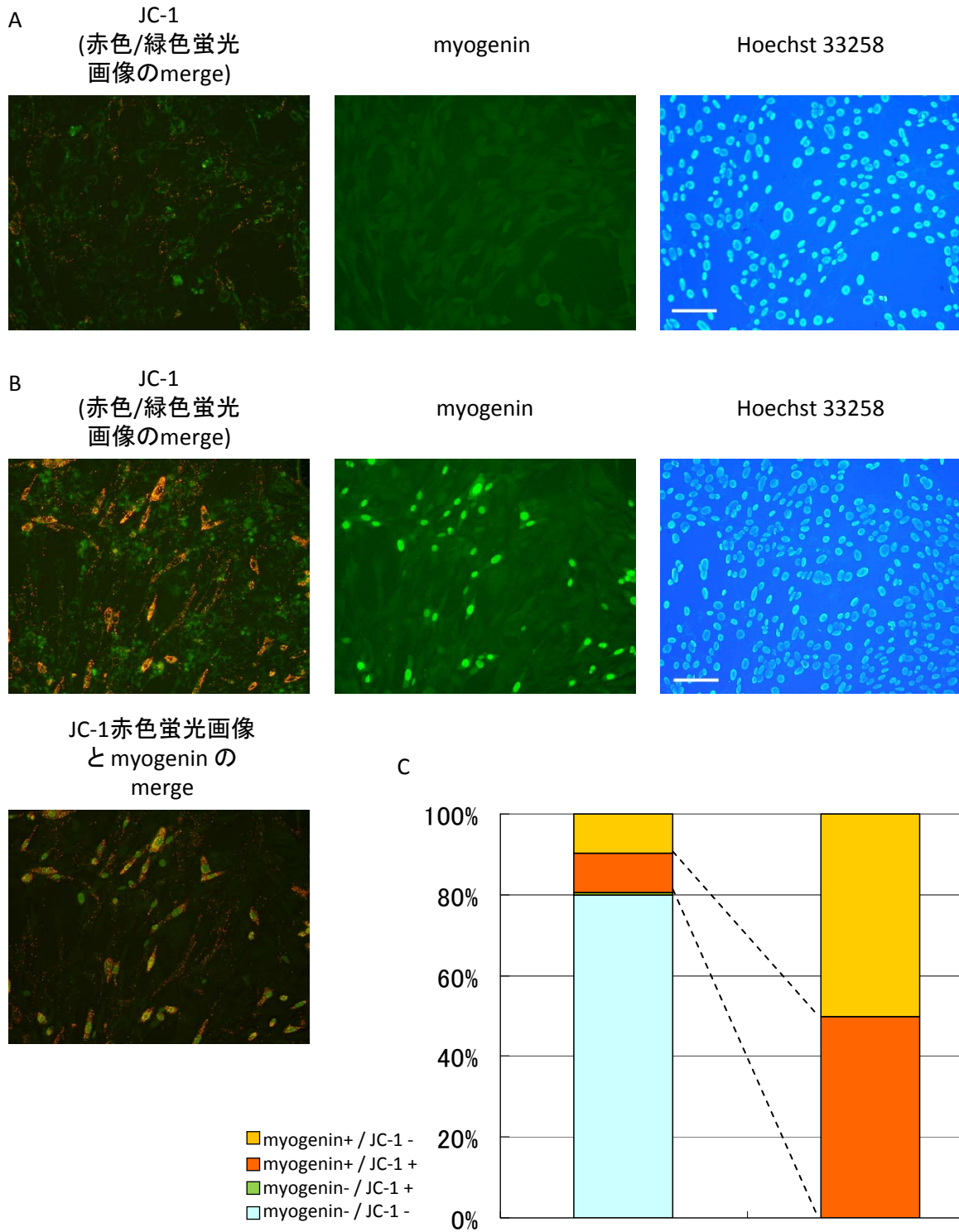


図21 myogenin 発現とミトコンドリア膜電位の関係

30°Cで4日間培養したC2C12 について、JC-1 でミトコンドリア膜電位を観察後、myogenin に対する免疫組織染色を行なった。A: DM(-) で培養した場合 B: 100 ng/ml IGF-I と 200 μM VC を添加した場合, bar = 100 μm
C: IGF-I と VC を添加した場合の JC-1 で赤色蛍光を示した細胞 (JC-1+ と表記) と myogenin 発現細胞の割合

DM(-) で培養すると、JC-1 でわずかに赤色蛍光を示す細胞は認められたが、myogenin は全く発現していなかった。IGF-I と VC を添加すると、全体の約20%の細胞が myogenin を発現し、myogenin 発現細胞の約50%でミトコンドリア膜電位が高かった。

総合考察

本研究は骨格筋細胞の分化に温度が大きな影響を与えることを示した。特に温度依存的に制御されているのは筋分制御因子 **myogenin** の発現であり、IGF や VC によるレスキュー効果も **myogenin** の発現促進を介した結果であると予想された。一方で、ミトコンドリアが正常に機能することも筋分化の進行には必須であり、これが **myogenin** の制御によるものかどうかはさらなる研究を要する。本研究が示した低温における培養方法は、今後これらの研究を推進するツールとしても有効であると考えている。

筋細胞がどのように外界の温度を感知し、細胞内に情報を伝えるのかは未だ不明である。現在研究が進んでいる、温度依存的に活性化する分子実体としては、温度感受性 TRP チャネルがある [72]。これは、特定の温度によって活性化される非選択的陽イオンチャネルであり、40°C以上で活性化される熱刺激感受性チャネル、37°C前後で活性化される温刺激感受性チャネル、20°C前後で活性化される冷刺激感受性チャネルに分けられる [72]。TRP チャネルは感覚神経だけではなく様々な組織で発現しており、膵臓β細胞におけるインスリン分泌 [73] など、種々の生理機能の調節にも関与することが示されている。骨格筋細胞においても発現が認められており [74]、これを阻害した場合に、低温における筋分化の進行やミトコンドリア活性はどのように変化するのか、あるいは IGF-I や VC がどのように機能するのかを検証することは興味深い。また、TRP チャネルの下流の分子機構を追跡することで、温度という物理的シグナルがいかにして化学的シグナルに変換されるのか、その情報伝達経路の手掛かりが得られるのではないかと考えている。

ヒトを含む多くの哺乳類が高いエネルギーコストを代償にして体温を 37°C前後に維持していることには、大きな意味があるはずである。高い体温は代謝や活動量を増加させただけでなく、進化の過程において恒温動物の細胞や組織レベルでの様々な生命活動にも影響を与えてきたであろうことは想像に難くない。本研究で示した骨格筋細胞の分化やミトコンドリアの活性化はその一例と言える。我々は、恒温動物の誕生や、一部の哺乳類に認められる冬眠現象 [75] について、その理由や意義を未だ十分に解明できていない。本研究が、これから発展するであろう「温度生物学」の端緒となることを期待したい。

参考文献

1. Morrison, P.R., Ryser, F.A. Weight and Body Temperature in Mammals. *Science* 116, 231-232 (1952)
2. Clarke, A., Pörtner, H.O. Temperature, metabolic power and the evolution of endothermy. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 85, 703-727 (2010)
3. Aschoff, J., Wever, R. Kern und Schale im Wärmehaushalt des Menschen. *Naturwissenschaften* 45, 477-485 (1958)
4. Al-Fageeh, M.B., Smales, C.M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.* 397, 247-259 (2006)
5. Berkes, C.A., Tapscott, S.J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 585-595 (2005)
6. Vertel, B.M., Fischman, D.A. Mitochondrial development during myogenesis. *Dev. Biol.* 58, 356-371 (1977)
7. Brunk, C.F. Mitochondrial proliferation during myogenesis. *Exp. Cell Res.* 136, 305-309 (1981)
8. Leary, S.C., Battersby, B.J., Hansford, R.G., Moyes, C.D. Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1365, 522-530 (1998)
9. Rochard, P., Rodier, A., Casas, F., Cassar-Malek, I., Marchal-Victorion, S., Daury, L., Wrutniak, C., Cabello, G. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *J. Biol. Chem.* 275, 2733-2744 (2000)
10. Braun, T., Arnold, H.H. ES-cells carrying two inactivated myf-5 alleles form skeletal muscle cells: activation of an alternative myf-5-independent differentiation pathway. *Dev. Biol.* 164, 24-36 (1994)
11. Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., Jaenisch, R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle

- development. *Cell* 71, 383-390 (1992)
12. Braun, T., Rudnicki, M.A., Arnold, H.H., Jaenisch, R. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369-382 (1992)
 13. Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., Jaenisch, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359 (1993)
 14. Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., Klein, W.H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501-506 (1993)
 15. Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., Nabeshima, Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532-535 (1993)
 16. Sun, X.H., Baltimore, D. An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-470 (1991)
 17. Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831 (1989)
 18. Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., Weintraub, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59 (1990)
 19. Jen, Y., Weintraub, H., Benezra, R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes. Dev.* 6, 1466-1479 (1992)
 20. Melnikova, I.N., Bounpheng, M., Schattman, G.C., Gilliam, D., Christy, B.A. Differential biological activities of mammalian Id proteins in muscle cells. *Exp. Cell. Res.* 247, 94-104 (1999)
 21. Melnikova, I.N., Christy, B.A. Muscle cell differentiation is inhibited by the helix-loop-helix

- protein Id3. *Cell Growth Differ.* 7, 1067-1079 (1996)
22. Rosenthal, S.M., Cheng, Z.Q. Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10307-10311 (1995)
23. Xu, Q., Wu, Z. The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J. Biol. Chem.* 275, 36750-36757 (2000)
24. Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Rosenthal, N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* 27, 195-200 (2001)
25. Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* 17, 481-517 (1996)
26. Stewart, C.E., James, P.L., Fant, M.E., Rotwein, P. Overexpression of insulin-like growth factor-II induces accelerated myoblast differentiation. *J. Cell Physiol.* 169, 23-32 (1996)
27. de la Haba, G., Bricker, J.V. Formation of striated muscle from myoblasts in vitro: inhibition of myotube formation by cis-4-hydroxy-L-proline and its reversal by native or denatured collagen (gelatin). *Mol. Cell Biochem.* 40, 61-63 (1981)
28. Matsuda, R., Saitoh, O., Periasamy, M. L-ascorbic acid 2-phosphate promotes myogenesis of BC3H1 cells by activating myogenin expression. *FASEB J.* 4, A1964 (1990)
29. Mitumoto, Y., Liu, Z., Klip, A. A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenin gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 394-402 (1994)
30. Callis, T.E., Chen, J.F., Wang, D.Z. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol.* 26, 219-225 (2007)
31. Kim, H.K., Lee, Y.S., Sivaprasad, U., Malhotra, A., Dutta, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 174, 677-687 (2006)

32. Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., Lodish, H.F. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8721-8726 (2006)
33. Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Poleskaya, M., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., Cuvellier, S., Harel-Bellan, A. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat. Cell Biol.* 8, 278-284 (2006)
34. Yaffe, D., Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725-727 (1977)
35. Blau, H.M., Chiu, C.P., Webster, C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32, 1171-1180 (1983)
36. Decary, S., Mouly, V., Hamida, C.B., Sautet, A., Barbet, J.P., Butler-Browne, G.S., Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum. Gene. Ther.* 8, 1429-1438 (1997)
37. Zhu, C.H., Mouly, V., Cooper, R.N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J.W., Di Santo, J.P., Butler-Browne, G.S., Wright, W.E. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6, 515-523 (2007)
38. Nagata, Y., Kobayashi, H., Umeda, M., Ohta, N., Kawashima, S., Zammit, P.S., Matsuda, R. Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 375-384 (2006)
39. Shi, L., Zhao, G., Qiu, D., Godfrey, W.R., Vogel, H., Rando, T.A., Hu, H., Kao, P.N. NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs. *J. Biol. Chem.* 280, 18981-18989 (2005)
40. Kadota, N., Suzuki, A., Nakagami, Y., Izumi, T., Endo, T. Endogenous meltrin alpha is

- ubiquitously expressed and associated with the plasma membrane but exogenous meltrin alpha is retained in the endoplasmic reticulum. *J. Biochem.* 128, 941-949 (2000)
41. Sun, L., Trausch-Azar, J.S., Ciechanover, A., Schwartz, A.L. E2A protein degradation by the ubiquitin-proteasome system is stage-dependent during muscle differentiation. *Oncogene* 26, 441-448 (2007)
42. Sakuma, K., Nakao, R., Aoi, W., Inashima, S., Fujikawa, T., Hirata, M., Sano, M., Yasuhara, M. Cyclosporin A treatment upregulates Id1 and Smad3 expression and delays skeletal muscle regeneration. *Acta. Neuropathol.* 110, 269-280 (2005)
43. Saika, S., Ikeda, K., Yamanaka, O., Flanders, K.C., Ohnishi, Y., Nakajima, Y., Muragaki, Y., Ooshima, A. Adenoviral gene transfer of BMP-7, Id2, or Id3 suppresses injury-induced epithelial-to-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C282-289 (2006)
44. Riechmann, V., van Crüchten, I., Sablitzky, F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res.* 22, 749-755 (1994)
45. Wilson, E.M., Hsieh, M.M., Rotwein, P. Autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-II mediates MyoD-stimulated myocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 278, 41109-41113 (2003)
46. Peterkofsky, B. The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 318-328 (1972)
47. Hata, R., Senoo, H. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 138, 8-16 (1989)
48. Florini, J.R., Magri, K.A., Ewton, D.Z., James, P.L., Grindstaff, K., Rotwein, P.S. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion

- of insulin-like growth factor-II. *J. Biol. Chem.* 266, 15917-15923 (1991)
49. Yoshiko, Y., Hirao, K., Maeda, N. Differentiation in C2C12 myoblasts depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1278-1286 (2002)
50. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-495 (1961)
51. Chargé, S.B., Rudnicki, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209-238 (2004)
52. Zammit, P., Beauchamp, J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68, 193-204 (2001)
53. Levine, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N. Engl. J. Med.* 314, 892-902 (1986)
54. Hollenberg, S.M., Cheng, P.F., Weintraub, H. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8028-8032
55. Ren, H., Yin, P., Duan, C. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *J. Cell Biol.* 182, 979-991 (2008)
56. Rosen, K.M., Wentworth, B.M., Rosenthal, N., Villa-Komaroff, L. Specific, temporally regulated expression of the insulin-like growth factor II gene during muscle cell differentiation. *Endocrinology* 133, 474-481 (1993)
57. Sun, Q., Zhang, Y., Yang, G., Chen, X., Zhang, Y., Cao, G., Wang, J., Sun, Y., Zhang, P., Fan, M., Shao, N., Yang, X. Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res.* 36, 2690-2699 (2008)
58. Lafyatis, R., Lechleider, R., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Secretion and transcriptional regulation of transforming growth factor- β 3 during myogenesis. *Mol. Cell Biol.* 11, 3795-3803 (1991)

59. Nagel, S., Papadakis, M., Hoyte, L., Buchan, A.M. Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage. *Expert. Rev. Neurother.* 8, 1255-1268 (2008)
60. Janata, A., Holzer, M. Hypothermia after cardiac arrest. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52, 168-179 (2009)
61. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144 (1996)
62. Lenka, N., Vijayasathy, C., Mullick, J., Avadhani, N.G. Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 309-344 (1998)
63. Kollberg, G., Moslemi, A.R., Lindberg, C., Holme, E., Oldfors, A. Mitochondrial myopathy and rhabdomyolysis associated with a novel nonsense mutation in the gene encoding cytochrome c oxidase subunit I. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 123-128 (2005)
64. Horváth, R., Schoser, B.G., Müller-Höcker, J., Völpel, M., Jaksch, M., Lochmüller, H. Mutations in mtDNA-encoded cytochrome c oxidase subunit genes causing isolated myopathy or severe encephalomyopathy. *Neuromuscul. Disord.* 15, 851-857 (2005)
65. Yang, H., Brosel, S., Acin-Perez, R., Slavkovich, V., Nishino, I., Khan, R., Goldberg, I.J., Graziano, J., Manfredi, G., Schon, E.A. Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to mutations in Sco2. *Hum. Mol. Genet.* 19, 170-180 (2010)
66. Hamai, N., Nakamura, M., Asano, A. Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C2C12 myoblast differentiation. *Cell Struct. Funct.* 22, 421-431 (1997)
67. Pawlikowska, P., Gajkowska, B., Hocquette, J.F., Orzechowski, A. Not only insulin stimulates mitochondriogenesis in muscle cells, but mitochondria are also essential for insulin-mediated myogenesis. *Cell Prolif.* 39, 127-145 (2006)

68. Lai, H.C., Liu, T.J., Ting, C.T., Sharma, P.M., Wang, P.H. Insulin-like growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle mitochondria via activation of PI 3 kinase/Akt pathway. *Mol, Cell Endocrinol.* 205, 99-106 (2003)
69. Puche, J.E., García-Fernández, M., Muntané, J., Rioja, J., González-Barón, S., Cortazar, I.C. Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology* 149, 2620-2627 (2008)
70. Mell, O.C., Seibel, P., Kadenbach, B. Structural organisation of the rat genes encoding liver- and heart-type of cytochrome c oxidase subunit VIa and a pseudogene related to the COXVIa-L cDNA. *Gene* 140, 179-186 (1994)
71. Lenka, N., Basu, A., Mullick, J., Avadhani, N.G. The role of an E box binding basic helix loop helix protein in the cardiac muscle-specific expression of the rat cytochrome oxidase subunit VIII gene. *J. Biol. Chem.* 271, 30281-30289 (1996)
72. Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., Vargas, G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42, 427-438 (2007)
73. Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., Tominaga, M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* 25, 1804-1815 (2006)
74. Kobayashi, Y., Katanosaka, Y., Iwata, Y., Matsuoka, M., Shigekawa, M., Wakabayashi, S. Identification and characterization of GSRP-56, a novel Golgi-localized spectrin repeat-containing protein. *Exp. Cell Res.* 312, 3152-3164 (2006)
75. Kondo, N. Endogenous circannual clock and HP complex in a hibernation control system. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 607-613 (2007)

謝 辞

本研究を行なうにあたり、卒業研究時より 6 年間の長きにわたりご指導下さいました松田良一先生に心より感謝し、お礼申し上げます。先生の独創的なアイデアと暖かい励ましは、いつでも私が研究を進める力となりました。また、この 6 年間の間に、多くの研究者との出会いや研究発表の機会を与えて下さったことにも、大変感謝しております。

松田研究室の皆様には、日頃から研究の相談に乗って頂き、有意義な議論をさせて頂くとともに、具体的な実験手法や操作手順を教えてくださいました。この場を借りて、お礼申し上げます。

IGF-I Tg マウスやヒト骨格筋細胞を用いた実験を行なうにあたっては、ペンシルベニア大学の H. L. Sweeney 教授、E. R. Barton 教授に大変お世話になりました。2009 年夏に 3 カ月の間、私を研究室に受け入れて実験をさせて頂いただけではなく、初めて海外で暮らすことになった私の生活面においても、多くの配慮を頂きました。両研究室の皆様にも大変親切にして頂き、感謝しております。

最後に、博士課程に進学することを快く許可し、常に私を温かく見守り、サポートしてくれた父と母に心より感謝しています。

2010 年 12 月 島 亜衣