

筋細胞の分化に及ぼすデコリンの影響

応用生物科学専攻 食資源科学講座 食肉科学分野
鈴木佳介

【背景と目的】 食肉の主体である家畜骨格筋の形成・発達機構を解明することを目的に、細胞外マトリックス分子の一つであるデコリンが筋細胞の分化に及ぼす影響を検討した。【方法】 デコリン遺伝子のオープンリーディングフレームを組み込んだ発現ベクターおよびデコリンに対する miRNA 発現ベクターを C₂C₁₂ 筋芽細胞に導入し、それぞれデコリン過剰発現筋細胞およびデコリン発現抑制筋細胞を作出した。細胞を播種し 10% FBS-DMEM で 16 時間の前培養後、培地を 2% HS-DMEM に交換して分化誘導を行い 144 時間まで培養した。その間に分化様相を観察し、各視野における全核数に対する筋管中の核数の割合を測定して分化の指標 (fusion index, FI) とした。また、デコリン過剰発現筋細胞を同様に播種して前培養後、ミオスタチン (0~6 µg/ml) を含む 2% HS-DMEM に交換して分化誘導を行い 144 時間まで培養して FI を測定した。さらに、ミオスタチンシグナルに反応するルシフェラーゼレポーター遺伝子 (CAGA-lux) を導入した細胞 (A204 横紋筋肉腫細胞) に、ミオスタチン (10 ng/ml) とともにデコリン (1,000 ng/ml) を添加して 6 時間培養し、ルシフェラーゼ活性値を測定した。また、C₂C₁₂ 筋芽細胞を播種し 10% FBS-DMEM で 16 時間の前培養後、培地を無血清培地 (DMEM) に交換して 24 時間培養した。その後デコリン (5 µg/ml) を添加して 10 分間培養し、細胞を回収して Akt のリン酸化 (活性化) を検出した。【結果と考察】 デコリン過剰発現筋細胞のデコリン mRNA 発現量は対照細胞に比べて約 5~10 倍となり、分化誘導後 72 および 144 時間における FI は対照細胞に比べて有意に高く ($P<0.01$)、太い筋管が観察された。デコリン発現抑制筋細胞のデコリン mRNA 発現量は対照細胞の 46% となり、分化誘導後 72 および 144 時間における FI は対照細胞に比べて有意に低く ($P<0.05$)、細い筋管が観察された。これらの結果から、デコリンは筋細胞の分化を促進することが示唆された。次に、デコリンの筋分化促進機構について検討したところ、ミオスタチン濃度 0~3 µg/ml におけるデコリン過剰発現筋細胞の FI は、対照細胞に比べて有意に高く ($P<0.05$)、ミオスタチンの作用は阻害されていた。しかし、レポーターアッセイの結果、ミオスタチンのみを添加した区とミオスタチンとともにデコリンを添加した区の間ルシフェラーゼ活性値に差は無く、デコリンは直接的にミオスタチンのシグナルを抑制しないことが示唆された。一方、デコリンが IGF-IR を介してシグナル分子として働く可能性をイムノプロットで調べた結果、デコリンの添加によって IGF-1 のダウンストリームの Akt の活性化が確認された。Akt の活性化は筋分化を促進することが知られていることから、デコリンによる筋分化促進機構には、主にデコリンのシグナル分子としての作用が寄与している可能性が示唆された。