

semaphorin 3E とその受容体 Plexin D1 が筋芽細胞の分化に与える影響

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 細胞組織生物学 久枝皓雅

1. はじめに

semaphorin は 20 種類以上のサブタイプが同定されているタンパク質群であり、神経系における神経回路形成のための軸索ガイダンス機能をはじめとして、骨や血管形成など様々な器官、組織で重要な生理機能を発揮することが明らかとなっている。しかし、骨格筋における semaphorin の機能についてはまだ不明な点が多い。これまでに当研究室では、クラス 3 型 semaphorin の 1 つである semaphorin 3A (Sema3A) が分化期の筋芽細胞において合成および分泌され、新生筋線維 (筋管) の遅筋化を誘導することを明らかにした。そこで本研究では、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 での発現が確認されており (Henningsen et al. 2010)、かつ他のクラス 3 型 semaphorin とは要求する細胞膜受容体 (Plexin family) のサブタイプが異なる semaphorin 3E (Sema3E) に着目して、骨格筋における生理機能を検証した。

2. 方法

まず、Sema3A と同様に異なる筋線維型組成を示す骨格筋に局在する筋幹細胞 (衛星細胞) での発現量に差があるかを検討するため、2-3 ヶ月齢の雄の C57BL/6 マウスの速筋 (長趾伸筋; EDL) および遅筋 (ヒラメ筋; soleus) からそれぞれ衛星細胞を単離し、分化誘導後の Sema3E と特異的受容体 Plexin D1 の mRNA の発現量を比較した。次に、筋線維上における Plexin D1 の局在性を調べるために、単一筋線維を単離して蛍光免疫染色法により衛星細胞マーカー Pax7 および Plexin D1 陽性細胞を検出した。続いて、C2C12 を 1, 5, 10, 50 および 100 ng/ml で recombinant Sema3E を添加した条件下で分化誘導を行い、72 時間目での筋分化転写制御因子 (MRFs; MyoD および myogenin) と未成熟型ミオシン重鎖 (MyHC) アイソフォームの mRNA 発現量を調べた。また、120 時間目まで培養した際には筋管融合率 (Fusion Index) を検証した。さらに、分化誘導開始とともに RNAi 法による Plexin D1 発現抑制処理とともに 50 ng/ml の recombinant Sema3E 添加した培養実験を行い、72 時間目における myogenin の mRNA 発現量および 120 時間目における総 MyHC 陽性細胞の割合を免疫染色法によって計測した。

3. 結果と考察

まず、EDL または soleus から単離した衛星細胞における Sema3E および Plexin D1 の発現量に差異は認められなかった。また、単一筋線維上に局在する Pax7 陽性の衛星細胞において Plexin D1 が特異的に発現していた。よって、分化期における衛星細胞で合成された Sema3E は Plexin D1 を介して、オートクライン型に筋分化へ作用する可能性が予想された。そこで、Sema3E を添加して筋芽細胞の分化誘導を行ったところ、添加濃度依存的に MyoD の発現量は低下したが、myogenin の発現量が大きく増加した。特に、50 ng/ml Sema3E 添加区においては Fusion Index も有意に増加した。Plexin D1 発現抑制条件下における Sema3E 添加培養実験では、myogenin 発現量が有意に下がり、かつ総 MyHC 陽性細胞の割合も有意に低下した。よって、筋芽細胞が合成、分泌する Sema3E が Plexin D1 に結合することで自律的に筋分化を促進する制御機構の存在が考えられた。