

研究課題名：筋衛星細胞の活性化の分子機構：物理刺激で作動するカルシウム・カルモジュリン依存的カスケード

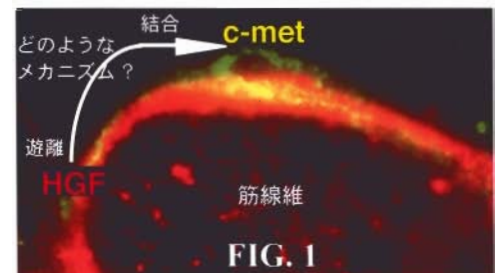
研究組織：辰巳隆一（研究代表者） ・ 池内義秀（研究分担者）
田畑正志（研究分担者）* ・ 橘 哲也（研究分担者）*
（生物機能科学部門、*動物資源科学部門）

研究背景・目的：

食肉は良質な動物性タンパク質の供給源として不可欠であり、21世紀においては地球規模での食料危機が予測されるなか、その安定供給は人類の生存にとって環境問題と並ぶ最重要課題の一つである。食肉の生産性を飛躍的に向上させるには、家畜や家禽の発生・成長・運動に伴う骨格筋の形成・肥大・再生の機構を分子レベルで考究することが必要であり、これにより画期的な生産技術の創生がはじめて可能となる。また、これらの学術的研究の成果は動物資源科学のみならず、ジストロフィー筋の再生治療分野、積極的な運動が制限される高齢者などの介護医療分野、あるいはアスリートの身体能力の向上を目指すスポーツ科学とも密接に関連しており、食糧科学を越えた学際的な貢献も期待される。

動物の成長や運動トレーニングによる骨格筋の肥大および筋の損傷による再生治癒は、筋線維の基底膜下に存在し衛星細胞と呼ばれる幹細胞の働きに依存している。成熟した骨格筋における衛星細胞の際立った特徴は、細胞分裂周期から逸脱した静止期に保持され分裂活動が休止している点にある。従って、衛星細胞が覚醒し分裂周期に復帰することが骨格筋の肥大・再生に不可欠であるが、この活性化の仕組みは不明である。

本研究代表者らは、1997年から「衛星細胞の活性化機構」の解明に取り組み、肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor, 略して HGF）が衛星細胞を活性化することを初めて見出した。現在までのところ、HGF 以外に活性化を誘起する細胞増殖因子は見つかっていない。また FIG. 1 の2重蛍光免疫染色像が示すように、HGF 特異的受容体 c-met が静止期の衛星細胞膜に既に発現している一方で、筋線維の細胞外マトリックスに HGF が結合保持されているという興味深い知見を得た(Tatsumi *et al.*, 1998)。これらの知見は、衛星細胞の活性化が受容体の発現で調節されるのではなく、何らかの外部刺激にตอบสนองして HGF が受容体に結合できるか否かによって制御されていることを示している。代表者は HGF の結合を誘導する外部刺激(トリガー)とその作用機序を *in vitro* と *in vivo* で追究し、以下の知見を得た (Tatsumi *et al.*, 2001; 2002a; 2002b)。i) 物理刺激を負荷すると衛星細胞が活性化する。従って、物理刺激が活性化のトリガーになりうる。ii) 物理刺激を負荷すると衛星細胞の一酸化窒素 (NO) 合成酵素が活性化され、NO が産生する。iii) NO の産生に依存して、細胞外マトリックスに結合していた HGF が遊離する。iv) 遊離した HGF が c-met 受容体に結合すると衛星細胞が活性化する。これらの知見に基づき、「物理刺激で作動する NO および HGF 依存的な活性化機構」を提起するに至った。



しかし、この活性化モデルには2つの大きなブラックボックスがある。第1は「物理刺激を負荷するとどのように NO 合成酵素が活性化するのか」であり、物理刺激を化学反応に変換する心臓部である。第2は「産生された NO によってどのように HGF が遊離するのか」である。本研究では第1ブラックボックスを解明し、衛星細胞の活性化をより大きな連鎖調節機構(カスケード)として発展的に理解することを目指す。

研究成果の概説：

一般に NO 合成酵素の活性化にはカルシウムが結合したカルモジュリン（カルシウム結合タンパク質の一つで、真核細胞に広く存在）が関与していると言われている。そこで本研究ではカルモジュリンに着目し、以下の2つのテーマに分けて実験を行った。

- (1) 衛星細胞におけるカルモジュリンの存在とカルシウム結合能の検討
- (2) 衛星細胞の活性化のカルシウム依存性およびカルモジュリン依存性の検討

(1) 衛星細胞におけるカルモジュリンの存在とカルシウム結合能の検討

実験材料として9ヶ月齢の成熟雄ラット（Sprague-Dawley 種）から Allen ら（1997）の方法に従い単離した衛星細胞標品（デスミンの発現を指標とした純度97%以上）を用いた。10% 正常馬血清および1%抗生物質を含む DMEM 培養液で12時間初代培養した後、細胞を SDS およびプロテアーゼ阻害剤を含む溶液に溶解し、抗カルモジュリンモノクローナル抗体（Sigma 社製、クローン番号 2D1）を用いた western blotting に供試した。FIG. 2A に示したように、鎖重約 17 kDa の位置に強い反応が認められ、これは牛脳由来の精製カルモジュリン（Sigma 社製、P-2277）を試料とした場合のそれと良く一致した。また FIG. 2B の間接蛍光二重染色像が示すように、衛星細胞の特異的マーカータンパク質である c-met に対して陽性な細胞が抗カルモジュリン抗体で良く染色された。これらの結果から、衛星細胞にカルモジュリンが存在することが確認された。

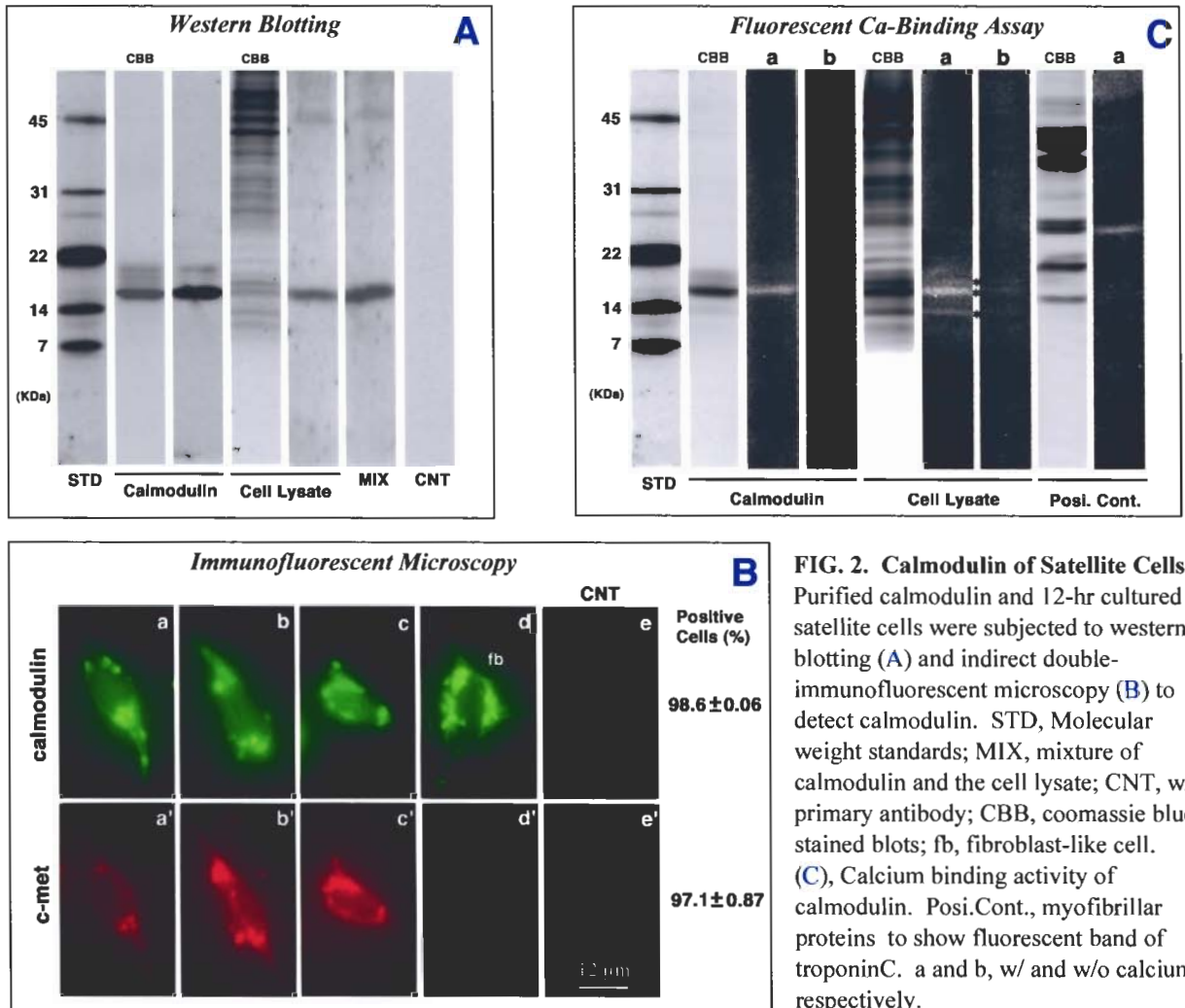


FIG. 2. Calmodulin of Satellite Cells. Purified calmodulin and 12-hr cultured satellite cells were subjected to western blotting (A) and indirect double-immunofluorescent microscopy (B) to detect calmodulin. STD, Molecular weight standards; MIX, mixture of calmodulin and the cell lysate; CNT, w/o primary antibody; CBB, coomassie blue-stained blots; fb, fibroblast-like cell. (C), Calcium binding activity of calmodulin. Posi.Cont., myofibrillar proteins to show fluorescent band of troponinC. a and b, w/ and w/o calcium, respectively.

衛星細胞由来のカルモジュリンにカルシウム結合能があるか否かを調べるため、衛星細胞標品を Ca 特異的蛍光指示薬である Quin2 (Dojindo 社製)を用いた蛍光検出法 (Tatsumi *et al.*, 1997) に供試した (FIG. 2C)。即ち、衛星細胞のタンパク質を転写した PVDF 膜をカルシウム溶液と反応させた後、Quin2 で処理することにより、カルシウムが結合したタンパク質を蛍光により検出した。Lane a に示すように、カルモジュリンに相当するバンドが蛍光を発すること、また lane b のように転写膜をカルシウムキレート剤 EGTA で洗浄してから Quin2 で処理すると蛍光が消失することから、衛星細胞のカルモジュリンに可逆的なカルシウム結合能があることが確認された。

(2) 衛星細胞の活性化のカルシウム依存性およびカルモジュリン依存性の検討

前述のようにこれまでに、衛星細胞に物理刺激を負荷すると細胞外マトリックスから遊離した肝細胞増殖因子 (HGF) が c-met 受容体に結合し衛星細胞が活性化することを明らかにした。そこで、HGF の遊離反応にカルシウムとカルモジュリンが関与しているかどうかを次に検討した (FIG. 3)。まず、カルシウム依存性を調べるため、衛星細胞に物理刺激を加える代わりに細胞内カルシウム導入剤 (カルシウムイオノホア) を培養液に添加し、2 時間静置培養した。HGF の遊離の指標である培養上澄の活性化活性を調べるため、得られた培養上澄を培養液として新たに衛星細胞を 24 時間培養し活性化率を測定した。A23187 および ionomycin のいずれのカルシウムイオノホアの場合でも、濃度の増加に伴い培養上澄の活性化活性は増加し、3 μM で陽性コントロールである 2.5 ng/ml HGF 添加区のそれとほぼ同じ程度にまで達した (FIG. 3A)。3 μM のカルシウムイオノホア処理区の培養上澄に抗 HGF 中和抗体を添加すると活性化活性は完全に消失し (data not shown)、また FIG. 3C の western blotting 像が示すようにカルシウムイオノホア処理区の培養上澄中に HGF が検出された。これらの結果は、培養上澄に認められた活性化活性が HGF に由来することを示しており、細胞外マトリックスからの HGF の遊離反応がカルシウムに完全に依存してことが確認された。

次に HGF の遊離反応にカルモジュリンが関与しているかどうかを調べた (FIG. 3B)。3 μM A23187 および種々の濃度のカルモジュリン特異的阻害剤 (calmidazolium, W-13, W-12) を培養液に添加し、先と同様に回収した培養上澄の活性化活性を測定した。いずれのカルモジュリン阻害剤の場合も濃度の増加に伴い培養上澄の活性化活性は減少し、0.3 μM calmidazolium あるいは 300 μM W-13, W-12 で対照区 (A23187 無添加) の値まで低下した。この結果は FIG. 3C の western blotting (lanes a-f) でも同様であり、カルモジュリン阻害剤を添加すると HGF の遊離が阻害される、即ち、細胞外マトリックスからの HGF の遊離反応はカルモジュリンに完全に依存していることが分かった。また、同様に 3 μM A23187 と共に一酸化窒素(NO)合成酵素の特異的競合阻害剤である L-NAME を添加すると HGF の遊離は阻害され、L-NAME の代わりにその鏡像異性体である D-NAME を加えると正常に HGF の遊離が観察された (FIG. 3C lanes g, h)。このことは、NO 合成酵素の活性化 (NO 産生による HGF の遊離) の上流にカルシウムとカルモジュリンが関与していることを示している。

以上、細胞外マトリックスからの肝細胞増殖因子(HGF)の遊離と、これに続く c-met 受容体への結合と衛星細胞の活性化はカルシウムイオンとカルモジュリンに依存していることが確認できた。これらの知見を先の「物理刺激で作動する NO および HGF 依存的な活性化機構」に組み込み、FIG. 4 に示した衛星細胞の活性化カスケードモデルを提起する。まず、物理刺激が負荷されると衛星細胞のカルシウムチャンネルが開き細胞外からカルシウムイオンが流入する。これがカルモジュリンに結合しカルシウム・カルモジュリン複合体が形成される。これが NO 合成酵素に結合しリン酸化すると L-アルギニンを基質にして NO を産生する。NO

Bromodeoxyuridine-Activation Assay

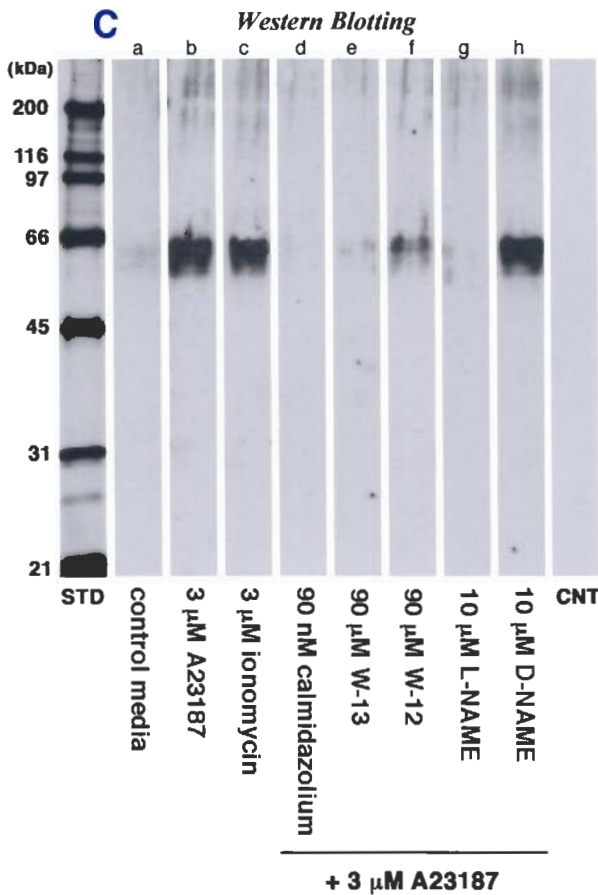
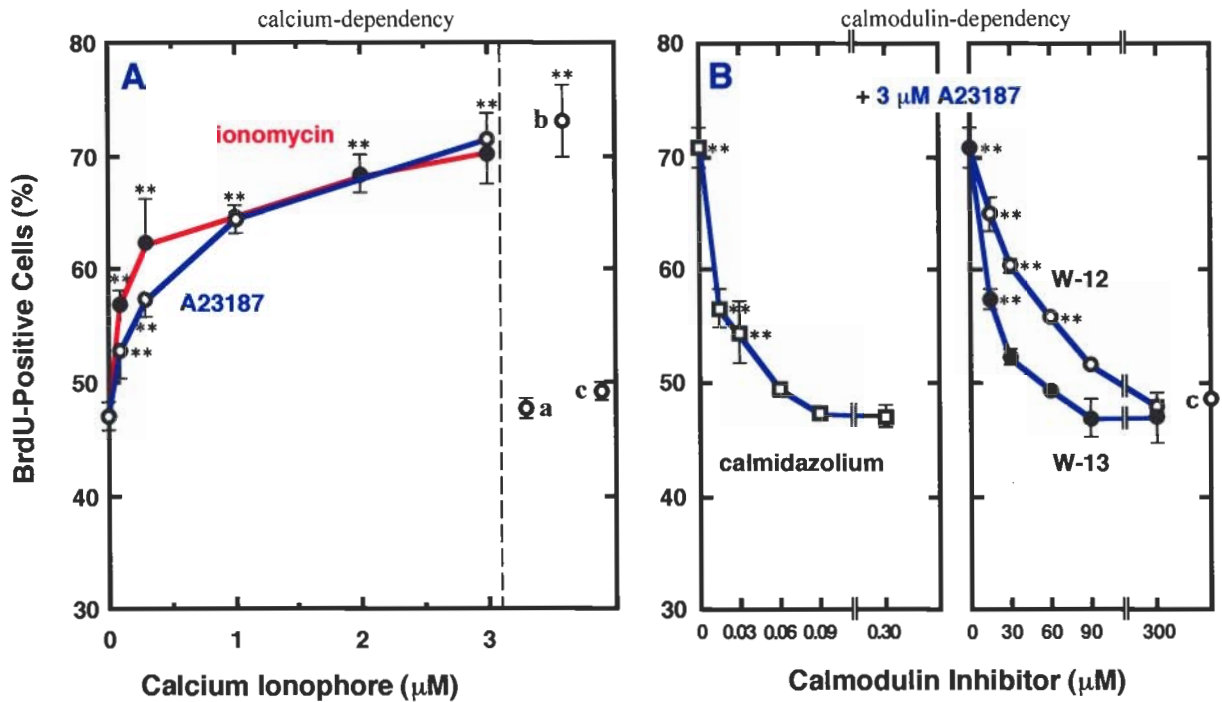


FIG. 3. Calcium- and Calmodulin-Dependencies of Satellite Cell Activation. (A) Satellite cells were cultured for 2 hr from 12 hr to 14 hr post-plating in the presence of various concentrations of calcium ionophore A23187 (open circle) or ionomycin (closed). Conditioned media were collected, dialyzed to remove calcium ionophore, and fed to newly prepared satellite cells, which were then maintained for the next 24 hr from 12-36 hr post-plating and pulse-labeled with bromodeoxyuridine (BrdU) for the last 2 hr. BrdU-positive cells were immunostained with anti-BrdU monoclonal antibody and the peroxidase-labelled secondary antibody, then counted under the microscopy. (B) Satellite cells were maintained for 2 hr in the presence of 3 µM A23187 and calmodulin inhibitors (calmidazolium, W-13, W-12); activating activities of conditioned media were evaluated as described for panel A. a, Control culture with 3 µM A23187 media dialyzed; b, positive control with 2.5 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF); c, negative control with fresh media (not conditioned media from 0 µM A23187-treated cells). Data points depict means and standard errors for three cultures per treatment. ** Statistically significant difference of treatments compared with the negative control (c) ($p < 0.01$). (C) Western blotting of HGF in conditioned media collected.

は速やかに細胞外に拡散し何らかの機構を介して HGF の遊離を引き起こす。HGF は細胞外マトリックスに存在するプロテオグリカンの糖鎖に結合していると一般に考えられているので、プロテオグリカンのコアタンパク質あるいは糖鎖を切断する何らかの酵素が関与している可能性がある。続いて、遊離した HGF が c-met 受容体に結合すると細胞内シグナル伝達系を介して衛星細胞の活性化 (DNA の複製の開始) が誘起されると考えている。前述の通り、このモデルには「どのようにして NO 依存的に HGF が遊離するのか (第 2 ブラックボックス)」の他、「物理刺激を負荷すると細胞内カルシウム濃度が本当に上昇するのか」という課題が残されている。今後、早急に研究を行う予定である。

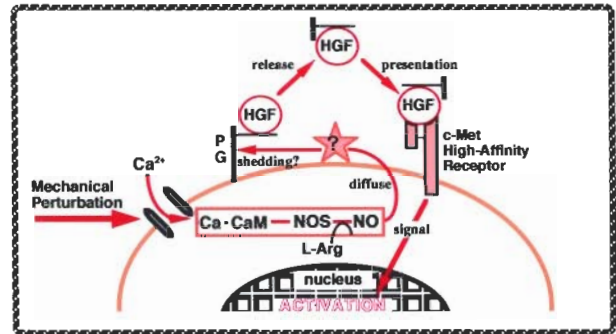


FIG. 4 Schematic Representation of Mechanical Perturbation-Induced Activation Cascade of Satellite Cells. Ca, calmodulin, NOS, NO and HGF-dependent model

本研究に関連する研究論文：

1. 辰巳 隆一
眠っていた筋細胞が目を覚ます,
化学と生物 (日本農芸化学会編), 第35巻 第4号, 295-297 (1997).
2. Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O., and Allen, R. E.
HGF/SF is Present in Normal Adult Skeletal Muscle and Is Capable of Activating Satellite Cells.
Developmental Biology **194**, 114-128 (1998).
3. Sheehan, S. M., Tatsumi, R., Temm-Grove, C.J., and Allen, R. E.
HGF is an Autocrine Growth Factor for Skeletal Muscle Satellite Cells In Vitro.
Muscle & Nerve **23**, 239-245 (2000).
4. Tatsumi, R., Sheehan, S. M., Iwasaki, H., Hattori, A., and Allen, R. E.
Mechanical Stretch Induces Activation of Skeletal Muscle Satellite Cells In Vitro.
Experimental Cell Research, **267**, 107-114 (2001).
5. 辰巳 隆一
筋衛星細胞の活性化機構,
食肉の科学 (日本食肉研究会) 第42巻 第2号, 123-133 (2001).
6. Tatsumi, R., Hattori, A., Allen, R. E., Ikeuchi Y., and Ito, T.
Mechanical Stretch-Induced Activation of Skeletal Muscle Satellite Cells Is Dependent on Nitric Oxide Production.
Animal Science Journal **73**, 235-239 (2002).
7. Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., and Allen, R. E.
Release of Hepatocyte Growth Factor from Mechanical Stretched Skeletal Muscle Satellite Cells and the Role of pH and Nitric Oxide.
Molecular Biology of the Cell **13**, 2909-2918 (2002).
8. Tatsumi, R., Mitsuhashi, K., Ashida, K., Haruno, A., Hattori, A., Ikeuchi, Y., and Allen, R. E.
Comparative Analysis of Mechanical Stretch-Induced Activation Activity of Back and Leg Muscle Satellite Cells In Vitro.
Animal Science Journal **75**, 345-351 (2004).

9. Mendias, C., Tatsumi, R., and Allen, R. E.
The Role of Cyclooxygenase-1 (COX-1) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Skeletal Muscle Satellite Cell Proliferation, Differentiation and Fusion.
Muscle & Nerve, in press.
10. Tatsumi, R. and Allen, R. E.
Active Hepatocyte Growth Factor is Present in Skeletal Muscle Extracellular Matrix.
Muscle & Nerve, in press.

学会発表：

1. 辰巳隆一¹・A.L.Wuollet²・池内義秀¹・伊藤肇躬¹・服部昭義³・R.E.Allen²
(¹九州大学大学院農学研究院・²アリゾナ大学畜産学科・³北海道大学大学院農学研究科)
「筋衛星細胞の活性化のカルシウム・カルモジュリン依存的カスケード」
日本畜産学会第103回大会(2004年3月、東京農工大学府中キャンパス)
2. 辰巳隆一¹・池内義秀¹・服部昭仁²
(¹九州大学大学院農学研究院・²北海道大学大学院農学研究科)
「筋衛星細胞の活性化機構：物理刺激で作動する一酸化窒素依存的カスケード」
日本獣医学会第137回大会，生理生化学分科会シンポジウム，骨格筋研究への複合領域的アプローチ(2004年4月、日本大学生物資源科学部藤沢キャンパス)

研究代表者略歴：

昭和62年	3月	北海道大学農学部畜産学科卒業
平成元年	3月	北海道大学大学院農学研究科畜産学専攻博士前期課程修了
平成4年	3月	北海道大学大学院農学研究科畜産学専攻博士後期課程修了 博士(農学)(北海道大学)の学位取得
平成5年	6月	北海道大学農学部研究生退学
平成5年	7月	北海道大学農学部助手に採用
平成8年	2月	文部省在外研究員(若手長期)米国アリゾナ大学、同年11月まで
平成13年	10月	九州大学大学院農学研究科助手に転入
平成14年	7月	米国アリゾナ大学客員研究員、平成15年8月まで 現在に至る