

# Abstract

During myogenesis, myogenic stem cells undergo several sequential events, including cell division, migration, and cell-cell fusion, leading to the formation of multinuclear myotubes, which are the precursors of myofibers. In the long processes of myogenesis, however, the molecular mechanisms and regulatory mechanisms of the initial cell-fusion event between myoblasts remain to be elucidated.

## Chapter 1: Clathrin adaptor GGA1 modulates myogenesis of C2C12 myoblasts

To understand the molecular mechanisms underlying these complex processes, an RNA interference-based gene depletion approach was used. Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1 (GGA1), a Golgi-resident monomeric clathrin adaptor, was found to be required for the process of myotube formation in C2C12 cells, a cultured murine myoblast cell line. *Ggal* mRNA expression was upregulated during myogenesis, and *Ggal* depletion prevented the formation of large multi-nucleated myotubes. Moreover, inhibition of lysosomal proteases in *Ggal* knockdown myoblasts increased the amount of insulin receptor, suggesting that GGA1 is involved in the cell surface expression and sorting of the insulin receptor. These results suggested that GGA1 plays a significant role in the formation and maturation of myotubes by targeting the insulin receptor to the cell surface to establish functionally mature myofibers.

## Chapter 2: Establishment of a novel cell-based assay system for monitoring the cell-cell fusion process during myotube formation

Comprehensive screening of genes required for the muscle differentiation or repair of damaged muscle, is a straight forward approach for understanding the complex events like myogenesis at a molecular level. In this chapter, a novel cell-based assay system to monitor the cell-to-cell fusion of myoblasts was established using the HiBiT system (Promega Corp.). The HiMy (HiBiT-based myoblast fusion assay) system was assessed for its capability of measuring of the cell fusion event and it appeared that the system could detect the cell fusion 3 hours after the initiation of differentiation of C2C12 cells. The system was also expected to be applicable for high throughput screening of chemicals and genes that could affect or involves the myogenic cell fusion event. Several chemical compounds were tested with HiMy assay and one inhibitor of calcium dependent protein kinase (PKC) and a phospholipid lysophosphatidylcholine were hit as possible inhibitors for the cell fusion. Moreover, knock down of all the Rab small GTPases was carried out and a group of Rabs including Rab12 was picked up that could be negative regulators for the myoblast fusion. That result suggests that some Rabs could be involved in the intracellular trafficking of the fusion machineries to the plasma membrane.

## 和文抄録

発生中の骨格筋の成長や筋損傷後の筋線維再生期においては、筋衛星細胞が活性化、分化し筋芽細胞となった後、筋芽細胞同士あるいは筋芽細胞と筋管細胞との細胞融合を経て多核の筋細胞が形成されるが、これらの過程における細胞間の認識機構や細胞膜融合に関わる因子群など、その基本的な分子機序は未だ不明な点が多い。本研究においては筋分化、特に筋芽細胞の細胞融合機構の解明を目指し、以下の通り解析を行った。

### Chapter 1: クラスリンアダプターGGA1はC2C12筋芽細胞の筋分化過程を制御する

ゴルジ体で機能するクラスリンアダプター分子 GGA1 (Golgi-associated, Gamma ear-containing, Arf binding protein 1) のノックダウンにより、マウス培養筋芽細胞 C2C12 の筋管形成過程が阻害されることが明らかとなった。また、筋分化条件下に GGA1 の発現が転写レベルで誘導されること、GGA1 ノックダウンにより 20 核以上の多核の筋管細胞が減少することが分かった。さらに GGA1 ノックダウンした細胞ではインスリン受容体の発現が低下しており、この発現低下はライソソームプロテアーゼの阻害により抑圧されることから、GGA1 のノックダウンによりインスリン受容体がライソソームに誤輸送され分解されていることが示唆される。以上の結果より GGA1 は細胞表面へのインスリン受容体の輸送を制御することで筋管細胞の成熟過程に関与していると考えられる。

### Chapter 2: 筋分化過程における筋芽細胞融合の新規検出系の開発

骨格筋の損傷からの修復過程には多くの分子が関与していることが明らかとなっているが、筋

管形成、特に筋芽細胞膜融合のプロセスに関する基本的な分子機構には未だ不明な点が多い。細胞融合に関与する遺伝子を網羅的に探索するために、近年 Promega 社より発売された HiBiT システムを応用することで筋芽細胞の融合過程を簡便に検出できる系を開発し、作製したアッセイ系を HiMy 法 (HiBiT-based myoblast fusion assay) と名付けた。HiMy 法は分化誘導 3 時間後という初期の細胞融合を定量的に測定することができる。また、化合物スクリーニングや遺伝子スクリーニングなどの大規模な探索実験をハイスループットに行うことが可能となる。本研究ではいくつかの化合物に対して HiMy 法を用いたところ、PKC 阻害剤と LPC が細胞融合阻害作用を有する可能性が示唆された。さらに、低分子量 Rab GTPase のノックダウンスクリーニングを行ったところ、Rab12 を含むいくつかの Rab 分子をノックダウンすると細胞融合が促進することが分かった。以上の結果により、Rab12 を含むいくつかの Rab 分子は細胞融合に関わる因子を細胞膜上に輸送する役割を担っている可能性が考えられる。