

信州大学審査学位論文

ニワトリ筋芽細胞の増殖と分化を
制御する分子の研究

令和 4 年 3 月

信州大学大学院 総合医理工学研究科

総合理工学専攻 生物・生命科学分野

二橋 佑磨

目次

略語一覧.....	2
第 1 章 序論.....	4
図表等	
第 2 章 卵用鶏と肉用鶏の骨格筋芽細胞における網羅的な遺伝子発現解析.....	12
2-1 緒言	
2-2 材料および方法	
2-3 結果	
2-4 考察	
図表等	
第 3 章 筋形成型オリゴ DNA-ベルベリン複合体によるニワトリ筋芽細胞の分化誘導	45
3-1 緒言	
3-2 材料および方法	
3-3 結果	
3-4 考察	
図表等	
第 4 章 総論.....	66
引用文献.....	71
謝辞.....	84
公表論文.....	86

略語一覽

Ber: Berberine
bFGF: Basic fibroblast growth factor
BPR: Barred Plymouth Rock
BS: Binding solution
BSA: Bovine serum albumin
CEE: Chicken embryo extract
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEG: Differentially expressed gene
DM: Differentiation medium
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
FBS: Fetal bovine serum
FDR: False discovery rate
GM: Growth medium
GO: Gene ontology
HS: Horse serum
IL: Interleukin
LENK: Leucine-enkephalin
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MB: Myoblast
MENK: Methionine-enkephalin
MHC: Myosin heavy chain
MRF: Myogenic regulatory factor
myoDN: Myogenetic oligodeoxynucleotide
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NEAA: MEM non-essential amino acids
NF- κ B: Nuclear factor-kappa B
ODN: Oligodeoxynucleotide
PCA: Principal component analysis
PBS: Phosphate buffered saline
PFA: Paraformaldehyde
PS: Penicillin-streptomycin
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

QTL: Quantitative trait locus
rhEGF: Recombinant human epidermal growth factor
RBD: RNA-binding domein
RNA-seq: RNA-sequencing
RPKM: Reads per kilobase of exon per million mapped reads
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
TLR: Toll-like receptor
TPM: Transcripts per million
UKC: UK Chunky
UTR: Untranslated region
WL: White Leghorn

第1章

序論

1-1 鶏肉の生産量と消費量

世界の人口は 2020 年の 77 億人から 2050 年に 97 億人へと増加し、21 世紀末に 110 億人に達すると予測されている。世界人口の増加、開発途上国の経済成長に伴い、世界全体の食肉需要は増加傾向で推移している [1]。鶏肉は、炭素排出量の点で牛肉や豚肉よりも持続可能なことに加え [2]、宗教的禁忌も少ないことから生産量が増加している (Fig. 1-1-A)。日本では若年層の魚離れや消費者ニーズの変化等により、魚介類の消費量が減少する一方で、一人当たりの食肉の消費量は、2019 年に 33.2 kg/年となり、過去最高を更新した [3]。特に国内の鶏肉需要は、消費者の価格志向や健康志向の変化による影響を強く反映し、他の畜肉と比較して増加傾向で推移している [4] (Fig. 1-1-B)。人類はこれまでに、戦略的な育種により肉用鶏の増体率を向上させることで、現在の食肉生産量を維持してきた [5-7]。

1-2 骨格筋組織の形成・再生

食肉となる骨格筋組織は動物で最大の器官であり、運動、姿勢維持、呼吸、熱発生などの重要な機能を担っている。骨格筋の形成は、タンパク質合成と分解のバランスによって維持されており、これらのプロセスは栄養状態やホルモンバランス、運動、および疾患や傷害などによる影響を常に受けている [8]。

骨格筋は、多数の筋細胞が融合してできた多核の筋線維から構成される (Fig. 1-2-A)。基底膜と筋細胞膜の間には、衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在している。衛星細胞は、幹細胞集団を維持するだけでなく、分化、融合を経て、新しい筋線維の形成および再構築を行う。成体の骨格筋では、衛星細胞の多くが、Pax3 [9]や Pax7 [10]を発現している。Pax3/Pax7 陽性の衛星細胞は、分化刺激を受けると細胞周期から離脱する。筋分化は、MyoD, myogenin, MRF4, Myf5 などの筋形成調節因子 (MRF) によって高度に組織化されている [11]。細胞周期を脱した細胞は、Myf5 と MyoD を発現する筋芽細胞 (前駆細胞) へと分化し、自己増殖する。次に筋芽細胞は、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 の発現増加と、網膜芽細胞腫タンパク質 pRB (Rb1) の脱リン酸化を介した代謝の切り替えを行う。一般的に p21 は増殖の停止に重要な因子として知られるが、近年では分化プログラムの開始に関与することが示唆されている。これまでに、筋分化中の p21 の転写は MyoD によって誘導されており、MyoD-p21 経路の活性化が筋分化の調節に重要なイベントであることが報告されている [12]。これらの代謝調節を受け、増殖を終えた筋芽細胞は、myogenin やミオシン重鎖 (MHC) を発現する筋細胞へと分化する。その後、単核の筋細胞が近くの筋管や既存の筋線維と融合することで多核の筋管を形成する。筋細胞の融合には、数万の筋芽細胞や筋細胞が関与すると考えられており、骨格筋形成はダイナミックなイベントであることがうかがえる。実際に、筋細胞同士の融合は、認識、接着、細胞内シグナル伝達、細胞骨格の変化、および膜の再配列を必要とする複雑なプロセスで、

厳密に制御されている。特に、膜貫通タンパク質 **myomaker** の発見は、脊椎動物における筋細胞融合メカニズムを紐解く際に大きく貢献した [13]。近年では **myomaker** のリガンド **myomixer** が同定されており、筋特異的な細胞融合メカニズムへの理解が深まりつつある [14]。複雑な融合プロセスを終えた筋管は、最終的に、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントを形成し、骨格筋として機能を発揮する。骨格筋形成の中でも筋芽細胞は、自己増殖による細胞の供給、膜の再編成や細胞融合によって骨格筋の構造と機能を維持することから、筋管と筋線維の形成プロセスにおいて中心的な役割を担っていると言える。したがって、筋芽細胞の増殖と分化に影響する因子の探索と同定は、筋管や筋組織の形成メカニズムを理解し、制御するために重要である。

1-3 卵用鶏と肉用鶏の筋芽細胞における網羅的な遺伝子発現解析

生物は外的環境に対応するために、細胞が保有している遺伝情報を読み解き、その情報を表現する。生物の全遺伝情報（ゲノム）の解読が進み、1つの細胞の中にタンパク質をコードする遺伝子や生命活動に重要な役割を担う RNA 分子が数万種類存在していることが明らかになっている。ゲノム DNA の一部を鋳型にして RNA が合成されることを転写と呼び、転写によって合成された RNA のことをトランスクリプトという。トランスクリプトは細胞内でタンパク質に翻訳され、臨機応変にその機能を発揮することで、生命活動に貢献する。トランスクリプトーム解析は、細胞全体の今の動きを可視化するだけでなく、未来の活動を予測する上で重要な技術である。同じ動物種由来の細胞でも、遺伝子発現パターンが個体（系統や品種）によって異なることもあり、細胞の性格を判断することにもトランスクリプトーム解析が利用されている。現在、トランスクリプトーム解析は、生物学研究、医学診断、および治療研究で広く使用されている。

定量 PCR (quantitative PCR; qPCR) はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、対象物の中にある特定のトランスクリプトの量を調べる方法である。迅速性と定量性に優れており、少ないサンプルの量で解析が可能である。一方で、qPCR では各遺伝子に対する特定のプライマーを設計して発現を解析するため、対象とする遺伝子は数百種類が限界である。この問題を克服した方法がマイクロアレイである。qPCR とは異なり、プライマーを用意する必要がなく、遺伝子発現を網羅的に調べることが可能である。マイクロアレイでは、一度の解析で数万種類の遺伝子の発現パターンを網羅的に調べることができる。マイクロアレイでは、標識した cDNA とスライドガラス上に固定化された DNA プローブをハイブリダイゼーションすることで、遺伝子の発現量を蛍光によって可視化する。DNA プローブの蛍光量を測定することにより、遺伝子の発現量を網羅的に評価することができる。しかし、マイクロアレイを利用するには、解析対象の塩基配列をあらかじめ知っておく必要があり、情報のない遺伝子の測定不可能である。また、ほとんどのマイクロアレイは、遺伝子上のエキソンに存在する一領域だけを発現解析指標として用いるため、遺伝子のスプライシングバリエーションの発現を調べることができな

い。マイクロアレイとは対照的に、RNA シーケンシング (RNA-seq) では、標識されたトランスクリプトを直接解析するため、スプライシングバリエントや融合遺伝子などを含む、新規転写物を同定することもできる。コストの面で敬遠されてきた RNA-seq であったが、逆転写反応と全 cDNA 増幅法の効率上昇、逆転写酵素の最適化や試薬コストの削減によって RNA-seq はより身近な解析方法となりつつある。最近では、クラウドプラットフォーム RaNA-Seq を用いて、RNA-seq データを迅速に解析・可視化することもできる [15]。RaNA-Seq では、中間マッピングファイルを形成せずに、遺伝子発現を定量するアルゴリズム (salmon) を用いることにより、次世代シーケンサからの出力されたテキストデータ (FASTQ ファイル) の定量、品質管理の計算、発現変動遺伝子の解析を数分で実行可能である。

食肉を効率的に生産するために育種選抜されてきた家畜は、原種よりも発達した骨格筋を有するようになった。これら家畜の筋形成メカニズムを紐解くことは、新たな筋形成シグナルの解明につながることを期待される。近年、RNA-seq を用いた網羅的な遺伝子発現解析によって、家畜の筋分化の機構を解析した研究が報告されている。ヒツジの品種間で上腕二頭筋のトランスクリプトームを比較した研究では、合計 1,300 遺伝子の発現パターンの違いが報告されている。この報告は、骨格筋組織の発達メカニズムの解明に役立つと期待されている [16]。最近では、霜降りの多い牛系統の選抜に必要な科学的な知見を得るため、背最長筋の網羅的な遺伝子発現解析が行われた [17]。さらに、RNA-seq を使用して、ブタの筋組織の発達と、肉の品質に関連する遺伝子が提案されている [18]。この流れはニワトリも例外ではなく、トランスクリプトームの解析が進められている。例えば、RNA-seq 解析によって、鶏肉の柔らかさに関与する可能性がある 68 個の遺伝子が明らかにされている [19]。このように、トランスクリプトーム解析を用いることで、家畜の特異的な筋形成に関わるメカニズムを組織や細胞レベルで明らかにすることが可能になりつつある。しかし、骨格筋の形成に関連するシグナルネットワークは複雑であり、鳥類の筋形成の研究はまだ不完全である。

最近では、肉用鶏の骨格筋組織の肥大に関わる遺伝子を探索するためのゲノムベースの研究も進められてきた。量的形質遺伝子座 (quantitative trait locus; QTL) 解析により、経済形質の遺伝子座を同定することで各肉用鶏を比較する報告も増えている [20-22]。だが、QTL 解析で明らかにできるのは、量的形質を支配する遺伝子の場所である。このため、対象とする遺伝子の機能を明らかにすることができない。マウスやヒトでの研究によって多くの骨格筋形成に関わる遺伝子が明らかになりつつあるが、筋形成に特化して育種選抜されてきた家禽と哺乳類で遺伝子発現が異なることが推測される。近年、筋組織の遺伝子発現パターンを網羅的に解析し、ニワトリの骨格筋形成に関わる新たな遺伝子群を同定しようとする試みがある [23-25]。しかし、これらの研究では、様々な細胞からなる成鶏の骨格筋組織を材料としているため、純粋に筋細胞の遺伝子発現を評価しているとはいえず、また、成育状況などの環境要因によ

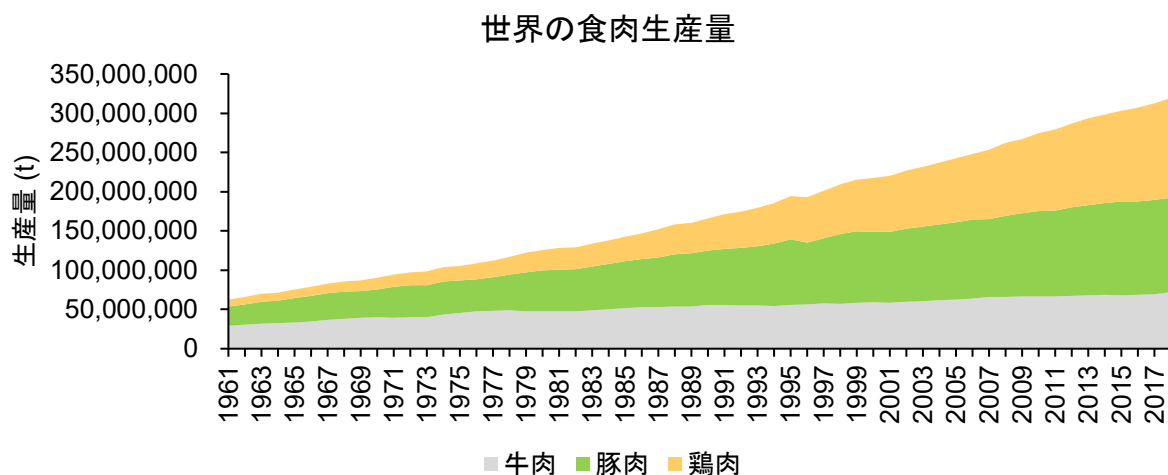
る影響の存在も否定できない。家禽の筋形成を制御する遺伝子の探索には、実験条件を厳密に制御でき、再現性の高い解析系の確立が不可欠である。筆者は、骨格筋の形成において中心的な役割を担う筋芽細胞に着目した。出生後の骨格筋組織の発達は、主に筋線維の長さや筋線維径の増大に依存している [26]。一方で筋線維数は、マウス [27, 28]、ラット [29]、豚 [30]、牛 [31] およびニワトリ [32] において胚形成の間に決定されることが報告されている。これらの報告は、発生段階での遺伝子発現が筋線維の形成に重要であることを示唆する。胚時期の筋形成では、筋芽細胞が増殖・分化することで、筋線維を形成する。これらの知見から、ニワトリ筋芽細胞の増殖・分化に関わる因子を探索することや、それら因子の機能を明らかにすることは家禽の筋形成メカニズムの理解に重要である。そこで本研究では、ニワトリ筋芽細胞の増殖と分化を制御する遺伝子の探索と、その機能の解明を目的とした。

1-4 筋形成型オリゴ DNA (myoDN) とベルベリンの複合体がニワトリ筋芽細胞に与える影響

最近、筆者が所属する研究室で、骨格筋芽細胞の分化を促進する 18 塩基のオリゴ DNA (ODN) 群が世界で初めて同定された [33]。これらの配列は筋形成型 ODN (myoDN) と命名された。myoDN は、ヒト腸内に存在し、乳製品にも用いられる乳酸菌 *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG のゲノム配列から設計された一本鎖 ODN である。これまでに myoDN は、マウスだけではなく、ヒト筋芽細胞の分化を強力に促進することが明らかになっている。また、myoDN の一つである iSN04 は多機能タンパク質ヌクレオリンに直接結合することが分かっている。ヌクレオリンと p53 の関係については詳細に調べられており、ヌクレオリンが p53 遺伝子の 3'-UTR に結合することで、p53 mRNA の翻訳を阻害することが報告されている [34-36]。実際に iSN04 を筋芽細胞に投与すると p53 タンパク質量が増加する。これまでに、マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた研究では、ドミナントネガティブ型の p53 が筋分化を阻害することが報告されている [37]。筋分化において、p53 は MyoD と協調して [38]、網膜芽細胞腫タンパク質 (RB) の転写を活性化する [39]。p53-RB シグナル経路は細胞周期を停止させ、筋分化中の MyoD の活性化に関わる補助的な機構として働く [40, 41]。これらの報告から、iSN04 がヌクレオリンタンパク質の阻害を介して、p53 タンパク質の翻訳を増加させ、筋分化を誘導していると考えられている。さらに、キハダ由来のアルカロイドであるベルベリンが iSN04 と結合し、その活性を劇的に亢進させることが見出されている (Fig. 1-2-B)。分子シミュレーションおよび変異 iSN04 を用いた実験から、13 から 15 番目の連続したグアニン (G) が iSN04 の活性に重要であることが分かっている。ベルベリンは、GGG 配列を介して iSN04 と物理的に相互作用することが示されており、構造を安定化することやヌクレオリンとの結合の親和性を向上させることによって iSN04 の筋分化活性を増強すると考えられている。

ODN の作用は同一配列でも動物種によって異なることが報告されている。例えば、TLR 依存的に免疫を制御する ODN である ODN-2006 はマウスとヒトの TLR9 を刺激するが、ODN-1826 はマウス TLR9 にのみ認識される [42]。ニワトリでは哺乳類 TLR9 の機能的ホモログとして TLR21 を発現する。最近では、鳥類マクロファージを刺激する ODN の報告もある [43]。鳥類の免疫系を刺激するために重要な配列も同定されつつあるが [44-46]、これら配列はマウスやヒトにおいては必須ではないことが示唆されている。筋形成型 ODN である iSN04 の標的タンパク質であるヌクレオリンのアミノ酸配列は、鳥類と哺乳類の間で比較的類似しているが、同一性は約 60%にとどまる (ニワトリ-ヒト間の同一性 62.5%、ニワトリ-マウス間の同一性 59.6%)。これらの知見は、myoDN が種特異性を示す可能性を示唆している。これまでに、哺乳類と鳥類で筋分化を促進する共通の核酸配列は報告されていない。myoDN がアンチセンス核酸や miRNA 様に機能するのであれば、各種ゲノムの相同遺伝子座に myoDN と類似の配列が保存されているはずである。しかし、BLAST 検索ではそのような遺伝子座を認めなかった。また、アンチセンス核酸は直鎖化による活性向上が期待されるが、先行研究によって myoDN の一部は熱変性により失活することが示されている。これらの結果は、myoDN の作用が立体構造依存的であることを強く示唆する。myoDN がニワトリ筋芽細胞の分化をも誘導する分子であることが明らかになれば、哺乳類と鳥類で高度に保存された筋分化メカニズムの発見につながると考えられる。しかし、myoDN が鳥類筋芽細胞にも効果があるかは不明である。そこで本研究では、myoDN がニワトリ筋芽細胞の分化を誘導するのかを検証した。

A



B

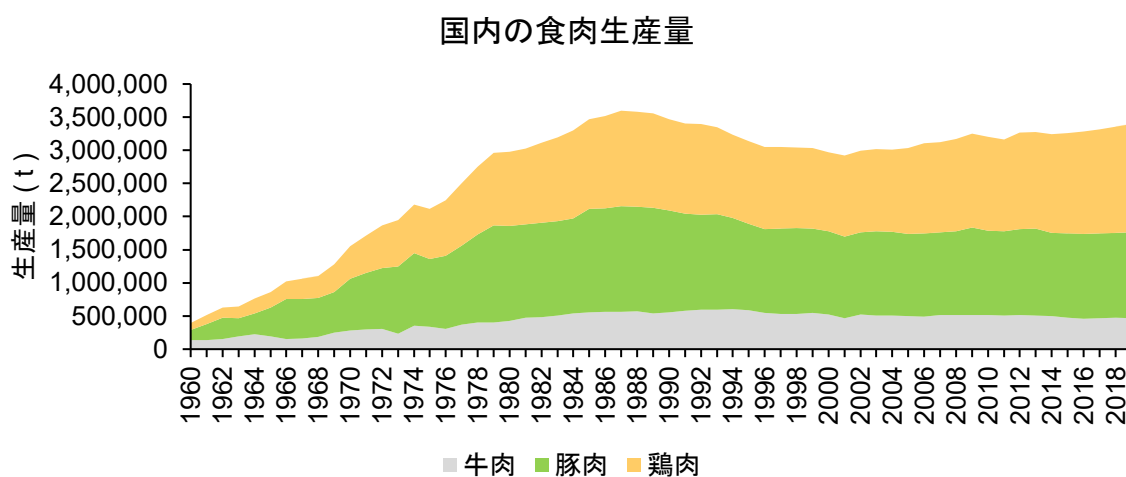
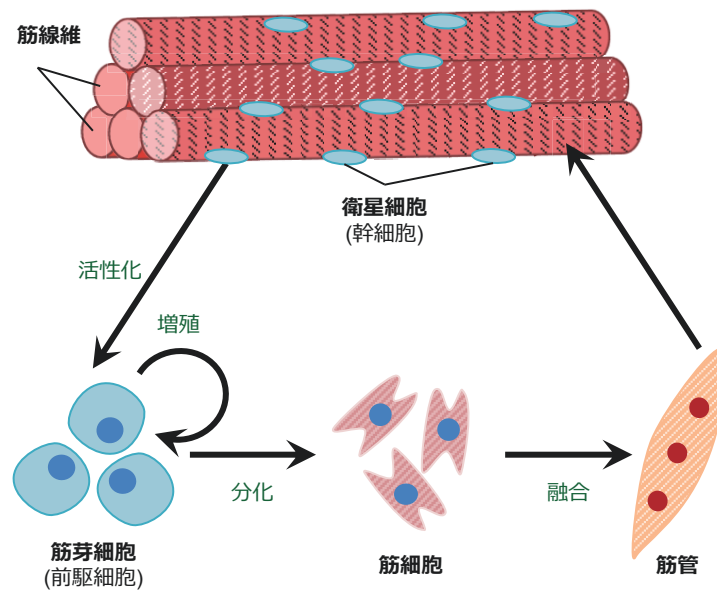


Fig. 1-1; 鶏肉の生産量と肉用鶏

A: 世界の食肉生産量 [1]

B: 国内の食肉生産量 [3]

A



B

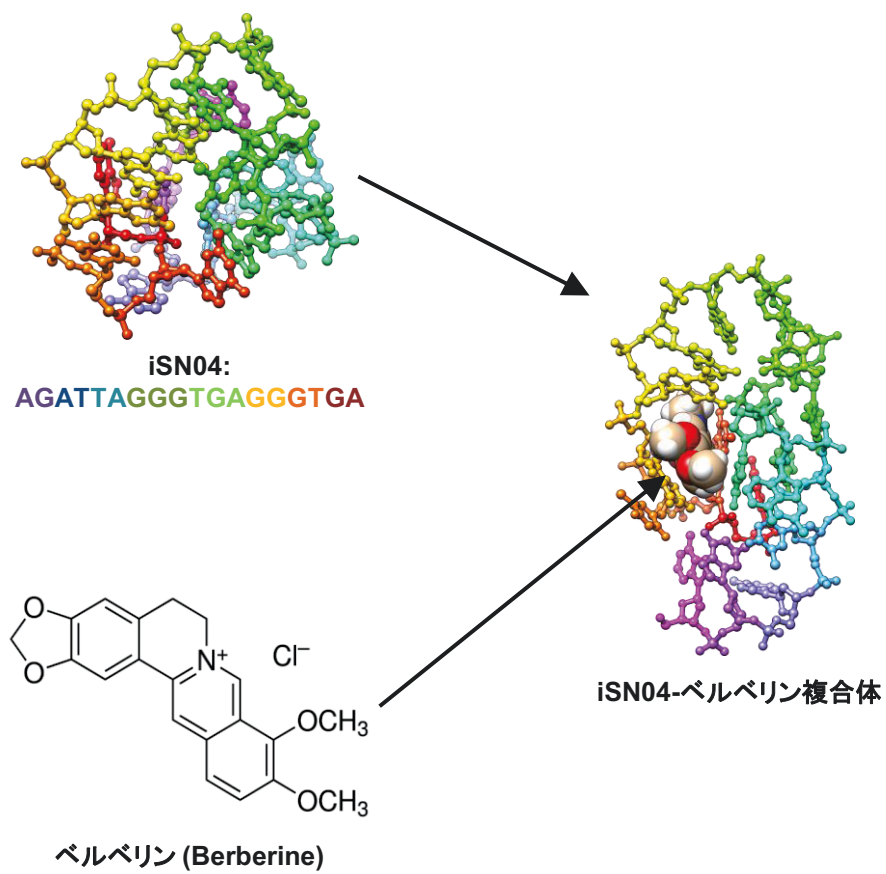


Fig. 1-2; 骨格筋の形成過程とmyoDN

A: 骨格筋の形成過程

B: iSN04-ベルベリン複合体の分子構造シミュレーション

第 2 章

卵用鶏と肉用鶏の骨格筋芽細胞における 網羅的な遺伝子発現解析

2-1 緒言

鶏肉は安価で良質なタンパク源であることから、世界的に需要が増加している。肉用鶏の体重などを指標に、有用形質の選抜が繰り返された結果、鶏肉の生産効率は年間約 3.3% ずつ向上してきた [47]。鶏肉生産に特化した肉用鶏は、他の品種と比較して、急速に骨格筋が発達する [48, 49]。孵化時の体重は、卵用鶏で 38.5 g であるが、肉用鶏では 44.4 g に達する。孵化後の肉用鶏の体重は 4~5 週間以内に 2 kg に達するが、卵用鶏の体重は依然として 0.4 kg に留まる。このように肉用鶏は急速に生育するように改良され、現在の食肉産業を支えている。

肉用鶏の骨格筋形成メカニズムを詳細に理解するために、ゲノムベースの研究が進められてきた。Ambo らは、QTL 解析を用いて、ニワトリ個体の体重が、限られた染色体領域に支配されていることを報告している [50]。最近では、日本原産の品種であるナゴヤと市販の肉用鶏の親品種であるホワイトプリマスロックの QTL 解析によって、出生後の成長を制御する 3 つの QTL が報告されている [51]。これらの報告によって肉用鶏の増体に関わる遺伝子座が同定されているが、QTL 解析では遺伝子の詳細な機能を明らかにすることはできない。

卵用鶏と肉用鶏の体重の違いは、主に骨格筋の大きさに起因する。卵用鶏と比較して、肉用鶏の骨格筋は、筋線維数が多く、各筋線維の直径が大きい。骨格筋形成の違いを分子レベルで明らかにするために、骨格筋組織のトランスクリプトーム解析が行われてきた。胸筋組織を対象としたマイクロアレイでは、遅筋線維や衛星細胞の増殖、および筋肉肥大に関連する遺伝子の発現が、卵用鶏と肉用鶏の間で異なることが報告されている [52]。また、肉用鶏の胸筋組織におけるマイクロアレイでは、胸筋組織の遺伝子発現パターンは飼料の影響を受けることが報告されている [53, 54]。次世代シーケンサの発展により RNA-seq は身近なツールとなりつつある。ニワトリのゲノム情報の刷新もあり、哺乳類のように簡単にデータが収集可能になってきている。最近では、RNA-seq を用いてニワトリのトサカの大きさに関わる遺伝子が探索された [55]。また、現行の商業用肉用鶏と改良前の肉用鶏の胸筋組織で発現の異なる遺伝子が報告されている [23, 24]。さらには、胸筋組織の pH が異なるニワトリ系統間の遺伝子発現を比較し、肉質に関わるマーカー遺伝子の探索が行われた [25]。これらの報告から、ニワトリの骨格筋形成には、ストレス応答や DNA の複製、ホルモンによる刺激などさまざまなシグナルが関与することが示唆されている。しかし、これらの研究では、成鶏の骨格筋組織を材料としているため、純粋に筋細胞の遺伝子発現を評価しているとはいえず、また、成育状況などの環境要因による影響も否定できない。家禽の筋形成メカニズムをより詳細に調べるためには、実験条件を厳密に制御でき、再現性の高い解析系の確立が不可欠である。

骨格筋は、多数の筋細胞が融合してできた多核の筋線維から構成される。基底膜と筋細胞膜の間には、衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在している。通常、衛星細胞は静止状態にあり、増殖しない。しかし、発生期や骨格筋が損傷するなどの刺激を受けると、衛星細胞は活性化されて筋芽細胞と呼ばれる前駆細胞に分化する。筋芽細胞は数回の細胞分裂によって増殖した後、筋細胞へと分化する。そして複数の筋細胞が互いに融合して、多核の筋管となる。骨格筋は筋管同士が互いに融合することで肥大する [56]。筋芽細胞は、自己増殖による細胞の供給や膜の再編成や細胞融合による筋管の形成に関わることから、骨格筋の形成において中心的な役割を担っていると言える。出生後の骨格筋組織の発達は、主に筋線維の長さや筋線維径の増大に依存している [26]。ニワトリの筋線維数は、胚形成の間に決定されることが報告されている [32]。これらの報告は、遺伝的な要因や発生段階での遺伝子発現が筋線維の形成に重要であることを示唆する。したがって、胚発生の筋形成において重要な役割を果たす筋芽細胞の遺伝子発現を解析することは、肉用鶏の活発な筋成長に関わる因子の探索に有用であると考えられる。しかし、今日までに、ニワトリ筋芽細胞で発現する遺伝子を網羅的に解析したデータはない。そこで本研究では、表現型の異なるニワトリ品種の比較を通じて筋芽細胞の増殖と分化の分子基盤を明らかにすることを目的とし、肉用鶏と骨格筋の発生および形態が大きく異なる卵用鶏の筋芽細胞を対照群とした。RNA-seq によって卵用鶏および肉用鶏のニワトリ胚から単離した筋芽細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。

2-2 材料および方法

2-2-1 初代培養ニワトリ筋芽細胞

卵用鶏（白色レグホン; WL）と肉用鶏（UK チャンキー; UKC）の鶏卵はそれぞれ、全国農業協同組合連盟から購入した。各鶏卵を 38.5℃、湿度 60%、水平回転 45° で、3.75 分間隔で 10 日間転卵培養した（ハンバーガー・ハミルトンの発生段階 36 期 [57]）。個体差を均等にし、胚あたりの細胞数が少ないことを克服するために、各系統で 10 個のニワトリ胚を使用した。ニワトリ 10 日胚の大腿骨を股関節と膝関節で切断し、皮膚を剥がして大腿骨を除去した後、2 mg/mL コラゲナーゼ II (Sigma-Aldrich)、DMEM (Nacalai)、10% FBS (HyClone; GE Healthcare)、1% PS (Nacalai) の混合溶液からなるコラゲナーゼ溶液中で後肢筋を細かく切り刻んだ。37℃で 1 時間培養器内に静置した後、細胞懸濁液を 100 μ m セルストレーナー (Thermo Fisher Scientific) を使用して筋線維を除去した。得られた細胞を、RPMI1640 (Nacalai)、20% FBS、1% NEAA (Wako)、1% CEE (US Biological)、2 ng/mL bFGF (Wako)、および 1% PS からなる増殖培地 (chMB-GM) に懸濁した。コラーゲンコーティングされていない培養皿で 24 時間培養し、脂肪細胞、線維芽細胞、血管細胞などの付着細胞を接着させた。次に、上清中のニワトリ筋芽細胞を、コラーゲンタイプ I-C (Cellmatrix; Nitta Gelatin) でコーティングされた培養皿で培養した。未分化なニワトリ筋芽細胞は chMB-GM で維持した。chMB-GM で維持したニワトリ筋芽細胞を、1 mM EDTA (Wako) を含む 0.25% トリプシンで 37℃で 5 分間処理して細胞を回収した。chMB-GM に懸濁した筋芽細胞をコラーゲンタイプ I-C でコーティングした培養皿またはプレートに適切な細胞数（各実験方法を参照）で播種し、サンプル間の細胞密度を均等にした。細胞を播種してから 24 時間後の筋芽細胞を 0 日目と定義した。筋分化は、DMEM、5% FBS、1% PS から成る分化培地 (chMB-DM) に置換することで誘導した。全ての実験においてニワトリ筋芽細胞は、37℃、5% CO₂で培養した。

2-2-2 初代培養マウス筋芽細胞

4 週齢の C57BL/6J マウスの骨格筋からマウス筋芽細胞を単離し、Ham's F-10 (SIGMA)、20% FBS、2 ng/mL bFGF (Wako)、および 1% PS から成る増殖培地で維持した。5.0 \times 10⁵ 個のマウス筋芽細胞をコラーゲンタイプ I-C でコーティングした 60 mm 培養皿で培養した。筋分化は、DMEM、5% FBS、1% PS から成る DM に置換することで誘導した [33]。

2-2-3 初代培養ヒト筋芽細胞

初代培養された成人の筋芽細胞 (CC-2580; Lonza) を購入し、製造元の指示に

従って培養した。 2.0×10^5 個のヒト筋芽細胞を、コラーゲンタイプ I-C でコーティングした 60 mm 培養皿に播種し、増殖培地で維持した。筋分化は、DMEM、2% HS (HyClone)、1% PS から成る DM に置換することで誘導した [33]。

2-2-4 細胞数計測

コラーゲンタイプ I-C でコーティングした 12 ウェルプレートに 2.5×10^4 個/ウェルでニワトリ筋芽細胞を播種した。筋芽細胞は chMB-GM で培養し、細胞数の計測時に、0.25% トリプシンで 37°C、5 分間処理した。血球計算盤を使用して筋芽細胞の数を数えた。

2-2-5 EdU (5-ethynil-2'-deoxyuridine; 5-エチニル-2'-デオキシウリジン) 染色

1.0×10^5 個のニワトリ筋芽細胞をコラーゲンタイプ I-C でコーティングした 30 mm 培養皿に播種した。24 時間後、EdU を最終濃度 10 μ M で添加し、細胞を 3 時間培養した。EdU 染色は、Click-iT EdU Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) を製造元の指示に従って使用した。DAPI によって細胞核を染色した。EdU 陽性細胞は、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を使用して計測した。EdU 陽性細胞の割合は、EdU で染色された核の数を、DAPI で染色された核の総数で割ったものとして定義した。

2-2-6 細胞の免疫染色

1.0×10^5 個のニワトリ筋芽細胞を 30 mm の培養皿に播種した。翌日、chMB-DM に培地交換し、2 日間培養した。培養細胞は 2% PFA (Nacalai) で固定し、0.2% Triton X-100 (Nacalai) で透過処理を行った。1% ウシ血清アルブミンで 30 分間ブロッキングした後、0.5 μ g/mL マウスモノクローナル抗 MHC 抗体 (MF20; R&D Systems) で免疫染色した。細胞核は DAPI (Nacalai) で染色した。Alexa Fluor 488 結合ロバポリクローナル抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) を二次抗体として使用した。EVOS FL Auto microscope (AMAFD1000; Thermo Fisher Scientific) を使用して、位相差および蛍光画像を撮影した。ImageJ ソフトウェアですべての核数を測定し、そのうちの MHC 陽性の割合を MHC 陽性率、2 個以上の多核の筋管に存在する核の割合を筋管形成率 (fusion index) と定義した。

2-2-7 RNA-seq

ニワトリ筋芽細胞の RNA-seq は、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター平成 29 年度後期共同研究課題「肉用鶏と卵用鶏の骨格筋芽細胞における遺伝子発現の比較解析」(17B-03) として行った。 2.0×10^5 個のニワトリ筋芽細胞をコラーゲンタイプ I-C でコーティングした 60 mm 培養皿に播種し、前述のように筋分化を誘導した。

細胞の全 RNA は、各品種の分化誘導前 (day 0)、分化誘導後 1 日目 (day 1) および 2 日目 (day 2) の筋芽細胞 (各品種 $n=3$ 、計 18 サンプル) から、NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel) を用いて回収した。RNA の純度は Agilent 2100 Bioanalyzer Agilent と RNA 6000 nano kit (Agilent Technologies) を用いて測定した。RNA Integrity Number (RIN) 値はすべてのサンプルで >8.0 だった (Fig. 2-1)。1 μg の全 RNA を、Illumina TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina) を使用して RNA-seq 用のライブラリを調製した。ライブラリの品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer および Agilent DNA 1000 試薬 (Agilent Technologies) を使用して確認した (Fig. 2-2)。RNA-seq は、Illumina HiSeq 2500 で実行し、102 サイクル、シングルリードの条件で各サンプルを解析した。FASTQ 読み取りデータは、bcl2fastq conversion software 2.18 (Illumina) で取得した。読み取りの品質 (Q スコア) は、DNA の塩基配列の品質を表す指標である Phred クオリティスコアによって計算した。低品質の読み取り (Q スコア <36) を削除し、アダプターシーケンスをトリミングした後、処理したデータをリファレンスゲノム (Gallus_gallus-5.0 Assembly; GCA_000002315.4) にマッピングした。CLC Genomics Workbench 9.5.2 (Qiagen) を使用して遺伝子発現を解析し、発現レベルを RPKM 法によって数値化した。最後に FDR を使用して p 値を算出した。RNA-seq の FASTQ リードデータは DDBJ Sequence Read Archive (DRA) に登録した (Accession Number; DRA007964)。RNA-seq のサンプル構成と総リード数、およびマッピングされたリード数とその割合を Table 2-1 に示す。

2-2-8 Volcano plot

Volcano plot は 2 つのサンプル間で異なる発現パターンを示す遺伝子を可視化するために作製した。遺伝子発現の差は、2 を底とする対数 (X 軸) および p 値の負の常用対数 (Y 軸) としてプロットした。

2-2-9 遺伝子オントロジー (GO) analysis

DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) [58] を使用して GO 解析した。生物学的プロセスにおけるオントロジーは、 p 値 <0.05 を基準として、有意に濃縮された遺伝子クラスタとして定義した。

2-2-10 Heatmap generation

ヒートマップは、Heatmapper によって生成した (<http://www.heatmapper.ca/>) [59]。各行は遺伝子を、各列は各サンプル ($n=3$) の平均を表している。緑は発現が高い遺伝子、赤は発現が低い遺伝子を示している。

2-2-11 STRING analysis

遺伝子の機能的および生理学的な相互作用を、STRING version 10.5 (<https://string-db.org/>) [60] を使用して視覚化した。

2-2-12 主成分分析 (PCA)

RNA-seq から得た RPKM 値 (読み取り数>0) を PCA に使用した。18 個のサンプルで発現する合計 13,815 個の遺伝子を次元数削減に使用した。分散共分散行列 (13815×13815 次元) は、18 個のベクトルから計算した。行列を対角化し、固有値とベクトルを取得した。最大の固有値の固有ベクトルへの射影は、PCA の最初の成分 (PC1) に対応した。PCA の 2 番目の成分 (PC2) は、2 番目に大きい固有値の固有ベクトルへ射影した。これらの計算は、Python スクリプトを使用して実行した。

2-2-13 qPCR

RNA-seq に使用したニワトリ筋芽細胞の全 RNA を qPCR に使用した。マウスおよびヒトの筋芽細胞からの全 RNA は、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して抽出した。RNA は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を使用して逆転写した。qPCR では、GoTaq qPCR Master Mix (Promega) と StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用した。各遺伝子の発現量は、ニワトリ *16S* 遺伝子、マウス *Rn18S* 遺伝子、ヒト *YWHAZ* 遺伝子の発現量で正規化し、結果は相対値として示した。qPCR に用いたプライマー配列を Table 2-2 に示す。

2-2-14 エンケファリン

MENK (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) (Peptide Institute) と LENK (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (Wako) を PBS に溶解し、実験に使用した。エンケファリンを用いた細胞実験では陰性対照群としてエンケファリンを含まない PBS を投与して実験を行った。

2-2-15 統計解析

各実験結果は平均±標準誤差で示した。対応のない独立した 2 群の検定には Student's *t* test、3 つ以上のグループ間の統計的差異は、一元配置分散分析 (ANOVA) を行ったのち、Williams' test または、Scheffe's *F* test によって評価した。有意水準は *p* 値<0.05 に設定した。

2-3 結果

2-3-1 WL と UKC 筋芽細胞における増殖と筋分化能の違い

WL と UKC の筋芽細胞の増殖・分化能を細胞レベルで詳細に比較解析した。まず、増殖培地中での WL と UKC の筋芽細胞の数を経時的に計測した (Fig. 2-3-A)。培養 48 時間後には UKC 筋芽細胞数は WL の 1.4 倍に達し、引き続き 72 時間後、96 時間後においても UKC 筋芽細胞数は WL を有意に上回っていた。このことから WL と比較して UKC 筋芽細胞の増殖が速いことがわかった。さらに、EdU のゲノム DNA への取り込みを指標に、細胞分裂の頻度を評価した (Fig. 2-3-B, C)。EdU 添加 3 時間後では、分裂中の細胞の割合を示す EdU 陽性率は UKC 筋芽細胞で 49% であり、WL の 35% を有意に上回っていた。細胞数の計測の結果と合わせて、UKC 筋芽細胞の増殖は速いことが明らかになった。

次に筋芽細胞の分化能を調べた。分化培地で筋芽細胞を分化誘導し、24 時間ごとに骨格筋の最終分化マーカーである MHC を免疫染色した (Fig. 2-3-D)。その結果、MHC 陽性率 (図中; MHC⁺ cells) は 1 日目および 2 日目で WL に比べて UKC 筋芽細胞で有意に高くなった (Fig. 2-3-E)。また、筋管の形成率 (図中; Fusion index) も同様に、UKC で有意に高くなっていた (Fig. 2-3-F)。このことから WL と比較して UKC 筋芽細胞は高い筋分化能を示すことがわかった。

2-3-2 WL と UKC 筋芽細胞で発現が異なる遺伝子群の解析

WL および UKC 筋芽細胞は独立して 3 回筋分化を誘導した。筋芽細胞を分化誘導後 0、1、および 2 日目の細胞の全 RNA を抽出し、RNA-seq に供した。得られたリードからアダプター配列をトリミング処理した。平均して 2,330 万のリードが取得され、そのうち約 2,260 万のリード (97.2%) がニワトリファレンスゲノム (Gallus_gallus-5.0) にマッピングされた (Table 2-1)。全サンプルを通じて、46,389 個の転写産物から合計 26,640 個の遺伝子の発現を確認した。遺伝子発現レベルは、リードカウントに対して、100 万リードあたりの正規化と、1 kb あたりの正規化を適用した値 (RPKM) を使用して、正規化した。偽発見率 (FDR) < 0.05、*p* 値 < 0.05、かつ fold-change \geq 2.0 の遺伝子を DEG として定義した。まず、分化段階ごとに WL と UKC 筋芽細胞を比較した解析では、合計 1,032 DEGs が同定された (Fig. 2-4-A)。そのうち 336 DEGs が 0 日目から 2 日目までの筋分化を通して常に発現量が異なっていた。これらの 336 DEGs は、WL と UKC 筋芽細胞の品種間の違いをよく反映すると考えられる。GO 解析の結果、336 DEGs には、コラーゲン、チャネル、受容体、リガンドなどの細胞外、または細胞表面に存在するタンパク質が多く含まれていた (Table 2-3)。これらのタンパク質は、筋芽細胞の特性を反映している可能性があり、ニワトリの筋発達を予測するための細胞マーカーとして役立つ可能性がある。Volcano plot から、これら遺

伝子群の発現は品種間で大きく異なることがわかった (Fig. 2-4-D)。

次に、各品種において分化に伴う DEGs (fold-change \geq 2.0, $p<0.05$) を抽出した (Fig. 2-4-E)。WL 筋芽細胞の分化においては合計 1,933 個 (Fig. 2-4-B)、UKC 筋芽細胞の分化においては合計 1,754 遺伝子 (Fig. 2-4-C) の発現が有意に変化した。Volcano plot から、これらの遺伝子群の発現変化は 24 時間以内では比較的小さく、発現レベルが大きく変化するには少なくとも 48 時間を必要とすることがわかった (Fig. 2-4-E)。

2-3-3 ニワトリ筋芽細胞の分化中に発現が変動する 840 遺伝子の解析

WL または UKC 筋芽細胞の分化過程で発現が変動する 840 DEGs (fold-change \geq 4.0, $p<0.05$) を抽出し、ヒートマップを作製した (Fig. 2-5-A)。緑は発現が高い遺伝子を、赤は発現が低い遺伝子を示している。階層的クラスタリングにより、840 DEGs は 4 つのサブクラスに分類された。未分化な WL で発現が高い WG (WL growth) 群、未分化な UKC で発現が高い UG (UKC growth) 群、分化後の WL で発現が高い WD (WL differentiation) 群、分化後の UKC で発現が高い UD (UKC differentiation) 群である。特徴的な変動パターンを示すこれら 4 つの遺伝子クラスタについて GO 解析をした (Table 2-4)。各群における GO 解析では、840 DEGs 内で細胞周期調節や筋肉形成に関わる複数の遺伝子クラスタが有意に形成された (Fig. 2-5-B)。UG 群 (117 遺伝子) の解析では、細胞分裂に関わるクラスタが有意に検出された。また、UD 群 (393 遺伝子) には、アクチンやミオシンなどの筋タンパク質が多数含まれていた。一方、WG 群 (45 遺伝子) と WD 群 (270 遺伝子) には機能的なクラスタを認めなかった。各群に含まれる遺伝子と、それら遺伝子から翻訳されるタンパク質の相互作用について、STRING データベースを使用して視覚化した (Fig. 2-6)。UG 群および UD 群内の遺伝子は互いに緊密に相互作用するが、WG 群と WD 群内の遺伝子間では相互作用がほとんど見られなかった。これらの解析から、UG 群と UD 群に含まれる遺伝子クラスタは、活発な増殖と分化を示す UKC 筋芽細胞の特徴とよく一致していることが示された。

2-3-4 主成分分析 (PCA) による肉用鶏の形質マーカー遺伝子の探索

GO 解析ではデータベースからオントロジー情報を収集することで、遺伝子クラスタに特徴づけをするため、GO 解析でアノテーションが付与されない未知の遺伝子は考慮されない。このため GO 解析で得られる結果は、よく研究された発現量が多い遺伝子クラスタの影響を強く反映し、偏った解釈をもたらす可能性がある。そこで、筋芽細胞の性質に寄与する遺伝子をデータベースに依存しない方法で探索するため、13,815 遺伝子を対象に主成分分析を行った (Fig. 2-7-A)。主成分分析によって定義された第 1 主成分 (PC1, 寄与率=0.73) は、WL および UKC 筋芽細胞の分化

段階に対応していた。第 2 主成分 (PC2, 寄与率=0.10) は、品種間差を明確に表していた。PC1 と PC2 に対して因子負荷率の高い遺伝子をそれぞれ抽出した (Fig. 2-7-B, C)。この遺伝子リストの中には、336/840 DEGs のいずれかに含まれる遺伝子が 13 個あった (Table 2-5)。これらの遺伝子は筋芽細胞の性質への関与が推測される。抽出した 13 遺伝子には、細胞周期関連遺伝子 (*CDKN2B*) や筋線維を構成する遺伝子 (*ACTC1*, *MHY15*, *TNNI1*, *TNNI2*, *TNNT2*) が含まれていた。加えて、サイトカインやペプチド、ホルモンをコードする遺伝子 (*CCK*, *CXCL14*, *MDK*, *PENK*) など 7 つの遺伝子が得られた。これらのサイトカインやペプチドと、筋芽細胞の分化の関係についてはこれまでに報告はない。そこで、これらの遺伝子について、RPKM 値を用いて、筋分化中の発現パターンを確認した (Fig. 2-7-D-J)。これら 13 遺伝子の発現パターンには一貫性がなく、それぞれのサイトカインやペプチドは独立して筋芽細胞の増殖と分化に影響することが示唆された。筋芽細胞の増殖と分化に関わる PC1 と、分化で発現が変動する 840 DEGs の両方に含まれる遺伝子は、筋芽細胞の性質の根幹に影響することが考えられる。そこで本研究では、鳥類だけでなく哺乳類の骨格筋形成や筋芽細胞における機能が不明であり、PC1 と 840 DEGs の両方に含まれる *PENK* 遺伝子に着目した。

2-3-5 エンケファリンが筋芽細胞に与える影響の解析

PENK はプロエンケファリン (proenkephalin) をコードする遺伝子である。*PENK* 遺伝子から翻訳された前駆体タンパクがプロセッシングを受けてエンケファリンが生成される。エンケファリンは 5 つのアミノ酸からなるペプチド (Tyr-Gly-Gly-Phe-XX) であり、C 末端がメチオニンの MENK (Met-enkephalin) と、C 末端がロイシンの LENK (Leu-enkephalin) の 2 種類が産生される [61]。

RNA-seq と qPCR による遺伝子発現解析では、補正法の違いによって異なる解釈を招くことがある。RNA-seq から得られたデータと実際の遺伝子発現量との関係を調べるため、ニワトリ *PENK* 遺伝子の発現レベルを、qPCR によって再確認した (Fig. 2-8-A)。RNA-seq と qPCR によって得られた *PENK* 遺伝子の発現パターンは強く相関していた ($R^2=0.623$) (Fig. 2-8-B)。このことから、RNA-seq の解析結果は、筋芽細胞における *PENK* 遺伝子の発現を正確に観測できていると言える。*PENK* の発現は 0 日目で最も高く、分化に伴って減少することが分かった。WL と UKC 筋芽細胞の間で *PENK* の発現量に有意差はなかった。これまでに、ラット L6 筋芽細胞株が *Penk* mRNA を発現することが報告されているが [62]、哺乳類の初代培養筋芽細胞がニワトリのように筋分化を通じて *PENK* 遺伝子を発現するかどうかは報告されていなかった。そこで、マウスとヒト筋芽細胞における *PENK* 遺伝子発現を確認した (Fig. 2-8-C, D)。その結果、鳥類と哺乳類の筋芽細胞が共通して *PENK* 遺伝子を発現していることがわかった。また、いずれの筋芽細胞においても *PENK* mRNA の発現は分化に伴

って減少していた。

次に、MENKとLENKが増殖中の筋芽細胞に与える影響を調べるため、1 μ MのエンケファリンをchMB-GM中に投与し、経時的に細胞数を計測した (Fig. 2-8-E)。培養 72 時間後の細胞数は、対照群と比較してエンケファリン投与群で有意に減少した。次に、分化におけるエンケファリンの効果を調べた (Fig. 2-8-F-H)。chMB-DM中にエンケファリンを投与し、48時間後にMHC染色をした (Fig. 2-8-F)。その結果、対照群とエンケファリン投与群の間に、MHC陽性率や筋管形成率の変化は見られなかった (Fig. 2-8-G, H)。このことからMENKおよびLENKは筋芽細胞の増殖を抑制するが、筋分化には影響を与えないことが示唆された。

2-4 考察

本研究では、WL と UKC 筋芽細胞で、細胞増殖や分化に違いがあることを見出した。WL に比べ UKC 筋芽細胞は活発に増殖するとともに、分化誘導時には MHC 陽性の筋細胞に速やかに分化した。これら UKC 筋芽細胞の性質は、成長が速く、発達した骨格筋を有する肉用鶏の表現型をよく反映していると考えられる。オントロジー解析によって得られた細胞周期関連遺伝子群の中には、細胞増殖に関する遺伝子に加え、細胞周期の停止に寄与する遺伝子も含まれていた。このことは、肉用鶏筋芽細胞は増殖期には活発に細胞周期を進める一方、筋形成時には速やかに細胞周期を離脱して筋分化に移行する機構が備わっていることを示唆している。

これまでに報告された遺伝子発現解析では、孵化後の骨格筋組織が試料として用いられていた [23-25]。骨格筋組織は筋細胞以外にも血管内皮細胞や脂肪細胞、線維芽細胞が存在している。そのため、これらの研究で行われた解析には筋細胞以外の細胞が発現する mRNA を含んでいる可能性が高い。Richard らの研究 [23] において発現量が変化した遺伝子の GO 解析では、筋分化に関わる遺伝子群は抽出されなかった (Table 2-6)。また、肉用鶏と卵肉兼用鶏の胸筋組織の遺伝子発現を比較した Kong らの報告において、最も差次的に発現する遺伝子の中に、脂肪滴の蓄積に関わるペリリピンや脂肪分化に関わる遺伝子である *FABP4* が含まれていた [24]。これらの結果は、骨格筋以外の細胞を含んだ解析であることを示唆している。本研究と先行研究で抽出された遺伝子群を比較しても、筋関連遺伝子を除き、骨格筋における機能未知遺伝子の重複はなかった。これらのことから、本研究で同定された遺伝子群は筋芽細胞の性質を純粋に反映したものだと考えられる。

RNA-seq によって肉用鶏筋芽細胞で特徴的に発現する遺伝子群の探索を行った。WL と UKC を比較すると、全遺伝子中 3.9% の遺伝子に発現量の違いを認めた。未分化な筋芽細胞 (day 0) から分化した筋管 (day 2) になるまでの間、常に発現が異なる 336 遺伝子を見出した。この 336 DEGs はニワトリ品種間の差異をよく反映することが考えられる。336 DEGs について GO 解析を行った結果、細胞外基質や細胞膜の構成成分といった機能的クラスターが有意に検出された。細胞膜を構成し、細胞外に露出しているタンパク質の違いは、増殖因子をはじめとするリガンドの感受性や細胞の遊走に関わることが予測される。ニワトリの筋線維数は、胚形成の間に決定されることから [32]、胚発生初期の遺伝子発現が、筋組織の大きさに関与していることが推察される。これらの報告から、細胞表面タンパク質の発現の差異が筋芽細胞の増殖や分化に影響している可能性が考えられる。

336 DEGs の中には、コラーゲンをコードする複数の遺伝子 (*COL2A1*, *COL6A3*, *COL9A2*, *COL11A1*, *COL14A1*, *COL16A1*, *COL21A1*, および *LOC426344*) が含まれていた。筋芽細胞は、基底膜と筋鞘の間に存在する衛星細胞に由来する前駆

細胞である。最近の研究で、細胞外マトリクスや分泌された成長因子などの微小環境が、衛星細胞の維持に重要であることが報告されている [63]。例えば、マウスの衛星細胞が発現するコラーゲンが、衛星細胞の休止期を制御していることが報告されている [64]。WLとUKC筋芽細胞で発現パターンの異なるこれらのコラーゲン遺伝子は、衛星細胞の微小環境の構築に寄与している可能性が考えられる。

BMP (bone morphogenetic protein) や *BMPER* (bone morphogenetic protein-binding endothelial regulator protein)、*GREM2* (DAN family BMP antagonist) といった BMP シグナルに関連する遺伝子の発現は、WL と比較して、UKC 筋芽細胞で高かった。*BMPER* は *BMP2*、*BMP4* および *BMP6* と相互作用して BMP シグナルを阻害することが知られている [65]。また、*GREM2* は *BMP2/4* のアンタゴニストであり、BMP シグナルを阻害することによりヒト多能性幹細胞の心筋分化を誘導することが報告されている [66]。筋芽細胞における *BMPER* および *GREM2* の発現に関する報告はないが、*BMP2/4/7* は筋芽細胞分化を阻害することがわかっている [67-69]。UKC 筋芽細胞で高い発現レベルを示す *BMPER* および *GREM2* は、UKC において BMP シグナルを阻害し、筋形成を促進している可能性が考えられる。

WL および UKC 筋芽細胞の day 0 から day 2 で発現が変化する遺伝子 840 個を見出した。未分化状態で UKC において発現が高い UG 群に分類される遺伝子では細胞周期や細胞分裂に関わる GO が有意に検出された。分化で UKC において発現が高い UD 群には、筋形成に関わる GO が有意に検出された。このことから 840 DEGs は WL と UKC の増殖から分化にかけての遺伝子発現の変化をよく反映していると考えられる。840 個の遺伝子で有意なクラスターを形成していない遺伝子の中にはマイオカインとして知られる *IL-7*、*IL-8* (*IL8L1*, *IL8L2*), *IL-15* が含まれていた。*IL-7* は筋肥大に関わることを報告されている [70]。*IL-8* は骨格筋における血管新生を誘導することが報告されている [71]。*IL-15* は筋肥大以外にも糖代謝や脂質代謝に関与するといわれている [72-74]。RNA-seq データでは、これらのマイオカインの発現量は分化に伴って増加する傾向にあった (Fig. 2-9)。培養 2 日目において、*IL-15* の発現は肉用鶏で有意に高かった。*IL8L2* は *IL-7* や *IL8L1* よりも RPKM 値が高いことが分かった。筋芽細胞から放出されたこれらのマイオカインが自己分泌あるいは傍分泌的に筋芽細胞の分化に作用している可能性が考えられる。

336 DEGs や 840 DEGs の性質についてはデータベースを用いて解析しており、データベース上に登録のない遺伝子群は抽出されない。RNA-seq から得られたデータライブラリを数学的に縮約することで未知遺伝子の同定につながると考え、主成分分析をした。主成分分析の結果、第 1 主成分においては筋分化、第 2 主成分においては品種による差異が、それぞれ関連していることが示唆された。これらの主成分とバイオインフォマティクスにより抽出した 336 DEGs および 840 DEGs とを比較し、筋芽

細胞の性質を特徴づけ得る 13 遺伝子を同定した。この 13 遺伝子の中には、細胞周期関連因子 (*CDKN2B*) や筋線維を構成する遺伝子 (*ACTC1*, *MYH15*, *TNNI1*, *TNNI2* および *TNNT2*) が含まれていた。また、4 つのペプチドやサイトカイン (*CCK*, *CXCL14*, *MDK*, および *PENK*) とその他 3 つの遺伝子 (*CSRP2*, *MFAP5*, および *UCHL1*) が抽出された。これらの 13 遺伝子は品種間、または筋芽細胞の増殖と分化に関与すると考えられる。

コレシストキニン (*CCK*) は強力な膵酵素分泌刺激作用と胆嚢収縮作用を有し、セクレチンやガストリンなどに代表される古典的な消化管ホルモンの一種として知られている。近年、*CCK* の分子量多様性 (*CCK4*, *CCK8*, *CCK33*, *CCK39*, *CCK58*) が明らかにされ、消化管ホルモンとしてのみではなく、中枢神経系における神経伝達物質としても注目されている。しかし、*CCK* が筋芽細胞で発現しているという報告はない。ラットへの *CCK* の投与は、骨格筋における AMP キナーゼ (*AMPK*) のリン酸化を増加させることが報告されている [75]。また、マウス筋芽細胞では、*AMPK* のリン酸化は G₁/S 細胞周期の移行を減少させること、筋管形成を阻害し、PGC-1 α の発現を亢進することによって筋管の萎縮を引き起こすことが知られている [76]。ニワトリ筋芽細胞において *CCK* の発現は、UKC 筋芽細胞と比較して、day 0 の WL 筋芽細胞において高い (Fig. 2-7-D)。これらのことから、WL 筋芽細胞で高発現する *CCK* は、細胞増殖や筋分化を抑制していることが考えられる。

CXCL14 (C-X-C motif chemokine ligand 14) は、筋肉を含む様々なヒト組織において発現しているサイトカインである [77]。最近の研究で、*CXCL14* がマウス筋芽細胞の細胞周期を活性化することで筋分化を抑制することが示された [78]。RNA-seq によって、*CXCL14* の発現レベルが、WL 筋芽細胞よりも UKC において 10 倍以上高いことがわかった (Fig. 2-7-E)。このことは、UKC 筋芽細胞が活発な増殖を示す理由の一つであると考えられる。

ミッドカイン (*MDK*) はヘパリン結合性の増殖因子で、細胞の増殖、生存、移動を促進するなどの多彩な活性を持っている。これまでの研究で、ラットの筋再生の初期段階で筋芽細胞および筋管で *MDK* が発現していることが知られている [79]。また、免疫細胞において *MDK* は走化性タンパク質として働き [80]、*Mdk*^{-/-} マウスではマクロファージ浸潤の減少に起因する筋再生の遅延を示すことが報告されている [81]。*MDK* の発現は、WL と比較して、UKC 筋芽細胞で有意に高かった (Fig. 2-7-F)。最近の研究では、肉用鶏の胸筋におけるマクロファージおよびリンパ球の浸潤を伴う、急性・慢性の炎症性病変が報告されている [82]。UKC 筋芽細胞で高発現する *MDK* は、肉用鶏の筋組織で観察される炎症に関与しているかもしれない。

CSRP2 (cysteine and glycine-rich protein 2) は、亜鉛結合性でシステイン残基を多く含むモチーフである LIM ドメインを持つタンパク質である。これまでの研究で、*CSRP3* は筋芽細胞分化を促進し [83]、*CSRP2* は平滑筋分化に関与すること [84]

が報告されているが、筋芽細胞における CSRP2 の機能は未知である。*Csrp2*^{-/-} マウスは、心筋細胞の超微細構造においてわずかな表現型を示すが、骨格筋において有意な変化を示さないことが分かっている [85]。しかし、CSRP1 あるいは CSRP3 が、CSRP2 の機能を補っている可能性は否定されていない。*CSRP2* の発現は、WL および UKC 筋芽細胞の両方において分化中に増加する傾向があった (Fig. 2-7-H)。ニワトリ筋芽細胞における CSRP2 の役割について、今後の研究で調べていく必要がある。

MFAP5 (microfibril associated protein 5) は、細胞外マトリックスのミクロフィブリル構成成分で、miR-29 の標的となる。マウス筋芽細胞における miR-29 の発現低下は、MFAP5 の増加に伴う筋線維芽細胞への分化転換を促進する [86]。*MFAP5* の発現は、UKC 筋芽細胞と比較して、筋分化中の WL において有意に高かった (Fig. 2-7-I)。*MFAP5* の発現は、筋管形成を損なう可能性が考えられる。

UCHL1 (ubiquitin C-terminal hydrolase L1) は、ニューロン細胞質タンパク質 9.5 (neuron cytoplasmic protein 9.5)、PGP9.5、PARK5 等の別名でも知られるタンパク質である。*UCHL1* は神経マーカーとして著名な遺伝子であるが、骨格筋においても発現が見られる。*Uchl1*^{-/-} マウスは、神経筋接合部の機能不全による進行性の麻痺を示し、早期に死亡する [87]。C2C12 (マウス筋芽細胞株) において、*UCHL1* の発現は筋分化の間に抑制されることが知られている。また、*Uchl1* のノックダウンは増殖を抑制し、筋管形成を誘導することが報告されている [88]。*UCHL1* の発現は、WL および UKC 筋芽細胞の分化中に 10 倍以上増加した (Fig. 2-7-J)。マウスとニワトリ筋芽細胞の分化において異なる発現パターンを示すことから、*UCHL1* の転写調節および機能は、哺乳類と鳥類で異なる可能性が考えられる。

本研究では、オピオイドペプチドであるエンケファリンに着目し、エンケファリンが筋芽細胞の増殖と分化に与える影響を解析した。オピオイドとは、中枢神経や末梢神経に存在する特異的受容体 (オピオイド受容体) への結合を介してモルヒネに類似した作用を示す物質の総称である。プロエンケファリン (PENK) から産生されるエンケファリンは、内在性オピオイドペプチドの一種である。5 つのアミノ酸からなるペプチドであり、C 末端のアミノ酸がメチオニンの MENK と、ロイシンの LENK の 2 種類が存在する。骨格筋におけるエンケファリンの機能に関する報告がなかったため、本研究では、*PENK* の発現とその機能に注目した。*PENK* は、胚発生時および出生後の発達の間にラット骨格筋で発現するが、成体筋肉では消失することが報告されている [89, 90]。また、ラット L6 筋芽細胞株は *Penk* mRNA を発現することが知られている [62]。今回筆者は、筋分化中のニワトリ筋芽細胞で、*PENK* の発現が低下することを確認した。また、筋芽細胞の分化過程における *PENK* 遺伝子の発現パターンが鳥類と哺乳類で共通していることを明らかにした。*PENK* 由来のペプチドである MENK および LENK は、オピオイド受容体を介してオピオイドペプチドとして働くことが報告されてい

る [91, 92]。しかし、WL および UKC 筋芽細胞において、オピオイド受容体 μ (*OPRM1*)、 δ (*OPRD1*)、 κ (*OPRK1*)、およびオピオイド関連ノシセプチン受容体 1 (*OPRL1*) の発現は検出されなかった。一方、オピオイド増殖因子受容体 (*OGFR*) 遺伝子 (*OGFR*) およびそのホモログ (*OGFRL1*) は、ニワトリ筋芽細胞で発現していた (Fig. 2-10)。OGFR は、通常のオピオイド受容体とは構造や機能も異なり、核周囲に局在している受容体である。オピオイドペプチドは、発生、癌成長および血管新生などの様々な細胞プロセスにおいて OGFR を介して成長調節因子として作用することが知られている [93]。また、MENK および LENK が B16-BL6 メラノーマの増殖を阻害することが報告されている [94]。この他にも、MENK が神経芽細胞腫 [95] および神経細胞 [96] の負の成長調節因子であることが報告されている。これらの知見は、筋芽細胞由来のエンケファリンがオピオイド増殖因子である可能性を示唆している。本研究では、MENK および LENK が筋分化に影響を与えずに、ニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制することを示した。これらのことから、エンケファリンは筋芽細胞の増殖に対する負の調節因子である可能性が考えられる。また、鳥類だけでなく哺乳類においてもエンケファリンが筋芽細胞の増殖に影響を与える可能性が示唆された。

本研究で、エンケファリンがオピオイド増殖因子受容体に作用することで、筋芽細胞の増殖を抑制することが示唆された。この結果は、骨格筋芽細胞にオピオイドが直接作用し、骨格筋量の減少を誘導する可能性を示唆している。ヒトゲノム中には、内因性オピオイドペプチドをコードしている 3 つの相同遺伝子がある。ヒトプロオピオメラノコルチン (*POMC*) 遺伝子は、 β -エンドルフィンや γ -エンドルフィンといった内因性のオピオイドペプチドをコードしている [97, 98]。プロダイノルフィン (*PDYN*) 遺伝子は、ダイノルフィンをコードする遺伝子である [99]。PDYN mRNA から翻訳された前駆体タンパク質は翻訳後にプロセッシングを受けて、ダイノルフィンやネオエンドルフィンを生成する。PENK 遺伝子から生成されるアドレノルフィン、C 末端アミド化オピオイドオクタペプチドであり、哺乳類の脳に広く分布していることが報告されている [100-102]。これら 3 つ相同遺伝子から生成されるオピオイド以外にも、PROL1 タンパク質の N 末端領域から生成されるオピオルフィンが同定されている [103, 104]。いずれのオピオイドペプチドも骨格筋芽細胞に作用するという報告はない。数アミノ酸からなるオピオイドペプチドは非常に短いために、偶然に内因性オピオイドペプチドと類似の作用を示すペプチドが食品等に含有されることがある [105]。これまでに、OPRM1 に対して親和性の強いオピオイド様化合物であるモルヒネの継続投与が、筋量を減らすことが報告されている [106]。これらの報告から、偶発的に生成されたオピオイドが継続的に骨格筋を刺激することで、骨格筋量の減少を誘導する可能性が考えられる。例えばニワトリでは、飼料等に含まれるオピオイドが骨格筋芽細胞に作用し、肉用鶏の骨格筋形成に影響を与える可能性が考えられる。ニワトリ筋芽細胞の RNA-seq によって、POMC mRNA や PDYN mRNA が発現していることがわかった (Fig. 2-10)。これら

のオピオイドペプチドが骨格筋に与える影響を調べることは筋芽細胞の増殖・分化に関わる新たな分子基盤の理解につながるかもしれない。

本研究では、ニワトリ筋芽細胞における遺伝子発現の網羅的な定量と、バイオインフォマティクスから、卵用鶏と肉用鶏筋芽細胞では細胞表面タンパクの発現が異なることを明らかにした。また、オントロジー解析と計量統計学的手法によって筋芽細胞の性質に寄与すると予測される 13 遺伝子を同定した。これら候補因子の役割の解明は、筋芽細胞による筋形成メカニズムの理解を進め、食肉生産に資する新たな知見に結び付くと期待される。本研究ではその一例として、ニワトリ筋芽細胞がエンケファリンを発現すること、エンケファリンはニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制するが筋分化には影響しないことを明らかにした。エンケファリンを含むオピオイドペプチドは、様々な食品に含まれることが知られている。本研究の結果から、飼料中に含まれるオピオイドが家畜の筋形成に及ぼす影響など、新たな研究課題が提示された。

Table 2-1; RNA-seqサンプルの構成とリード数およびマッピング率

Sample	No. of input reads	No. of mapped reads	% mapped
UKC P04 day 0	21,812,633	21,148,264	97.0%
UKC P04 day 1	22,489,004	21,835,912	97.1%
UKC P04 day 2	24,764,717	24,103,965	97.3%
UKC P05 day 0	21,189,864	20,571,250	97.1%
UKC P05 day 1	22,606,963	21,975,686	97.2%
UKC P05 day 2	25,375,970	24,697,715	97.3%
UKC P07 day 0	23,073,691	22,380,689	97.0%
UKC P07 day 1	22,275,274	21,667,048	97.3%
UKC P07 day 2	24,544,406	23,885,619	97.3%
WL P08 day 0	24,636,499	23,929,133	97.1%
WL P08 day 1	22,279,784	21,709,664	97.4%
WL P08 day 2	21,924,068	21,378,021	97.5%
WL P09 day 0	23,197,326	22,560,790	97.3%
WL P09 day 1	22,870,723	22,246,047	97.3%
WL P09 day 2	24,432,387	23,831,100	97.5%
WL P10 day 0	24,958,361	24,198,953	97.0%
WL P10 day 1	22,996,430	22,362,891	97.2%
WL P10 day 2	23,271,079	22,694,664	97.5%

Table 2-2; 本章で使したプライマー配列

Gene	Sequence	bp	Reference
<i>CCK</i> (chicken)	CTCGGGGAAGGAAGGAAG CTGTCAGGCTCTGCTGGAG	151	本研究で作成
<i>CSRP2</i> (chicken)	CTATGGTCAGGGAGCAGGAG TGGCCCAAACACTACAGTCA	151	本研究で作成
<i>CXCL14</i> (chicken)	GTGACCCTGTGGACGAAAGT ATCTTCTGCAGAGCCCAGTC	192	本研究で作成
<i>MDK</i> (chicken)	AGAGCAGGAAGCTCAAATGC ACCACCTCCTCACATTTCAGC	169	本研究で作成
<i>MFAP5</i> (chicken)	TCTCCCTTGCAAACAGATCC ATTGCAACCACCATGACAGA	245	本研究で作成
<i>PENK</i> (chicken)	GCCCAGAACTGGAAGATGAA TCTCTGGGACCTCTTTGGAA	186	本研究で作成
<i>UCHL</i> (chicken)	GGGATCTGCCCTGAAGAAAT TTGTGCCATGGTTTACAGGA	236	本研究で作成
<i>16S</i> (chicken)	ACCTATTTGACTCCCTCAACCA AAGTTTACGCCGTAGGAGGATAGGTT	102	[128]
<i>Penk</i> (mouse)	CAGGCGACATCAATTTCTCTG TCATCCTGTTTGCTGCTGTC	157	本研究で作成
<i>Rn18s</i> (mouse)	CGCACGGCCGGTACAGTGAAACTG CACCCGTGGTCACCATGGTAGGCA	344	[129]
<i>PENK</i> (human)	CATCCTCCAGTGGGAAACTG CCAAAAAGAGCACAGAACCTG	128	本研究で作成
<i>YWHAZ</i> (human)	CAAGCATACCAAGAAGCATTTGA GGGCCAGACCCAGTCTGA	76	[130]

Table 2-3; 336DEGsのGO解析

GO	<i>p</i> -value	Gene
Proteinaceous extracellular matrix	7.1E-06	<i>NOV, HAPLN1, COL9A2, COL14A1, CRISPLD2, SMOC1, LUM, ELN, COL6A3, FBN3, ECM2, COL16A1, SLIT3</i>
Extracellular matrix	3.4E-05	<i>COL14A1, COL21A1, COMP, F3, MMP27, MMP17, FBN3, TGM4, AGRN, FBN2</i>
Extracellular region	7.7E-05	<i>FGF19, BGLAP, CCK, ENPP2, C1R, ESM1, PTGFR, ADCYAP1, NOV, PGR, DNASE1, DKK3, BMPER, CXCL14, AGRN, NRG1, CD200R1</i>
Extracellular space	3.6E-04	<i>ENPP2, PDGFA, LUM, FAM132A, LRRC4C, NRN1, GREM2, ABI3BP, C1QTNF5, COMP, COL6A3, SERPINB10, PTN, NRG1, LOC422654, ECM2, SLIT3, PTHLH, GKN2, BMPER, COL14A1, F3, SEMA4D, IL12B, LIPC</i>
Axon	2.7E-03	<i>ALCAM, PTPRK, CCK, PVALB, STMN2, CHRNA7, AGRN, GAP43</i>
Neuron projection	3.4E-03	<i>STMN2, TENM2, MAP2, AGRN, GHSR, GAP43, TPH2, ADCYAP1</i>
Integral component of plasma membrane	1.0E-02	<i>SLC8A3, LPPR1, FLT4, TRPV3, PTGFR, APCDD1, KDR, ALCAM, SEMA6A, THBD, SLC24A4, SLC6A7, SLC24A2, TENM2, ADRA1B, CLDN1, TBXA2R, SEMA4D, NRG1, FAM26F</i>
Collagen trimer	2.7E-02	<i>COL9A2, C1QTNF5, COL14A1, COL6A3</i>
Cell surface	3.9E-02	<i>PTPRK, THBD, CAPN5, CLSTN2, PDGFA, F3, BF2, ITGB5, GHSR, MDK</i>

Table 2-4; UG群とUD群にアノテーションされたオントロジーのリスト

Group	Ontology	<i>p</i> -value
UG	Cell cycle process	1.2.E-04
	Cell cycle	7.7.E-04
	Chromosome organization	5.9.E-03
	Mitotic nuclear division	6.4.E-03
	Organelle organization	7.2.E-03
	Mitotic cell cycle	1.3.E-02
	Cell division	1.3.E-02
	Single-organism organelle organization	1.4.E-02
	DNA conformation change	1.6.E-02
	DNA integrity checkpoint	2.0.E-02
	Cellular response to DNA damage stimulus	4.7.E-02
UD	Muscle contraction	1.2.E-04
	Regulation of muscle contraction	1.6.E-03
	Regulation of system process	1.6.E-03
	Striated muscle contraction	2.4.E-03
	Regulation of multicellular organismal process	1.4.E-02

Table 2-5; 13候補遺伝子のリスト

Category	Gene	Product	Involved in	
Cell cycle	<i>CDKN2B</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)	PC2	336 DEGs
Muscle	<i>ACTC1</i>	Cardiac muscle actin, alpha	PC1, PC2	840 DEGs
	<i>MYH15</i>	Myosin heavy chain 15	PC1,	840 DEGs
	<i>TNNI1</i>	Troponin I1	PC1	840 DEGs
	<i>TNNI2</i>	Troponin I2	PC1	840 DEGs
	<i>TNNT2</i>	Troponin T2	PC1, PC2	840 DEGs
Peptide, cytokine	<i>CCK</i>	Cholecystokinin	PC1, PC2	336 DEGs
	<i>CXCL14</i>	C-X-C motif chemokine ligand 14	PC2	336 DEGs
	<i>MDK</i>	Midkine	PC2	336 DEGs
	<i>PENK</i>	Proenkephalin	PC1	840 DEGs
Others	<i>CSRP2</i>	Cysteine and glycine-rich protein 2	PC2	840 DEGs
	<i>MFAP5</i>	Microfibril associated protein 5	PC2	336 DEGs
	<i>UCHL1</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	PC1	840 DEGs

Table 2-6; 孵化6日目のニワトリ骨格筋組織を用いたRNA-seqにおいて発現が変化した遺伝子のGO解析 [23]

GO	Count	p-value	Genes
Mitosis	8	2.08E-04	<i>CCNB2, INCENP, NUF2, CDK1, NUSAP1, NDC80, NCAPH, SMC2</i>
Cell division	9	2.15E-04	<i>CCNB3, CCNB2, INCENP, NUF2, CDK1, NUSAP1, NDC80, NCAPH, SMC2</i>
Nucleotide-binding	38	2.17E-04	<i>TOP2A, HSP90AB1, RRAD, MCM9, ATP2A2, KIF11, AURKA, KIF15, SMC2, CKMT2, SEPT9, CKB, PRKG1, WARS, CAMK1D, PLK1, MYH1C, KIF24, KIF23, MYH1B, MYO16, EEF1A1, TUBB2B, MRAS, MELK, RAD51, STK17A, UBE2T, ARL8BL, KIF4A, CDK2, CDK1, MCM3, SUCLG2, PRKCQ, KIF20A, MCM6, MCM2</i>
ATP-binding	31	5.05E-04	<i>TOP2A, HSP90AB1, MCM9, ATP2A2, KIF11, AURKA, KIF15, SMC2, CKMT2, CKB, PRKG1, WARS, CAMK1D, PLK1, MYH1C, KIF24, KIF23, MYH1B, MYO16, MELK, RAD51, STK17A, UBE2T, KIF4A, CDK2, CDK1, MCM3, PRKCQ, KIF20A, MCM6, MCM2</i>
Cell cycle	10	7.44E-04	<i>CCNB3, CCNB2, INCENP, NUF2, CDK1, NUSAP1, MCM3, NDC80, NCAPH, SMC2</i>
Chromosome	10	9.97E-04	<i>H3F3B, H2AFY2, HIST1H46L2, INCENP, KIF4A, NUF2, CENPK, HMGB2, NDC80, SMC2</i>
Phosphoprotein	19	0.001007	<i>MYBPC3, FEN1, HSP90AB1, H3F3B, TFRC, HIST1H46L2, CHRM4, ODC1, HSPB1, ATP2A2, FOS, LMNB2, MYL12A, EEF1A1, PLN, STMN1, CDK1, CKB, LBR</i>
Actin-binding	9	0.002056	<i>MYBPC3, WDR1, MYH1C, XIRP1, PLS3, MYH1B, DBN1, MYO16, LMOD2</i>
Motor protein	7	0.003576	<i>KIF4A, MYH1C, KIF23, MYH1B, KIF20A, MYO16, MYL12A</i>
Cytoskeleton	11	0.006404	<i>TUBB2B, WDR1, INCENP, KIF4A, NUF2, STMN1, CDK1, ZYX, NUSAP1, NDC80, LMOD2</i>
Microtubule	7	0.006702	<i>TUBB2B, INCENP, KIF4A, STMN1, NUSAP1, KIF23, KIF20A</i>
Kinetochore	4	0.006955	<i>INCENP, NUF2, CENPK, NDC80</i>

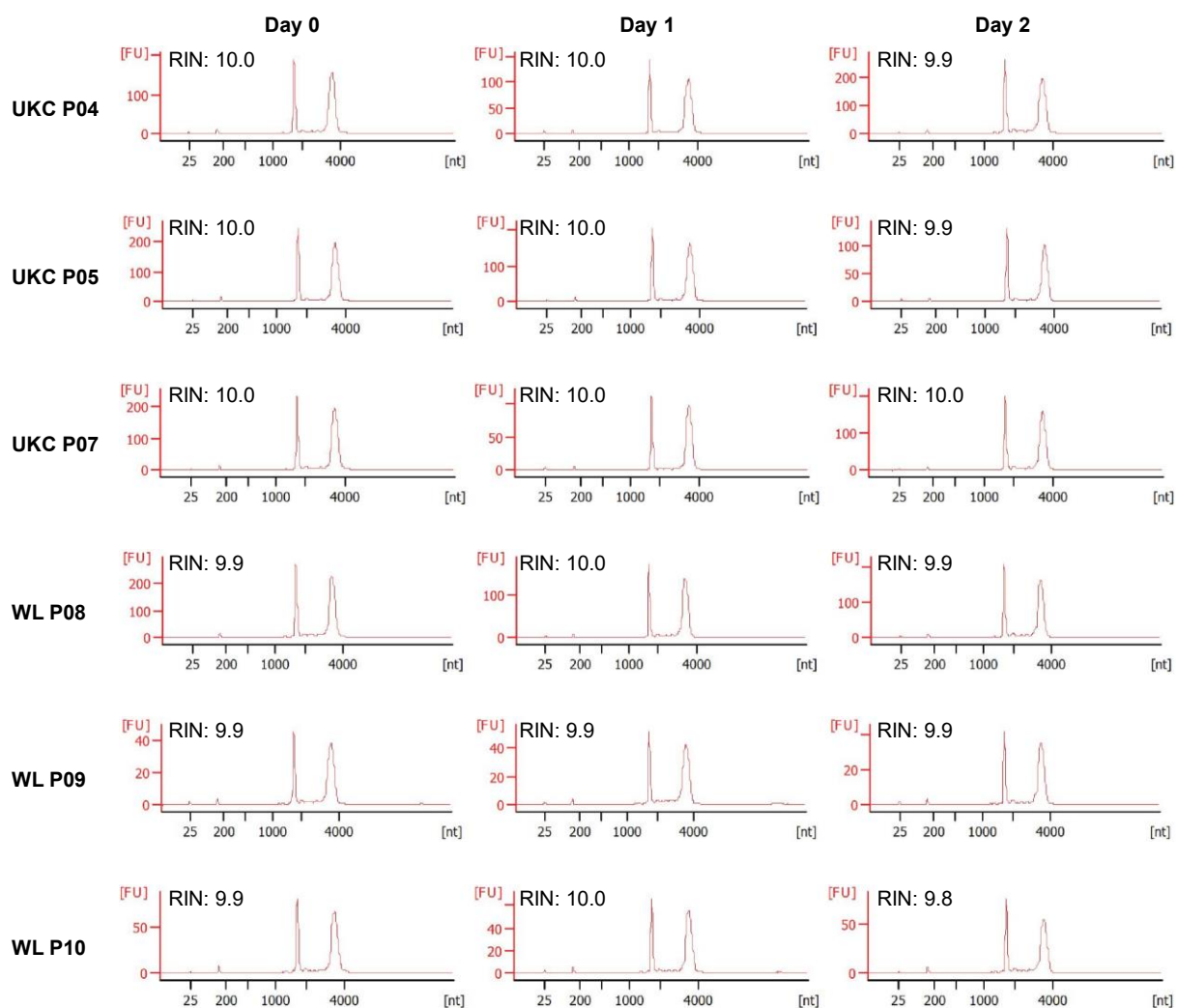


Fig. 2-1; RNA-seqに使用したRNAサンプルの純度

RNAの純度はAgilent 2100 Bioanalyzer AgilentとRNA 6000 nano kit (Agilent Technologies) を用いて測定した。RNA Integrity Number (RIN) 値はすべてのサンプルで8.0以上であり、全てのサンプルが純度の高いRNAであることがわかった。

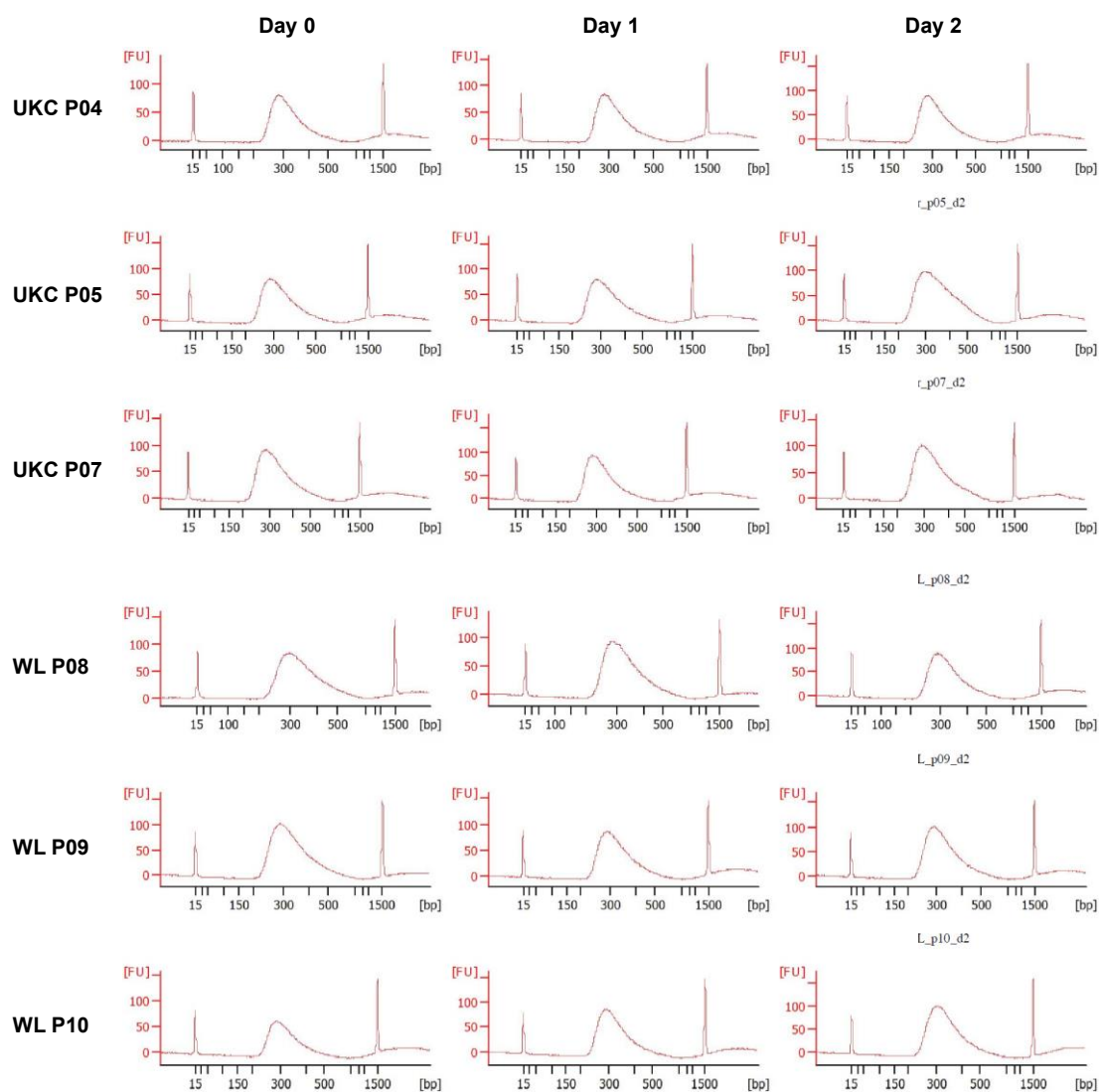


Fig. 2-2; RNA-seq ライブラリの品質

RNA-seq用のライブラリの品質は、Agilent 2100 BioanalyzerおよびAgilent DNA 1000 試薬 (Agilent Technologies) を使用して確認した。いずれのサンプルにおいてもアダプター配列の混入は見られなかった。

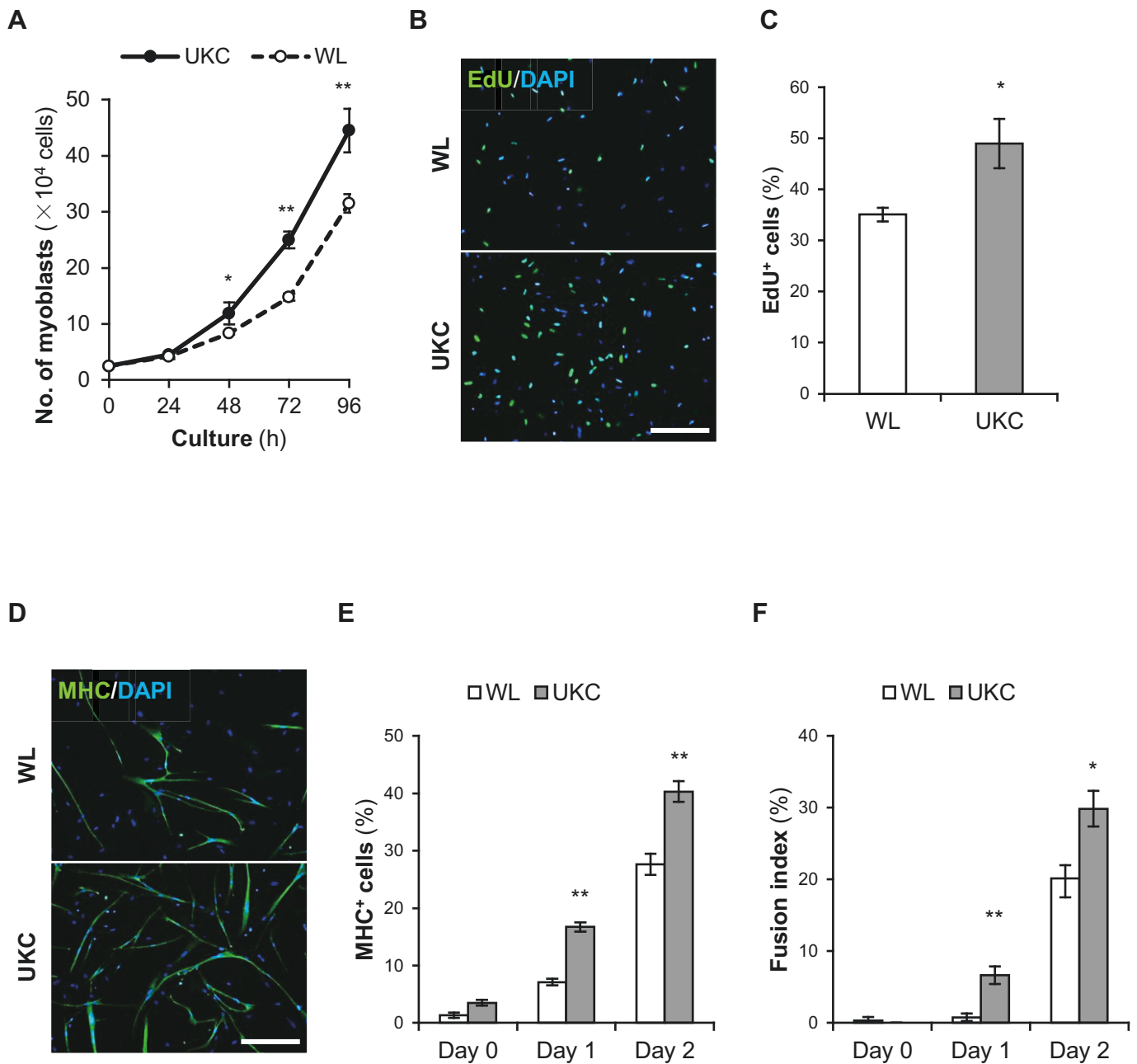


Fig. 2-3; WLとUKC筋芽細胞の増殖と分化は異なる

A: WLとUKC筋芽細胞の増殖を経時的に計測した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 各時点でのStudent's t test, $n=3$ 。

B-C: WLとUKC筋芽細胞のEdU染色像 (B)、EdU+細胞を定量化した (C) (EdU+細胞率=EdU+細胞/全核数)。* $p < 0.05$, Student's t test, $n=4$, scale bar=200 μm 。

D-F: WLとUKC筋芽細胞の分化誘導2日目のMHC染色像 (D)、MHC+細胞率 (E) (MHC+細胞率=MHC+細胞/全核数)、細胞融合率 (F) (Fusion index=1つの筋管内に複数核がある細胞の核数/全核数)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t test, $n=4$, scale bar=200 μm 。

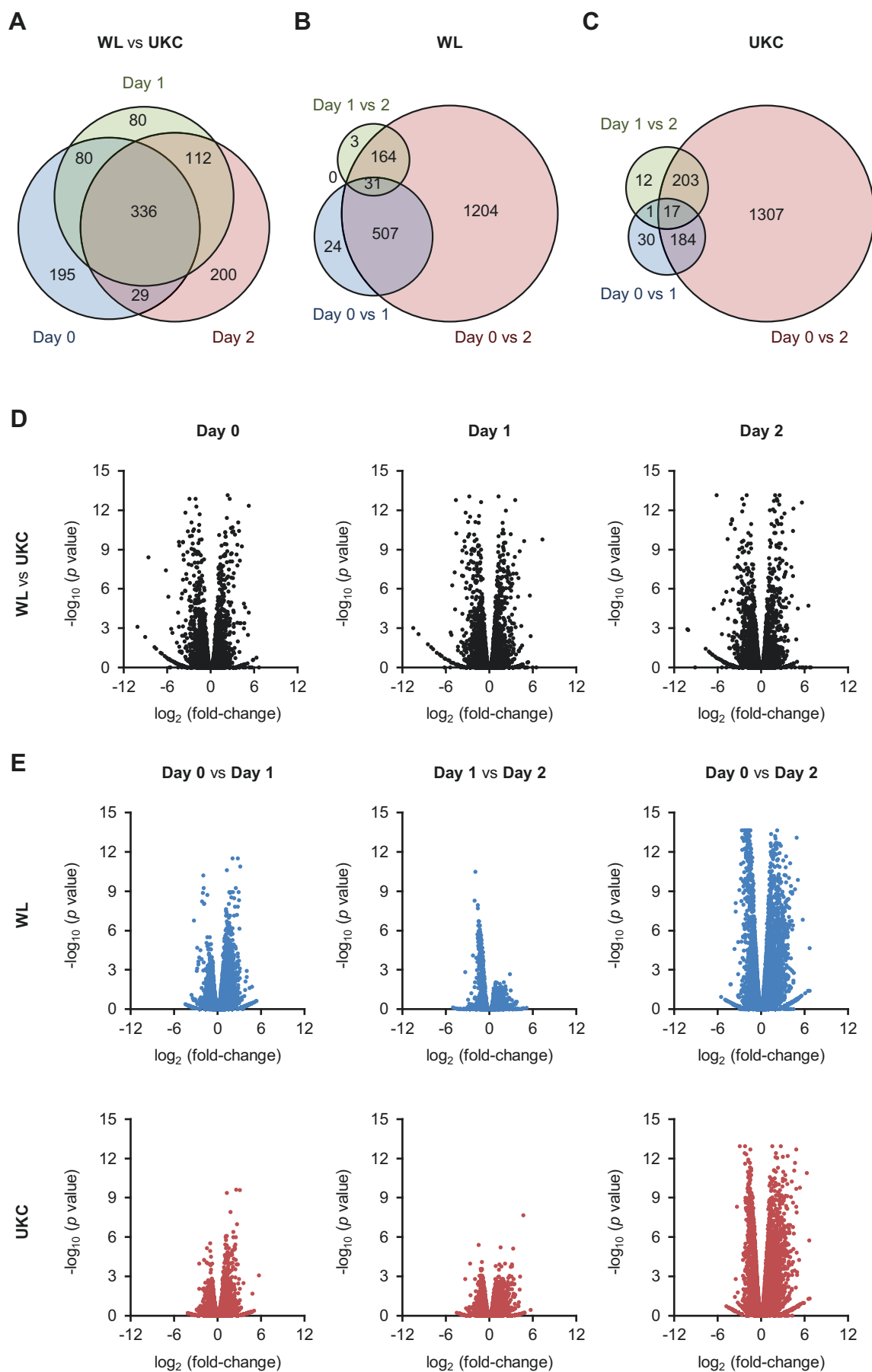


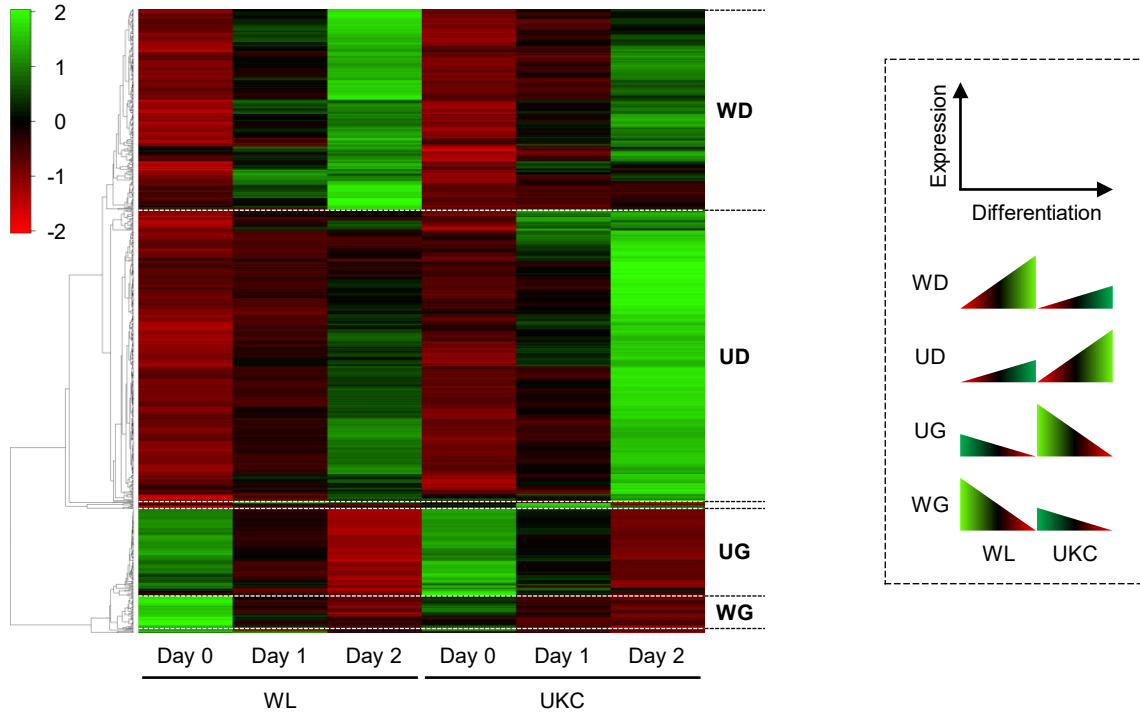
Fig. 2-4; 各筋芽細胞の増殖・分化の過程で発現が異なる遺伝子

A: WLとUKC筋芽細胞で発現が異なる遺伝子のベン図を作製した ($\text{fold-change} \geq 2.0$, $p < 0.05$)。

B-C: 品種内で発現が異なる遺伝子のベン図を作製した。WL (B), UKC (C)。

D-E: WLとUKCの各時点 (D)、各品種内の分化 (E) において発現が変動する遺伝子をVolcano plotによって可視化した ($\text{fold-change} \geq 2.0$, $p < 0.05$)。

A



B

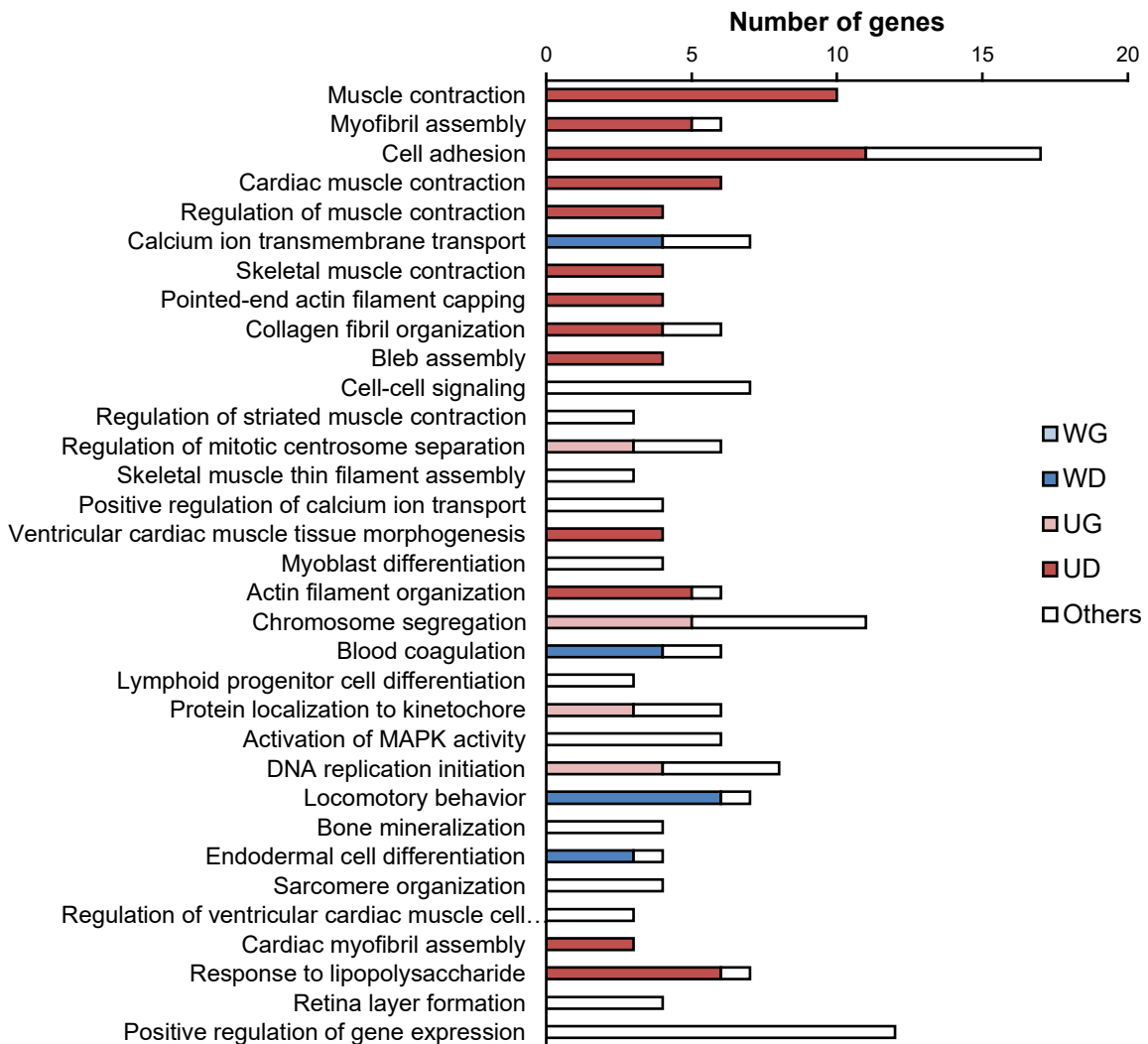


Fig. 2-5; WLまたはUKC筋芽細胞の分化過程で発現が変動する遺伝子群

A: WLまたはUKC筋芽細胞の分化に伴って発現が変動する遺伝子をHeatmapで可視化した。
 $p < 0.05$ (FDR), $|\text{fold-change}| \geq 4$.

B: 840 DEGsについてオントロジー解析をした。

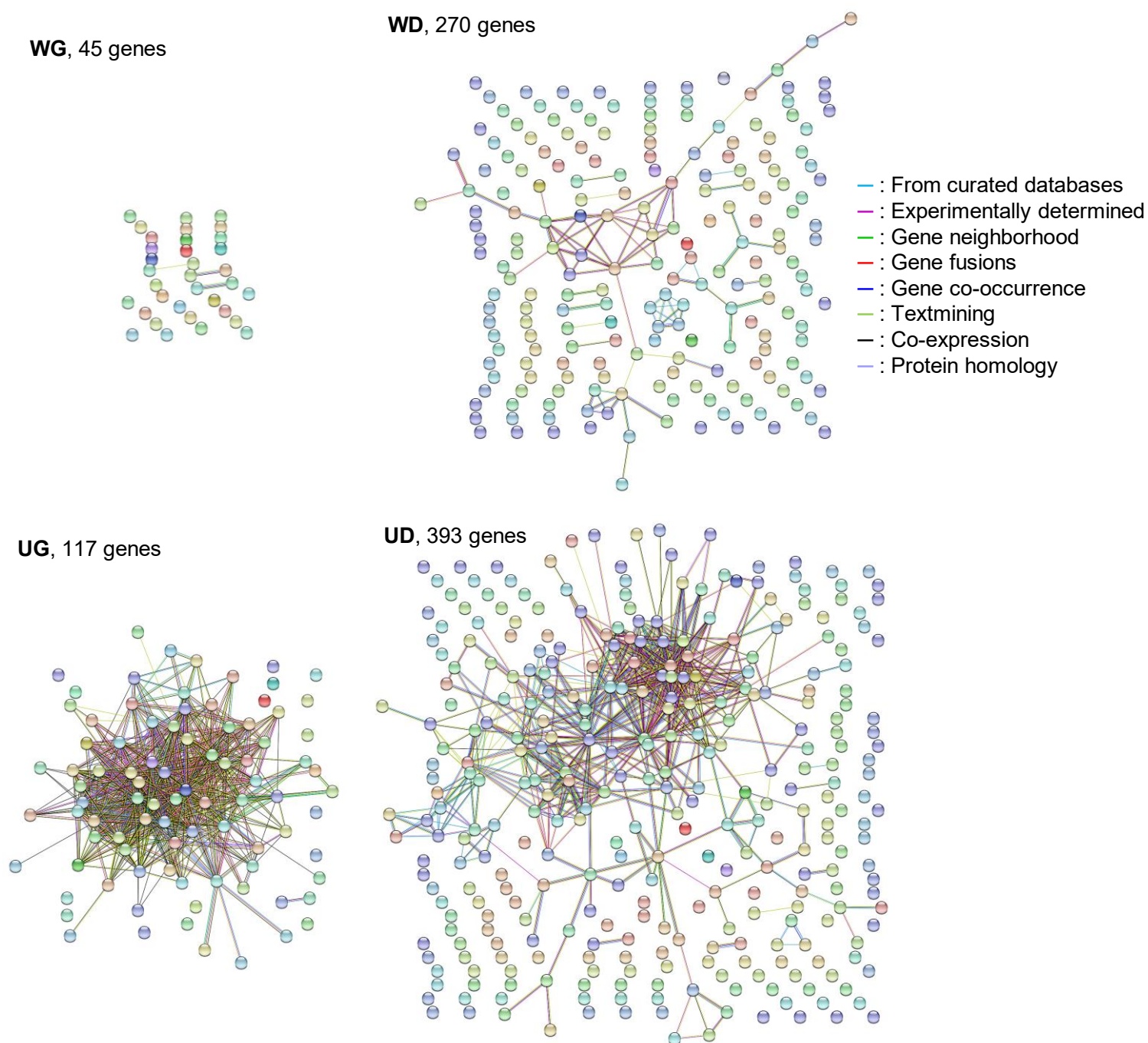


Fig. 2-6; STRINGを用いたタンパク質間相互作用の解析
 WG、WD、UG、およびUDに含まれる遺伝子のタンパク質間相互作用をSTRINGによって視覚化した。

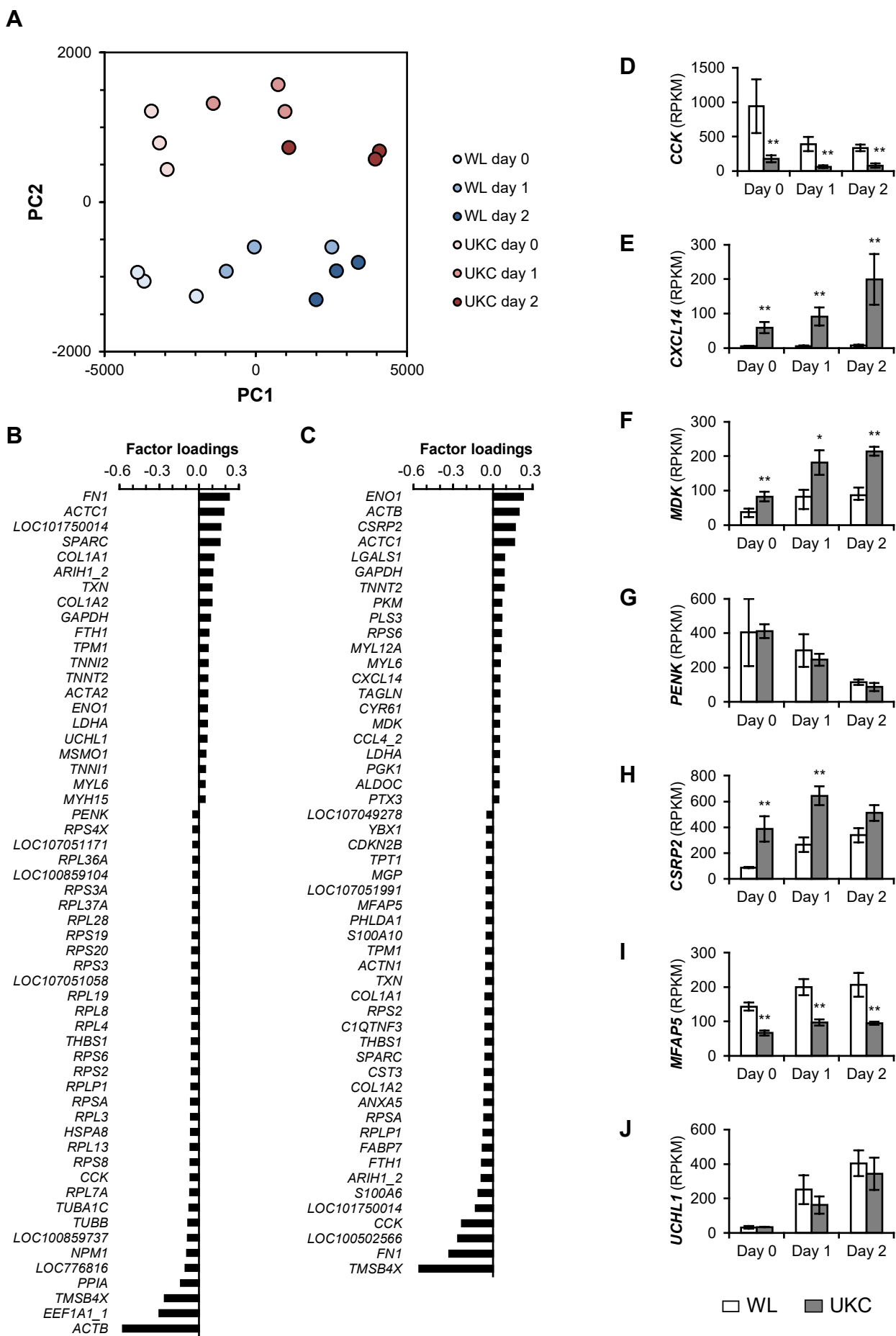


Fig. 2-7; PCAの結果と候補遺伝子の発現解析

A: PCAの結果をプロットした図。X軸=PC1, Y軸=PC2。

B-C: PC1 (B) およびPC2 (C) で因子負荷率が高い遺伝子のリスト。

D-J: CCK (D), CXCL14 (E), MDK (F), PENK (G), CSRP2 (H), MFAP5 (I), UCHL1 (J) 遺伝子のRPKM値をグラフ化した。有意差は各時点でのWLの値と比較解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, FDR。

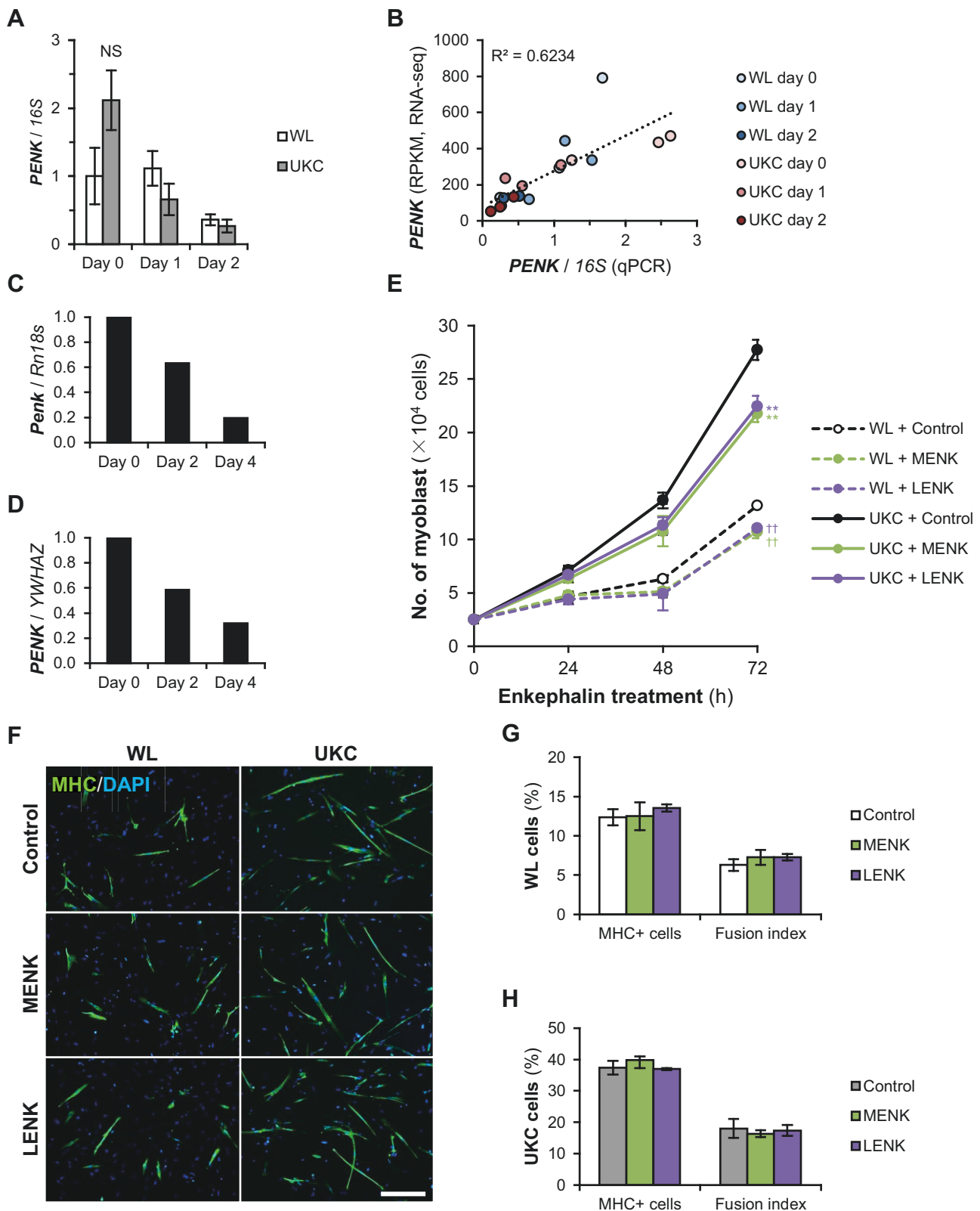


Fig. 2-8; PENKの発現比較と筋分化に与える影響の解析

A: ニワトリ筋芽細胞におけるPENK遺伝子の発現をqPCRで解析した。NSはWLとの有意差なし。Student's *t* test, $n=3$ 。

B: RNA-seqおよびqPCRで得られたPENK遺伝子の発現をピアソンの相関係数によって解析した。

C, D: マウス (C) およびヒト (D) 筋芽細胞におけるPENK遺伝子の発現をqPCRで定量した。0日目の平均値を1.0とした。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs day 0, Williams' test, $n=3-4$ 。

E: GMに1 μ M MENKまたはLENKペプチドを投与し、WLおよびUKC筋芽細胞の細胞数を計測した。†† $p<0.01$ vs control WL; ** $p<0.01$ vs control UKC, Scheffe's *F* test, $n=4$ 。

F: DMに1 μ M MENKまたはLENKペプチドを投与してから48時間後のMHC染色像。Day2, scale bar=200 μ m。MHC +筋細胞の比率 (G)、および筋管形成率(H)。各投与群のcontrol、MENK、およびLENK投与群の間に有意差はなかった。Scheffe's *F* test, $n=4$ 。

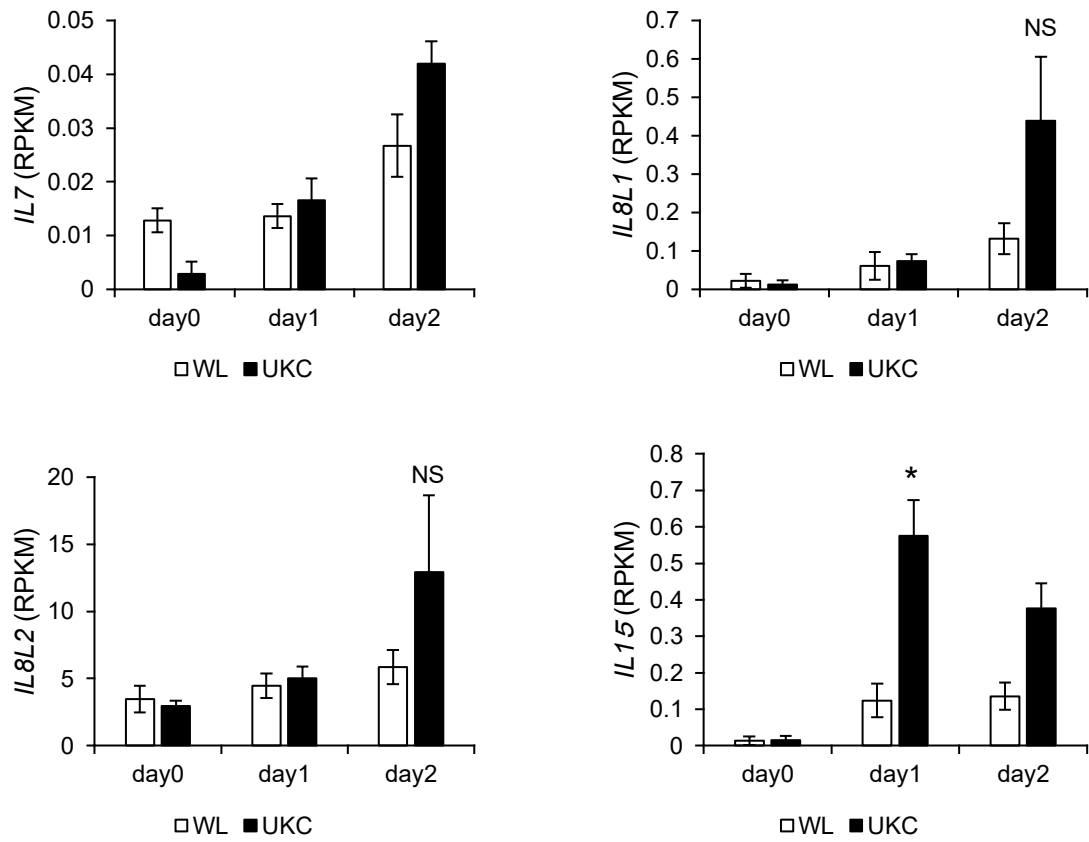


Fig. 2-9; ニワトリ筋芽細胞の筋分化におけるマイオカインの発現
 マイオカインの発現量はRNA-seqデータ (RPKM値) を用いた。* $p < 0.05$, 各時点でのWLの値と比較, Student's t test, $n=3$ 。

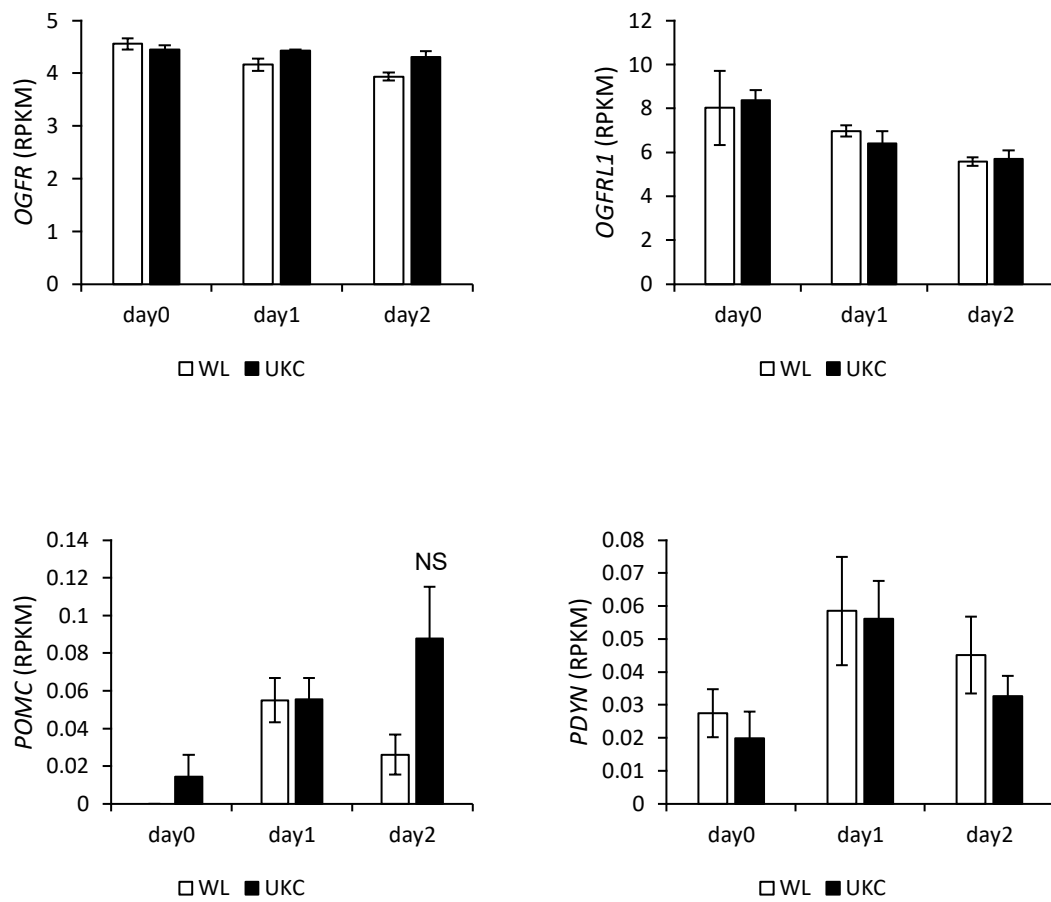


Fig. 2-10; ニワトリ筋芽細胞の筋分化におけるオピオイド受容体の発現
オピオイド受容体とPOMCの発現量はRNA-seqデータ (RPKM値) を用いた。n=3。

第 3 章

筋形成型オリゴ DNA-ベルベリン複合体
によるニワトリ筋芽細胞の分化誘導

3-1 緒言

鶏肉の需要は、過去半世紀にわたって世界中で増加している。肉用鶏は、戦略的な育種によってより増体率の大きい個体が選抜されてきた [107-109]。食肉となる骨格筋組織は、筋線維と呼ばれる縞状の長い多核の細胞から構成されている。筋線維の細胞膜と基底膜の間には、単核の衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在する。成長中の骨格筋では、衛星細胞が活性化し、筋芽細胞と呼ばれる増殖性の前駆細胞に分化する。未分化な筋芽細胞は細胞分裂を数回した後、収縮性の筋細胞に分化する。最終的に、筋細胞は互いに融合し、多核の筋管を形成する [66]。この一連のプロセスによって骨格筋の恒常性は厳密に維持・制御されている。とくに筋芽細胞は前駆細胞の供給から分化までの段階に関わり、骨格筋の再生・形成において中心的な役割を担っている。そのため、肉用鶏の筋芽細胞の増殖と分化を制御する機構を解明することは、肉用鶏の筋形成メカニズムの理解に有用であることが考えられる。

先行研究において、Toll 様受容体 (TLR) 非依存的にマウスとヒト筋芽細胞の分化を誘導する筋形成型 ODN (myoDN) 群と呼ばれる一連の 18 塩基の ODN が同定された [33]。myoDN の 1 つである iSN04 は、自発的に細胞内に取り込まれ、多機能タンパク質として知られるヌクレオリンに結合する。iSN04 はヌクレオリンの機能を阻害することで p53 タンパク質の翻訳を増加させ、p53 シグナル経路を活性化して筋分化を促進する。さらに、iSN04 はイソキノリンアルカロイドであるベルベリンと複合体を形成し、iSN04 単体よりも高い筋分化促進作用を示す。この効果は、ベルベリンが iSN04 の立体構造を安定化させるためであると考えられている [33]。TLR 依存的な免疫型 ODN の効果は同一配列でも動物種によって異なることが知られている。例えば、TLR 依存的に免疫を制御する ODN である ODN-2006 はマウスとヒトの TLR9 を刺激するが、ODN-1826 はマウス TLR9 にのみ認識される [42]。ニワトリでは哺乳類 TLR9 の機能的ホモログとして TLR21 を発現する。最近では、鳥類マクロファージを刺激する ODN の報告もある [43]。鳥類の免疫系を刺激するために重要な配列も同定されつつあるが [44-46]、これら配列はマウスやヒトにおいては必須ではないことが示唆されている。筋形成型 ODN である iSN04 の標的タンパク質であるヌクレオリンのアミノ酸配列は、鳥類と哺乳類の間で比較的類似しているが、同一性は約 60%にとどまる (ニワトリ-ヒト間の同一性 62.5%、ニワトリ-マウス間の同一性 59.6%)。これらの知見は、myoDN が種特異性を示す可能性を示唆している。myoDN-ベルベリン複合体がニワトリ筋芽細胞の分化をも促進すれば、哺乳類と共通した新たな筋分化を促進する機構の発見につながることを期待される。しかし、myoDN が鳥類筋芽細胞にも効果があるかは不明である。そこで本研究では、myoDN がニワトリ筋芽細胞の分化を誘導するのかを検証した。

3-2 材料および方法

3-2-1 初代培養ニワトリ筋芽細胞

黄斑プリマスロック (BPR) と UKC の鶏卵はそれぞれ、後藤養鶏場と全国農業協同組合連盟から購入した。2-2-1 と同様の方法で細胞を培養した。細胞数の計測は 2-2-4、EdU 染色は 2-2-5 と同様の方法で行った。

3-2-2 細胞の免疫染色

コラーゲンタイプ I-C でコーティングした 96 ウェルプレートに 5.0×10^3 個/ウェル、または 30 mm 培養皿に 1.0×10^5 個のニワトリ筋芽細胞を播種した。24 時間後に chMB-GM に培地を交換し、10 μ M の ODN を投与して 48 時間培養した。免疫染色は、2-2-6 と同様の方法で行った。抗体は、0.5 μ g/mL マウスモノクローナル抗 MHC 抗体 (MF20; R&D Systems) と 1.0 μ g/mL ウサギポリクローナル抗ヌクレオリン抗体 (ab22758; Abcam) で免疫染色した。Alexa Fluor 488 結合ロバポリクローナル抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) と Alexa Fluor 594 結合ロバポリクローナル抗ラビット IgG 抗体を二次抗体として使用した。免疫染色した細胞の画像は、CellInsight NXT (Thermo Fisher Scientific) で自動的に撮影した。HCS Studio と Cellomics Scan ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を用いて MHC⁺ 細胞の割合を算出した。

3-2-3 qPCR

2-2-13 と同様の方法で行った。qPCR に用いたプライマー配列を Table 3-1 に示す。各転写物の量は *YWHAZ* の量で正規化し、結果はすべて相対値として示した。

3-2-4 化合物

合成されたホスホロチオエート化 ODN (PS-ODN) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製された (GeneDesign)。PS-ODN とベルベリン (Nacalai) は超純水に溶解した。PS-ODN またはベルベリンを含まない等量の超純水を対照群として設定した。iSN04-ベルベリン複合体形成のために、iSN04 とベルベリンは RPMI1640 培地 (Nacalai) 中で混合し、20°C で 30 分間静置してから実験に用いた。スクリーニングに用いた ODN の配列を Table 3-2 に示す。

3-2-5 RaNA-Seq による RNA-seq データ解析

ヒト筋芽細胞に 30 μ M iSN04 を投与してから 24 時間後の遺伝子発現を解析した RNA-seq のデータファイルを DDBJ から取得 (Accession number; DRA008498) した [33]。データの解析・可視化をするためのクラウドプラットフォーム RaNA-Seq を

使用した [15]。リードカウントデータの補正は TPM (transcripts per million) で補正した。遺伝子発現の解析は、RaNA-Seq プラットフォームに搭載されている DESeq2 [111] を用いて解析した。TPM の変化が条件間で 2 倍を超える場合、有意に発現が異なる遺伝子として定義した。STRING 解析は 2-2-11 と同様の方法で行った。

3-2-6 MA plot

対照群と iSN04 群間における遺伝子発現量の差異を可視化するために R studio を用いて MA plot を作図した。RNA-seq で得られた各遺伝子の発現量をサンプル間で比較し、縦軸を発現量比、横軸を平均発現量として各遺伝子の値を二次元平面上にプロットした。

3-2-7 ヌクレオリンの立体構造予測

NCBI からヒト (NM_005381.3), マウス (NM_010880.3), ニワトリ (NM_205265.1) のヌクレオリンのアミノ酸配列を取得し、タンパク質の構造予測を実行する Google の人工知能プログラム AlphaFold 2 を用いてヌクレオリンの立体構造を予測した [112]。

3-2-8 統計解析

各実験結果は平均±標準誤差で示した。対応のない独立した 2 群の検定には Student's *t* test、3 つ以上のグループ間の統計的差異は、一元配置分散分析 (ANOVA) を行ったのち、Williams' test または、Scheffe's *F* test によって評価した。有意水準は *p* 値<0.05 に設定した。

3-3 結果

3-3-1 ニワトリ筋芽細胞におけるヌクレオリンの局在

最初に、単離した初代培養ニワトリ筋芽細胞の純度を確認した。初代培養した細胞を chMB-DM で 5 日間、筋分化誘導した結果、MHC 陽性細胞の比率が 90%以上に達し (Fig. 3-1-A)、ほとんどが分化能を持つ筋芽細胞であることがわかった。

ヌクレオリンは iSN04 の標的タンパク質として先行研究で同定されたが [33]、ニワトリ筋芽細胞におけるヌクレオリンの発現や局在は報告されていない。免疫染色の結果、ニワトリ筋芽細胞では、ヌクレオリンが核に局在していることがわかった。未分化な筋芽細胞では、ヌクレオリンは核小体に集中していたが (Fig. 3-1-B, day 0)、MHC 陽性の単核の筋細胞および多核の筋管では、ヌクレオリンが細胞質にも拡散して存在することが観察された (Fig. 3-1-B, day 2, day 4)。ニワトリ筋芽細胞の分化中のヌクレオリン局在の変化は、マウスとヒトで観察された様子と一致していた [33]。

次に、7 つの myoDN (iSN01-iSN07) を含む 19 種類の PS-ODN を、ニワトリ筋芽細胞へ投与し、筋分化への影響をスクリーニングした。chMB-GM で培養した筋芽細胞を 10 μ M の PS-ODN で 48 時間処理し、MHC で免疫染色した (Fig. 3-2-A)。iSN01-iSN07 投与群では MHC 陽性細胞の割合が顕著に増加したが、他の PS-ODN は筋芽細胞の分化に影響を与えなかった (Fig. 3-2-B)。myoDN は、マウスおよびヒトの筋芽細胞と同様に、ニワトリ筋芽細胞の筋分化も促進することがわかった。以降の実験では、マウス同様にニワトリ筋芽細胞で最も高い筋分化活性を示す iSN04 を使用した。

3-3-2 iSN04 はニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制する

幹細胞や前駆細胞の増殖と分化は相反するプロセスであり、互いに負に調節されている [113]。マウス筋芽細胞では、iSN04 は筋分化を促進することにより細胞増殖を抑制する [33]。これら iSN04 の効果がニワトリ筋芽細胞でも観察されるのかを検証した。3 または 10 μ M の iSN04 でニワトリ筋芽細胞を処理し、細胞数を経時的に計測した (Fig. 3-3-A)。iSN04 を投与してから 48 時間後には、対照群と比較して、iSN04 投与群の細胞数が濃度依存的に減少した。次に、EdU 染色によってニワトリ筋芽細胞における DNA の複製を評価した (Fig. 3-3-B, C)。EdU 陽性細胞の割合は 10 μ M iSN04 群で有意に減少した (Fig. 3-3-C)。これらの結果から、iSN04 はニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制することがわかった。

3-3-3 ベルベリンは iSN04 の筋分化活性を増強する

イソキノリンアルカロイドであるベルベリンは、iSN04 の 13 から 15 番目のグアニンを介して iSN04 と物理的に相互作用し、緊密な複合体を形成する。これにより、ベルベリンは iSN04 の構造の安定化に寄与し、iSN04 の筋分化活性を増大させる [33]。ニワトリ筋芽細胞においても、ベルベリンが iSN04 の活性を増強するかどうかを調べるために、10 μ M のベルベリン単体、iSN04 単体、または iSN04-ベルベリン複合体をニワトリ筋芽細胞に 48 時間投与した (Fig. 3-4-A)。対照群の MHC 陽性細胞率 (8.0%) および筋管形成率 (5.2%) と比較して、iSN04 単体投与群では MHC 陽性細胞率 (23.9%) と筋管形成率 (18.7%) が有意に増加した (Fig. 3-4-B, C)。iSN04-ベルベリン複合体投与群においても、MHC 陽性細胞 (42.4%) と筋管形成率 (32.0%) が顕著に増加しており、その値は iSN04 単体投与群よりも有意に高かった。ベルベリン単体ではニワトリ筋芽細胞の分化が変化しなかったことから、iSN04-ベルベリン複合体の活性は iSN04 とベルベリンの相乗効果ではなく、ベルベリンによる iSN04 の活性増強によるものであることが確認された。これらの結果から、マウス筋芽細胞と同様にニワトリ筋芽細胞においても、ベルベリンが、iSN04 の筋分化活性を増強することがわかった。

3-3-4 iSN04 はニワトリ筋芽細胞の筋原性遺伝子の発現を促進する

iSN04 および iSN04-ベルベリン複合体がニワトリ筋芽細胞の遺伝子発現に与える影響を明らかにするために、MyoD (*MYOD1*)、myogenin (*MYOG*)、ミオシン重鎖 (*MYH1*)、および myomaker (*TMEM8C*; 筋肉特異的膜タンパク質) の発現を qPCR で評価した (Fig. 3-4-D, E)。iSN04 または iSN04-ベルベリン複合体の投与 8 時間後には、*MYOD1* の発現が有意に増加した。さらに、iSN04-ベルベリン複合体は、*MYOG* と *TMEM8C* の発現を有意に増加させた (Fig. 3-4-D)。一方で、これら遺伝子の発現増加は iSN04 単体では観察されなかった。これらの結果は、iSN04 単体よりも iSN04-ベルベリン複合体の筋分化促進作用が高いことを示している。投与 24 時間後には、iSN04 および、iSN04-ベルベリン複合体の両群において、*MYOD1*, *MYOG*, *MYH1*, および *TMEM8C* の発現が同程度に誘導された (Fig. 3-4-E)。一方、いずれの時点でも、ベルベリン単体は遺伝子発現に影響を与えなかった。これらの結果から、iSN04 単体と iSN04-ベルベリン複合体が、投与直後にニワトリ筋芽細胞の遺伝子発現プログラムを誘導することがわかった。また、iSN04 単体と比較して、iSN04-ベルベリン複合体は筋分化促進効果が高いことが明らかになった。

3-4 考察

本研究では、myoDN と呼ばれる一連の 18 塩基の ODN (iSN01-iSN07) が、ニワトリ筋芽細胞の筋分化を促進することを明らかにした。myoDN の中でも、iSN04 がニワトリ筋芽細胞において最も高い活性を示した。これらのデータは、マウスやヒト筋芽細胞の結果とよく一致していた [33]。筋芽細胞の分化と筋管の形成は、骨格筋組織の発生、形成、再生において必須のプロセスである [66]。卵用鶏と比較して肉用鶏の筋芽細胞は、高い分化能を示す [114]。しかし、肉用鶏筋芽細胞の分化能力は、週齢によって変化し、体重が増加すると筋芽細胞の分化能が減弱することが報告されている [41]。近年、家禽の筋形成メカニズムに関する研究が多数報告されているが、肉用鶏筋芽細胞における増殖と分化に関わるメカニズムは不明な点が多い。myoDN は、筋芽細胞を直接の標的とする 1 本鎖の ODN である。これまでに myoDN の筋分化促進作用には分子内立体構造が重要であることが示唆されている。myoDN の作用機構を詳細に解析することは、ニワトリ筋芽細胞の分化メカニズムの解明に有用な知見となることが期待される。ニワトリの骨格筋線維数は胚性期において筋芽細胞の数に依存して決定されることが報告されている [32]。iSN04 を筋芽細胞の増殖が終了した孵化後に給餌することで、iSN04 による筋芽細胞の増殖抑制作用が筋線維数に及ぼす影響を最小化しながら、筋分化促進作用による筋組織の増大効果を得られるのではないかと考えられる。

休眠状態で基底膜下に存在している衛星細胞が活性化すると、Myf-5, MyoD, Myf-6, myogenin など bHLH 転写因子を有する筋発生調整因子 (myogenic regulatory factors; MRFs) を段階的に発現することが知られている [115]。先行研究から、iSN04 は培地に投与してから 2 時間で細胞内に取り込まれることが分かっている [33]。ニワトリ筋芽細胞では、iSN04 単体を投与して 8 時間後に、*MYOD1* の発現量が増加していた。このことから iSN04 は、迅速に筋芽細胞に作用し、筋分化を促進することが示唆された。さらに、iSN04-ベルベリン複合体を 8 時間投与した群でのみ *MYOG* と *TMEM8C* の発現が有意に増加した。*MYOG* と *TMEM8C* は MyoD の活性化後に発現が増加する遺伝子である。これらのことから iSN04 単体と比較して、iSN04-ベルベリン複合体の筋分化促進効果が強いことが示唆された。ベルベリンは、薬用植物由来の安全性の高いイソキノリンアルカロイドであり、抗炎症作用や抗腫瘍作用など複数の生理活性を示し [116, 117]、いくつかの臨床試験に活用されている [118]。さらに、ベルベリンはテロメア DNA と結合し、DNA の立体構造を安定化させる [119]。先行研究において、ベルベリンが iSN04 の 13 から 15 番目のグアニンを介して物理的に相互作用し、iSN04 の立体構造を安定化させ、マウス筋芽細胞の筋分化を強力に促進することがわかっている [33]。本研究で、iSN04-ベルベリン複合体が、ニワトリにおいてもその効果を発揮することを確認した。ベルベリンを用いた

iSN04 の筋分化活性の増強は、ODN の機能を向上させるための重要な知見である。

先行研究では、ヒト筋芽細胞へ iSN04 を投与し、24 時間後の遺伝子発現を RNA-seq で網羅的に解析している [33]。本考察ではこのデータを、RaNA-Seq [15] を用いて再解析した。クラスタリングの結果から、対照群と iSN04 投与群では、細胞の遺伝子発現が大きく変化することが推測された (Fig. 3-5-A)。さらに遺伝子発現を両群で比較すると、iSN04 で発現が増加した遺伝子は 296 遺伝子、発現が減少した遺伝子は 328 遺伝子であった (Fig. 3-5-B)。発現が増加、または発現が減少した遺伝子群のタンパク質間相互作用を STRING によって視覚化した (Fig. 3-5-C, D)。STRING 解析の結果、発現が増加した遺伝子群と減少した遺伝子群の両方でタンパク質が密に相互作用することが示唆された。さらに各群について GO 解析をした。発現が増加した遺伝子群には骨格筋形成に関わる遺伝子クラスタが有意に含まれていた (Table 3-3)。一方で発現が減少した遺伝子群では細胞増殖に関わる GO が有意に含まれていた (Table 3-4)。これらヒト筋芽細胞の解析結果と、本研究で観察されたニワトリ筋芽細胞の表現型はよく一致しており、iSN04 がヒトとニワトリ筋芽細胞を活性化する機構は類似していると推測される。興味深いことに、iSN04 投与によって発現が減少した遺伝子群に炎症反応に関わる遺伝子クラスタが検出された (Table 3-4)。近年、肉用鶏の骨格筋組織では肉質の異常がしばしば観察されている。この組織の異常は筋線維内の酸素濃度の低下や慢性的な炎症反応に起因する [120]。RNA-seq の再解析から、iSN04 は筋芽細胞の分化を促進するだけでなく、炎症シグナルを抑制する可能性が示唆された。iSN04 は家禽の筋分化を促進するだけでなく、炎症を抑制する新たな分子である可能性が期待される。

iSN04 は、多機能タンパク質であるヌクレオリンと物理的に相互作用する [33]。ヌクレオリンは、p53 mRNA に結合して翻訳を阻害する [34-36]。筋分化において、p53 は MyoD と協調して [38]、網膜芽細胞腫タンパク質 (RB) の転写を活性化する [39]。p53-RB シグナル経路は細胞周期を停止させ、筋分化中の MyoD の活性化に関わる補助的な機構として働く [40, 41]。ヒト筋芽細胞において、iSN04 はヌクレオリンの機能を阻害し、p53 タンパク質の翻訳を増加させる [33]。iSN04 の投与によって活性化された p53 シグナル経路は、MyoD や myogenin などの筋原性遺伝子の発現を増加させることで、細胞周期の停止と筋分化を誘導する [33]。本研究で、iSN04 がニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制し、MYOD1 と MYOG mRNA の発現を促進させたことから、iSN04 の作用機序が鳥類と哺乳類の筋芽細胞で共通していることが強く示唆された。

ODN の作用は種特異的であると考えられている。例えば、非メチル化 CpG-ODN は TLR9 のリガンドであるが、その最適なモチーフはマウスとヒトでは異なる [121]。CpG-ODN の特異性は、おそらく種ごとの TLR9 の細胞外ドメインに対する結合親和性に依存していると考えられる [42]。一方、iSN04 は、ニワトリ、マウス、ヒト筋芽細胞

間で同様の作用を示した。抗ヌクレオリン DNA アプタマーとして AS1411 が知られている。AS1411 は、ヌクレオリンの 4 つの RBD (RBD1-RBD4) と相互作用すると考えられている (Fig. 3-6) [122]。また、AS1411 は、iSN04 と同様に哺乳類の筋芽細胞の分化を促進することがすでに確認されている [33]。このことから、iSN04 はヌクレオリンの RBD ドメインに結合することが予測される。ニワトリヌクレオリンの RBD のアミノ酸配列は、マウスやヒトのアミノ酸配列と非常に同一性が高い (Table 3-5)。特にヌクレオリンの RBD4 配列の保存性は、iSN04 がニワトリと哺乳類筋芽細胞において筋分化作用を発揮する理由の一つであると推察される。この仮説を分子構造の観点から考察するため、ヌクレオリンの立体構造を AlphaFold2 [112] で予測した (Fig. 3-7)。ヌクレオリンの N-末端ドメインは、塩基性アミノ酸の繰り返しの挟まれた酸性のストレッチからなり、高移動度グルーブ型タンパク質の構造に似ていた。このドメインは、ヌクレオリンがクロマチンの凝縮を調節する能力に関係していると考えられている [123, 124]。ヌクレオリンには、中央部を始まりとして、4 つの RNA 結合ドメインが存在する。約 85 アミノ酸の C 末端ドメインは、グリシン、アルギニン残基が非常に豊富である。ヌクレオリンの RBD4、およびアルギニン-グリシン-グリシン (RGG) ドメインがグアニン四重鎖構造の形成に重要であることが報告されている (Fig. 3-6) [125]。RGG ドメインは生物種間で高度に保存されており、各生物種が共通して iSN04 を認識するのに重要であることが予測される。配列と立体構造との関係から、ヌクレオリンの RBD4 と RGG ドメインが iSN04 との結合に重要であることが推測される。先行研究から、iSN01 から iSN07 の塩基配列中に存在する二つの GGG 配列によって形成される立体構造が筋分化促進活性に重要であることがわかっている。iSN01 から iSN07 はいずれも GGG 配列を有するが、18 塩基のオリゴ DNA 全長のどの部位に存在するかによって立体構造が変化するため、iSN01 から iSN07 の活性に違いが生じていると考えられる。

本研究では、iSN04 とベルベリンが形成する複合体が筋分化プログラムの活性化を介して、ニワトリ筋芽細胞の分化を強力に誘導することを見出した。さらに、iSN04 は筋分化の促進だけではなく、肉用鶏の骨格筋で発生する炎症を抑制する可能性が示唆された。また、本研究は、ニワトリ筋芽細胞がヒトやマウスと同様に、ヌクレオリンを発現することを明らかにした。アミノ酸配列の比較から、iSN04 がヌクレオリンの RBD4 に結合することで、ヌクレオリンの機能を阻害することが示唆された。本研究の成果は、ヌクレオリンの RBD が核酸を認識する機構の解明に重要な知見となることが期待される。

Table 3-1; 本研究で使⽤したプライマー配列

Gene	Sequence	bp	Reference
<i>MYH1</i>	CTCCTCACGCTTTGGTAA TGATAGTCGTATGGGTTGGT	213	[131]
<i>MYOD1</i>	GACAGCAGCTACTACACGGAATCA GGAAATCCTCTCCACAATGCTT	102	[132]
<i>MYOG</i>	GGAGCACCCAGCTGGAGTT CGATGCTCTCCACGATGGA	108	[132]
<i>TMEM8C</i>	TGGGTGTCCCTGATGGC CCCGATGGGTCCTGAGTAG	135	[131]
<i>YWHAZ</i>	TCCACCACGACAGACCA CCAGCCTTCCAACCTCC	358	[133]

Table 3-2; 本章で使⽤したODN配列

Name	Sequence
iSN01	AAAAGATTAGGGTGAGGG
iSN02	AAAGATTAGGGTGAGGGT
iSN03	AAGATTAGGGTGAGGGTG
iSN04	AGATTAGGGTGAGGGTGA
iSN05	GATTAGGGTGAGGGTGAG
iSN06	ATTAGGGTGAGGGTGAGT
iSN07	TTAGGGTGAGGGTGAGTT
iSN08	AGTTCAACATTAGGGTGA
iSN15	CATTAGGGTGAAAATGAA
iSN16	TAAAGCATTAGGGTGATG
iSN23	TTAGGGTGATGAAATCCA
iSN24	ATCAGGCTCAAGCTTGAG
iSN30	CTCAAGCTTGAGTTCTGA
iSN31	TCATTCCTAAGCTTGAGG
iSN39	AAGCTTGAGGCCTATGGG
iSN40	GGAACGATCCTCAAGCTT
iSN47	CCTCAAGCTTAGGTCCGC
iSN48	AAATAGCTTTAGGGTTAG
iSN50	ATAGCTTTAGGGTTAGCC

Table 3-3; iSN04で発現が増加した296遺伝子のGO解析

	GO	No.	p-value	Gene
GO:0045944	positive regulation of transcription	22	0.045492	<i>MEF2A, MYOG, HDAC5, EGR2, CEBPB, PRRX1, AIRE, ATP1B4, HFE2, FOXO4, SIRT2, FLCN, CSRP3, MAF, ABLIM3, SOHLH2, HSF4, IRF7, HES1, SOX8, SOX4, PITX3</i>
GO:0007155	cell adhesion	18	3.72E-04	<i>DDR1, POSTN, MYBPC1, MYBPC2, LAMB3, ACTN2, ADGRG1, ISLR, CXCL12, THEMIS2, FAP, GPNMB, ITGA10, BOC, SSPO, HES1, ITGB6, SCN1B</i>
GO:0000122	negative regulation of transcription	18	0.031837	<i>MEF2A, HDAC5, PRRX1, SATB1, PDE2A, ARX, HFE2, NR1D1, SIRT2, FLCN, MAF, BHLHE40, HSF4, IRF7, HES1, MSC, SKIL, DACT1</i>
GO:0006936	muscle contraction	14	4.58E-09	<i>MYOM1, TRIM63, MYBPC2, LMOD3, MYOM2, LMOD2, MYLPF, CHRND, ACTA1, CHRNG, HRC, MYH8, SCN4A, SNTB1</i>
GO:0030049	muscle filament sliding	12	3.79E-12	<i>ACTA1, MYBPC1, MYBPC2, ACTN2, MYL2, TNNT3, TNNC2, MYH8, TNNI1, TNNI2, TCAP, NEB</i>
GO:0030198	extracellular matrix organization	9	0.007645	<i>DDR1, POSTN, OLFML2B, LAMB3, CRISPLD2, COL14A1, ITGA10, ITGB6, NPNT</i>
GO:0003009	skeletal muscle contraction	8	3.33E-08	<i>CHRND, TNNT3, TNNC2, MYH8, STAC3, TNNI1, TNNI2, TCAP</i>
GO:0007420	brain development	8	0.020383	<i>EGR2, ADGRG1, BCL2L11, SCT, SPHK1, NNAT, CKB, SEPT4</i>
GO:0060048	cardiac muscle contraction	7	4.28E-05	<i>CSRP3, MYL2, TNNI1, TNNI2, TCAP, ATP1A2, SCN1B</i>
GO:0007517	muscle organ development	6	0.009286	<i>MEF2A, UNC45B, SGCD, NEB, FOXO4, JPH1</i>

Table 3-4; iSN04で発現が減少した328遺伝子のGO解析

	GO	No.	p-value	Gene
GO:0051301	cell division	51	3.46E-31	<i>ZWILCH, NCAPG2, KIF14, BUB1B, KIF11, SMC4, CDC20, PTTG1, NUF2, NEK2, HELLS, LIG1, CDC25C, CCNA2, SGO2, PSRC1, CCNE2, KIFC1, BIRC5, MCM5, KIF2C, KIF20B, CDCA2, CDCA3, CDCA5, CDCA7, NCAPG, CDCA8, NCAPH, SKA1, AURKA, CCNB2, DSN1, CCNB1, FAM83D, BUB1, SPAG5, UBE2C, CDC6, NDC80, ZWINT, CENPE, TPX2, CENPF, KIF18B, UBE2S, CDK2, CDK1, TACC3, SPC25, MAD2L1</i>
GO:0007067	mitotic nuclear division	37	7.68E-23	<i>CDCA2, CDCA3, ZWILCH, CDCA5, NCAPG2, BUB1B, KIF11, PKMYT1, SKA1, AURKB, AURKA, CDC20, CCNB2, PTTG1, NUF2, PBK, NEK2, FAM83D, BUB1, CEP55, HELLS, PLK1, CDC6, CDC25C, NDC80, CCNA2, ASPM, ANLN, TPX2, CENPF, INCENP, CDK2, CDK1, BIRC5, KIF2C, KIF20B, SPC25</i>
GO:0006260	DNA replication	26	2.69E-17	<i>BLM, FEN1, RNASEH2A, MCM10, CHTF18, ORC6, CHAF1A, CDC45, ORC1, EXO1, CLSPN, POLE, GINS2, RFC3, RFC4, RRM2, LIG1, GINS4, CDC6, CDC25C, CDK2, MCM3, CDK1, MCM4, MCM5, MCM2</i>
GO:0007062	sister chromatid cohesion	25	1.43E-20	<i>ZWILCH, CDCA5, CDCA8, BUB1B, SKA1, AURKB, CDC20, DSN1, NUF2, BUB1, CENPU, PLK1, NDC80, ZWINT, SGO2, CENPE, CENPF, INCENP, CENPK, BIRC5, CENPM, KIF2C, CENPO, MAD2L1, SPC25</i>
GO:0006955	immune response	24	1.62E-06	<i>CD274, IL1RN, CXCL8, CCL4L2, AQP9, HLA-B, LIF, HLA-C, TNFRSF11B, PDCD1LG2, TNFRSF1B, CTSS, CXCL10, CXCL11, IL6, IL1B, TNFSF4, CCL4, CCL3, IGKV3-15, HLA-DRA, IL7R, CTSC, HLA-DPA1</i>
GO:0006955	xpositive regulation of cell proliferation	23	2.74E-05	<i>MYOCD, EDN1, PDGFB, KIF14, LIF, ADM, TTK, NRG1, ADRA1D, FOXM1, FGF2, FGF5, EFNB2, FOSL1, CDC20, CXCL10, IL6, PRC1, TNFSF4, CDK2, BIRC5, CD248, KIF20B</i>
GO:0008283	cell proliferation	21	7.85E-06	<i>TCF19, PLK1, EMP1, BUB1B, NRG1, ADRA1D, MCM10, MKI67, CDC25C, CYR61, AURKB, FGF5, TPX2, CENPF, ERCC2, CDK1, TACC3, KIF2C, FAM83D, BUB1, DLGAP5</i>
GO:0006281	DNA repair	20	3.61E-08	<i>FANCI, POLQ, BLM, FEN1, LIG1, FANCA, FOXM1, FANCG, RAD51AP1, RAD51, CHAF1A, PTTG1, FANCD2, EXO1, RFWD3, CDK2, CDK1, RAD54L, CLSPN, POLE</i>
GO:0006281	xG1/S transition of mitotic cell cycle	19	1.82E-13	<i>RRM2, CDCA5, PRIM1, MCM10, CDC6, PKMYT1, IQGAP3, ORC6, CDC45, ORC1, CCNE2, CDK2, MCM3, CDK1, MCM4, MCM5, POLE, CDKN3, MCM2</i>
GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	19	0.004486	<i>BLM, MYOCD, SPI1, MSTN, ATAD2, WNT5A, PDGFB, FOXM1, FGF2, CCNA2, IL6, PSRC1, IL1B, ID2, ERCC2, CDK2, E2F1, MYBL1, CREB5</i>

Table 3-5; ニワトリ-ヒト間、およびニワトリ-マウス間のRBDのアミノ酸配列の同一性 (%)

Domain	Chicken-human	Chicken-mouse
RBD1	55.8%	55.8%
RBD2	64.0%	68.0%
RBD3	66.7%	70.7%
RBD4	89.5%	88.2%

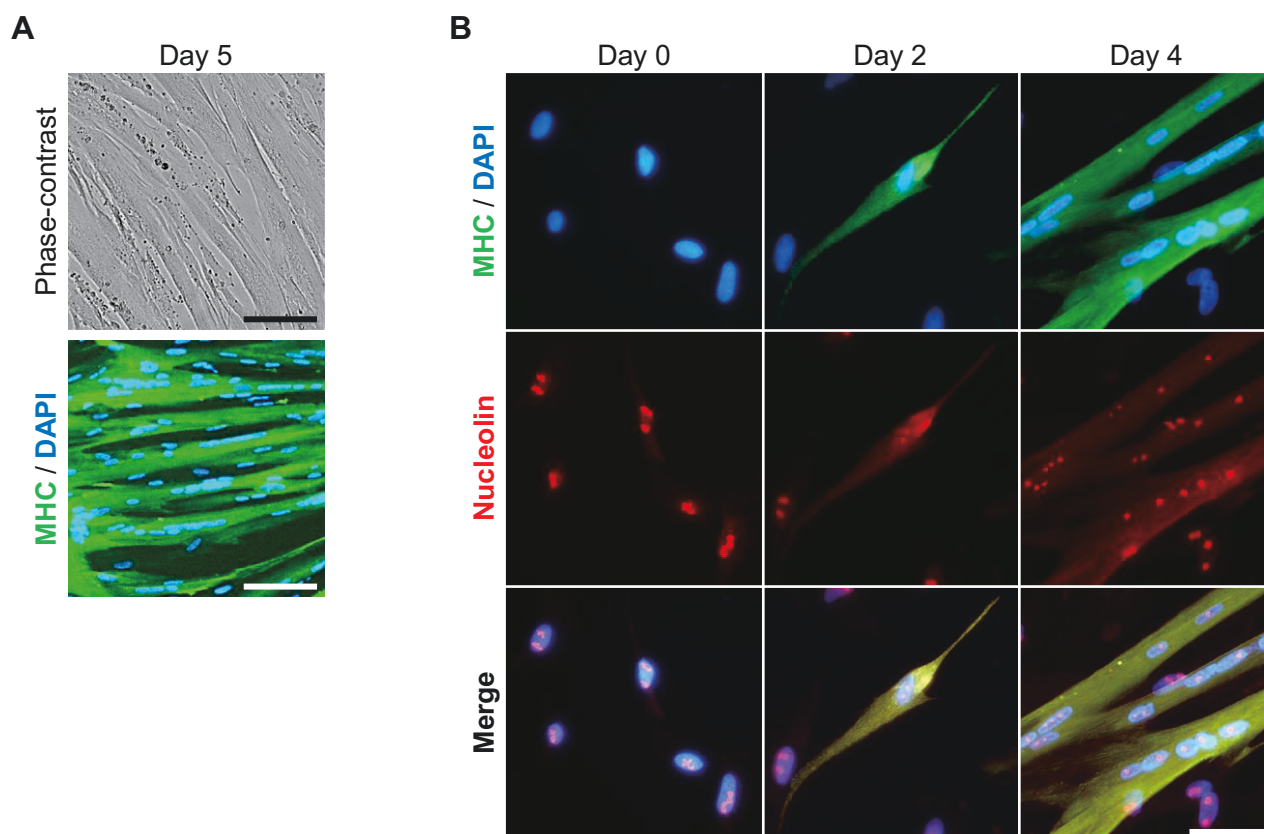
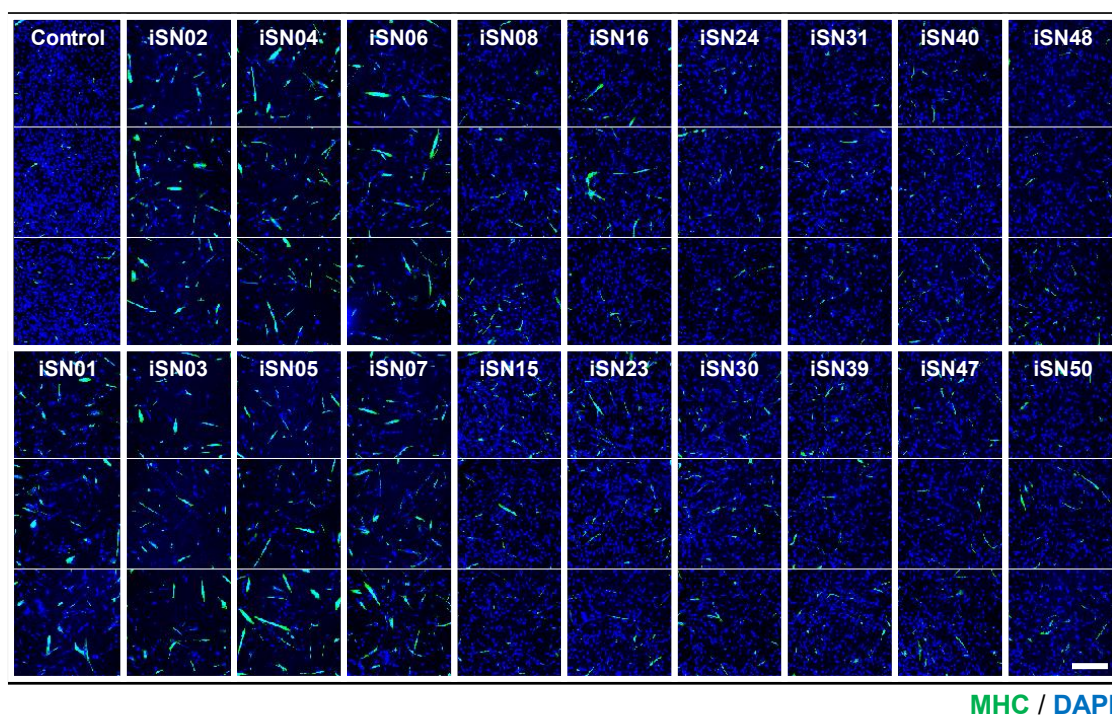


Fig. 3-1; ニワトリ筋芽細胞におけるヌクレオリンの局在

A: chMB-DMで5日間分化誘導したBPR筋芽細胞の位相差およびMHCの蛍光画像。Scale bar=100 μm 。

B: 分化誘導0、2、および4日目にchMB-DMで培養されたBPR筋芽細胞のヌクレオリンおよびMHC染色の代表的な画像。Scale bar=50 μm 。

A



B

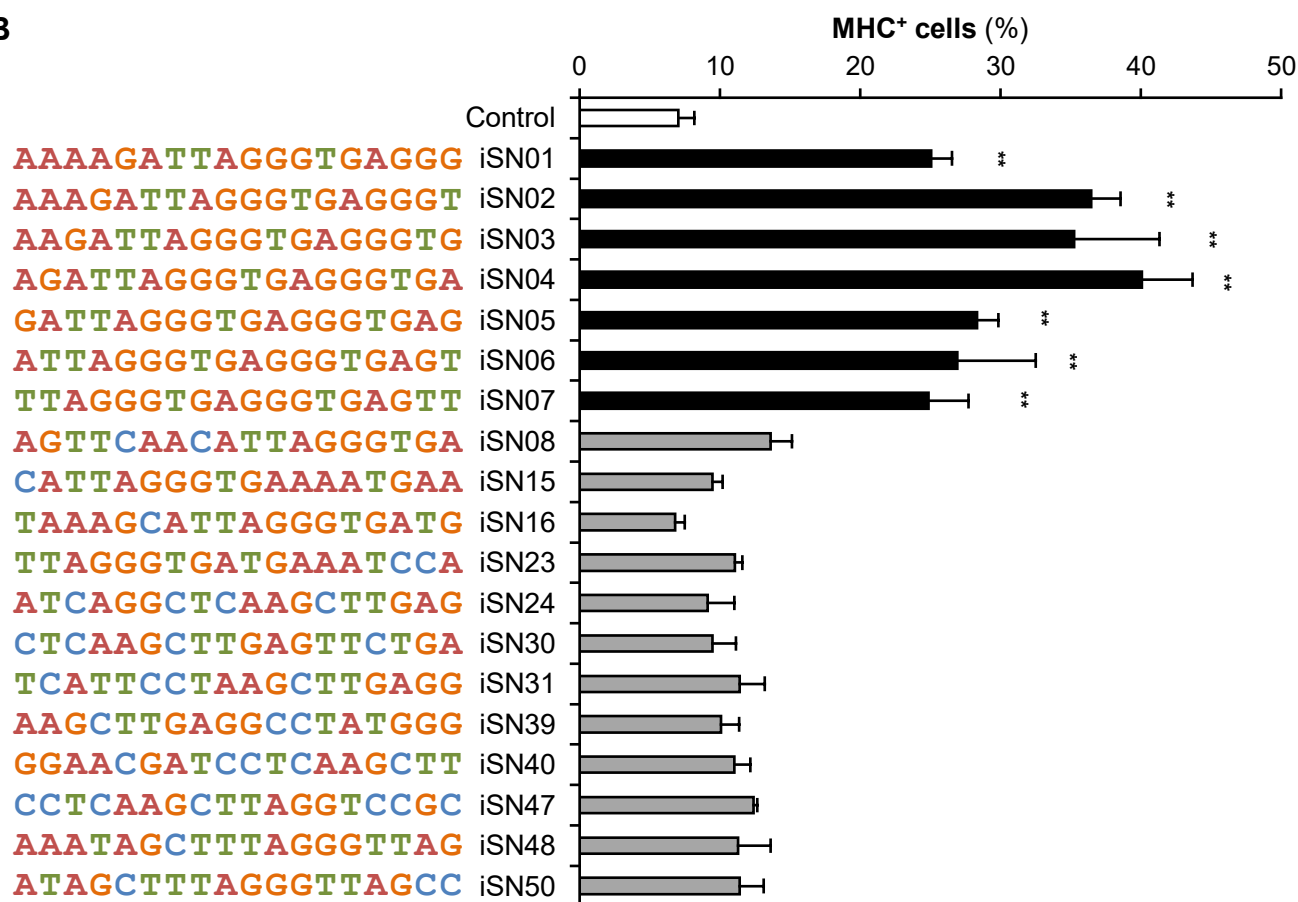


Fig. 3-2; ODNのスクリーニング

A: BPR筋芽細胞に10 μ M PS-ODNを投与してから48時間後のMHC染色像。Scale bar=200 μ m。

B: 蛍光画像を定量化しMHC⁺細胞の比率をグラフ化した。** $p < 0.01$ vs control, Dunnett's test, $n = 3$ 。

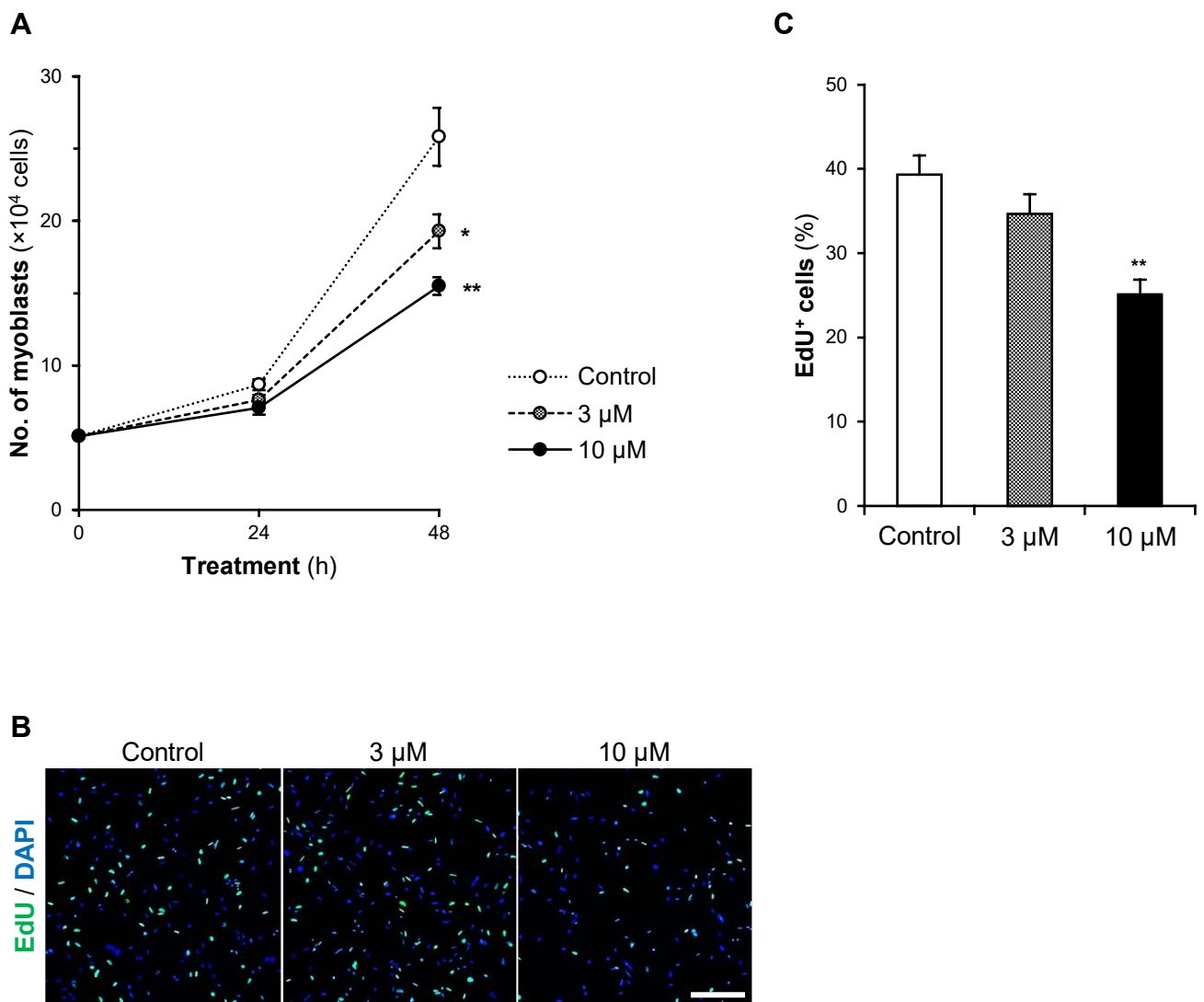


Fig. 3-3; iSN04投与による細胞数の変化

A: UKC筋芽細胞に3または10 μ MのiSN04を投与してから24および48時間後の細胞数。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control, Williams' test, $n = 3$ 。

B-C: UKC筋芽細胞に3または10 μ MのiSN04を投与してから48時間後のEdU染色画像 (B)、およびEdU+細胞率 (C)。Scale bar=200 μ m, ** $p < 0.05$ vs control, Williams' test, $n = 4$ 。

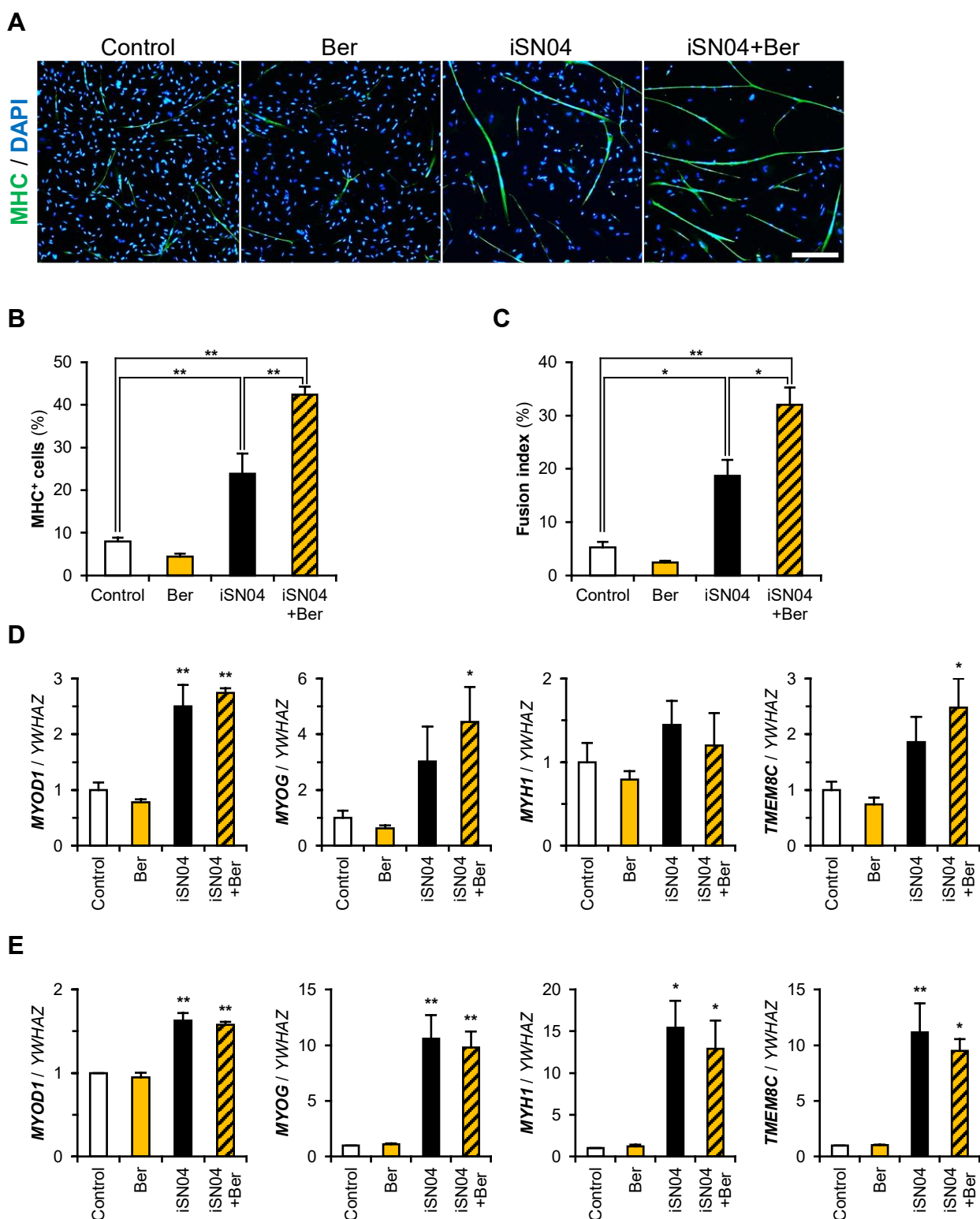
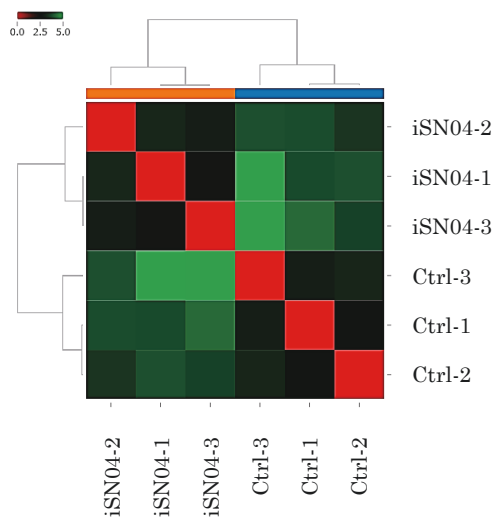


Fig. 3-4; iSN04投与が筋芽細胞の分化に与える影響と遺伝子発現の変化

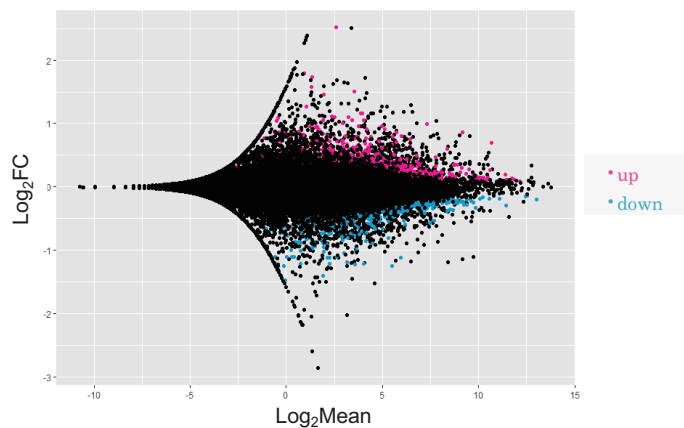
A-C: UKC筋芽細胞を10 μ Mのベルベリン (Ber) 単体、iSN04単体およびiSN04とベルベリンを共投与して48時間処理した。MHCおよびDAPI染色の代表的な画像 (A)、MHC⁺細胞の比率 (B)、および筋管形成率 (C)。Scale bar=200 μ m, * p <0.05, ** p <0.01, Scheffe's F test, n =4。

D-E: UKC筋芽細胞における筋形成関連遺伝子の発現解析。UKC筋芽細胞を10 μ Mのベルベリン (Ber) 単体、iSN04単体およびiSN04とベルベリンを共投与 (iSN04-Ber) して8時間 (D)、または24時間 (E) 処理したときの遺伝子発現をqPCRで定量した。Controlの平均値は、各遺伝子で1.0に設定した。* p <0.05, ** p <0.01 vs control, Dunnett's test, n =3-4。

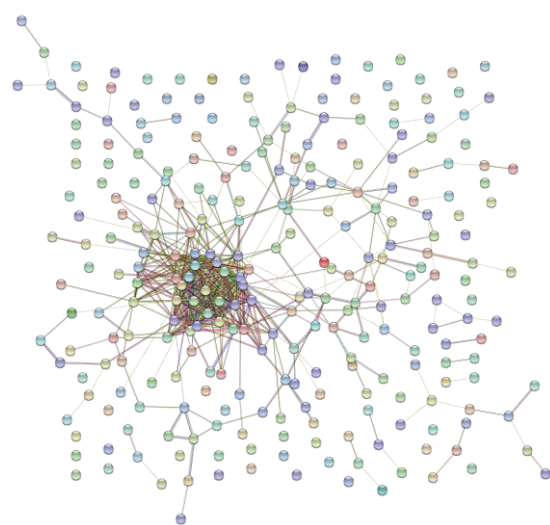
A



B

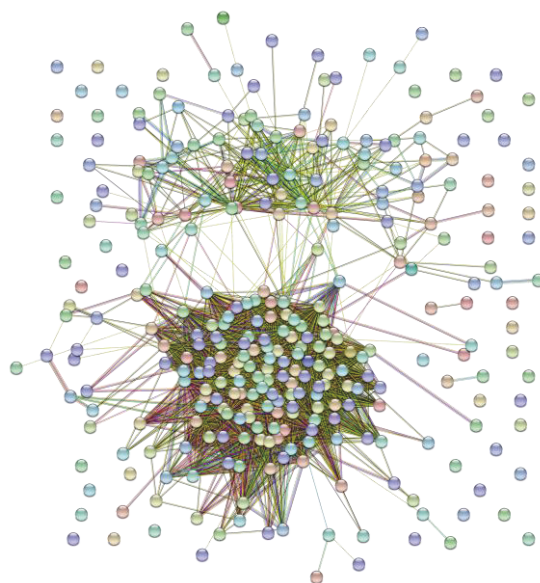


C



**iSN04-upregulated
296 genes**

D



**iSN04-downregulated
328 genes**

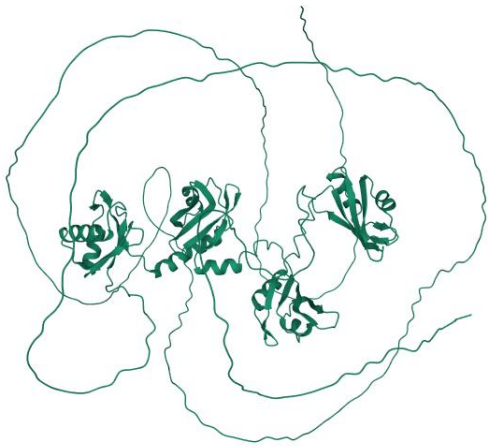
—: From curated databases
—: Experimentally determined
—: Gene neighborhood
—: Gene fusions
—: Gene co-occurrence
—: Textmining
—: Co-expression
—: Protein homology

Fig. 3-5; RaNA-SeqによるRNA-seqデータの再解析

A: 対照群とiSN04群のクラスタリング解析。

B: 対照群とiSN04投与群における遺伝子発現の差異をMA plotにより可視化した (赤; iSN04で発現が増加した遺伝子、青; iSN04で発現が減少した遺伝子)。 $p < 0.05$ (FDR), $|\text{fold-change}| \geq 2$, $n=3$ 。

C,D: 発現が増加した296遺伝子 (C)と、発現が減少した328遺伝子 (D) のSTRING解析。

A

ヒト

B

マウス

C

ニワトリ

Fig. 3-7; ヌクレオリンタンパク質の立体構造

A-C: AlphaFold2によるヒト (A)、マウス (B)、ニワトリ(C) のヌクレオリンタンパク質の立体構造予測。

第 4 章

総論

4-1 卵用鶏と肉用鶏の骨格筋芽細胞における網羅的な遺伝子発現解析

世界的な人口増加や開発途上国の経済発展により食肉の需要は増加傾向にある。中でも、安価で良質なタンパク質であり、宗教的な禁忌も少ない鶏肉は、過去 40 年で最も高い消費量を示している。これらの状況から、さらに迅速に成長するニワトリ系統の開発が求められているが、家禽の筋形成に関する報告は少ない。これまでに、肉用鶏の骨格筋の形成メカニズムを明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析が行われてきた。しかし、これらの研究では、成鶏の骨格筋組織を材料としているため、純粋に筋細胞の遺伝子発現を評価しているとはいえず、また、成育状況などの環境要因による影響の存在も否定できない。そこで本研究では、表現型の異なるニワトリ品種の比較を通じて筋芽細胞の増殖と分化の分子基盤を明らかにするため、肉用鶏と骨格筋の発生と形態が大きく異なる卵用鶏の筋芽細胞の遺伝子発現を網羅的に比較した。

本研究で、卵用鶏と肉用鶏で発現が異なる遺伝子群を同定した。これらの遺伝子の多くは細胞外および細胞表面に存在するタンパク質をコードしていた。食肉生産に特化した育種選抜によって、肉用鶏は発達した骨格筋を有するようになった。これら肉用鶏の骨格筋組織の遺伝子発現は原種とは大きく異なることが示唆されている [23-25]。近年では、気温によっても骨格筋形成が抑制される可能性が報告されている [126, 127]。これまでに家禽の筋形成メカニズムを解析した研究が報告されてきたが、純粋なニワトリ筋芽細胞の遺伝子発現を解析した報告はなかった。本研究で同定された細胞表面タンパク質の発現に関わる遺伝子は、肉用鶏の増殖と分化に関わるシグナルを解析する上で、起点となる可能性が期待される。また、本研究で同定された細胞膜の構成に関わる遺伝子群は肉用鶏の選抜マーカーとして有用であると考ええる。日本国内で育種された国産鶏から筋芽細胞を採取して、その特性を比較解析することは、国産肉用鶏の有用形質の選抜につながる可能性がある。また、肉用鶏筋芽細胞の形質と、個体の表現型や育種地域の相関を解析することで、増体率や環境適応能力が高い国産鶏の確立につながると期待される。

本研究では、卵用鶏と肉用鶏筋芽細胞の増殖と分化の過程で変化する遺伝子発現も比較した。その結果、肉用鶏筋芽細胞では、増殖と分化に関わる遺伝子群が一貫して発現変動することがわかった。これらの肉用鶏筋芽細胞の遺伝子発現は、速やかに成長し、発達した骨格筋を形成する個体の表現型をよく反映することがわかった。オントロジー解析によって得られた細胞周期関連遺伝子群の中には、細胞増殖に関する遺伝子に加え、細胞周期の停止に寄与する遺伝子も含まれていた。筋芽細胞の増殖と分化は互いに負に制御しあうプロセスである [63]。これら遺伝子群が互いを制御しあう機構を解析することは、筋芽細胞の増殖と分化メカニズムの解明につながることを期待される。

また本研究では、オントロジー解析と計量統計学的手法によってニワトリ筋芽細胞の性質に寄与すると予測される 13 遺伝子を同定した。本研究で同定された遺伝子の機

能を明らかにすることは、ニワトリ筋芽細胞の増殖と分化の分子基盤の解明につながると期待される。本研究ではその一例として、オピオイドペプチドであるエンケファリンがニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制するが筋分化には影響しないことを世界で初めて明らかにした。オピオイドペプチドは非常に短いために、偶然に内因性オピオイドペプチドと類似の作用を示すペプチドが飼料に含有されることがある [105]。本研究によって、偶発的に生成されたオピオイドが継続的に骨格筋を刺激することで、骨格筋量の減少を誘導する可能性が示唆された。本研究の成果は、肉用鶏の品種改良に貢献するだけでなく、飼料配合物を最適化するための一助となることが期待される。

4-2 myoDN-ベルベリン複合体によるニワトリ筋芽細胞の分化誘導

myoDN は、筋芽細胞を直接の標的とする 1 本鎖の ODN である [33]。myoDN がニワトリ筋芽細胞の分化をも促進すれば、哺乳類と共通した新たな筋分化メカニズムの発見につながることを期待される。しかし、myoDN が鳥類筋芽細胞にも効果があるかは不明である。そこで本研究では、myoDN がニワトリ筋芽細胞の分化を誘導するのかを検証した。

本研究により、iSN04-ベルベリン複合体が筋分化プログラムの活性化を介して、ニワトリ筋芽細胞の分化を強力に誘導することを見出した。iSN04-ベルベリン複合体の作用機構をより詳細に調べることで哺乳類と家禽で共通する筋形成プログラムの解明に貢献することが期待される。筋線維数は胚性期において筋芽細胞の数に依存して決定されることが報告されている [32]。iSN04 を筋芽細胞の増殖が終了した孵化後に給餌することで、iSN04-ベルベリン複合体による筋芽細胞の増殖抑制作用が筋線維数に及ぼす影響を最小化しながら、筋分化促進作用による筋組織の増大効果を得られると考えられる。

近年、肉用鶏の筋線維では筋線維の大小不同や変性、壊死が観察される。特に肉用鶏の胸筋においては、筋線維に沿って乳白色の線条が発達する外観的異常や、滲出液を伴う著しい弾力性硬化が観察される [120]。このような筋組織の異常は、筋線維内の酸素濃度の低下や慢性的な炎症応答が原因だと考えられている [120]。本研究によって、iSN04 が炎症シグナルを抑制することが示唆された。iSN04 が筋形成を促進するだけでなく、筋線維内で発生する炎症を抑制することが期待される。

家禽の筋形成や炎症を抑制する iSN04 は飼料配合物のリード化合物として新たな飼料配合物の開発が可能だと考えられる。近年では、AI の発達によって立体構造の似た分子を探索することが可能となった。先行研究から、iSN01 から iSN07 の塩基配列中に存在する二つの GGG 配列によって形成される立体構造が筋分化促進活性に重要であることがわかっている。iSN01 から iSN07 の活性が異なる理由を明らかにすることは、筋分化促進作用を持つ分子を *in silico* で探索するための重要な知見となることが期待される。

家禽の筋形成を直接活性化する飼料配合物の開発は食肉の増産に貢献し、食料不足問題の解決につながると期待される。

iSN04 はヌクレオリンに直接結合することで筋分化を促進する [33]。ヌクレオリンは、哺乳類だけではなく、鳥類の筋芽細胞でも発現し、いずれの動物種においても核に局在することが観察されている。本研究から、ヌクレオリン-p53 経路は、いずれの動物種でも高度に保存されている筋分化を促進する経路であることがうかがえる。考察でも述べたようにヌクレオリンが iSN04 と結合するには、ヌクレオリンの RBD4 と RGG ドメインが重要であることが推察される。ヌクレオリンの RBD ドメインの構造は自由度が高く、立体構造が決定されていない。また、筋芽細胞におけるヌクレオリンの機能は不明

な点も多い。本研究が、ヌクレオリンが核酸を認識する機構の解明や、筋分化におけるヌクレオリンの役割の解明につながることを期待する。

4-3 総括

タンパク質は人類にとって最も重要な栄養素の一つであり、我々の健康に深く関わっている。人口増加や気候変動、エネルギー問題など世界の情勢が目まぐるしく変化する中でも、効率的に食肉を生産することは、人類の存続に重要な課題である。本研究で肉用鶏筋芽細胞の増殖や分化を内外から刺激する因子を同定した。本研究によって、ニワトリ筋芽細胞の分化機構の理解を深めるとともに、産肉性の高い肉用鶏が開発されることや、肉用鶏の増体に寄与する飼料の開発が期待される。本研究が筋分化機構の理解に貢献し、品種改良に有用な知見となることを祈る。

引用文献

1. Global Change Data Lab, <https://global-change-data-lab.org/>.
2. Clune, S., Crossin, E. & Verghese, K. Systematic review of greenhouse gas emissions for different fresh food categories. *J Clean Prod* **140**, 766–783 (2017).
3. 独立行政法人 統計センター, <https://www.nstac.go.jp/>.
4. 農林水産省, 食料需給表, <https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/>.
5. Marks, H. L. Growth rate and feed intake of selected and nonselected broilers. *Growth* **43**, 80–90 (1979).
6. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., Scheideler, S. E. & Larson, B. T. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed “typical” 1957 and 1991 broiler diets. *Poult Sci* **73**, 1785–1794 (1994).
7. Hunton, P. 100 Years of poultry genetics. *World's Poult Sci J* **62**, 417–428 (2006).
8. Hoppeler, H., Lüthi, P., Claassen, H., Weibel, E. R. & Howald, H. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch* **344**, 217–232 (1973).
9. Epstein, J. A., Lam, P., Jepeal, L., Maas, R. L. & Shapiro, D. N. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J Biol Chem* **270**, 11719–11722 (1995).
10. Cornelison, D. D. & Wold, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* **191**, 270–283 (1997).
11. Tapscott, S. J. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* **132**, 2685–2695 (2005).
12. Relaix, F., Bencze, M., Borok, M. J., Der Vartanian, A., Gattazzo, F., Mademtzoglou, D., Perez-Diaz, S., Prola, A., Reyes-Fernandez, P. C., Rotini, A. & Taglietti, V. Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* **12**, 692 (2021).
13. Millay, D. P., O'Rourke, J. R., Sutherland, L. B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* **499**, 301–305 (2013).

14. Bi, P., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Fusogenic micropeptide Myomixer is essential for satellite cell fusion and muscle regeneration. *PNAS* **115**, 3864–3869 (2018).
15. Prieto, C. & Barrios, D. RaNA-Seq: interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics* **36**, 1955–1956 (2020).
16. Zhang, C., Wang, G., Wang, J., Ji, Z., Liu, Z., Pi, X. & Chen, C. Characterization and comparative analyses of muscle transcriptomes in Dorper and small-tailed Han sheep using RNA-Seq technique. *PLoS One* **8**, e72686 (2013).
17. Fonseca, L. F. S., Dos Santos Silva, D. B., Gimenez, D. F. J., Baldi, F., Ferro, J. A., Chardulo, L. A. L. & de Albuquerque, L. G. Gene expression profiling and identification of hub genes in Nellore cattle with different marbling score levels. *Genomics* **112**, 873–879 (2020).
18. Song, S.-Q., Ma, W.-W., Zeng, S.-X., Zhang, C.-L., Yan, J., Sun, C.-C., Li, X., Wang, R.-M. & Li, Z.-Q. Transcriptome analysis of differential gene expression in the longissimus dorsi muscle from Debao and landrace pigs based on RNA-sequencing. *Biosci Rep* **39**, BSR20192144 (2019).
19. Piórkowska, K., Żukowski, K., Nowak, J., Połtowicz, K., Ropka-Molik, K. & Gurgul, A. Genome-wide RNA-Seq analysis of breast muscles of two broiler chicken groups differing in shear force. *Anim Genet* **47**, 68–80 (2016).
20. Allais, S., Hennequet-Antier, C., Berri, C., Salles, L., Demeure, O. & Le Bihan-Duval, E. Mapping of QTL for chicken body weight, carcass composition, and meat quality traits in a slow-growing line. *Poult Sci* **98**, 1960–1967 (2019).
21. Moreira, G. C. M., Salvian, M., Boschiero, C., Cesar, A. S. M., Reecy, J. M., Godoy, T. F., Ledur, M. C., Garrick, D., Mourão, G. B. & Coutinho, L. L. Genome-wide association scan for QTL and their positional candidate genes associated with internal organ traits in chickens. *BMC Genomics* **20**, 669 (2019).
22. Tatsuda, K., Fujinaka, K. & Yamasaki, T. Genetic mapping of a body weight trait in chicken. *Anim Sci J* **71**, 130–136 (2000).
23. Davis, R. V. N., Lamont, S. J., Rothschild, M. F., Persia, M. E., Ashwell, C. M. & Schmidt, C. J. Transcriptome analysis of post-hatch breast muscle in legacy and modern broiler chickens reveals enrichment of several regulators of myogenic growth. *PLoS One* **10**, e0122525 (2015).

24. Kong, B.-W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., Cook, D., Piekarski, A., Dridi, S., Anthony, N. & Bottje, W. RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line. *BMC Genomics* **18**, 82 (2017).
25. Beauclercq, S., Hennequet-Antier, C., Praud, C., Godet, E., Collin, A., Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S., Bourin, M., Moroldo, M., Martins, F., Lagarrigue, S., Bihan-Duval, E. L. & Berri, C. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Sci Rep* **7**, 6447 (2017).
26. Rehfeldt, C., Fiedler, I., Dietl, G. & Ender, K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livest Prod Sci* **66**, 177–188 (2000).
27. Goldspink, G. & Ward, P. S. Changes in rodent muscle fibre types during post-natal growth, undernutrition and exercise. *J Physiol* **296**, 453–469 (1979).
28. Rowe, R. W. & Goldspink, G. Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. II. Dystrophic mice. *J Anat* **104**, 531–538 (1969).
29. Timson, B. F. & Dudenhoefter, G. A. Skeletal muscle fibre number in the rat from youth to adulthood. *J Anat* **173**, 33–36 (1990).
30. Swatland, H. J. Muscle growth in the fetal and neonatal pig. *J Anim Sci* **37**, 536–545 (1973).
31. Wegner, J., Albrecht, E., Fiedler, I., Teuscher, F., Papstein, H. J. & Ender, K. Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J Anim Sci* **78**, 1485–1496 (2000).
32. Smith, J. H. Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken^{1,2}. *Poult Sci* **42**, 283–290 (1963).
33. Shinji, S., Umezawa, K., Nihashi, Y., Nakamura, S., Shimosato, T. & Takaya, T. Identification of the myogenetic oligodeoxynucleotides (myoDNs) that promote differentiation of skeletal muscle myoblasts by targeting Nucleolin. *Front Cell Dev Biol* **8**, 616706 (2021).
34. Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G. & Kastan, M. B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**, 49–63 (2005).
35. Chen, J., Guo, K. & Kastan, M. B. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J Biol*

- Chem* **287**, 16467–16476 (2012).
36. Soddu, S., Blandino, G., Scardigli, R., Coen, S., Marchetti, A., Rizzo, M. G., Bossi, G., Cimino, L., Crescenzi, M. & Sacchi, A. Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J Cell Biol* **134**, 193–204 (1996).
 37. Cerone, M. A., Marchetti, A., Bossi, G., Blandino, G., Sacchi, A. & Soddu, S. p53 is involved in the differentiation but not in the differentiation-associated apoptosis of myoblasts. *Cell Death Differ* **7**, 506–508 (2000).
 38. Porrello, A., Cerone, M. A., Coen, S., Gurtner, A., Fontemaggi, G., Cimino, L., Piaggio, G., Sacchi, A. & Soddu, S. p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb. *J Cell Biol* **151**, 1295–1304 (2000).
 39. Gu, W., Schneider, J. W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* **72**, 309–324 (1993).
 40. Novitch, B. G., Mulligan, G. J., Jacks, T. & Lassar, A. B. Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol* **135**, 441–456 (1996).
 41. Daughtry, M. R., Berio, E., Shen, Z., Suess, E. J. R., Shah, N., Geiger, A. E., Berguson, E. R., Dalloul, R. A., Persia, M. E., Shi, H. & Gerrard, D. E. Satellite cell-mediated breast muscle regeneration decreases with broiler size. *Poult Sci* **96**, 3457–3464 (2017).
 42. Pohar, J., Lainšček, D., Fukui, R., Yamamoto, C., Miyake, K., Jerala, R. & Benčina, M. Species-specific minimal sequence motif for oligodeoxyribonucleotides activating mouse TLR9. *J Immunol* **195**, 4396–4405 (2015).
 43. Sanjaya, A., Elder, J. R. & Shah, D. H. Identification of new CpG oligodeoxynucleotide motifs that induce expression of interleukin-18 and nitric oxide in avian macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* **192**, 1–7 (2017).
 44. Gomis, S., Babiuk, L., Godson, D. L., Allan, B., Thrush, T., Townsend, H., Willson, P., Waters, E., Hecker, R. & Potter, A. Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. *Infect Immun* **71**, 857–863 (2003).

45. Xie, H., Raybourne, R. B., Babu, U. S., Lillehoj, H. S. & Heckert, R. A. CpG-induced immunomodulation and intracellular bacterial killing in a chicken macrophage cell line. *Dev Comp Immunol* **27**, 823–834 (2003).
46. Taghavi, A., Allan, B., Mutwiri, G., Van Kessel, A., Willson, P., Babiuk, L., Potter, A. & Gomis, S. Protection of neonatal broiler chicks against salmonella typhimurium septicemia by DNA containing CpG motifs. *Avian Dis* **52**, 398–406 (2008).
47. Hill, W. G. Is Continued genetic improvement of livestock sustainable? *Genetics* **202**, 877–881 (2016).
48. Scheuermann, G. N., Bilgili, S. F., Tuzun, S. & Mulvaney, D. R. Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poult Sci* **83**, 1404–1412 (2004).
49. Willson, N.-L., Forder, R. E. A., Tearle, R. G., Nattrass, G. S., Hughes, R. J. & Hynd, P. I. Evaluation of fatty acid metabolism and innate immunity interactions between commercial broiler, F1 layer × broiler cross and commercial layer strains selected for different growth potentials. *J Anim Sci Biotechnol* **8**, 70 (2017).
50. Ambo, M., Moura, A. S. a. M. T., Ledur, M. C., Pinto, L. F. B., Baron, E. E., Ruy, D. C., Nones, K., Campos, R. L. R., Boschiero, C., Burt, D. W. & Coutinho, L. L. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. *Anim Genet* **40**, 200–208 (2009).
51. Ishikawa, A., Essa, B. H., Nasr, S. M. & Suzuki, S. Mapping QTLs for breast muscle weight in an F2 intercross between native Japanese Nagoya and white plymouth rock chicken breeds. *Life* **11**, 754 (2021).
52. Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X.-J. & Zhu, D. Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC Genomics* **10**, 87 (2009).
53. Kong, B.-W., Song, J. J., Lee, J. Y., Hargis, B. M., Wing, T., Lassiter, K. & Bottje, W. Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K oligo microarray. I. Top differentially expressed genes. *Poult Sci* **90**, 2535–2547 (2011).
54. Bottje, W. G., Kong, B.-W., Song, J. J., Lee, J. Y., Hargis, B. M., Lassiter, K., Wing, T. & Hardiman, J. Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K microarray. II. Differentially expressed focus genes. *Poult Sci* **91**, 2576–

- 2587 (2012).
55. Wan, Y., Jin, S., Ma, C., Wang, Z., Fang, Q. & Jiang, R. RNA-Seq reveals seven promising candidate genes affecting the proportion of thick egg albumen in layer-type chickens. *Sci Rep* **7**, 18083 (2017).
 56. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* **93**, 23–67 (2013).
 57. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* **195**, 231–272 (1992).
 58. Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Collins, J. R., Alvord, W. G., Roayaei, J., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C. & Lempicki, R. A. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol* **8**, R183 (2007).
 59. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A. & Wishart, D. S. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* **44**, W147–W153 (2016).
 60. Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J. & von Mering, C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* **45**, D362–D368 (2017).
 61. Gent, J. P. & Wolstencroft, J. H. Effects of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin compared with those of morphine on brainstem neurones in cat. *Nature* **261**, 426–427 (1976).
 62. Denning, G. M., Ackermann, L. W., Barna, T. J., Armstrong, J. G., Stoll, L. L., Weintraub, N. L. & Dickson, E. W. Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides* **29**, 83–92 (2008).
 63. Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M.-C. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol* **5**, 1027–1059 (2015).
 64. Baghdadi, M. B., Castel, D., Machado, L., Fukada, S.-I., Birk, D. E., Relaix, F., Tajbakhsh, S. & Mourikis, P. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature* **557**, 714–718 (2018).
 65. Moser, M., Binder, O., Wu, Y., Aitsebaomo, J., Ren, R., Bode, C., Bautch,

- V. L., Conlon, F. L. & Patterson, C. BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 5664–5679 (2003).
66. Bylund, J. B., Trinh, L. T., Awgulewitsch, C. P., Paik, D. T., Jetter, C., Jha, R., Zhang, J., Nolan, K., Xu, C., Thompson, T. B., Kamp, T. J. & Hatzopoulos, A. K. Coordinated proliferation and differentiation of Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitor cells depend on bone morphogenetic protein signaling regulation by GREMLIN 2. *Stem Cells Dev* **26**, 678–693 (2017).
 67. Dahlqvist, C., Blokzijl, A., Chapman, G., Falk, A., Dannaes, K., Ibáñez, C. F. & Lendahl, U. Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* **130**, 6089–6099 (2003).
 68. Aoyama, K., Yamane, A., Suga, T., Suzuki, E., Fukui, T. & Nakamura, Y. Bone morphogenetic protein-2 functions as a negative regulator in the differentiation of myoblasts, but not as an inducer for the formations of cartilage and bone in mouse embryonic tongue. *BMC Dev Biol* **11**, 44 (2011).
 69. Friedrichs, M., Wirsdörfer, F., Flohé, S. B., Schneider, S., Wuelling, M. & Vortkamp, A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biol* **12**, 26 (2011).
 70. Haugen, F., Norheim, F., Lian, H., Wensaas, A. J., Dueland, S., Berg, O., Funderud, A., Skålhegg, B. S., Raastad, T. & Drevon, C. A. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C807-816 (2010).
 71. Amir Levy, Y., Ciaraldi, T. P., Mudaliar, S. R., Phillips, S. A. & Henry, R. R. Excessive secretion of IL-8 by skeletal muscle in type 2 diabetes impairs tube growth: potential role of PI3K and the Tie2 receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **309**, E22-34 (2015).
 72. Busquets, S., Figueras, M., Almendro, V., López-Soriano, F. J. & Argilés, J. M. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle. An antidiabetogenic effect of the cytokine. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1613–1617 (2006).
 73. Quinn, L. S., Anderson, B. G., Strait-Bodey, L. & Wolden-Hanson, T. Serum and muscle interleukin-15 levels decrease in aging mice:

- correlation with declines in soluble interleukin-15 receptor alpha expression. *Exp Gerontol* **45**, 106–112 (2010).
74. Tamura, Y., Watanabe, K., Kantani, T., Hayashi, J., Ishida, N. & Kaneki, M. Upregulation of circulating IL-15 by treadmill running in healthy individuals: is IL-15 an endocrine mediator of the beneficial effects of endurance exercise? *Endocr J* **58**, 211–215 (2011).
 75. Merino, B., Cano, V., Guzmán, R., Somoza, B. & Ruiz-Gayo, M. Leptin-mediated hypothalamic pathway of cholecystokinin (CCK-8) to regulate body weight in free-feeding rats. *Endocrinology* **149**, 1994–2000 (2008).
 76. Williamson, D. L., Butler, D. C. & Alway, S. E. AMPK inhibits myoblast differentiation through a PGC-1alpha-dependent mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E304–314 (2009).
 77. Frederick, M. J., Henderson, Y., Xu, X., Deavers, M. T., Sahin, A. A., Wu, H., Lewis, D. E., El-Naggar, A. K. & Clayman, G. L. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol* **156**, 1937–1950 (2000).
 78. Waldemer-Streyer, R. J., Reyes-Ordoñez, A., Kim, D., Zhang, R., Singh, N. & Chen, J. Cxcl14 depletion accelerates skeletal myogenesis by promoting cell cycle withdrawal. *NPJ Regen Med* **2**, 16017 (2017).
 79. Sakakima, H., Kamizono, T., Matsuda, F., Izumo, K., Ijiri, K. & Yoshida, Y. Midkine and its receptor in regenerating rat skeletal muscle after bupivacaine injection. *Acta Histochem* **108**, 357–364 (2006).
 80. Ikutomo, M., Sakakima, H., Matsuda, F. & Yoshida, Y. Midkine-deficient mice delayed degeneration and regeneration after skeletal muscle injury. *Acta Histochem* **116**, 319–326 (2014).
 81. Horiba, M., Kadomatsu, K., Nakamura, E., Muramatsu, H., Ikematsu, S., Sakuma, S., Hayashi, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Kuzuya, M., Kaname, T., Hirai, M., Saito, H. & Muramatsu, T. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* **105**, 489–495 (2000).
 82. Kuttappan, V. A., Shivaprasad, H. L., Shaw, D. P., Valentine, B. A., Hargis, B. M., Clark, F. D., McKee, S. R. & Owens, C. M. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poult Sci* **92**, 331–338 (2013).
 83. Arber, S., Halder, G. & Caroni, P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* **79**, 221–

231 (1994).

84. Chang, D. F., Belaguli, N. S., Iyer, D., Roberts, W. B., Wu, S.-P., Dong, X.-R., Marx, J. G., Moore, M. S., Beckerle, M. C., Majesky, M. W. & Schwartz, R. J. Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors. *Dev Cell* **4**, 107–118 (2003).
85. Sagave, J. F., Moser, M., Ehler, E., Weiskirchen, S., Stoll, D., Günther, K., Büttner, R. & Weiskirchen, R. Targeted disruption of the mouse *Csrp2* gene encoding the cysteine- and glycine-rich LIM domain protein CRP2 result in subtle alteration of cardiac ultrastructure. *BMC Dev Biol* **8**, 80 (2008).
86. Wang, L., Zhou, L., Jiang, P., Lu, L., Chen, X., Lan, H., Guttridge, D. C., Sun, H. & Wang, H. Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Mol Ther* **20**, 1222–1233 (2012).
87. Chen, F., Sugiura, Y., Myers, K. G., Liu, Y. & Lin, W. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 is required for maintaining the structure and function of the neuromuscular junction. *PNAS* **107**, 1636–1641 (2010).
88. Gao, H., Hartnett, S. & Li, Y. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 regulates myoblast proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **492**, 96–102 (2017).
89. Keshet, E., Polakiewicz, R. D., Itin, A., Ornoy, A. & Rosen, H. Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages during organogenesis. *EMBO J* **8**, 2917–2923 (1989).
90. Kew, D. & Kilpatrick, D. L. Widespread organ expression of the rat proenkephalin gene during early postnatal development. *Mol Endocrinol* **4**, 337–340 (1990).
91. Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. & Morris, H. R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**, 577–580 (1975).
92. Leslie, F. M. Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacol Rev* **39**, 197–249 (1987).
93. Zagon, I. S., Verderame, M. F. & McLaughlin, P. J. The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr). *Brain Res Rev* **38**, 351–376 (2002).
94. Scholar, E. M., Violi, L. & Hexum, T. D. The antimetastatic activity of enkephalin-like peptides. *Cancer Lett* **35**, 133–138 (1987).
95. Zagon, I. S. & McLaughlin, P. Endogenous opioids and the growth regulation of a neural tumor. *Life Sci* **43**, 1313–1318 (1988).

96. Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J. Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system. *Brain Res* **542**, 318–323 (1991).
97. Chang, A. C., Cochet, M. & Cohen, S. N. Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *PNAS* **77**, 4890–4894 (1980).
98. Ling, N., Burgus, R. & Guillemin, R. Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *PNAS* **73**, 3942–3946 (1976).
99. Horikawa, S., Takai, T., Toyosato, M., Takahashi, H., Noda, M., Kakidani, H., Kubo, T., Hirose, T., Inayama, S. & Hayashida, H. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. *Nature* **306**, 611–614 (1983).
100. Matsuo, H., Miyata, A. & Mizuno, K. Novel C-terminally amidated opioid peptide in human pheochromocytoma tumour. *Nature* **305**, 721–723 (1983).
101. Weber, E., Esch, F. S., Böhlen, P., Paterson, S., Corbett, A. D., McKnight, A. T., Kosterlitz, H. W., Barchas, J. D. & Evans, C. J. Metorphamide: isolation, structure, and biologic activity of an amidated opioid octapeptide from bovine brain. *PNAS* **80**, 7362–7366 (1983).
102. Sonders, M., Barchas, J. D. & Weber, E. Regional distribution of metorphamide in rat and guinea pig brain. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 892–898 (1984).
103. Miyata, A., Mizuno, K., Honzawa, M., Tohyama, M. & Matsuo, H. Adrenorphin immunoreactivity in rat brain. *Neuropeptides* **5**, 517–520 (1985).
104. Rougeot, C., Robert, F., Menz, L., Bisson, J.-F. & Messaoudi, M. Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J Physiol Pharmacol* **61**, 483–490 (2010).
105. Garg, S., Nurgali, K. & Mishra, V. K. Food proteins as source of opioid peptides-A review. *Curr Med Chem* **23**, 893–910 (2016).
106. Galassi, G., Ariatti, A., Gozzi, M. & Cavazza, S. A heroin addict with focal weakness. *Acta Myol* **32**, 27–29 (2013).
107. Marks, H. L. Growth rate and feed intake of selected and nonselected

- broilers. *Growth* **43**, 80–90 (1979).
108. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., Scheideler, S. E. & Larson, B. T. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed “typical” 1957 and 1991 broiler diets. *Poult Sci* **73**, 1785–1794 (1994).
 109. Hunton, P. 100 Years of poultry genetics. *Worlds Poult Sci J* **62**, 417–428 (2006).
 110. MacKinnon, K. M., He, H., Swaggerty, C. L., McReynolds, J. L., Genovese, K. J., Duke, S. E., Nerren, J. R. & Kogut, M. H. In ovo treatment with CpG oligodeoxynucleotides decreases colonization of *Salmonella enteritidis* in broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **127**, 371–375 (2009).
 111. Law, C. W., Chen, Y., Shi, W. & Smyth, G. K. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* **15**, R29 (2014).
 112. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. & Hassabis, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
 113. Ruijtenberg, S. & van den Heuvel, S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* **15**, 196–212 (2016).
 114. Nihashi, Y., Umezawa, K., Shinji, S., Hamaguchi, Y., Kobayashi, H., Kono, T., Ono, T., Kagami, H. & Takaya, T. Distinct cell proliferation, myogenic differentiation, and gene expression in skeletal muscle myoblasts of layer and broiler chickens. *Sci Rep* **9**, 16527 (2019).
 115. Zammit, P. S., Partridge, T. A. & Yablonka-Reuveni, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* **54**, 1177–1191 (2006).
 116. Meng, F.-C., Wu, Z.-F., Yin, Z.-Q., Lin, L.-G., Wang, R. & Zhang, Q.-W. Coptidis rhizoma and its main bioactive components: recent advances in chemical investigation, quality evaluation and pharmacological activity. *Chin Med* **13**, 13 (2018).

117. Shinji, S., Nakamura, S., Nihashi, Y., Umezawa, K. & Takaya, T. Berberine and palmatine inhibit the growth of human rhabdomyosarcoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **84**, 63–75 (2020).
118. Imenshahidi, M. & Hosseinzadeh, H. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phytother Res* **33**, 504–523 (2019).
119. Bazzicalupi, C., Ferraroni, M., Bilia, A. R., Scheggi, F. & Gratteri, P. The crystal structure of human telomeric DNA complexed with berberine: an interesting case of stacked ligand to G-tetrad ratio higher than 1:1. *Nucleic Acids Res* **41**, 632–638 (2013).
120. Huang, X. & Ahn, D. U. The incidence of muscle abnormalities in broiler breast meat—A Review. *Korean J Food Sci Anim Resour* **38**, 835–850 (2018).
121. Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. & Lipford, G. B. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *PNAS* **98**, 9237–9242 (2001).
122. Bates, P. J., Laber, D. A., Miller, D. M., Thomas, S. D. & Trent, J. O. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol* **86**, 151–164 (2009).
123. Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S. & Fukui, K. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J Cell Sci* **120**, 2091–2105 (2007).
124. Erard, M. S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. & Amalric, F. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* **175**, 525–530 (1988).
125. González, V. & Hurley, L. H. The C-terminal of Nucleolin promotes the formation of the c-MYC G-quadruplex and inhibits c-MYC promoter activity. *Biochemistry* **49**, 9706–9714 (2010).
126. Tang, J., He, A., Yan, H., Jia, G., Liu, G., Chen, X., Cai, J., Tian, G., Shang, H. & Zhao, H. Damage to the myogenic differentiation of C2C12 cells by heat stress is associated with up-regulation of several selenoproteins. *Sci Rep* **8**, 10601 (2018).
127. Shima, A. & Matsuda, R. Low culture temperature inhibits myogenic differentiation through mitochondrial activity. *Zoolog Sci* **32**, 129–134 (2015).

128. Fujimura, T., Matsumoto, T., Tanabe, S. & Morimatsu, F. Specific discrimination of chicken DNA from other poultry DNA in processed foods using the polymerase chain reaction. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 909–913 (2008).
129. Hirai, H., Verma, M., Watanabe, S., Tastad, C., Asakura, Y. & Asakura, A. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. *J Cell Biol* **191**, 347–365 (2010).
130. Baptista, F. I., Pinto, M. J., Elvas, F., Almeida, R. D. & Ambrósio, A. F. Diabetes alters KIF1A and KIF5B motor proteins in the hippocampus. *PLoS One* **8**, e65515 (2013).
131. Luo, W., Li, E., Nie, Q. & Zhang, X. Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, promotes chicken myoblast fusion. *Int J Mol Sci* **16**, 26186–26201 (2015).
132. Sławińska, A., Brzezińska, J., Siwek, M. & Elminowska-Wenda, G. Expression of myogenic genes in chickens stimulated in ovo with light and temperature. *Reprod Biol* **13**, 161–165 (2013).
133. Yue, H., Lei, X., Yang, F., Li, M. & Tang, C. Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. *Virol Sin* **25**, 425–431 (2010).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻をいただいた高谷智英先生に心から感謝の意を表します。高谷先生には研究面のみならず、様々な場面でご指導、ご助力いただき、感謝の念に堪えません。

鏡味裕先生には、この論文の執筆にあたり、必要な研究手法をご教示いただきました。特に鶏卵の培養法に関しましてひとかたならないご指導・ご鞭撻を賜りました。小野珠乙先生には、家畜生産や鳥類の生態に関してご教授賜り、この論文を完成させることができました。多大なるご支援を賜り、厚く感謝申し上げます。オリゴ DNA に関しまして有益なご助言やご支援をくださった下里剛士先生に心より感謝申し上げます。本研究で用いたオリゴ DNA の立体構造や主成分分析の解析をしてくださった梅澤公二先生に厚く御礼申し上げます。

本論文作成には欠くことのできない RNA-seq の実施ならびに、解析を行っていただいた奈良県立医科大学医学部の小林久人先生と早稲田大学理工学術院先進理工学部の浜口悠先生に厚く御礼申し上げます。東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの公募研究課題に推薦してくださった東京農業大学応用生物科学部の河野友宏先生に深謝申し上げます。

本論文の査読をくださった米倉真一先生、そして新潟大学農学部の杉山稔恵先生に心より感謝申し上げます。

分子細胞機能学研究室の皆様には、日頃の研究活動において多くの示唆を頂き、充実した研究生活を送ることができました。厚く御礼を申し上げ、感謝する次第です。

末尾となりましたが、本学位論文の完成に関わっていただいたすべての方々と、日頃より私を支えてくれた家族の皆様は心より感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会特別研究員奨励費 (19J20888) と長野県科学振興会 平成 29 年度科学研究費助成金 (H29-3-12) により遂行することができました。また本研究の RNA-seq は、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター平成 29 年度後期共同研究課題 (17B-03) として実施されました。この場をかりて御礼申し上げます。

公表論文

1. **Nihashi, Y.**, Umezawa, K., Shinji, S., Hamaguchi, Y., Kobayashi, H., Kono, T., Ono, T., Kagami, H. & Takaya, T. Distinct cell proliferation, myogenic differentiation, and gene expression in skeletal muscle myoblasts of layer and broiler chickens. *Sci Rep* **9**, 16527 (2019).
2. **Nihashi, Y.**, Shinji, S., Umezawa, K., Shimosato, T., Ono, T., Kagami, H. & Takaya, T. Myogenetic oligodeoxynucleotide complexed with berberine promotes differentiation of chicken myoblasts. *Anim Sci J* **92**, e13597 (2021).