

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 島 亜衣

脊椎動物の進化において恒温動物の出現は非常に大きな出来事であるが、いまだ十分に研究が進んでおらず、恒温動物と変温動物の遺伝子発現レベルでの相違は不明である。本論文は恒温動物と変温動物の細胞分化における温度感受性の違いを明らかにするため、転写因子レベルで分化制御機構が明らかになっている哺乳類骨格筋細胞を用いて、分化制御遺伝子の発現に対する培養温度の影響を調べた。まず、マウス筋芽細胞株 C2C12 を分化誘導後 38, 35, 30°C で培養したところ、35°C では筋分化が遅れるが正常に進行したのに対し、30°C では長期間培養しても多核の筋管細胞が形成されず、筋分化の進行が抑制された。このとき、30°C では筋分化制御因子のうち MyoD は発現したものの myogenin の発現が著しく抑制されていた。また、30°C では、筋分化制御因子が骨格筋特異的遺伝子の発現を活性化するのに必須である E2A は発現していたが、通常は分化に伴い発現が低下する分化抑制因子 Id3 の発現が高いまま維持されていた。Id3 は E2A と筋分化制御因子の相互作用を阻害するため、これが 30°C における筋分化抑制の一因であると考えられる。

低温においても筋分化を促進する生体因子の探索を行なったところ、インスリン様成長因子 (IGF)-I とアスコルビン酸リン酸(安定型ビタミン C) を培養液に添加すると、30°C でも Id3 の発現が低下し、myogenin を発現して筋管細胞を形成することを見出した。C2C12 は分化に伴って IGF-II や骨格筋特異的マイクロ RNA(miR-1, -133, -181, -206) の発現が増加することが報告されているが、これらについても 30°C では発現が認められなかったものが、IGF-I とビタミン C の添加により発現が回復した。すなわち、IGF-I とビタミン C は 30°C における骨格筋細胞の分化抑制を全面的に解除する効果を示した。さらに、IGF-I とビタミン C を添加すると 28°C でも筋管細胞を形成することが示された。IGF-I とビタミン C を添加し、温度を変化させて培養すると、筋分化の進行速度を任意に調節できることから、低温での培養系は筋分化を詳細に研究する実験ツールとしても有用である。

さらに、低温での myogenin の発現抑制と IGF-I、ビタミン C によるレスキュー効果はマウス

だけではなくヒト骨格筋細胞においても認められた。このことから、哺乳類骨格筋細胞に共通した現象であることが示唆された。また、骨格筋で IGF-I を過剰発現させたトランスジェニックマウスの筋衛星細胞を 30°C で培養すると、野生型マウスより高い割合で **myogenin** を発現したことから、生体由来の培養系でも骨格筋細胞分化における制御遺伝子発現の温度感受性は示された。

次に、骨格筋細胞分化に大きな影響を与えるミトコンドリアの機能が、低温によってどのように変化するのかを検討した。C2C12 細胞を用いて、38°C では分化に伴って発現が増加するシトクロム c 酸化酵素サブユニット I の発現を 30°C で調べたところ、発現が著しく低下していた。すなわち、30°C ではミトコンドリアが正常に機能していないことが示唆された。ただし、IGF-I とビタミン C を添加するとサブユニット I の発現は回復した。ミトコンドリア膜電位についても調べたところ、30°C ではミトコンドリア膜電位の高い細胞はほとんど存在しなかったのに対し、IGF-I とビタミン C を添加すると膜電位の高いミトコンドリアが増加した。これらの結果から、低温での筋分化抑制にはミトコンドリアが大きく関与していることが示された。また、IGF-I とビタミン C を添加して培養した場合、**myogenin** が発現した細胞で特にミトコンドリア膜電位の上昇が認められたことから、筋分化に伴うミトコンドリアの変化が **myogenin** によって制御されることが示唆された。

今後は、マウスおよびヒト骨格筋細胞で得られた以上の結果を変温動物や長期の低体温に耐えるシステムを有する冬眠動物の骨格筋と比較することで、進化生物学的にも新たな知見をもたらすものと期待される。また、低温でも筋分化を促進する IGF-I やビタミン C は低体温療法や凍傷治療に対しても重要な示唆を与えられ、医学的価値が極めて高いと思われる。本論文は、哺乳類骨格筋細胞における分化制御遺伝子の発現やミトコンドリア機能の温度感受性を初めて示すものであり、本審査会は博士(学術)を授与するにふさわしいものと認定する。