【41】

氏　名(本　籍)	真島　淳(東京都)
学位の種類	博　士(理　学)
学位記番号	博甲第 1,634 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Expression of Chicken Troponin T Isoforms in Cultured Skeletal Muscle Cells (培養ニワトリ骨格筋細胞における Troponin T Isoforms 発現様式)
主　査	筑波大学教授　理学博士　平林民雄
副　査	筑波大学教授　理学博士　井上　勲
副　査	筑波大学教授　理学博士　小熊　譲
副　査	筑波大学助教授　理学博士　林　純一

論文の内容の要旨

骨格筋はその収縮特性と生化学的特性により速筋と遅筋に分けることができ，筋肉の型を反映した isoform を発現することが知られている。そのタンパク質の1つである troponin T の発現様式は細胞系列において決定されていることが示唆されており，troponin T isoform は遺伝子の転写制御・alternative splicing の機構を解明し，細胞系列の確立過程を調べるために良いマーカーであると言える。本研究では，異なる筋組織からの単離培養細胞における troponin T の発現様式を調べ，その発現機構と細胞系列との関連を考察するために，発生段階初期の筋組織及び培養骨格筋細胞における troponin T isoform 発現の安定性を調べた。

まず，発生段階初期の胚の筋肉を連続切片にし，隣接した切片を速筋と遅筋の troponin T isoform を特異的に認識する2種類の抗血清を用いて染色した。大胸筋（速筋）と腓腹筋（混合筋）では15日胚，前広背筋（遅筋）では17日胚で既に adult のニワトリと同じ troponin T isoform を発現していたが，それ以前の時期では adult と異なる複数種の isoform を同時に発現していた。

骨格筋の培養は筋細胞の純度を上げた後に37℃，5％CO_2で行った。数日後，融合する細胞が出現したことを確かめて成長培養液から血清濃度を下げた分化培養液に換え培養し，十分に分化させた。融合し十分に成熟した筋細胞を前述の抗血清によって2重染色し，それを計数した。培養細胞は troponin T isoform の発現に基づいて速筋型isoformのみを発現する細胞と速筋型と遅筋型の両方の isoform を発現している細胞の2種類に分類できた。遅筋型 isoform のみを発現する細胞は見つからなかった。この2種に分類された骨格筋細胞の存在比は由来する筋組織と発生段階を反映していると思われる。筋形成の位相は primary myogenesis から secondary myogenesis へと移る時期が8日胚前後であり，筋繊維が成熟し始め satellite cell が出現する時期が16日胚前後であると考えられている。今回示した細胞比の遷移と筋形成の位相が一致していると思われる。

次に troponin T isoform の発現が遺伝的に安定であるか否かを調べ，細胞内の発現プログラムの安定度を評価するため継代クローン解析を行った。筋細胞を低密度で培養しコロニーを形成させて，これを印しておき，両端の開いたシリンダーをかぶせてそのコロニーの細胞だけを取り出して再び低密度で培養した。この方法で植え継ぎを繰り返して troponin T isoform の発現を調べた。その結果13日胚と孵化後1日齢のニワトリの大胸筋から5回の植え継ぎを経たクローンでも isoform の発現様式には変化がなかった。このことから troponin T isoform の発現は培養下で安定であるといえる。

以上の結果からtroponin T isoformの発現調節には細胞系列が重要な役割を果たしていること，細胞系列内ではtroponin T isoformの発現が非常に安定であること，及び，細胞外からのさらなる調節によって組織特異的なisoformを発現していることが判明した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は生体内で観察される骨格筋タンパク質troponin T isoformの発現様式は培養下で完全には再現できないものの，その発現様式は細胞系列内で安定的に決められていることを明確に証明した。とりわけ遅筋型isoformのみを発現する細胞は培養下では出現しないこと，クローン化した筋肉細胞を継代培養してもこのタンパク質の発現様式は変わらないことを示した点は遺伝子発現の決定機構を理解する上で重要な研究成果であると評価できる。

よって，著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。