

## HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素ノックアウト細胞におけるミトコンドリア機能の解析

河合 あかり (筑波大学 生物学類)

指導教員：中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

### 【背景・目的】

コレステロールは、主に脂質二重層をもつ細胞膜の流動性の維持や、ホルモンの合成など様々な生命現象に関わっており、生体において不可欠な化合物である。このコレステロールはメバロン酸経路によって合成され、この反応は細胞において主に細胞質基質上で行われている。

メバロン酸経路とは、アセチル CoA から始まり、中間体としてヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMGC<sub>o</sub>A) からメバロン酸が合成され、最終的にコレステロールが合成される反応経路である。この経路における律速段階は HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素によって HMGC<sub>o</sub>A がメバロン酸に還元される反応である。そのため HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素はメバロン酸経路における重要な酵素となっている。事実、HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素阻害薬は、コレステロール降下薬として広く臨床で用いられている。また、発症機構は不明であるが HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素を阻害した際、生体において筋障害が見られることが知られている。これらのことから、メバロン酸経路は筋分化や筋再生に関わっていることが示唆される。さらに、筋障害発生時にミトコンドリア機能障害がみられることや、ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系において電子伝達体、ユビキノンの生合成にメバロン酸経路由来のポリプレニル側鎖が関与していることなどから、メバロン酸経路のミトコンドリア機能への関与も予想される。

そこで本研究では、筋芽細胞株 C2C12 において HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素をノックアウトした細胞モデルを用い、メバロン酸経路が筋細胞における分化や増殖、ミトコンドリア機能に与える影響の解析を目的とする。

### 【方法】

#### 1. HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素ノックアウト C2C12 細胞の樹立

本実験で用いる細胞株は、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞である。CRISPR-Cas9 により、HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素の遺伝子上に HDR プラスミドを挿入することで HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素ノックアウト C2C12 細胞を樹立した。これに対し、プラスミド未挿入の C2C12 細胞をコントロール (Ctrl) とし以下の実験を行った。

#### 2. C2C12 細胞における cell growth の検証

上記の C2C12 Ctrl/KO 細胞に対し、通常培養下での細胞増殖速度の比較を行った。細胞は 10% FBS (ウシ胎児血清) を含む high glucose DMEM で培養し、細胞播種から 6、12、24、30、36、42、48 時間後の細胞数をカウントした。

#### 3. C2C12 細胞における筋細胞分化形態の観察

筋芽細胞である C2C12 細胞は、特定の分化誘導培地で培養すると筋芽細胞同士が融合して多核の筋管を形成し、筋分化する。そこで本実験では C2C12 Ctrl/KO 細胞を 80-90% コンフルエン

トになるまで培養し、その後分化誘導培地である 2% HS (ウマ血清) を含む high glucose DMEM に交換し、1 日置きの培地交換で最大 96 時間観察を行った。加えて、筋分化の程度を示す指標として Fusion index の測定も行った。測定にあたり、細胞をギムザ染色液で染色した。Fusion index は、無作為に選んだ 4 つの領域において、総核数あたりの多核細胞質になっている核数のパーセンテージを算出することで求めた。

#### 4. メバロン酸添加時の C2C12 細胞の筋分化形態の観察

筋分化不全とメバロン酸経路の関連性を検討するため、メバロン酸経路において HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素の直下にあるメバロン酸を添加し、分化不全の改善の有無を調べた。通常分化誘導培地に加え、メバロン酸をそれぞれ 10 μM、5 mM 含む分化誘導培地を作成し、これを 1 日置きに交換した。観察は最大 96 時間行い、形態観察と Fusion index の算出により分化不全改善の程度を比較した。

#### 5. HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素ノックアウト C2C12 細胞におけるミトコンドリア機能の解析

ATP は細胞質基質で行われる解糖系と、ミトコンドリア内で行われるクエン酸回路、電子伝達系の反応によって生成される。解糖系はグルコースをピルビン酸などの有機酸に異化し、グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP を生成する。これに対しクエン酸回路は解糖系によって得られたピルビン酸をアセチル CoA へ変換して電子伝達系で用いる NADH を生成し、電子伝達系では解糖系に比べて大幅に効率よく ATP が生成される。ミトコンドリア機能障害が起きると、この電子伝達系が十分に機能しなくなり、代わりに解糖系の亢進が起こる。解糖系の亢進は副産物として合成される乳酸の増加につながる。このため、低 ATP・高乳酸の状態はミトコンドリア機能障害の指標の一つとなっている。

本実験では、ATP と乳酸の定量キットを用い、C2C12 Ctrl/KO 細胞におけるミトコンドリア機能の評価を行った。

### 【結果】

今回の実験において、HMGC<sub>o</sub>A 還元酵素をノックアウトした筋芽細胞において筋分化不全が引き起こされることが半明した。4 の実験において、この分化不全がメバロン酸の添加により部分的に改善された。

この他の詳細な結果、考察については発表会にて報告予定である。