

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 10 年度博士課程 進学

氏名 小檜山篤志

指導教官 渡部終五

論文題目 コイ速筋ミオシン重鎖アイソフォーム遺伝子の転写調節機構に関する研究

コイやキンギョなどの広温域性淡水魚は、季節的な環境水温の変動に応じて体温も大幅に変化する。生体内の化学反応の多くは温度の影響を受けることから、これら魚類の代謝や運動能力も環境水温に依存して大きく変化することが予想される。しかしながら、コイでは温度馴化に伴い、ミオシン・アイソフォームの組成を変え ATPase 活性を変化させることが明らかにされており、この事実が幅広い温度域での高い遊泳能力を可能にしていると考えられている。ところで、筋肉の主要タンパク質であるミオシンは、約 200kDa の重鎖 2 本と約 20kDa の軽鎖 4 本によって 1 分子が構成される。その後のコイを対象とした研究で、ATP およびアクチン結合部位を有するミオシン重鎖につき、10°C および 30°C 馴化コイ速筋で転写量が增大するそれぞれ 10°C および 30°C 型ミオシン重鎖 cDNA が単離され、ミオシン・アイソフォームの変換は転写レベルで調節されていることが示された。しかしながら、その遺伝子発現調節機構は未だ不明である。

このような背景の下、本研究ではまず、コイ速筋から筋特異的転写因子 MyoD ファミリーおよび myocyte-specific enhancer factor 2 (MEF2) ファミリーの cDNA を単離した。次に、これら転写因子につき種々の発生段階のコイ、および成魚の温度馴化過程における遺伝子発現パターンを調べ、ミオシン重鎖のものと比較した。また、高温誘導型ミオシン重鎖遺伝子 MyHC30 を単離し、その構造遺伝子領域および 5' 非転写領域の塩基配列を決定した。さらに本遺伝子につき、既報の低温誘導型ミオシン重鎖遺伝子 MyHC10 とともにプロモーター活性の測定を行い、それ

それぞれの転写調節領域を同定した。本研究は以上の成果をとりまとめたもので、概要は以下の通りである。

1. コイ筋特異的転写因子の cDNA クローニング

まず受精後 30 時間のコイ卵および孵化直後のコイ仔魚より調製した全 RNA から first strand cDNA を合成した。次に既報の生物種の塩基配列を参考に作製したプライマーを用いて RT-PCR を行い、MyoD ファミリー転写因子 myf-5、MyoD および myogenin の cDNA 断片を増幅した。さらに、RACE 法を用いて全長をコードする塩基配列を決定した。アミノ酸配列を演繹したところ、上記の順にそれぞれ 240、275 および 253 アミノ酸をコードしていることが示された。3 つの転写因子とも、DNA との結合および二量体の形成に重要である basic helix-loop-helix 領域のアミノ酸配列は、他生物種のものと同様によく保存されていた。

次に、コイ速筋 cDNA ライブラリーを鋳型に他生物種の塩基配列を参考に作製したプライマーで PCR を行い、コイ MEF2C の cDNA 断片を得た。さらに、本 DNA 断片をプローブに用い、cDNA ライブラリーから MEF2 ファミリー転写因子 MEF2A および MEF2C cDNA を単離して塩基配列を決定した。塩基配列からアミノ酸配列を演繹したところ、それぞれ 472 および 474 アミノ酸をコードしていることが示された。両転写因子とも、DNA との結合および二量体の形成に必須な MADS box および MEF2 domain のアミノ酸配列は、既報の生物種のものと同様によく保存されていた。

2. コイ発生段階および成魚の温度馴化に伴う筋特異的転写因子および速筋ミオシン重鎖の遺伝子発現パターン

種々の発生段階のコイを用いて、MyoD ファミリーおよび MEF2 ファミリーにつきノーザンプロット解析を行い、ミオシン重鎖および α -アクチン転写産物の発現パターンと比較した。その結果、まず転写因子をコードする mRNA が発現した。すなわち、myf-5、MyoD および MEF2C mRNA は受精後 30 時間、myogenin および MEF2A mRNA は受精後 42 時間の卵で検出された。一方、骨格筋ミオシン重鎖を共通認識するプローブおよび α -アクチン特異的プローブでは、転写因子よりやや遅れて、受精後 61 時間の卵でシグナルが得られた。なお、転写因子については myf-5 を除き孵化後でも mRNA が観察されたことから、この段階でもミオシン重鎖遺伝子の転写調節を行っていることが示唆された。

次に、20°C に馴化させたコイ成魚につき、飼育水温を 20°C から 30°C に 1 日で変化させ、その後水温を 30°C に保ち、ミオシン重鎖アイソフォーム mRNA の変化を調べた。その結果、水温の上昇後 3 日目で 30°C 型ミオシン重鎖の mRNA 蓄積量は大きく増大し、逆に 10°C 型は著しく減少した。MyoD および myogenin の mRNA 蓄積量は水温の上昇後 1 日目に増大した後、MyoD では速やかに 20°C 時のレベルに戻り、myogenin では 7 日目に大きく減少した。一方、MEF2A および MEF2C の mRNA 蓄積量は 30°C 飼育中、低下することが示された。

飼育水温を 20°C から 10°C に変化させた場合、30°C 型ミオシン重鎖の mRNA 蓄積量は減少するものの、10°C

型はほとんど変化しなかった。MyoD の mRNA 蓄積量は緩やかに減少し、MEF2C の mRNA 蓄積量は 10°C 飼育中、緩やかに増大した。以上のように、MyoD ファミリーおよび MEF2 ファミリー転写因子の遺伝子発現は飼育水温の変化に伴って複雑な変動を示したが、ミオシン重鎖アイソフォーム遺伝子の発現調節に関与する可能性も示された。一方、温度馴化過程におけるミオシン重鎖アイソフォーム mRNA の発現局在を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べたところ、速筋細胞全体に一様に分布することが明らかになった。

3. コイ速筋ミオシン重鎖遺伝子のクローニング

コイのゲノムライブラリーから高温誘導型ミオシン重鎖遺伝子 MyHC30 を単離した。MyHC30 の構造遺伝子領域の塩基配列を決定し、既報の 10°C および 30°C 型ミオシン重鎖 cDNA のものと比較したところ、30°C 型によく類似することが示された。また、MyHC30 の転写開始点より 5' 上流域の塩基配列を決定した結果、約 3kb 内には MyoD ファミリーが結合する E-box、MEF2 ファミリーの結合配列、カルシニューリン依存的に筋特異的遺伝子の発現を誘導する nuclear factor of activated T-cell (NFAT) 結合配列、CCAAT/enhancer-binding protein が結合する CCAAT box、および基本転写因子群が結合する TATA box が存在した。次に、MyHC30 の 5' 上流約 1kb を、既報のコイ低温誘導型ミオシン重鎖遺伝子 MyHC10 および高温誘導型と報告されたコイ・ミオシン重鎖遺伝子 FG2 のものと比較した。その結果、TATA box、CCAAT box および約-500b に位置する E-box とその周辺の塩基配列が良く保存されており、これら配列がミオシン重鎖の筋特異的な遺伝子発現に重要であることが示唆された。また、MyHC30 の約 -1kb には既報の FG2 と同様に MEF2 結合配列が存在した。

4. コイ速筋ミオシン重鎖遺伝子の 5' 上流調節領域の機能解析

既報の MyHC10 の 5' 上流域の機能解析を行うため、同領域を 5' 側から欠失させた様々な長さの DNA 断片を pGL3-Basic vector のルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に組み込み、レポーターアッセイ用のプラスミドを構築した。10°C 馴化コイ成魚の背側速筋に本プラスミドを注入して 15 日後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、転写活性には本遺伝子の 5' 上流 824-921b が重要であることが示された。この配列中には、NFAT とともに筋特異的遺伝子の転写を活性化する GATA 因子およびマウス IIB 型ミオシン重鎖遺伝子の 5' 上流域にみられる Oct-1 の結合配列が存在し、これら転写因子が MyHC10 の遺伝子発現を活性化することが示唆された。また、本遺伝子の 5' 上流約 3k および 1kb を組み込んだプラスミドを 10°C および 30°C 馴化コイに注入してプロモーター活性を測定した結果、10°C 馴化コイでの値は 30°C 馴化コイのものより有意に高かった。したがって、MyHC10 の 5' 上流約 1kb 内には、温度依存的な発現調節に関わる配列が存在することが示唆された。

一方、MyHC30 の 5' 上流域につき機能解析を行ったところ、既報の FG2 と同様に約-1kb に存在する MEF2 結合配列が 30°C 馴化コイにおける転写活性に必要であることが示された。また、本遺伝子の 5' 上流 3k および 1kb を組

み込んだプラスミドを 10°C および 30°C 馴化コイに注入してプロモーター活性を調べたところ、両馴化コイ間で差はみられなかった。したがって、MyHC30 の 5'上流約 3kb 内に温度依存的な発現調節に関わる配列は存在しないことが示唆された。

以上、本研究により、コイ MyoD ファミリーおよび MEF2 ファミリーは種々の発生段階のみならず、孵化後のコイでも筋特異的遺伝子の転写を調節している可能性が示された。また、これら転写因子は成魚での飼育水温の変化に伴うミオシン重鎖アイソフォームの発現変動にも関与することが示唆された。さらに、低温誘導型ミオシン重鎖遺伝子 MyHC10 および高温誘導型の MyHC30 につき、それぞれ 10°C および 30°C 馴化コイにおける転写活性に必要な領域を同定した。以上のように本研究は馴化温度依存的に発現するコイ・ミオシン重鎖アイソフォーム遺伝子の発現調節機構の一端を明らかにしたもので、これらの成果は比較生理生化学上のみならず、魚類の高度利用上にも資するところが大きいものと考えられた。