

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小 檜 山 篤 志

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。その後、10℃および30℃馴化コイ速筋で転写量が増大するそれぞれ10℃および30℃型コイ・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が、その遺伝子発現調節機構は不明である。そこで本研究ではまず、コイからMyoDファミリーおよびMEF2ファミリーのcDNAを単離した。次に、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。さらに、高温誘導型ミオシン重鎖遺伝子MyHC30を単離して塩基配列を決定し、既報の低温誘導型のMyHC10とともに転写調節領域を同定した。

まず、コイ卵および仔魚のfirst strand cDNAを鋳型に、PCR法を用いてmyf-5、MyoDおよびmyogenin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、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。さらに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を単離した。アミノ酸配列を演繹したところ、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。

次に、種々の発生段階のコイを用いてノーザンブロット解析を行った結果、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、骨格筋ミオシン重鎖および α -アクチンでは、受精後61時間の卵でシグナルが得られた。さらに飼育水温を20℃から30℃に1日で変化させ、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、30℃型ミオシン重鎖のmRNA蓄積量は増大し、10℃型は減少した。MyoDおよびmyogeninのmRNA蓄積量は増大した後、MyoDでは20℃時のレベルに戻り、myogeninでは減少した。一方、MEF2AおよびMEF2CのmRNA蓄積量は低下した。水温を20℃から10℃に変化させた場合、30℃型ミオシン重鎖mRNA蓄積量は減少したが、10℃型は変化しなかった。またMyoDのmRNA蓄積量は減少し、MEF2CのmRNA蓄積量は増大した。さらに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示された。

次に、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たところ、30℃型ミオシン重鎖cDNAによく類似した。

また、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が保存されており、これらがミオシン重鎖の遺伝子発現に重要であることが示唆された。

さらに、MyHC10の5'上流域につき機能解析を行ったところ、10℃馴化コイでの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。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℃および30℃馴化コイに注入して活性を測定した結果、本遺伝子の5'上流約1kb内には、温度依存的な発現に関わる配列が存在することが示唆された。また、MyHC30の5'上流域につき機能解析を行ったところ、約-1kbに存在するMEF2結合配列が30℃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。次に、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℃および30℃馴化コイに注入して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。

以上、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、学術上、応用上に寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。