

## 論文の内容の要旨

水圏生物学専攻  
平成 12 年度博士課程 進学  
氏 名 糸井 史朗  
指導教官 渡部 終五

### 魚類 $F_0F_1$ -ATPase の温度適応に関する分子生物学的および生化学的研究

魚類は変温動物でその体温は環境水温の変化に伴って変化する。体温の変化は代謝に大きな影響を及ぼすことが想定されるが、広温域性淡水魚のコイ *Cyprinus carpio* やキンギョ *Carassius auratus* は、季節的に 0°C 付近から 30°C 以上までと大きく変動する温度帯においても恒常的な生命活動を維持する。このような進化の過程で魚類が獲得した温度適応能については、種々の側面から分子レベルの研究が行なわれてきた。例えば、コイやキンギョでは温度馴化に伴って異なるミオシン・アイソフォームを発現して広い温度帯で遊泳運動を行なうことが明らかにされている。一方、呼吸代謝は  $Q_{10}$  の法則で知られるように 10°C の温度低下で約 1/2 に低下する。したがって、低温でも維持される魚類の高い遊泳能力は、何らかのエネルギー代謝の補償機構が存在しなければ達成できない。しかしながら、魚類のエネルギー代謝に関する分子レベルの知見は少なく、とくに温度適応との関係からみた研究はほとんど見当たらない。

本研究はこのような背景の下、コイの低温馴化に伴って発現量が増大する水溶性タンパク質 55 kDa 成分の同定を行ったところ、ミトコンドリア ATP 合成酵素 ( $F_0F_1$ -ATPase) の  $\beta$ -サブユニットであることが示された。そこで、コイを対象に本酵素を構成する種々のサブユニットの低温馴化に伴う発現変動を詳細に検討した。同時に、低温および高温馴化魚の普通筋からミトコンドリアを単離し  $F_0F_1$ -ATPase 比活性を測定して比較した。

さらに、水温を変えて飼育した海産魚のヒラメ *Paralichthys olivaceus* およびマダイ *Pagrus major* につき、 $F_0F_1$ -ATPase の各サブユニットの発現量や比活性の変化を調べて比較したもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

### 1. コイの温度馴化に伴う普通筋水溶性タンパク質組成の変化

まず、10°C および 30°C で 5 週間以上飼育して温度馴化させたコイ成魚の普通筋から水溶性タンパク質を抽出し、等電点電気泳動と SDS-PAGE からなる 2 次元電気泳動分析に付して、タンパク質組成を両馴化魚間で比較した。その結果、10°C 馴化魚の 55 kDa 成分量は 30°C 馴化魚のその約 2 倍に上昇していることが明らかとなった。そこで、この 55 kDa 成分の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、VAPAAAAAASGR 以下計 37 残基が決定された。当該配列を Blast 検索したところ、他生物種の  $F_0F_1$ -ATPase  $\beta$ -サブユニットと高い相同性を示した。

### 2. コイの温度馴化に伴う普通筋 $F_0F_1$ -ATPase の遺伝子解析

コイの低温馴化に伴って発現量の増大した 55 kDa 成分が  $F_0F_1$ -ATPase  $\beta$ -サブユニットであることが示唆されたことから、様々な真核生物の当該サブユニット遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを作製し、10°C 馴化コイ普通筋 cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行った。さらに、増幅 cDNA 断片をプローブにスクリーニングを行ったところ、先の N 末端アミノ酸配列分析で決定された配列を含む  $F_0F_1$ -ATPase  $\beta$ -サブユニットの全アミノ酸 518 残基をコードする 1,777 bp の cDNA クローンが得られた。さらに、この cDNA をプローブに 10°C および 30°C 馴化コイ普通筋の mRNA 蓄積量を調べたところ、10°C 馴化魚は 30°C 馴化魚の約 2 倍であることが示された。

$F_0F_1$ -ATPase は、ミトコンドリア内膜に存在する分子量 50 万にも及ぶ巨大タンパク質複合体で、核およびミトコンドリア・ゲノムにコードされる多数のサブユニットから構成され、電子伝達系の酵素群と共役して細胞に必要な ATP の大部分を合成する。そこで、 $\beta$ -サブユニットと同様に核ゲノムによってコードされている  $\alpha$ -、 $\gamma$ -、 $c$ -サブユニットの全長をコードする cDNA をコイ普通筋からクローン化した。その結果、各 cDNA は上記の順にそれぞれ、552 残基をコードする 1,889 bp、292 残基をコードする 1,119 bp、および 140 残基をコードする 667 bp の塩基からなることが示された。また、各サブユニットの mRNA 蓄積量は低温馴化に伴っていずれも約 2 倍増大することが明らかとなった。

一方、ミトコンドリア・ゲノムにコードされている  $F_0F_1$ -ATPase の  $a$ -および A6L-サブユニット (ATPase 6-8) や、ミトコンドリアの内膜に存在する電子伝達系のチトクローム  $c$  酸化酵素サブユニット II およびチトクローム  $b$  の mRNA 蓄積量については、10°C 馴化魚は 30°C 馴化魚の約 7 倍と著しく高かった。なお、mRNA 蓄積量の測定に当たっては、各サブユニットの cDNA 断片を既報のコイのミトコンドリア・ゲノム全塩基配列

のデータを用いて PCR で増幅し、その増幅産物をプローブとしてノザンブロット解析を行った。

ところで、ミトコンドリア・ゲノムにコードされた成分の mRNA 蓄積量の増大や、筋組織中のミトコンドリア量の増大には mtDNA 量の変化が関与することが報告されている。そこで、核ゲノム・コードの  $F_0F_1$ -ATPase  $\alpha$ -サブユニットおよびミトコンドリア・ゲノム・コードの ATPase 6-8 の部分 DNA 配列をプローブにサザンブロット解析を行い、核ゲノム量に対する mtDNA 量の比につき 10°C および 30°C 馴化コイを対象に調べた。その結果、mtDNA 相対量の馴化温度による違いは認められなかった。

### 3. コイの温度馴化に伴う普通筋 $F_0F_1$ -ATPase 量および比活性の変化

まず、10°C および 30°C 馴化コイの普通筋から 1% SDS および 4M 尿素を含む溶液で全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE 分析した。次に、市販の抗ウシ  $F_0F_1$ -ATPase  $\alpha$ -サブユニット・マウス抗体を用いてイムノブロッティングを行った。その結果、10°C 馴化コイ筋組織中の  $F_0F_1$ -ATPase  $\alpha$ -サブユニット量は 30°C 馴化コイの約 2 倍と測定され、先の水溶性タンパク質を試料とした 2 次元電気泳動分析による差と一致した。

次に、10°C および 30°C 馴化コイ普通筋からミトコンドリアを単離し SDS-PAGE 分析に付した。次に、 $F_0F_1$ -ATPase  $\alpha$ -サブユニットについては前述と同様のイムノブロッティングで当該バンド同定し、別途 SDS-PAGE ゲルタンパク質染色した後に定量した。一方、 $F_0F_1$ -ATPase  $\beta$ -サブユニットについては SDS-PAGE ゲルをタンパク質染色した後に当該バンドの定量を行なった。その結果、 $\alpha$ -および  $\beta$ -サブユニット量とも両馴化魚のミトコンドリア間で差は認められなかった。

さらに、単離したミトコンドリアを対象に  $F_0F_1$ -ATPase 比活性を 25°C で測定したところ、10°C および 30°C 馴化コイでそれぞれ、 $155 \pm 11$  および  $67 \pm 5$  nmol/min · mg mt protein と、前者は後者の約 2 倍であった。なお、この差は測定温度 10°C および 30°C でも同じであった。以上のように、コイは  $F_0F_1$ -ATPase を量的および質的に変化させて体温の低下に伴う代謝活性の低下を補償していることが示された。

### 4. ヒラメおよびマダイの飼育温度依存的な普通筋 $F_0F_1$ -ATPase の変化

ヒラメおよびマダイについては、8~10°C の低温および 23~25°C の高温で 4 週間以上飼育し、 $F_0F_1$ -ATPase の変化を調べた。まず、ヒラメにつき  $\beta$ -サブユニットを指標に単位全筋肉タンパク質量当りの  $F_0F_1$ -ATPase 量の変化を検討した。その結果、10°C 飼育ヒラメの  $F_0F_1$ -ATPase 量は 25°C 飼育ヒラメの約 3 倍であることが示された。一方、 $F_0F_1$ -ATPase の比活性については 10°C および 25°C 飼育魚でいずれも約 80 nmol/min · mg mt protein と、両飼育魚間で差は認められなかった。したがって、ヒラメの場合は低温下の代謝を  $F_0F_1$ -ATPase 量の増大のみで補償しているものと結論された。

次に、マダイでは 8°C 飼育魚は 23°C 飼育魚に比べて、単位全筋肉タンパク質当たりの

$F_0F_1$ -ATPase 量は約 2 倍増大した。さらに、本酵素の比活性は 8°C および 23°C 飼育魚でそれぞれ  $65 \pm 9$  および  $33 \pm 9$  nmol/min · mg mt protein と、8°C 飼育魚で約 2 倍大きいことが示された。したがって、マダイでは低温飼育に伴い、コイと同様の  $F_0F_1$ -ATPase の量的および質的变化が生じて代謝の補償を行なっていることが明らかとなった。

以上、本研究により、コイは低温馴化に伴い、 $F_0F_1$ -ATPase を量的に増大させるとともに、比活性をも増大させ、低温下におけるエネルギー代謝を量的および質的に補償していることが示された。一方、海産魚のヒラメでは低温下の代謝を  $F_0F_1$ -ATPase 量の増大のみで補償していることが示された。さらに、同じく海産魚のマダイでは、低温飼育に伴いコイと同様の  $F_0F_1$ -ATPase の量的および質的变化を示した。しかしながら、今回検討した 3 魚種のいずれも低温下の代謝補償を  $F_0F_1$ -ATPase の何らかの変化で補償していることが明らかにされた。筋肉中の ATP の残存量は死後硬直の進行に大きな影響を与えることから、魚類の低温飼育で亢進される  $F_0F_1$ -ATPase 活性の増大は、魚類の高鮮度保持に有利と考えられ、今後この方面の研究の発展が期待される。