

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 糸井 史朗

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やキンギョは、幅広い温度域で恒常的な生命活動を維持する。このような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が、魚類のエネルギー代謝について温度適応との関係からみた分子レベルの研究は少ない。本論文では、コイの低温馴化に伴って発現量が增大する水溶性タンパク質 55 kDa 成分の同定を行って、ミトコンドリア ATP 合成酵素 (F_0F_1 -ATPase) の β -サブユニットであることが示されたことから、コイを対象に本酵素の他サブユニットの低温馴化に伴う発現変動を詳細に検討するとともに、低温および高温馴化魚の普通筋の F_0F_1 -ATPase 比活性を測定した。さらに、ヒラメおよびマダイについても飼育温度の違いに伴う本酵素量や比活性の変化を調べて比較した。

まず、コイでは 10 および 30°C で 5 週間以上飼育して温度馴化させた後、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 倍に上昇した。本成分の N 末端アミノ酸配列は、他生物種の F_0F_1 -ATPase β -サブユニットと高い相同性を示した。

次に、コイ F_0F_1 -ATPase β -サブユニット遺伝子の cDNA クローニングを試みた結果、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 β -サブユニット全長をコードする cDNA クローンが得られた。さらに、当該サブユニット遺伝子の部分 cDNA 断片をプローブに 10 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 倍であった。

F_0F_1 -ATPase は、核およびミトコンドリア・ゲノム (mtDNA) にコードされる多数のサブユニットから構成されることから、核ゲノムにコードされている α -、 γ -、 c -サブユニットの cDNA クローニングを行い、各サブユニットの mRNA 蓄積量を調べた。その結果、いずれのサブユニットでも mRNA 蓄積量は低温馴化に伴って約 2 倍に増大した。一方、mtDNA 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) などの 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。

mtDNA コード成分の 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 α -サブユニットおよび mtDNA コードの ATPase 6-8 遺伝子の部分 DNA 配列をプローブにザンプロット解析を行ったが、核ゲノム量に対する mtDNA 量には、馴化温度による違いは認められなかった。

10 および 30°C 馴化コイの普通筋から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 α -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

ったところ、10℃馴化コイ筋組織中の α -サブユニット量は30℃馴化魚の約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。続いて、10および30℃馴化コイ普通筋からミトコンドリアを単離しSDS-PAGE分析に付して、ゲル上の α -および β -サブユニットのバンドを定量した結果、両サブユニットとも馴化温度による差はなかった。単離したミトコンドリアを対象に F_0F_1 -ATPase比活性を25℃で測定したところ、10℃馴化魚では30℃馴化魚の約2倍であった。

ヒラメおよびマダイについては、8~10℃の低温および23~25℃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、ヒラメでは10℃飼育魚の F_0F_1 -ATPase量は25℃飼育ヒラメの約3倍であった。一方、 F_0F_1 -ATPaseの比活性については10および25℃飼育魚間で差は認められなかった。次に、マダイでは8℃飼育魚は23℃飼育魚に比べて、筋組織中の F_0F_1 -ATPase量は約2倍に増大した。また、本酵素の比活性は8℃飼育魚で23℃飼育魚の約2倍であった。

以上本論文は、魚類は低温飼育に伴い、 F_0F_1 -ATPaseを量的および質的に変化させて、低温下におけるエネルギー代謝を補償していることを示した。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、魚類が低温飼育で F_0F_1 -ATPase活性を亢進される事実は、魚類の高鮮度保持に有用な指針を示したもので、学術上、応用上貢献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。