

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 12 年博士課程 進学
氏名 二瓶義明
指導教官 渡部終五

論文題目 Expression Analysis of Carp Myosin Heavy Chain Genes
during Muscle Development
(コイ筋発生に伴うミオシン重鎖遺伝子の発現変動の解析)

ミオシン II は筋肉に普遍的に存在する分子で分子量約 20 万の重鎖 2 本と分子量約 2 万の軽鎖 4 本から 1 分子が構成されている。このうち重鎖サブユニットには筋収縮に重要なアクチン結合および ATPase 触媒部位が存在する。高等脊椎動物では、筋肉を構成するミオシン重鎖には組織および発生段階特異的に発現する複数のアイソフォームが存在する。例えばヒト骨格筋では、成長過程で胎児型、周生型、成体型の順に骨格筋型ミオシン II 重鎖アイソフォームの発現変換が生じる。成体では筋繊維の収縮速度の違いに応じて、遅筋で I 型、速筋で IIa、IIx および IIb 型のミオシン重鎖アイソフォームが発現する。また、骨格筋と同様に横紋筋である心筋には、 α および β 型の 2 種類の重鎖アイソフォームが発現する。一方、魚類では、コイ成体が温度馴化に伴い、性状の異なる速筋型ミオシン重鎖アイソフォームを発現することが明らかとされているが、胚発生時における特異的アイソフォームの存在およびその消長は不明である。また、成体の遅筋および心筋における重鎖アイソフォームの存在状態についても知見がない。

本研究はこのような背景の下、コイ筋分化制御機構の解明の一環として、コイ胚型、遅筋型および心筋型ミオシン重鎖アイソフォームの cDNA クローニングを行った。次に、これらアイソフォームにつき、筋分化過程における遺伝子発現パターンの変化を調べた。さらに筋特異的遺伝子の転写因子 E タンパク質 E12 をクローン化し、筋分化に伴う発現パターンを調べたもので、その概要は以下の通りである。

1. コイ・ミオシン重鎖アイソフォームの cDNA クローニング

まず、孵化直後のコイ仔魚より作製した first strand cDNA を鋳型に、既報のミオシン重鎖遺伝子の保存性の高い領域の塩基配列を参照して合成したプライマーを用いて 3'RACE を行った。その結果、ミオシン重鎖中の L-メロミオシンの C 末端側約 4 分の 1 をコードする 3 種類の cDNA クローン、MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2} および MyHC_{emb3} が得られた。次に、これらの 3'側非翻訳領域を特異的プローブとして用い、孵化仔魚より作製した cDNA ライブラリーから上記の 3 クローンのスクリーニングを行った。さらに 5'RACE を行い、ここで得られた cDNA 断片の塩基配列を重ね合わせ、MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2} および MyHC_{emb3} cDNA の全長を決定した。各 cDNA はそれぞれ、全長 5,989、5,985 および 5,973 bp からなり、それぞれ 1,933、1,935 および 1,939 アミノ酸をコードしていることが明らかとなった。

次に、10°C、20°C および 30°C に 5 週間以上馴化させたコイ成体（平均体重約 300 g）より遅筋を採取し、先と同様に 3'RACE を行ったところ、10°C および 30°C 馴化魚の遅筋より異なる 2 種類の cDNA クローンが得られた。次に、より 5'側の塩基配列を求めるため、既報の他生物種の塩基配列をもとにプライマーを合成して PCR を行い、その塩基配列を決定した。以上の結果、MyHC 分子全体の 57% をコードする cDNA クローン、MyHC_{S10} (3420 bp) および MyHC_{S30} (3422 bp) が得られた。両 cDNA クローンとも 1,111 アミノ酸をコードしていた。また、同様に 10°C、20°C および 30°C 馴化魚の心筋を対象に 3'RACE を行ったところ、1 種類の cDNA クローン、MyHC_{card} を得た。決定された cDNA 部分断片は 627 bp からなり、173 アミノ酸をコードしていた。

これら cDNA クローンから演繹されたミオシン重鎖アイソフォームのアミノ酸配列を、既報の 10°C および 30°C 馴化コイ成体で主成分として発現する速筋型アイソフォーム、MyHC_{F10} および MyHC_{F30} とともに比較したところ、各アイソフォームは大きく 2 つのグループに分けられた。すなわち、MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2}、MyHC_{F10} および MyHC_{F30} は 88~95% のアミノ酸同一率を示し、いずれも速筋型アイソフォームと判断された。一方、MyHC_{emb3}、MyHC_{S10}、MyHC_{S30} および MyHC_{card} 間のそれは 88~96% で、これらは遅筋型アイソフォームと考えられた。なお、両グループ間のアミノ酸同一率は 74~79% であった。

2.コイ・ミオシン重鎖アイソフォームの筋分化過程および温度馴化魚における遺伝子発現パターン

コイ筋分化過程における各ミオシン重鎖アイソフォームの遺伝子発現パターンを調べるため、3'側非翻訳領域をプローブとしてノザンプロット解析を行った。解析に用いた全RNAは、発生段階の試料からは全組織を一括して、一方、成体からは筋組織別に分けて抽出した。なお、コイ胚の発生は17~20°Cで進行させ、孵化後の仔魚は20°Cで飼育した。また、MyHC_{F10}およびMyHC_{F30}の遺伝子発現パターンも同時に解析した。その結果、MyHC_{emb1}およびMyHC_{emb2}のmRNAは、受精後61時間の心臓の鼓動開始時から発現がみられ、その後、両mRNA蓄積量は孵化後1ヶ月まで増大を続けた。なお、MyHC_{emb1}mRNAは孵化後7ヶ月の稚魚でもわずかな発現がみられたが、MyHC_{emb2}mRNAはこの段階の稚魚では確認できなかった。MyHC_{emb3}mRNAは、受精後77時間の眼胞に色素沈着がみられる段階から発現し、その後はMyHC_{emb1}mRNAと同様の推移を示した。MyHC_{S10}およびMyHC_{S30}のmRNAはいずれも孵化直後の仔魚より発現がみられ、MyHC_{card}mRNAは受精後61時間から発現していた。

次に、10°C、20°Cおよび30°C馴化コイ成体におけるミオシン重鎖アイソフォーム遺伝子の発現を速筋、遅筋および心筋に分けて調べたところ、MyHC_{emb1}mRNAは10°Cおよび20°C馴化魚の速筋で発現がみられた。本重鎖アイソフォームのmRNA蓄積量はとくに20°C馴化魚の速筋で高かったが、遅筋では全く発現がみられなかった。MyHC_{emb2}遺伝子はコイ成体の速筋および遅筋のいずれにおいても発現が認められなかった。MyHC_{emb3}mRNAは10°C~30°C馴化コイ速筋および遅筋のいずれにおいても発現がみられたが、30°C馴化魚の遅筋での蓄積量はきわめてわずかであった。MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2}、MyHC_{emb3}のmRNAはいずれも心筋での発現は確認されなかった。なお、コイ成体の速筋型MyHC_{F10}およびMyHC_{F30}のmRNAは孵化後1ヶ月までは全く発現が確認されなかったことから、MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2}、MyHC_{emb3}はいずれも胚型ミオシン重鎖アイソフォームと判断された。MyHC_{S10}mRNAは10°Cおよび20°C馴化魚の遅筋で発現し、MyHC_{S30}mRNAは10°C、20°Cおよび30°C馴化魚のいずれにおいても発現がみられた。MyHC_{card}mRNAはコイ成体のすべての筋組織において発現しており、とくに心筋での蓄積量が高かった。

3. E タンパク質 E12 の cDNA クローニングおよび筋分化における発現パターン

ミオシン重鎖アイソフォームの発現調節には筋分化制御因子 MyoD ファミリーの関与が明らかにされているが、未だ不明な点が多く残されている。そこで、MyoD ファミリーとヘテロ 2 量体を形成して筋特異的遺伝子の転写調節を行う E タンパク質 E12 をコイよりクローニングした。

まず、コイ孵化仔魚より作製した first strand cDNA を鋳型とし、既報の他生物種 E タンパク質遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを合成して 3'RACE を行い、E タンパク質 E12 の分子全体の約 50% をコードする cDNA 断片を得た。次に、5'RACE を行い、先の cDNA 断片と合わせて全長 2,507 bp の塩基配列を決定した。この cDNA は 586 アミノ酸をコードしていた。演繹アミノ酸配列を既報のゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルおよびヒトのものと比較したところ、81、47 および 41% のアミノ酸同一率が得られた。コイ E12 においても MyoD ファミリーと同様に basic helix-loop-helix (bHLH) 領域が存在し、この領域のアミノ酸同一率は約 90% ときわめて高かった。したがって、コイ E12 も MyoD ファミリーと HLH 領域を介してヘテロ 2 量体を形成し、両者の basic 領域が DNA の特異配列に結合してミオシン重鎖遺伝子などの筋特異的遺伝子の転写を活性化することが示唆された。

次に、コイ E12 をコードする cDNA 断片をプローブとしてノザンプロット解析を行い、種々の発生段階における遺伝子発現パターンを調べた。その結果、E12 mRNA は、測定に供した受精後 30 時間から孵化後 7 ヶ月の試料まで一貫して高い蓄積量がみられた。この発現パターンの結果と既報のコイ MyoD ファミリーのそれとを合わせても、E12 は MyoD ファミリーと相互作用し、ミオシン重鎖遺伝子をはじめとする筋特異的遺伝子の転写調節に深く関与することが示唆された。

以上、本研究により、コイにおける胚型、遅筋型および心筋型ミオシン重鎖アイソフォームの存在および筋分化過程におけるそれらの遺伝子発現パターンが明らかにされ、既報の速筋型ミオシン重鎖アイソフォームの遺伝子発現パターンとの相違が明確に示された。さらに、筋分化過程における関連転写因子 E12 の発現パターンが示されたもので、これらの成果は魚類の筋分化制御機構を解明する上で基礎的知見を与えるのみならず、比較生理生化学上にも資するところが大きいものと考えられる。