

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 二瓶 義明

高等脊椎動物では、筋肉を構成するミオシン重鎖 (MyHC) 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。魚類では、コイが温度馴化に伴い、性状の異なる速筋型 MyHC 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、成体の遅筋および心筋に特異的なアイソフォームの存在およびその消長については不明な点が多い。そこで本論文では、コイ筋分化機構の解明の一環として、コイ胚型、遅筋型および心筋型 MyHC アイソフォームの cDNA クローニングを行い、筋分化過程における遺伝子発現の変化を調べた。さらに、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、筋分化に伴う発現パターンを調べた。

まず、コイ孵化仔魚を対象に cDNA ライブラリーからのスクリーニング、3'および 5'RACE を行い、3 種類の MyHC アイソフォーム、MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2} および MyHC_{emb3} の全長をコードする塩基配列を決定した。次に、10°C、20°C および 30°C に馴化させたコイ成体より遅筋および心筋を採取し、3'RACE を行った。その結果、10°C および 30°C 馴化魚の遅筋より 2 種類の cDNA クローン、MyHC_{S10} および MyHC_{S30} が、心筋より 1 種類の cDNA クローン、MyHC_{card} が得られた。以上 6 アイソフォームの演繹アミノ酸配列を、既報の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、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、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。

次に、コイ筋分化過程における各 MyHC アイソフォームの遺伝子発現パターンを調べるため、ノザンプロット解析を行った。その結果、MyHC_{emb1}、MyHC_{emb2} および MyHC_{emb3} 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、両 mRNA 蓄積量は孵化後 1 ヶ月まで増大を続けた。なお、MyHC_{emb1} および MyHC_{emb3} の 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_{S10} および MyHC_{S30} 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発現を速筋、遅筋および心筋に分けて解析したところ、MyHC_{emb1} mRNA は 10°C および 20°C 馴化魚の速筋で発現していたが、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 は速筋および遅筋のいずれにおいても発現がみられた。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} および MyHC_{emb3} は胚型 MyHC 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 は成魚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。

次に、コイ孵化仔魚を対象に 3' および 5' RACE を行い、E12 全長の塩基配列を決定した。演繹アミノ酸配列を他生物種のものと比較したところ、コイ E12 においても basic helix-loop-helix 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。次に、ノザンプロット解析により、種々の発生段階における E12 の遺伝子発現パターンを調べたところ、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、MyHC 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。

以上本論文は、コイ胚型、遅筋型および心筋型 MyHC 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を明らかにし、既報の速筋型 MyHC アイソフォームの遺伝子発現パターンとの相違を明確に示した。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。