

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 13 年博士課程 入学

氏名 池田 大介

指導教官 渡部 終五

論文題目 トラフグ筋関連遺伝子の分子生物学的研究

トラフグのゲノムサイズは約 400Mb で、ヒトより 7 倍以上小さいながらほぼ同数の遺伝子をもつことが示唆された。すなわち、トラフグゲノム中の繰り返し配列は 15%以下で、ヒトゲノムの 35 - 45%に比べ著しく小さい。さらに、トラフグゲノムは遺伝子間領域が短かく、イントロンサイズはヒトの数～数十分の 1 である。トラフグゲノムはこのような特徴からヒトゲノムの機能解析のモデルとして全ゲノム解析が行われ、現在、全体の約 90%をカバーするドラフトシーケンスのデータが公開されている。したがって、目的遺伝子のコーディングシーケンスだけでなく、転写調節に関わるプロモーター領域および選択的スプライシングに関わるイントロン領域の情報を容易に入手することが可能である。一方、トラフグはわが国の重要な産業種で、全ゲノム解析データの水産への応用、すなわち高成長や耐病性に関する遺伝子および選抜育種のためのマイクロサテライトマーカーの探索などにも利用されることが期待されている。

以上のような背景の下、本研究はトラフグの可食部である筋肉に着目し、未だ不明な点が多い魚類の筋関連遺伝子のうち、主要成分であるトロポミオシンおよびミオシンのコード遺伝子を対象にゲノム構造を明らかにし、他生物種のオーソログ遺伝子と比較した。

得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. トロポミオシン 1 遺伝子の解析

まず、トラフグ・ゲノムデータベース(<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/blast/>)を既報のシログチ・トロポミオシン 1 遺伝子(*TPM1*)の cDNA をプローブにスクリーニングしたところ、同配列と相同性のみられる 8 種類の scaffold が得られた。個々の scaffold に含まれる配列を解析した結果、scaffold (S)31 および S1614 に含まれる配列が既報の *TPM1* と高い相同性を示した。これらの配列は、イントロン領域は大きく異なるが翻訳領域はいずれも高い相同性を示したため、S31 および S1614 がコードする遺伝子をそれぞれ *TPM1-1* および *TPM1-2* とした。ちなみに、他の脊椎動物では 1 種類の *TPM1* しか明らかにされていない。また、高等脊椎動物の *TPM1* が 15 エクソン/14 イントロンにより構成されているのに対し、*TPM1-1* は 14 エクソン/13 イントロン、*TPM1-2* は 11 エクソン/10 イントロンより構成されていた。

トラフグ *TPM1-1* および *TPM1-2* 周辺の遺伝子領域を比較したところ、*TPM1* とともに 5' 側に位置する遺伝子の *TLN2* も倍化していた。したがって、2 種類の *TPM1* は魚類祖先における同遺伝子を含む大きな領域の倍化、もしくは全ゲノム規模の倍化によって形成されたものと考えられた。また、TPM 分子の特徴であるコイルドコイル形成能につき予測したところ、*TPM1-1* および *TPM1-2* 間には明確な差異は認められなかった。

次に、RT-PCR により速筋、遅筋、肝臓、心臓、腎臓、脾臓、眼、未分化生殖腺、皮膚および脳における発現を確認したところ、*TPM1-1* は肝臓以外のすべての組織において、*TPM1-2* は速筋、遅筋、肝臓、眼、生殖腺、皮膚および脳において発現がみられ、両アイソフォーム転写産物の発現組織の違いが明確に示された。したがって、2 つのトラフグ *TPM1* は偽遺伝子化することなく、その発現組織を互いに補完するように分子進化したものと推察された。

2. ミオシン重鎖遺伝子の網羅的解析

ミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) のサイズはタンパク質コード領域が約 6kb もあり大きく、1 つの遺伝子の全領域をクローニングすることは容易ではない。現在までに、GenBank に登録されている全コード領域をカバーする魚類 *MYH* は 9 遺伝子に過ぎず、さらにそれらは

骨格筋型および心筋型のものである。そこで、*TPM*の研究の成果を応用し、トラフグ *MYH* のゲノム構造および遺伝子数の解析を試みた。*In silico* クローニングされたトラフグ *MYH* は 16 骨格筋型、9 心筋型、5 遅筋/superfast 型、11 平滑筋/非筋細胞型の合計 41 遺伝子であった。このうち、開始コドンから終止コドンまでを含む完全長の *MYH* は 4 骨格筋型、1 心筋型、1 遅筋/superfast 型、4 平滑筋/非筋細胞型の合計 10 遺伝子であった。各 *MYH* のコード領域におけるイントロン部位を解析したところ、その多くは対応するヒト *MYH* のイントロン部位とよく一致したが、トラフグ独自の位置にイントロンが存在する例もみられた。

MYH 分子は N 末端側の ATPase 活性能を有する球状の頭部サブフラグメント 1 (S1) と、C 末端側のコイルドコイル構造を形成する線維状の尾部ロッドからなる。タンパク質分解酵素に感受性の高い部位として知られる S1 の loop 1 および loop 2 領域の一次構造は、アイソフォーム間で大きく異なることが知られていることから、各アイソフォームに特異的な PCR プライマーを比較的容易に設計できる領域であることが予想された。そこで、*in silico* クローニングにより得られたトラフグ 41 *MYH* 遺伝子のうち、15 遺伝子につき RT-PCR を適用して loop2 領域をコードする転写産物の解析を行った。その結果、骨格筋型、心筋型、遅筋型および平滑筋/非筋細胞型 *MYH* は当該組織に顕著な発現がみられ、一次構造からの予想によく一致した。一方、RT-PCR により骨格筋型、遅筋型および平滑筋/非筋細胞型 *MYH* の発現が胚体でも確認された。同時に、別途クローニングした筋分化制御因子のコード遺伝子 *MyoD* および *myogenin* の発現も認められた。そこで、これら遺伝子を対象に whole-mount *in situ* hybridization (WISH) による発現部位の解析を行った。その結果、受精後 72 および 96 時間のトラフグ胚体の筋節において、*MyoD* の発現に続き、*myogenin* が発現することが示された。さらに、これら筋分化制御因子の発現に誘導され、トラフグ胚体の筋節で速筋型および遅筋型 *MYH* の発現が確認された。また、平滑筋/非筋細胞型 *MYH* は胚全体に発現がみられた。

3. 骨格筋型ミオシン重鎖遺伝子のゲノム構造解析

哺乳類では、6 骨格筋型および 2 心筋型の計 8 種類の横紋筋型 *MYH* の存在が報告されている。このうち、6 種類の骨格筋型 *MYH* はヒトおよびマウスにおいて、それぞれ 17 および 11 番染色体においてタンデムクラスターを形成している。したがって、*MYH* クラスター

内の物理的な位置関係が発生段階における発現調節に何らかの役割を果たしていると考えられている。これまで魚類 *MYH* のゲノム構造に関する詳細な報告はなく、その正確な遺伝子数すら不明であった。そこでイギリスの MRC HGMP-RC が提供しているトラフグゲノムの bacterial artificial chromosome (BAC) エンドシーケンス、cosmid エンドシーケンスおよび BAC 内の配列をランダムに決定したランドマーク BAC シーケンスのデータを活用し、トラフグ骨格筋タイプ *MYH* を含む mayffold 同士の位置関係を詳細に解析し、ヒトおよびトラフグの *MYH* クラスターと比較した。

まず、骨格筋型 *MYH* クラスターを解析したところ、トラフグではヒト骨格筋型 *MYH* クラスターに対応する遺伝子座が 2 種類あることが見出された。次に、BAC エンドシーケンスの情報を基に骨格筋型 *MYH* を含む mayffold 同士を結合し、それぞれの位置関係の情報を得た。その結果、トラフグには 3 種類以上の骨格筋型 *MYH* を含むクラスターの遺伝子座が少なくとも 2 領域存在することが示唆された。ヒト全ゲノムデータベースを用いてヒト遺伝子座と比較したところ、トラフグゲノムのシンテニー領域には大幅な遺伝子の再編成が認められた。一方、トラフグの *MYH* を含む遺伝子座につきヒトのシンテニー領域を解析したところ、周辺には *MYH* の配列は存在しなかった。したがって、トラフグにおける骨格筋型 *MYH* クラスターは高等脊椎動物と魚類の共通祖先が約 4 億 5 千年前に分岐した後に出現したものと考えられた。

以上、本研究によりトラフグにおける筋関連遺伝子 *TPM1* および *MYH* の構造が明らかとなった。すなわち、*TPM1* についてはトラフグにおいて倍化しており、2 種類の *TPM1-1* および *TPM1-2* がその発現組織を互いに補完するように分子進化したことが示された。*MYH* についてはヒトに存在する全てのタイプをトラフグは有しており、かつその遺伝子数が多いことが示された。また、骨格筋型 *MYH* のゲノム中の分布も示され、ヒトなど高等脊椎動物のものとは大きく異なることが明らかにされた。これらの成果は比較ゲノム科学に寄与するのみならず、トラフグゲノムの産業的な利用に基礎的知見を提供することから、応用上の価値も大きいと考えられる。