

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池田 大介

トラフグゲノムは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。本研究は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た。

まず、トラフグ・ゲノムデータベースを既報のシログチ・トロポミオシン1遺伝子(*TPMI*)のcDNAを用いて検索したところ、相同性のみられる8種類の配列が得られた。個々の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 *TPMI* と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 *TPMI-1* および *TPMI-2* とした。トラフグ *TPMI-1* および *TPMI-2* 周辺の遺伝子領域を比較したところ、*TPMI* 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 *TPMI* 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。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、*TPMI-1* は肝臓以外のすべての組織において、*TPMI-2* は心臓、腎臓および脾臓以外の組織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 *TPMI* 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。

次に、ミオシン重鎖遺伝子(*MYH*)の解析を行った。*In silico* クローニングされたトラフグ *MYH* は16速筋型、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。得られたトラフグ *MYH* 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つところ、速筋型、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。また、筋分化制御因子のコード遺伝子 *MyoD* および *myogenin* とともに、これら遺伝子の一部を対象に whole-mount *in situ* hybridization 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。

最後に、トラフグゲノムのBACエンドシーケンス、cosmidエンドシーケンスおよびランドマークBACシーケンスのデータを活用し、トラフグ速筋タイプ *MYH* を含む

mayffold 同士の位置関係を詳細に解析した。ヒトおよびトラフグの *MYH* クラスターと比較した結果、トラフグではヒト速筋型 *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。BAC エンドシーケンスの情報に基づき速筋型 *MYH* を含む mayffold の位置関係を解析した結果、トラフグには 3 種類以上の速筋型 *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、トラフグにおける速筋型 *MYH* クラスターは高等脊椎動物と魚類の共通祖先が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 *TPMI* はトラフグにおいて倍化しており、2 種類の *TPMI-1* および *TPMI-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。