

## 論文の内容の要旨

水圏生物学専攻  
平成 13 年度博士課程 入学  
氏 名 陶 妍  
指導教官 渡部 終五

論文題目 Biochemical studies on fast skeletal myosin isoforms from  
thermally acclimated grass carp  
(温度馴化ソウギョの速筋ミオシン・アイソフォームに関する生化学的研究)

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、広温域性淡水魚は、水温が季節的に 0℃付近から 30℃以上までと大きく変動しても恒常的な生命活動を維持する。このような進化の過程で魚類が獲得した温度適応能については、種々の生化学的研究が行われてきた。例えば、コイ *Cyprinus carpio* は温度馴化に伴い、ミオシン・アイソフォームを発現し、その発現が遺伝子レベルで制御されていることが明らかにされた。コイは染色体数が 104 のいわゆる系統的 4 倍体種で、前述の変化がゲノムの倍数化に関係することも考えられるが、実態は不明である。一方、ソウギョ *Ctenopharyngodon idella* はコイのように幅広い温度帯に生息するが染色体数 52 の 2 倍体種である。したがって、ソウギョは上記の進化的問題を検討するに当たっては格好の研究対象魚であるが、コイに比べて温度適応に関する研究は皆無に等しい。

本研究はこのような背景の下、ソウギョを種々の温度に馴化してミオシン・アイソフォームを単離し、生化学的性状および熱安定性を調べて比較した。さらに、各ミオシン・アイソフォームの cDNA クローニングを行い、温度依存的な遺伝子発現の様相を明らかに

した。一方、埼玉県の養魚池にて自然環境下で飼育したソウギョを各季節ごとに採取し、人工的に温度馴化したソウギョについての結果と比較した。得られた研究成果の概要は以下の通りである。

### 1. ミオシン・アイソフォームの温度馴化および季節変化に伴う ATPase 活性の変化

実験室内においてはソウギョ成魚(300-500 g)を、10、20 および 30°C で 5 週間以上飼育して温度馴化させた。一方、自然条件下の養魚池での飼育においては、ソウギョ成魚(400-700 g)を 1、5、8 および 11 月に採取し、それぞれ冬季、春季、夏季および秋季の試料とした。なお、採取時の養魚池の水温はそれぞれ、6.2、17.0、30.3 および 16.2°C であった。

まず、各試料の速筋からミオシンを精製し、その純度を SDS-PAGE によって確認した。各標品につき、アクチン活性化  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性を測定したところ、10°C 馴化魚ミオシンの最大反応初速度 ( $V_{max}$ ) は  $0.15 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg myosin}^{-1}$  と、30°C 馴化魚ミオシンの  $0.09 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg myosin}^{-1}$  より 1.7 倍高く、20°C 馴化魚ミオシンの  $0.14 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg myosin}^{-1}$  に近い値を示した。

一方、冬季魚ミオシンの  $V_{max}$  は  $0.14 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg myosin}^{-1}$  と、10 および 20°C 馴化魚の値とほぼ同じで、夏季魚ミオシンの  $0.08 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg myosin}^{-1}$  より 1.8 倍高かった。なお、春季および秋季魚の水温はほとんど同じであったが、両試験魚ミオシンの  $V_{max}$  には差がみられた。すなわち、春季および秋季魚ミオシンの  $V_{max}$  は、それぞれ  $0.10$  および  $0.13 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg myosin}^{-1}$  と、それぞれ夏季および冬季魚ミオシンの  $V_{max}$  に近い値を示した。

### 2. ミオシン・アイソフォームの温度馴化および季節変化に伴う熱安定性の変化

ソウギョ・ミオシンの熱安定性を調べるため、35°C、0-60 分間の熱処理後の残存  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性から変性速度恒数 ( $K_D$ ) を求めた。10°C 馴化魚ミオシンの  $K_D$  は  $25.3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  と、20 および 30°C 馴化魚ミオシンのそれぞれ  $7.4 \times 10^{-4}$  および  $6.5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  より 3-4 倍高く、10°C 馴化魚ミオシンはより不安定であることが示された。これらの結果はアクチン活性化ミオシン  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性でみられた傾向とはやや異なった。

一方、冬季魚ミオシンは  $31.3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  と、夏季魚ミオシンの  $4.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  より約 7 倍高かった。以上の結果から、冬季魚ミオシンの  $K_D$  は 10°C 馴化魚のそれより 1.2 倍高く、夏季魚ミオシンの  $K_D$  は 30°C 馴化魚のそれより 1.4 倍低いことが明らかとなった。次に、春季魚ミオシンの  $K_D$  は  $6.9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  と、20°C 馴化魚、30°C 馴化魚および夏季魚ミオシンの値に近く、秋季魚ミオシンの  $K_D$  は  $26.1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  と、10°C 馴化魚および冬季魚ミオシンの値に近かった。

### 3. ミオシン・アイソフォームの温度馴化および季節変化に伴う熱力学的性状の変化

ミオシンの熱力学的性状は示差走査熱量計(DSC)により検討した。10°C馴化魚ミオシンの測定温度の上昇に伴う吸熱反応の主要ピーク(転移温度、 $T_m$ )は 32.6、37.9 および 46.2°Cに観察され、そのエンタルピー( $\Delta H_{cal}$ )はそれぞれ 405.0、507.0 および 120.0 kcal/mol であった。次に 20°C 馴化魚ミオシンの  $T_m$  は 38.4 および 45.6°Cにみられ、 $\Delta H_{cal}$  はそれぞれ 839.0 および 257.0 kcal/mol であった。さらに、30°C馴化魚ミオシンの  $T_m$  は 37.8、41.7 および 45.4°Cにみられ、 $\Delta H_{cal}$  はそれぞれ 759.0、263.0 および 206.0 kcal/mol と測定された。

一方、冬季魚ミオシンの  $T_m$  は 32.1 および 38.2°Cにみられ、 $\Delta H_{cal}$  はそれぞれ 310.0 および 581.0 kcal/mol であった。春季魚ミオシンの主要ピークの  $T_m$  は 38.4 および 45.7°Cに観察され、 $\Delta H_{cal}$  はそれぞれ 803.0 および 223.0 kcal/mol であった。また、夏季魚ミオシンの  $T_m$  は 38.4 および 45.2°Cにみられ、 $\Delta H_{cal}$  はそれぞれ 648.0 および 483.0 kcal/mol であった。さらに、秋季魚ミオシンの  $T_m$  は 32.6、38.0 および 46.7°Cにみられ、 $\Delta H_{cal}$  はそれぞれ 313.0、495.0 および 268.0 kcal/mol であった。

以上のように、38 および 45-46°Cの吸熱ピークの  $\Delta H_{cal}$  は 20 および 30°C馴化魚、さらには春季および夏季魚のミオシンで高く、これらミオシンの熱力学的性状は類似する傾向にあった。一方、10°C馴化魚および秋季魚ミオシンのパターンはよく類似し、冬季魚のパターンとはやや異なったが、3 者ミオシンはいずれも 32-33°Cの吸熱ピークを示した。以上の結果から、32-33°Cの吸熱ピークは低温馴化魚ミオシンに特有のものであることが推察された。なお、DSC で観察されたこれら吸熱反応は $\alpha$ らせん構造の unfolding によることが、円二色性(CD)の測定によって明らかとなった。

### 4. ミオシン重鎖アイソフォームの cDNA クローニングと温度馴化および季節変化に伴う遺伝子の発現変動

ミオシン重鎖のC末端側をコードする cDNA を温度馴化したソウギョ速筋から 3'-RACE を用いて増幅した。次に、増幅された翻訳領域および非翻訳領域を含む約 550 bp の DNA 断片を pGEM-T Easy ベクターにサブクローニンし、いくつかのクローンを任意に選択して、塩基配列を決定した。その結果、温度馴化に依存して発現する 3 種類のアイソフォーム cDNA が得られた。すなわち、10°C馴化魚から選択した 21 クローン中、18 クローンが同じ塩基配列を示したことから、これを 10°Cタイプとした。次に、30°C馴化魚から選択した 21 クローン中、15 クローンが同じ塩基配列を示したことから、これを 30°Cタイプとした。なお、10°C馴化魚の残りの 3 クローンと 30°C馴化魚の残りの 6 クローンは同じ塩基配列を示したことから、これを中間タイプとした。10°Cおよび中間タイプの間で塩基配列および演繹アミノ酸配列の同一率は、それぞれ 76 および 88%であった。一方、10 および 30°Cタイプ間の同一率は塩基配列で 77%、演繹アミノ酸配列で 89%であった。さらに、中間および 30°Cタイプ間の塩基配列および演繹アミノ酸配列の同一率

は、それぞれ 92 および 97% と高い値を示した。

3 タイプの 3' 翻訳領域および非翻訳領域からなる特異配列をプローブとするノーザンブロット解析で、10、20 および 30°C 馴化魚速筋での発現量を調べたところ、10°C および中間タイプはそれぞれ、10 および 20°C 馴化魚で最も高かった。一方、30°C タイプは 30°C 馴化魚でのみ発現がみられた。次に、各季節で採取したソウギョ速筋については、10°C タイプは冬季魚で最も多く発現し、次いで秋季魚の順となったが、春季および夏季魚では発現がみられなかった。一方、中間タイプの発現量は春季魚で最も高く、夏季魚がこれに続いたが、秋季および冬季魚では発現が認められなかった。さらに、30°C タイプは春季および夏季魚でほぼ同程度に高い発現量がみられ、秋季および冬季魚では発現が認められなかった。

以上、本研究により、2 倍体ソウギョは温度依存的に異なる速筋ミオシン重鎖アイソフォームを発現することにより、環境水の温度変動に対処して恒常的な運動を行うことが示唆された。これらの結果は既報の系統的 4 倍体種のコイの温度適応機構と同じ傾向にあることから、ミオシン重鎖アイソフォームの変化による温度適応は魚類の 4 倍体化に伴って生じたものではないことが明らかとなった。一方、実験室内の温度馴化と屋外の養魚池で飼育したときの季節的な温度適応とでは若干異なったミオシン重鎖アイソフォームの発現パターンが観察された。これらの成果は比較生化学上に寄与するのみならず、ソウギョの高度利用にも基礎的知見を与えるもので、応用上に貢献するところも大きいと考えられる。