

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 陶 妍

広温域性淡水魚は、季節的な水温変化に対して恒常的な生命活動を維持する。コイは温度馴化に伴い、遺伝子レベルで制御されたミオシンアイソフォームを発現することが明らかにされている。コイは染色体数が 104 の系統的 4 倍体種であるのに対し、同じコイ科のソウギョは染色体数 52 の 2 倍体種である。染色体の倍加と温度適応能の関係を明らかにする上で、ソウギョの温度適応様式に興味をもたれる。本研究は、種々の温度に馴化させたソウギョから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の発現様式を明らかにした。また、自然環境下で飼育したソウギョと人工的に温度馴化したソウギョを比較した。

まず、実験室内で、10、20 および 30°C で 5 週間温度馴化させたソウギョ成魚をそれぞれ 10、20 および 30°C 馴化魚とした。また、屋外の養魚地で飼育したソウギョ成魚を 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。各試料の速筋ミオシンにつき、アクチン活性化 Mg^{2+} -ATPase 活性を測定したところ、10、20 および 30°C 馴化魚ミオシンの最大反応初速度 (V_{max}) は、それぞれ 0.15、0.14 および 0.09 $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg myosin}^{-1}$ であった。一方、春季、夏季、秋季および冬季魚ミオシンの V_{max} は、それぞれ 0.10、0.08、0.13 および 0.14 $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg myosin}^{-1}$ であった。

次に、35°C で 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) を求めたところ、10、20 および 30°C 馴化魚ミオシンの K_D は、それぞれ 25.3×10^{-4} 、 7.4×10^{-4} および $6.5\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ であった。こ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、春季、夏季、秋季および冬季魚ミオシンの K_D は 6.9×10^{-4} 、 4.8×10^{-4} 、 26.1×10^{-4} および $31.3\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ であった。

さらに、示差走査熱量計 (DSC) 測定から、10°C 馴化魚ミオシンで T_m 32.6、37.9 および 46.2°C、20°C 馴化魚ミオシンで T_m 38.4 および 45.6°C、30°C 馴化魚ミオシンで T_m 37.8、41.7 および 45.4°C に吸熱ピークが観察された。一方、春季魚ミオシンは T_m 38.4 および 45.7°C、夏季魚ミオシンは T_m 38.4 および 45.2 °C、秋季魚ミオシンは T_m 32.6、38.0 および 46.7°C、冬季魚ミオシンは T_m 32.1 および 38.2°C に観察された。

各ソウギョの cDNA クローニングから、10、中間および 30°C タイプのアイソフォームが得られた。10°C および中間タイプ、10 および 30°C タイプ、中間および 30°C 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%、77%、および 89%、92 および 97% であった。ノーザンブロット解析から、10°C および中間タイプはそれぞれ 10 および 20°C 馴化魚で最も多く発現していた。一方、30°C タイプは 30°C 馴化魚でのみ発現がみられた。また、10°C タイプは冬季、秋季魚の順に多く発現し、春季および夏季魚で

は発現がみられなかった。一方、中間タイプの発現は春季、夏季魚の順に多く発現し、秋季および冬季魚では発現がみられなかった。さらに、30℃タイプは春季および夏季魚で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みられなかった。

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の発現により、環境水の温度変動に対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。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たもので、学術上、応用上貢献するところが少ない。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。