

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 14 年博士課程 進学

氏名 梁 春実

指導教官 渡部 終五

論文題目 メダカ速筋ミオシン重鎖遺伝子の温度依存的発現調節に関する研究

魚類など水圏に生息するほとんどの生物は変温生物で、体温は環境水温に支配される。生体内といえども化学反応は温度に依存して変化することから、魚類の代謝や運動能力は環境水温によって大きな影響を受けるはずである。しかしながら、コイ *Cyprinus carpio* やキンギョ *Carassius auratus* に代表される広温域性魚類は、季節的に大きく変化する環境水温に対しても馴化し、代謝の恒常性を維持する。筋細胞においては、夏には Mg^{2+} -ATPase 活性の低い速筋ミオシンアイソフォームを、冬には同活性の高いアイソフォームを発現して遊泳能力を一定に保つ。この変化は、ミオシン重鎖遺伝子の転写レベルで制御されていることが明らかにされているが、各遺伝子の発現調節機構など詳細は未だ明らかでない。一方、発生や遺伝研究のモデル生物であるメダカ *Oryzias latipes* もコイやキンギョと同様に幅広い温度域で生息可能である。また、種々の遺伝子工学技術が確立され、転写調節機構の研究に適しているが、温度適応機構に関する分子レベルの研究はほとんど行われていない。

本研究はこのような背景の下、まず 10°C および 30°C 馴化メダカの筋原繊維 Mg^{2+} -ATPase 活性を

測定して比較した。次に、メダカ速筋ミオシン重鎖 cDNA をクローニングし、その馴化温度依存的な遺伝子発現パターンを調べた。さらに、メダカ速筋ミオシン重鎖遺伝子族のゲノム構造を調べるとともに、10°Cおよび 30°Cで主に発現するミオシン重鎖遺伝子の転写調節領域の構造と転写活性の解析を行ったもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. メダカ速筋ミオシン重鎖 cDNA クローニングと馴化温度依存的な遺伝子発現パターン

約 1 年齢の 10°Cおよび 30°Cに馴化した市販メダカ(平均体長 3.3 cm)の体幹部筋肉より筋原繊維を調製し、Mg²⁺-ATPase 活性を測定した。その結果、10°C馴化メダカは $1.10 \pm 0.06 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ と測定され、30°C馴化メダカの $0.94 \pm 0.05 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ の 1.17 倍と有意に高かった ($P < 0.05$)。

次に、約 1 年齢の 10°Cおよび 30°C馴化 HNI 近交系メダカ(平均体長 2.6 cm)の体幹部筋肉より cDNA ライブラリーを構築し、速筋ミオシン重鎖 cDNA の 3'翻訳および非翻訳領域をコードするプローブを用いてスクリーニングした。その結果、m-10-1、m-10-2 および m-30-1 ~ m-30-5 の計 7 種類の成体速筋型ミオシン重鎖 cDNA を単離することができた。m-10-1、m-10-2、m-30-1 および m-30-2 は非常によく類似した配列を有し、塩基同一率は 95 ~ 98 %を示したが、m-30-3 ~ m-30-5 は他のクローンと 3'非翻訳領域が著しく異なり、塩基同一率は 76 ~ 86 %であった。

さらに、各ミオシン重鎖 cDNA で保存された塩基配列をプローブに、ランダムに 10°Cおよび 30°C馴化メダカ cDNA ライブラリーをスクリーニングし、各 cDNA の出現頻度を調べた。その結果、10°C馴化メダカは m-10-1 および m-10-2 を、30°C馴化メダカは m-30-1 および m-30-2 を主成分として発現することが明らかとなった。これら 4 つの cDNA クローンは両 cDNA ライブラリーで検出されたが、m-30-3 ~ m-30-5 は 30°C馴化メダカ cDNA ライブラリーでのみにみられた。以上の結果から、メダカもコイと同様に温度馴化に伴って異なる速筋ミオシン重鎖遺伝子を発現して環境温度の変化に適応することが示唆された。

2. メダカ速筋ミオシン重鎖遺伝子族の構造解析

HNI 近交系メダカのゲノム bacterial artificial chromosome (BAC)ライブラリーを対象に、メダカ

の各速筋ミオシン重鎖 cDNA の 3' 翻訳および非翻訳境界領域で保存性の高い 463 bp をプローブにコロニー・ハイブリダイゼーションを行った。得られた陽性クローンにつき、上述のプローブでサザンブロット解析を行い、前節で単離した全ての cDNA クローンの相当遺伝子を含み、末端領域の塩基配列が互いに重複した 2 個の BAC クローンを選び、ショットガンライブラリー法を用いて 296 kbp の全塩基配列を決定した。本 BAC クローンには 11 個の速筋ミオシン重鎖遺伝子が含まれており、5' 側から順に mMyHC-1 ~ mMyHC-11 と名付けた。各ミオシン重鎖遺伝子につき、エクソン・イントロン構造解析を行い、エクソン部分の塩基配列を cDNA のそれと比較したところ、mMyHC-1/m-30-4、mMyHC-2/m-30-3、mMyHC-3/m-10-1、mMyHC-6/m-10-2、mMyHC-7/m-30-1、mMyHC-9/m-30-2 および mMyHC-11/m-30-5 と対応することが明らかとなった。さらに、遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、mMyHC-5 も実際に発現する新規ミオシン重鎖遺伝子であった。これらの遺伝子はいずれも 41 エクソン/40 イントロンから構成され、第 1 ~ 3 および 41 エクソンは非翻訳領域を含んでいた。一方、mMyHC-4 は第 6 エクソンに相当する部分に終止コドンが挿入され、mMyHC-8 は第 18 ~ 25 エクソンに相当する領域のみ存在した。また、mMyHC-10 は第 41 エクソンが欠損していることから、以上の 3 種のみオシン重鎖遺伝子は偽遺伝子と判断された。各ミオシン重鎖遺伝子の翻訳開始点から終止点までの cDNA 塩基配列および演繹アミノ酸の同一率は、それぞれ 91 ~ 98 % および 93 ~ 99 % であった。

次に、各遺伝子の第 3 エクソンまで含む 5' 上流域 5 kbp の相同性を比べた結果、2 つのグループに大別された。グループ 1 は mMyHC-3、mMyHC-6、mMyHC-7 および mMyHC-9 を含み、対応する cDNA クローンは 10°C あるいは 30°C 馴化メダカで主成分として発現するものであった。このグループには新規遺伝子 mMyHC-5 と偽遺伝子 mMyHC-4 が含まれた。グループ 2 は mMyHC-1、mMyHC-2 および mMyHC-11 と、当該ゲノム上 5' および 3' 端側に位置し、対応する cDNA クローンは 30°C でのみ発現するタイプであった。なお、このグループには偽遺伝子 mMyHC-10 が含まれた。

3. 10°C および 30°C 型ミオシン重鎖遺伝子の転写調節領域の解析

各ミオシン重鎖遺伝子の転写開始点より 6 kbp 上流域の範囲にある転写因子結合配列を調べた。

その結果、MyoD ファミリーが結合する E-box、myocyte-specific enhancer factor 2 (MEF2)ファミリーの結合配列、カルシニューリン依存的に筋特異的遺伝子の転写を活性化する nuclear factor of activated T cells (NFAT)の結合配列、CCAAT/enhancer-binding protein が結合する CCAAT box、および基本転写因子群が結合する TATA box などが含まれていた。前述のように、各ミオシン重鎖遺伝子は 5'上流域を含めてかなり高い相同性を示すにもかかわらず、転写因子結合配列の位置は著しく異なり、5'上流域が各ミオシン重鎖遺伝子の温度依存的な転写調節に密接に関連することが示唆された。

そこで、10°C 馴化メダカで主成分として発現し 30°C 馴化メダカで発現量が少ない mMyHC-6/m-10-2、さらに 30°C 馴化メダカで最も多く発現し 10°C 馴化メダカで発現量の少ない mMyHC-7/m-30-1 をそれぞれ、10°C型および 30°C型遺伝子とし、その 5'上流から種々の長さの DNA 断片および突然変異体を調製して pGL3-Basic Vector のルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込み、レポーターアッセイ用プラスミドを構築した。次に、構築したプラスミドを 10°Cおよび 30°C 馴化メダカの骨格筋に注入し、各温度で 1 週間飼育してルシフェラーゼ活性の測定に供した。その結果、10°C型遺伝子の 10°C馴化メダカにおける転写活性には-966~-957 の MEF2 結合配列および-613~-608 の E box が重要であること、30°C型遺伝子の 30°C馴化メダカにおける転写活性には-960~-951 の MEF2 結合配列が重要であること、が示された。また、10°C型遺伝子の 5'上流域は 10°C馴化メダカでの、30°C型遺伝子のそれは 30°C馴化メダカでの遺伝子発現に主に機能することが確かめられた。

以上、本研究は、メダカもコイやキンギョと同様に温度馴化に伴って異なる速筋ミオシン重鎖遺伝子を発現して遊泳運動の恒常性を維持することを示唆した。また、メダカ 296 kbp のゲノム領域内に、3 個の偽遺伝子を含む 11 個もの速筋ミオシン重鎖遺伝子がクラスターを形成していることを明らかにした。さらに、10°C型および 30°C型遺伝子の 5'上流域につき、E box や MEF2 結合配列など、それぞれ 10°Cおよび 30°C馴化メダカにおける転写活性の発現に重要な領域を特定し、メダカの温度適応分子機構の一端を明らかとしたもので、これらの成果は比較生理生化学上に資するところが大きいものと考えられる。