

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 梁 春実

変温生物である魚類の体温は環境水温に支配され、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。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、環境水温に対して馴化し、代謝の恒常性を維持する。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、その詳細に関しては不明な点が多い。このような背景の下、本研究では、メダカ *Oryzias latipes* を対象に速筋ミオシン重鎖遺伝子の馴化温度依存的な発現、ゲノム構造および 5' 上流調節領域について調べたもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

序論に続く第 1 章では、速筋ミオシン重鎖の馴化温度依存的な発現を調べた。まず、10°C および 30°C 馴化メダカの体幹部筋肉より筋原繊維を調製し、Mg²⁺-ATPase 活性を測定してメダカも温度馴化に応じてミオシンの組成を変化させることを明らかにした。次に、10°C および 30°C 馴化 HNI 近交系メダカの体幹部筋肉より cDNA ライブラリーを構築し、速筋ミオシン重鎖 cDNA の 3' 翻訳領域をコードするプローブを用いてスクリーニングを行った。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 が単離された。次に、10°C および 30°C 馴化メダカ体幹部筋肉 cDNA ライブラリーをランダムにスクリーニングし、3' 翻訳および非翻訳領域の塩基配列を調べて各クローンの出現頻度を調べたところ、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した。

第 2 章では HNI 近交系メダカのゲノム BAC ライブラリーを対象に、各速筋ミオシン重鎖 cDNA で保存性の高い 3' 翻訳および非翻訳境界領域をプローブにコロニー・ハイブリダイゼーションを行い、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った。すべての速筋ミオシン重鎖遺伝子を含む 2 個の BAC クローンを選んで 296 kbp の全塩基配列を決定した結果、mMyHC-1 ~ mMyHC-11 の 11 速筋ミオシン重鎖遺伝子が単離され、エキ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、mMyHC-11/m-30-5 および新規機能ミオシン重鎖遺伝子 mMyHC-5 であった。これらの機能遺伝子はいずれも 41 エキソンと 40 イントロンから構成された。一方、mMyHC-4 は第 8 エキソンに終止コドンが挿入され、mMyHC-8 は第 18 ~ 25 エキシソンのみ存在した。また、mMyHC-10 は第 41 エキソンが欠損していることから、以上の 3 種のミオシン重鎖遺伝子は偽遺伝子と判断された。

第 3 章では、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、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、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 5'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。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、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った。

以上、本研究は、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代謝の恒常性を維持することが明らかにした。さらに、296 kbp のゲノム領域に 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示し、5'上流域の E box や MEF2 結合配列が 10°C型および 30°C型遺伝子の転写活性に重要なことなどを示唆したもので、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。