

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 15 年博士課程 進学

氏 名 平山 真

指導教員名 渡部 終五

論文題目 cDNA マイクロアレイを用いたメダカ温度適応関連遺伝子の網羅的解析

変温動物である魚類の体温は環境水温に依存して変化する。体温の変化は代謝速度の変化をもたらすと考えられるが、広温域性淡水魚のコイやキングヨは、季節的に大きく変化する環境水温に対しても代謝の恒常性を維持し、生存することができる。これまでに広温域性淡水魚の温度適応については多くの研究が行われ、水温依存的な膜脂質組成の変化やタンパク質のアイソフォームの発現変動などがこの適応機構の一端を担っていることが示されている。一方、メダカも広温域性淡水魚であるが、日本国内外に明確な地域集団が存在し、遺伝的多様性が大きい。また、近交系が樹立されており、Expressed Sequence Tag (EST) 解析や全ゲノム解析による遺伝情報の蓄積も著しい。しかしながら、メダカではこれらの特性を利用した温度適応分子機構に関する研究はほとんどない。

本研究ではこのようなメダカのゲノム情報や遺伝的特性に着目し、種々の地域集団由来の培養細胞を用いて、細胞レベルでの温度適応能を調べた。次に、EST データベースを利用して温度適応関連候補遺伝子を選抜し、それら遺伝子の温度依存的な発現の有無

を調べた。さらに、メダカ EST ライブラリーを利用して cDNA マイクロアレイを作製し、増殖適性温度が大きく異なる北日本および南日本集団由来の培養細胞を対象に培養温度を変化させたときの遺伝子発現プロファイルを網羅的に調べた。得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. メダカ各地域集団由来培養細胞株の温度依存的な増殖と遺伝子発現

東京大学の三谷から供与された北日本集団メダカ HNI 近交系尾鰭由来 OLHNI-1 および OLHNI-2、同胚体由来 OLHNI-e1、同集団 Kaga 近交系胚体由来 OLKaga-e2 の 4 株、南日本集団メダカ HdrR 近交系胚体由来 OLHdrR-e3、同集団 CAB 系統尾鰭由来 OLCAB-2、同胚体由来 OLCAB-e1、OLCAB-e3 の 4 株、東韓集団メダカ SOK 近交系胚体由来 OLSOK-e7 株、さらに対照として東南アジアに生息するセレベスメダカ胚体由来 CE-1 の線維芽細胞を実験に供した。北日本および東韓集団由来各細胞株は、33 から 15 へ移行した後 11 日目で 33 のときの 2 倍以上の細胞数を示した。南日本集団由来各細胞株およびセレベスメダカ由来 CE-1 株ではこの温度で、細胞数は一定もしくは逆に減少傾向にあった。一方、33 から 4 へ温度移行したところ、北日本集団由来 OLHNI-2、OLKaga-e2 株および東韓集団由来 OLSOK-e7 株では細胞数はほとんど変化しなかったが、その他の細胞株は減少傾向を示した。とくに、セレベスメダカ由来 CE-1 株は 3 日後にはほとんどすべての細胞が死滅した。

次に、温度依存的な発現変動が示唆されている既報の 102 遺伝子の配列をメダカ EST データベースから抽出し、25 で 7 日間培養した北日本集団由来 OLHNI-1 株を対象に RT-PCR に供して、33 で同日数培養したものの遺伝子発現と比較した。その結果、heat shock protein 47 遺伝子 (*HSP47*) は 33 の方で、inhibitor of nuclear factor- κ B 遺伝子 (*I κ B α*) および Rab family protein 1c 遺伝子 (*Rab-1c*) を含む 11 遺伝子は 25 の方で mRNA 蓄積量が高かった。さらに、RT-PCR により温度依存的な発現が明瞭に示された *I κ B α* および *Rab-1c* 両遺伝子につき、北日本、南日本および東韓集団由来細胞のそれぞれ OLHNI-1、OLHdrR-e3 および OLSOK-e7 株を 15 で 7 日間培養して定量的リアルタイム PCR に供し、33 で同日数培養したものと比較した。その結果、OLHNI-1 および OLSOK-e7 株の 33 における *I κ B α* の mRNA 蓄積量は 15 での蓄積量に比べてそれぞれ 4 および 3 倍と有意に高かった。一方、*Rab-1c* の mRNA 蓄積量は OLHNI-1 および

OLSOK-e7 株で 33 に比べて 15 でそれぞれ 2 および 3 倍と有意に高かった。以上の結果から、いくつかの遺伝子で mRNA 蓄積量が異なる温度依存性を示すことが明らかになった。

2. メダカcDNAマイクロアレイの構築

メダカを対象に温度依存的な遺伝子発現を網羅的に解析するため、メダカ EST ライブラリーを利用した cDNA マイクロアレイの作製条件を検討した。まず、EST データベースから個々のクラスターに含まれる代表的なクローンを選別した。すなわち、北日本集団 HNI 近交系の尾鰭由来 OLHNI-1 株、その UV 照射および γ 線照射細胞、さらには同系統の卵巣および肝臓から構築した各 cDNA ライブラリーからそれぞれ、1233、268、174、1549、および 325 クローンの、計 3549 クローンを *in silico* で選択した。次に、各クローンにつき汎用プライマーを用いた PCR で挿入配列を増幅し、MATSUNAMI 社製の APS コート、poly-L-lysine コート、高密度化アミノ基導入および DMSO 対応高密度化アミノ基導入の計 4 タイプのスライドガラスに供試した。さらに、DNA 溶解液として MATSUNAMI 社製 Spotting Solution、50% DMSO、および Spotting Solution と 50%DMSO の 1:1 混合の溶液を用いてスライドガラスへの DNA の固定方法を検討した。その結果、DMSO 対応高密度化アミノ基導入スライドガラスおよび 50%DMSO を加えた DNA 混合溶液がスポットの形状および大きさともに最適であった。この条件下で各クローンを対象に、1 枚のスライドガラス上に PCR 産物を 2 スポットずつ、またネガティブコントロールとして用いる人工 DNA のスポットを含む、計 7680 スポットからなる cDNA マイクロアレイを作製した。

3. cDNAマイクロアレイを用いたメダカ温度適応関連遺伝子の網羅的探索

マイクロアレイ実験はloop designを用いて行った。まず、25 で1ヶ月以上継代した北日本集団由来OLHNI-e1 株を 33 または 15 へ移行し、0、1、3、12時間、および1、3、7日後に全RNAを抽出した。次いで、各処理時間の細胞由来の全RNAを鋳型に、アミノアリル法によりCy3TMまたはCy5TMで標識したcDNAプローブを調製した。異なる蛍光物質で標識した2つの処理時間由来のcDNAプローブを混合し、前節で作製したcDNAマイクロアレイに対してハイブリダイゼーション後、マイクロアレイスキャナーにより

蛍光画像を取り込み、専用ソフトウェアによる画像解析に供した。各アレイにおけるシグナル強度比を中央値で標準化し、ANOVAによる統計解析を行ったところ、全 3549 クローン中、33 培養細胞で 153 クローン、15 培養細胞で 348 クローンがいずれかの処理時間の間で有意差 ($P<0.05$)を示した。これらのクローンでは、33 移行 3 時間後に mRNA蓄積量が大きく増大または減少した。興味深いことにその増大および減少傾向は移行 3 日後に逆転し、さらに 7 日後では 3 時間後と同様の傾向に復元した。一方、15 移行 1 時間後に多くのクローンで mRNA蓄積量が減少し、3 時間後では逆に増大する傾向を示した。その後、各クローンの mRNA蓄積量は経時的に増大または減少し、一定の傾向は認められなかった。

次に、25 で 1 ヶ月以上継代した南日本集団由来 OLHdrR-e3 株につき 15 へ移行後 0、3、12 時間、および 1、3 日後に細胞を採取し、上記の北日本集団由来 OLHNI-e1 株と同様の方法で解析試料を調製した。両株で細胞増殖能に差のみられた 15 で遺伝子発現プロファイルを比較したところ、15 移行後 3 日目で 127 クローンの mRNA 蓄積量が両株間で有意に異なった ($P<0.05$)。すなわち、gelsolin、myosin light chain kinase isoform 6、ribosomal protein L22 proprotein および tudor domain containing 7 をコードするクローンの mRNA 蓄積量は OLHNI-e1 株で温度移行 3 時間後から増大傾向にあったが、OLHdrR-e3 株では逆に減少した。これらのクローンは細胞増殖、シグナル伝達、タンパク質合成および転写に関わる遺伝子で、OLHNI-e1 および OLHdrR-e3 株間で 15 における代謝応答が大きく異なることが明らかとなった。

以上、本研究によりメダカの遺伝的特性を利用して温度適応に関する実験を行ったところ、各地域集団の温度適応能が細胞レベルで異なることが明らかとなった。また、メダカ EST データベースおよびライブラリーを利用して cDNA マイクロアレイ技術を確立し、これを用いて北日本および南日本集団メダカ由来細胞の温度適応能が遺伝子レベルで制御されていることを示した。これらの成果は変温動物の環境温度変化に伴う遺伝子ネットワークのダイナミズムについて、その一端を明らかにしたもので比較生化学的に資するところが大きく、生息適温が大きな限定要因となっている水産増養殖にも基礎的知見を与えるものである。