

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平山 真

広温域性淡水魚のメダカは、季節的に大きく変化する環境水温に対して代謝の恒常性を維持し、生存することができる。一方、メダカには明確な地域集団が存在し、遺伝的多様性が大きい。また、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。本研究ではこのようなメダカの遺伝的特性やゲノム情報に着目し、種々の地域集団由来の培養細胞を用いて温度依存的増殖能を調べるとともに、温度適応の関連遺伝子を網羅的に解析した。

北日本集団由来 OLHNI-1、OLHNI-2、OLHNI-e1 および OLKaga-e2 の 4 株、南日本集団由来 OLHdrR-e3、OLCAB-2、OLCAB-e1 および OLCAB-e3 の 4 株、東韓集団由来 OLSOK-e7 株、さらに東南アジアに生息するセレベスメダカ由来 CE-1 株の線維芽様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 へ移行しても増殖が可能であったが、南日本集団由来細胞株およびセレベスメダカ由来 CE-1 株は増殖しなかった。一方、33 から 4 へ移行したところ、北日本および東韓集団由来細胞株は細胞数を維持したが、南日本集団およびセレベスメダカ由来細胞株は減少した。

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 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 12 遺伝子は 25 の方で mRNA 蓄積量が高かった。さらに、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 *I κ B α* および *Rab-1c* を対象とする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 15 における *I κ B α* の mRNA 蓄積量は 33 での蓄積量よりそれぞれ 5 および 2 倍、*Rab-1c* ではそれぞれ 2 および 3 倍と有意に高かった。

さらに、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 *in silico* で選別し 3549 クローンを得た。さらに、50%DMSO の DNA 溶解液および DMSO 対応高密度化アミノ基導入スライドガラスを用い、各クローン由来 PCR 産物を 2 スポットずつとネガティブコントロールの人工 DNA のスポットを含む 7680 スポットからなる cDNA マイクロアレイを作製した。次に、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 日目の細胞につき、作成した cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを解析した。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。

次に、南日本集団由来 OLHdrR-e3 株につき、上記の OLHNI-e1 株と同様に解析試料を調製し、15 で遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、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 ($P < 0.05$)。一例として、gelsolin、myosin light chain kinase isoform 6 をコードするクローン の mRNA 蓄積量は OLHNI-e1 株でほぼ一定であったが、OLHdrR-e3 株では減少した。これらのクローンは細胞増殖、シグナル伝達、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た 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の違いが遺伝子レベルで制御されていることが示された。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ともに、水産増養殖にも基礎的知見を与えるもので、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。