

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 尾島 信彦

生物は熱ストレスに应答して細胞内で熱ショックタンパク質 (heat-shock protein; HSP) の合成を誘導する。HSP の発現は転写レベルで制御されており、その特異的転写因子は熱ショック転写因子 (heat-shock transcription factor; HSF) と呼ばれる。主要転写因子である HSF1 は HSP 遺伝子プロモーター上流域の熱ショックエレメント (heat-shock element; HSE) に特異的に結合し、HSP 遺伝子の転写を促進する。魚類細胞においてはこれまで熱ストレスによる HSP の合成誘導が報告されているが、HSP 遺伝子については未だ不明な点が多い。そこで本研究は、冷水性魚類ニジマス *Oncorhynchus mykiss* を対象に、HSP の構造と遺伝子発現特性、および発現調節機構を明らかにすることを目的として行われた。

Hsp70 は脊椎動物における主要なストレス誘導性タンパク質で、そのアミノ酸配列は生物種間で高度に保存されている。一方、ニジマスは 4 倍体化した祖先種をもつと考えられており、重複した *Hsp70* の存在が推定される。実際に重複遺伝子が存在するかどうかを明らかにするため、25、30 分間、熱処理した 3 ヶ月齢のニジマスから *Hsp70* をコードする全長 cDNA クローンを単離した。その結果、2 つの *Hsp70* (*Hsp70a* および *Hsp70b*) が同定された。これらの推定アミノ酸配列は互いに 98.1% の同一率を示した。サザンブロット解析により、*Hsp70a* と *Hsp70b* はゲノム上で異なる遺伝子としてコードされていることが示された。ニジマス RTG-2 細胞を用いたノーザンブロット解析により、致死的な熱ストレスを与えた細胞において、長さの異なる 2 種類の mRNA の蓄積がいずれの *Hsp70* にも観察された。これらの結果からニジマスには重複した *Hsp70* が存在し、熱ストレスの強さにより各 mRNA の発現パターンが変化することが明らかとなった。

次に、*Hsp70* 以外の HSP ファミリー遺伝子につき、重複遺伝子を含めた包括的な探索を試みた。25、24 時間の熱ストレス処理した RTG-2 細胞から cDNA ライブラリーを作製し、任意に 200 クローンを単離してそれらの塩基配列を決定した。その結果、*Hsp90 $\beta$ a*、*Hsp90 $\beta$ b*、*Grp78*、*Hsp70a*、*Hsc70a*、*Hsc70b*、*Cct8*、*Hsp47*、*DnaJ* のホモログが単離された。これら遺伝子は RTG-2 細胞のノーザンブロット解析により、単一バンドとして検出された。ただし *Hsp70a* は上述と同様に、強い熱ストレス下で 2 本の mRNA のバンドが検出された。定量的 RT-PCR 解析により、*Hsp70a* と *Hsp70b* の mRNA 蓄積量は 28、3 時間の熱ショック後、それぞれ定常状態の 480 倍および 510 倍に増加することが示された。*Hsc70a*、*Hsc70b*、*Hsp47* の mRNA 蓄積量は、それぞれ定常状態の 1.3 倍、2.8 倍、1.6 倍に増加した。以上の結果から、重複遺伝子間や HSP ファミリー間で mRNA の発現特性に差異のあることが明らかとなった。

さらに、ニジマスにおける HSP ファミリー遺伝子の転写調節機構を明らかにするため、RTG-2 細胞から HSF をコードする cDNA のクローン化を試みた。その結果、重複遺伝子と考えられる 2 つの *HSF1* (*HSF1a* および *HSF1b*) が同定された。サザンブロット解析により、*HSF1a* および *HSF1b* はゲノム上でそれぞれ異なる遺伝子としてコードされていることが示された。RT-PCR 解析により、*HSF1a* と *HSF1b* の mRNA は非ストレス下のニジマス諸組織において共発現していることが明らかとなった。次に *HSF1a* にはヘマグルチニンタグ、*HSF1b* にはプロテイン C タグを融合させる発現ベクターを構築し、*in vitro* 転写・翻訳を行った。この翻訳産物を用いたゲルシフトアッセイにより、両 *HSF1* は HSE コンセンサス配列の合成オリゴヌクレオチドに結合することが示された。また翻訳産物を EGS で化学的に架橋し、各エピトープタグに特異的な抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、各 *HSF1* のホモ 3 量体形成が確認され、さらに *HSF1a* と *HSF1b* のヘテロ 3 量体形成も観察された。これ

らの結果から、ニジマスでは HSF1 アイソフォームが 2 種類発現しており、その両方が HSP ファミリー遺伝子の熱ストレス誘導性転写調節に関与していることが示唆された。

以上、本研究により、冷水性魚類ニジマスには重複遺伝子を介する独特な熱ストレス応答の分子機構が存在することが明らかとなった。また重複した HSP ファミリー遺伝子や *HSF* を区別して検出することが初めて可能となった。本研究は魚類の増養殖に基礎的知見を与えるのみならず、今後さらに重複遺伝子の存在意義や種々のストレス因子の解明へと発展することが期待されることから、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。