

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 16 年博士課程 進学

氏名 中庭 真基子

指導教員名 渡部 終五

論文題目 メダカ・ヘモペキシン様タンパク質 Wap65 の発現調節機構に関する研究

魚類などの水棲生物は変温動物で、環境水温の変化はその代謝に大きな影響を及ぼすことが容易に想像できる。しかしながら、魚類は日周的あるいは季節的に絶えず変化する水温中、温度適応して代謝調節を行うことで恒常性を保ち、生命を維持している。例えば、季節的に水温が大きく変動する温帯域の淡水魚は、数週間から数ヶ月間にわたって生ずる水温の大きな変化に適応し馴化する。これら広温域性魚類に属するコイ *Cyprinus carpio* およびキンギョ *Carassius auratus* は、高温馴化に伴って 65 kDa の水溶性タンパク質、warm temperature acclimation-related 65 kDa protein (Wap65) の発現量を特異的に増大させる。一次構造解析の結果、Wap65 は哺乳類のヘム結合性血漿糖タンパク質、ヘモペキシンと類似することが示された。同じ広温域性淡水魚のメダカ *Oryzias latipes* および海産魚トラフグ *Takifugu rubripes* では 2 種類の Wap65 の存在が明らかにされた。さらに、Wap65 の発現には環境温度の変化のみならず、生体防御系因子や他の環境因子の関与が示唆された。しかしながら、その発現調節機構については未だ不明な点が多い。

本研究ではこのような背景の下、メダカ成体を対象に温度馴化過程における Wap65 の転写産物量およびタンパク質量の変化を調べた。次に、メダカ胚発生における転写産物量の

変化および発現部位の解析を試みた。さらに、メダカ Wap65 遺伝子 (*mWap65*) の 5' 上流域につき、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. メダカ成体の温度馴化過程における Wap65 遺伝子およびタンパク質の発現変動

メダカ成体を 5°C に充分馴化させた後、水温を 2 日間で 35°C に上昇させ、その後、同温度で 21 日間飼育した。この間、2 種類の *mWap65*、*mWap65-1* および *mWap65-2* の転写産物量および発現タンパク質量の経時的な変動を、それぞれ定量的リアルタイム PCR および特異的抗体を用いたイムノブロットング法を用いて調べた。その結果、*mWap65-1* 転写産物量は水温が 35°C に到達した直後に大きく増大した後、35°C で 3 日目には減少し、21 日目には水温 5°C のときのレベルに戻った。一方、*mWap65-2* 転写産物量は水温上昇を始めて 20°C に到達した 1 日目および 35°C に到達した当日にかけて大きく減少したが、21 日目には 5°C のときのレベルに回復するなど、2 種類の *mWap65* は相補的な発現変動パターンを示した。次に、タンパク質レベルでは *mWap65-1* および *mWap65-2* ともその発現量は転写産物量より数日から 1 週間ほど遅れて変化したが、転写産物量の経時的な変動パターンと同様の傾向を示した。

2. メダカ Wap65 遺伝子の胚発生期における遺伝子発現様式

mWap65 の胚発生期における遺伝子発現様式を明らかにするため、種々の発生段階のメダカ胚を採取し、各段階における転写産物蓄積量を定量的リアルタイム PCR により調べた。*mWap65-1* は実験開始時の後期桑実胚期より転写産物が検出され、後期囊胚期で最高値が観察された。その後、蓄積量は一度減少したが 30 体節期で再び上昇し、その値は孵化期まで維持された。一方、*mWap65-2* の転写産物は後期囊胚期で最初に検出され、以降、孵化期まで急速に蓄積量が増大した。次に、体節完成期のメダカ胚をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションに供し遺伝子発現部位を調べた。その結果、*mWap65-1* の転写産物は胸鰭の縁辺部および尾部の正中膜鰭に沿って検出された。一方、*mWap65-2* の転写産物は肝臓原基にのみ観察された。

次に、*mWap65* の発現様式を *in vivo* で明らかにするため、*mWap65* プロモーターの制御下、green fluorescent protein (GFP) を発現するトランスジェニック魚の作出を試みた。まず、メダカ BAC ライブラリーのスクリーニングにより、*mWap65-1* を含むクローン 182024 お

よび *mWap65-2* を含むクローン 107E17 を単離し、その全配列を決定した。次に、両遺伝子の 5' 上流域を GFP 遺伝子の 5' 上流に連結したコンストラクトを作製し、1 細胞期のメダカ受精卵に顕微注入した。いずれのコンストラクトを導入した場合でも中期囊胚期には GFP の発現がみられた。その後、*mWap65-1* プロモーター由来の GFP は孵化期には肝臓および耳石付近に観察され、孵化後は肝臓にのみみられた。一方、*mWap65-2* プロモーター由来の GFP は心臓発達期には卵黄嚢で観察され、孵化後は消化器官に局在した。以上の結果から、*mWap65* 両遺伝子は胚発生の初期に発現するが、その時期や部位は相違することが明らかになった。

3. メダカ Wap65 遺伝子ゲノム構造の解析

mWap65-1 および *mWap65-2* のエクソン-イントロン構造を解析した。次に、全ゲノムデータベースが利用できるトラフグ *Wap65*、*fWap65-1* および *fWap65-2*、さらには *Wap65* との相同性が知られているヒト・ヘモペキシン遺伝子についてもエクソン-イントロン構造を解析して比較した。その結果、これら遺伝子のエクソン-イントロン構造は一致し、魚類 *Wap65* はヒト・ヘモペキシン遺伝子のオーソログであることが示された。

次に、*mWap65* の翻訳領域およびその近傍の塩基配列をヒト・ヘモペキシン遺伝子のもものと比較したところ、遺伝子 5' 上流域の相同性はほとんどみられなかった。しかしながら、*mWap65-1* の第 5 および第 6 エクソンは *mWap65-2* およびヒト・ヘモペキシン遺伝子の対応する領域と明らかな相同性を示した。そこで、*mWap65-1* および *mWap65-2* の第 5 および第 6 エクソンにつき、演繹一次構造を哺乳類ヘモペキシンのそれと比較したところ、ヘモペキシンのレセプター結合部位に相当することが示された。ヘモペキシンのヘム結合部位の立体構造の安定化に重要と考えられる 8 個の疎水性アミノ酸については、*mWap65-1* では 5 個、*mWap65-2* では 7 個が該当し、それらはほぼ第 6 エクソンに局在した。

さらに、*mWap65* の 5' 上流域を転写因子の結合部位予測プログラムに供したところ、肝臓に豊富に存在し、脂肪の代謝と分化に関与する HNF-3 β の結合部位が含まれたほか、消化管の形成に重要な Cdx1 や心臓の発達に重要な Nkx-2.5、心臓および前脳の発生に関係する Prx-2 など発生に重要な転写因子の結合配列が存在し、これらが両 *mWap65* の転写調節に関与することが考えられた。

4. ルシフェラーゼアッセイによるメダカ *Wap65* 遺伝子転写調節領域の機能解析

前節のように *mWap65* の 5' 上流域、すなわち転写調節領域に様々なシスエレメントの存在が示唆されたため、レポーターアッセイにより同域の機能解析を試みた。*mWap65-1* および *mWap65-2* の 5' 上流約 3 kbp を対象に、種々の長さの DNA 断片を調製し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に連結してレポーターコンストラクトを構築した。これらをメダカ肝癌由来培養細胞 DIT29 株に導入して 33 °C で 24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、*mWap65-1* の 5' 上流 -218 bp から -131 bp の領域および *mWap65-2* の -442 bp から -234 bp の領域が転写活性に重要であることが示された。これら領域につき、さらに 5' 側を欠損した変異体を構築しルシフェラーゼアッセイを行った結果、*mWap65-1* の発現には -184 から -154 bp の領域が、*mWap65-2* では 5' 上流 -442 bp から -367 bp および -305 bp から -234 bp の領域が重要であることが示された。したがって、*mWap65-1* の転写調節にはこれら領域に含まれる前節で述べた HNF-3 β または赤血球の産生と成熟に必須の転写因子 GATA-1 の結合部位が関与することが示唆された。一方、*mWap65-2* では前節の Cdx1 やサイトカインやストレスシグナルに応答する遺伝子の発現調節を行ったり細胞増殖や分化に関与する転写因子 AP-1 が転写調節に関わることが考えられた。

さらに *mWap65* に免疫応答性があるかどうかを調べるため、5' 上流域 3 kbp を連結したレポーターコンストラクトを上述の培養細胞に導入して炎症性サイトカインの一種インターロイキン-6 (IL-6) で刺激した。しかしながら、*mWap65-1* および *mWap65-2* の転写活性に変化は認められなかった。

以上、本研究により、メダカ成体では *mWap65-1* の転写産物量およびタンパク質量は温度馴化過程の初期に上昇し、一方 *mWap65-2* のそれらは減少し、相補的な発現変動を示すことが明らかになった。また、両遺伝子は胚発生の初期に発現するが、それらの発現部位は明らかに異なることが示された。さらに 5' 上流域の解析により、両遺伝子の転写調節には胚発生、器官形成、脂質代謝、免疫系に働く転写因子の関与が示唆された。これらの成果は、魚類の温度馴化分子機構の一端を明らかにしたもので、比較生理生化学的に資するところが大きいと考えられる。