

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中庭 真基子

魚類などの水棲生物は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。一方、広温域性魚類に属するコイおよびキンギョは高温馴化に伴って 65 kDa の水溶性タンパク質、Wap65 の発現量を特異的に増大させ、この Wap65 の一次構造は哺乳類のヘム結合性血漿糖タンパク質、ヘモペキシシンと類似する。同じ広温域性淡水魚のメダカおよび海産魚トラフグでは 2 種類の Wap65 の存在が明らかにされたが、その発現調節機構については未だ不明な点が多い。本研究ではメダカを対象に温度馴化過程およびメダカ胚発生期における Wap65 の発現解析を行い、さらに、転写調節機構の解析を試みた。

まず、メダカ成体を 5°C に馴化させた後、水温を 2 日間で 35°C に上昇させた。その後、同温度で 21 日間飼育した。この間 2 種類のメダカ Wap65、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調べた。mWap65-1 転写産物量は水温が 35°C に到達した直後に増大する傾向がみられ、一方、mWap65-2 は水温上昇後、直ちに減少した。いずれの遺伝子も 21 日目には 5°C のときのレベルに回復し、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 とも転写産物量の変動パターンと同様の傾向を示した。

次に、mWap65 の胚発生期における遺伝子発現様式をリアルタイム PCR で調べた。mWap65-1 は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後、蓄積量は減少した。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た。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、mWap65-2 は肝臓原基にのみ観察された。さらに、mWap65 の挙動を *in vivo* で明らかにするため、mWap65 プロモーターの制御下、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 ライブラリーより mWap65 を含む BAC クローンを単離した。次に、両遺伝子の 5' 上流域を GFP

遺伝子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射した。いずれの遺伝子も中期囊胚期には GFP の発現がみられた。孵化後は *mWap65-1* 由来の GFP は肝臓にのみみられ、*mWap65-2* は消化器官に局在した。以上、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。

次に、ゲノム構造を解析した。2種類の *mWap65* のエクソン-イントロン構造はトラフグ *Wap65* およびヒト・ヘモペキシン遺伝子のそれと一致した。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のと比較したが、5'上流域の相同性はほとんどみられなかった。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、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 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 *mWap65* の転写調節に関与することが考えられた。

そこで、レポーターアッセイにより転写調節領域の解析を試みた。*mWap65* の 5'上流域をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したコンストラクトを構築し、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* の転写調節には前述の HNF-3 β または造血に必須の転写因子 GATA-1 の結合部位が関与し、*mWap65-2* では前述の Cdx1 やサイトカイン応答性の遺伝子の発現調節を行う AP-1 が関与することが示唆された。さらに、*mWap65* の免疫応答性を調べるため、上述の培養細胞を炎症性サイトカインの一種 IL-6 で刺激して転写活性を調べた。しかしながら、2 遺伝子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* のそれらは減少する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、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。