

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏名 小野 陽介
指導教員名 渡部 終五

論文題目 メダカ筋発生におけるミオシン重鎖遺伝子の発現制御機構に関する研究

筋線維の構成単位である筋原線維はミオシンを主体とする太いフィラメントとアクチンを主体とする細いフィラメントが規則的に配列した構造からなり、両フィラメントのすべりで起こる筋収縮は動物の生命活動の根幹をなすものである。このうちミオシン分子は2本の重鎖サブユニット(MYH)と4本の軽鎖サブユニットから構成され、特にMYHはATPおよびアクチンとの結合部位、フィラメント形成部位を有し、ミオシンの生理機能の主体をなしている。脊椎動物においては多くのMYHアイソフォームが存在し、各アイソフォームをコードする各遺伝子(MYH)は組織や発生段階ごとに異なる発現様式を示すことが知られているが、それらの機能や発現制御機構には未だ不明な点が多い。一方、魚類の筋肉は一般的に嫌気代謝的な速筋が体幹部の大部分を占め、好気代謝的な性質を持つ遅筋は体幹部の表層部分に局在し、速筋と遅筋は異なるMYHアイソフォームを発現する。このような魚類筋肉の構造は速筋線維と遅筋線維が混在して存在する哺乳類のものとは明らかに異なるが、魚類に特徴的な筋肉構造の詳細な形成機構は不明である。

本研究ではこのような背景の下、発生および遺伝学研究のモデル魚であるメダカ *Oryzias latipes* を用いて筋形成過程におけるMYHの発現解析および発現制御機構の解析を行い、魚類の筋形成機構の解明を目指したもので、成果の概要は以下の通りである。

1. メダカの発生過程における *MYH* の発現解析

まず、3' RACE による横紋筋型 *MYH* の cDNA クローンライブラリーを作成した。筋肉の前駆組織である体節の形成期である受精後 2 日目から孵化期にあたる受精後 9 日目、および孵化後 60 日目までの筋形成過程における cDNA クローンを調べたところ、8 種の新規遺伝子および 5 種の既報成体型 *MYH* からなる 13 種の *MYH* が得られ、各 *MYH* は発生段階ごとに異なるクローン頻度を示した。特に受精後 2 日目から 4 日目までの体節形成初期では胚体(embryonic)型の *mMYH_{emb1}* が優占的に得られたのに対し、孵化期前後では仔魚(larval)型の *mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* が優占的となった。さらに孵化後の経過とともに既報の成体型 *MYH* のクローンが多く得られたことから、体節形成期から孵化期、孵化期から成体期の 2 段階にかけて筋形成で大きな変化が起きていることが予想された。

次に、RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションにより、*mMYH_{emb1}* の発現は受精後 2 日目より観察され、背側と腹側の筋肉を分割する組織である水平筋隔に局在することが示された。また、発現部位は発生に伴い体幹部側方に移動し、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の遅筋前駆組織である *adaxial cell* と類似する挙動を示した。一方、*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* は受精後 3 日目より発現し、体幹部の筋節全体および仔魚の頭部筋肉で発現が観察された。また、クローンライブラリーから少ないクローン頻度で得られた遅筋・心筋型 *MYH* の *mMYH_{C1}* および *mMYH_{C2}* は、それぞれ水平筋隔および心筋で特異的な発現がみられた。これらの筋形成過程における *MYH* の転写産物の局在性は、異なる筋肉の形成に特異的な *MYH* の発現が関与していることを示唆した。

2. メダカ *MYH* の分子系統解析およびゲノム解析

筋形成過程において優占的に発現する *mMYH_{emb1}*、*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* につき、ショットガンシーケンス法および 5' RACE により完全長 cDNA の解析を試みた。その結果、3 種の *MYH* につき、それぞれ 1938、1933 および 1933 残基のアミノ酸をコードする 5997 bp、5987 bp および 5982 bp の全長配列が決定された。さらに演繹アミノ酸配列を用いて分子系統解析を行い、既報の魚類 *MYH* と比較したところ、3 種の *MYH* はいずれも速筋型に分類された。*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* は胚体速筋型に分類されたのに対し、*mMYH_{emb1}* は発生初期に発現するにも関わらず成体型 *MYH* に近いアミノ酸配列を持つことが示された。さらに、cDNA 配列をもとにゲノムデータベースで BLAST 検索を行った結果、*mMYH_{emb1}* は 5 番染色体に含まれる scaffold 431 上に位置した。これに対し、*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* は 6 番染色体の scaffold 9 および染色体情報のない scaffold 2438 上に位置していた。また、両遺伝子はゲノム上で隣接していた。これらの *MYH* は既報の成体型 *MYH* を含む遺伝子クラスターとは異なるゲノム上の位置に見出されたことから、*mMYH_{emb1}*、*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* は成体型 *MYH* と分子系統的な由来が異なり、その機能も異なっていると考えられる。

3. メダカ胚体型・仔魚型 *MYH* の転写調節領域の解析

次に、*mMYH_{emb1}*、*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* の 5' 上流配列の解析を行った。その結果、*mMYH_{emb1}*

の上流配列中にはオーソログ遺伝子であるトラフグ *Takifugu rubripes* *MYH*_{M2528-2} の上流配列とホモロジーを示す 164 bp の領域が存在し、同配列中には複数の *cis* エlementが確認された。さらに、遺伝子上流配列を hrGFP および DsRed のコード配列に連結した組換え DNA 体を作成し、マイクロインジェクションにより受精卵へ導入し、胚体における蛍光タンパク質の局在を観察した。その結果、*mMYH*_{emb1} の上流 1.9 kb と hrGFP を連結した emb1-1.9k-hrGFP コンストラクトにより発現したタンパク質は水平筋隔における *mMYH*_{emb1} 転写産物の発現を再現した。一方、*mMYH*_{L1} の上流 2.6 kb と DsRed を連結した L1-2.6k-DsRed、および *mMYH*_{L2} の上流 4.0 kb と hrGFP を連結した L2-4.0k-hrGFP は、いずれも発現タンパク質が筋節全体に分布し、内在性の遺伝子発現を再現した。これらの結果から、筋形成過程における *MYH* 発現の局在性が 5' 上流配列によって制御されていることが明らかとなった。また、L1-2.6k-DsRed と L2-4.0k-hrGFP は単一筋線維中で共発現することが示されたことから、*mMYH*_{L1} および *mMYH*_{L2} の上流配列は共通の発現制御機構を有すると考えられた。さらに、これらの遺伝子の発現はゼブラフィッシュ卵へ導入した場合にも観察されたことから、*MYH* の上流配列による発現制御が魚類で保存されていることが予想された。emb1-1.9k-hrGFP および L1-2.6k-DsRed については、生殖細胞系列に導入遺伝子を取り込んだ個体から F1 ファミリーを得ることでトランスジェニック系統が作出された。

さらに、*mMYH*_{emb1} については、上流 1.9 kb から特定の領域を除いた deletion コンストラクト、および特定の *cis* エlementに変異を導入した mutation コンストラクトを作成して、*in vivo* プロモーター解析を行なった。上述のトラフグ *MYH*_{M2528-2} 上流配列とのホモロジー領域に含まれる -1069~-1129 bp 間に存在する 61 bp の配列を除くと hrGFP の発現が有意に低下したことから、この領域が *mMYH*_{emb1} の発現に重要であることが示された。しかしながら、この領域をさらに 2 分割していずれかを除去したコンストラクトでは、いずれも hrGFP の発現が変化しなかった。また、この領域に含まれる E-box 配列、SRY および deltaEF1 の結合配列に変異を導入した場合でも発現が変化しないことから、未知の *cis* エlementの存在もしくは複数の *cis* エlementが共同して発現に関与していることが示唆された。

4. メダカ胚体型 *MYH* を発現制御する転写因子の解析

前述のように、*mMYH*_{emb1} の発現が遅筋形成に関与していることが示唆された。そこで、ゼブラフィッシュの筋発生における遅筋の誘導因子ヘッジホッグのシグナル伝達経路をシクロパミン処理により阻害したところ、emb1-1.9k-hrGFP トランスジェニック胚における hrGFP 発現個体の頻度が有意に低下した。さらに、emb1-1.9k-hrGFP 発現細胞は adaxial cell が分化した muscle pioneer と呼ばれる細胞群のマーカータンパク質 engrailed を同時に発現することが免疫染色により示された。これらの結果から *mMYH*_{emb1} を発現する細胞が遅筋発生の系譜に属することが明らかになった。

そこで、*mMYH*_{emb1} の発現を制御する転写因子の同定を目的に、上述の *in vivo* プロモーター解析によって同定された上流配列を用いて DNA-タンパク質結合実験および酵母 one-hybrid 法による転写因子のスクリーニングを試みた。その結果、前者の実験では発現制御配列と予想される

61 bp の領域と特異的に結合するタンパク質の存在が示された。さらに、酵母 one-hybrid 法による転写因子のスクリーニングでは、転写因子をコードする遺伝子のほか複数の候補遺伝子が得られた。しかしながら、いずれの方法でも *mMYH_{emb1}* を発現制御する転写因子の同定には至らなかった。

以上、本研究により、メダカの筋形成過程では *MYH* は成体筋肉中とは異なる発現プロファイルを示すことから、筋発生と *MYH* の発現が密接に関わっていることが示された。また、トランスジェニックを用いた解析手法により、筋形成過程において優占的に発現する *mMYH_{emb1}*、*mMYH_{L1}* および *mMYH_{L2}* は 5' 上流配列により発現が制御され、その制御は魚類で保存されていることが明らかになった。さらに、*mMYH_{emb1}* を発現する細胞が遅筋発生の系譜に属し、その発現がヘッジホッグシグナル伝達経路に依存することを示した。これらの成果は、魚類の筋形成機構の一端を明らかにしたもので、系統発生学に寄与するのみならず、筋成長の差が養殖効率に影響を及ぼすことから応用面にも資するところが大きいと考えられる。