

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小野陽介

---

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、MYHはミオシンの生理機能の主体をなしている。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る、一方、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、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。

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横紋筋型MYHの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<sub>emb1</sub>* 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<sub>L1</sub>* および *mMYH<sub>L2</sub>* が優占的となった。次に、RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションにより、*mMYH<sub>emb1</sub>* 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。一方、*mMYH<sub>L1</sub>* および *mMYH<sub>L2</sub>* 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。

次に、*mMYH<sub>emb1</sub>*、*mMYH<sub>L1</sub>* および *mMYH<sub>L2</sub>* 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<sub>L1</sub>* および *mMYH<sub>L2</sub>* は胚体速筋型に分類されたのに対し、*mMYH<sub>emb1</sub>* 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、ゲノムデータベースから、*mMYH<sub>emb1</sub>*、*mMYH<sub>L1</sub>* および *mMYH<sub>L2</sub>* 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。

次に、*mMYH<sub>emb1</sub>* 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<sub>M2528-2</sub>* 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。そこで、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た。その結果、*mMYH<sub>emb1</sub>* 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<sub>emb1</sub>* 転写産物の発現

を再現した。一方、*mMYHL1*の上流 2.6 kb と DsRed を連結した L1-2.6k-DsRed、および *mMYHL2*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。*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、*MYHM2528-2* 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<sub>emb1</sub>* の発現に重要であることが示された。

次に、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<sub>emb1</sub>* 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、*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。

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が明らかになった。筋形成過程において優占的に発現する *mMYH<sub>emb1</sub>*、*mMYHL1* および *mMYHL2* は 5' 上流配列により発現が制御されていることが明らかになった。さらに、*mMYH<sub>emb1</sub>* 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、学術上、応用上資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。