

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 タダサハブ ハウサハブ アコカ-

魚類における筋形成は、速筋と遅筋の分離した構造や成体での筋線維数の増大など、哺乳類と比較して多くの違いがある。骨格筋や心筋の主要構成成分である横紋筋型ミオシンは2本の重鎖(MYH)と4本の軽鎖からなるが、筋線維の性質はMYH遺伝子(MYH)の発現により規定される。他の脊椎動物同様、魚類のMYHもマルチジーンファミリーを形成しているが、その構成数は高等脊椎動物よりはるかに多く、筋形成の過程でそれらがどのように発現し、筋肉の機能とどのように関連するか、その詳細は明らかでない。本研究は、トラフグ *Takifugu rubripes* を対象に、成体および発生過程胚および仔魚の筋肉におけるMYHの発現パターンを明らかにするとともに、筋芽細胞の維持や増殖に関わるPaxファミリーの構造と発現様式を解析した。

まず、酸性(pH4.6)処理に対する筋原線維ATPase活性の感受性の違いから、速筋には様々な直径の筋線維が含まれており、太い線維は酸性処理でATPase活性が不活化し、細い線維は安定であることが示された。一方、体の表層と背鰭下の遅筋の筋線維は同処理でも安定であった。また、仔魚では、速筋の筋線維は全て酸性処理で不活化された。さらにNADH-diaphorase染色では、背鰭下遅筋の筋線維は全て染色され、これらは酸化的代謝を行うと考えられた。一方、表層遅筋では、内側の比較的太い筋線維は、より表層にある細い線維に比して染色の程度が弱く、これらは中間的な酸化的代謝能を持つことが示唆された。速筋では全ての筋線維が染色されなかった。

続いて、成体トラフグ筋肉におけるMYHsの発現パターンを解析した。ランダムクローニングの結果、速筋、遅筋および心筋から7種類のMYHが得られ、うちMYH_{M86-1}、MYH_{M8248}およびMYH_{M880}はそれぞれ速筋、遅筋および心筋特異的に、MYH_{M2528-1}、MYH_{M1034}、MYH_{M2126-2}およびMYH_{M5}は複数の筋肉で検出された。分子系統解析の結果、MYH_{M86-1}、MYH_{M2528-1}およびMYH_{M1034}は速筋型、MYH_{M8248}は遅筋型、MYH_{M2126-2}は心筋型、MYH_{M5}とMYH_{M880}は遅筋/心筋型にそれぞれ分類された。クローンの出現頻度解析とノーザンブロット解析の結果、速筋ではMYH_{M86-1}が、心筋ではMYH_{M2126-2}が最も優先的であり、遅筋ではMYH_{M2528-1}、MYH_{M1034}、MYH_{M8248}、MYH_{M2126-2}およびMYH_{M5}がそれぞれほぼ等量ずつ発現していた。In situ hybridizationの結果、MYH_{M86-1}の転写産物は、速筋の全ての筋線維で検出された。また、速筋中、細い筋線維ほどMYH_{M2528-1}を多く発現する傾向がみられた。細い筋線維は成体で新しく形成されたものと考えられ、MYH_{M2528-1}の発現と成体でのhyperplasiaとの関連が示唆された。MYH_{M8248}とMYH_{M2126-2}を発現する筋線維は遅筋に分布した。興味深いことに、遅筋の中で比較的太く、中間的な酸化的代謝能を示す筋線維は速筋型のMYH_{M2528-1}を発現していた。

また、トラフグ胚および仔魚についても、同様にMYHsの発現パターンを明らかにした。

トラフグ胚および仔魚からは6種の横紋筋型 *MYH* がクローニングされ、ここには速筋型 *MYH_{M743}*、*MYH_{M86-2}*、*MYH_{M2528-1}* および *MYH_{M1034}*、心筋型 *MYH_{M2126-1}*、遅筋/心筋型 *MYH_{M5}* が含まれた。クローンの出現頻度は、胚から仔魚期まで通じて *MYH_{M743}* が最も多く、受精後5日目と7日目の胚では *MYH_{M86-2}* が続いて、受精後10日目と16日目の仔魚では *MYH_{M2528-1}* が続いて多かった。*MYH_{M1034}* は仔魚でのみ僅かに検出され、*MYH_{M5}* は胚から仔魚期まで検出された。RT-PCRで各 *MYH* の発現時期を調べたところ、*MYH_{M743}* は受精後3日目、*MYH_{M86-2}* は受精後4日目の胚で発現が始まり、その後仔魚期まで発現し、成体では検出されなかった。これら *MYH* は筋発生過程での働きが示唆される。一方、*MYH_{M5}* は受精後3日目、*MYH_{M2528-1}* は受精後7日目の孵化期の胚から発現が始まり、その後継続的に発現し、成体でも発現が認められた。これらは筋成長過程での働きが示唆される。*In situ hybridization* の結果、受精後4日の胚では、*MYH_{M86-2}* は筋節全体で、*MYH_{M5}* は表層遅筋と水平筋隔で特異的に発現することが明らかになった。

Pax ファミリーは様々な組織の発生や器官形成に関わるが、このうち *Pax3* と *Pax7* は筋芽細胞の増殖や維持等に関与する。そこで、トラフグについても *Pax* の構造と発現様式を検討した。*In silico* 解析で、トラフグゲノムにはそれぞれ2種類のパラログ *Pax3a* と *Pax3b* および *Pax7a* と *Pax7b* が含まれることが明らかになった。哺乳類の *Pax3* と *Pax7* にはペアードメイン (PD) の一次構造が異なるスプライシングバリエーションがあり、その結果、DNA結合の特異性に違いが生じる。cDNAクローニングとゲノム解析の結果、トラフグ *Pax3b* と *Pax7b* についても同様に、選択的スプライシングでPDの構造の異なるバリエーションが形成されていた。RT-PCRの結果、4種の *Pax* 転写産物は受精後3日目以降仔魚期まで継続的に検出され、それらが筋発生過程で働くことが示された。さらに *Pax7b* は成体でも発現し、同遺伝子が成体での筋形成に関与していることが示唆された。

以上、本研究は、トラフグ成体、胚および仔魚の筋肉の構造と機能的特徴を明らかにするとともに、それら筋肉で発現する *MYH* を同定し、その発現パターンの詳細を明らかにした。各 *MYH* は筋肉の部位によって、あるいは発生過程において特徴的な発現様式を示し、それぞれに機能的分担があり、筋肉の性質や成長と密接に関わることが考えられた。本研究の成果は、魚類の筋肉の特徴的な構造と成長様式を理解するうえで、きわめて重要な基礎的知見であり、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。