

## 論文の内容の要旨

水圏生物学 専攻  
平成 21 年度博士課程 入学  
氏名 小山 寛喜  
指導教員 渡部 終五

### エビ類腹部屈筋ミオシンの分子構造および組織分布に関する 生化学的および分子生物学的研究

エビ類は世界各地で養殖されており、水産業において重要な位置を占めている。わが国での主要養殖種はクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* であるが、ウシエビ *Penaeus monodon* およびパシフィックホワイトシュリンプ（以下、ホワイトシュリンプと略記）*P. vannamei* も日本国内で広く流通しており、これら 2 種は海外において大規模養殖されている。エビ類の品質は、可食部である腹部屈筋に依存しており、品質の客観的評価にはこの部位の生化学的性状を明らかにすることが重要と考えられる。一方、筋肉の主要構成タンパク質はミオシンで、その性状が筋肉の生化学的性状の決定に大きな役割を果たす。ミオシンは約 200 kDa のミオシン重鎖（MYH）と約 20 kDa のミオシン軽鎖（MYL）から成り立ち、とくに MYH はアクチン結合、ATP 結合、フィラメント形成能といったミオシンの生理機能に主体的な役割を果たしている。ところで、無脊椎動物、とくにエビ類が属する節足動物門においては、種の多様性にも関わらずミオシンについての研究は非常に乏しい。例えば、MYH の全一次構造が明らかとなっているのはショウジョウバエのみで、エビ類を含めた甲殻類では断片的な情報があるに過ぎない。

本研究は、このような背景の下、クルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプ成体腹部屈筋で発現する MYH の全長のクローニングおよび遺伝子発現解析を行った。また、ウシエビおよびホワイトシュリンプにおいては幼生型 MYH 遺伝子（*MYH*）の探索を行い、

その一次構造や発現様式を成体 MYH と比較したもので、成果の概要は以下の通りである。

#### 1. エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖遺伝子のクローニング

宮崎産活クルマエビ(体重 31.5 g)、タイ産活ウシエビ(体重 12.1 g)およびタイ産活ホワイトシュリンプ(体重 11.2 g)成体の背側の腹部屈筋を用いた。試料から全 RNA を抽出後、cDNA を合成し、これを鋳型に PCR を行った。3 種エビ類の MYH 全長配列の決定は以下の方法で行った。クルマエビは 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) により 3' 末端を決定した後、縮重プライマーおよび遺伝子特異的プライマーの組み合わせによる 2 回の PCR、さらに 5'RACE により全長を決定した。ウシエビは 3'RACE に続き、縮重プライマーおよび遺伝子特異的プライマーの組み合わせによる PCR、および 5'RACE により全長を決定した。ホワイトシュリンプの場合は縮重プライマー同士の組み合わせによる PCR で得られた配列をもとにした 3'RACE、縮重プライマーおよび遺伝子特異的プライマーの組み合わせによる PCR、および 5'RACE を行い、全長を決定した。いずれのエビ類からも 2 種類の MYH がクローニングされ、クルマエビにおける発現頻度の多い順にそれぞれ MYHa および MYHb と命名した。

決定した MYHa および MYHb の塩基数は非翻訳領域 (UTR) を含めて、クルマエビではそれぞれ 5929 および 5955 bp、ウシエビではそれぞれ 5926 および 5914 bp、ホワイトシュリンプではそれぞれ 5923 および 5914 bp であった。3 種エビ類 MYH の 3'UTR の長さは MYHa および MYHb でそれぞれ、64-75 bp および 65-74 bp と短かった。既報のアメリカンロブスター *Homarus americanus* およびゴーストクラブ *Ocypode quadrata* の MYH の 3'UTR の長さがそれぞれ 125-203 bp および 217-281 bp であることから、甲殻類においては 3'UTR が短いという傾向がみられる。

次に、MYHa および MYHb の演繹アミノ酸残基数は、クルマエビではそれぞれ 1912 および 1910、ウシエビではそれぞれ 1914 および 1909、ホワイトシュリンプではそれぞれ 1913 および 1909 であった。3 種エビ類から得られた全ての MYH の一次構造を比較したところ、MYHa および MYHb 間のアミノ酸同一率は 71-72 % であったが、MYHa 同士および MYHb 同士の比較では、それぞれ 94-96 % および 95-98 % であった。さらに、両 MYH の N 末端側サブフラグメント-1 領域には、ループ 1、ループ 2、ATP 結合部位、アクチン結合部位、MYL 結合部位など、ミオシンの機能に重要な部位が保存されていた。そこで、MYHa および MYHb のループ 1 とループ 2 における電荷を既報のヨーロピアンロブスター *H. gammarus* や、端脚類、等脚類のそれらと比較したところ、本研究 3 種エビ類の MYHa のループ 1 は 0 と、他の甲殻類に比べて値が小さかった。一方、MYHb では +1 あるいは +2 で、他の甲殻類と同程度か、やや小さい値であった。ループ 1 の電荷の減少はミオシンの運動性の低下と関連することが示唆されている。なお、ループ 2 では電荷の違いは認められなかった。

次に、3 種エビ類成体からクローニングされた MYH の演繹アミノ酸配列や、既報のアメリカンロブスター、ゴーストクラブなどの MYH の相同配列から近隣結合法を用いて分子系統樹を構築した。アメリカンロブスターでは既に速筋型および遅筋型 MYH の部分アミ

ノ酸配列が報告されているが、本研究の3種エビ類のいずれのMYHともアメリカンロブスターMYHとは異なるグループに分類された。また、MYHaは3種エビ類ともMYHbとは異なるクラスターを形成した。さらに、MYHaおよびMYHbともウシエビとホワイトシュリンプが同じクラスターを形成し、クルマエビとは分岐した。

## 2. エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖の発現解析

先述のように、3種エビ類成体腹部屈筋からMYHaおよびMYHbの2種類のMYHがクローニングされた。そこで、先述のクローニングに用いたクルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプ成体腹部屈筋からクローンライブラリーを作製し、MYHaおよびMYHbクローンの出現頻度を調べた。その結果、クルマエビ腹部屈筋ではMYHaおよびMYHbクローン数は34:12と、MYHaの方が多かった。

一方、ウシエビの場合は、プライマーセットが異なるPCRで2種類のクローンライブラリーを作製し、MYHaおよびMYHbクローンの出現頻度を調べた。その結果、MYHaおよびMYHbクローン数は4:20および8:14と、いずれのクローンライブラリーともMYHbの方が多かった。さらに、ホワイトシュリンプにおいても2種類のクローンライブラリーを作製してMYHaおよびMYHbのクローン数を比較したところ、0:50および3:11と、ウシエビと同様にMYHbの方が多く、ウシエビおよびホワイトシュリンプはクルマエビとは異なるMYH発現パターンを示した。MYHの発現パターンが先述の3種エビ類の分子系統樹での類縁関係と一致する点は興味深い。

また、クルマエビ成体腹部屈筋から常法により精製したミオシンにつき、 $\alpha$ -キモトリプシン消化断片を調製し、SDS-PAGEに供してpolyvinylidene difluoride膜に転写後、消化断片のN末端アミノ酸配列を解析したところ、MYHa由来の消化断片であると判断された。この結果は、先述のクローンライブラリー中のMYHaおよびMYHbのクローン数から推定した転写産物量の組成をよく反映した。

## 3. エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖遺伝子の発現局在

宮崎産クルマエビ(体重13.2-17.8g)、タイ産ウシエビ(体重16.9-31.5g)およびタイ産ホワイトシュリンプ(体重11.5-17.1g)成体を対象とした。まず、3種エビ類の腹部屈筋につきNADH-diaphorase活性染色を行った。その結果、いずれの種でも、筋肉のほとんどを占める腹部屈筋は活性染色されず、嫌氣的代謝を行っていることが明らかとなり、速筋型MYHを発現していることが示唆された。一方、腹部屈筋の周辺に位置する遊泳脚およびそれに付随する筋肉部位はよく染色され、好氣的代謝の筋肉と判断され、遅筋型MYHを発現することが推測された。

次に、3種エビ類の腹部屈筋におけるMYHの局在を明らかにするために、MYHaおよびMYHbの特異的プローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。腹部屈筋は背側に局在するextensor muscleと、腹側のほとんどおよび背側の一部を占めるflexor muscleに分類されるが、3種エビ類ともMYHb転写産物は腹部屈筋全体に分布した。一方、MYHa転写産物はflexor muscleにのみ分布し、extensor muscleには認められなかった。また、遊

泳脚およびその周辺領域の筋肉では *MYHa* および *MYHb* ともに発現が認められなかった。

そこでさらに、腹部屈筋の *extensor muscle*、*flexor muscle* 上部、*flexor muscle* 下部および遊泳脚を摘出し、全 RNA を抽出した。抽出 RNA を 5  $\mu$ g ずつアガロースゲル電気泳動し、Bodyne PLUS 0.45  $\mu$ m ナイロン膜へ転写後、*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブを用いたノーザンブロット解析を行った。その結果、3 種エビ類とも *MYHa* は *flexor muscle* のみで発現が認められた。一方、*MYHb* は *extensor muscle* および *flexor muscle* の両組織で発現が認められ、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果とよく一致した。したがって、*MYHa* および *MYHb* とも成体速筋型 *MYH* と判断された。なお、異なった局在性を示す *MYHa* および *MYHb* の機能の違いは第 1 節の全一次構造の比較からも不明で、今後の課題として残された。

#### 4 . エビ類幼生ミオシン重鎖遺伝子のクローニングと分子系統解析

他生物種においては成長に伴い異なる *MYH* アイソフォームが発現することが知られている。そこで、タイ産ウシエビおよびホワイトシュリンプ幼生を対象に、*MYH* のクローニングを試みた。ウシエビではノープリウス、ゾエア、ミシスおよびポストラーバの各成長段階の幼生を、一方、ホワイトシュリンプではミシス、ゾエアおよびポストラーバの幼生を試料とした。各試料から全 RNA を抽出し、cDNA 合成を行い、それらを鋳型とする 3'RACE および PCR により、幼生型 *MYH* の 3'側をクローニングした。その結果、ウシエビおよびホワイトシュリンプのゾエア、ミシスおよびポストラーバから *MYH* の C 末端側一部領域をコードする複数の幼生型 *MYH* (516-877 bp) のクローンが得られた。

得られたエビ類幼生型 *MYH* クローンのアミノ酸配列を演繹し、先述の成体から得られた *MYHa*、*MYHb*、さらには既報のエビ類、カニ類や他生物種 *MYH* の相同配列とともに、近隣結合法を用いて分子系統樹を作成した。その結果、ウシエビおよびホワイトシュリンプ幼生型 *MYH* は、それぞれ一つのグループを形成し、3 種エビ類の成体型 *MYHb* と同じクラスターを形成した。これら *MYH* は、アメリカンロブスター遅筋型 *MYH* およびゴーストクラブ *MYH* と同じクラスターを形成し、アメリカンロブスター速筋型 *MYH* および 3 種エビ類成体型 *MYHa* を含むクラスターとは分岐した。したがって、3 種エビ類成体からクローン化された速筋型と考えられる *MYHb* は幼生型に近く、遅筋型 *MYH* とも類似することが明らかとなった。

以上、本研究により、クルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプ成体腹部屈筋から成体速筋型 *MYHa* および *MYHb* の全長がクローニングされた。*MYH* 全長のクローニングは甲殻類においては初めてである。また、*MYHa* 転写産物は *flexor muscle* に局在したが、*MYHb* 転写産物は *flexor muscle* ほか *extensor muscle* にも分布した。さらに、幼生型 *MYH* もクローン化され、この *MYH* が成体型 *MYHb* と分子系統上類似するとともに、遅筋型 *MYH* にも近縁であることが示された。以上の成果は比較生化学に寄与するのみでなく、*MYH* の組成と筋肉の性状、品質の関係にも基礎的知見を与えるもので、応用上に資するところも少なくない。