

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小山 寛喜

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 はミオシンの生理機能に主体的な役割を果たしている。しかしながら、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。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ブ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ブにおいては幼生型 MYH 遺伝子 (MYH) の探索を行い、一次構造や発現様式を成体 MYH と比較した。

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ブ (体重 11.2 g) 成体の背側の腹部屈筋から全 RNA を抽出後、cDNA を合成し、これを鋳型に PCR および 3', 5'RACE により全長を決定したところ、いずれのエビ類からも 2 種類の MYH がクローニングされ、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、ホワイトシュリンブではそれぞれ 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、ATP 結合部位、アクチン結合部位など、ミオシンの機能に重要な部位が保存されていた。次に、近隣結合法を用いて分子系統樹を構築したところ、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ブが同じクラスターを形成し、クルマエビとは分岐した。

次に、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たところ、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、ホワイトシュリンブにおいても MYHa および MYHb のクローン数は 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ブはクルマエビとは異なる MYH 発現パターンを示した。

次に、宮崎産クルマエビ (体重 13.2-17.8 g)、タイ産ウシエビ (体重 16.9-31.5 g) およびタイ産ホワイトシュリンブ (体重 11.5-17.1 g) 成体を対象に、NADH-diaphorase 活性染色したところ、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，*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ところ，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 下部および遊泳脚から全 RNA を抽出してアガロースゲル電気泳動し，*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブを用いてノーザンプ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。

さらに，ウシエビおよびホワイトシュリンプから幼生型 *MYH* の 3' 側をクローニングしたところ，ウシエビおよびホワイトシュリンプのゾエア，ミススおよびポストラバから *MYH* の C 末端側一部領域をコードする複数の幼生型 *MYH* 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。

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もので，これらの成果は学術上，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。