

ゲノム情報を利用した魚類の筋分化制御に関する研究
Genome-wide study on the regulation of the muscle
Differentiation in fish

渡部 終五 (WATABE Shugo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



研究の概要

ミオシン重鎖 (myosin heavy chain, MYH) は筋発生や筋成長過程における筋タイプの決定に主体的な役割を果たす。本研究は、魚類のゲノムデータベースを利用して MYH 遺伝子 (MYH) の発現パターンと筋タイプとの関連を調べるとともに、MYH の発現制御機構を明らかにすることで、筋分化制御の分子機構を探る。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：水産学、ゲノム、発生・分化、筋肉、トラフグ

1. 研究開始当初の背景

ミオシンは筋肉の主要タンパク質で、収縮運動の主体となるが、その主たる機能部位は重鎖サブユニット (myosin heavy chain, MYH) に局在する。さらに MYH には一次構造の異なるアイソフォームが多数存在し、それらの発現の違いが速筋や遅筋といった筋肉タイプを規定する。また、発生、成長、運動など様々な要因は、アイソフォームの発現を変え、筋肉を適応的に変化させる。したがって、MYH 遺伝子 (MYH) の発現制御機構の解明は、未だ不明な点の多い筋分化制御の分子機構の基本的な理解につながることを期待される。

2. 研究の目的

魚類 MYH を対象に、その発現と筋タイプとの関連を調べるとともに、MYH の発現制御機構を明らかにすることで、筋分化制御の分子機構を探る。また、魚類に特徴的な成体での筋細胞数の増大機構を利用した育種技術の開発など、応用的側面にも基礎的資料を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

脊椎動物のモデルとしてゲノムデータベースなど研究の基盤が整備されているトラフグや、小型魚類メダカ、ゼブラフィッシュを対象に、筋発生や筋成長に伴う MYH の発現変化を調べるとともに、トランスジェニック魚を用いて MYH の転写調節領域および結合する転写因子を探る。さらに確立したトランスジェニック魚を用いて、その転写機構が、筋発生や筋成長でどのように働くのか検討する。

4. これまでの成果

(1) ゲノムデータベースを利用したトラフグ MYH のクローニングと発現パターンの解析

筋原線維 ATPase 活性染色と、好氣的代謝細胞を検出する NADH ジアホラーゼ活性染色により、トラフグ成体や仔魚の筋線維のタイプを調べた結果、速筋と遅筋、仔魚と成体では明らかに異なることが示された。さらに、上述した筋線維タイプの違いに関連し、ゲノムデータベースを利用しつつ MYH の発現パターンを調べたところ、胚体期から仔魚期、成魚期にかけて大きく変動すること、また筋肉部位によって明確に異なること、などが明らかになった (図 1)。この結果は、トラフグが筋発生や筋成長で複雑な MYH の発現制御を行っていることを示している。また、成体や仔魚では新しく形成した筋線維は特異的に MYH_{M2528-1} を発現することが明らかになった。これは、特定の MYH の発現が、魚類に特徴的にみられる仔魚期以降の筋線維数の増大による筋成長に寄与している可能性を示しており、興味深い。

(2) MYH の時空間特異的な発現を担う転写調節領域の同定

トラフグにおいて胚体や成体の遅筋/心筋に特異的な MYH_{M5}、胚体の速筋特異的な MYH_{M743-2}、およびメダカの水平筋隔に特異的な mMYH_{emb1} を用いて、遺伝子の上流配列をゲノムデータベースからクローン化し、ゼブラフィッシュおよびメダカ胚を用いて in

vivo レポーターアッセイを行った。その結果、各 *MYH* の筋肉部位特異的な発現に十分な転写調節領域は、いずれも上流域 4kb 以内に含まれることが示された。脊椎動物の遅筋の発生には *hedgehog* (Hh) シグナルが密接に関わる。薬剤処理による Hh シグナルの阻害実験により、*MYH_{M5}* および *mMYH_{emb1}* の転写活性が同シグナルに依存することが示された。オーソログ遺伝子との比較ゲノム解析と欠損変異体を用いた解析から、*MYH_{M5}* の上流 3990b の 128bp および *MYH_{M743-2}* の同 1-2kb に、それぞれ遅筋/心筋および速筋特異的な遺伝子発現を正に制御する *cis* エlement が含まれることが明らかになった。さらに、*mMYH_{emb1}* の上流 1.9kb の 61bp の配列が転写活性に大きく寄与することを明らかにした。一方、この領域に含まれる既報の転写因子の結合配列は転写活性に寄与しておらず、未知の *cis* エlement の存在が示唆された。また、*mMYH_{emb1}* については、同転写調節領域の下流で GFP を発現するトランスジェニック系統を確立した (図 2)。

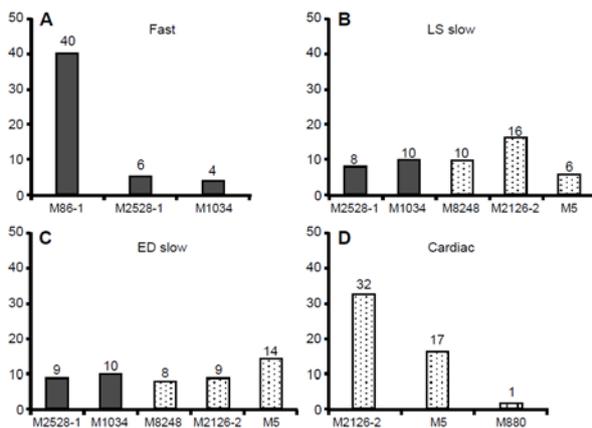


図 1. トラフグ成体の様々な筋肉部位における *MYH* の発現組成。ランダムクローニングによる約 50 クローン の出現頻度を示した。A, 速筋, B, 表層遅筋, C, 背鰭下遅筋, D, 心筋。M86-1 などは *MYH* の種類を表す。■, 速筋型 *MYH*; □, 遅筋型 *MYH*; ▨, 遅筋/心筋型 *MYH*

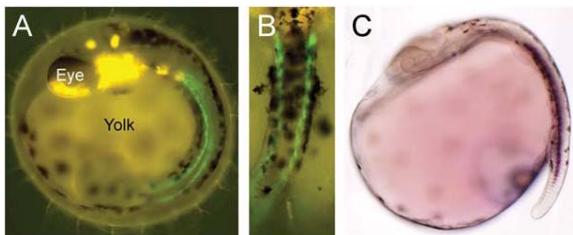


図 2. *mMYH_{emb1}* 転写調節領域の下流で GFP を発現するトランスジェニックメダカ。A, B, トランスジェニック魚における GFP の発現。A, 側面図。B, 背面図。C, 内在性の *mMYH_{emb1}* 転写産物の分布。

5. 今後の計画

引き続き転写因子のスクリーニングと同定を行う。またこれら転写因子が筋発生、筋成長や、修復、運動、温度変化といった過程で、どのように *MYH* の発現を制御するかについて、転写因子の発現の変化や活性の変化から検討する。魚類には終生成長する種とそうではない種があり、前者では筋細胞数の増大が終生続く。その結果、魚類の体サイズに大きなバリエーションをもたらす、例えばトラフグは 10kg を超える大型魚となるが、ゼブラフィッシュやメダカは体長数 cm にしかない。これら魚種間では、筋分化の過程で、本研究で得られる分子群の機能や発現様式に違いはあるのであろうか。このような検討も加えたい。

6. これまでの発表論文等

- D. Ikeda, Y. Nihei, Y. Ono, and S. Watabe: Three embryonic myosin heavy chain genes encoding different motor domain structures from common carp show distinct expression patterns in cranial muscles. *Marine Genomics*, in press
- Y. Ono, S. Kinoshita, D. Ikeda, and S. Watabe: Early development of medaka *Oryzias latipes* muscles as revealed by transgenic approaches using embryonic and larval types of myosin heavy chain genes. *Developmental Dynamics*, in press
- D. B. Akolkar, S. Kinoshita, L. Yasmin, Y. Ono, D. Ikeda, H. Yamaguchi, M. Nakaya, O. Erdogan, and S. Watabe: Fiber-type-specific expression patterns of myosin heavy chain genes in adult torafugu *Takifugu rubripes* muscles. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 137-145, 2010
- C.S. Liang, D. Ikeda, S. Kinoshita, A. Shimizu, T. Sasaki, S. Asakawa, N. Shimizu, and S. Watabe: Myocyte enhancer factor 2 regulates expression of medaka *Oryzias latipes* fast skeletal myosin heavy chain genes in a temperature-dependent manner. *Gene*, **407**, 42-53, 2008
- D. Ikeda, Y. Ono, P. Snell, Y.J.K. Edwards, G. Elgar, and S. Watabe: Divergent evolution of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods; evidence from comparative genomic analysis. *Physiological Genomics*, **32**, 1-15, 2007

(代表的な原著論文のみ)

ホームページ等

<http://mbl.fs.a.u-tokyo.ac.jp/index.html>