

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007～2011

課題番号：19108003

研究課題名（和文）ゲノム情報を利用した魚類の筋分化制御に関する研究

研究課題名（英文）Genome-wide study on the regulation of the muscle differentiation in fish

研究代表者

渡部 終五（Watabe Shugo）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40111489

研究代表者の専門分野：水産化学

科研費の分科・細目：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. 研究計画の概要

ミオシンは筋肉の主要タンパク質で、アクチンとの相互作用でATPを分解し収縮運動に必要なエネルギーを得るが、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複数存在し、それぞれの発現の違いが速筋や遅筋といった異なる性質の筋線維を生み出し、それらの空間的配置が筋肉の性質を規定する。また、発生、成長、運動など様々な生理的要因は、アイソフォームの発現パターンを変え、筋肉を適応的に変化させる。しかしながら、このようなMYHの複雑な発現様式を制御する分子機構の詳細は不明である。他方、魚類では、複数の魚種でゲノムデータベースが利用できること、解剖学的に速筋と遅筋が分離し両者の区別が容易なこと、成体で筋細胞数が増加し温度適応すること、など筋発生、筋分化のモデルとして哺乳類とは異なる多くの魅力を備える。

本研究では脊椎動物のゲノムモデルおよび器官形成モデルとしてそれぞれ研究の基盤整備の進むトラフグおよび小型魚類を主対象に、魚類 MYH 遺伝子（MYH）の発現変動を調べつつ、トラフグの MYH の転写制御下で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック魚をメダカやゼブラフィッシュで作成し、効率よく遺伝子の転写制御の分子機構を探る。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、筋肉の発生、分化、成長、運動、傷の修復などにどのようにかかわるかについて検討する

2. 研究の進捗状況

(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、が明らかになった。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抽出し、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}* の上流域 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。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している

(理由)本研究ではこれまでにトラフグの筋線維のタイプとその*MYH*の発現パターンを明らかにしたが、その過程では筋線維の増大時に新しく形成する筋線維に特異的な*MYH_{M2528.1}*や、水平筋隔に特異的な*mMYH_{emb1}*など、予想外の興味深い発現パターンを示す*MYH*を同定できた。魚類に特有の成体における筋線維数の増大による筋肉の肥大の分子機構は全く分かっておらず、*MYH_{M2528.1}*の発見は、その機構解明の端緒となる可能性がある。また、複数の*MYH*について転写調節機構の解析を進めているが、いずれも機能配列の絞り込みが進んでおり、予定通りの成果が期待できる。水平筋隔に特異的な*mMYH_{emb1}*については、転写調節領域を61bpにまで絞り込んでいるが、ここに含まれる既報の筋分化関連の転写因子の結合配列は転写活性に寄与しないことが明らかになった。今後、新規転写因子が同定される可能性があり、全く新しい筋発生、筋分化の制御機構の発見につながることも期待される。このように本研究は、当初の計画に沿っておおむね順調に進展していると判断する。

4. 今後の研究の推進方策

引き続き転写因子のスクリーニングと同定を行う。また、既報の筋分化制御因子と、得られた転写因子との機能的関連を検討する。またこれら因子が筋肉の発生、分化、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、転写因子の発現パターン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、

ゼブラフィッシュはやメダカは体長数 cm しかない。これら魚種間では、筋分化や筋成長の過程で、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。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件)

Ono Y., Kinoshita S., Ikeda D., and Watabe S. Early development of medaka *Oryzias latipes* muscles as revealed by transgenic approaches using embryonic and larval types of myosin heavy chain genes. *Dev. Dyn.* in press. 査読有

Akolkar D.B., Kinoshita S., Yasmin L., Ono Y., Ikeda D., Yamaguchi H., Nakaya M., Erdogan O., and Watabe S. Fibre-type-specific expression patterns of myosin heavy chain genes in adult torafugu *Takifugu rubripes* muscles. *J. Exp. Biol.*, **213**, 137-145 (2010). 査読有

[学会発表](計31件)

Watabe S., Myosin heavy chains responsible for temperature plasticity of fish muscle. Annual Main Meeting 2009 of the Society for Experimental Biology, 2009年6月28日, UK

Watabe S., Functional plasticity of fish myosin heavy chain genes and their spatial and temporal expression patterns.

International Symposium of Genomics in Aquaculture, 2009年7月5日, Norway
Kinoshita S., Ono Y., Ikeda D., and Watabe S. Fiber type-specific transcriptional regulation in the expression of fish myosin heavy chain genes. WFC2008 5th World Fisheries Congress, 2008年10月23日, 横浜

[図書](計1件)

Johnston I.A., Macqueen D.J., and Watabe S., Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle. Fisheries for Global Welfare and Environment (Tsukamoto K., Kawamura T., Takeuchi T., Beard T.D., and Kaiser M.J., eds), 241-262, 2008, Terrapub, Tokyo