

機関番号：32607

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780198

研究課題名 (和文) ミオシン重鎖遺伝子クラスターの起源、意義そして発現調節機構の解明

研究課題名 (英文) The origin and purpose of fast skeletal muscle myosin heavy chain gene cluster of vertebrates

研究代表者

池田 大介 (IKEDA DAISUKE)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：00466806

研究成果の概要 (和文)：

ミオシン重鎖(MYH)は筋運動に必須のタンパク質であるが、四足類や真骨魚類だけでなく、無顎類のヤツメウナギも MYH 遺伝子 (*MYH*) がクラスターを形成していることを明らかにした。また、ヤツメウナギ *MYH* のプロモータ領域はゼブラフィッシュ胚体速筋での発現を正しく誘導することが明らかとなった。これらのことから、脊椎動物のごく初期の進化段階において、*MYH* クラスターが既に出現しており、かつ、基本的な筋発生の転写調節機構は確立していたことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Myosin heavy chain (MYH) is essential protein for a wide range of motile processes in eukaryotic cells and fast skeletal MYH genes (*MYHs*) formed clusters in mammals and teleosts. In the present study, we found that the fast skeletal *MYHs* formed a cluster also in the lamprey, agnathan vertebrate. Moreover, in vivo promoter assay demonstrated that lamprey fast skeletal *MYH* promoters could drive reporter gene to express in the fast skeletal muscle in zebrafish embryo. These results suggest that in the early vertebrates, fast skeletal *MYHs* had already formed clusters and the basic mechanism for transcriptional control of skeletal muscle development had been determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ミオシン重鎖 クラスター ゲノム 筋発生 ヤツメウナギ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトおよびマウスなどの哺乳類では6種類の速筋型ミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) がゲノム上の1箇所クラスターを形成し、各 *MYH* の発現は時間的、空間的に制御されていることが報告されているが、魚類における知見は少なかった。そこで公開されているトラフグのゲノム情報を利用して、真骨魚類の *MYH* とくに筋肉の主要可食部を占める速筋の *MYH* を解析した。その結果、哺乳類 *MYH* クラスターに対応する領域はトラフグにおいて2箇所に倍化しているが、それぞれの領域には1種類の *MYH* しか存在しないことがわかった。トラフグにはこれらの2箇所の遺伝子座以外に、更に3箇所において *MYH* が存在し、それぞれの領域で独自のクラスターを形成していた。また、これらのクラスターはトラフグだけでなく、ゼブラフィッシュやメダカにも存在しており、すべての真骨魚類に共通することが示唆された。

ところで、真骨魚類の祖先である条鰭類は四足動物の祖先である肉鰭類と4.5億年前に、トラフグとゼブラフィッシュの共通祖先は3.2億年前にそれぞれ分岐したとされている。また、脊椎動物祖先で全ゲノム重複が2回起き、ゲノム全体が4倍になったという2R仮説が提唱されたが、近年の研究ではさらに真骨魚類特異的な全ゲノム重複が3.5億年前から3.2億年前に起きたことが強く示唆されている。これらのことから、1) ゼブラフィッシュとトラフグの祖先が分岐前の真骨魚類形成の初期段階において、*MYH* クラスターは既に形成、もしくは形成途上であったこと、2) 真骨魚類の全ゲノム重複が *MYH* の増大に寄与していたことが示唆される。しかしながら、上記1) および2) に対する明確な証拠は現在まで得られておらず、魚類の *MYH* の多様性を理解するためには、さらに詳細な解析が必要である。そこで申請者は、真骨魚類および四足類を含めた硬骨魚類の共通祖先と5.6億年前に分岐した無顎類ヤツメウナギに注目し、*MYH* の構成を調べた。その結果、驚くべきことに、ヤツメウナギにおいても速筋タイプ *MYH* がクラスターを形成していることを予備的に明らかにした。同クラスターには少なくとも3種類の *MYH* が存在しているが、これら遺伝子が時空的な発現制御を受けて

いるかどうかは不明である。

## 2. 研究の目的

### (1) 無顎類のクラスターを含めたミオシン重鎖遺伝子構成を明らかにする

真骨魚類および四足類を含めた硬骨魚類の共通祖先と5.6億年前に分岐した無顎類における速筋型 *MYH* の構成を明らかにし、脊椎動物の速筋型 *MYH* が現在の構成に至るまでの過程を推定する。また、無顎類ではゲノム重複が1回しか起きていないことが明らかにされているが、無顎類の *MYH* 構成を調べ、全ゲノム重複が *MYH* の多様化に与えた影響を推定する。無顎類のウミヤツメ (*Petromyzon marinus*) のゲノム情報は既に公開されているため、データベースを用いて *MYH* の構成を網羅的に解析する。

### (2) 無顎類ミオシン重鎖遺伝子の転写調節機構を明らかにする

脊椎動物の中でも進化系統的に大きく離れている無顎類の *MYH* プロモータが真骨魚類でどのように働くのか、ゼブラフィッシュを使用したトランスジェニック技術により解析し、無顎類 *MYH* の転写調節機構を解明する。本研究の成果は脊椎動物に共通する筋発生機構の解明の一助となることが予想される。また、分子系統解析ではヤツメウナギの速筋型 *MYH* の真骨魚類におけるオルソログを同定することはできていないが、ゼブラフィッシュ転写制御系におけるヤツメウナギ *MYH* の個々のプロモータの挙動を調べ、様々なゼブラフィッシュ *MYH* の発現部位と比較することにより、間接的にオルソログを同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 無顎類のクラスターを含めたミオシン重鎖遺伝子構成を明らかにする

ウミヤツメ *Petromyzon marinus* ゲノムデータベースおよび既報のカワヤツメ *Lethenteron japonicum* *MYH1* および *MYH2* の cDNA 配列を参考に設計したプライマーを使用し、カワヤツメのゲノム DNA を鋳型にロング PCR を行った。次に、得られた PCR 産物のショットガンライブラリーを構築し、ランダムにクローンを採取して塩基配列を決定し、

Phred/Phrap/Consed システムを用いてアセンブリングを行った。

#### (2) 無顎類ミオシン重鎖遺伝子の転写調節機構を明らかにする

カワヤツメのミオシン重鎖遺伝子上流約 5kb を組み込んだ GFP もしくは RFP コンストラクトをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注射し、蛍光タンパク質の発現を蛍光実体顕微鏡で観察した。発現が確認された一部の個体については、抗 GFP もしくは抗 RFP 抗体および抗遅筋抗体を用いて 2 重染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてより詳細な観察を行った。この他、トランスジェニック系統の確立を目指し、蛍光タンパク質の発現が強い個体を選抜し飼育を継続した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヤツメウナギミオシン重鎖遺伝子クラスターの解析

ウミヤツメゲノムデータベースを用いた解析およびカワヤツメのゲノム解析により、ヤツメウナギ類は *MYH2-MYH3-MYH1* の順で同一方向に 3 種類のミオシン重鎖遺伝子がクラスターを形成していることがわかった (図 1)。また、同 *MYH* クラスターは約 120kb であると概算され、対象領域は 11 断片の PCR 産物でカバーすることができた。次に、各 PCR 産物につきショットガンライブラリーを作製し、合計約 2300 クロウンを解析したところ、*MYH2* 上流から *MYH1* の第 3 エクソンまで、約 87kb の塩基配列を決定することができた。これまで報告されている真骨魚類の速筋型 *MYH* の大きさが約 12kb 程度であるのに対し、*MYH2* および *MYH3* はそれぞれ約 27kb および 36kb であった。さらに、各 *MYH* のエクソン-イントロン構造を調べたところ、四足類および真骨魚類のそれに一致した。したがって、速筋型 *MYH* の遺伝子構造は初期の脊椎動物が出現した段階において、既に定まっていたことが示唆された。

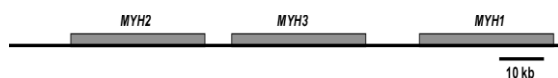


図 1. ヤツメウナギに存在する速筋型 *MYH* クラスター

#### (2) ヤツメウナギミオシン重鎖プロモータの解析

ウミヤツメゲノムデータより得られた塩基配列を参考にしてプライマーを設計し、カワヤツメのゲノム DNA を鋳型に 3 種類のミオシン重鎖遺伝子、*MYH1*、*MYH2* および *MYH3* の上流約 5kb を PCR 法にて増幅し、GFP もしくは RFP ベクターに挿入した。これらベクターをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注射し、蛍光タンパク質の発現を観察したところ、*MYH1* および *MYH2* 上流域を挿入したコンストラクトはゼブラフィッシュ筋肉における発現がみられたが、*MYH3* のコンストラクトでは発現がみられなかった (図 2)。*MYH1* および *MYH2* はカワヤツメ胚体期における発現が確認されているが、*MYH3* の発現は確認されていないため、*MYH3* のプロモータはゼブラフィッシュにおいても胚体期では発現を誘導しないことが示唆された。また、蛍光タンパク質の発現が確認されたゼブラフィッシュ胚を固定し、遅筋線維を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ、蛍光タンパク質の発現部位は速筋に限定していた。真骨魚類および四足類を含めた硬骨魚類の共通祖先と 5.6 億年前に分岐したとされる無顎類ヤツメウナギの速筋型 *MYH* プロモータが真骨魚類のゼブラフィッシュで正しく認識されていることから、速筋型 *MYH* の転写調節機構の一部は両者の共通祖先が分岐する以前に確立されていたことが示唆された。

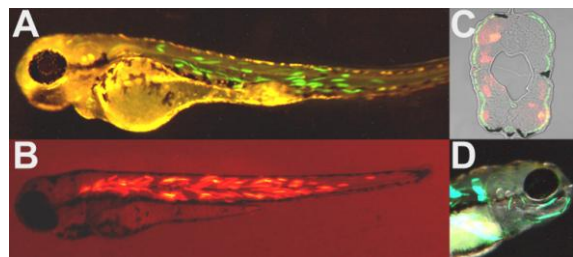


図 2. ヤツメウナギ速筋型 *MYH* プロモータのゼブラフィッシュでの挙動

レポーター遺伝子として GFP (A) および RFP (B) を用いた。*MYH1* および *MYH2* はレポーター遺伝子の発現を誘導したが、*MYH3* は誘導しなかった。C. B の横断面。表層遅筋線維 (一部を白矢印で示す) を免疫染色し、RFP (一部を黒矢印で示す) が速筋のみで発現していることを確認した。D. 無顎類であるヤツメウナギの速筋型 *MYH* プロモータがゼブラフィッシュ類の筋肉でのレポーター遺伝子の発現を誘導した (矢じり)。

5. 主な発表論文等

(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 3 件)

1. Lubna Yasmin, Shigeharu Kinoshita, Dadasaheb B. Akolkar, Daisuke Ikeda, Yosuke Ono and Shugo Watabe: A 5' -flanking region of embryonic-type myosin heavy chain gene, *MYH<sub>M743-2</sub>* from torafugu *Takifugu rubripes* regulates developmental muscle-specific expressions. *Comp. Biochem. Physiol., Part D* **6**, 76-81 (2011). 査読あり

2. Yosuke Ono, Shigeharu Kinoshita, Daisuke Ikeda and Shugo Watabe: Early development of medaka *Oryzias latipes* muscles as revealed by transgenic approaches using embryonic and larval types of myosin heavy chain genes. *Dev. Dyn.* **239**, 1807-1817 (2010). 査読あり

3. Daisuke Ikeda, Yoshiaki Nihei, Yosuke Ono and Shugo Watabe: Three embryonic myosin heavy chain genes encoding different motor domain structures from common carp show distinct expression patterns in cranial muscles. *Mar. Genomics* **3**, 1-9 (2010). 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 池田 大介: カワヤツメ速筋型ミオシン重鎖遺伝子クラスターの解析 平成 23 年度日本水産学会春季大会、2011 年 3 月 28 日、東京海洋大学品川キャンパス (東京都)

2. 池田 大介: ヤツメウナギ類速筋型ミオシン重鎖遺伝子クラスターに含まれるプロモータ領域の解析 平成 22 年度日本水産学会春季大会、2010 年 3 月 29 日、日本大学生物資源科学部 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 大介 (IKEDA DAISUKE)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号 : 00466806

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし