

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780214

研究課題名（和文） 魚類ミオシン重鎖遺伝子の進化を探る－無顎類から肉鰭類まで－

研究課題名（英文） Evolution of fast skeletal myosin heavy chain genes of fish

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、その起源は同一であることが示唆された。また、真骨魚類と四足動物間、および真骨魚類と無顎類間では共通した筋発生の転写調節機構を保持しているが、四足動物と無顎類間ではこの機構が保持されていないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）： In the present study, to elucidate the evolutionary relationship of fast skeletal myosin heavy chain genes (MYHs), MYHs of teleosts and tetrapods were compared with those of agnathan lampreys, one of the most primitive jawless fish. As a result, lampreys contained at least three fast skeletal MYHs which were clustered in a head-to-tail manner on a single genomic region. Moreover, there was an apparent synteny in the corresponding MYH cluster regions between lamprey and tetrapod, implying that fast skeletal MYH clustering was a very early event in vertebrate evolution. Although zebrafish MYH promoters showed apparent activity to direct reporter gene expression in myogenic cells derived from mouse, those of lamprey had no activity. These results suggest that the common ancestor of vertebrate fast skeletal MYHs had been diverged into those of agnathan fish, teleosts and tetrapods. Tetrapods are assumed to have subsequently developed a transcriptional network system different from that of agnathan fish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、ゲノム、分子進化、発生進化、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箇所でも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。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。

真骨魚類および四足類を含めた硬骨魚類の共通祖先と約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おり、同クラスターには少なくとも3種類の *MYH* が存在していることが明らかとなった。また、同クラスターの3種類の *MYH*のうち、2種類は胚体期で発現するが、同 *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誘導することが GFP レポーターベクターを用いたトランスジェニック魚の解析により明らかとなった。すなわち、脊椎動物が出現した初期段階において、既に速筋および遅筋での発現調節など、基本的な筋発生機構および転写調節機構は確立していたと思われる。また、無顎類を含め、脊椎動物の速筋型 *MYH* はそのすべてがクラスターを形成していることから、速筋型 *MYH* の発現調節におけるクラスターの重要性が示唆される。しかしながら、無顎類から真骨魚類、さらには四足類へと続く進化の流れにおいて、*MYH* の進化系統関係およびクラスターの形成過程は未だ不明であり、さらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

(1) 無顎類と肉鰭類のミオシン重鎖遺伝子構成を明らかにする

ヤツメウナギの速筋型 *MYH* クラスターは1つであることが判明したが、どのような過程を経て四足類型(1領域1クラスター)、真骨魚類型(5領域3クラスター)へと進化したのかは不明である。そこで、カワヤツメ速筋型 *MYH* クラスターの全塩基配列を決定する。また、進化過程の溝を埋める生物として肉鰭類のシーラカンスの *MYH* の構成を明らかにする。

(2) 脊椎動物に共通するミオシン重鎖遺伝子の転写調節機構を明らかにする

無顎類のヤツメウナギ速筋型 *MYH* のプロモータが、進化的に大きく離れた真骨魚類のゼブラフィッシュで正しく働くことがトランスジェニック魚の解析で示唆された。ヤツメウナギのプロモータがゼブラフィッシュで働くことから、無顎類と四足類、さらには真骨魚類と四足類間でも転写調節機構が保存されていることが予想される。そこで、これら速筋型 *MYH* プロモータの挙動を哺乳類細胞および真骨魚類細胞内で解析し、脊椎動物に共通する *MYH* の転写調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 無顎類と肉鰭類の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。また、シーラカンス *Latimeria chalumnae* ゲノムデータベースを使用し、肉鰭類速筋型 *MYH* の構成を調べた。

(2) 脊椎動物に共通するミオシン重鎖遺伝子の転写調節機構を明らかにする

カワヤツメおよびゼブラフィッシュ *MYH* の上流域を結合したルシフェラーゼ遺伝子ベクターを構築し、マウス筋芽細胞 C2C12 にトランスフェクションした。また、ゼブラフィッシュ筋分化制御因子(MRF)を強制発現させたヒトおよびゼブラフィッシュ由来の培養細胞を用いて、カワヤツメ *MYH* プロモータの機能を調べた。MRF4、Myf5、MyoD および myogenin の発現ベクターを、カワヤツメ *MYH* の上流域を結合したルシフェラーゼ遺伝子コンストラクトと共に、ヒト HEK293 細胞およびゼブラフィッシュ ZF4 細胞に導入した。

4. 研究成果

(1) 無顎類と肉鰭類のミオシン重鎖遺伝子カワヤツメ速筋型 *MYH* クラスターの全塩基配列を決定した。対象領域は14断片のPCR産物でカバーすることができた。合計約2800クローンをアセンブリングしたところ、*MYH2* 上流から *MYH1* の第41エクソンまで、106kbの塩基配列を決定することができた。カワヤツメ速筋型 *MYH* のエクソン-イントロン構造は、これまで報告されている真骨魚類速筋型 *MYH* および6種類のヒト速筋型 *MYH* のうち、*MYH3* および *MYH8* と同一であることがわかった。また、近年バージョンアップしたウミヤツメゲノムデータベースを用いた解析により、ヤツメウナギ *MYH* クラスターに隣接する遺伝子がヒトと同じく GAS7 であることがわかった。以上の結果より、脊椎動物のごく初期段階においてすでに *MYH* クラスターが存在し、同クラスターが原生脊椎動物 *MYH* クラスターの起源であったことが強く示唆された。ゲノムデータベース解析より、シーラカン

スゲノム中に数種類の速筋型 MYH と思われる配列が存在することがわかった。このうち、ある領域には速筋型 MYH の 3' 上流域に *SCOI* が存在しており、哺乳類の MYH 領域とシンテニーがあった。同 MYH を詳細に解析し、分子系統樹解析を行ったところ、同 MYH はヒト MYH3 のオルソログであることが示唆された (図 1)。以上の結果より、肉鰭類と四足動物の分岐以前に MYH3 が既に存在していたことが予想された。

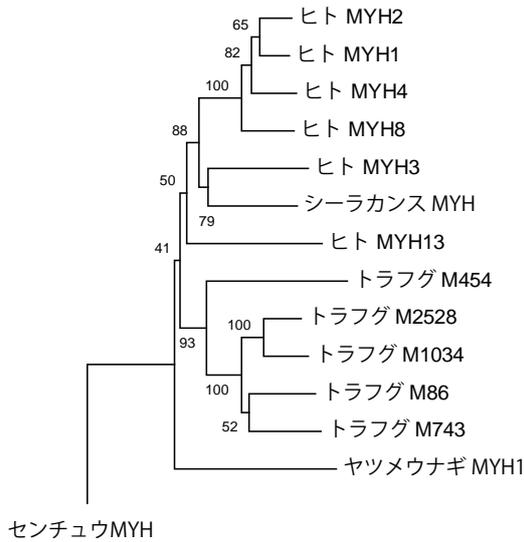


図 1. 脊椎動物速筋型ミオシン重鎖の系統樹

(2) 脊椎動物に共通するミオシン重鎖遺伝子の転写調節機構

カワヤツメ MYH の上流域を結合したルシフェラーゼ遺伝子ベクターを構築し、マウス筋芽細胞 C2C12 にトランスフェクションした。筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導後、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。対照として用いたマウス MYH1 の上流域約 3kb を挿入したコンストラクトでは、筋管細胞への分化誘導に伴い細胞内ルシフェラーゼ活性が約 70 倍上昇したが、カワヤツメ MYH1 および MYH2 の上流域約 3kb を挿入したコンストラクトでは明確な活性上昇はみられなかった (図 2)。

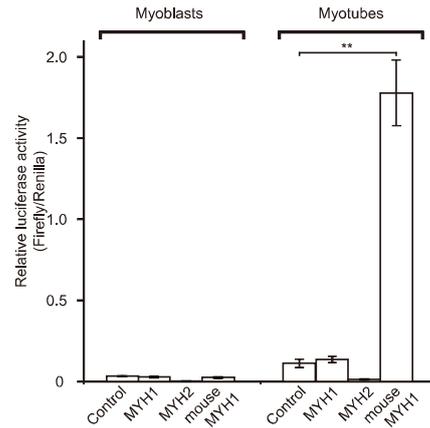


図 2. ルシフェラーゼアッセイの結果。マウス MYH1 プロモータは筋芽細胞 (Myoblasts) から筋管細胞 (Myotubes) への分化誘導に伴い、細胞内ルシフェラーゼ活性を約 70 倍上昇させたが、ヤツメウナギ MYH1 および MYH2 プロモータでは活性上昇は認められなかった。

一方、ゼブラフィッシュ MYH コンストラクトは、マウス MYH コンストラクトと同様に、C2C12 の筋管細胞への分化誘導に伴い細胞内ルシフェラーゼ活性が上昇した。この結果より、真骨魚類と哺乳類の筋分化制御機構は保存されていることが示唆された (図 3)。

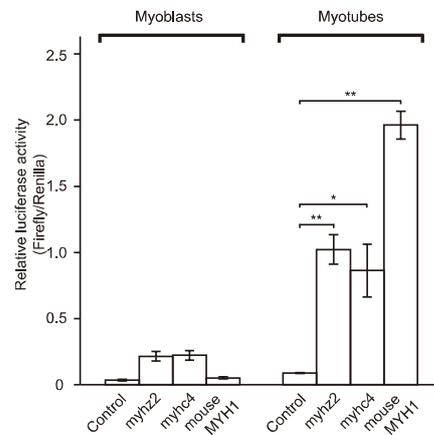


図 3. ルシフェラーゼアッセイの結果。マウス MYH1 プロモータと同様に、ゼブラフィッシュ MYH プロモータ (myhz2 および myhc4) は筋芽細胞 (Myoblasts) から筋管細胞 (Myotubes) への分化誘導に伴い、細胞内ルシフェラーゼ活性を上昇させた。

続いて、MRF4、Myf5、MyoD および myogenin の発現ベクターを、カワヤツメ MYH の上流域を結合したルシフェラーゼ遺伝子コンストラクトと共に、ヒト HEK293 細胞およびゼブラフィッシュ ZF4 細胞に導入した。HEK293 細胞において、カワヤツメ MYH コンストラクト

の細胞内ルシフェラーゼ活性は、ゼブラフィッシュ MRF 発現区および非発現区間で差がみられなかった。ZF4 細胞を用いて同様の解析を行ったところ、Myf5 および MyoD 発現区で明確な活性上昇がみられた。以上より、真骨魚類の MRF は無顎類の *MYH* プロモーター領域を認識して結合するが示唆されたが、この結合は哺乳類の培養細胞では転写には至らないことが示された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Daisuke Ikeda: Myosin heavy chain clusters in fish. The International Symposium on Muscle Biochemistry. 平成 23 年 10 月 28 日 東京大学本郷キャンパス(東京都)

(2) 池田大介、平野茂樹、菅野信弘、渡部終五 カワヤツメ速筋型ミオシン重鎖遺伝子クラスターの塩基配列決定とプロモーター領域の解析、平成 24 年度日本水産学会春季大会、平成 24 年 3 月 27 日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都)

(3) 池田大介、平野茂樹、菅野信弘、渡部終五 培養細胞を用いたカワヤツメ速筋型ミオシン 重鎖遺伝子プロモーター領域の解析、平成 24 年度日本水産学会秋季大会、平成 24 年 09 月 15 日、水産大学校 (山口県)

(4) 池田大介、平野茂樹、菅野信弘、渡部終五 培養細胞発現系を用いたヤツメウナギおよびゼブラフィッシュ・ミオシン重鎖遺伝子プロモーター 領域の機能比較、平成 25 年度日本水産学会春季大会、平成 25 年 3 月 28 日、東京海洋大学品川キャンパス(東京都)

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