

[別 紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ブイヤン シャーミン シッディク

申請者氏名 Bhuayan Sharmin Siddique

骨格筋は遅筋や速筋といったタイプの異なる筋線維が集合して出来上がっている。そのため、筋線維のタイプの決定機構は筋肉の形成を理解する上で重要であるが、その詳細なメカニズムは明らかでない。一方、ミオシン重鎖（myosin heavy chain, MYH）は筋肉の主要構成タンパク質であるが、MYH遺伝子（*MYH*）は多重遺伝子族を構成しており、アイソフォームの発現パターンで筋線維のタイプが決まる。最近になって、幾つかの*MYH*はイントロン内にmyomiRと称する小分子RNAを持っており、ほ乳類においてこれらが筋線維のタイプの決定機構において重要な転写ネットワークを構築していることが明らかになってきている。ところで、魚類の体幹部骨格筋は遅筋と速筋が解剖学的に分離しており、筋線維のタイプの決定機構を解析する良いモデルである。数多くの*MYH*の発現制御機構の詳細も、魚類骨格筋をモデルに解明されてきた。しかしながら、myomiRと宿主*MYH*については、魚類ではほとんど知見がない。そこで本研究では魚類におけるmyomiRと宿主*MYH*のゲノム構造、発現様式、および機能解析を行い、筋線維のタイプの決定機構への寄与を検討した。

まず*MYH14*/miR-499のゲノム構造と発現パターンを解析した。*MYH14*はイントロン内にmyomiRであるmiR-499を持つ。ほ乳類において遅筋および心筋特異的に発現し、遅筋特異的な遺伝子群の発現を活性化する。一方、魚類において当該遺伝子座は多様化しており、真骨魚の系統で起きたゲノム倍加とその後の分類群特異的な倍加および欠失の過程が明らかになった。いくつかの魚類の*MYH14*にはmiR-499を持たないものも見いだされるが、それらは進化速度が速まっていることが明らかになった。これらの結果は*MYH14*とmiR-499間の機能的相関が解除されたためであることが示唆された。ゼブラフィッシュでは3つの*MYH14*が存在し、そのうち2つが実際に発現していたが、発現様式に明確な違いがあった。しかしながら、miR-499の発現を解析したところ、その発現は遅筋/心筋特異的に維持されていた。さらに、メダカゲノムにおいては*MYH14*が存在せず、

miR-499のみが存在したが、宿主MYHが存在しなくてもmiR-499の遅筋/心筋特異的な発現が維持されていた。

続いて、MYH6/MYH7/miR-208の遺伝子座について検討した。MYH6およびMYH7は、ほ乳類の遅筋/心筋で発現し、それぞれイントロン内にmiR-208aおよびmiR-208bを持つ。系統解析の結果、魚類では、主要な心筋型MYHであるvmhcがmiR-736を持ち、これがMYH6/MYH7/miR-208のオーソログであることが明らかになった。MYH14/miR-499同様、宿主MYHは魚類できわめて多様化する一方で、miR-736を持つMYHは各魚種で一つしか存在しなかった。トラフグとメダカにおけるmiR-736の発現を次世代シーケンシングで調べた結果、その発現は極めて微量で、かつ遅筋/心筋に特異的でないことが明らかになり、miR-736はほ乳類miR-208sの機能的なオーソログではないことが考えられた。

続いて、多様化している宿主MYHの発現制御機構を*in vivo* reporterアッセイにより検討した。その結果、ゼブラフィッシュのMYH14-1とMYH14-3の上流に、それぞれの特異的な発現を制御する転写調節領域が存在することが示され、宿主MYHパラログの発現の多様化は上流配列の制御によることが示された。さらに、メダカmiR-499の転写制御についても同様に検討した。miR-499の周辺配列を比較したとこと、メダカでは宿主MYH14が存在しないが、上流配列は他魚種と保存されており、同領域には筋肉特異的に遺伝子の発現を誘導する活性があることを確認した。

最後に、miR-499の機能抑制を行い、筋線維のタイプの決定に与える影響を検討した。ほ乳類ではmiR-499とmiR208sは相補的な転写ネットワークを構築しており、両者のdouble knockoutによって遅筋の形成が抑制される。アンチセンスを用いたノックダウンを行ったところ、魚類では、miR-499の機能阻害単独で、メダカとゼブラフィッシュにおいて明らかな遅筋線維の形成不全を観察した。したがって、魚類においてはmiR-499のみが唯一機能的なmyomiRであり、その機能がmiR-208sのものを補償していることが考えられた。

以上、本研究ではmyomiRおよび宿主MYHの分子ネットワークの進化過程を明らかにするとともに、当該遺伝子座は魚類ではきわめて多様化しているものの、myomiRの発現は保存され、筋線維のタイプ決定機構に寄与することを明らかにした。さらに、メダカのmyomiRがイントロン型から遺伝子間型に進化していることを構造および機能面から初めて明らかにした。以上の成果は学術上、応用上資するところが大きく審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文としてふさわしいものと認めた。