

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

A K シャクール アーメド

申請者氏名 A. K. Shakur Ahammad

骨格筋は脊椎動物の体の大部分を占めており、脊椎動物の成長の程度というのは、生涯のうちに骨格筋量がどれだけ増大するか依存している。ほ乳類においては、出生前後の段階で生涯の筋線維数は決まり、その後の筋肉の成長には限界がある。出生後にほ乳類で新しく筋線維が形成されるのは、怪我などで筋肉が損傷した場合に再生する時だけである。ところが、魚類では生涯を通して筋線維数が増え続け成長に限界がない。この‘終生成長’という現象は、魚類の成長を考えるうえで非常に重要であり、また、ほ乳類でみられる骨格筋の老化を理解する上でも重要である。しかしながら、これまで魚類骨格筋の終生成長に関わる分子機構は全く不明であった。

本研究ではトラフグ *Takifugu rubries* の成長時に新たに形成される筋線維で特異的に発現するミオシン重鎖遺伝子 *MYH_{M2528-1}* に着目し、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* レポーターアッセイにより、*MYH_{M2528-1}* の特異的な発現を制御するプロモーターを同定し、当該プロモーターが魚種を問わず保存されていることを明らかにした。また、欠損変異体を用いた解析によって複数の転写因子の結合部位が当該プロモーター活性に寄与することを示した。

1. 魚類の終生成長に関わる遺伝子発現を活性化するプロモーターの同定

MYH_{M2528-1} の発現を誘導するために必要なプロモーター領域を同定するため、EGFPレポーター遺伝子に翻訳開始点から上流を連結した発現コンストラクトを構築し、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* レポーターアッセイを行った結果、翻訳開始点上流2100bp内にあるシスエレメントがプロモーター活性に寄与することが明らかになった。そこで、翻訳開始点上流2100bpを用いてゼブラフィッシュでトランスジェニック系統 Tg:MYH_{M2528-1}:EGFP を確立し、EGFP の発現パターンを解析した。一般に、魚類においては速筋と遅筋が分離して存在するが、速筋においては筋前駆細胞が既存の筋線維の間に散在し、そこから新しい筋線維が形成されるため、新生筋線維の分布はモザイク状になる。一方、遅筋においては、筋形成が行われる部位は速筋と遅筋を分ける筋隔膜付近にあり、そこから新生筋線維が生み出される。Tg:MYH_{M2528-1}:EGFP の幼魚期初期（受精後20日、体長10mm）において、EGFP の発現は速筋ではモザイク状に存在する小さい筋線維で、遅筋では筋隔膜近くで観

察され、上述の新生筋線維の形成部位とよく一致した。ゼブラフィッシュとトラフグは系統的に大きく離れるが、本研究は $MYH_{M2528-1}$ プロモーターの活性が両種間で保存されていることを示す。ただし、両魚種間では、速筋においてプロモーターの活性が続く期間が異なっており、本研究では小型魚であるゼブラフィッシュでの活性は体長17mmで止まっており、一方、先行研究ではトラフグにおける $MYH_{M2528-1}$ の発現ははるかに大きい体サイズ（体重1kg）でも止まっていない。速筋は魚類骨格筋の大部分を占めるため、速筋における筋線維数の違いが魚体サイズに大きく影響すると考えられる。

2. $MYH_{M2528-1}$ プロモーター活性に寄与する複数のcis制御因子について

$MYH_{M2528-1}$ の翻訳開始点上流2100bpにはMyoD、Pax3、MEF2、およびNFATの結合配列が予測されたが、これらはいずれも、魚類を含む脊椎動物の筋形成や筋成長の筋特異的遺伝子の発現制御に関わることが知られる。そこで、これら転写因子の結合部位を欠く欠損変異体を作成し、レポーターアッセイを行った。その結果、いずれの転写因子の結合部位も欠損することでプロモーター活性は有意に低下し、これらが $MYH_{M2528-1}$ の発現に寄与することが示唆された。また、本研究ではこれら4種の転写因子がゼブラフィッシュおよびトラフグの筋形成過程で実際に発現していることを、RT-PCRにより確認した。特にNFATは、ほ乳類骨格筋の再生時に働くことで注目される。ほ乳類では出生後に新生筋線維形成はほとんど起きないが、怪我等で筋肉が損傷した時には、新しい筋線維が作られ筋肉が再生する。この時、新生児型および胚型と呼ばれる MYH が特異的に発現し、この発現にNFATが寄与することが最近明らかになっているが、 $MYH_{M2528-1}$ プロモーター活性にもNFATの結合部位が寄与するという本研究の結果は、魚類の骨格筋においては筋再生時に働くシグナル経路が恒常的に活性化しており、それが終生成長につながっている可能性を示す。ただし、これら転写因子の結合予測部位を全て欠損しても $MYH_{M2528-1}$ のプロモーター活性は完全にはなくなり、他の因子も活性に寄与するものと考えられた。

まとめ

本研究は、魚類の終生成長における遺伝子発現を制御する転写調節機構について、その一端を明らかにした。終生成長過程で特異的に働くプロモーターの報告は本研究が初になる。本研究の成果は、魚類骨格筋の成長に関する基礎的知見のみならず、魚類の体サイズの違いや脊椎動物の成長や老化の違いに関わる新しい知見を提示しており、学術上、応用上資するところが大きい。したがって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。