

エビ類腹部屈筋ミオシンの分子構造および組織分布に関する

生化学的および分子生物学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

水圏生物学専攻 博士課程

小山 寛喜

## 目 次

	頁
序論	1
謝辞	12
省略記号	13
第1章 エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖遺伝子のクローニング	15
第1節 クルマエビ	16
第2節 ウシエビ	21
第3節 パシフィックホワイトシュリンプ	24
第4節 エビ類ミオシン重鎖の一次構造比較	27
第5節 考察	30
第2章 エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖の発現解析	32
第1節 クルマエビ	34
第2節 ウシエビ	37
第3節 パシフィックホワイトシュリンプ	39
第4節 考察	41
第3章 エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖遺伝子の発現局在	43
第1節 クルマエビ	45
第2節 ウシエビ	50
第3節 パシフィックホワイトシュリンプ	52
第4節 考察	54
第4章 エビ類幼生ミオシン重鎖遺伝子のクローニングと分子系統解析	57
第1節 ウシエビ幼生	59
第2節 パシフィックホワイトシュリンプ幼生	62
第3節 エビ類ミオシン重鎖の系統分類	64
第4節 考察	66
第5章 総括	68
参考文献	71



## 序 論

現在、世界各地において様々な水産物が養殖されている。そのなかでもとくに商業的に重要な品種の一つとしてエビ類が挙げられる。わが国においては、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* が養殖品種の主たるものである。また、他にわれわれが食する機会のある代表的な品種として、ウシエビ *Penaeus monodon* およびパシフィックホワイトシュリンプ（以下、ホワイトシュリンプと略記）*P. vannamei* が挙げられ、海外において大規模に養殖されている。これらエビ類の研究の中心となっている分野は、成長や栄養要求性などの生理学的分野である（Liu *et al.*, 2009; Jose *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2010）。また近年、大規模養殖の弊害として様々な伝染病が問題となっており、代表的なものとしてホワイトスポット症候群が知られている。これら伝染病は蔓延するとエビ類の大量斃死を引き起こし、養殖業者に大打撃を与える（Zhang *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005）。そのため、養殖場ではウイルスを持ち込ませないための細心の注意が払われており、研究の分野ではエビ類の免疫系にも力が注がれている（Soderhall, 1999; Destoumieux *et al.*, 2001）。さらに、エビ類の養殖は水産業と密接に関わっているため、斃死による損害を如何に防ぐかも重要であり、その原因究明や対策に関する研究も多く行われている（Sritunyalucksana *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007）。

そして、産業上重要種であるために、エビ類の食品としての品質向上も求められる。エビ類のなかでも、とくにクルマエビはウシエビ、ホワイトシュリンプと比べて商品価値が高い。この商品価値の点で差が生じる原因の一つとして品質が挙げられる。エビ類の品質は、可食部である腹部屈筋に大きく依存しているおり、この部位の生化学的性状を明らかにすることが品質向上のうえで重要と考えられる。筋肉の主要構成タンパク質はミオシンであり、この性状が筋肉の生化学的性状の決定に大きく関わっている。

筋肉の主要構成タンパク質ミオシンは、六量体からなっている。その構成成分は、約 200 kDa の MYH が 2 本、そして約 20 kDa のミオシン軽鎖 (MYL) 4 本である (Harrington and Rodgers, 1984)。MYH は酵素による消化でさらに 3 つの領域に分割できる。N 末端から順にサブフラグメント-1 (S1) 重鎖、サブフラグメント-2 (S2)、ライトメロミオシン (LMM) と名付けられている。S1 重鎖はさらに N 末端側から 25、50、20 kDa 領域に分割され、それぞれはループ 1 およびループ 2 と呼ばれる部位によって連結されている (Balint *et al.*, 1978; Mornet *et al.*, 1979; Rayment *et al.*, 1993; Goodson *et al.*, 1999)。これらのループはミオシンの運動性に影響を与えることが知られている (Uyeda *et al.*, 1994; Murphy and Spudich, 1998, 1999; Sweeney *et al.*, 1998)。また、S1 領域は ATP 結合、アクチン結合などの生理的に重要な機能を有している (Lowey *et al.*, 1969; Harrington and Rodgers, 1984; Cope *et al.*, 1996; Bobkov *et al.*, 1997)。S2 領域および LMM 領域はミオシンロッドを形成し、ATP 分解により生じた化学エネルギーを運動エネルギーに変換している (Harrington and Rodgers, 1984)。

MYH には様々なアイソフォームの存在が知られている。例を挙げると、哺乳類の骨格筋ではタイプ I、タイプ IIa、タイプ IIb、タイプ IIc/x の 4 タイプに分類できる。タイプ I と IIa は好氣的代謝を行うのに対し、タイプ IIb、IIc/x は嫌気代謝を行うことが知られている (Lyons *et al.*, 1990; Schiaffino and Reggiani, 1996; Spangenburg, 2003; Bassel-Duby and Olson, 2006)。また、哺乳類や魚類は発生段階により異なるアイソフォームを発現することや (Lyons *et al.*, 1990; Agbulut *et al.*, 2003; Nihei *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2006, 2010)、コイ *Cyprinus carpio* では環境中の温度変化に合わせてアイソフォームの発現パターンが変化することも観察されている (Watabe, 2002)。

無脊椎動物においても MYH の研究がなされており (Hopper *et al.*, 2005; Hooper *et al.*, 2008)、イカ類やホタテガイ類 *Argopecten irradians* においては MYH 遺伝子

(*MYH*) の全長が既にクローニングされている (Matulef *et al.*, 1998; Nyitray *et al.*, 1990)。これら無脊椎動物で最も種の多様性に富んでいるといえるのが節足動物門である (Martin and Davis, 2001)。節足動物門は昆虫類をはじめ、本研究に用いた甲殻類のエビ類などが属しており、非常に大きなグループとなっている。節足動物門で最も *MYH* の研究が進んでいる種はキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* である。キイロショウジョウバエは遺伝学において重要な種であるとともに (Rubin and Lewis, 2000)、筋運動の面では飛翔筋を対象とした研究がなされている (Squire *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2011)。そのため、*MYH* も全長配列が決定しており、アイソフォームの存在も明らかになっている (Collier *et al.*, 1990, Hoskins *et al.*, 2007)。しかし、種の多様性に富んでいるにもかかわらず、節足動物門で *MYH* の全長が明らかとなっているのはショウジョウバエ類のみであり、その他の種においてはほとんど研究がなされていない。

エビ類が属する甲殻類に関しても断片的な研究が行われているに過ぎない。例を挙げると、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* の腹部屈筋からはミオシンが精製され、SDS-PAGE に供することにより、タンパク質レベルで 4 種類の *MYH* アイソフォームの存在が確認されている (LaFramboise *et al.*, 2000)。また、骨格筋の性質を明らかにする方法として、NADH-diaphorase 活性染色と ATPase 活性染色があるが、この組織染色法はアメリカンロブスター *Homarus americanus* で行われている (Ogonowski and Lang, 1979)。染色の結果、遊泳脚およびそれに付随する筋肉や superficial extensor muscle、superficial flexor muscle が遅筋であり、その他の大部分は速筋であることが示された。

さらに、アメリカンロブスターでは *MYH* のクローニングもなされ、計 3 タイプの塩基配列が、3'側のみではあるが明らかになっている (Cotton and Mykles, 1993; Medler and Mykles, 2003; Medler *et al.*, 2004)。速筋型が 1 種類、遅筋型が 2 種類得られており、遅筋型は S<sub>1</sub> slow twitch と S<sub>2</sub> slow tonic の 2 種類に分類され

ている。それぞれの塩基同一率は 79 % 以下であったが、open reading frame (ORF) の同一率は比較的高い値を示した。そして、それぞれの 3' untranslated region (UTR) の長さは、速筋型で 199 bp、遅筋の S<sub>1</sub> slow twitch で 203 bp、S<sub>2</sub> low tonic で 125 bp であった (Medler *et al.*, 2004)。また、腹部屈筋の遅筋に属する superficial extensor および superficial flexor muscle の筋線維の大部分は S<sub>1</sub> と S<sub>2</sub> の両遅筋タイプが共発現していることが RT-PCR により示されている (Medler *et al.*, 2004)。さらに、ハサミの閉筋も調べられている。ロブスターは左右非対称なハサミを持っており、大きな方は crusher claw と呼ばれ、捕らえた獲物を砕くのに用いられ、一方、やや小さく細めのハサミは cutter claw と呼ばれ、獲物を切り刻むのに用いられる。この cutter claw の閉筋末端部分である distal region の遅筋線維について SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) が行われた結果、線維によって S<sub>1</sub> 型のみが存在するもの、S<sub>2</sub> 型のみが存在するもの、そして S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub> 型の両方が存在するものがあることが明らかになっている (Medler and Mykles, 2003)。そして cutter claw の閉筋中心部においては RT-PCR が行われており、それらを構成する筋線維は速筋型と遅筋 S<sub>1</sub> 型の両方が発現していることが示されている (Medler and Mykles, 2003)。さらに、腹部屈筋、cutter claw 閉筋の速筋、crusher claw 閉筋についてリアルタイム PCR が行われている。その結果、腹部屈筋では速筋型のみの発現がみられ、cutter claw 閉筋では速筋、遅筋型 MYH の両方が発現していたが、速筋型が優勢であった。これに対して、crusher claw 閉筋では遅筋型の方が優勢であった (Medler and Mykles, 2003)。他にも、幼生の成長段階における筋線維の変化も観察されており、幼生の初期では、cutter claw と crusher claw の間で速筋と遅筋との比に差はないが、cutter claw では成長に伴って速筋の比率が上昇する結果が得られている (Mykles, 1997)。

ゴーストクラブ *Ocypode quadrata* においては脚の筋肉で研究が行われている (Perry *et al.*, 2008)。脚の基部と中央部における NADH-diaphorase 活性染色によ

って、基部は好氣的であり、中央部はやや嫌氣的であることが示されている。また、脚の基部や末端の筋線維の長さに対し、中央部の長さは約 2 倍という違いもある。そして、SDS-PAGE により 3 種類のアイソフォームが確認されており、それぞれ、MHC<sub>1</sub>、MHC<sub>2</sub>、MHC<sub>3</sub> と名付けられている。これらのうち、MHC<sub>1</sub> と MHC<sub>3</sub> は共発現している。3 種類のアイソフォームの分布はゴーストクラブの大きさによって変化することも示されている。脚の筋肉の中央部では、小さな個体 (18.7 g) も大きな個体 (55 g) も、ともに MHC<sub>1</sub> および MHC<sub>3</sub> を発現している。しかし、基部の筋肉は、小さな個体では MHC<sub>1</sub> および MHC<sub>3</sub> を発現する筋線維と MHC<sub>2</sub> のみを発現する筋線維が混ざっている状態であるのに対し、大きな個体では、3 種類全ての MHC が発現する筋線維と MHC<sub>2</sub> のみを発現する筋線維が混ざっている状態である。脚の末端の筋肉は、小さな個体では MHC<sub>1</sub> および MHC<sub>3</sub> を発現する筋線維のみであるが、大きな個体では 3 種類全ての MHC が発現する筋線維と MHC<sub>2</sub> のみを発現する筋線維が混ざっている状態である。さらに、これら 3 種類の MYH の 3' 末端塩基配列も明らかになっている。それぞれの ORF 間における塩基同一率は約 80 % を示したが、3' UTR の配列は大きく違い、長さは 217-281 bp であった。

端脚類でも MYH に関する研究が行われている (Rock *et al.*, 2009; Whiteley *et al.*, 2010)。高緯度に生息する端脚類からループ 1 あるいはループ 2 を含む領域の一次構造が判明しており、ループ 1 は 3 グループ、ループ 2 は 4 グループに分類された。それぞれの存在比は種ごとの生息環境によって変化することが示され、環境適応との関連性も指摘されている。

以上のように、甲殻類における MYH の知見を数例挙げたが、エビ類の MYH に関する情報は非常に乏しい。ロブスター類以外では、ピンクシュリンプ *Farfantepenaeus paulensis* で成長に関連する遺伝子探索のためにディファレンシャルディスプレイ法が用いられ、その結果として、MYH の 3' 末端の配列が得ら



れている程度である (Kamimura *et al.*, 2008)。したがって、さらに詳細な研究が必要であり、エビ類の MYH に関する詳しい知見を得ることができれば、品質との関連性を議論できる可能性がある。そして、エビ類で得られた情報を基に、他の甲殻類の MYH に関する知見を広げられる可能性もある。従って、本研究ではわが国で入手が容易であり、かつ食品としての品質に優れていると考えられているクルマエビ、および東南アジアで盛んに養殖されているウシエビとホワイトシュリンプを試料として用い、エビ類 MYH の基礎的知見を得ることを目的とした。

まず、MYH の遺伝情報を知る必要があるため、MYH 全長のクローニングを行った結果、それぞれの種から 2 種類の MYH が得られ、甲殻類としては初めてその全長を決定した。エビ類から得られた 2 種類の MYH を MYHa および MYHb と命名し、一次構造比較および分子系統解析を行った。MYHa と MYHb の発現量を調べるためにクルマエビではクローンライブラリー作製および MYH の N 末端アミノ酸配列解析を行い、ウシエビ、ホワイトシュリンプではクローンライブラリー作製のみを行った。また、組織切片を作成し、NADH-diaphorase 活性染色によって筋肉の性質を調べ、*in situ* ハイブリダイゼーションにより MYH 転写産物の分布様式を明らかにした。そして、ノーザンブロット解析により、MYH 転写産物の分布を再確認した。さらに、ウシエビ、ホワイトシュリンプの幼生を入手し、各成長段階に属する幼生の MYH 発現を RT-PCR により検討した。本論文は以上の研究結果を全 4 章にまとめ、第 5 章は総括的考察を行ったもので、成果の概要は以下の通りである。

第 1 章ではエビ類成体腹部屈筋 MYH のクローニングを行った。宮崎産活クルマエビ (体重 31.5 g)、タイ産活ウシエビ (体重 12.1 g) およびタイ産活ホワイトシュリンプ (体重 11.2 g) 成体の背側の腹部屈筋を用いた。試料から全 RNA を抽出後、cDNA を合成し、これを鋳型に PCR を行った。3 種

エビ類の *MYH* 全長配列の決定は以下の方法で行った。クルマエビは 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) により 3'末端を決定した後、縮重プライマーおよび遺伝子特異的プライマーの組み合わせによる 2 回の PCR、さらに 5'RACE により全長を決定した。ウシエビは 3'RACE に続き、縮重プライマーおよび遺伝子特異的プライマーの組み合わせによる PCR、および 5'RACE により全長を決定した。ホワイトシュリンプの場合は縮重プライマー同士の組み合わせによる PCR で得られた配列をもとにした 3'RACE、縮重プライマーおよび遺伝子特異的プライマーの組み合わせによる PCR、および 5'RACE を行い、全長を決定した。いずれのエビ類からも 2 種類の *MYH* がクローニングされ、クルマエビにおける発現頻度の多い順にそれぞれ *MYHa* および *MYHb* と命名した。

決定した *MYHa* および *MYHb* の塩基数は 5'および 3'UTR を含めて、クルマエビではそれぞれ 5929 および 5955 bp、ウシエビではそれぞれ 5926 および 5914 bp、ホワイトシュリンプではそれぞれ 5923 および 5914 bp であった。3 種エビ類 *MYH* の 3'UTR の長さは *MYHa* および *MYHb* でそれぞれ、64-75 bp および 65-74 bp と短かった。既報のアメリカンロブスターおよびゴーストクラブの *MYH* の 3'UTR の長さがそれぞれ 125-203 bp および 217-281 bp であることから、甲殻類においては 3'UTR が短いという傾向がみられる。

次に、*MYHa* および *MYHb* の演繹アミノ酸残基数は、クルマエビではそれぞれ 1912 および 1910、ウシエビではそれぞれ 1914 および 1909、ホワイトシュリンプではそれぞれ 1913 および 1909 であった。3 種エビ類から得られた全ての *MYH* の一次構造を比較したところ、*MYHa* および *MYHb* 間のアミノ酸同一率は 71-72 % であったが、*MYHa* 同士および *MYHb* 同士の比較では、それぞれ 94-96 % および 95-98 % であった。さらに、両 *MYH* の N 末端側サブフラグメント-1 領域には、ループ 1、ループ 2、ATP 結合部位、アクチン

結合部位、MYL 結合部位など、ミオシンの機能に重要な部位が保存されていた。そこで、MYHa および MYHb のループ 1 とループ 2 における電荷を既報のヨーロッパアンロブスター *H. gammarus* や、端脚類、等脚類のそれらと比較したところ、本研究 3 種エビ類の MYHa のループ 1 は 0 と、他の甲殻類に比べて値が小さかった。一方、MYHb では+1 あるいは+2 で、他の甲殻類と同程度か、やや小さい値であった。ループ 1 の電荷の減少はミオシンの運動性の低下と関連することが示唆されている。なお、ループ 2 では電荷の違いは認められなかった。

次に、3 種エビ類成体からクローニングされた MYH の演繹アミノ酸配列や、既報のアメリカンロブスター、ゴーストクラブなどの MYH の相同配列から近隣結合法を用いて分子系統樹を構築した。アメリカンロブスターでは既に速筋型および遅筋型 MYH の部分アミノ酸配列が報告されているが、本研究の 3 種エビ類のいずれの MYH ともアメリカンロブスター MYH とは異なるグループに分類された。また、MYHa は 3 種エビ類とも MYHb とは異なるクラスターを形成した。さらに、MYHa および MYHb ともウシエビとホワイトシュリンプが同じクラスターを形成し、クルマエビとは分岐した。

第 2 章ではエビ類成体腹部屈筋 MYH の発現解析を行った。先述のように、3 種エビ類成体腹部屈筋から MYHa および MYHb の 2 種類の MYH がクローニングされた。そこで、先述のクローニングに用いたクルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプ成体腹部屈筋からクローンライブラリーを作製し、MYHa および MYHb クローンの出現頻度を調べた。その結果、クルマエビ腹部屈筋では MYHa および MYHb クローン数は 34 : 12 と、MYHa の方が多かった。

一方、ウシエビの場合は、プライマーセットが異なる PCR で 2 種類のクローンライブラリーを作製し、MYHa および MYHb クローンの出現頻度を調

べた。その結果、*MYHa* および *MYHb* クローン数は 4 : 20 および 8 : 14 と、いずれのクローンライブラリーとも *MYHb* の方が多かった。さらに、ホワイトシュリンプにおいても 2 種類のクローンライブラリーを作製して *MYHa* および *MYHb* のクローン数を比較したところ、0 : 50 および 3 : 11 と、ウシエビと同様に *MYHb* の方が多く、ウシエビおよびホワイトシュリンプはクルマエビとは異なる *MYH* 発現パターンを示した。*MYH* の発現パターンが先述の 3 種エビ類の分子系統樹での類縁関係と一致する点は興味深い。

また、クルマエビ成体腹部屈筋から常法により精製したミオシンにつき、 $\alpha$ -キモトリプシン消化断片を調製し、SDS-PAGE に供して polyvinylidene difluoride 膜に転写後、消化断片の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、*MYHa* 由来の消化断片であると判断された。この結果は、先述のクローンライブラリー中の *MYHa* および *MYHb* のクローン数から推定した転写産物量の組成をよく反映した。

第 3 章ではエビ類成体腹部屈筋 *MYH* の発現局在を調べた。宮崎産クルマエビ（体重 13.2-17.8 g）、タイ産ウシエビ（体重 16.9-31.5 g）およびタイ産ホワイトシュリンプ（体重 11.5-17.1 g）成体を対象とした。まず、3 種エビ類の腹部屈筋につき NADH-diaphorase 活性染色を行った。その結果、いずれの種でも、筋肉のほとんどを占める腹部屈筋は活性染色されず、嫌氣的代謝を行っていることが明らかとなり、速筋型 *MYH* を発現していることが示唆された。一方、腹部屈筋の周辺に位置する遊泳脚およびそれに付随する筋肉部位はよく染色され、好氣的代謝の筋肉と判断され、遅筋型 *MYH* を発現することが推測された。

次に、3 種エビ類の腹部屈筋における *MYH* の局在を明らかにするために、*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。腹部屈筋は背側に局在する extensor muscle と、腹側のほとんど

および背側の一部を占める flexor muscle に分類されるが、3 種エビ類とも *MYHb* 転写産物は腹部屈筋全体に分布した。一方、*MYHa* 転写産物は flexor muscle にのみ分布し、extensor muscle には認められなかった。また、遊泳脚およびその周辺領域の筋肉では *MYHa* および *MYHb* ともに発現が認められなかった。

そこでさらに、腹部屈筋の extensor muscle、flexor muscle 上部、flexor muscle 下部および遊泳脚を摘出し、全 RNA を抽出した。抽出 RNA を 5 µg ずつアガロースゲル電気泳動し、Biodyne PLUS 0.45 µm ナイロン膜へ転写後、*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブを用いたノーザンブロット解析を行った。その結果、3 種エビ類とも *MYHa* は flexor muscle のみで発現が認められた。一方、*MYHb* は extensor muscle および flexor muscle の両組織で発現が認められ、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果とよく一致した。したがって、*MYHa* および *MYHb* とも成体速筋型 *MYH* と判断された。なお、異なった局在性を示す *MYHa* および *MYHb* の機能の違いは第 1 節の全一次構造の比較からも不明で、今後の課題として残された。

第 4 章ではエビ類幼生 *MYH* のクローニングと分子系統解析を行った。他生物種においては成長に伴い異なる *MYH* アイソフォームが発現することが知られている。そこで、タイ産ウシエビおよびホワイトシュリンプ幼生を対象に、*MYH* のクローニングを試みた。ウシエビではノープリウス、ゾエア、ミシスおよびポストラバの各成長段階の幼生を、一方、ホワイトシュリンプではミシス、ゾエアおよびポストラバの幼生を試料とした。各試料から全 RNA を抽出し、cDNA 合成を行い、それらを鋳型とする 3'RACE および PCR により、幼生型 *MYH* の 3'側をクローニングした。その結果、ウシエビおよびホワイトシュリンプのゾエア、ミシスおよびポストラバから *MYH* の C 末端側一部領域をコードする複数の幼生型 *MYH* (516-877 bp) のクロー

ンが得られた。

得られたエビ類幼生型 *MYH* クローンのアミノ酸配列を演繹し、先述の成体から得られた *MYHa*、*MYHb*、さらには既報のエビ類、カニ類や他生物種 *MYH* の相同配列とともに、近隣結合法を用いて分子系統樹を作成した。その結果、ウシエビおよびホワイトシュリンプ幼生型 *MYH* は、それぞれ一つのグループを形成し、3 種エビ類の成体型 *MYHb* と同じクラスターを形成した。これら *MYH* は、アメリカンロブスター遅筋型 *MYH* およびゴーストクラブ *MYH* と同じクラスターを形成し、アメリカンロブスター速筋型 *MYH* および3 種エビ類成体型 *MYHa* を含むクラスターとは分岐した。したがって、3 種エビ類成体からクローン化された速筋型と考えられる *MYHb* は幼生型に近く、遅筋型 *MYH* とも類似することが明らかとなった。

最後に第 5 章で本研究全般にわたる総括的考察を行った。

なお、本研究で得られた成果の一部は以下の通り公表済みである。

1. Koyama, H., Akolkar, D. B., Shiokai, T., Nakaya, M., Piyapattanakorn, S. and Watabe, S. (2012). The occurrence of two types of fast skeletal myosin heavy chains from abdominal muscle of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* and their different tissue distribution. *J. Exp. Biol.* **215**, 14-21.

## 謝 辞

本研究は渡部終五教授の始終懇切なる御指導、御鞭撻の下に行われたもので、ここに甚大なる謝意を表します。本論文を御校閲して頂きました松永茂樹教授、浅川修一教授、潮秀樹准教授ならびに東海大学 落合芳博教授に謝意を表します。本研究に関して有益な御助言、御指導を賜りました金子元助教、中谷操子博士ならびに木下滋晴助教に厚く感謝致します。本研究において、Dadasaheb B. Akolkar 博士ならびに汐海隆史氏には多大なご協力を頂きました。ここに御礼申し上げます。3 種エビ類のミオシン重鎖遺伝子クローニングにおいて、consensus-degeneration hybrid oligonucleotide primers を用いての縮重プライマー設計を行って下さいました北里大学 池田大介博士に感謝致します。また、タイでの試料採取において御指導を賜りましたチュラロンコン大学 Sanit Piyapattanakorn 博士に深く感謝致します。クルマエビの試料採取にご協力下さいました宮崎水産試験場 稲野俊直博士に感謝致します。クルマエビの試料を御提供下さいました松本水産の皆様へ感謝致します。タイにおいてウシエビ幼生の試料を御提供下さいました Bunjong ファームの皆様ならびにパシフィックホワイトシュリンプ幼生の試料を御提供下さいました I.T.ファームの皆様へ御礼申し上げます。さらに、日頃から貴重な御助言を頂きました水産化学研究室、水圏生物工学研究室の皆様へ篤く御礼申し上げます。

## 省略記号

以下では、次の省略記号を使用した。

AAP: abridged anchor primer

ATP: adenosine triphosphate

AUAP: abridged universal amplification primer

bp: base pair

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CODEHOP: consensus-degeneration hybrid oligonucleotide primers

dCTP: 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate

DIG: digoxigenin

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTPs: 2'-deoxyribonucleotide 5'-triphosphates

DTT: ( $\pm$ )-dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

kbp: kilobase pair

kDa: kilodalton

LB: Luria-Bertani

LMM: light meromyosin

MEGA 4.1: molecular evolutionary genetics analysis version 4.1

mRNA: messenger ribonucleic acid

MYH: myosin heavy chain

MYL: myosin light chain

NADH:  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form



NBT: nitroblue tetrazolium chloride

PBST: phosphate buffered saline with 0.1% Tween 20

PCR: polymerase chain reaction

PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride

RACE: rapid amplification of cDNA ends

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcription – polymerase chain reaction

S1: subfragment-1

S2: subfragment-2

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

SSC: saline sodium citrate

SSCT: saline sodium citrate with 0.1% Tween 20

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase

Tris: 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

UTR: untranslated region

UV: ultraviolet

## 第1章 エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖遺伝子のクローニング

ミオシン重鎖 (MYH) に関する研究は脊椎動物で盛んに行われているが、無脊椎動物では脊椎動物と比べるとそうとはいえない。特に節足動物では、種の多様性に富んでいるにもかかわらず、断片的な研究に留まっている。節足動物門に属する甲殻類は食品としてわれわれにとって身近な生物が多く、そのなかでもエビ類は世界中で養殖が行われている産業上重要な種といえる。これらエビ類の可食部の大部分を占めるのは骨格筋であり、その主たる構成成分はミオシンである。エビ類の食品としての品質を上げるためにもミオシン、特に MYH に関する知見を得ることが重要な要素であると考えられる。エビ類の MYH 遺伝子 (MYH) はロブスター類やピンクシュリンプ *Farfantepenaeus paulensis* など、ごく一部のみでしか明らかになっておらず (Kamimura *et al.*, 2008)、しかも断片に留まっている。研究例を挙げると、例えば、アメリカンロブスター *Homarus americanus* は甲殻類の筋肉の研究試料として用いられることが多く (Parnas and Atwood, 1966; Jahromi and Atwood, 1969)、3 種類の MYH 断片が得られている (Cotton and Mykles, 1993; Medler and Mykles, 2003; Medler *et al.*, 2004)。他にもザリガニ類 (LaFramboise *et al.*, 2000)、カニ類 (Tse *et al.*, 1983; Perry *et al.*, 2008)、端脚類 (Rock *et al.*, 2009; Whiteley *et al.*, 2010) など、MYH に関する研究が行われている。しかし、MYH の機能をはじめとする諸性質の十分な理解の一助として、その全一次構造の解析がなされていることが重要である。

よって本章では、産業上重要種であり、かつ比較的入手が容易な 3 種エビ類に着目し、それらの MYH の全一次構造の決定を試みた。第1節ではわが国で主に養殖されているクルマエビ *Marsupenaeus japonicus*、第2節、第3節では、海外で大規模に養殖されているウシエビ *Penaeus monodon*、パシフィックホワイトシュリンプ (以下、ホワイトシュリンプと略記) *P. vannamei* について、それぞれ着目した。

## 第1節 クルマエビ

本節ではクルマエビ成体を試料とした。ミオシン重鎖遺伝子のクローニングには筋肉の大部分を占め、われわれが主に食する部分である腹部屈筋を用いた。

### 実験方法

#### 1. 試料

宮崎産クルマエビ成体（体重 31.5 g）を試料とした。生体を断頭による即殺後、摘出が容易な腹部屈筋背側を採取し（Fig. 1-1A）、*RNAlater* (Ambion、Austin、TX、USA) 中で、全 RNA 抽出まで -20 °C で凍結保存した。

#### 2. *MYH* クローニング

クルマエビ腹部屈筋背側 0.1 g に ISOGEN（ニッポンジーン、東京）を 1 mL 加え、破砕機によって組織を完全に破砕した。次に、付属の説明書に従って操作を行うことで、全 RNA を抽出した。全 RNA 3 µg に 50 µM アダプタープライマー [5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)<sub>17</sub>-3'] 1 µL および滅菌水を加え、全量が 11 µL になるように調製し、70 °C での加熱を 10 分行った後、氷中で急冷した。急冷後、溶液に 5 x 反応緩衝液 4 µL、10 mM dNTP 混液 1 µL、0.1 M DTT 2 µL および RNase OUT (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) 1 µL (40 U) を加え、42 °C でのプレインキュベーションを 5 分間行った。次に、逆転写酵素 Superscript III (Invitrogen) 1 µL (200 U) を加え、42 °C で 50 分、51 °C で 30 分、さらに 70 °C で 15 分のインキュベーションを行った後、RNase H 1 µL (2 U) を添加し、一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、*MYH* を増幅するように設計した縮重プライマー（Table 1-1、Fig. 1-2A）での PCR を行った。

縮重プライマーは、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の *MYH* (DDBJ/EMBL/GenBank accession number AAA28686)、アメリカンロブスターの速

筋 (U03091) および遅筋 S<sub>1</sub> slow twitch (AY232598) 型の *MYH* の配列を基に CODEHOP (Rose *et al.*, 1998) を用いて設計した。

まず、*MYH* の 3'末端決定のため、3' RACE を行った。プライマーは Forward プライマー F1 および Reverse プライマー AUAP を用いた (Table 1-1、Fig. 1-2A)。

PCR 反応液は先に調製した一本鎖 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M AUAP 3  $\mu$ L、*Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (5 U/ $\mu$ L) (タカラバイオ、大津) 1  $\mu$ L、10 x *Ex Taq* 緩衝液 5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 34  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、94 °C 30 秒、60 °C 30 秒および 72 °C 1 分を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル行い、さらに 72 °C で 7 分間 インキュベートすることで、*MYH* の 3'末端を増幅させた。

増幅産物は pGEM-T Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、付属の説明書に従い、pGEM-T ベクターにライゲーションした。ライゲーション後、大腸菌 *Escherichia coli* JM109 への導入を行った。目的遺伝子を持つベクターは増幅後、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて回収した。

ベクターに組込まれた増幅産物は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により蛍光標識し、DNA シークエンサー ABI PRISM DNA sequencer model 3100 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の解析を行った。

塩基配列解析の結果、2 種類の *MYH* が得られたため、それぞれを *MYHa* および *MYHb* と名付けた。なお、後述するが、発現量の多い方を *MYHa* とした。

以下、*MYHa* の全長決定法について述べる。上述のようにして決定した *MYHa* の 3'末端配列を基に遺伝子特異的 Reverse プライマー kMYHa-R1 を設計した (Table 1-1、Fig. 1-2A)。cDNA を鋳型に縮重プライマー kMYHa-F2 と遺伝子特異的プライマー kMYHa-R1 を用いて PCR を行った。反応溶液の組成は、鋳型

cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Reverse プライマー 1  $\mu$ L、*Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 x *Ex Taq* 緩衝液 5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 36  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は1回目のPCRと同様にした。増幅産物は上述の方法に従い、pGEM-T ベクターにライゲーションし、シーケンスを行った。

2回目のシーケンスにより決定した配列を基に遺伝子特異的 Reverse プライマー kMYHa-R2 (Table 1-1、Fig. 1-2A) を設計し、縮重プライマー F3 とともに PCR に用いた。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Reverse プライマー 1  $\mu$ L、KOD -Plus- Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/ $\mu$ L) (Toyobo、大阪) 1  $\mu$ L、10 x KOD -Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu$ L、25 mM  $Mg_2SO_4$  3  $\mu$ L、2 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 33  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94  $^{\circ}C$  で 2 分加熱後、98  $^{\circ}C$  10 秒、55  $^{\circ}C$  30 秒および 68  $^{\circ}C$  3 分を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行った。増幅産物の塩基配列はダイレクトシーケンスにより決定し、得られた配列を基に遺伝子特異的プライマー kMYHa-R3 の設計をした (Table 1-1、Fig. 1-2A)。

次に、*MYHa* の 5'末端を決定するために 5'RACE を行った。腹部屈筋背側から上述の方法で全 RNA を抽出、cDNA の合成を行った。cDNA を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen、Valencia、CA、USA) によって精製し、ポリ C テールの付加に用いた。精製した cDNA 10  $\mu$ L に 5 x tailing 緩衝液 5  $\mu$ L、2 mM dCTP 2.5  $\mu$ L および滅菌水 6.5  $\mu$ L を混合し、94  $^{\circ}C$  で 3 分のインキュベート後、氷中で急冷した。続いて、TdT (15 U/ $\mu$ L) を 1  $\mu$ L 加え、37  $^{\circ}C$  で 10 分インキュベートすることで cDNA の 3'末端にポリ C を付加し、さらに 65  $^{\circ}C$  で 10 分のインキュベートにより TdT を失活させた。この操作により cDNA の 3'末端にポリ C が付加したものが得られたので、これを鋳型とし、AAP および kMYHa-R3 を用いての PCR を行った。PCR 反応液はポリ C 付加 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M AAP 3  $\mu$ L、10  $\mu$ M

Reverse プライマー 1  $\mu\text{L}$ 、KOD –Plus- Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、10 x KOD –Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu\text{L}$ 、25 mM  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  3  $\mu\text{L}$ 、2 mM dNTPs 5  $\mu\text{L}$  および滅菌水 31  $\mu\text{L}$  を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、98 °C 10 秒、55 °C 30 秒および 68 °C 1 分を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行うことで、5' untranslated region (UTR) を含む 5' 末端の増幅を行った。

増幅産物は制限酵素 *EcoRV* 処理済のベクター pBluescript II KS (+) (Stratagene、La Jolla、CA、USA) に Ligation high (Toyobo) を用いてライゲーションした。作製したベクターは JM109 に導入し、前述の方法でシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

*MYHb* に関しても、*MYHa* と同様の方法を用いた。ただし、PCR に用いるプライマーは kMYHb-F2、kMYHb-R1、kMYHb-R2 および kMYHb-R3 とした (Table 1-1、Fig. 1-2A)。

## 結果

3'RACE により、*MYHa* および *MYHb* でそれぞれ、961 および 965 bp の断片が得られた。プライマーセット kMYHa-F2/kMYHa-R1 および kMYHb-F2/kMYHb-R1 での PCR により、それぞれ 1004 および 1178 bp の断片が得られた。さらにプライマーセット kF3/kMYHa-R2、kF3/kMYHb-R2 による PCR でそれぞれ 3685、3691 bp の断片が得られた。次に 5'RACE では *MYHa* および *MYHb* でそれぞれ 791 および 928 bp の断片が得られた。以上の結果から *MYHa* の全長は 5929 bp であり、1912 アミノ酸残基をコードしていること、および *MYHb* の全長は 5955 bp であり 1910 アミノ酸残基をコードしていることが明らかになった (Fig. 1-3)。

*MYHa* に関して述べると、5'UTR は 118 bp、S1 重鎖領域に相当する部分は 2526 bp で、842 アミノ酸残基をコードしていた。S2 領域は 1584 bp で 528 アミノ酸をコードし、LMM は 1626 bp で 542 アミノ酸をコードしていた。3'UTR は 75 bp

であった。

*MYHb* においては、5'UTR は 147 bp、S1 重鎖領域は 2529 bp で、843 アミノ酸残基をコードしていた。さらに S2 領域は 1587 bp で 529 アミノ酸をコードし、LMM は 1614 bp で 538 アミノ酸をコードしていた。3'UTR は 74 bp であった。

また、ヨーロッパアンロブスターMYH のループ 1 およびループ 2 領域、コイMYH の ATP 結合部位、アクチン結合部位、ミオシン軽鎖結合部位とのアライメントを行った結果 (Holmes *et al.*, 2002、Ikeda *et al.*, 2010)、MYHa、MYHb においてそれぞれの部位が保存されていた (Fig. 1-3)。

## 第2節 ウシエビ

本節ではウシエビ成体を試料とした。*MYH* のクローニングには筋肉の大部分を占め、われわれが主に食する部分である腹部屈筋を用いた。

### 実験方法

#### 1. 試料

タイ産ウシエビ成体（体重 12.1 g）を試料とした。生体を断頭による即殺後、摘出が容易な腹部屈筋背側を採取し（Fig. 1-1B）、*RNAlater* 中で、全 RNA 抽出まで -20 °C で凍結保存した。

#### 2. *MYH* クローニング

クルマエビと同様の手法を用い、全 RNA の抽出、cDNA の合成を行った。まず、3'末端決定のために、プライマーF1 およびAUAPを用いてのPCRを行った。PCR 条件、シーケンスに関しては、クルマエビと同様である。ウシエビの場合も2種類の *MYH* が得られたので、以下は *MYHa* のクローニングについて述べる。

決定した塩基配列を基に遺伝子特異的プライマーtMYHa-R1（Table 1-2、Fig.1-2B）の設計を行い、縮重プライマーF3 とでPCRを行った。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1 µL、10 µM Forward プライマー 1 µL、10 µM Reverse プライマー 1 µL、KOD –Plus- Neo DNA ポリメラーゼ（1 U/µL）1 µL、10 x KOD –Plus- Neo 緩衝液 5 µL、25 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 µL、2 mM dNTPs 5 µL および滅菌水 33 µL を混合したものとした。反応条件は 94 °C で2分加熱後、98 °C 10 秒、55 °C 30 秒および 68 °C 3 分 30 秒を1サイクルとし、これを40サイクル行った。このPCRによる増幅産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。そして、得られた塩基配列を基に、遺伝子特異的プライマーtMYHa-R2 を設計した（Table



1-2、Fig. 1-2B)。

次に、5'末端塩基配列決定のために 5'RACE を行った。クルマエビと同様の方法でウシエビ腹部屈筋由来の全 RNA から合成した cDNA にポリ C テールを付加し、PCR によって *MYHa* の 5'末端を増幅した。ただし、Reverse プライマーは tMYHa-R2 を用いた (Table 1-2、Fig. 1-2B)。増幅産物は pBluescript II KS (+)へライゲーション後、大腸菌 XL1-Blue MRF'に導入した。目的の遺伝子を含むベクターは、QIAprep Spin Miniprep Kit を用い回収し、上述の方法でシーケンスを行った。

*MYHb* も同様の方法で増幅、塩基配列の決定を行った。ただし、用いたプライマーは tMYHb-R1 および tMYHb-R2 である (Table 1-2、Fig. 1-2B)。

## 結果

3'RACE により、*MYHa* および *MYHb* それぞれ、980 および 962 bp の断片が得られた。プライマーセット F3/tMYHa-R1 および F3/tMYHb-R1 での PCR により、それぞれ 5226 および 5133 bp の断片が得られた。さらに 5'RACE では *MYHa* および *MYHb* で、それぞれ 1014 および 1016 bp の断片が得られた。以上の結果からウシエビの *MYHa* 全長は 5926 bp であり、1914 アミノ酸残基をコードしていること、さらに *MYHb* 全長は 5914 bp であり 1909 アミノ酸残基をコードしていることが明らかになった (Fig. 1-4)。

*MYHa* の 5'UTR は 118 bp であり、S1 重鎖領域は 2529 bp で 843 アミノ酸残基、S2 領域は 1584 bp で 528 アミノ酸残基および LMM は 1629 bp で 543 アミノ酸残基をコードしていた。また、3'UTR は 66 bp であった。

*MYHb* は 5'UTR が 116 bp であり、S1 重鎖領域は 2529 bp で 843 アミノ酸残基、S2 領域は 1584 bp で 528 アミノ酸残基および LMM は 1614 bp で 538 アミノ酸残基をコードしていた。また、3'UTR は 71 bp であった。

S1 重鎖領域にはクルマエビ同様、MYHa および MYHb のいずれも、ループ 1、ループ 2、ATP 結合部位、アクチン結合部位、ミオシン軽鎖結合部位と予想される領域が保存されていた (Fig. 1-4)。

### 第3節 パシフィックホワイ トシュリン プ

本節ではホワイ トシュリン プ成体を試料とした。 *MYH* のクローニ ングには筋肉の大部分を占め、われわれが主に食する部分である腹部屈筋を用いた。

#### 実験方法

##### 1. 試料

タイ産ホワイ トシュリン プ (体重 11.2 g) を試料とした。生体を断頭により即殺後、摘出が容易な腹部屈筋背側を採取し (Fig. 1-1C)、 *RNAlater* 中で、全 RNA 抽出まで -20 °C で凍結保存した。

##### 2. *MYH* クローニ ング

クルマエビ、ウシエビと同様の手法を用い、全 RNA の抽出、cDNA の合成を行った。ただし、逆転写の際、アダプタープライマーの代わりに GeneRacer Oligo dT プライマー [5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)<sub>24</sub>-3'] を 1 µL 用いた。はじめに縮重プライマーの F1 および R を用いての PCR を行った (Table 1-3、Fig. 1-2C)。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1 µL、10 µM Forward プライマー 1 µL、10 µM Reverse プライマー 1 µL、KOD -Plus- Ver. 2 DNA ポリメラーゼ (1 U/µL) 1 µL、10 x KOD -Plus- Ver.2 緩衝液 5 µL、25 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 µL、2 mM dNTPs 5 µL および滅菌水 34 µL を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、98 °C 10 秒、55 °C 30 秒および 68 °C 1 分を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル行った。増幅産物はベクター pBluescript II KS (+)へライゲーションし、XL1-blue MRF'への導入後、ベクターの回収およびシーケンスを行った。本種の場合も 2 種類の *MYH* が得られたので、以下は *MYHa* のクローニ ング法について述べる。

縮重プライマー F1 および R を用いた PCR により得られた増幅産物の塩基配列

を基に、遺伝子特異的プライマーwMYHa-F4 および wMYHa-R2 を設計した (Table 1-3、Fig. 1-2C)。MYHa の 3'末端決定のため、wMYHa-F4 および GeneRacer 3' Primer による PCR を行った。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M GeneRacer 3' Primer 3  $\mu$ L、KOD –Plus- Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 x KOD –Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu$ L、25 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3  $\mu$ L、2 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 31  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、98 °C 10 秒および 68 °C 1 分を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行い、増幅産物を pBluescript II KS (+)へライゲーションした。作製したベクターを XL1-Blue MRF'に導入後、上述の方法で回収し、塩基配列を決定した。

次に、MYHa の 5'側配列決定のために、縮重プライマーF3 および遺伝子特異的プライマーwMYHa-R2を用いて PCR を行った。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Reverse プライマー 1  $\mu$ L、KOD –Plus- Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 x KOD –Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu$ L、25 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3  $\mu$ L、2 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 33  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、98 °C 10 秒および 68 °C 4 分を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行い、増幅産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。この塩基配列を基に遺伝子特異的プライマーwMYHa-R3 を設計した (Table 1-3、Fig. 1-2C)。

さらに 5'末端配列決定のため、上述のウシエビと同様の方法で 5'RACE を行った。ただし Reverse プライマーは wMYHa-R3 を用いた。

MYHb も同様の方法で全塩基配列の決定を行った。ただし、プライマーは wMYHb-F4、wMYHb-R2 および wMYHb-R3 を用いた (Table 1-3、Fig. 1-2C)。

## 結果

縮重プライマーF1 および R を用いた PCR により、MYHa および MYHb とともに

325 bp の遺伝子断片が得られた。プライマーセット wMYHa-F4/GeneRacer 3' Primer および wMYHb-F4/GeneRacer 3' Primer による PCR では *MYHa* および *MYHb* でそれぞれ、821 および 816 bp の断片が得られた。プライマーセット F3/wMYHa-R2 および F3/wMYHb-R2 を用いた PCR では *MYHa* および *MYHb* でそれぞれ、4446 および 4452 bp の断片が得られた。さらに 5'RACE によって *MYHa* および *MYHb* でそれぞれ、797 および 779 bp の断片を得た。以上の結果から、ホワイトシュリンプの *MYHa* 全長は 5923 bp であり、1913 アミノ酸残基をコードしていること、また、*MYHb* 全長は 5914 bp であり、1909 アミノ酸残基をコードしていることが明らかとなった (Fig. 1-5)。

*MYHa* の 5'UTR は 120 bp であり、S1 重鎖領域は 2526 bp で 842 アミノ酸残基、S2 領域は 1584 bp で 528 アミノ酸残基、さらに、LMM は 1629 bp で 543 アミノ酸残基をコードしていた。また、3'UTR は 64 bp であった。

*MYHb* は 5'UTR が 116 bp であり、S1 重鎖領域は 2529 bp で 843 アミノ酸残基、S2 領域は 1584 bp で 528 アミノ酸残基、さらに、LMM は 1614 bp で 538 アミノ酸残基をコードしていた。また、3'UTR は 65 bp であった。

S1 重鎖領域ではクルマエビ、ウシエビ同様、*MYHa* および *MYHb* のいずれにおいても、ループ 1、ループ 2、ATP 結合部位、アクチン結合部位およびミオシン軽鎖結合部位と予想される領域が保存されていた (Fig. 1-5)。

## 第4節 エビ類成体ミオシン重鎖の一次構造の比較

第1節から第3節の実験により3種エビ類成体から *MYH* の全長がクローニングされた。本節では、これらの演繹アミノ酸配列と他生物種の *MYH* との一次構造比較を行った。次に、ミオシンの運動能に影響を与えるとされるループ1およびループ2のアミノ酸配列と正味の電荷について、他の甲殻類との比較を行った。さらに、得られた配列を基に分子系統樹を作成し、*MYHa* および *MYHb* の分子系統解析を行った。

### 実験方法

#### 1. 一次構造比較

前節までの実験により、全アミノ酸配列が明らかとなったクルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプについて *MYH* 全配列、*S1* 重鎖領域、*S2* 領域および *LMM* 領域同士での演繹アミノ酸配列比較を行った。

また、甲殻類で *MYH* の *S1* 重鎖領域に存在するループ1およびループ2のアミノ酸配列が報告されている種があるため (Holmes *et al.*, 2002)、それらの種と今回決定した3種エビ類のループ1およびループ2の一次構造および電荷の比較を行った。比較に用いた種は等脚類の *Glyptonotus antarcticus* および *Idotea resecata*, 端脚類 *Eulimnogammarus verrucosus*、さらに、ヨーロッパロブスター *Homarus gammarus* とした。一次構造の比較には Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いた。

#### 2. 分子系統解析

3種エビ類の *MYHa* および *MYHb* に加えて、アメリカンロブスターの速筋型 (U03091)、遅筋型 *S1* slow twitch (AY232598) および *S2* slow tonic (AY521626) *MYH*、さらに、ゴーストクラブ *Ocypode quadrata* (*MYH1*, DQ534440; *MYH2*,

DQ534441; MYH3, EU676338)、ホタテガイ類 *Argopecten irradians* (X55714)、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (アイソフォーム K, NP724008; アイソフォーム P, NP001162992)、ショウジョウバエ類 *D. virillis* (XM002051957)、ケンサキイカ *Loligo pealei* (AAC24207)、ヤリイカ *L. bleekeri* (ACD68201) およびコイ *Cyprinus carpio* (D89990) の MYH アミノ酸配列から系統樹を構築した。ただし、本系統樹はクルマエビ MYHa の C 末端側 155 残基に相当する部分を用いた。演繹アミノ酸配列は Clustal W を用いて比較を行った。系統樹は、MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 2008) を用いた近隣結合法により構築した。

## 結果

### 1. 一次構造比較

エビ類の MYHa および MYHb 間の演繹アミノ酸同一率は、71-72 % であった。S1 重鎖間の比較では、同一率は 76-78%であり、同様に S2 間および LMM 間の同一率はそれぞれ、60-61%および 72-73%であった。このように、S1 重鎖間の同一率が最も高く、逆に S2 間の同一率が最も低かった。また、MYHa 同士あるいは MYHb 同士のアミノ酸比較においては全ての領域で 93%以上の高い同一率を示した (Table 1-4)。

次に、甲殻類 MYH のループ 1 を構成するアミノ酸残基の比較を行った。エビ類 MYHa に着目すると 3 種とも 8 アミノ酸残基から構成されていた (Fig. 1-6)。MYHb のループ 1 は 9 アミノ酸残基により構成されていた。また、今回比較に用いた甲殻類 MYH のループ 1 は 9 アミノ酸残基であった。エビ類 MYHa の正味電荷は 0、MYHb は +1 あるいは +2 であった。一方、比較に用いた他の甲殻類では +2 または +3 であった。

さらに、ループ 2 を構成するアミノ酸残基の比較を行った。エビ類 MYH のループ 2 は MYHa および MYHb とともに 19 アミノ酸残基から構成されていた。他

の甲殻類においては、ヨーロピアンロブスターで速筋および遅筋型ともに 19 アミノ酸残基であり、*G. antarcticus* および *E. verrucosus* では 21 アミノ酸残基、*I. resecata* は 20 アミノ酸残基であった。正味の電荷については、エビ類 MYHa で +2、MYHb では +4 であった。一方、ヨーロピアンロブスターは +2、*G. antarcticus*、*I. resecata* および *E. verrucosus* は +3 であった。

## 2. 分子系統解析

分子系統樹作成の結果、エビ類の MYHa は、MYHb、アメリカンロブスター MYH およびゴーストクラブ MYH とはブートストラップ値 98 と高い値で分岐し異なるグループを形成した (Fig. 1-7)。また、MYHb は、アメリカンロブスター MYH およびゴーストクラブ MYH とは異なるクラスターを形成した。さらに MYHa および MYHb とともにウシエビとホワイトシュリンプが同じクラスターを形成し、クルマエビとは分岐していた。



## 第5節 考察

本章において甲殻類では初めて *MYH* の全長配列が決定された。クルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプ各種において2タイプの *MYH* が得られ、それぞれを *MYHa* および *MYHb* と命名した (Figs. 1-3、1-4、1-5)。一次構造比較を行った結果、*MYHa* および *MYHb* 全長間のアミノ酸同一率は71-72 %であった。領域ごとのアミノ酸同一率はS1重鎖間で相対的に高い値、S2間で低い値を示した。S1重鎖領域はループ1、ループ2、ATP結合部位、アクチン結合部位およびMYL結合部位といったミオシンの機能において重要な領域が存在し、また、それらの部位が保存されていることから、S2およびLMMと比べてアミノ酸同一率が高くなったものと考えられる。また、S2領域はミオシンの機能に重要であり、この領域のアミノ酸配列の違いが *MYHa* および *MYHb* の機能の違いに影響していると考えられる。さらに、エビ類 *MYH* の3'UTRが総じて短いという特徴も挙げられる。3'UTRの長さはアメリカンロブスター*MYH* で125-203 bp (Medler *et al.*, 2004)、ゴーストクラブ *Ocypode quadrata* で217-281 bp (Perry *et al.*, 2008)、本研究の3種エビ類で64-75 bpであるので、甲殻類においては短いという傾向がみられる。

次に、S1重鎖領域のループ1につき、その正味の電荷をみたところ、エビ類 *MYHa* では電荷が0、*MYHb* では+1あるいは+2となった (Fig. 1-6)。*MYHa* の電荷は今回比較に用いた甲殻類 *MYH* と比べても小さかった。これは、*MYHa* グルタミン酸残基が他 *MYH* ではリシンであることが電荷を低くしている原因である。*MYHa* でみられたループ1の電荷低下はミオシンの運動性を低下させることが知られている (Sweeney *et al.*, 1998)。また、ヨーロッパロブスターのループ1では速筋型 *MYH* のほうが遅筋型 *MYH* より電荷が大きいことが示されている (Holmes *et al.*, 2002)。

次に、ループ2では *MYHb* の電荷が+4と他 *MYH* よりも高かったが (Fig. 1-6)、

ループ 2 の電荷に関しては-1 から+2 の範囲内の違いにおいてはミオシンの運動性に影響を及ぼさないことが報告されている (Furch *et al.*, 1998)。

ループ 1 およびループ 2 の電荷比較から、エビ類は今回比較に用いた甲殻類に比べて運動能において違いがあることが示唆される。また、MYHa および MYHb 間のループ 1 の一次構造や電荷に違いが認められることから、それぞれは異なる運動能を有していると予想される。

さらに分子系統樹を作成し、アメリカンロブスターの速筋および遅筋 MYH、ゴーストクラブ MYH、さらにエビ類 MYH を比較した結果、アメリカンロブスターおよびゴーストクラブ MYH と、エビ類 MYHa および MYHb は異なるクラスターを形成した。これらの結果から、ロブスターやカニ類の MYH と本研究の 3 種エビ類 MYH は系統的に異なっていることが示唆される (Fig. 1-7)。また、後述する第 3 章の結果から MYHa および MYHb は嫌氣的代謝を行う速筋から得られたものであることから、MYHa および MYHb はともに速筋型であると考えられる。エビ類 MYHb はロブスターおよびカニの MYH とブーツストラップ値 43 で分岐しており、さらにロブスターとカニ MYH が形成するクラスターには遅筋型も含まれていることから、MYHb は速筋型でありながら遅筋にも近い系統関係にあると示唆される。したがって、エビ類 MYHa および MYHb はともに速筋型ではあるが、系統的に両者は異なるものと考えられる。また、速筋型 MYH は複数存在する可能性が示唆されているため (Koenders *et al.*, 2004)、本章の結果はこれを支持するものである。

## 第2章 エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖の発現解析

第1章において3種エビ類腹部屈筋から *MYHa* および *MYHb* が得られた。これら2種類の *MYH* の一次構造や *S1* 重鎖領域のループ1、ループ2の電荷を比較した結果、運動性に違いが示唆された。したがって、*MYHa* および *MYHb* はその発現部位や発現頻度において違いがみられることが予想される。また、それぞれの種間においても違いが観察されることも考えられる。

アメリカンロブスターやヨーロッパロブスターにおいても複数の *MYH* アイソフォームの断片が得られている (Cotton and Mykles, 1993; Holmes *et al.*, 2002; Magnay *et al.*, 2003; Medler and Mykles, 2003; Medler *et al.*, 2004)。アメリカンロブスターでは腹部屈筋、cutter claw および crusher claw 筋における速筋型 *MYH*、遅筋 *S1* 型 *MYH* およびアクチンの mRNA 蓄積量がリアルタイム PCR により調べられている (Medler and Mykles, 2003)。また、ヨーロッパロブスターでは異なる水温において飼育した幼生の速筋型 *MYH*、遅筋型 *MYH*、アクチンおよびトロポミオシンの mRNA 蓄積量をノーザンブロット解析により示している (Magnay *et al.*, 2003)。

上述のようにロブスター類では、部位ごとや異なる水温での速筋型および遅筋型 *MYH* の発現頻度に関する情報が得られているが、エビ類では未知である。したがって、本章ではまず、クルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプにおける *MYHa* および *MYHb* の発現頻度を調べることを目的とした。本研究では腹部屈筋を試料とし、かつ摘出が容易な背側を用いて、その部位における *MYHa* および *MYHb* の発現頻度に違いが見られるかどうかを調べた。方法としては、それぞれのエビ類の背側腹部屈筋から全 RNA を抽出し、cDNA の合成を行った。次に、合成された cDNA を鋳型として縮重プライマーを用いて PCR を行い、その結果得られた増幅産物をベクターに組み込み、大腸菌に導入することでクローンライブラリーを作成した。このクローンライブラリーから大腸菌コ

ロニーを無作為に選び、シーケンスを行うことで、*MYHa* あるいは *MYHb* があるかを調べ、それぞれの数を求めた。

クルマエビでは、1 種類のクローンライブラリーから *MYHa* および *MYHb* の発現頻度を調べた。ウシエビおよびホワイトシュリンプにおいては異なるプライマーの組み合わせにより 2 種類のクローンライブラリーを作製し、発現頻度を調べた。

また、クルマエビ腹部屈筋からミオシンを精製し、 $\alpha$ -キモトリプシンによる消化を行った。消化物の N 末端アミノ酸配列を解析することで、*MYHa* あるいは *MYHb* のどちらがより多く存在しているかを調べ、クローンライブラリーから得られた結果と一致しているかも併せて調べた。

## 第1節 クルマエビ

クルマエビ成体の背側腹部屈筋から全 RNA を抽出し、クローンライブラリーの作製に用いた。さらに、作製されたライブラリーから得られたクローンの塩基配列を解析し発現量の比較を行った。さらに、腹部屈筋からミオシンを精製し、 $\alpha$ -キモトリプシンによる消化後、N 末端アミノ酸配列を解析した。

## 実験方法

### 1. 試料

宮崎産クルマエビ成体（体重 31.5 g）1 個体を断頭により即殺し、背側腹部屈筋を摘出した。摘出した部位は RNeasy 中で、全 RNA 抽出に用いるまで -20 °C 下で保存した。また、ミオシンの精製には複数のクルマエビ成体から採取した腹部屈筋 52.2 g を用いた。

### 2. クローンライブラリーの作製

全 RNA の抽出および cDNA 合成は第 1 章第 1 節と同様の方法を用いた。合成された cDNA を鋳型とし、プライマー F1 および AUAP を用いての PCR を行った。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M AUAP 3  $\mu$ L、*Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 x *Ex Taq* 緩衝液 5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 34  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、94 °C 30 秒、60 °C 30 秒および 72 °C 1 分を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル行い、さらに 72 °C で 7 分間インキュベートした。増幅産物を第 1 章第 1 節の方法で pGEM-T ベクターにライゲーションし、大腸菌 JM109 に導入することでクローンライブラリーを作製した。目的の遺伝子が組込まれているベクターを含む大腸菌を Luria-Bertani 寒天培地にまき、生じたコロニーを無作為に選び出した。次に、第 1 章、第 1 節の方法で DNA シーケンサーによって、

それらの塩基配列を解析した。得られた塩基配列から *MYHa* および *MYHb* を決定し、それぞれの数を求めた。

### 3. ミオシン精製

Hwang らの方法に従い (Hwang *et al.*, 1990)、ミオシンの精製を行った。クルマエビ腹部屈筋 52.2 g を 5 倍量の 6 mM  $K_2PO_4$  緩衝液 (pH 7.0) 中でホモジナイズ後、4 °C、3,000 g で 5 分遠心分離した。上清の可溶性画分を取り除き、沈殿に再び 5 倍量の 6 mM  $K_2PO_4$  緩衝液 (pH 7.0) を加え再溶解させ、上述のようにホモジナイズおよび遠心分離を行い、上清を取り除いた。この操作をさらにもう一度行うことで得られた沈殿を 2 倍量の ATP 溶液 [0.675 M KCl、7.5 mM  $MgCl_2$ 、0.15 mM DTT、7.5 mM ATP (pH 6.4)] で溶解した。この溶解液を 15 分間氷上で保持した後、4 °C、5,500 g で 10 分間遠心分離した。沈殿を 1/5 倍量の Tris-マレイン酸緩衝液 [0.12 M Tris-マレイン酸 (pH 7.5)、3 M KCl、0.6 M DTT] で溶解し、さらに 1/10 倍量の ATP 溶液 [110 mM ATP、55 mM EDTA (pH 7.5)] を添加した。さらに、この溶解液を 40-55% 飽和硫酸アンモニウムで分画し、4 °C、5,500 g で 10 分間の遠心分離を行った。生じた沈殿は、Tris-マレイン酸緩衝液 [20 mM Tris-マレイン酸 (pH 7.5)、0.5 M KCl、0.1 mM DTT] に溶解後、100,000 g で 60 分間遠心分離を行い、精製ミオシンを上清として得た。

精製されたミオシンの濃度は 4.71 mg/mL となり、これを Tris-マレイン酸緩衝液 [20 mM トリス-マレイン酸 (pH 7.0)、0.05 M KCl、1 mM EDTA、1 mM DTT] に溶解した 1/130 倍量の  $\alpha$ -キモトリプシンを用い、10 °C で消化した。消化開始から 0 分、5 分、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分の各時間において、終濃度が 0.5 mM となるように PMSF を添加し、消化を止めた。

### 4. N 末端アミノ酸配列分析

$\alpha$ -キモトリプシンにより消化したミオシンは、sodium dodecyl sulfate (SDS)-グリセロール緩衝液 [0.1 M Tris 塩酸塩 (pH 6.8)、4 % SDS、20 % グリセロール、12 % 2-メルカプトエタノール、ブロモフェノールブルー] で処理し、0.1 % SDS を含む 7.5-20 % グラジエントゲルの SDS-polyacrylamide gel electrophoresis に供した。泳動後、ミオシン断片を polyvinylidene difluoride 膜に転写し、50 % メタノールおよび 10 % 酢酸を含む 0.05 % Coomassie Brilliant Blue 溶液による染色で可視化した。次に、N 末端アミノ酸配列分析に用いる断片を切り出し、ABI Procise 492HT プロテインシーケンサー (Applied Biosystems) によってアミノ酸配列を分析した。

## 結果

クローンライブラリーから計 46 個のコロニーを無作為に選び出し、それぞれの塩基配列を解析したところ *MYHa* が 34 クローン、*MYHb* が 12 クローンであり、*MYHa* が多かった (Fig. 2-1)。統計処理は $\chi^2$ 検定により行い、有意差を得た。

$\alpha$ -キモトリプシン処理後のミオシンを電気泳動した結果を Fig. 2-2 に示した。時間が経過するにつれて分子量の大きな MYH が消化されている。ここで Fig. 2-2 中の a および b に相当するバンドを切り出し、N 末端のアミノ酸配列を決定したところ、バンド a は S2 領域、バンド b は LMM に相当する部分であることが分かった。バンド a と、*MYHa* および *MYHb* のアミノ酸配列を比較したところ、*MYHa* のそれにより近かった。また、バンド b も同様の傾向であったことより、腹部屈筋では *MYHa* の発現が多いといえる。

以上の 2 つの結果から、クルマエビの MYH の発現比率は *MYHa* > *MYHb* であると考えられる。

## 第2節 ウシエビ

ウシエビ成体の腹部屈筋上部から全 RNA を抽出し、クローンライブラリーの作製に用いた。次に、作製されたライブラリーから得られたクローンの塩基配列を解析し、発現量の比較を行った。

### 実験方法

#### 1. 試料

タイ産ウシエビ成体（体重 12.1 g）1 個体を断頭により即殺し、背側腹部屈筋を摘出した。摘出した部位は RNAlater 中で、全 RNA 抽出に用いるまで -20 °C で保存した。

#### 2. クローンライブラリーの作製

全 RNA の抽出および cDNA 合成は第 1 章第 2 節と同様の方法を用いた。合成された cDNA を鋳型に、F1/AUAP および F2/AUAP の 2 種類のプライマーの組み合わせを用いて PCR を行った。PCR 反応液組成および反応条件は第 2 章第 1 節と同様にした。それぞれの増幅産物を前述の方法で pGEM-T ベクターにライゲーションし、大腸菌 JM109 に導入して 2 種類のクローンライブラリーを作製した。ここで、プライマー F1/AUAP によるライブラリーをクローンライブラリー I、F2/AUAP によるものをクローンライブラリー II とした。それぞれのライブラリーから前述の方法でクローンを無作為に選び出し、塩基配列を解析して *MYHa* および *MYHb* の数を求めた。

### 結果

クローンライブラリー I から計 24 個のコロニーを無作為に選び出し、それらの塩基配列を解析したところ、*MYHa* は 4 クローン、*MYHb* は 20 クローンであ



った (Fig. 2-3)。次に、クローンライブラリーⅡでは計 22 個のクローンを選出し、同様に塩基配列を解析したところ *MYHa* が 8 クローン、*MYHb* が 14 クローンであった (Fig. 2-3)。これらの結果から、ウシエビにおいては、クローンライブラリーⅠおよびⅡともに *MYHb* が多かった。統計処理は $\chi^2$ 検定により行い、クローンライブラリーⅠにおいて有意差を得た。

### 第3節 パシフィックホワイトシュリンプ

ホワイトシュリンプ成体の背側腹部屈筋から全 RNA を抽出し、クローンライブラリーの作製に用いた。次に、作製されたライブラリーから得られたクローンの塩基配列を解析し、発現量の比較を行った。

#### 実験方法

##### 1. 試料

タイ産ホワイトシュリンプ成体（体重 11.2 g）1 個体を断頭により即殺し、背側腹部屈筋を摘出した。摘出した部位は *RNAlater* 中で、全 RNA 抽出に用いるまで -20 °C で保存した。

##### 2. クローンライブラリーの作製

全 RNA の抽出および cDNA 合成は第 1 章第 3 節と同様の方法を用いた。合成された cDNA を鋳型に、F1/R1 および F2/R1 の 2 種類のプライマーの組み合わせを用いて PCR を行った。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Reverse プライマー 1  $\mu$ L、KOD –Plus- Neo DNA ポリメラーゼ（1 U/ $\mu$ L）1  $\mu$ L、10 x KOD –Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu$ L、25 mM  $Mg_2SO_4$  3  $\mu$ L、2 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 33  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94 °C で 2 分加熱後、98 °C 10 秒および 68 °C 30 秒を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行った。それぞれの増幅産物を前述の方法に従い、pBluescript II KS (+) ベクターにライゲーションし、大腸菌 XL1-Blue MRF' に導入することで 2 種類のクローンライブラリーの作製を行った。ここで、プライマー F1/R1 によるライブラリーをクローンライブラリー III、F2/R1 によるものをクローンライブラリー IV とした。それぞれのライブラリーから前述の方法でクローンを無作為に選り出し塩基配列を解析することで、*MYHa* および *MYHb* の数を求めた。

## 結果

クローンライブラリーIII から計 50 個のコロニーを無作為に選択し、塩基配列を解析したところ、全て *MYHb* だった (Fig. 2-4)。クローンライブラリーIV では計 14 クローン中、*MYHa* が 3 クローン、*MYHb* が 11 クローンであった (Fig. 2-4)。これらの結果からホワイトシュリンプにおいても *MYHb* が多く発現すると判断された。統計処理は $\chi^2$ 検定により行い、クローンライブラリーIII および IV において有意差を得た。

#### 第4節 考察

エビ類の *MYHa* および *MYHb* の発現比率をクローンライブラリーによって調べた。クルマエビの背側腹部屈筋由来のクローンライブラリーを1種類作製し、*MYH* の発現量をみたところ2種類の *MYH* 間において違いがみられた。ここで、発現比率の高かった *MYH* を *MYHa* とし、もう一方を *MYHb* とした。

クルマエビ腹部屈筋から精製したミオシンの $\alpha$ -キモトリプシン消化物をN末端アミノ酸配列解析に用いたところ、バンドaは*MYHa*に近い配列であった (Fig. 2-2)。バンドaはC末端側の配列が*MYHa*とは異なっているが、これは、C末端側になるにつれてプロテインシーケンサーの分析の正確性が低下することによるものと考えられる。従って、バンドaは*MYHa*由来であると考えられる。また、バンドbの場合はC末端側は*MYHa* および *MYHb* と一致しているがアミノ酸同一率の点で *MYHa* であると考えられる。以上のことから、クルマエビ腹部屈筋では *MYHa* が多く発現していると結論付けられた。

ウシエビの場合は、作製した2種類のクローンライブラリーとも *MYHb* の発現量が多かった。ライブラリー作製時のPCRに用いたプライマーの一方は縮重プライマーであるため、何らかのバイアスがかかり *MYHa* あるいは *MYHb* のどちらかが増えやすくなる可能性や、ベクターに組込むときにも、どちらかが組込まれやすくなる可能性も考えられる。しかし、2種類のライブラリーを作製しており、そのどちらも *MYHb* の発現量が多かったことから、ウシエビにおいてはクルマエビとは逆に *MYHb* の発現量が多いと考えられる。

ホワイトシュリンプにおいても縮重プライマーによるPCR産物をもとにクローンライブラリーを作製しているため、上記のウシエビと同様のことが危惧されるが、この場合も2種類のプライマーの組み合わせによるライブラリーを作製しており、そのどちらも *MYHb* の発現量が多いという結果を示しているため、ホワイトシュリンプにおいてもウシエビと同様に *MYHb* が多く発現してい

ると考えられる。

本章ではエビ類成体の腹部屈筋における *MYH* の発現比率を調べ、クルマエビでは *MYHa* が多いのに対し、ウシエビおよびホワイトシュリンプでは *MYHb* が多いという結果を得た。第1章において構築した分子系統樹ではウシエビおよびホワイトシュリンプがクラスターを形成し、クルマエビからは分岐していたが、この結果が発現比率においても反映されていた。以上のことから、*MYHa* および *MYHb* の発現比率は種特異的であるといえるが、この差が各種エビ類の運動性の違いに関連するのかや、品質に影響を及ぼすのかなどは今後の課題である。

### 第3章 エビ類成体腹部屈筋ミオシン重鎖遺伝子の発現局在

第1章で3種エビ類成体腹部屈筋から2種類の *MYH* が得られ、一次構造比較から *MYHa* および *MYHb* はそれぞれ異なる生理機能を有していることが示唆された。また、第2章では *MYHa* および *MYHb* の発現比率を求め、クルマエビでは *MYHa* が多く、それに対してウシエビおよびホワイトシュリンプでは *MYHb* が多いことが示された。しかし、これら2種類の *MYH* の筋組織内の分布様式については不明であるため、本章ではエビ類腹部屈筋の組織学的解析を目的とした。

まず、腹部屈筋のどの部位が好氣的か嫌氣的であるかを調べた。アメリカンロブスターにおいて、NADH-diaphorase 活性染色および ATPase 活性染色が行われており、部位ごとの性質が調べられ (Ogonowski and Lang, 1979)、ゴーストクラブにおいても脚の筋肉で NADH-diaphorase 活性染色が行われているが (Perry *et al.*, 2008)、ロブスター以外のエビ類においては初めての試みである。本研究では、3種エビ類の腹部屈筋組織切片を作製し、NADH-diaphorase 活性染色を行った。この染色により、好氣的代謝および嫌氣的代謝を行っている部位とが明らかになった。

次に、*MYHa* および *MYHb* のそれぞれに特異的に結合するプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、転写産物の分布が部位ごとに異なっているかどうかを調べた。また、分布様式が種によって違いがあるのかも調べた。甲殻類の *MYH* 転写産物の分布様式を調べる *in situ* ハイブリダイゼーションはアメリカンロブスターで行われている (Cotton and Mykles, 1993; Mykles, 1997)。アメリカンロブスター速筋型 *MYH* 転写産物は cutter claw 速筋線維の核の周りや筋原線維間に分布していたが、crusher claw 遅筋線維には分布していなかった。しかしながら、腹部屈筋全体での分布に関する情報はないので、本研究では、3種エビ類の腹部屈筋切片を試料とし、*MYHa* および *MYHb* 転写産物の分布を調べ

た。

さらに、腹部屈筋および遊泳脚から併せて 4 部位を採取し、それらの部位において *MYHa* および *MYHb* の転写産物が存在するか否かを明らかにするため、ノーザンブロット解析を行った。さらに、その結果と *in situ* ハイブリダイゼーションから得られた結果とを比較し、結果に矛盾がないかを検討した。

## 第1節 クルマエビ

クルマエビ成体を試料として用い、腹部屈筋切片を NADH-diaphorase 活性染色および *in situ* ハイブリダイゼーションに供した (Fig. 1-1A)。また、腹部屈筋および遊泳脚の4箇所から筋組織を摘出して全 RNA を抽出し、それらをノーザンブロット解析に用いた。

## 実験方法

### 1. NADH-diaphorase 活性

宮崎産クルマエビ成体 (体重 13.2 g) の腹部屈筋を摘出し、O.C.T. compound (サクラファインテック、東京) に包埋後、液体窒素で瞬間凍結した。凍結試料はクライオスタットを用いて厚さ 18  $\mu\text{m}$  の組織切片とした。切片はスライドガラスに貼り付け、短時間乾燥させた後、2.25 mM NADH および 2.45 mM nitroblue tetrazolium chloride (NBT) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 中で、37 °C、30 分インキュベートした。インキュベート後、蒸留水中で5分間の洗いを3回行った。次に、順に 30 %、60 %、90 %、60 %および 30 %アセトンに各 10 分間ずつ浸透しつつ連続して組織切片の脱水をした。さらに、蒸留水で2分の洗浄を4回行った後、グリセロールで包埋した。染色後の切片は光学顕微鏡により観察した。

### 2. プローブ作製

*in situ* ハイブリダイゼーションおよびノーザンブロット解析に使用するプローブは、特異性の高い *MYH* の 3'UTR を含む領域から設計した。まず、*MYHa* および *MYHb* のプローブとする領域を増幅するように設計したプライマーを用いて PCR を行った。ただし、Forward プライマーの 5'側には T7 プロモーター配列 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、Reverse プライマーの 5'側には SP6 プロ



モーター配列 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') を付加した。PCR 反応液は 鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Reverse プライマー 1  $\mu$ L、KOD -Plus- Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 x KOD -Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu$ L、25 mM  $Mg_2SO_4$  3  $\mu$ L、2 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 33  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94  $^{\circ}C$  で 2 分加熱後、98  $^{\circ}C$  10 秒、55  $^{\circ}C$  30 秒および 68  $^{\circ}C$  30 秒を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行った。増幅産物は、2% アガロースゲル電気泳動後、MiniElute Gel Extraction kit によって回収した。この回収産物を鋳型として、ラベリング反応を行った。

上述の方法により回収した鋳型 200 ng、10 x 転写用緩衝液 2  $\mu$ L、digoxigenin (DIG) RNA labeling Mix (Roche Applied Science) 2  $\mu$ L、RNase OUT 1  $\mu$ L (40 U)、T7 または SP6 RNA ポリメラーゼ (Roche Applied Science) 1  $\mu$ L (20 U) および滅菌水を加えて 20  $\mu$ L としたものを 37  $^{\circ}C$ 、90 分インキュベートし、*in vitro* 転写を行った。転写後、エタノール沈殿により転写産物を沈殿させ、30  $\mu$ L Tris-EDTA 緩衝液および 30  $\mu$ L ホルムアミド混合液に懸濁させた。作製したプローブは使用まで -20  $^{\circ}C$  で保存した。

### 3. ドットブロット分析

*MYHa* および *MYHb* に対する特異的 RNA プローブを作製後、ドットブロットでプローブの特異性を調べた。*MYHa* あるいは *MYHb* の 3' 末端が組込まれている pBluescript II KS (+) ベクター 10 ng を Biotinylated PLUS 0.45  $\mu$ m ナイロン膜 (Pall Life Sciences, Port Washington, NY, USA) に滴下した。乾燥後、UV クロスリンクを行ったナイロン膜をチャーチリン酸緩衝液 [0.5 mM  $Na_2HPO_4$ 、(pH 7.2)、1 mM EDTA、7 % SDS] 中で、67  $^{\circ}C$ 、20 分間インキュベートし、プレハイブリダイゼーションを行った。次に、80  $^{\circ}C$ 、10 分の熱変性処理を施した DIG ラベルアンチセンスプローブを加え、67  $^{\circ}C$ 、16 時間のインキュベートを行った。16 時間後、0.1 %

SDS を含む 2 x SSC 緩衝液[150 mM NaCl、15 mM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O (pH 7.0) ] で室温、10 分間洗浄した。次に、0.1 % SDS を含む 1 x SSC 緩衝液で 67 °C、20 分の洗浄を 2 回行い、さらに 0.1 % SDS を含む 0.1 x SSC 緩衝液で 67 °C、1 時間の洗浄を行った。次に、洗浄液[0.1 M マレイン酸、0.15 M NaCl (pH 7.5)、0.3 % Tween 20]で室温、3 分間の洗浄後、ブロッキング溶液[0.1 M マレイン酸(pH 7.5)、0.15 M NaCl、1 % ブロッキング試薬 (Roche Applied Science) ]中で室温、30 分間のインキュベーションを行い、抗体の非特異的吸着を防いだ。そして、15 mU ml<sup>-1</sup> の anti DIG-AP Fab fragment (Roche Applied Science) を 1 %ブロッキング試薬中で 2,000 倍希釈し、室温、30 分間のインキュベーションを行った。抗 DIG 抗体は CDP-Star (Roche Applied Science) により検出した。

#### 4. *in situ* ハイブリダイゼーション

プローブの特異性を確認した後、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。クルマエビ成体（体重 17.5 g）の腹部屈筋を 4% paraformaldehyde で固定し、30% スクロースに置換後、O.C.T. compound に包埋し、液体窒素により瞬間凍結を行った。さらに、クライオスタットで厚さ 18 μm の組織切片を作製した。切片は phosphate buffered saline (PBST) (137 mM NaCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、2.68 mM KCl、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4、0.1 % Tween 20) で室温、10 分間洗浄し、続いてプロテアーゼ K (5 μg/mL PBST) を 400 μL 滴下した。5 分後、グリシン (2 mg/mL PBST) を 400 μL 滴下して室温で 10 分間放置し、プロテアーゼ K の活性を止めた。さらに、4 % PFA を 400 μL 滴下し、室温で 10 分間放置後、PBST で室温、5 分の洗浄を 3 回行った。次に、ハイブリダイゼーションバッファー [5xSSC (pH 7.0)、50 % ホルムアミド、50 μg/mL ヘパリン、500 μg/mL torula RNA、0.1% Tween 20]中、58 °C で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。1 時間後、DIG ラベルされた *MYHa* あるいは *MYHb* に対する特異的プローブを加えた

ハイブリダイゼーションバッファー中で 58 °C、16 時間のインキュベートを行った。16 時間後、切片を 50 % ホルムアミドを加えた 2xSSCT (SSC、0.1 % Tween 20) 緩衝液で洗浄し、さらに 2xSSCT および 0.2xSSCT 緩衝液での洗浄を行った。各洗浄は、いずれも 58 °C、15 分間行った。洗浄後、2%ブロッキング試薬を加え、室温で 1 時間放置した。15 mU/mL の anti DIG-AP fab fragment を 2%ブロッキング試薬により 2,000 倍希釈したものを滴下し、4 °C、16 時間インキュベートした。インキュベート後、PBST を滴下し室温、15 分間の洗浄を 4 回行い、さらに staining buffer with 0.1% Tween 20 [100 mM NaCl, 100 mM Tris 塩酸塩 (pH 9.5)、0.1% Tween 20] を加え、室温、5 分間の放置を 2 回行った。最後に、NBT/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Roche Applied Science) を用いて RNA プロブの検出を行った。

## 5. ノーザンブロット解析

クルマエビ成体 (体重 17.8 g) 腹部屈筋および遊泳脚の 4 部位 (extensor muscle、flexor muscle 背側、flexor muscle 腹側および遊泳脚) から第 1 章の方法により全 RNA を抽出した。各部位から抽出した全 RNA の 5 µg を 20%ホルムアミドを含む 0.9%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜への転写を行った。以下、ドットブロットと同様の方法を用いて、*MYHa* および *MYHb* 転写産物の検出を行った。

## 結果

### 1. NADH-diaphorase 活性

染色の結果、遊泳脚およびその付近の筋肉で強い染色がみられた (Fig. 3-1)。この結果から遊泳脚やその付近の筋肉は好氣的で、それ以外の部位は嫌氣的代謝を行っていることが明らかとなった。

## 2. ドットブロット分析

ドットブロット分析の結果、*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブはそれぞれ *MYHa* および *MYHb* のみを認識した (Fig. 3-2)。

## 3. *in situ* ハイブリダイゼーション

腹部屈筋における *MYHa* および *MYHb* 転写産物の分布を調べるために *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*MYHa* を特異的に認識するプローブを用いた場合では、flexor muscle においてシグナルが観察されたが、extensor muscle ではシグナルは観察されなかった (Fig. 3-3)。MYHb を特異的に認識するプローブでは、extensor muscle、flexor muscle とともにシグナルが観察された (Fig. 3-2)。

## 4. ノーザンブロット解析

腹部屈筋の 4 部位における *MYH* の発現をノーザンブロットで調べたところ、*MYHa* は flexor muscle のみで発現がみられ、*MYHb* は extensor および flexor muscle で発現がみられた (Fig. 3-4D, E)。遊泳脚は *MYHa* および *MYHb* のいずれの発現もみられなかった (Fig. 3-4D, E)。また、extensor muscle の *MYHb* 転写産物に対するシグナルは flexor muscle と比較して弱かった。

## 第2節 ウシエビ

ウシエビ成体を試料として用い、腹部屈筋切片を NADH-diaphorase 活性染色および *in situ* ハイブリダイゼーションに供した (Fig. 1-1B)。また、腹部屈筋および遊泳脚の4箇所から筋組織を摘出して、全 RNA を抽出し、それらをノーザンブロット解析に用いた。

### 実験方法

#### 1. NADH-diaphorase 活性

タイ産ウシエビ成体 (体重 31.5 g) の腹部屈筋を試料として用いた。方法はクルマエビと同様とした。

#### 2. *in situ* ハイブリダイゼーション

使用するプローブは *MYH* の S2 をコードする領域内から設計し、ウシエビ成体 (体重 16.9 g) 腹部屈筋を試料として用いた。プローブの特異性確認および *in situ* ハイブリダイゼーションはクルマエビと同様にした。

#### 3. ノーザンブロット解析

ウシエビ成体 (体重 21.4 g) 腹部屈筋および遊泳脚の4部位 (extensor muscle、flexor muscle 背側、flexor muscle 腹側、遊泳脚) から全 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析に用いた。方法はクルマエビの場合と同様にした。

### 結果

#### 1. NADH-diahorase 活性

遊泳脚およびその付近の筋肉において強い染色がみられた (Fig. 3-5)。また、flexor muscle においては大部分が染色されなかったが、一部弱く染色されるところ

るもあった。これらの結果から、遊泳脚やその付近の筋肉は好氣的で、それ以外の部分は主に嫌氣的代謝であると判断された。

## 2. ドットブロット分析

ドットブロット分析の結果、*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブはそれぞれ *MYHa* および *MYHb* のみを認識した (Fig. 3-6)。

## 3. *in situ* ハイブリダイゼーション

*MYHa* 転写産物は flexor muscle にのみ分布しているのに対し、*MYHb* 転写産物は extensor および flexor muscle に分布していた (Fig. 3-7)。また、遊泳脚では *MYHa* および *MYHb* の発現は認められなかった (Fig. 3-7)。

## 4. ノーザンブロット解析

*MYHa* は flexor muscle のみで発現がみられ、*MYHb* は extensor および flexor muscle のいずれの筋組織でも発現が認められた (Fig. 3-8C, D)。遊泳脚は *MYHa* および *MYHb* とともに発現が認められなかった (Fig. 3-8C, D)。

### 第3節 パシフィックホワイトシュリンプ

ホワイトシュリンプ成体を試料として用い、腹部屈筋切片を NADH-diaphorase 活性染色および *in situ* ハイブリダイゼーションに供した (Fig. 1-1C)。また、腹部屈筋および遊泳脚の4箇所から筋組織を摘出して全 RNA を抽出し、それらをノーザンブロット解析に用いた。

#### 実験方法

##### 1. NADH-diaphorase 活性

タイ産ホワイトシュリンプ成体 (体重 17.1 g) の腹部屈筋を試料として用いた。方法はクルマエビおよびウシエビと同様とした。

##### 2. *in situ* ハイブリダイゼーション

使用するプローブは *MYH* の *S2* をコードする領域内から設計し、ホワイトシュリンプ成体 (体重 11.5 g) 腹部屈筋を試料として用いた。プローブの特異性確認および *in situ* ハイブリダイゼーションはクルマエビおよびウシエビと同様にした。

##### 3. ノーザンブロット解析

ホワイトシュリンプ成体 (体重 14.2 g) 腹部屈筋の4部位 (extensor muscle、flexor muscle 背側、flexor muscle 腹側、遊泳脚) から全 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析に用いた。方法はクルマエビおよびウシエビの場合と同様にした。

#### 結果

##### 1. NADH-diaphorase 活性

遊泳脚およびその付近の筋肉において強い染色がみられた (Fig. 3-9)。また、flexor muscle においては大部分が染色されなかったが、一部弱く染色される場所もあった。これらの結果から、遊泳脚やその付近の筋肉は好氣的で、それ以外の部分は主に嫌氣的代謝であると判断された。

## 2. ドットブロット分析

ドットブロット分析の結果、*MYHa* および *MYHb* の特異的プローブはそれぞれ *MYHa* および *MYHb* のみを認識した (Fig. 3-10)。

## 3. *in situ* ハイブリダイゼーション

*MYHa* 転写産物は flexor muscle にのみ分布しているのに対し、*MYHb* 転写産物は extensor および flexor muscle に分布していた (Fig. 3-11)。また、遊泳脚では *MYHa* および *MYHb* の発現は認められなかった (Fig. 3-11)。

## 4. ノーザンブロット解析

*MYHa* は flexor muscle のみで発現がみられ、*MYHb* は extensor および flexor muscle での発現が認められた (Fig. 3-12C, D)。遊泳脚は *MYHa* および *MYHb* ともに発現が認められなかった (Fig. 3-12C, D)。



#### 第4節 考察

NADH-diaphorase 活性染色、*in situ* ハイブリダイゼーションおよびノーザンブロット解析を行ったところ、3 種エビ類の成体において同様の結果が得られた (Figs. 4-1- 4-9)。腹部屈筋における代謝や *MYH* の発現様式については種間に大きな違いがないものと考えられる。

NADH-diaphorase 活性染色では、遊泳脚およびそれに付随する筋肉で強い活性が認められたことから、それらの部位は好氣的代謝を行っていることが明らかになった。この染色パターンは、アメリカンロブスターで観察されたものと一致している (Ogonowski *et al.*, 1979)。したがって、遊泳脚やそれに隣接する筋肉は遅筋であり、それ以外の筋肉は速筋であると考えられる。ブルークラブ *Callinectes sapidus* の口に存在する外転筋において、succinate dehydrogenase 活性染色および ATPase 活性染色が行われ、好氣的代謝を行う速筋の存在も明らかになっている (Silverman and Charlton, 1980) が、嫌氣的代謝を行う遅筋の存在は報告されていない。したがって、本研究で得られた *MYHa* および *MYHb* は嫌氣的代謝を行う部位で発現しているので、速筋型であるといえる。

次に、*in situ* ハイブリダイゼーションおよびノーザンブロット解析のために特異的プローブの作製を行ったが、*MYHa* および *MYHb* に対するプローブがクロスハイブリダイゼーションしないことが条件となる。*MYHa* および *MYHb* 間で 3'UTR の塩基同一率が低いため、クルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプともに、その領域からプローブを作製した。ドットブロットの結果、クルマエビではプローブの特異性が確認できたが、ウシエビおよびホワイトシュリンプでは特異的なプローブが作製できなかった。これらの一番大きな原因として、*MYHa* および *MYHb* とともに 3'UTR が非常に短く 70 bp 前後しかないことが挙げられる。このため、十分な長さのプローブが設計できず、特異的プローブの作製に至らなかった。そこで、3'UTR 以外からのプローブの設計を試みた。

5'UTR も *MYHa* および *MYHb* 間で同一率が低い、この領域も十分な長さを有していないため、プローブの設計ができなかった。十分な長さがあり、かつ *MYHa* および *MYHb* 間の同一率が低い領域を探索したところ、S2 領域の 5'末端側が候補として挙げられた。この領域から、塩基同一率がウシエビで 53 %、ホワイトシユリンプで 55 %となるような約 500 b のプローブが作製できた。このプローブは特異性を持つことが確認できたので、*in situ* ハイブリダイゼーションおよびノーザンブロット解析に用いた。

3 種エビ類で行った *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、*MYHa* および *MYHb* 転写産物の分布に明らかな違いが認められた。*MYHa* 転写産物は flexor muscle のみに分布していたのに対し、*MYHb* 転写産物は extensor および flexor muscle の両方に分布した。*MYHa* および *MYHb* はともに速筋型であるが、これらの分布様式がエビ類の筋運動に影響を与えている可能性もあり、今後検討が必要である。

NADH-diaphorase 活性染色により extensor muscle は速筋であると分かり、*in situ* ハイブリダイゼーションではその部位においては *MYHb* のみの発現しか確認できなかった。flexor muscle では *MYHa* および *MYHb* の発現が確認できたが、それらが同じ筋線維に発現しているのかどうかは未確認である。また、アメリカンロブスターでは flexor muscle において速筋型 *MYH* のみの発現が示されており (Medler and Mykles, 2003)、本研究の 3 種エビ類もこれに準ずるものと考えられる。

さらにノーザンブロット解析を行ったところ、*MYHa* 転写産物は flexor muscle のみに分布し、*MYHb* 転写産物は extensor および flexor muscle に分布していた。この結果は *in situ* ハイブリダイゼーションのものと一致した。また、遊泳脚では *in situ* ハイブリダイゼーションおよびノーザンブロット解析ともに *MYHa* および *MYHb* 転写産物の分布はみられなかった。NADH-diaphorase 活性染色におい

て、遊泳脚は染色されたことも併せて考えると、遊泳脚には本研究により得られた *MYH* とは異なる別の *MYH* アイソフォームが発現していると考えられる。

ここで、第2章では、クルマエビでは腹部屈筋上部で *MYHa* 転写産物が多いことが示された。一方、本章では、腹部屈筋の最上部を占める *extensor muscle* には *MYHa* が発現していないことが示された。この両者の結果を併せて考えると、*extensor muscle* では *MYHb* のみ発現しているものの、その発現量は少ないと考えられる。これはクルマエビのノーザンブロット解析で、*extensor muscle* の *MYHb* に対するシグナルが *flexor muscle* と比較して弱いことと一致する。一方、*flexor muscle* 上部では *MYHa* が *MYHb* より多く発現しているものと思われる。これにより、総合的に *MYHa* の発現量が *MYHb* のそれを上回ったものと考えられる。ウシエビおよびホワイトシュリンプに関しては、*MYHb* の発現量の方が多いという結果を示しているため、*flexor muscle* 上部では *MYHb* が優勢に発現している可能性が考えられる。これを確認するためにも、今後はリアルタイム PCR を用いたより詳しい発現量解析が必要である。しかし、エビ類 *MYH* の 3'UTR は非常に短いのでこの部位ではリアルタイム PCR に適するプライマーが作製できないことが予備実験により明らかになっているため、他の部位でプライマーが作製できるかどうか検討しなければならない。アメリカンロブスターの *flexor muscle* では、リアルタイム PCR によって速筋型 *MYH* と遅筋型 *MYH* の発現量が調べられており、速筋型 *MYH* のみ発現していることが示されている (Medler and Mykles, 2003)。エビ類の腹部屈筋においては2種類の速筋型 *MYH* がクローニングされているため、それらの発現量の詳細な検討により新たな知見が得られるであろう。

#### 第4章 エビ類幼生ミオシン重鎖遺伝子のクローニングと分子系統解析

MYH アイソフォームの発現量は成長段階によって変化するという例が他生物種において知られている (Lyons *et al.*, 1990; Agbulut *et al.*, 2003; Nihei *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2006, 2010)。アメリカンロブスターでは、幼生のハサミ閉筋における筋分化が ATPase 活性染色により示されている (Mykles, 1997)。幼生初期では速筋および遅筋の分布様式は cutter claw および crusher claw とともに差異がみられないが、成長に従って cutter claw においては速筋の割合が増加する。一方、crusher claw では変化がほとんどみられない。さらに、速筋型および遅筋型 MYH をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションも行われており、成長に伴って cutter claw では速筋型 MYH が、crusher claw では遅筋型 MYH 発現することも示されている (Mykles, 1997)。

本研究の 3 種エビ類もアメリカンロブスターと同様に、孵化直後から様々な形態を経て成体へと変態する。したがって、3 種エビ類においても成長に伴って MYH の発現に変化がみられる可能性があるため、本章ではまず、幼生の各成長段階における MYH の発現について調べた。

試料はタイの養殖場で採取したウシエビとホワイトシュリンプの幼生を用いた。ウシエビはノープリウス、ゾエア、ミシス、ポストラバの成長段階の試料を採取した。また、ホワイトシュリンプはゾエア、ミシスおよびポストラバに変態後 3 日目の幼生およびポストラバに変態後 20 日目の幼生をそれぞれ採取した。また、幼生は極めて小さく部位ごとに単離することが困難であったため、全体から RNA を抽出し実験に用いた。

第 1 章において全長を決定した MYH は成体の腹部屈筋からクローニングされたものであるため、幼生で発現しているか否かは不明である。そこでまず、ウシエビおよびホワイトシュリンプの幼生に成体から得られた MYHa および MYHb が発現しているかを調べるために RT-PCR を行った。

次に *MYHa* および *MYHb* が両種とも幼生で発現していないことが示されたので、*MYH* を増幅させるように設計した縮重プライマーでの PCR を行った。PCR により得られた増幅産物の塩基配列を解析し、幼生で特異的に発現する *MYH* の 3'末端を決定した。

第3節では決定した *MYH* の一次構造と他生物種の *MYH* のアミノ酸配列とを比較して、系統樹を作成した。

## 第1節 ウシエビ幼生

タイの養殖場で採取したウシエビ幼生を試料とし、RT-PCR によって *MYHa* および *MYHb* の発現を調べた。さらに縮重プライマーによる PCR を行い、幼生で発現している *MYH* の探索を試みた。

## 実験方法

### 1. 試料

タイのウシエビ養殖場において、ノープリウス、ゾエア、ミシスおよびポスターバの各成長段階の幼生を採取した。試料は *RNAlater* 中、全 RNA 抽出に用いるまで -20 °C で保存した。

### 2. RT-PCR

各成長段階に属する幼生から第1章の方法を用いて全 RNA の抽出、cDNA の合成を行った。ただし、逆転写の際には GeneRacer Oligo dT プライマーを用いた。合成した各幼生の cDNA を鋳型とし、*MYHa* および *MYHb* の 3'側を特異的に増幅させるように設計したプライマーセット tMYHa-F4/tMYHa-R3 および tMYHb-F4/tMYHb-R3 を用いて PCR を行った (Table 1-2)。PCR 反応液は鋳型 cDNA 1 μL、10 μM Forward プライマー 1 μL、10 μM Reverse プライマー 1 μL、KOD –Plus– Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/μL) 1 μL、10 x KOD –Plus– Neo 緩衝液 5 μL、25 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 μL、2 mM dNTPs 5 μL および滅菌水 33 μL を混合したものとした。反応条件は 94 °C、2 分加熱後、98 °C 10 秒、68 °C 30 秒を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行った。得られた増幅産物を pBluescript II KS (+) にライゲーションし、前述の方法で塩基配列を解析した。

### 3. 縮重プライマーによる PCR

次に、プライマーF1/GeneRacer 3' Primer による PCR を行った。PCR 反応液は 鋳型 cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Forward プライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M Reverse プライマー 3  $\mu$ L、KOD –Plus- Neo DNA ポリメラーゼ (1 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、10 x KOD –Plus- Neo 緩衝液 5  $\mu$ L、25 mM  $Mg_2SO_4$  3  $\mu$ L、2 mM dNTPs 5  $\mu$ L および滅菌水 31  $\mu$ L を混合したものとした。反応条件は 94  $^{\circ}C$  で 2 分加熱後、98  $^{\circ}C$  10 秒、55  $^{\circ}C$  30 秒および 68  $^{\circ}C$  40 秒を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル行った。得られた増幅産物を pBluescript II KS (+)にライゲーションし、前述の方法で塩基配列の解析をした。

## 結果

### 1. RT-PCR

*MYHb* の 3'側を特異的に増幅させるように設計したプライマーセット tMYHb-F4/tMYHb-R3 による PCR では、成体由来の cDNA を鋳型とした PCR のみでしか増幅産物が認められなかった (Fig. 4-1A)。その塩基配列を解析したところ、*MYHb* のものと一致した。

一方、*MYHa* の 3'側を特異的に増幅させるように設計したプライマーセット tMYHa-F4/tMYHa-R3 による PCR では、成体以外でポストラバにおいても増幅産物がみられた (Fig. 4-1A)。これらの塩基配列を解析したところ、成体由来の増幅産物は *MYHa* と一致した。しかし、ポストラバ由来の増幅産物では *MYHa* と異なるものが 2 種類得られたため、*MYHpa* および *MYHpb* と名付けた。*MYHpa* は増幅した 516 塩基中、6 塩基が *MYHa* と異なっており、演繹アミノ酸配列では 172 残基中、2 残基が *MYHa* と異なっていた。また、*MYHpb* は 516 塩基中、29 塩基が *MYHa* と異なっており、演繹アミノ酸配列は 172 残基中、7 塩基に *MYHa* と違いがみられた (Fig. 4-2A)。

### 2. 縮重プライマーによる PCR

プライマーセット F1/GeneRacer 3' Primer による PCR では、ゾエアおよびミシスにおいて増幅産物がみられた (Fig. 4-1B)。それらの増幅産物の塩基配列を解析したところ、ゾエアでは 921 bp の *MYH* 断片が得られ、3'UTR は 56 bp であった。また、ミシスでは 934 bp の *MYH* 断片が得られ、3'UTR は 60 bp であった。ここで、ゾエアから得られた *MYH* 断片を MYHz、ミシスから得られたものを MYHm とした。それぞれの演繹アミノ酸配列と、MYHa および MYHb とのアミノ酸同一率を求めた結果、MYHz および MYHa 間では 70 %、MYHz および MYHb 間では 94 % であった。一方、MYHm および MYHa 間では 69 %、MYHm および MYHb 間では 93 % となった。また、MYHz と MYHm は 98 % のアミノ酸同一率を示した。



## 第2節 パシフィックホワイトシュリンプ幼生

タイの養殖場で採取したホワイトシュリンプ幼生を用いて、*MYHa* および *MYHb* の発現の有無を調べた。また、縮重プライマーによる PCR を行い、幼生で発現する *MYH* の探索を試みた。

### 実験方法

#### 1. 試料

タイのホワイトシュリンプ養殖場において、ゾエア、ミシスおよびポストラーバの各成長段階の幼生を採取した。ポストラーバにおいては変態後 3 日経過したものと 20 日経過したもの 2 種類を採取した。試料は *RNAlater* 中、全 RNA 抽出に用いるまで -20 °C で保存した。

#### 2. RT-PCR

第1節のウシエビ幼生と同様の方法を用いて、RT-PCR を行った。ただし、用いたプライマーセットは wMYHa-F5/wMYHa-R4、wMYHb-F5/wMYHb-R4 および F1/GeneRacer 3' Primer とした (Table 1-3)。

#### 3. 縮重プライマーによる PCR

本章第1節と同様の方法を用いて、PCR および増幅産物の塩基配列の解析を行った。

### 結果

#### 1. RT-PCR

プライマーセット wMYHa-F5/wMYHa-R4 および wMYHb-F5/wMYHb-R4 による PCR では、成体由来の cDNA を鋳型にしたときのみでしか増幅産物は認めら

れなかった (Fig. 4-3A)。

## 2. 縮重プライマーによる PCR

F1/GeneRacer 3' Primer による PCR ではゾエア、ミシスおよびポストラーバで増幅産物がみられた (Fig. 4-3B)。増幅産物の塩基配列を解析した結果、*MYHa* および *MYHb* とは異なる *MYH* が得られた。ここでゾエア、ミシス、変態後 3 日目のポストラーバおよび変態後 20 日目のポストラーバから得られた *MYH* をそれぞれ、*MYHz*、*MYHm*、*MYHp3* および *MYHp20* とした。これらのうち、*MYHz*、*MYHm* および *MYHp20* の塩基配列および演繹アミノ酸配列は一致した (Fig. 4-4)。これらのアミノ酸配列と *MYHa* 間の同一率は 70 % であるのに対し、*MYHb* 間とは 93-94% であった。また、*MYHz* および *MYHp3* 間での演繹アミノ酸同一率は 96% であった。

### 第3節 エビ類ミオシン重鎖の系統分類

第1章により3種エビ類から *MYH* の全長がクローニングされた。一方、本章第1節および第2節では、ウシエビおよびホワイトシュリンプの幼生から新たな *MYH* 断片が得られた。したがって、本節では、これらの演繹アミノ酸配列と他生物種の *MYH* との一次構造比較を行い、分子系統樹を構築した。

#### 実験方法

第1章で全アミノ酸配列が明らかとなったクルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプの *MYHa* および *MYHb*、さらには、本章でC末端側のアミノ酸配列が明らかになった幼生型 *MYH* に加えて、アメリカンロブスターの速筋型 (U03091) および遅筋型 *S<sub>1</sub> slow twich* (AY232598) *MYH*、また、ゴーストクラブ、ホタテガイ *Argopecten irradians* (X55714)、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (アイソフォーム K, NP724008; アイソフォーム P, NP001162992) および *D. virillis* (XM002051957)、ケンサキイカ *Loligo pealei* (AAC24207)、ヤリイカ *L. bleekeri* (ACD68201)、およびコイ *Cyprinus carpio* (D89990) の *MYH* アミノ酸配列から系統樹を作成した。演繹アミノ酸配列は Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) を用いて比較した。系統樹は、MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 2008) を用いた近隣結合法により構築した。

#### 結果

分子系統樹から、3種エビ類 *MYH* およびアメリカンロブスター *MYH* はそれぞれ異なるクラスターを形成した。さらに、3種エビ類 *MYH* およびゴーストクラブ *MYH* も異なるクラスターを形成した。*MYHa* およびウシエビおよびポストラーバ由来 *MYHpa* および *MYHpb* は同じグループを形成し、それ以外の甲殻類 *MYH* とはブートストラップ値 98 で分岐した。*MYHb* および幼生型 *MYH* の多

くは同じグループを形成したが、アメリカンロブスター速筋および遅筋型 MYH およびゴーストクラブ MYH とは異なるグループであった。また、幼生型 MYH はウシエビおよびホワイトシュリンプごとに別のクラスターを形成した (Fig. 4-5)。

#### 第4節 考察

RT-PCR および塩基配列の解析により、ウシエビおよびホワイトシュリンプにおいては、*MYHa* および *MYHb* は成体のみで発現していることが明らかとなった。まずウシエビではゾエア、ミシスおよびポストラバに属する幼生で新たな *MYH* がクローニングされた。ゾエアおよびミシスから得られた *MYH* はアミノ酸同一率から *MYHb* に近いことが示された。一方、ポストラバからの *MYH* は *MYHa* に近かった。これらの結果から類推すると、幼生初期の段階では *MYHb* タイプのみが発現しており、変態が進むにつれて *MYHa* タイプが発現する可能性がある。本章ではゾエア、ミシス、ポストラバでは *MYH* のクローニングに成功したが、ノープリウス幼生からは未だ *MYH* がクローニングされていない。RT-PCR では、 $\beta$ -アクチンの増幅は確認されているので、RNA の抽出と cDNA の合成までは成功していることが分かる。すなわち、今回用いた縮重プライマーの設計に問題があり、*MYH* が増幅されなかったと判断されるので、今後は縮重プライマーの設計を変更し、再度 PCR を行う必要がある。このクローニングに成功すれば、発生最初期でいかなるタイプの *MYH* が発現しているかが明らかとなり、エビ類の筋発生に関する新たな知見を得ることができる。

ホワイトシュリンプの幼生から新たにクローニングされた *MYH* は、アミノ酸同一率から全て *MYHb* に近い配列を有していることが分かった。また、*MYHz*、*MYHm* および *MYHp20* の配列は、本章で明らかになった範囲においては同一であった。ウシエビでは成長段階ごとに異なる配列の *MYH* が得られたのに対し、ホワイトシュリンプでは成長段階が異なっても同一の幼生型アイソフォームが発現していた。ヨーロッパアンロブスターのミシスおよびポストラバではそれぞれ2種類ずつの *MYH* アイソフォームの存在が示されているが (Magnay *et al.*, 2003)、3種エビ類の幼生では何種類の *MYH* が存在しているのかは不明である。成長段階による *MYH* の発現の違いは種の違いによるものなのか、あるいは本研

究で使用した縮重プライマーの配列の関係でウシエビでは異なるものが得られ、ホワイトシュリンプでは同一のものが得られたものなのかも検討の余地がある。

さらに分子系統樹を新たに構築し、アメリカンロブスターおよびゴーストクラブ MYH と、3 種エビ類の MYH とを比較した結果、MYHa、MYHpa および MYHpb は他の MYH とブートストラップ値 98 で分岐していた。第 1 章の系統樹および第 3 章の NADH-diaphorase 活性染色の結果を併せて考えると、MYHa、MYHpa および MYHpb は速筋型であるといえる。また、アメリカンロブスターの速筋および遅筋型 MYH およびゴーストクラブ MYH は同一のクラスターを形成し、MYHb および幼生型 MYH とはブートストラップ値 41 で分岐していた (Fig. 4-5)。この結果から、MYHb は速筋型ではあるが遅筋型にも類似すると判断される。さらに、MYHpa および MYHpb 以外の幼生型 MYH においても MYHb と近い系統関係にあることから速筋型であると考えられる。

本研究において、エビ類の成体および幼生から速筋型 MYH が得られたが、遅筋型は未知である。したがって、今後は NADH-diaphorase 活性染色により好氣的代謝を行うことが示された部位においての遅筋型 MYH の探索が必要である。

## 第5章 総括

水圏には多様な生物が生息しており、水産資源として養殖されている種も多く存在する。そのなかでも世界中で養殖されている重要種の一つにエビ類が挙げられる。エビ類は、多様性に富む節足動物門、甲殻亜門に属し (Martin and Davis, 2001)、主に生理学的側面からの研究が行われてきた (Liu *et al.*, 2009; Jose *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2010)。しかし、可食部である筋肉そのものを対象とした研究はほとんど行われてこなかった。筋肉の主要構成成分はミオシンであり、その中でも MYH が大部分を占める (Lowey *et al.*, 1969; Harrington and Rodgers, 1984; Cope *et al.*, 1996; Bobkov *et al.*, 1997)。そこで本研究ではエビ類の MYH を対象に、その基礎的知見を得ることを目的とした。

全4章に渡る研究の結果、今まで未知であったエビ類の MYH に関する多くの知見を得ることができた。とくに甲殻類において初めて MYH の全長を決定したことは重要である。さらに、クルマエビ、ウシエビおよびホワイトシュリンプからそれぞれ速筋型 MYH を各2種類ずつ、計6種類の MYH 全長を決定したことは、今後の甲殻類の MYH に関する研究の進展に寄与する。本研究により明らかとなった配列が、アメリカンロブスターをはじめとする他のエビ類や甲殻類のみならず、節足動物類 MYH 全長解明に役立つことが期待できる。また、甲殻類の多くの種において MYH の全長解明がなされれば、脊椎動物を含む他生物種の MYH との全長比較が可能となり、甲殻類 MYH の一次構造上の特徴を詳細に把握できるであろう。

ウシエビおよびホワイトシュリンプの各成長段階における幼生型 MYH の存在が認められたことにより、エビ類も成長に伴い異なる MYH アイソフォームを発現することが明らかとなった。今後、幼生型においても全長を解明することで、成体型と幼生型の構造比較ができ、それぞれの機能上の違いを類推することも可能となるであろう。さらに、エビ類 MYH の一次構造に関する情報の蓄積によ

り、甲殻類 **MYH** の系統分類のみならず進化の過程を明らかにする一助となることも予想される。

クローンライブラリーおよび組織学的解析により、エビ類の速筋型および遅筋型 **MYH** の発現頻度や腹部屈筋における転写産物の分布も明らかとなった。これらの分布の違いがエビ類の食品としての品質、とくに食感に影響していることも十分に考えられる。3 種エビ類の間で大きな違いがみられたのは、ともに速筋型の **MYHa** および **MYHb** の発現頻度である。クルマエビでは **MYHa** 転写産物が多かったのに対し、ウシエビおよびホワイトシュリンプでは **MYHb** 転写産物が多かった。この両 **MYH** の発現頻度の違いがエビ類の食感を決定する因子の一つになっている可能性がある。

クルマエビは一般的にその食感に優れているといわれている。つまり、**MYHa** の存在量が多ければ食感が良くなるのかもしれない。これを確認するためには、同種のエビで、かつ **MYHa** および **MYHb** の発現量が異なる個体を得る必要がある。これらの発現量を変える可能性がある方法として、異なる塩分での飼育が挙げられる。甲殻類は浸透圧調節のために、塩分変化に伴い遊離アミノ酸量が変動することが知られている (Camien *et al.*, 1951; Henry *et al.*, 1980)。**MYH** の発現量も塩分変化に伴って変動することも考えられるため、今後はエビ類の飼育実験が必要である。様々な塩分で飼育することにより **MYH** の発現量や転写産物の分布が変化すれば、それぞれのエビにおいて食感の比較ができ、最良な食感を有するエビ類の飼育条件を導き出せる可能性がある。他にも、水温変化と **MYH** の発現および転写産物の分布の関連性を調べる研究も考えられる。ヨーロッパンロブスターの幼生において異なる水温での飼育により、速筋型および遅筋型 **MYH** の発現比率が変動することが示されているため (Magnay *et al.*, 2003)、3 種エビ類においても飼育水温により、**MYH** の発現に変動がみられる可能性がある。したがって、水温と **MYH** の発現との関連性についても明らかにしなければ



ならない。

これらの研究から得られた結果を養殖で生かすことができれば、水産養殖において重要な位置を占めるエビ類の商品価値をさらに向上させることが可能となる。したがって、本研究の成果はエビ類の品質向上にも寄与することができ、生化学の分野のみならず水産養殖においても重要であると結論付けられる。

## 参考文献

Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F. and Butler-Browne, G. (2003). Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol. Cell* **95**, 399-406.

Balint, M., Wolf, I., Tarcsafalvi, A. and Gergely, J. (1978). Location of SH-1 and SH-2 in the heavy chain segment of heavy meromyosin. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 793-799.

Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 19-37.

Bobkov, A. A., Sutoh, K. and Reisler, E. (1997). Nucleotide and actin binding properties of the isolated motor domain from *Dictyostelium discoideum* myosin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **18**, 563-571.

Camien, M. N., Sarlet, H., Duchâteau, G. and Florkin, M. (1951). Non-protein amino acids in muscle and blood of marine and fresh water crustacea. *J. Biol. Chem.* **193**, 881-885.

Clark, K. A., Lesage-Horton, H., Zhao, C., Beckerle, M. C. and Swank, D. M. (2011). Deletion of *Drosophila* muscle LIM protein decrease flight muscle stiffness and power generation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, C373-C382.

Collier, V. L., Kronert, W. A., O'Donnell, P. T., Edwards, K. A. and Bernstein, S. I. (1990). Alternative myosin hinge regions are utilized in a tissue-specific fashion that

correlates with muscle contraction speed. *Genes Dev.* **4**, 885-895.

Cope, M. J., Whisstock, J., Rayment, I. and Kendrick-Jones, J. (1996). Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* **4**, 969-987.

Cotton, J. L. S. and Mykles, D. L. (1993). Cloning of a crustacean myosin heavy chain isoform: exclusive expression in fast muscle. *J. Exp. Zool.* **267**, 578-586.

Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P. and Bache're E. (2001). Crustacean immunity antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* **276**, 47070-47077.

Furch, M., Geeves, M. A. and Manstein, D. J. (1998). Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry* **37**, 6317-6326.

Goodson, H. V., Warrick, H. M. and Spudich, J. A. (1999). Specialized conservation of surface loops of myosin: evidence that loops are involved in determining functional characteristics. *J. Mol. Biol.* **287**, 173-185.

Harrington, W. F. and Rodgers, M. E. (1984). Myosin. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 35-73.

Henry, R. P., Mangum, C. P. and Webb, K. L. (1980). Salt and water balance in the

oligohaline clam, *Rangia cuneata*. II. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation. *J. Exp. Zool.* **211**, 11-24.

Holmes, J. M., Whiteley, N. M., Magnay, J. L. and El Haj, A. J. (2002). Comparison of the variable loop regions of myosin heavy chain genes from Antarctic and temperate isopods. *Comp. Biochem. Physiol. B* **131**, 349-359.

Hooper, S. L., Hobbs, K. H. and Thuma, J. B. (2008). Invertebrate muscles: thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle. *Progr. Neurobiol.* **86**, 72-127.

Hooper, S. L. and Thuma, J. B. (2005). Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.* **85**, 1001-1060.

Hoskins, R. A., Carlson, J. W., Kennedy, C., Acevedo, C., Evans-Holm, M., Frise, E., Wan, K. H., Park, S., Mendez-Lago, M., Rossi, F., Villasante, A., Dimitri, P., Karpen, G. H. and Celniker, S. E. (2007). Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* **316**, 1625-1628.

Hwang, G. C., Watabe, S. and Hashimoto, K. (1990). Changes in carp ATPase induced by temperature acclimation. *J. Comp. Physiol. B* **160**, 233-239.

Ikeda, D., Nihei, Y., Ono, Y. and Watabe, S. (2010). Three embryonic myosin heavy chain genes encoding different motor domain structures from common carp show distinct expression patterns in cranial muscles. *Marine Genomics* **3**, 1-9.

Jahromi, S. S. and Atwood, H. L. (1969). Correlation of structure, speed of contraction, and total tension in fast and slow abdominal muscle fibers of the lobster (*Homarus americanus*). *J. Exp. Zool.* **171**, 25-38.

Jose, S., Mohandas, A., Philip, R. and Bright S. I. S. (2010). Primary hemocyte culture of *Penaeus monodon* as an *in vitro* model for white spot syndrome virus titration, viral and immune related gene expression and cytotoxicity assays. *J. Invertebrate Pathol.* **105**, 312-321.

Kamimura, M. T., Meier, K. M., Cavalli, R. O., Laurino, J., Maggioni, R. and Marins, L. F. (2008). Characterization of growth-related genes in the south-western Atlantic pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) through a modified DDRT-PCR protocol. *Aquac. Res.* **39**, 200-204.

Koenders, A., Lamey, T. M., Medler, S., West, J. M. and Mykles D. L. (2004). Two fast-type fibers in claw closer and abdominal deep muscles of the Australian freshwater crustacean, *Cherax destructor*, differ in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and troponin-I isoforms. *J. Exp. Zool.* **301A**, 588-598.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* **9**, 299-306.

LaFramboise, W. A., Griffis, B., Bonner, P., Warren, W., Scalise, D., Guthrie, R. D. and

Cooper, R. L. (2000). Muscle type-specific myosin isoforms in crustacean muscles. *J. Exp. Zool.* **286**, 36-48.

Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L. and Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1031-1041.

Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. and Baker, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation. *J. Mol. Biol.* **42**, 1-29.

Lyons, G. E., Ontell, M., Cox, R., Sassoon, D. and Buckingham, M. (1990). The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J. Cell Biol.* **111**, 1465-1476.

Magnay, J. L., Holmes, J. M., Neil, D. M. and El Haj, A. J. (2003). Temperature-dependent developmental variation in lobster muscle myosin heavy chain isoforms. *Gene* **316**, 119-126.

Matulef, K., Sirokman, K., Perreault-Micale, C. L. and Szent-Gyorgyi, A. G. (1998). Amino-acid sequence of squid myosin heavy chain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 705-712.

Martin, J. W. and Davis, G. E. (2001). An updated classification of the recent crustacea. *Nat. History Museum Los Angeles County Sci. Ser.* **39**, 1-124.

Medler, S. and Mykles, D. L. (2003). Analysis of myofibrillar proteins and transcripts in adult skeletal muscles of the American lobster *Homarus americanus*: variable expression of myosins, actin and troponins in fast, slow-twitch and slow-tonic fibres. *J. Exp. Biol.* **206**, 3557-3567.

Medler, S., Lilley, T. and Mykles, D. L. (2004). Fiber polymorphism in skeletal muscles of the American lobster, *Homarus americanus*: continuum between slow-twitch (S<sub>1</sub>) and slow-tonic (S<sub>2</sub>) fibers. *J. Exp. Biol.* **207**, 2755-2767.

Mornet, D., Pantel, P., Audemard, E. and Kassab, R. (1979). The limited tryptic cleavage of chymotryptic S-1 : an approach to the characterization of the actin site in myosin heads. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 925-932.

Murphy, C. T. and Spudich, J. A. (1998). *Dictyostelium* myosin 25-50k loop substitutions specifically affects ADP release rates. *Biochemistry* **37**, 6738-6744.

Murphy, C. T. and Spudich, J. A. (1999). The sequence of the myosin 50-20k loop affects myosin's affinity for actin throughout the actin-myosin ATPase cycle and its maximum ATPase activity. *Biochemistry* **38**, 3785-3792.

Mykles, D. L. (1997). Crustacean muscle plasticity: molecular mechanisms determining mass and contractile properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **117B**, 367-378.

Nihei, Y., Ikeda, D., Ono, Y., Kobiyama, A., Ohara, S., Cole, N. J., Johnston, I. A., and

Watabe, S. (2006). Molecular cloning and mRNA expression analysis of carp embryonic, slow and cardiac myosin heavy chain isoforms. *J. Exp. Biol.* **209**, 188-198.

Nyitrai, L., Goodwin, E. B. and Szent-Gyorgyi, A. G. (1990). Nucleotide sequence of full length of cDNA for a scallop striated muscle myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7158.

Ogonowski, M. M. and Lang, F. (1979). Histochemical evidence for enzyme differences in crustacean fast and slow muscle. *J. Exp. Zool.* **207**, 143-151.

Ono, Y., Liang, C., Ikeda, D. and Watabe, S. (2006). cDNA cloning of myosin heavy chain genes from medaka *Oryzias latipes* embryos and larvae and their expression patterns during development. *Dev. Dyn.* **235**, 3092-3101.

Ono, Y., Kinoshita, S., Ikeda, D., and Watabe, S. (2010). 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.

Parnas, I. and Atwood, H. L. (1966). Phasic and tonic neuromuscular systems in the abdominal extensor muscles of the crayfish and rock lobster. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 701-723.

Perry, M. J., Tait, J., Hu, J., White, S. C. and Medler, S. (2009). Skeletal muscular fiber types in the ghost crab, *Ocypode quadrata*: implications for running performance. *J. Exp. Biol.* **212**, 673-683.



Rayment, I., Rypniewsky, W. R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. and Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58.

Richard, L., Blanc, P. P., Rigolet, V., Kaushik, S. J. and Geurden, I. (2010). Maintenance and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilisation efficiencies in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. *Br. J. Nutr.* **103**, 984-995.

Rock, J., Magnay, J. L., Beech, S., El Haj, A. J., Goldspink, G., Lunt, D. H. and Whiteley, N. M. (2009). Linking functional molecular variation with environmental gradients: myosin gene diversity in a crustacean broadly distributed across variable thermal environments. *Gene* **437**, 60-70.

Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M. and Henikoff, S. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1628-1635.

Rubin, G. M. and Lewis, E. B. (2000). A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science* **287**, 2216-2218.

Schiaffino, S. and Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* **76**, 371-423.

Silverman, H. and Charlton, M. P. (1980). A fast-oxidative crustacean muscle: histochemical comparison with other crustacean muscle. *J. Exp. Zool.* **211**, 267-273.

Soderhall, K. (1999). Invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 263-266.

Spangenburg, E. E. and Booth, F. W. (2003). Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta. Physiol. Scand.* **178**, 413-424.

Squire, J. M., Bekyarova, T. Farman, G., Gore, D., Rajkumar, G., Knupp, C., Lucaveche, C., Reedy, M. K. and Irving, T. C. (2006). The myosin filament superlattice in the flight muscles of flies: A-band lattice optimisation for stretch-activation? *J. Mol. Biol.* **361**, 823-838.

Sritunyalucksana, K., Wannapapho, W., Lo, C. F. and Flege, T. W. (2006). PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *J. Virol.* **80**, 10734-10742.

Sweeney, H. L., Rosenfeld, S. S., Brown, F., Faust, L., Smith, J., Xing, J., Stein, L. A. and Sellers J. R. (1998). Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *J. Biol. Chem.* **273**, 6262-6270.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**,

4673-4680.

Tse, F. W., Govind, C. K. and Atwood, H. L. (1983). Diverse fiber composition of swimming muscles in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Can. J. Zool.* **61**, 52-59.

Uyeda, T. Q. P., Ruppel, K. M. and Spudich, J. A. (1994). Enzymatic activities correlate with chimeric substitutions at the actin-binding face of myosin. *Nature* **368**, 567-569.

Watabe, S. (2002). Temperature plasticity of contractile proteins in fish muscle. *J. Exp. Biol.* **205**, 2231-2236.

Whiteley, N. M., Magnay, J. L., McCleary, S. J., Khazrazee Nia, S., El Haj, A. J. and Rock, J. (2010). Characterisation of myosin heavy chain gene variants in the fast and slow muscle fibres of gammarid amphipods. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **157**, 116-122.

Wu, W., Wang, L. and Zhang, X. (2005). Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology* **332**, 578-583.

Xu, J. Y., Han, F. and Zhang, X. (2007). Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Res.* **73**, 126-131.

Zhang, X., Huang, C., Tang, X., Zhuang, Y. and Hew, C. L. (2004). Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. *Proteins* **55**, 229-235.

Table 1-1. Primer sequences to amplify MYH clones from kuruma shrimp

Name	Sequence (5' - 3')	Primer positions (bp)**
F1	GGCCCTGCGCATGAARAARAARYT	MYHa, 4945-4968; MYHb, 4980-5003
kMYHa-F2	CTBACTAATCARCTBGAYGAYACH	4037-4060
kMYHb-F2	ATYGARGARYTBGARGARGAR	4180-4200
F3	GGCGAGTCCGGCGCNGGNAARAC	MYHa, 662-685; MYHb, 691-714
kMYHa-R1	GATTCATCATGAACCTTCCTAAGA	5041-5065
kMYHb-R1	ATCTCGGCCTGGGCCTTCTTCACC	5076-5099
kMYHa-R2	CGTCCAGCTCAACAGCCGCACGCAT	4370-4394
kMYHb-R2	TCGTCGATTTTCGGTAATAATGCGTCC	4405-4430
kMYHa-R3	CGTTACCGTAAGCCTCAAGGATGG	792-815
kMYHb-R3	GCAGGTACACCTCGATATCAGCAC	929-952
AAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG I I GGG I I GGG I I G	
AUAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	

\* Abbreviations used are: AAP, abridged anchor primer; AUAP, abridged universal amplification primer.

Table 1-2. Primer sequences used in this study to amplify *MYH* s from black tiger shrimp

Name	Sequence (5' - 3')	Primer positions (bp)**
F1	GGCCCTGCGCATGAARAARAARYT	MYHa, 4948-4971; MYHb, 4946-4969
F2	CCCTGGATCACGCCAAYAARGCNAA	MYHa, 5001-5025; MYHb, 4998-5023
F3	GGCGAGTCCGGCGCNGGNAARAC	MYHa, 662-684; MYHb, 660-682
tMYHa-F4	ACCAGAATACTGCTCTCACTGC	5271-5292
tMYHb-F4	CAGCATGGATCCCCTTTCCATGG	5271-5292
tMYHa-R1	TAGCATATAATTTTGTTCAGCAGTT	5902-5927
tMYHb-R1	ATACTTAGCTCCTCTGCACTGTCTCA	5825-5850
tMYHa-R2	GATGTCGTCAGACAATAAGCACATC	1015-1039
tMYHb-R2	GATGTCGTCCGAAAGATGACACAG	1017-1040
tMYHa-R3	CACTGCGTTTAATAGTGGACGAC	5849-5871
tMYHb-R3	ATGTCATGTCCGGCTCATGTCG	5861-5882
AAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG I I GGG I I GGG I I G	
AUAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	

\*Abbreviations used are: AAP, abridged anchor primer; AUAP, abridged universal amplification primer.

\*\*Nucleotide positions from the 5' end of *MYH*.

Table 1-3. Primer sequences used in this study to amplify *MYH*s from Pacific white shrimp

Name	Sequence (5' - 3')	Primer positions (bp)**
F1	GGCCCTGCGCATGAARAARAARYT	MYHa, 4947-4970; MYHb, 4946-4969
F2	CCCTGGATCACGCCAAYAARGCNAA	MYHa, 5000-5024; MYHb, 4999-5023
F3	GGCGAGTCCGGCGCNGGNAARAC	MYHa, 664-686; MYHb, 660-682
wMYHa-F4	CCTCCGAGTTCCGTGAACAGTATG	5108-5131
wMYHb-F4	CTTCTGAGTATCGCGAGCAGTGC	5107-5129
wMYHa-F5	CAACCAGAACACTGCTCTCACTGC	5268-5291
wMYHb-F5	CTCAGCATGGATCCCTCTCCATG	5269-5291
R1	TGCATCTCGCCCTCCARYTTNCKYTT	5296-5321
wMYHa-R2	CGTTGAAGCGGCGTTCAGCAATG	5133-5155
wMYHb-R2	AGCATTGGCCTTACGCTCGGAG	5135-5156
wMYHa-R3	TGGCATTGCCGTAAGCTTCAAGG	798-820
wMYHb-R3	GGTTGGTCTGCACGATCTGGTC	771-793
wMYHa-R4	GGATGATAGTTACTCCCTCAGATTCTTC	5827-5854
wMYHb-R4	ACAATATAATTAGCTCCTCTGCACTGTC	5828-5855
AAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG I I GGG I I GGG I I G	
AUAP*	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
GeneRacer 3' Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	

\*Abbreviations used are: AAP, abridged anchor primer; AUAP, abridged universal amplification primer.

\*\*Nucleotide positions from the 5' end of *MYH*.

Table 1-4. The amino acid identity of MYH among shrimps (%)

	Kuruma MYHb				Tiger MYHa				Tiger MYHb				White MYHa				White MYHb			
	S1	S2	LMM	Total	S1	S2	LMM	Total	S1	S2	LMM	Total	S1	S2	LMM	Total	S1	S2	LMM	Total
Kuruma MYHa	78	60	72	71					78	61	72	71	96	95	93	95	78	61	73	72
Kuruma MYHb					76	60	73	71	95	93	97	95	78	60	72	71	95	93	97	95
Tiger MYHa									77	60	73	71	96	94	97	96	77	60	73	71
Tiger MYHb													78	60	72	72	97	97	99	98
White MYHa																	78	60	73	72

Abbreviations used are: S1, subfragment-1; S2, subfragment-2; LMM, light meromyosin.

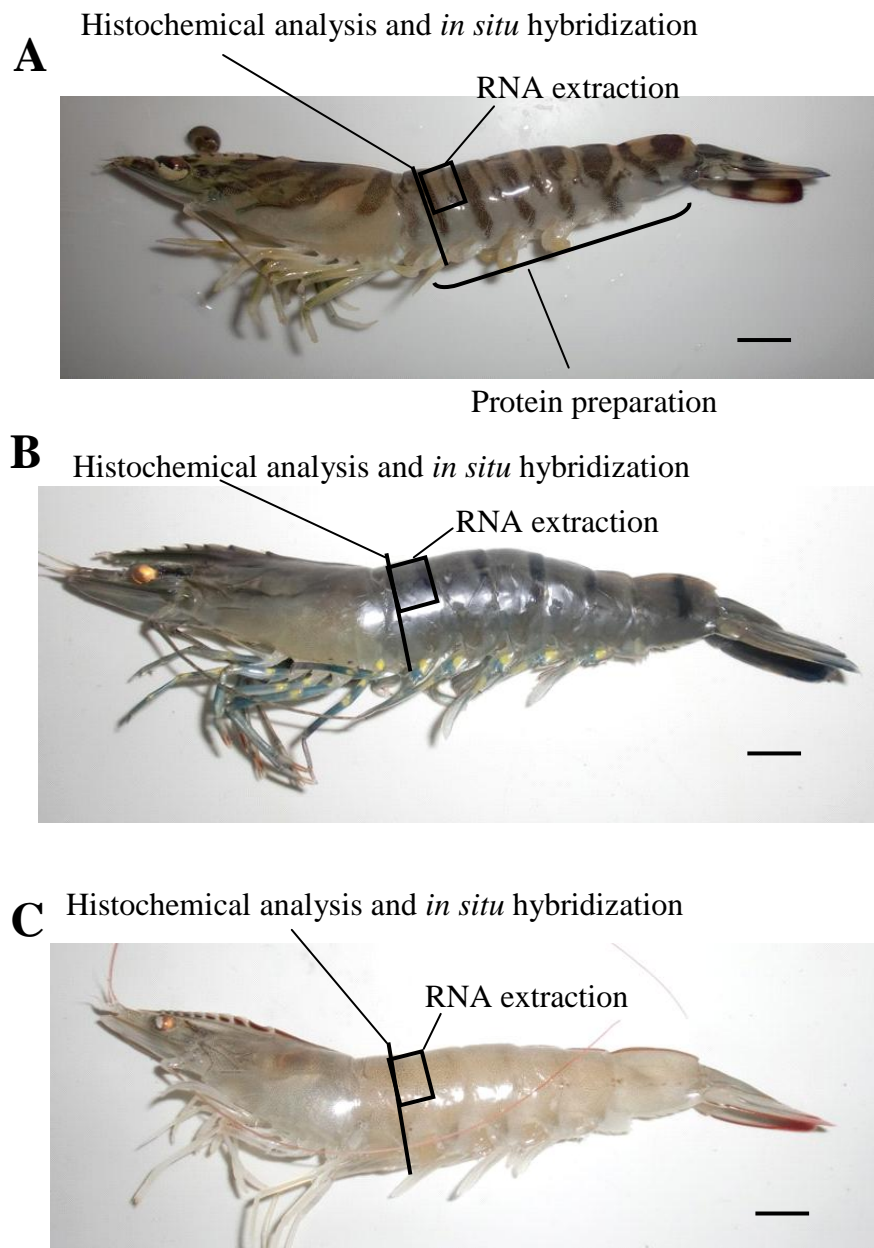
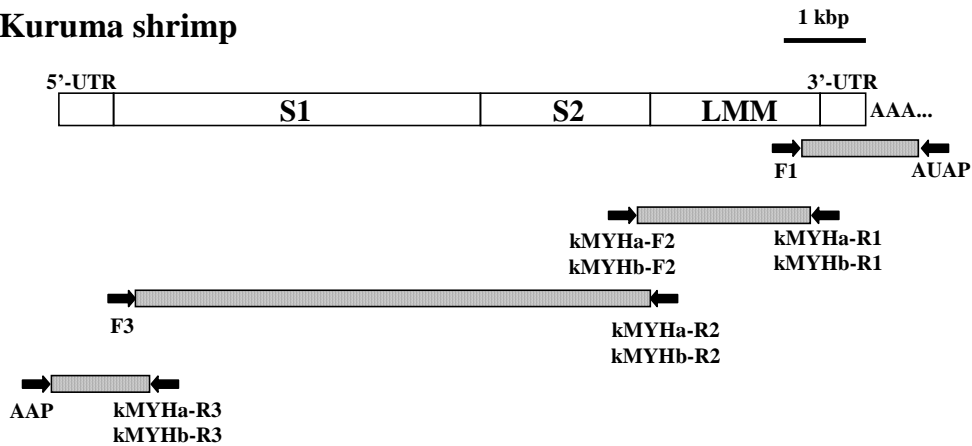


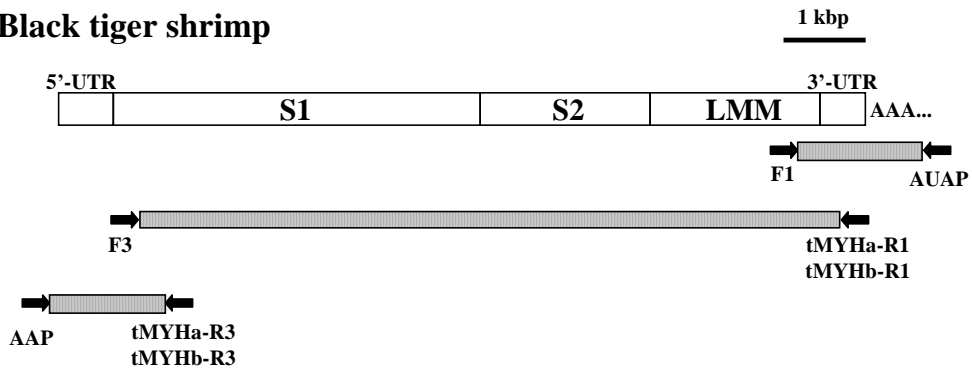
Fig. 1-1. The lateral view of shrimps. Lines crossing the tails indicate cross sectioning. Boxes indicate the areas from which total RNAs were extracted. The major part of abdominal muscle of kuruma shrimp was subjected to myosin preparation. The scale bars in each panel indicate 1.0 cm. (A) kuruma shrimp; (B) black tiger shrimp; (C) Pacific white shrimp.



### A Kuruma shrimp



### B Black tiger shrimp



### C Pacific white shrimp

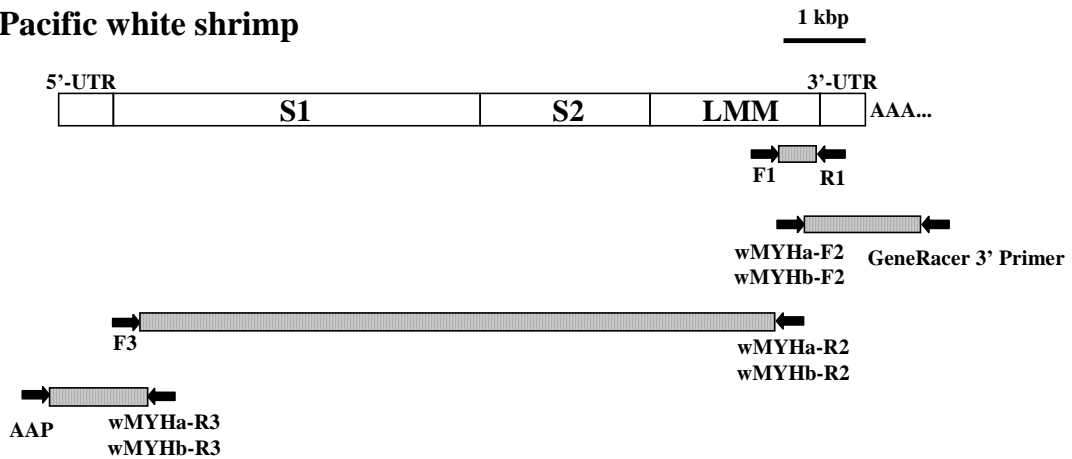


Fig. 1-2. The schematic diagram of MYH cDNA and location of PCR primers. A, the structure of MYH from kuruma shrimp and the primer positions. S1, S2 and LMM indicate subfragment-1, subfragment-2 and light meromyosin, respectively. PCR was performed four times to determine the full sequences of *MYHs*. The amplified fragments are represented in the bars. B, the structure of MYH from black tiger shrimp and the primer positions. C, the structure of MYH from Pacific white shrimp and the primer positions.

MHCa	MPGH IKKSTGPD PDPTEYLFISREQRMKDQTKPYDPKKSFWCPD PNEGVECELQGAQGDKHVTVKLP SGETKDFKKEQVGQVNPYPKYEK	90
MHCb	...VV.....F.....A.....L.....C.V..DK...A.GLI.....F.S.Q.K...V.....DT.V.....	90
MHCa	CEDVSNLTFLND PSVFFVLKSRYSQAKLI YTYSGLFCAVNP YKRYPIYTNRAVKIYI GKRRNEVP PHLFAICD GAYQNMNQRQNSMLI	180
MHCb	.....A..L.N..T..... <b>ATP binding site I</b> ..... <b>VI</b> .....T.....Q.....S..... <b>MD.L.SGL</b> .....	180
MHCa	TGESGAGKTENTKRVLSYFANVGAS <b>Loop 1</b> EKKEGESRQNLSDQI IQTNP <b>ATP binding site III</b> LEAYGNAKTT RNDNS SRF GKF IRVHFAPNGKLSGAD IEVYLLE	269
MHCb	.....TSK...D.K.....V.....P.....I.....	270
MHCa	KARVISQSPAERGYYIFYQLMCDQIDYI KKI CLLSDDIYDYHYEAQGVTVPSIDDKEDMQFTHDAFDVLNFSHEERDCNYKVTSVMHF	359
MHCb	...V..A.....M.S..VPTL..T.....R..C.....E..N..TI...TD...S..I..A...H	360
MHCa	GNMKFKQRGREGQAEADGTEAGEIVATLLGVDAEELYRNFCKPKIKVGAEEFVTKGMNVQVNYI GAMAKGIFSRVFSWLVVRKNCMTLET	449
MHCb	.....P.....C.E.M..S...K.L.....Q.R.....Y.SVS.....L.D.L.K.I.K...Q....	450
MHCa	GQTRAMFIGVLD IAGFEIFDFNGFEQIC INF CNEKLQQFFNHMFVLEQEEYAKEGI VWQFVDFGMDLQACIELEF <b>actin binding site II</b>	539
MHCb	.MK.....KA...D.V.....L...A.....	540
MHCa	FPKATDKTFEEKLNHHGKSRCFIKPKPKPGQFDNHFAI VHYAGTVS YNL TGWLEKNKDP LND TVVDQLKSSNALTVE IFADHFGQS	629
MHCb	.....S.....KA...P.....S...AEG.....T...S.....KLP..I..L.....	630
MHCa	GDGGGKGKGKQQTGFKTVSSGYKDQLGNLMKTLNATH PHFIRCIVPNEFKK PGEVDAGLIMHQLTCNGVLEGIRI CQKGFPNRMPYPDF	719
MHCb	APAEA...GKK.KTG.....RE..NS..T..HS.....V.....T.S..V.....Q.....	720
MHCa	KQRYNIIAAQEMIEAKDKKAAQACFORAGLDPELYRTGNTKVF FRAGVLGTLEIIRDDRIMKLVSWLQAWIRGWA SRKFYAKMQKQRTA	809
MHCb	.H..K...DI..TSE...EKT.E.S...C.K.....M..L..E.LS.IIT.. <b>ELC binding site</b> ...LIG..E.GRL.E..VS	810
MHCa	LLVMQRNLKRYKIMRSLWYELNITLKPRLKACRAEELEKLEATAAKAEEQYEKEVKVREELEAQAALLAEKNELLAAVES SKGGMSE	899
MHCb	.V.L...I...MA.SN.S.FIFQKV..LINQPL.D.IN..KDR.E..VADLDR.STR.K...ES.VT.AE.L.N.KVTL..T..NV.K	900
MHCa	YLDKQAKLLAQKGELEAQLNETLERLRKEEDARNQIANGKKCEQEVSNLKKLEEELELSVQKGEQDKQTKDQQLTSLNEE ISHQEELIT	989
MHCb	FIEE...IS.A.AD...SDASAK.H...ES.TEMFQL.R.A..D.NAMR.D..DF..N...TN...A..H.IRNI.D...D...N	990
MHCa	KVNKEKKHLQECNQKTAEDLQSI ED KCNNLNKVKTKLESTLDELEDTLREKKLRAEVEKSKRKVEGD LRLTQEA VSD LERNLKELEVAA	1079
MHCb	.....M.....V.E.ASH...I.A...Q.....SSVG.....I.R.....KM...T.A.I..QH.D..QT.I	1080
MHCa	ERKEKEIGA ITAKIEDEQALVYRDQR-QVKE LQARLEELEEVE HERQARGKAEKAKNLLSRELS ELGERLDEAGGATAAQ IE INKKRES	1168
MHCb	Q..D...NLAN.L.E..GV.SKV.KGIR.NARPAF...T.A.....A...G.GMM...ND.N...G...L...A...S...A	1170
MHCa	ELAKVRRDI EESNLQHEAALATLRKKHNDVAEMSEQVDYLNKMKARAEKDKKAMKRDADDAKASMDSLARDKTTAEKTTQLQHGYGEI	1258
MHCb	..G.L...L..A.I...S...N.....T..I.H.....KT..E..M..YQ..E..SA..N...AL...AN.TI.Q.IS.V	1260
MHCa	CAKLDEVNR TLSDFDATKKKLACENSDLVRLQEEAENQVSQLSRVKLSLTNQ LD DTRKMCDEESRARA TLGKFRNLEHDIQALRDQLDE	1348
MHCb	NV...A...N...VH...V..G..L...D...IN..NNL.V...T..E..K..V.D...E.SV...LDG..E...S	1350
MHCa	ESDAKGVLRMLSKANAELMWRSKYES EGVARAELEAARMKLARLEEAEMQIES LNVRNLHLEKTKMRAA VELDD LHA SAERAQALA	1438
MHCb	.CE..A.AN.Q...HG..Q...I.....L.....Q...K.MQ...A.G.IIT.I..EMQMQV...G..	1440
MHCa	NAAEKQKNFDKI ISEWKLKVD LAAEVDASQKECRNY STEHFRLKAANDEN IEQLDSIRRENKNLSDEI RDLMDQIGEGGRAFHETQKN	1528
MHCb	...DRR..D..RVVN...I...Q...T.L.....Q.....I...VYE..L.H...V.....G.AE..K...E..S...SL..IE..	1530
MHCa	ARRLELEKVELQAAL EEAALAEQENKVLRTQLELSQVRRREIDRRVQEKKEEFDNTRKCHQRAI DSLQASLEVETKGKAEALRLKKLE	1618
MHCb	.K.F.I..E.....G.....Q...K.I.....A.....E.M.....A.A.S...M....	1620
MHCa	SDINELEIALDHANKANS DLHKHLRKVHDEIKDAETRVKEEQRLASEYREQYGI AERRFNALHGELEE SRTTLEQS DRGRRHAETELNDA	1708
MHCb	..G.....A.IQ.QVK.AQA.M..MQA.ME.....CSAS..KA..VN.....Q..S..A..	1710
MHCa	REQINNFNTQNA GLTASKRKLEGEHMTLQADLEMLGEAKNSEEKAKKAMLD AARLADELRS EQEHAQTQEKMRRALEVTKD LQTRL EE	1798
MHCb	N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H.E.DD..N.....D.....V.....A.....KG.DLSV...A..D..	1800
MHCa	SESAAMKAGKKA VGNMEARI RELESALDDETRRHAD SQKLNLRKERRIKELAFQTEEDKKNH DRMDQLVD KLQKQKI KT YKRQI EEEAEETI A	1888
MHCb	F..T.H.T...LAKL.G...D...H...A...A.....T..SD.....E.....	1890
MHCa	ALNLAKFRKTQQEELESEVIVSHF	1912
MHCb	.....Y..A.....TVQRS----	1910

Fig. 1-3. The full-length deduced amino acid sequences of MYHs from kuruma shrimp. Amino acid residues in MYHb (AB613206) identical to those in MYHa (AB613205) are indicated by dots and hyphens denote deletions introduced to maximize the alignment. Putative ATP-, actin-, essential light chain (ELC)- and regulatory light chain (RLC)-binding sites, as well as loops 1 and 2, are boxed. S1, S2 and LMM indicate myosin subfragment-1 heavy chain, myosin subfragment-2 and light meromyosin, respectively.

MYHa	MPGHVKKSTGPDPTPEYLFISREQRMKDQTKPYDPKKSFWCPDPNEGFECELGAGKDKHVTVKLPSETKDFKKEQVGVNPPKYEK	90
MYHb	.....V.....F.....A.....L.....C.V..DK...A.GLI.....L.S.Q.K...V.....DL.V.....	90
MYHa	.....ATP binding site I.....ATP binding site II.....	
MYHa	CEDVSNLTFNDPVSFVYVLKSRQAKLYTYSGLFCIAVNPKRYPIYTNRAVKIYIGKRRNEVPPHLFAICDGAAYQNMNQERQNCMLI	180
MYHb	.....A.L.N.....VI.....T.....Q.....S.....MD.L.SQ.....	180
MYHa	.....Loop 1.....ATP binding site III.....	
MYHa	TGESGAGKTENTKKVLSYFANVGAS-EKKEGESKRNLEDQIIQTNPLEAYGNAKTTNRDSSRFKGFIRVHFAPNGKLSGADIEVYLLE	269
MYHb	.....TSK.....D.N.....V.....E.....I.....	270
MYHa	KARVISQSPAERGYYHIFYQLMCDQIDYVKKMCLLSDDIYDYYEAGQKVTVPSSIDDKEDMQFTHDAFDVLNFSHEERDDCYKVTSVMHH	359
MYHb	.....V.A.....M.S.V..L..L.H.....R.C.....E..N..TI..TN.....S..I..A...	360
MYHa	GNMKFKQRGREEQAEADGTEAGEIVAKLLGVDAEELYNFCPKIKVGAEFVTKGMNVQVNYNIGAMAKGLFSRVFSWLKKCNMTLET	449
MYHb	.....P..D..DVI.D.M..ET.....K.....Q.R.....Y.SVS.....D.L.K.I.....Q.....	450
MYHa	GQTRAMFIGVLDIAGFEIFDFNGFEQICINFNCNEKLQFFNHHMFVLEQEEYAKEGIVWQFVDFGMDLQACIELEFKMGLLSILEEESM	539
MYHb	..MK.....KA..D.V.....L..A.....	540
MYHa	.....actin binding site III.....	
MYHa	FPKATDKTFEELNNHLLGKSRCFIKPKPPKAGQPENHFAIVHYAGTVSYNLTGWLEKNKDLPLNDTVVDQLKASNALTVEIFADHPGQS	629
MYHb	.....S.....KA.....P.....S.G.....T..S.....SKLP.V..L.....	630
MYHa	.....Loop 2.....	
MYHa	GDGGGKGGKGGKQQTGFKTIVSSGYKQLANIMKTLNATHPHFIRCIVPNEFFKKPGEVDSGLIMHQLTCNGVLEGHPLFARRASPTGMPYKD	719
MYHb	APAEA..GKK.KTG.....RE..NS..T..HS.....V.....T.S..V.EA.....-IRICQKGF.NR.Q.P.	719
MYHa	FKLRYNIIAAKEMLEAKDDKAATACFERAGLNPELYRTGNTVFFRAGVLGTLEEVRDDRMKLVSWLQAWVRGWASRRKYYSKMQKQRT	809
MYHb	..H..K...DV.ATE.....EMT.QK...DK...C.K.....M..L...LA.IIT.M.S.I..LIG..E.TRL.E..V	809
MYHa	.....RLC binding site.....S1 ← → S2.....	
MYHa	ALIVMDRNIRKFKIMRSWLWYELWIMLKPRKATRGEELEKLEATAVKAEEEFKGVVVKVRELEAQNALLMQERNELLAAVDSTKGGMS	899
MYHb	S.V.L.....ME.SN.S.FIF.QKV..LINQH.I.D.IN..KDR.E..VADLDRETR.K...DS.LS.AE.L.T.KETLE...NV.	899
MYHa	EYLDKQAKLLAQAELEGQLNDTLERLRKEEDARNQIANGKKKCEQEVNTLKKLELEELSVQKGEQDKQTKDQQLTNLEEISHQEELI	989
MYHb	KFIEE...IS.A..D..A..S.ASA..Q...ES.TEMFQL.R.A..D.NAMR.D..DF..N...TN...A..H.IR.I.D..A..D.I.	989
MYHa	TKVNKEKKHLQECNQKTAEDLQGVEDKCNLNKVKTKLESSLDELEDTLREKKLRAEVEKSKRKVEGDLRLTQEAVDLERNLKELEVA	1079
MYHb	N.....L..M.....A..E.ASH...I.S...QT.....SSVG.....I.R.....KM...T.A.I..QH.D..QT	1079
MYHa	AERKEKEISAITAKIEDEQALVYRDQKQVKELQARLEELEEDVEHERQARGKAEKAKNVLSRELSELGERLDEAGGATAQIEINKKREG	1169
MYHb	IQ..D...GNLAN..L.E..GV.SKV.KTI..M...I...TEA.....A...G.GNM...ND.N.....G..M.L...A	1169
MYHa	ELGKVRDRDIEESNLQHEAALATLRKKHNDVVAEMSEQVDYLNKMKARTEKDKAMKRDADAKASMDSLARDKTTAEKTTKQLQHGYGEL	1259
MYHb	..A.L...L..A.I...S...N.....A...T..I.H.....K...E..M..YQ..E..SA.....AL...AN.TI.Q.IN.V	1259
MYHa	CAKLDEVNRTLSDFDATKKKLACENTDLVRQLEEAENQVSQLSRVKLSLTNQDDTRKMCDEESRGRATLLGKFRNLHEDIQALRDQLDE	1349
MYHb	NV...A...R...Q...SV..G..L...D..IN..NNL.V...T..E..K..V.D...E.SV.....LDG..E...	1349
MYHa	.....S2 ← → LMM.....	
MYHa	ESDAKGDVLRMLSAANAALMWRSKYESEGVAREAELEAARMKLAARLEEAEMQIESLNVRLHLEKTKMRAAELDDLHASAERAQALA	1439
MYHb	.CE..A.AN.Q..K.H...Q.....I.....L.....L...Q...K.MQ...A.G.IIS.I.EMQM...GM.	1439
MYHa	SAAEKKQKNFDKIISEWKLKVDLAAEVDASQKECRNYSTEHFRLKAANDENIEQLDSIRRENKNSDEIRDLMDQLGEGGRAYHEVQKN	1529
MYHb	I...RR...D..RVVN...I...Q..T.L.....Q.....I..VYE..L.H...V...G.AE..K...E.IS...SL..IE..	1529
MYHa	ARRLELEKEELQAAEEAEAELEQENKVLRTQLELSQVRQEIDRRVQEEKEEFDNTRKCHQRAIDSMQASLEVAEKGAELRMKKKLE	1619
MYHb	.K.F.I.....G.....K.I.....A.....E.....A...S.....	1619
MYHa	SDINELEIALDHANKANSDLHKHLRRVHDEIKDAETRVKEEQRVASEFREQYGAERRFNALHGELEESRTLLEQSDRGRRAETELNDA	1709
MYHb	..G.....A.IQ.QVKKQA.M..MQA..E...L..Y..CSAS..KA..VN.....Q..S..A..	1709
MYHa	REQINNFTNTQNTALTASKRKLEGEMSTLQADLEEMLINEAKNSEEKAKKAMLDAAARLADELRSQEHAQSQEKMRKALEITAKDLQTRLEE	1799
MYHb	N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H.E.DD.....D.....V.....A.....T.....G.DLSV...A..D.	1799
MYHa	SESAAAMKAGKKAVSNMEARIRDLESALDDETRHRHADSQKNLRKCERRIKELAFQTEEDKKNHDMQDLVDKLLQKIKTYKQKIEEAEIEA	1889
MYHb	F..S.H.T...LAKL...E..NQ...S...A.....S..S.....E.....	1889
MYHa	ALNLAKFRKTQOELESESTVTVVHY	1914
MYHb	..D...Y..A.....TVQRS-----	1909

Fig. 1-4. The full-length deduced amino acid sequences of MYHs from black tiger shrimp. Amino acid residues in MYHb identical to those in MYHa are indicated by dots and hyphens denote deletions introduced to maximize the alignment. Putative ATP-, actin-, ELC- and RLC-binding sites, as well as loops 1 and 2, are boxed. See the legend of Fig. 1-3 for other abbreviations.

MYHa	MPGHVKKSTGPDPTTEYLFIISREQMKDQTKPYDPKKSYPWCPDNEGFVECEFFQAPKGDKLVTVKLPSETKDFKKEQVGVQVNPVKYEK	90
MYHb	.....V.....F.....A.....R.....L.....C.....V.....DK.....A.....GLI.....EA.....S.....Q.....K.....V.....DL.....V.....	90
MYHa	ATP binding site I CEDVSNLTFLNDPSVFYVVKSRQAKLITYTYSGLFCIAVNPYKRYPIYTNRVAKIYIGKRRNEVPPLHFAICDGAAYQNMNQERQNSMLI	180
MYHb	.....A.....L.....N.....VI.....T.....Q.....MD.....L.....SQ.....	180
MYHa	Loop 1 TGESGAGKTENTTKVLSYFANVGASEKK-EGESKONLEDQIIQTNPLEAYGNAKTTRNDNSSRFKGFIRVHFAPNGKLSGADIEVYLL	269
MYHb	.....TT.....K.....D.....K.....V.....P.....I.....	270
MYHa	KARVISQSPAERGYHIFYQLMCDQIDYMKKICLSDDIYDYHYEAQGVTVPSIDDKEDMQFTHDAFDILNFSHEERDDCYKVTASVMHH	359
MYHb	.....V.....A.....M.....S.....V.....L.....L.....H.....R.....C.....E.....N.....T.....TN.....S.....A.....	360
MYHa	actin binding site I GNMKFKQGRGEEQAEADGTEAGEIVAKLLGVDAEELYNFCKPKIKVGAEFVTKGMNDQVYNVVGAMAKGLFSRVFSWLVKRCNMLET	449
MYHb	.....P.....D.....D.....TIM.....ES.....Q.....R.....Y.....SIS.....D.....L.....K.....I.....K.....Q.....	450
MYHa	actin binding site II GQTRAMFIVGLDIAGFEIFDFNGFEQICINFNCNEKLQOFFNHHMFVLEQEEYAKGIVWQFVDFGMDLQACIELFEKMGLLSLTEESM	539
MYHb	.....MK.....KA.....D.....V.....L.....A.....	540
MYHa	actin binding site III FPKATDKTFEELNNNHGKSRCFIKPKPPKAGQPENHFAIVHYAGTVSYNLTGWLEKNKDPLNDTVVDQLKASNALTVEIFADHPCQS	629
MYHb	.....S.....KA.....P.....A.....G.....T.....S.....SKMD.....V.....L.....	630
MYHa	Loop 2 GDGGGKGKGGKQQTGFKTVSSGYKDQLANLMTLNATHPHFIRCIVPNEFKKPGEVDAGLIMHQLTCNGVLEGIRICQKGFNRPMPYPDF	719
MYHb	APAEA.....GKK.....KTG.....RE.....NS.....T.....HS.....V.....T.....S.....V.....E.....Q.....	720
MYHa	ELC binding site KQRYNIIAAKEMLEAKDDKKAATACFERAGLDPELYRTGNTKVFFRAGVLGTLEEIRDDRIMKLVSWLQAWIRGWASRKYYSKMOKQRTA	809
MYHb	.....H.....K.....DV.....ATE.....EMT.....QKS.....K.....C.....K.....M.....L.....E.....LA.....IIT.....M.....S.....LIG.....E.....GRL.....E.....VS.....	810
MYHa	RLC binding site LIVMORNIKKFKIMRSWLWYELWIKLPRLKATRGEELEKLEATAVKAEEEFKVLKVREELEAQNALLAEKNELLAAVESSKGGVSE	899
MYHb	.....V.....L.....YMD.....SN.....S.....FIF.....Q.....V.....LINQF.....I.....D.....IN.....KDR.....E.....VADLDRECTR.....K.....ES.....VS.....AE.....L.....T.....KETL.....T.....N.....K.....	900
MYHa	YLDKQAKLLAQKAELEGQLNETLERLRKEEDARNQISNGKKKCEQEVSNLKKLEEELELSVQGEQDKQTKDQQLTNLEEISHQEELIS	989
MYHb	FIEE.....IS.....A.....D.....A.....SDASA.....Q.....EN.....TEMFQL.....R.....A.....D.....NAMR.....D.....DF.....N.....KTN.....A.....H.....IR.....I.....D.....D.....I.....N.....	990
MYHa	KVNKEKKHLQECNQKTAEDLQGIEDKCNNLNKVKTKLESGLDELEDTLEREKKLRAEVEKSKRKVEGDLRLTQEAUSDLEARNLKELEVAA	1079
MYHb	.....L.....M.....AV.....E.....ASH.....I.....A.....QT.....GSVG.....I.....R.....KM.....T.....A.....I.....QH.....D.....QTI.....	1080
MYHa	ERKEKEIAAMTAKIDDEQALVYRDQRIKELQARLEEEEEEVEHERQARSKAEKAKNLLSRELSSELGERLDEAGGATAQIEINKKREGE	1169
MYHb	Q.....D.....GNLAN.....LEE.....VV.....SKV.....KT.....M.....I.....T.....A.....A.....G.....GNM.....ND.....N.....G.....V.....L.....A.....	1170
MYHa	LAKVRRDIEESNLQHEAALATLRKKHNDAVAEMSEQVDYLNKMKARTEKDKEAMKRDADAKASMDTLARDKTTAEKTKQLQHQYGEIC	1259
MYHb	.....G.....L.....L.....A.....I.....S.....N.....T.....I.....H.....T.....K.....E.....M.....YQ.....E.....SA.....S.....AL.....AN.....TI.....Q.....IN.....VN.....	1260
MYHa	AKLDEVNRTLSDFDATKKKLACENADIVRQLEEAENQVSQLSRVKLSLTNQLDDTRKMCDEESRGRATLLGKFRNLEHDIAQLRDQDDEE	1349
MYHb	V.....A.....N.....Q.....SV.....G.....L.....D.....IN.....NNL.....T.....E.....K.....V.....D.....E.....GV.....LDG.....E.....	1350
MYHa	S2 SDAKGDVLRMLSKANAELMWSKYSEGVARAEELEAARMKLARLEEAEMQIESLNVNHLHLEKTKMRAAELDDLHASAERAQALAS	1439
MYHb	CE.....A.....AN.....Q.....Y.....Q.....I.....L.....L.....Q.....K.....MQ.....A.....G.....IIS.....I.....EMQM.....V.....G.....N.....	1440
MYHa	AAEKKQKNFDKIISEWKLKVDDLAAEVDASQKECRNYSYTHFRKAANDENIEQLDSIRRENKNLSDEIRDLMQDQGEGRAYHEVQKNA	1529
MYHb	.....RR.....D.....RVVN.....I.....Q.....T.....L.....Q.....I.....VYE.....L.....H.....V.....G.....AE.....K.....E.....IS.....SL.....IE.....	1530
MYHa	RRLELEKEELQAALEEAALAEQEEENKVLRTQLELSQIRQEIDRRLOKEEEFNDNRKCHQRAIDSMQASLEVEAKGAEALRIKKKLES	1619
MYHb	K.....F.....I.....G.....V.....K.....I.....A.....E.....A.....S.....M.....	1620
MYHa	DINELEIALDHANKANSDLHKHLRKVHDEIKDAETRVKEEQRHASEFREQYGIARRFNALHGELEESRTLLEQSDRGRRAETELNDAR	1709
MYHb	.....G.....A.....IQ.....QVK.....AQA.....M.....MQA.....E.....L.....Y.....CSAS.....KA.....VN.....Q.....S.....A.....N.....	1710
MYHa	EQINNFTNQTALTASKRKLEGEMSTLQADLEMLNEARNSEEKAKKAMLDARLADELRSQEHAQAQEKMRKALEITVKDLQTRLDES	1799
MYHb	.....SLSHL.....A.....HGS.....SMA.....IQ.....H.....E.....DD.....K.....D.....V.....A.....T.....G.....DLS.....A.....F.....	1800
MYHa	ESAAMKAGKAVSNMEARIRDLESALDEEVRRHADSQKNLRKCERRIKELAFQTEEDKKNHDMQDLVDKLQKIKTYKRIEEAEEIAA	1889
MYHb	.....S.....H.....T.....LAKL.....E.....NQ.....D.....S.....A.....S.....S.....E.....	1890
MYHa	LNLAKEFRKTQEELESEGVTIIHY	1913
MYHb	.....Y.....A.....TVQRS-----	1909

Fig. 1-5. The full-length deduced amino acid sequences of MYHs from Pacific white shrimp. Amino acid residues in MYHb identical to those in MYHa are indicated by dots and hyphens denote deletions introduced to maximize the alignment. Putative ATP-, actin-, ELC- and RLC-binding sites, as well as loops 1 and 2, are boxed. See the legend of Fig. 1-3 for other abbreviations.

A		Loop 1	Charge
	Tiger MYHa	-EKKEGESK	0
	Tiger MYHb	SK...D.N.	+1
	White MYHa	-.....	0
	White MYHb	TK...D.K.	+2
	Kuruma MYHa	-.....	0
	Kuruma MYHb	SK...D.K.	+2
	G.antarcticus	TK.RGE...	+2
	I.resecata	TK.RGE...	+2
	E.verrucosus	TK..GE.A.	+2
	H.gammarus fast	TK..GEVA.	+3
	H.gammarus slow	TK.RGE.A.	+2

B		Loop 2	Charge
	Tiger MYHa	PGQSGDGGGKGKGKGGK-QQTG-	+2
	Tiger MYHb	...APAEA..GKK.--K..G	+4
	White MYHa	.....-....-	+2
	White MYHb	...APAEA..GKK.--K..G	+4
	Kuruma MYHa	.....-....-	+2
	Kuruma MYHb	...APAEA..GKK.--K..G	+4
	G.antarcticus	A...G.DAG.GK.RGKKS.G	+3
	I.resecata	....G-DAG.GK.RGKKS.G	+3
	E.verrucosus	....G.DAG....RGKKS.G	+3
	H.gammarus fast	....PVES..GR.A--KS.S	+2
	H.gammarus slow	....AVADT..GR.Q--KS.S	+2

Fig. 1-6. The comparison of deduced amino acid sequences of MYH loops 1 (A) and 2 (B). MYHs cited are from kuruma, black tiger and Pacific white shrimps as well as isopods *Glyptonotus antarcticus* and *Idotea resecata*, amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* and European lobster *Homarus gammarus* (Holmes *et al.*, 2002). Right columns indicate the net charges of respective loops.

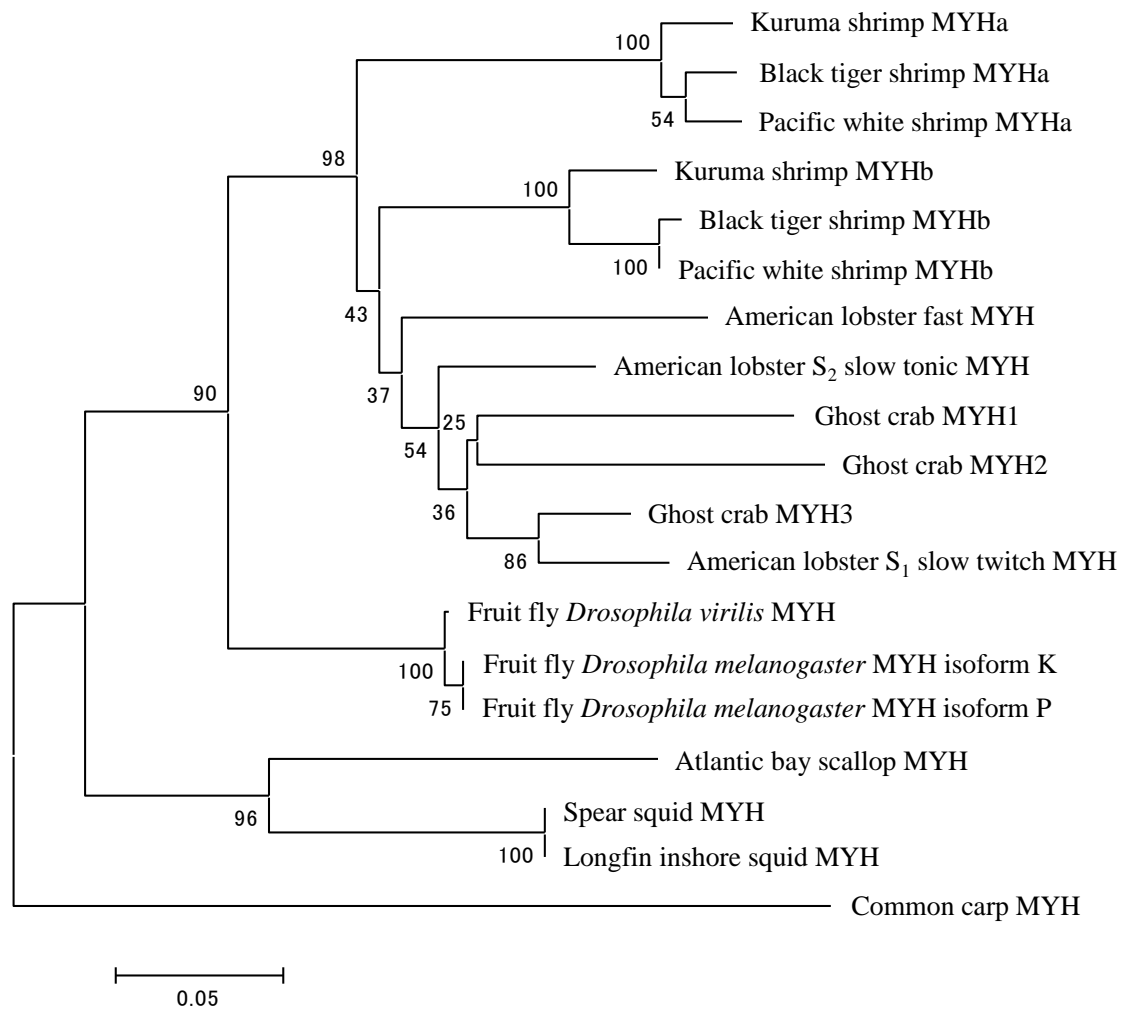


Fig. 1-7. The neighbor-joining tree of MYHs from three shrimps and other invertebrates. MYHs cited are American lobster *Homarus americanus* (fast, U03091; S<sub>1</sub> slow twitch, AY232598; S<sub>2</sub> slow tonic, AY521626), ghost crab *Ocypode quadrata* (MYH1, DQ534440; MYH2, DQ534441; MYH3, EU676338), flies *Drosophila melanogaster* (isoform K, NP724008; isoform P, NP001162992) and *D. virilis* (XM002051957), scallop *Argopecten irradians* (X55714), squids *Loligo pealei* (AAC24207) and *L. bleekeri* (ACD68201) and common carp *Cyprinus carpio* (D89990).

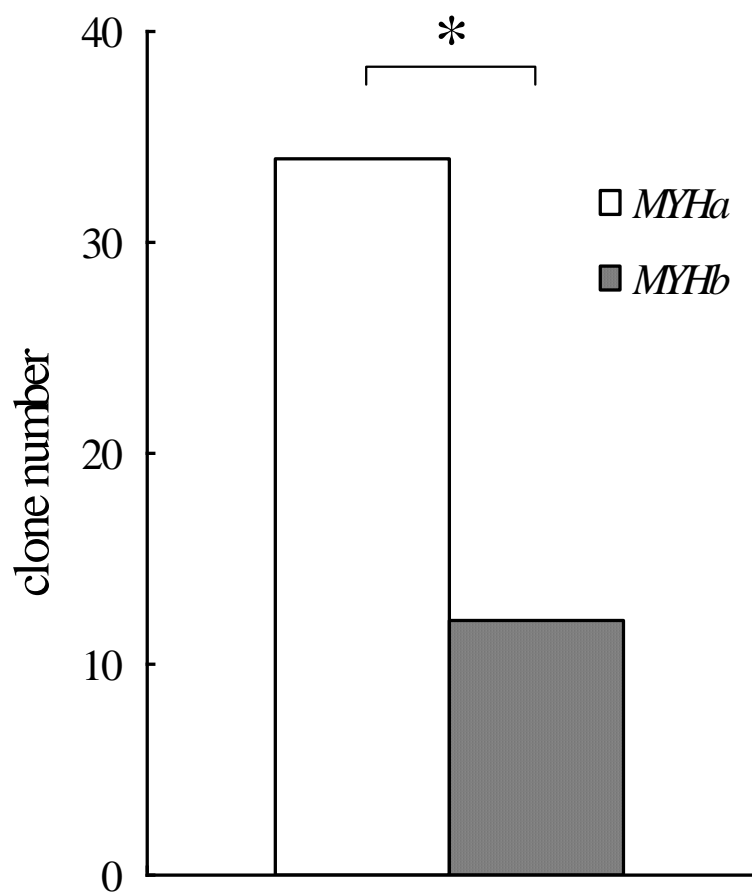
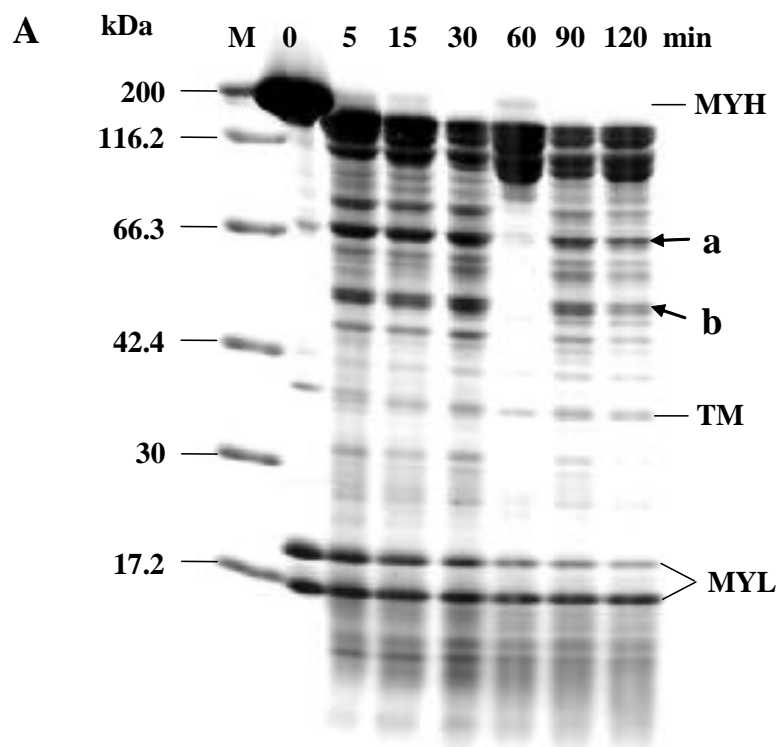


Fig. 2-1. The histogram based on the frequency of *MYH* clones obtained from clone library in kuruma shrimp. The clone numbers of *MYHa* and *MYHb* are 34 and 12, respectively. Significant difference in the clone numbers between *MYHa* and *MYHb* is indicated at the level of  $p < 0.05$  (\*).



**B**

band a (S2)	SLTNQLDDTRKMCDDDESKGA	20
MYHa	.....E..RAR	1325
MYHb	...T..E..K..V....RER	1327

**C**

band b (LMM)	STEHFRLKAVNDENLEQLDS	20
MYHa	.....A....I.....	1496
MYHb	.....I...YE....H...	1498

Fig. 2-2. SDS-PAGE patterns and N-terminal amino acid sequences of  $\alpha$ -chymotryptic digests of myosin purified from the abdominal muscle of kuruma shrimp. SDS-PAGE was performed using a 7.5-20% gradient polyacrylamide gel and numerals above lines indicate digestion time periods along with molecular weight markers (lane M) (A). Bands a and b were subjected to N-terminal amino sequencing. N-terminal amino acid sequences of band a (S2) (B) and band b (LMM) (C) obtained from myosin isolated from the abdominal muscle of kuruma shrimp were subjected to alignment with corresponding regions of MYHa and MYHb determined by cDNA cloning. Numbers in the right margin indicate amino acid residues from the N terminus of chymotryptic digests (S2 and LMM) and those deduced from cDNAs (MYHa and MYHb). Abbreviations used are: MYH, myosin heavy chain; TM, tropomyosin; MYL, myosin light chains; S2, subfragment-2; LMM, L-meromyosin.



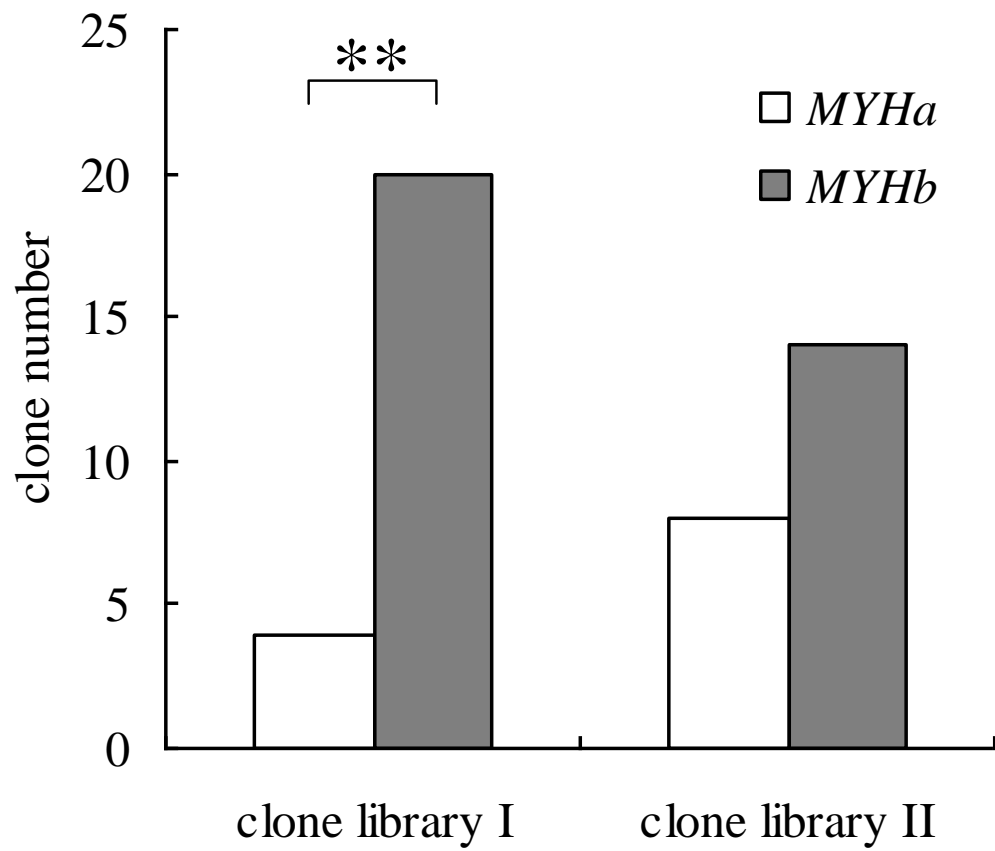


Fig. 2-3. The histogram based on the frequency of *MYH* clones obtained from clone library in black tiger shrimp. The clone numbers of *MYHa* and *MYHb* are 4 and 20 in clone library I, and 8 and 14 in clone library II, respectively. Significant difference in the clone numbers between *MYHa* and *MYHb* is indicated at the level of  $p < 0.01$  (\*\*).

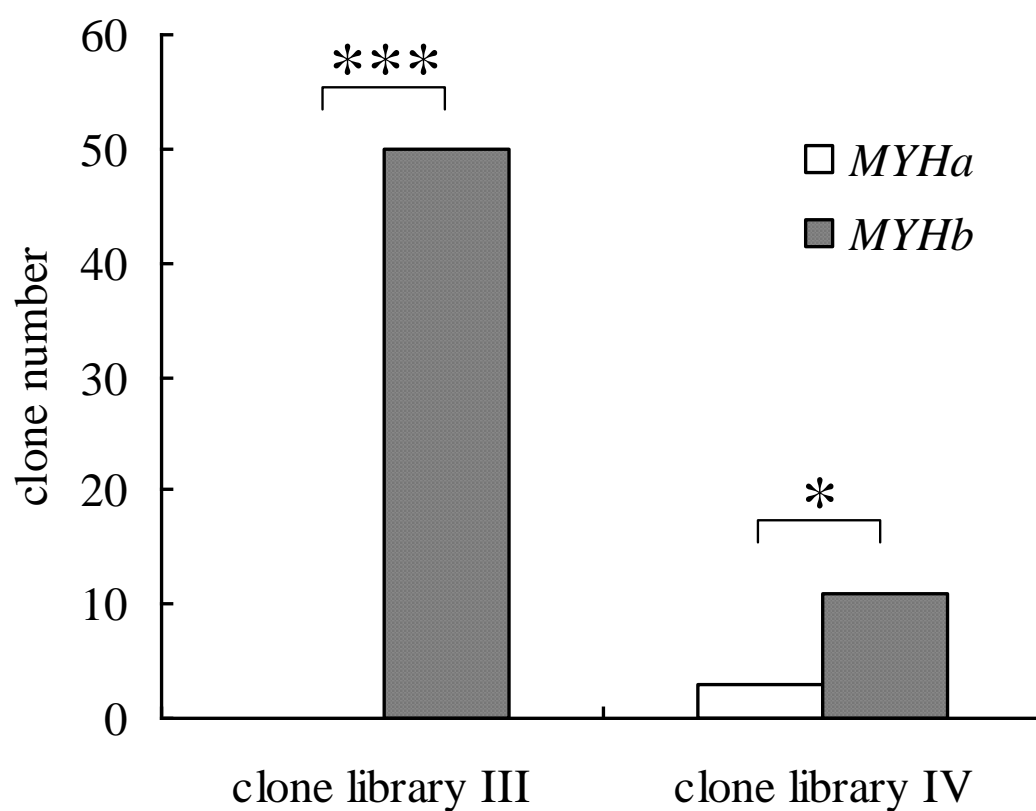


Fig. 2-4. The histogram based on the frequency of *MYH* clones obtained from clone library in Pacific white shrimp. The clone numbers of *MYHa* and *MYHb* are 0 and 50 in clone library III, and 3 and 11 in clone library IV, respectively. Significant differences in the clone numbers between *MYHa* and *MYHb* are indicated at the level of  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*).

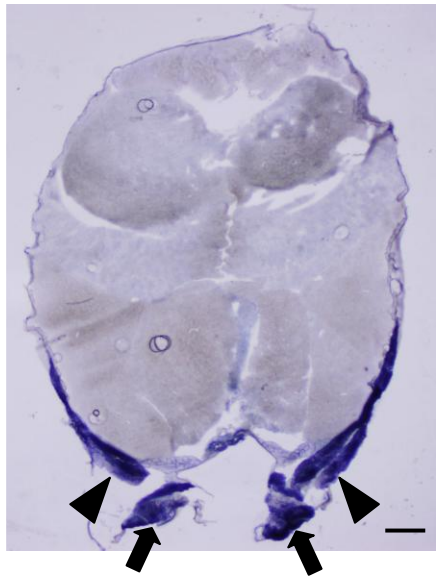


Fig. 3-1. Histochemical analysis of NADH-diaphorase activity in the abdominal muscle of kuruma shrimp. Slow muscles are located at pleopods (arrows) and its neighboring areas (arrowheads) as revealed by staining. The scale bar indicates 1.0 mm.

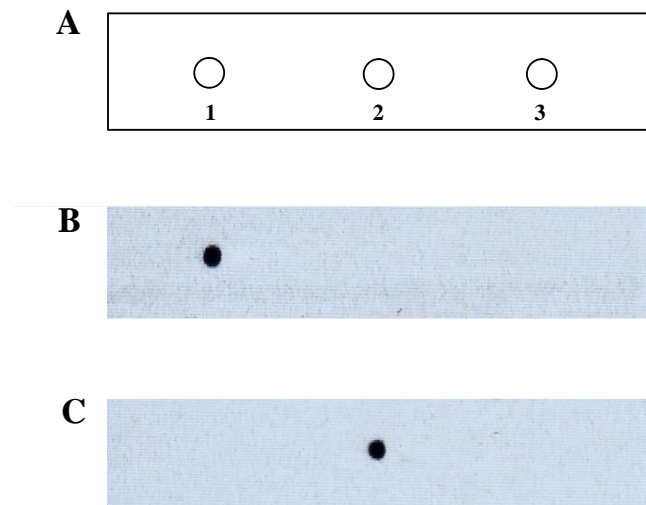


Fig. 3-2. Dot blot analysis for probes constructed from the 3'-end sequences of kuruma shrimp *MYHa* and *MYHb*. Plasmids containing the probes were spotted on nylon membranes at locations 1 and 2 together with that containing no *MYH* at location 3 (negative control) (A) and hybridized with probes specific to *MYHa* (B) and *MYHb* (C).

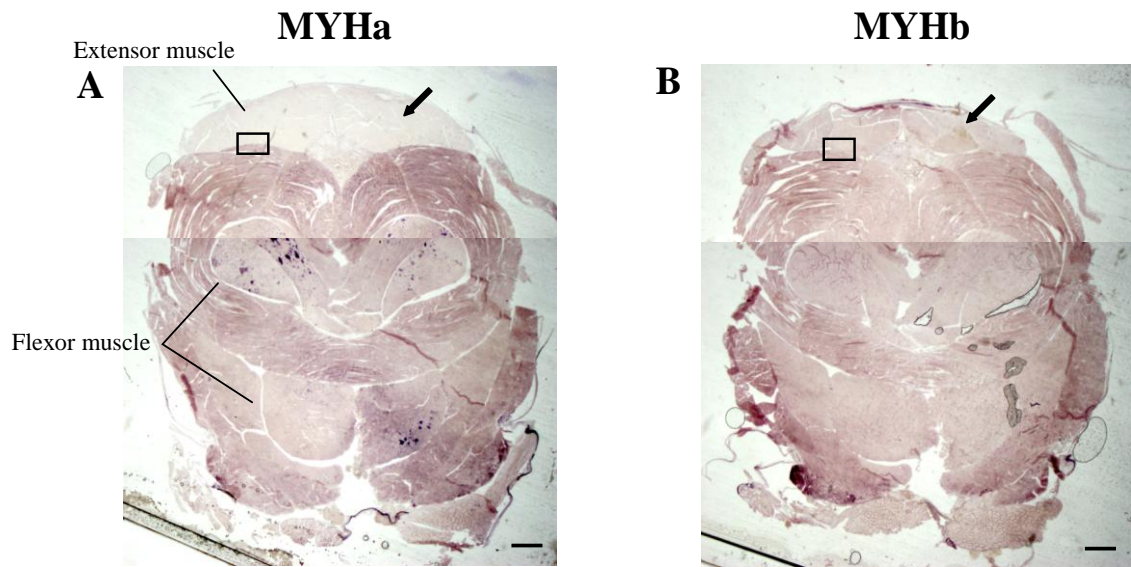


Fig. 3-3. Tissue distributions of *MYHa* (A) and *MYHb* (B) transcripts from kuruma shrimp as revealed by *in situ* hybridization. *MYHa* transcripts are localized in most part of the abdominal muscle except the extensor muscle (an arrow) (A). *MYHb* transcripts are localized at the whole abdominal muscle. Scale bars indicate 1.0 mm.

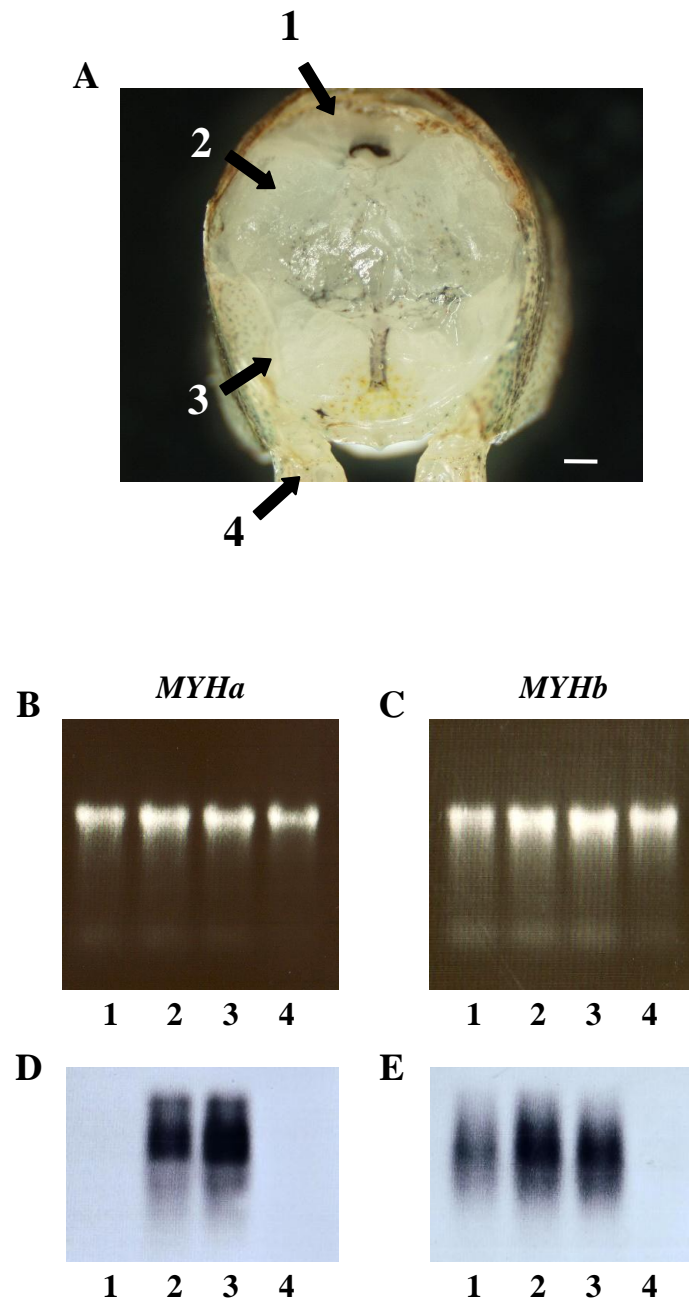


Fig. 3-4. Northern blot analysis for *MYHa* and *MYHb* transcripts of kuruma shrimp. Total RNAs were extracted from four distinct parts indicated by arrows 1-4 (A). Electrophoretic patterns are shown for total RNA (B, C) and Northern blots with probes specific to *MYHa* (D) and *MYHb* clones (E). No *MYHa* transcripts are detected in either extensor or pleopod muscle (D), whereas *MYHb* transcripts are observed in the whole abdominal muscle, but not in pleopod (E). Scale bar indicates 1.0 mm.

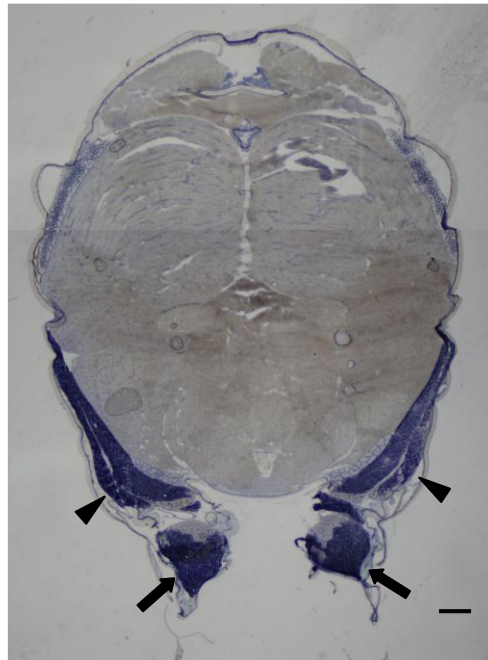


Fig. 3-5. Histochemical analysis of NADH-diaphorase activity in the abdominal muscle of black tiger shrimp. Slow muscles are located at pleopods (arrows) and its neighboring areas (arrowheads) as revealed by staining. The scale bar indicates 1.0 mm.

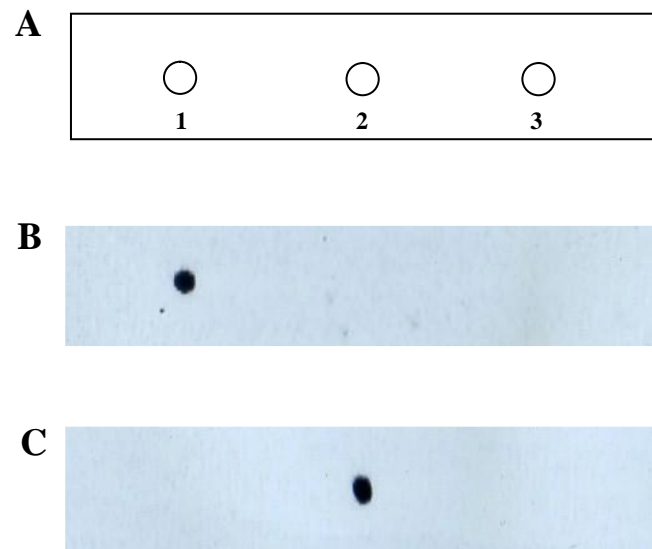


Fig. 3-6. Dot blot analysis for probes constructed from the 3'-end sequences of black tiger shrimp *MYHa* and *MYHb*. Plasmids containing the probes were spotted on nylon membranes at locations 1 and 2 together with that containing no *MYH* at location 3 (negative control) (A) and hybridized with probes specific to *MYHa* (B) and *MYHb* (C).



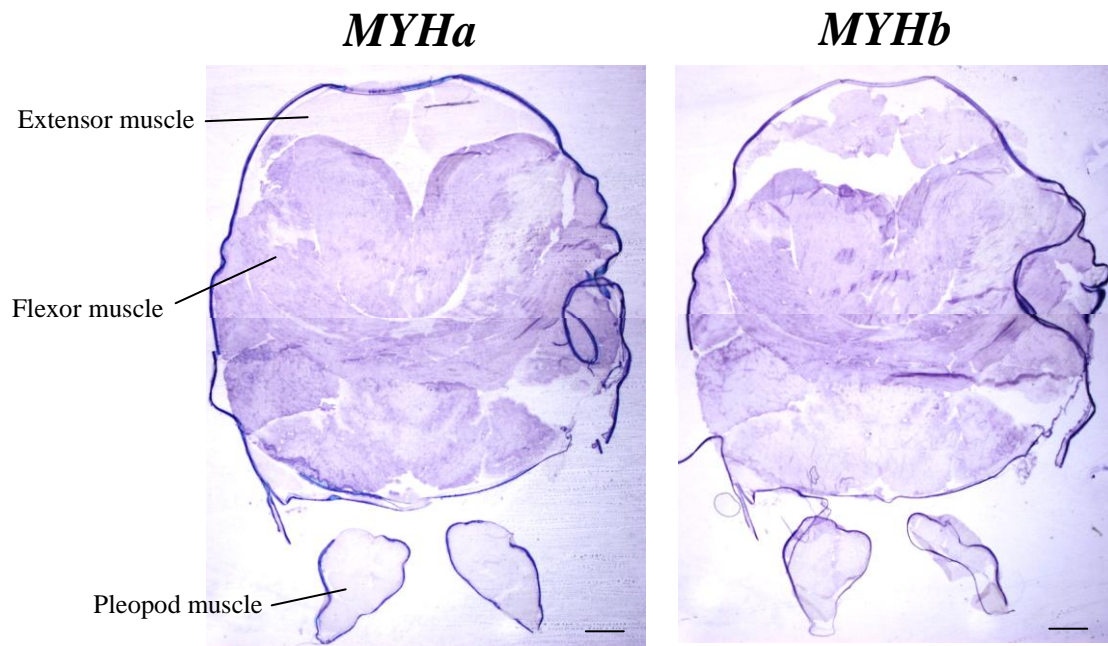


Fig. 3-7. Tissue distribution of *MYHa* and *MYHb* transcripts from black tiger shrimp. *In situ* hybridization was performed with probes specific to *MYHa* and *MYHb*. *MYHb* are localized at extensor and flexor muscles, whereas *MYHa* are localized at flexor muscle. Scale bars indicate 1.0 mm.

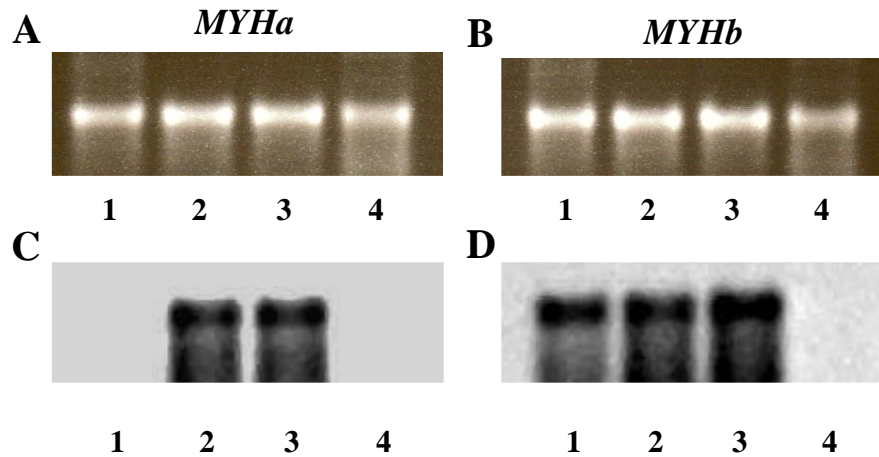


Fig. 3-8. Northern blot analysis for *MYHa* and *MYHb* of black tiger shrimp. Total RNAs were extracted from four distinct parts: 1, extensor muscle; 2, upper part of flexor muscle; 3, lower part of flexor muscle; 4, pleopod muscle. Electrophoretic patterns are shown for total RNA (A, B) and Northern blots with probes specific to *MYHa* (C) and *MYHb* (D). No *MYHa* transcripts are detected in either extensor or pleopod muscle, whereas *MYHb* transcripts are observed in extensor and flexor muscles, but not in pleopod.

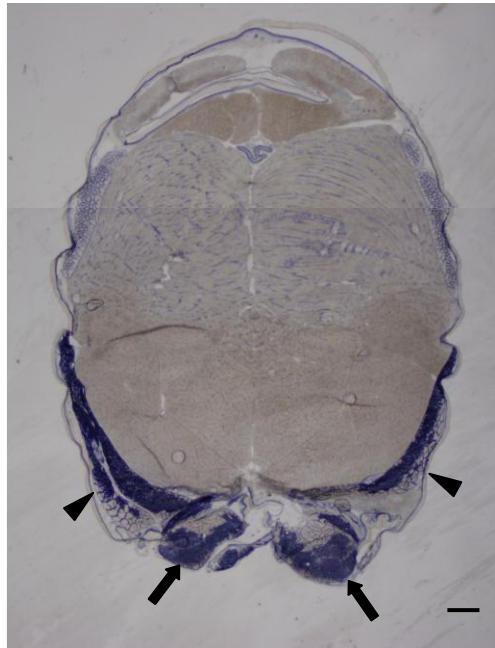


Fig. 3-9. Histochemical analysis of NADH-diaphorase activity in the abdominal muscle of Pacific white shrimp. Slow muscles are located at pleopods (arrows) and its neighboring areas (arrowheads) as revealed by staining. The scale bar indicate 1.0 mm.

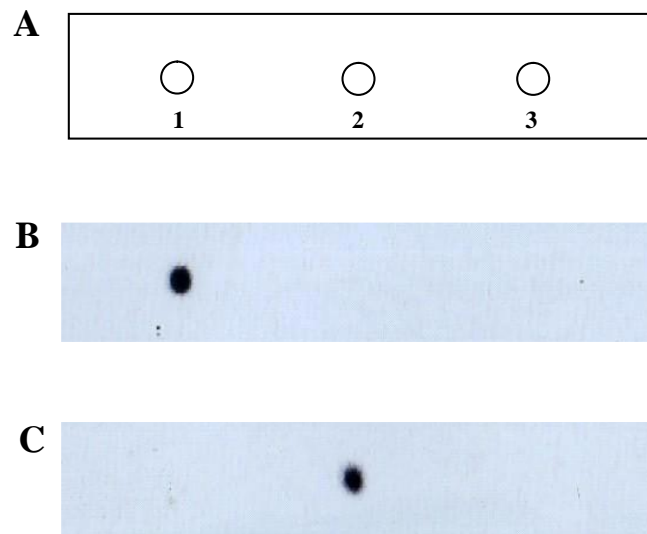


Fig. 3-10. Dot blot analysis for probes constructed from the 3'-end sequences of Pacific white shrimp *MYHa* and *MYHb*. Plasmids containing the probes were spotted on nylon membranes at locations 1 and 2 together with that containing no *MYH* at location 3 (negative control) (A) and hybridized with probes specific to *MYHa* (B) and *MYHb* (C).

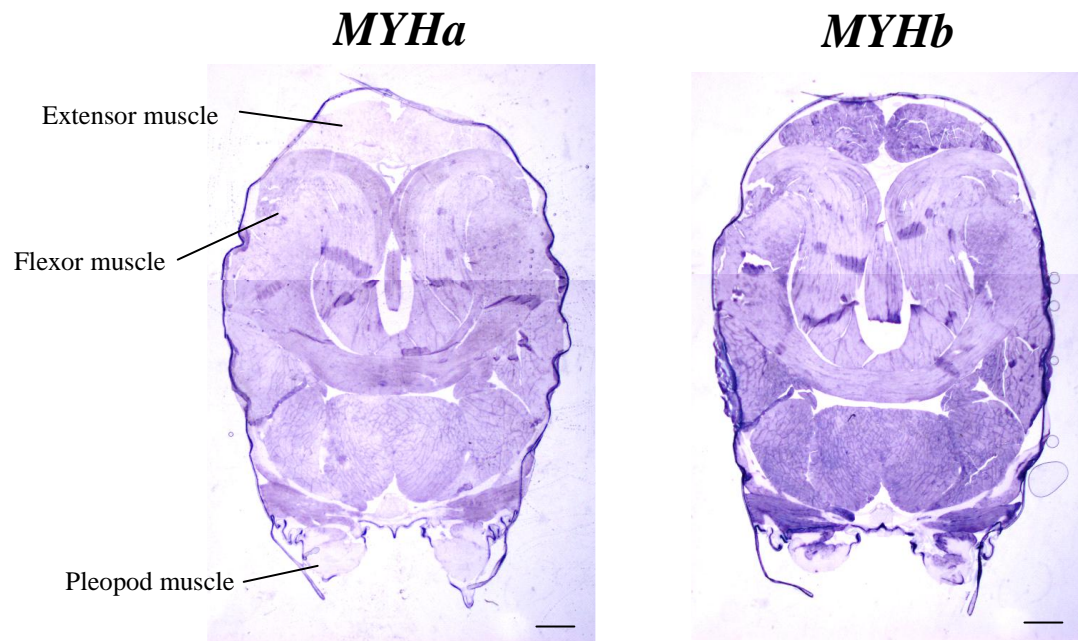


Fig. 3-11. Tissue distribution of *MYHa* and *MYHb* transcripts from Pacific white shrimp. *In situ* hybridization was performed with probes specific to *MYHa* and *MYHb*. *MYHb* are localized at extensor and flexor muscles, whereas *MYHa* are localized at flexor muscle. Scale bars indicate 1.0 mm.

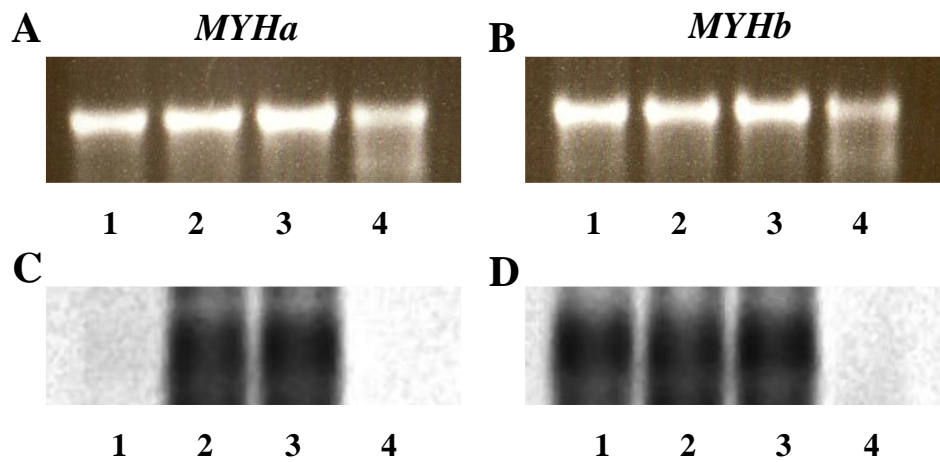


Fig. 3-12. Northern blot analysis for *MYHa* and *MYHb* of Pacific white shrimp. Total RNAs were extracted from four distinct parts: 1, extensor muscle; 2, upper part of flexor muscle; 3, lower part of flexor muscle; 4, pleopod muscle. Electrophoretic patterns are shown for total RNA (A, B) and Northern blots with probes specific to *MYHa* (C) and *MYHb* (D). No *MYHa* transcripts are detected in either extensor or pleopod muscle, whereas *MYHb* transcripts are observed in extensor and flexor muscles, but not in pleopod.

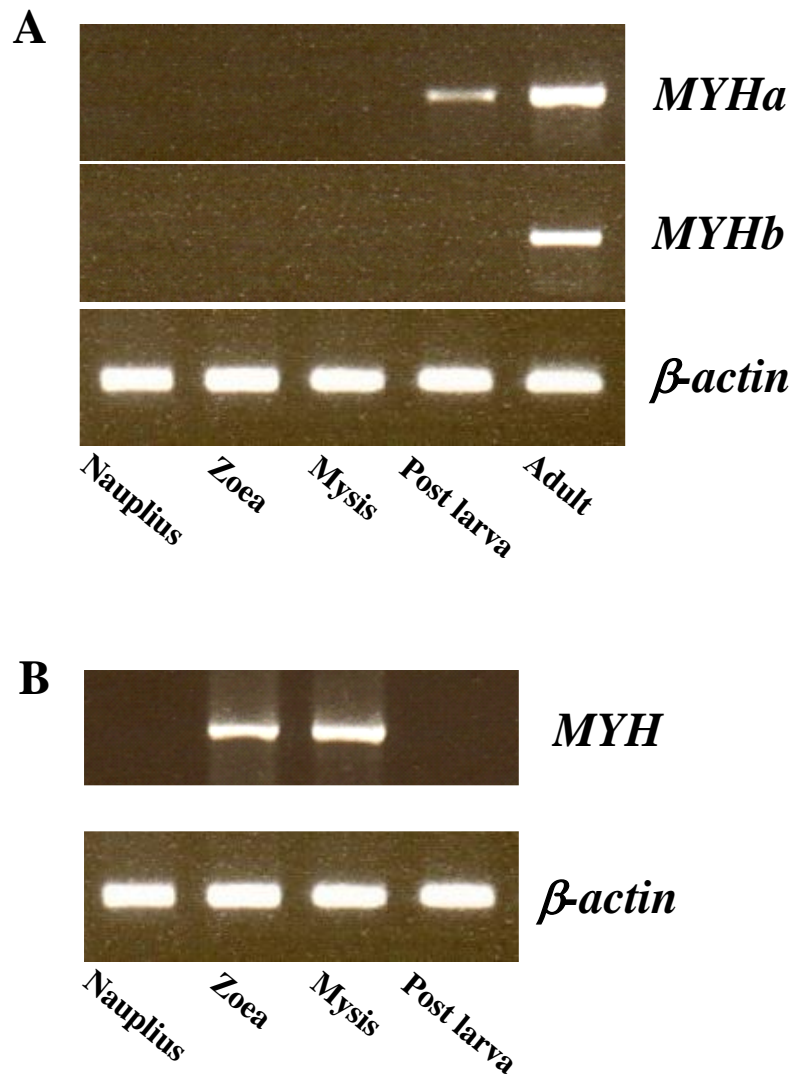


Fig. 4-1. The expression patterns of *MYHs* from black tiger shrimp in various growth stages. (A) *MYHa* and *MYHb* transcripts are expressed in an adult stage. The amplified product in post-larval stage did not correspond to *MYHa* transcripts. (B) *MYH* was amplified in zoea and mysis stages by using degenerate primer for PCR.

## A

MYHa	ADLEEMLNEAKNSEEKAKKAMLDAAARLADELRSQEHAQSQEKMRKALEITAKDLQTRLE	1798
MYHb	.E.DD.....D.....V.....A.....T.....G.DLSV...A..D	1793
MYHpa	.....R.....	60
MYHpb	.....R.....	60
MYHa	ESESAAMKAGKKAVSNMEARIRDLESALDDETRRHADSQKNLRKCERRIKELAFQTEEDK	1858
MYHb	.F..S.H.T...LAKL.....E..NQ....S.....A.....S..S....	1853
MYHpa	.....	120
MYHpb	...AS.....G...E.....A.....	120
MYHa	KNHDRMQDLVDKLOQKIKTYKRQIEEAEEIAALNLAKFRKTQOELEESSETVTVVHY	1914
MYHb	...E.....D...Y..A.....TVQRS	1909
MYHpa	.....I.---	172
MYHpb	.....I.---	172

## B

MYHa	ESDINELEIALDHANKANSIDLHKHLRRVHDEIKDAETRVKEEQRVASEFREQYGIAERRF	1678
MYHb	....G.....A.IQ.QVKKAQA.M..MQA..E....L...Y...CSAS..KA	1673
MYHz	....G.....G.IQ.QVKKAQA.M..MQA.LE....L...Y...CSAS..KA	60
MYHm	....G.....G.IQ.QVKKAQA.M..MQA.LE....L...Y...CSAS..KA	60
MYHa	NALHGELEESRTLLEQSDRGRRHAETELNDAREQINNFTNQTALTASKRKLEGEMSTLQ	1738
MYHb	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	1733
MYHz	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	120
MYHm	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	120
MYHa	ADLEEMLNEAKNSEEKAKKAMLDAAARLADELRSQEHAQSQEKMRKALEITAKDLQTRLE	1798
MYHb	.E.DD.....D.....V.....A.....T.....G.DLSV...A..D	1793
MYHz	.E.DD.....D.....V.....A..D...NS.....G..VSV...HA..D	180
MYHm	.E.DD.....D.....V.....A..D...NS....RG..VSV...HA..D	180
MYHa	ESESAAMKAGKKAVSNMEARIRDLESALDDETRRHADSQKNLRKCERRIKELAFQTEEDK	1858
MYHb	.F..S.H.T...LAKL.....E..NQ....S.....A.....S..S....	1853
MYHz	DF..SGH.T...LAKL.V...E..TQ....A.....A.....S..SD...	240
MYHm	DF..S.H.T...LAKL.V...E..TQ....A.....A.....S..SD...	240
MYHa	KNHDRMQDLVDKLOQKIKTYKRQIEEAEEIAALNLAKFRKTQOELEESSETVTVVHY	1914
MYHb	...E.....D...Y..A.....TVQRS	1909
MYHz	...E.....Y..A.....SK	288
MYHm	.....Y..A.....SVHRS	291

Fig. 4-2. The comparison of deduced amino acid sequences of MYHs from black tiger shrimp. (A) The partial amino acid sequences of two types of MYH isoforms (MYHpa and MYHpb) obtained from post-larva stage. (B) The C terminal sequences of MYHs obtained from zoea (MYHz) and mysis (MYHm) stages.



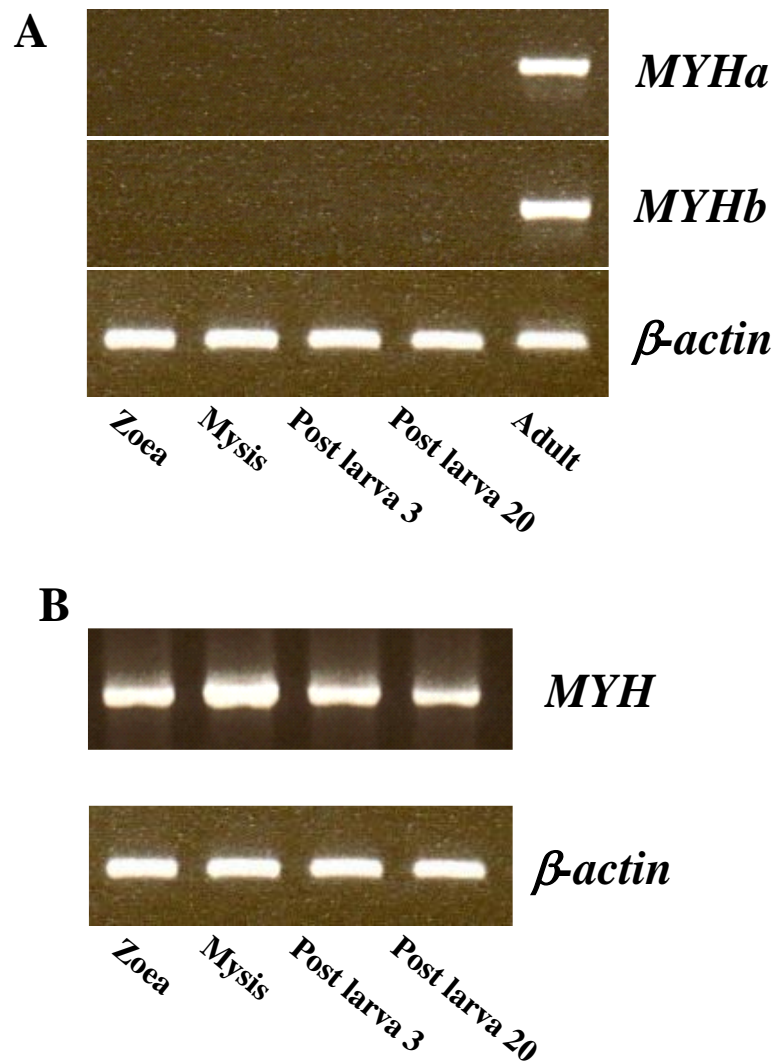


Fig. 4-3. The expression patterns of *MYHs* from Pacific white shrimp in various growth stages. (A) *MYHa* and *MYHb* transcripts are expressed in an adult stage. (B) *MYH* was amplified in zoea, mysis and post-larval stages by using degenerate primer for PCR. Post larva 3, 3 days after metamorphosis into post larva; Post larva 20, 20 days after metamorphosis into post larva.

MYHa	ESDINELEIALDHANKANSDLHKHLRKVHDEIKDAETRVKEEQRHASEFREQYGIAERRF	1677
MYHb	...G.....A.IQ.QVK.AQA.M..MQA..E....L...Y...CSAS..KA	1678
MYHz	...G.....G.IQ.QVK.AQA.M..MQS.LE....L...Y...CSAS..KA	60
MYHm	...G.....G.IQ.QVK.AQA.M..MQS.LE....L...Y...CSAS..KA	60
MYHp3	.A..G.....A.IQ.QVK.AQA.M..MQA..E....L...Y...CSAS..KA	60
MYHp20	...G.....G.IQ.QVK.AQA.M..MQS.LE....L...Y...CSAS..KA	60
MYHa	NALHGELEESRTLLEQSDRGRRHAETELNDAREQINNFTNQNTALTASKRKLEGEMSTLQ	1737
MYHb	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	1738
MYHz	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	120
MYHm	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	120
MYHp3	..VN.....Q..S..S..N.TLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	120
MYHp20	..VN.....Q..S..A..N.SLSHL.A.HGS.SMA.....IQ..H	120
MYHa	ADLEEMLNEARNSEEKAKKAMLDAAARLADELRSQEHAQAQEKMRKALEITVKDLQTRLD	1797
MYHb	.E.DD....K..D....V.....A.....T.....G.DLS....A...	1798
MYHz	.E.DD....K..D....V.....A..D..NS....G..VS....S...	180
MYHm	.E.DD....K..D....V.....A..D..NS....G..VS....S...	180
MYHp3	.E.DD....K..D....V.....A..D..NS....S..VS....S...	180
MYHp20	.E.DD....K..D....V.....A..D..NS....G..VS....S...	180
MYHa	ESESAAMKAGKKAVSNMEARIRDLESALDEEVRRHADSQKNLRKCERRIKELAFQTEEDK	1857
MYHb	.F..S.H.T...LAKL....E..NQ..D.S....A.....S..S....	1858
MYHz	DF..S.H.T...LAKL....E..TQ..D.A....A.....S..SD...	240
MYHm	DF..S.H.T...LAKL....E..TQ..D.A....A.....S..SD...	240
MYHp3	DF..S.H.T...LAKL....E..TQ..D.A....A.....FS..SD...	240
MYHp20	DF..S.H.T...LAKL....E..TQ..D.A....A.....S..SD...	240
MYHa	KNHDRMQDLVDKLOQKIKTYKRQIEEAEIEAALNLAKFRKTQQELEEESEGVTHY	1913
MYHb	...E.....Y..A.....TVQRS	1909
MYHz	...E.....Y..A.....SVHRS	291
MYHm	...E.....Y..A.....SVHRS	291
MYHp3	..PE.....Y..A.....SVHRS	291
MYHp20	...E.....Y..A.....SVHRS	291

Fig. 4-4. The comparison of the C terminal sequences of MYHs obtained from various stages at zoea (MYHz), mysis (MYHm), post-larva 3 (MYHp3) and post-larva 20 (MYHp20) of Pacific white shrimp.

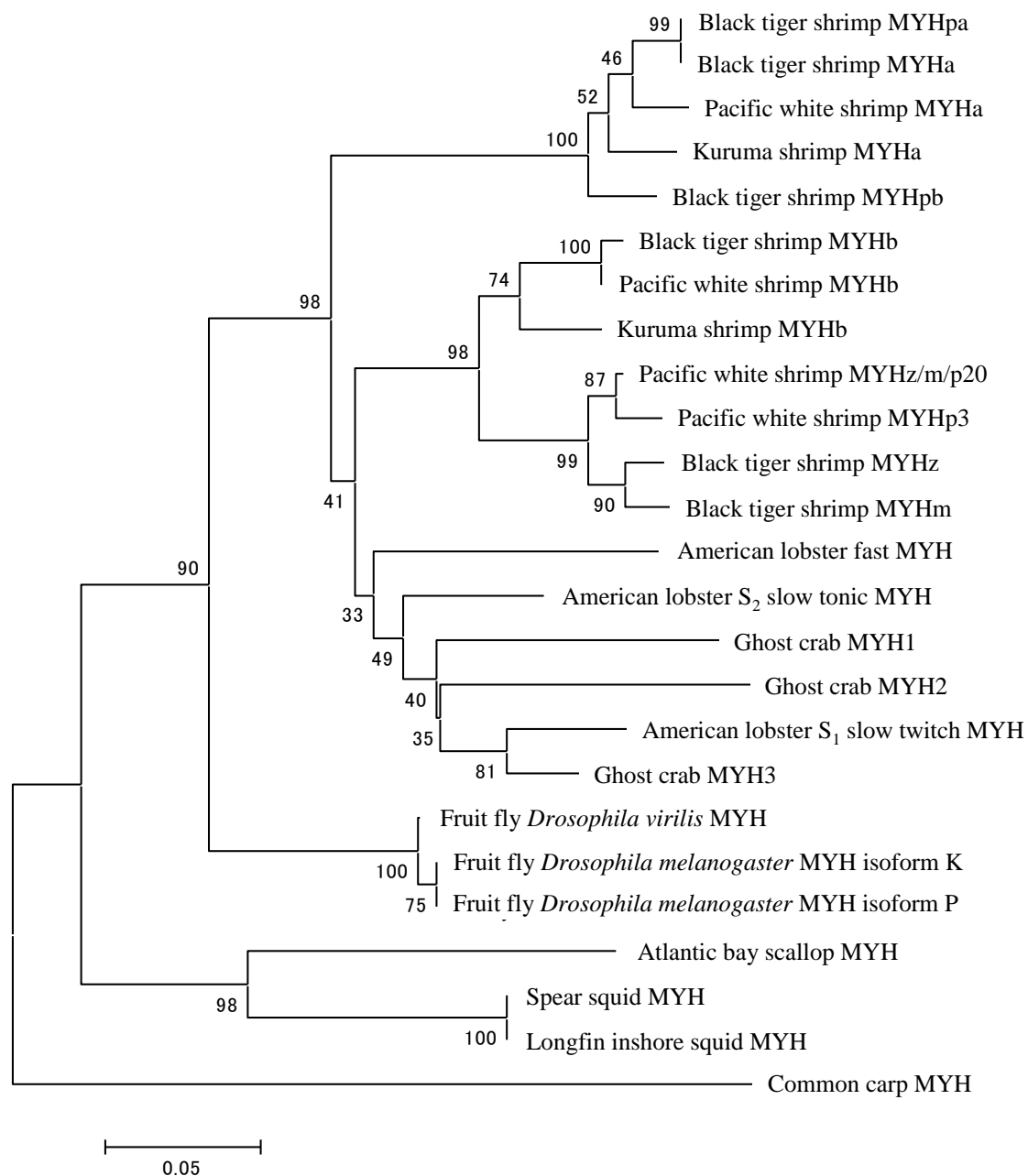


Fig. 4-5. The neighbor-joining tree of MYHs from adult three shrimps of kuruma, black tiger and Pacific white shrimps, larval shrimps of black tiger and Pacific white shrimps and other invertebrates. MYHs cited are American lobster *Homarus americanus* (fast, U03091; S<sub>1</sub> slow twitch, AY232598; S<sub>2</sub> slow tonic, AY521626), ghost crab *Ocypode quadrata* (MYH1, DQ534440; MYH2, DQ534441; MYH3, EU676338), flies *Drosophila melanogaster* (isoform K, NP724008; isoform P, NP001162992) and *D. virilis* (XM002051957), scallop *Argopecten irradians* (X55714), squids *Loligo pealei* (AAC24207) and *L. bleekeri* (ACD68201), and common carp *Cyprinus carpio* (D89990).