

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 モハマド アサドザマン

脊椎動物の骨格筋は、性質の異なる複数の筋線維が集合した多様性と、再生力が強く運動や成長でその量の変動する可塑性を併せ持つ器官である。一方、ミオシンは、筋肉の主要タンパク質であるが、その重鎖サブユニット (myosin heavy chain, MYH) には多数のアイソフォームがあり、速筋や遅筋といった筋肉のタイプによって、また筋肉量の増減でそれらの発現が変化する。したがって、MYH の発現制御機構は筋肉の多様性と可塑性を説明する鍵であるが、その詳細は依然として不明な点が多い。筋形成研究において、魚類は速筋と遅筋が解剖学的に分離すること、筋肉の再生力が強く成体でも筋線維数が増加するなど、研究対象として様々な魅力を備える。このような背景から、本研究は魚類の MYH を対象に、筋線維のタイプによって異なる発現を示す MYH の転写制御機構の解析を行った。また、魚類特有の筋成長過程で特定の MYH が発現することを明らかにした。その概要は以下の通りである。

第一章の序論に続き、第二章では、トラフグから同定された速筋特異的 MYH 遺伝子 (MYH) である MYH_{M743-2} の発現制御機構について検討した。 MYH_{M743-2} の翻訳開始点上流 2075bp を EGFP 遺伝子に連結したレポーターベクターをゼブラフィッシュに導入し、トランスジェニック魚を作出した。トランスジェニック魚において、EGFP は稚魚の体幹部速筋と頭部骨格筋の一部で特異的に発現することが免疫染色で確認され、これはトラフグにおける MYH_{M743-2} の発現パターンと一致したことから、同領域には魚類に共通して働く速筋特異的プロモーターが含まれることが明らかになった。この領域中には筋分化制御に関わる転写因子 MEF2 および MyoD、また、筋特異的遺伝子の発現に関わる SRF の結合配列が含まれ、これらの欠損変異体を用いた解析から、いずれの転写因子部位もプロモーター活性に寄与すること、頭部骨格筋については MyoD 結合部位が特異的に寄与することが明らかになった。

第三章ではトラフグの遅筋特異的 MYH である MYH_{M86-2} の発現制御機構について検討した。 MYH_{M86-2} の翻訳開始点上流 2614bp を EGFP 遺伝子に連結したレポーターベクターをゼブラフィッシュに導入し、トランスジェニック魚を作出した。トランスジェニック魚において、EGFP は稚魚の体幹部の遅筋線維で特異的に発現することが免疫染色で確認された。ほ乳類と魚類で、遅筋線維の発生に寄与するヘッジホッグシグナル経路につき、同経路の阻害剤で MYH_{M86-2} :EGFP トランスジェニック魚の EGFP 発現は完全に阻害され、 MYH_{M86-2} プロモーターはヘッジホッグシグナル経路依存的であることが示された。さらに、同シグナル経路で働く転写抑制因子 Sox6 につき、結合部位を欠損した変

異体を作成したところ、プロモーター活性の遅筋特異性が失われることが明らかになった。一方、一連の欠損変異体を用いた解析から、転写活性化因子として NFAT と MEF2 転写因子の結合部位が、プロモーターの活性化に寄与することが示された。以上の結果から、遅筋特異的な *MYH* の発現は、速筋線維での発現を抑制する *Sox6* と遅筋線維で発現を活性化する NFAT および MEF2 の協調によることが明らかになった。

第四章では、魚類の特徴である出生後の筋線維数の増加に関し、新しく形成された筋線維で特異的に発現する *MYH* について検討した。トラフグでは、*MYH_{M2528-1}* につき、同遺伝子が稚魚において筋形成の活発な部位で、成魚では新しく形成された小さな筋線維で特異的に発現することを示した。一方、ゼブラフィッシュでは筋線維の形成が活発な時に発現が上昇する *MYH* として *myhz1* と *myhz2* が報告されており、これら遺伝子プロモーターで EGFP を発現するトランスジェニック魚を作出したところ、*myhz1:EGFP* では体幹部前方に、*myhz1:EGFP* では体幹部後方に、それぞれ特異的に EGFP が発現し、両プロモーターは、体幹部の筋成長において相補的に働くことが考えられた。

以上、本研究は、魚類の筋形成において、速筋線維と遅筋線維にそれぞれ特異的に発現する *MYH* のプロモーター解析から、多様な筋線維が形成される際に働く転写ネットワークの一端を明らかにした。また、魚類特有の筋成長過程において、特定の *MYH* が発現することを示した。以上の成果は、脊椎動物の筋肉において多様な構造が形成されるメカニズムの解明のため基礎的知見として重要であり、筋成長マーカーとしての利用など応用的にも資するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。