

学 位 論 文 題 名

Structure, Expression, and Transcriptional Regulation
of the Actin Gene Family in Medaka *Oryzias latipes*

(メダカアクチン遺伝子ファミリーの構造と
発現および発現制御機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

細胞骨格や筋繊維を構成する主要なタンパク質であるアクチンは細胞骨格アクチンと筋肉アクチンの2種類に大別され、それぞれ別の遺伝子にコードされている。脊索をもたない無脊椎動物では両アイソフォームのアミノ酸配列は区別できないほどよく似ている。一方脊索動物の筋肉アクチンは、細胞骨格アクチンとは大きく違っており、両者を特定のアミノ酸位置において区別することが可能である。哺乳類では筋肉アクチンがさらに二つの横紋筋 (α 骨格筋、 α 心筋) アクチンと二つの平滑筋 (α および γ) アクチンの計4つに分かれて進化し、よく似たタンパク質をコードしているにも関わらず、それぞれ異なる筋肉組織に特異的に発現し、独立な転写調節を受けている。このように筋肉アクチン遺伝子が重複し、異なる発現調節機構下に置かれるという現象は、脊椎動物の複雑な体制の進化と大きく関わっていると考えられる。このような顕著な組織特異的発現を示す筋肉アクチン遺伝子ファミリーは、組織特異的遺伝子発現制御機構の格好の研究系の一つである。脊椎動物における筋肉アクチン遺伝子の発現調節機構については1980年代の初めから多くの研究がなされてきたにも関わらず、主に研究に用いられてきた哺乳類や鳥類では個体レベルでの転写調節機構の詳細な解析が困難であったため、培養細胞を用いた一面的・部分的な解析にとどまっていた。本研究では発生過程における遺伝子発現制御機構の解析が個体レベルで可能な実験系としてメダカ *Oryzias latipes* に注目し、アクチン遺伝子ファミリーの単離と構造解析を行い、さらにメダカ胚への外来遺伝子導入技術を駆使して発現調節機構の解析を行った。

メダカ稚魚cDNAライブラリーおよびゲノムDNAライブラリーから二種類のアクチン cDNA および二種類のアクチン遺伝子をコードするゲノムDNA断片を得、全塩基配列を明らかにした。cDNAの一つは、細胞骨格アクチン (OICA1) をコードしており、もう一方のcDNAおよびゲノムDNA断片の一つは、筋肉アクチン (OIMA1) をコードしていた。もう一つのゲノムDNA断片はOIMA1とは異なる筋肉アクチン遺伝子を含んでおり、OIMA2 と名付けられた。分子系統学的解析の結果、OICA1は哺乳類の β 細胞骨格アクチンに最もよく似ており、OIMA1とOIMA2は哺乳類の α 横紋筋アクチンに最もよく似ていることが示された。また脊椎動物に複数存在する筋肉アクチン遺伝子は、脊椎動物が他の脊索動物から分岐した後で、単一の祖先型筋肉アクチン遺伝子が重複を繰り返してできたことが推察された。

次に初期発生における遺伝子発現パターンをホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーショ

ン法および発生段階特異的RT-PCR法により明らかにした。*OIMA1*は体節に由来する骨格筋および頭部の骨格筋でのみ発現する骨格筋アクチン遺伝子であることが示された。一方、*OIMA2*は骨格筋および心筋で特異的に発現することが明らかにされた。両者ともに体節の形成に先んじてわずかながら発現しており、筋肉の分化にともなって急激に発現量が上昇した。このような発現パターンは哺乳類・両生類でみられるものに類似している。*OICA1*は発生過程を通じて胚全体で発現がみられた。

発現パターンの異なる二つの筋肉アクチン遺伝子 *OIMA1*、*OIMA2* の発現制御機構の比較解析を目的として、両者の転写開始点を決定したうえで、転写調節領域の配列を比較した。*OIMA1* と *OIMA2* では第一イントロンや転写開始点の位置は似通っているものの、配列そのものはあまり似ていないことがわかった。両遺伝子共に転写開始点の上流には、他の脊椎動物で筋肉特異的転写に重要な E box、CArG box などの転写因子結合モチーフが多数存在するが、その配置は両者間でも、他の脊椎動物のアクチン遺伝子のものとも保存されていなかった。

両遺伝子の筋特異的転写に必要なシス調節領域を明らかにするため、筋肉アクチン遺伝子上流領域と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の融合遺伝子をメダカ受精卵に顕微注入し、蛍光顕微鏡を用いて発現を観察した。転写開始点の上流 1430 bp (*OIMA1*)または 4096 bp (*OIMA2*) をGFP遺伝子につないだ融合遺伝子を顕微注入した胚では、筋肉特異的なレポーター遺伝子の発現が初期発生を通じてみられた。また、5' 非翻訳領域に含まれる第一イントロンは組織特異的転写を活性化する機能をもつことが分かった。次に上流領域のさまざまな部分を欠失させる、あるいは塩基置換を導入することにより、転写調節に重要な領域を調べ、以下のような結果を得た。

*OIMA1*の骨格筋特異的な発現には転写開始点の上流約 1 kbpが必要十分である。MA1eと名付けた-949から-662までの領域 とP1と名付けた-421から-201までの領域がエンハンサーとして働き、この二つのエンハンサーの協調的な働きが骨格筋特異的な発現に必要である。また、MA1e に存在する3つのE boxのうち上流の2つのE boxと他の未解明の配列の相互作用がこのエンハンサーの強い活性に必要であると考えられた。また、P1の塩基配列はフグ骨格筋アクチン遺伝子 α -*Sk1*の上流のほぼ同じ位置に保存されており、魚類に共通な転写調節機構の存在が示唆された。

OIMA2 の心筋および骨格筋特異的な発現には転写開始点の上流 520 bp が必要十分である。-520から-174までの領域は強い発現に必須なエンハンサーであり、MA2eと名付けた。また -140 に位置するCArG box も筋特異的発現に必須である。MA2e に唯一含まれるE box に変異をくわえると、心筋・骨格筋両方で転写活性が大幅に下がった。他の脊椎動物での研究では、E box に結合するbHLH型の転写因子の存在が心筋では明らかにされておらず、心筋におけるE box の必要性は現在議論の的となっている。本研究により、E box が心筋での筋肉アクチン遺伝子の発現に必要であることが生きた胚内で示された。

骨格筋アクチン遺伝子のエンハンサーと心筋アクチン遺伝子のエンハンサーを交換して他方の遺伝子のプロモーターに結合すると、エンハンサーが由来する遺伝子の発現パターンに合致する転写活性の上昇がみられた。このことから、これらのエンハンサーは、別の筋肉アクチン遺伝子のプロモーターにも作用して骨格筋、あるいは心筋での転写を活性化することがわかった。

以上の研究により、1) アクチン遺伝子ファミリーの構成が魚類と哺乳類や鳥類との間で非常によく保存されていること、2) 骨格筋および心筋におけるアクチン遺伝子の発現には、E

box、CArG boxなど既知の転写調節配列に加え、これまで哺乳類や鳥類で明らかにされていない転写調節配列も重要であり、これらの複雑な組み合わせにより遺伝子発現制御が行われていること、3) 個体レベルで遺伝子発現制御機構を解析する系として、メダカが非常に有用であること、が示された。本研究の成果は、脊椎動物における筋肉特異的遺伝子発現制御機構およびその多様性を解明する上で重要な知見を提供するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

Structure, Expression, and Transcriptional Regulation of the Actin Gene Family in Medaka *Oryzias latipes*

(メダカアクチン遺伝子ファミリーの構造と
発現および発現制御機構に関する研究)

近年、胚発生過程における遺伝子の発現調節機構に関する研究が盛んに行われている。細胞骨格や筋繊維を構成する主要なタンパク質であるアクチンは細胞骨格アクチンと筋肉アクチンの2種類に大別され、それぞれ別の遺伝子にコードされている。脊索をもたない無脊椎動物では両アイソフォームのアミノ酸配列は区別できないほどよく似ている。一方、脊索動物の筋肉アクチンは、細胞骨格アクチンとは大きく違っており、両者を特定のアミノ酸位置において区別することが可能である。哺乳類では筋肉アクチンがさらに二つの横紋筋アクチンと二つの平滑筋アクチンの計4つに分かれて進化し、よく似たタンパク質をコードしているにも関わらず、それぞれ異なる筋肉組織に特異的に発現し、独立な転写調節を受けている。このように筋肉アクチン遺伝子が重複し異なる発現調節機構下に置かれるという現象は、脊椎動物の複雑な体制の進化と大きく関わっていると考えられる。本学位論文は、このような顕著な組織特異的発現を示す筋肉アクチン遺伝子ファミリーを組織特異的遺伝子発現制御機構の格好の研究系と考え、発生過程における遺伝子発現制御機構の解析が個体レベルで可能な実験系としてメダカ *Oryzias latipes* を用いて、アクチン遺伝子ファミリーの単離と構造解析およびメダカ胚への外来遺伝子導入技術を駆使して発現調節機構の解析を行い、1) アクチン遺伝子ファミリーの構成が魚類と哺乳類や鳥類との間で非常によく保存されていること、2) 骨格筋および心筋におけるアクチン遺伝子の発現には、E box、CArG box など既知の転写調節配列に加え、これまで哺乳類や鳥類で明らかにされていない転写調節配列も重要であり、これらの複雑な組み合わせにより遺伝子発現制御が行われていることが明らかにし、さらに3) 個体レベルで遺伝子発現制御機構を解析する系として、メダカが非常に有用であることを示したもので、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。