

Studies on the mechanism of heat stress responses by myosin chaperone protein UNC-45B in fish muscle

魚類筋肉におけるミオシンシャペロン UNC-45B の熱ストレス応答機構に関する研究

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
高 禎俐

第1章では、本研究の背景と目的を説明した。近年の地球温暖化による海水面温度の上昇は、海面養殖される養殖魚に熱ストレスを与え、その肉質にも影響を及ぼすことが考えられる。マグロ類・ブリ類では、解体後に生の状態にも関わらず、身が焼けたように白濁化し保水性を失った肉質となる現象、いわゆる『やけ肉』が発生する。やけ肉は外観からは判定できず解体後に初めて確認されるため市場で問題となっている。そのためにやけ肉発生機構に関する研究報告例は多く、当研究室ではブリにおいてやけ肉に伴う解糖系酵素の不溶化を、Konno らはクロマグロのやけ肉に伴うミオシンの変性を明らかにしている。一般に熱ストレスにより生じた変性タンパク質は、heat shock protein (HSP) 等のシャペロンタンパク質によりリフォールディングされて、機能を回復することが知られている。しかし、魚類筋肉における熱ストレス応答機構は未解明のままである。これまでに修士論文研究において、ゼブラフィッシュ胚由来培養細胞 (ZF4 細胞) のトランスクリプトーム解析により、魚類筋肉における熱ストレス応答タンパク質の候補としてミオシンシャペロン UNC-45B を見出した。UNC-45B は横紋筋に局在し、変性ミオシンのリフォールディングの際には HSP90、HSP70 との相互作用により働くことが報告されている。そこで本研究では、飼育水温の上昇に伴う魚類 (ゼブラフィッシュ、ブリ、クロマグロ) 筋肉中の UNC-45B の発現解析を行い、魚類筋肉における熱ストレス応答機構への関与を明らかにすることを目的とした。

第2章では、モデル生物であるゼブラフィッシュを用いて、熱ストレスに伴う UNC-45B の応答及び本遺伝子 5'-上流領域の転写制御機構について調べた。熱ストレスに伴う ZF4 細胞及びゼブラフィッシュ筋肉における *unc-45b* mRNA 発現量について、リアルタイム定量 PCR 法により調べたところ、両者ともに顕著な上昇を示した。また、ゼブラフィッシュ UNC-45B 遺伝子 5'-上流領域 (-1,768/ -1) のレポーターアッセイ系を構築し、構築したプラスミドを ZF4 細胞にトランスフェクション後、プロモーター活性を測定した結果、熱ストレス 2 h 後にプロモーター活性の顕著な上昇を確認した。さらに、site-directed mutagenesis 法により作製した種々の欠失ミュータントを用いて、プロモーター活性測定により熱ストレスに伴う本遺伝子 5'-上流領域の発現調節部位を推定した。その結果、activating transcription factor (ATF) 及び heat shock factor (HSF) の認識配列は *unc-45b* の転写活性化に関与することが示唆された。

第3章では、熱ストレスに伴うブリ UNC-45B の発現解析を行った。ブリ筋肉中の UNC-45B の発現解析に必要な遺伝情報を得るために、cDNA クローニングを行った。その結果、ブリ筋肉

unc-45b cDNA の全塩基配列 3,051 bp (ORF 2,793 bp) を決定し、930 アミノ酸残基を推定した。この配列情報に基づいて特異的なプライマー及び抗ペプチドポリクロナール抗体を設計・作製し、発現解析に用いた。短期間の熱ストレスによるブリ UNC-45B の挙動を明らかにするために、養殖ブリ (約 500 g) を、飼育水温の異なる試験区 (対照区 25°C、熱ストレス区 30°C) に移し、経時的 (0, 4, 8, 24, 30 h) に取り上げて神経締めした。各魚体の背部筋における発現量は、リアルタイム定量 PCR 法及びウェスタンブロット法により測定した。その結果、mRNA レベルでは、熱ストレス 8 h 後に顕著に上昇し、24 h 後にピークを迎えた。それに対して、タンパク質レベルでは、熱ストレス 24 h 後に著しく上昇した。さらに、長期間熱ストレスを受けたブリ UNC-45B の挙動を明らかにするために、夏季 (30°C)・冬季 (14°C) にブリをサンプリングし、同じく UNC-45B の発現レベルについて調べた。結果として、mRNA 及びタンパク質レベルの両方で、夏季ブリ筋肉 UNC-45B の発現量は冬季より有意に高かった。以上の結果より、長期間や短期間に関わらず、熱ストレスに対してブリ UNC-45B は安定に応答していることを明らかにした。

第4章では、熱ストレスに伴うクロマグロ UNC-45B の発現解析を行った。前章の結果でブリの熱ストレス試験により UNC-45B 発現量の顕著な上昇が見られたため、本章ではブリよりやけ肉現象が頻発しているクロマグロを対象魚として、UNC-45B の挙動を調べた。まずクロマグロ筋肉中の UNC-45B の発現解析に必要な遺伝情報を得るために、cDNA クローニングを行った結果、クロマグロ UNC-45B の cDNA を2種類見出した。isoform1 として全塩基配列 2,994 bp (ORF 2,796 bp、931 アミノ酸残基) を決定し、isoform2 として全塩基配列 3,071 bp (ORF 2,793 bp、930 アミノ酸残基) を決定した。尚、クロマグロ UNC-45B の2種類の isoform について、全一次構造はほぼ一致しており、その差異は N 末端のメチオニン1残基だけであった。次に、夏季 (29°C)・冬季 (21°C) の養殖クロマグロを試料として、UNC-45B の発現レベルを調べた。その結果、夏季クロマグロ筋肉中の UNC-45B の発現量はタンパク質レベルで冬季に比べて著しく高かった。一方、mRNA レベルでは isoform2 が熱ストレスに伴い、顕著に上昇した。以上の結果より、ブリ及びクロマグロ筋肉中の UNC-45B は、熱ストレス応答タンパク質として機能しており、熱ストレスにより変性したミオシンをリフォールドすることでやけ肉の回避に関与することが示唆された。

第5章では、総合考察を行った。以上の結果を踏まえて、熱ストレスによるやけ肉の発生及びその回避機構の仮説を立てた。魚類筋肉において、熱ストレスにより変性したミオシンの排除ができず蓄積・凝集することによりやけ肉が発生する。一方、変性ミオシンの機能回復のために、ミオシンシャペロンである UNC-45B は HSP90、HSP70 と協同して介在し、変性したミオシンの立体構造を回復させることにより、やけ肉の回避に関与すると考えられる。従って、UNC-45B は選抜育種のバイオマーカー候補として応用可能であり、マグロ類・ブリ類の熱ストレスによる『やけ肉』の防除対策、即ち、『やけ肉を発生させない養殖技術』の開発への貢献が期待される。