


論文審査の結果の要旨

報告番号	博(水・環)甲第75号	氏名	高 禎 俐
学位審査委員	主査 長 富 潔 副査 山 口 健 一 副査 平 坂 勝 也 副査 吉 田 朝 美		
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>高 禎俐氏は2018年10月長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科博士後期課程に入学し、現在に至っている。同氏は水産・環境科学総合研究科に入学以降、水産科学を専攻して所定の単位を修得するとともに、魚類筋肉中のミオシンシャペロンUNC-45Bの熱ストレス応答に関する研究に従事し、その成果を2021年7月に主論文「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)」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文 1編 (うち審査付き論文 1編)、印刷公表予定論文 1編 (うち審査付き論文 1編)、学位の基礎となる論文 3編 (うち審査付き論文 3編)を付して、博士 (水産学) の学位を申請した。長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授会は、2021年7月21日の定例教授会において論文内容を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審議し、公開論文発表会を実施すると共に、最終試験を行い、論文審査及び最終審査の結果を2021年8月25日の水産・環境科学総合研究科教授会に報告した。</p> <p>本研究は、飼育水温の上昇に伴う魚類筋肉中のミオシンシャペロン 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の解明に取り組んだものである。</p> <p>第1章では、背景としてマグロ類、ブリ類で白濁化し保水性を失った肉質になる現象 (やけ肉) の概要、やけ肉発生機構に関するこれまでの知見を詳述し、研究目的と構成を紹介している。</p> <p>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。熱ストレスに伴うゼブラフィッシュ胚由来株化細胞 ZF4 及びゼブラフィッシュ筋肉における <i>unc-45b</i> mRNA発現量について、リアルタイム定量PCR法 (qPCR) により調べたところ、両者共に顕著な上昇を示した。また、構築したゼブラフィッシュ本遺伝子 5'-上流領域 (-1,768/ -1) のレポーターアッセイ系を用いたプロモーター活性測定の結果、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。更に、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たプロモーター活性解</p>			

析により、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) の認識配列が *unc-45b* の転写活性化に関わることを示唆した。

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 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、養殖ブリを飼育水温の異なる試験区 (対照区 25℃、熱ストレス区 30℃) に移し、経時的に採取した各魚体の背部筋における発現量をqPCR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。一方、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。更に、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・冬季ブリのUNC-45Bの発現レベルについて調べた結果、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、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、熱ストレスに伴うクロマグロUNC-45Bの発現解析を行った。まずクロマグロUNC-45BのcDNAクローニングの結果、2種類のクロマグロUNC-45B cDNA の isoform を見出した。isoform1 として全塩基配列 2,994 bp (931アミノ酸残基)を決定し、isoform2 として全塩基配列 3,071 bp (930アミノ酸残基)を決定した。次に、夏季・冬季クロマグロの 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を示唆した。

第5章では本研究の結果について総合考察を行い、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。仮説では魚類筋肉中の UNC-45B が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可能性を示唆している。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、『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。

以上のように、本研究では魚類筋肉中における熱ストレス応答機構への UNC-45B の関与を明らかにした。学位審査委員会は、これらの知見が水圏生化学の分野において極めて有益な成果であるとともに、水産科学の分野の進歩発展に貢献するところが大きいと評価し、博士 (水産学) の学位に値するものとして合格と判定した。