

受賞者総説

魚類の温度馴化に伴う生化学的变化に関する研究*1

(平成 11 年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

菊 池 潔*2

東京大学大学院農学生命科学研究科

環境水温の変動は変温動物である魚類に極めて大きな影響をもたらす。生体内の化学反応の多くが温度依存性を示すからである。したがって、温度適応という現象の解明は、魚類の生理や生化学的性状を理解する上で不可欠である。

変温性魚類の温度適応を、それに要する時間という観点から区別すると、便宜的に以下の3つの様式が考えられる。すなわち、短時間の温度変化に対する適応、適応に数日を要する温度馴化、進化による遺伝形質の変化を伴う適応である。¹⁾

1980 年代初頭までに魚類の温度馴化という現象に対して多くの研究が蓄積されており、その範囲は個体生存温度域の変化から酵素活性の変化というレベルまでおよんでいた。^{1,2)} 例えば、多くの魚類において高温馴化に伴い上限致死温度が上昇することが報告されている。³⁾ 高温馴化に伴う酵素活性の変化の例としては、リソソームや窒素代謝に関する多くの酵素の活性が上昇することが挙げられる。¹⁾ これらの酵素活性の変化は、代謝産物の分解を通じて、高水温下における生存に寄与していると推測されている。同様に、多くの魚類において低温馴化に伴い下限致死温度が低下することが報告されている。³⁾ さらに、キンギョなどの一部の魚種においては低温馴化に伴う遊泳能力の上昇も報告されている。⁴⁾ 生化学レベルでの研究から、多くの魚類において低温馴化に伴い酸化的リン酸化経路による ATP 産生能力が上昇することが知られており、この ATP 産生能力の上昇は、遊泳能力の増大に寄与していると推測されている。^{1,5)} また、コイなどの一部の魚種で低温馴化に伴う細胞膜脂質組成の変化が報告されており、これらの魚種では膜流動性の増加を通じて酸化的リン酸化経路に含まれる酵素の活性を上昇させているという仮説が提唱されている。^{6,7)}

上記のような温度馴化という現象の背後には、遺伝子発現の変化が存在すると予想される。従って、遺伝子の発現変動とそれにコードされるタンパク質の量的変化と

いう観点から研究を進めれば、より統一された視点で温度馴化という現象を把握できると考えられる。著者が研究を始めた 1990 年代初頭において、上記のような観点からの研究はほとんどなかった。しかし、現在では、著者らの研究に加えて、コイ・ミオシン重鎖,^{8,9)} コイ脂肪酸不飽和化酵素,¹⁰⁾ 低水温下に生息する魚類の抗凍結タンパク質,¹¹⁾ 様々な魚種の熱ショック・タンパク質^{12,13)} などの研究が分子レベルで進められている。これらの研究の蓄積により、将来、魚類温度馴化の分子機構の詳細が明らかになると期待される。

本稿では、広温度域性魚類であるキンギョとコイを材料とし、温度馴化に伴うタンパク質および mRNA の発現変動の一端を明らかにした著者らの一連の研究について概説する。

1) 温度馴化に伴うタンパク質組成の変化

温度馴化に伴うタンパク質組成の変化を明らかにするため、10°C または 30°C で 5 週間以上飼育して充分馴化させたキンギョおよびコイの速筋抽出液を、等電点電気泳動および SDS-PAGE からなる 2 次元電気泳動分析に付した。その結果、いずれの魚種においても、30°C 馴化魚に 65 kDa の成分が多量に認められ、逆に 10°C 馴化魚では 55 kDa 成分の割合が高いことが判明した。¹⁴⁾ この傾向はキンギョの脳抽出液においても認められた。また、高温馴化に伴う 65 kDa タンパク質の増大は、キンギョの肝臓抽出液および血清においても観察された。^{14,15)} このほか、SDS-PAGE 分析により、30°C 馴化キンギョは脳で 27 kDa および 200 kDa 以上の 2 成分を、肝臓で 27 kDa および 97 kDa の 2 成分を、いずれも 10°C 馴化魚と比べて多く含むことが示された。以上より、キンギョやコイには温度馴化に伴って発現量に変動するタンパク質が存在することが示された。

*1 Studies on Biochemical Changes Associated with Temperature Acclimation of Fish.

*2 Kiyoshi Kikuchi (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan).

2) キンギョの高温馴化に関連する Wap65

上述のキンギョ 65 kDa タンパク質を 2 次元電気泳動ゲルから単離し、これを抗原として抗体を作製した。次に、この抗体を用いたウエスタンブロット法により、速筋の高温馴化過程における本成分の量的変動を調べた。20°C 馴化キンギョを飼育する水槽の温度を 20 時間で 20°C から 30°C へ上昇させとて、3 日以降 6 日以内に本タンパク質の発現量が増大し、少なくとも実験終了時の 9 日目までその量が維持された。¹⁶⁾ 以上の結果より、高水温に対する持続的な反応である高温馴化という現象に、65 kDa タンパク質が関与している可能性が示された。

別途、部分一次構造を明らかにするため、抗体による反応を指標として、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、逆相カラムを用いて、キンギョ背側筋より、65 kDa タンパク質の精製を行った。得られた精製試料の N 末端アミノ酸配列 44 残基は、既報のタンパク質に対し有意な相同性を示さなかった。¹⁷⁾ 以上の結果は、本タンパク質が高温馴化に関連する新規タンパク質であることを示唆している。そこで、本タンパク質を warm temperature acclimation-related 65 kDa protein (Wap65) と名付けた。

Wap65 遺伝子が発現している組織を知るため、まず、同定された N 末端アミノ酸配列を基にプライマーを作成し、PCR 法により cDNA 断片を得た。これをプローブとしたノザンブロット法で、Wap65 遺伝子の発現を脳、筋肉、肝臓、血球について調べたところ、肝臓で多量に発現していることが示された。¹⁵⁾ 30°C 馴化魚の肝臓における Wap65 の mRNA 量は 10°C 馴化魚の約 8 倍であり、本タンパク質の血中量の差と高い相関を示した。先に Wap65 は、筋肉、脳、血清などに検出されたことを述べたが、これは肝臓で生合成された Wap65 が循環器系に分泌された後、各組織に運ばれたことを示すものと判断された。

続いて、cDNA クローニング法により、445 アミノ酸からなる Wap65 の全一次構造を演繹した。この配列はラット・ヘモペキシンと 31% のアミノ酸同一率を示し、高次構造の形成に重要なシステインの位置も類似していた。^{15,18)} 哺乳類のヘモペキシンはヘム結合性を示す血清タンパク質であり、血中のヘムを肝臓に運搬する役割を持つ。しかし、Wap65 はヘモペキシンのヘム結合性に関与するヒスチジンを欠き、ヘム・アガロースに対する吸着性も示さなかった。¹⁹⁾ 以上より、Wap65 はヘモペキシンとは異なった生化学的性質を持つことが示された。

別途、高温馴化過程における肝臓の Wap65 mRNA 量の経時的変動を調べるため、10°C 馴化キンギョを飼

育する水槽の水温を 20 時間で 10°C から 30°C へ上昇させた。その結果、Wap65 の mRNA 量は 3 日後に 10°C 馴化魚の 40 倍に達し、21 日後には 10 倍となった。²⁰⁾ 以上の結果は、フィードバック機構を含む複雑な発現制御機構が存在する可能性を示している。

肝臓特異的発現および高水温による発現量増大という特徴を持つ Wap65 の発現制御機構の一端を明らかにするため、Wap65 の遺伝子断片をゲノム・ライブラリーから単離し、転写制御領域を調べた。その結果、遺伝子の 5' 領域に肝臓特異的発現に関与するとされる配列が見出された。また、炎症反応誘導性の発現に関与するとされる配列も存在した。そこで、エンドトキシンを腹腔内に投与したところ、Wap65 の mRNA 量は有意に上昇し、Wap65 の発現調節機構と生体防御機構との関連性が示された。²⁰⁾

以上の結果から、Wap65 の一次構造および発現制御機構の一部が明らかとなった (図 1)。しかし、生理的役割の詳細については不明である。Wap65 はヘモペキシンと有意なアミノ酸同一率を示し、それらの高次構造もある程度類似していることが予想される。また、高温馴化キンギョの血清タンパク質の中で、Wap65 が比較的大きな割合を占めることなどから、著者は Wap65 が血中の物質運搬に関わっているのではないかと推測している。

3) コイの低温馴化に関連するミトコンドリア ATP 合成酵素 β -サブユニット

低温馴化に伴いコイ速筋で発現量が増大する 55 kDa タンパク質の全一次構造を明らかにするため、まず、2 次元電気泳動ゲルより本タンパク質を単離して、N 末端アミノ酸配列 40 残基を決定した。これを基にプライマーを作製し、PCR 法により cDNA 断片を得た。次

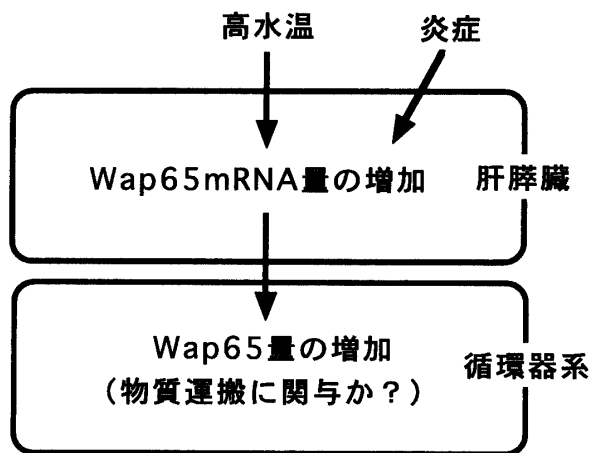


図 1 高温馴化によって発現量が増加するキンギョ Wap65

に、得られた cDNA 断片をプローブとした cDNA クローニングにより、アミノ酸 518 残基をコードする cDNA 全長を単離した。このアミノ酸配列は哺乳類のミトコンドリア ATP 合成酵素 β -サブユニットのそれと約 90% の同一率を示した。^{21,22)} 10°C 馴化魚の速筋における本タンパク質の mRNA 量は 30°C 馴化魚の約 2 倍であり、本タンパク質の発現量の差と高い相関を示した。

本タンパク質は、ATP 合成酵素を構成するサブユニットの一つである。ATP 合成酵素はミトコンドリア内膜に存在し、酸化的リン酸化反応の最終段階において ATP を合成する働きを持つ。²³⁾ 一方、低温馴化に伴い筋肉中のミトコンドリア体積密度が増加することが、キンギョなどで報告されている。²⁴⁾ したがって、低温馴化に伴う本タンパク質の発現量の増加は、ミトコンドリア体積密度の増加に相関するものと推測される。また、その発現量増大は、低水温によってもたらされる ATP 産生能力の低下を補う役割を持つと考えられた (図 2)。

まとめと今後の展望

本研究では、まず、キンギョやコイにおいて、温度馴化に伴い発現量が変動するタンパク質が存在することを明らかにした。そこで、それらの中から 2 種類のタンパク質を選び出し、全演繹アミノ酸配列を決定した。さらに、これらのタンパク質の発現制御が mRNA のレベルで行われていることも示した。高温馴化に伴い発現量が増加するキンギョ Wap65 は、ラット・ヘモペクシンと 31% のアミノ酸同一率を示すものの、その生化学的性質および生理的役割に関しては、現在のところ不明な点が多い。一方、低温馴化で発現量が増加するコイ 55

kDa タンパク質は、相同性解析の結果、ミトコンドリア ATP 合成酵素 β -サブユニットであることが示された。また、低水温下におけるその発現量の増加は、ATP 産生能力の低下を補償する役割を持つと推測された (図 1 および 2)。

今回、温度馴化に伴って発現量が変動することの生理的意義が比較的容易に推測できるタンパク質とそうではないタンパク質が得られた。これは、本研究で採用した方法論の必然的な帰結である。つまり、解析したタンパク質の一次構造が既知タンパク質に高い相同性を示し、そのタンパク質がこれまでに報告された生化学レベルでの温度馴化反応と関連性がある場合、そのタンパク質の機能の推測は比較的容易である。一方、上記の条件を満たさないタンパク質の場合、その機能予測は困難になる。しかし、このようなタンパク質をその一要素とする代謝経路やシグナル伝達経路を調べることは、未知の温度馴化機構を明らかにするための端緒となる可能性を持つため、非常に重要である。

未知または無名タンパク質の機能を推測する有効な方法の一つは、できるだけ多くの馴化関連タンパク質を同定することである。温度馴化関連タンパク質は時空的に共存する他の温度馴化関連タンパク質や生体成分と協同して、温度馴化に寄与すると予想されるからである。²⁵⁾ また、近年の逆遺伝学的手法の発達により、馴化関連遺伝子の転写制御能を失った魚類個体を作製することも夢とは言えなくなってきた。²⁶⁾ このような個体の解析は、機能不明の馴化関連タンパク質が果たす生理的役割を明示してくれると期待される。

本研究により、キンギョやコイでは、特定遺伝子の転写制御を通じて特定タンパク質量や生体成分を変化させることにより、環境水温の変動に対応しているという構図が見えてきた。今後、さらに多くの温度馴化関連タンパク質を解析し、それらによって構成される機能と情報伝達のネットワークを明らかにすることで、広温度域性淡水魚の温度馴化機構の全体像がより鮮明に見えてくるものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜った東京大学・渡部終五教授に深く感謝いたします。また、本研究の基礎となる博士課程の研究において、ご指導、ご助言をいただいた東京大学・会田勝美教授に御礼を申し上げます。cDNA クローニング法を指導して下さった中央水産研究所・山下倫明博士、コイ ATP 合成酵素 β -サブユニットを共に研究してくれた糸井史朗さん、そして、多くの協力をいただいた東京大学・水圏生物工学研究室および水族生理学研究室内の皆様に感謝いたします。

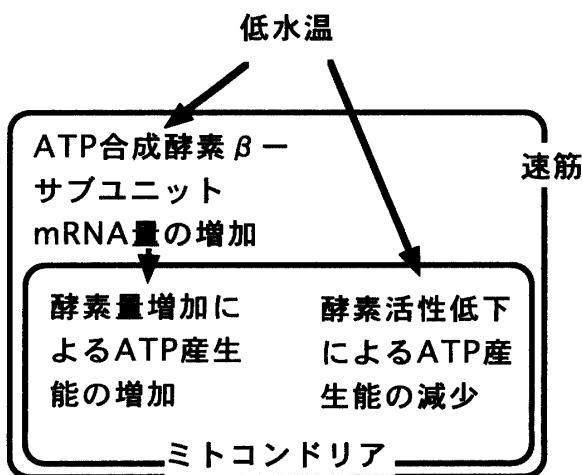


図 2 低温馴化によって発現量が増加するコイ・ミトコンドリア ATP 合成酵素 β -サブユニット

文 献

- 1) J. R. Hazel and C. L. Prosser: Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.*, **54**, 620-677 (1974).
- 2) P. W. Hochachka and G. N. Somero: Biochemical Adaptation. Princeton University Press, NJ, 1984.
- 3) F. E. Fry: The effect of environmental factors on the physiology of fish. In *Fish Physiology*, vol. 6, ed. W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press, NY and London, pp. 1-98, 1971.
- 4) F. W. H. Beamish: Swimming capacity. In *Fish Physiology*, vol. 7, ed. W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press, NY and London, pp. 101-175, 1978.
- 5) B. J. Battersby and C. D. Moyes: Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, **275**, R905-R912 (1998).
- 6) G. Van den Thillart and J. Modderkolk: The effect of acclimation temperature on the activation energies of state III respiration and the unsaturation of membrane lipids of goldfish mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 38-51 (1978).
- 7) E. Wodtke: Temperature adaptation of biological membranes: compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 710-720 (1981).
- 8) J. Imai, Y. Hirayama, K. Kikuchi, M. Kakinuma, and S. Watabe: cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with temperature acclimation. *J. Exp. Biol.*, **200**, 27-34 (1997).
- 9) S. Watabe, Y. Hirayama, M. Nakaya, M. Kakinuma, K. Kikuchi, X.-F. Guo, S. Kanoh, S. Chaen, and T. Ooi: Carp expresses fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities to compensate for changes in environmental temperature. *J. Therm. Biol.*, **22**, 375-390 (1998).
- 10) P. E. Tiku, A. Y. Gracey, A. I. Macartney, R. J. Beynon, and A. R. Cossins: Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science*, **271**, 815-818 (1996).
- 11) S. L. Chan, G. L. Fletcher, and C. L. Hew: Control of antifreeze protein gene expression in winter flounder. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 2, ed. P. W. Hochachka and T. P. Mommsen, Elsevier, Amsterdam and NY, pp. 293-305, 1993.
- 12) T. J. Dietz and G. N. Somero: The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gill-ichthys*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3389-3393 (1992).
- 13) C. N. White, L. E. Hightower, and R. J. Schultz: Variation in heat-shock proteins among species of desert fishes (*Poeciliidae*, *Poeciliopsis*). *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 106-119 (1994).
- 14) S. Watabe, K. Kikuchi, and K. Aida: Cold- and warm-temperature acclimation induces specific cytosolic proteins in goldfish and carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 151-156 (1993).
- 15) K. Kikuchi, M. Yamashita, S. Watabe, and K. Aida: The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17087-17092 (1995).
- 16) K. Kikuchi, S. Watabe, Y. Suzuki, K. Aida, and H. Nakajima: The 65-kDa cytosolic protein associated with warm temperature acclimation in goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Physiol. B*, **163**, 349-354 (1993).
- 17) K. Kikuchi, S. Watabe, and K. Aida: Isolation of a 65-kDa protein from white muscle of warm temperature-acclimated goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **120B**, 385-391 (1998).
- 18) H. Nikkila, J. D. Gitlin, and U. Muller-Eberhard: Rat hemopexin. Molecular cloning, primary structural characterization, and analysis of gene expression. *Biochemistry*, **30**, 823-829 (1991).
- 19) K. Kikuchi: Molecular biological studies of temperature acclimation in the goldfish. PhD thesis at The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, 1996.
- 20) K. Kikuchi, S. Watabe, and K. Aida: The Wap65 gene expression of goldfish (*Carassius auratus*) in association with warm water temperature as well as bacterial lipopolysaccharide (LPS). *Fish Physiol. Biochem.*, **17**, 423-432 (1997).
- 21) K. Kikuchi, S. Itoi, and S. Watabe: Increased levels of mitochondrial ATP synthase β -subunit in fast skeletal muscle of carp acclimated to cold temperature. *Fisheries Sci.*, **65**, 629-636 (1999).
- 22) G. A. M. Breen, P. L. Holmans, and K. E. Garnett: Isolation and characterization of a complementary DNA for the nuclear-coded precursor of the β -subunit of bovine mitochondrial F_1 -ATPase. *Biochemistry*, **27**, 3955-3961 (1988).
- 23) C. D. Moyes, B. J. Battersby, and S. C. Leary: Regulation of muscle mitochondrial design. *J. Exp. Biol.*, **201**, 299-307 (1998).
- 24) S. Tyler and B. D. Sidell: Changes in mitochondrial distribution and diffusion distances in muscle of goldfish upon acclimation to warm and cold temperatures. *J. Exp. Zool.*, **232**, 1-9 (1984).
- 25) D. A. Lashkari, J. L. DeRisi, J. H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown, and R. W. Davis: Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13057-13062 (1997).
- 26) B. Appel, A. Fritz, M. Westerfield, D. J. Grunwald, J. S. Eisen, and B. B. Riley: Delta-mediated specification of midline cell fates in zebrafish embryos. *Curr. Biol.*, **9**, 247-256 (1999).