

2007.5

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第十八号

評価広報課発行

本学は、次の者に博士（理学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
甲理博第18号	中江 雅典	Review of spino-occipital and spinal nerves in Tetraodontiformes, with special reference to pectoral and pelvic fin muscle innervation (フグ目魚類における後頭神経と前方脊髄神経 特に胸鰭と腹鰭に關与する筋肉の神経支配について)	1
甲理博第19号	田中 久美子	環形動物フォスファゲンキナーゼの基質特異性と進化に関する研究	3

<p>ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目</p>	<p>なかえ まさのり 中江 雅典 (滋賀県) 博士(理学) 甲理博第18号 学位規則第4条第1項該当 平成19年3月23日 Review of spino-occipital and spinal nerves in Tetraodontiformes, with special reference to pectoral and pelvic fin muscle innervation (フグ目魚類における後頭神経と前方脊髄神経—特に胸鰭と腹鰭に關与する筋肉の神経支配について—)</p> <p>発表誌名 (1) Ichthyological Research. No. 51: 327-336. November 25, 2004. (2) Ichthyological Research. No. 52: 343-353. November 25, 2005. (3) Ichthyological Research. No. 53: 233-246. August 25, 2006.</p> <p style="text-align: right;">審査委員 主査 教授 町田 吉彦 副査 教授 佐々木邦夫 副査 教授 近藤 康生</p>
---	---

論文の内容の要旨

Spino-occipital (S0) and spinal (SV) nerves in 10 tetraodontiform families and 5 outgroup taxa were examined, with special reference to pectoral and pelvic fin muscle innervation. Compared with the outgroup taxa, tetraodontiforms were characteristic in having S03 + SV1 (S03 in tetraodontids) that extended several subbranches to the pectoral fin base laterally and S0 involvement in the innervation of the infracarinalis anterior. S0 and SV1 were mingled with one another (in 6 patterns) before entering into the pectoral fin muscles in most species, including the outgroup taxa, such resulting in the involvement of SV1 in the innervation of almost all pectoral fin muscles. S03 + SV1 was present in all tetraodontiforms (except in two tetraodontids having S03) and the outgroup taxa, a dorsal branch from it uniformly extending into the pectoral fin base dorsally. The pectoral fin base also received a branch ventrally, but its identity differed in the inclusion and exclusion of SV2. In the latter, SV1 constituted the branch, a derived condition occurring in Aracanidae, Ostraciidae, Tetraodontidae, Diodontidae and Molidae. In all outgroup taxa examined, S01 passed medial to the pharyngoclaviculares internus and externus, and a S03 + SV1 branch entered into the pectoral fin base from the dorsalmost ray. In tetraodontiforms, three S01 and two S03 + SV1 conditions were recognized. Because the conditions in the outgroup taxa were common to those in primitive tetraodontiforms (i.e., Triacanthodidae), Ostraciidae, Tetraodontidae and Diodontidae, and Balistidae, Monacanthidae, Tetraodontidae and Diodontidae could be recognized as derived in the respective characters. No strong characters to specify the tetraodontiform sister group were recognized in the spino-occipital and spinal nerves.

論文審査の結果の要旨

世界で 10 科 100 属 350 以上の種を含むフグ目は硬骨魚類の中で最も特化した分類群とされ、系統に関する研究が盛んに行われてきた。フグ目においても、従来の手法である骨格系および筋肉の観察に基づいた仮説が提唱されており、また、初期生活史のさまざまなステージにおける形態的变化に基づいた仮説も提唱されている。さらに近年は、DNA の塩基配列に基づく分子系統学的な仮説が提示されているが、いまだフグ目内における科の類縁関係は判然としておらず、また、フグ目がいかなる祖先形から派生したのかも不明のままであった。本研究は、過去に研究例がない側線系と末梢神経系の詳細な観察と、神経支配に基づく筋肉系の相同性の判定から、フグ目魚類の系統に迫った画期的な業績である。

1974 年以降、魚類の神経系の観察に関する著名な論文はいくつかある。しかしながら、末梢神経の微細な分布を知る上での適切な染色法が確立されておらず、系統解析に耐え得る資料の提示はなされなかった。本論文では直接触れていないが、本論文の完成には、従来の染色法に独自の改良を加えた画期的手法の開発がまず挙げられ、これについては申請者が既に論文として公表している。これまで、高度に特化したフグ目魚類は側線系を欠くとされていた。しかしながら、新たな染色法により、フグ目魚類の中でも最も特化したと分類群と想定されていたマンボウ科が側線系を持つことが本研究により明らかにされた。従来の比較解剖学では、筋肉の相同性は筋肉が付着する骨格系の構成要素との関連で判断されていた。しかしながら、本研究は神経支配に基づき筋肉の相同性を判断するという、これまでに世界で例のない試みを採用しており、すでに公表された本研究の成果の一部は学会で高い評価を得ている。

本研究で、フグ目は外群と比較して、後頭神経第 3 枝と第 1 脊髄神経腹枝が合流した複合枝が胸鰭に外側から入ること、後頭神経が前腹側竜骨下筋 (*infracarinalis anterior*) の支配に関与する点で特徴的であることが明らかとなり、また、後頭神経と第 1 脊髄神経腹枝は 6 つの様式の合流パターンを示すことが明らかにされた。さらに、フグ目では第 1 脊髄神経腹枝による胸鰭筋肉の神経支配が引き起こされていることが示された。フグ科を除くすべての種では、後頭神経第 3 枝と第 1 脊髄神経腹枝の複合枝があり、それが上方から胸鰭基底に入る。また、神経枝は下方からも胸鰭基底へ入るが、第 2 脊髄神経腹枝の関与の有無で相違が認められる。ここで、第 2 脊髄神経腹枝の関与のない状態が派生的と考えられることから、これらにはイトマキフグ科、ハコフグ科、フグ科、ハリセンボン科、マンボウ科が該当する。外群では、後頭神経第 1 枝が *pharyngoclavicularis internus* と *pharyngoclavicularis externus* の内側を通り、後頭神経第 3 枝と第 1 脊髄神経腹枝の複合枝が胸鰭第 1 軟条から胸鰭基底へ入る。フグ目では、これらに複数の様式が認められ、原始的なフグ目魚類とされているベニカワムキ科が外群と同様の状態を示す。したがって、後頭神経第 1 枝では、ハコフグ科、フグ科、ハリセンボン科が派生的な状態を示すことが明らかにされた。一方、後頭神経第 3 枝と第 1 脊髄神経複合枝では、モンガラカワハギ科、カワハギ科、フグ科およびハリセンボン科が派生的状態にあることが認められた。しかしながら、後頭神経と前方脊髄神経では、フグ目の姉妹群を特定する有効な形質が発見されなかった。

以上の成果は、フグ目魚類の科の複雑怪奇な系統の解明への大きな端緒であり、また、フグ目魚類の祖先形の推定に新たな方向性を与えた。このように、魚類学の分野において、本研究は神経系が系統解析にきわめて有効である可能性を示した点で、魚類全般に関わる系統学ならびに進化学に大きなインパクトを与えた先駆的な業績であると認める。よって、学位申請者 中江雅典は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。

ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	たなか くみこ 田中 久美子 (広島県) 博士(理学) 甲理博第19号 学位規則第4条第1項該当 平成19年3月23日 環形動物フォスファゲンキナーゼの基質特異性と進化に関する研究 (1) <i>FEBS Lett.</i> 573:78-82. 2004
審査委員 主査 教授 鈴木 知彦 副査 教授 川村 和夫 副査 教授 松岡 達臣	

論文の内容の要旨

脊椎動物が一種類のフォスファゲンキナーゼしか持たないのに対し、環形動物にはこれまで知られている六種類のフォスファゲンキナーゼの全てが存在しており、何故このように多種多様なフォスファゲンキナーゼを持つようになったのか、また進化の過程で、どのようにして様々な基質に対する多様性を獲得するに至ったのか、これらは興味を引く問題であった。よって私は、これらを念頭に置き、研究を行ってきた。その結果と議論は四章に分けて記述する。

第一章．環形動物フォスファゲンキナーゼの進化

環形動物の多種多様なフォスファゲンキナーゼの進化を探るため、シマミミズ・ロンブリシンキナーゼとタマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼの遺伝子構造を解析した。結果、二つの遺伝子構造は非常に酷似しており、他の環形動物のフォスファゲンキナーゼ遺伝子とも酷似していた。また、クレアチンキナーゼのミトコンドリア型アイソザイムの遺伝子構造と、環形動物フォスファゲンキナーゼのものは相同であった。

以上のことから、環形動物フォスファゲンキナーゼは共通の祖先から進化し、その祖先型はミトコンドリア型クレアチンキナーゼ様のものであると推測された。

第二章．環形動物シマミミズ・ロンブリシンキナーゼの基質認識機構

ロンブリシンキナーゼの基質認識機構を解明するため、様々なアミノ酸置換体を作成し、その酵素特性を調べた。その結果、K95Y 変異体においては、ロンブリシンよりタウロシアミンに対して基質親和性が高くなった。また K95I 変異体では、両基質に対して野生型より触媒効率が増加した。

以上のことから、シマミミズ・ロンブリシンキナーゼは 1 アミノ酸を置換するだけで、酵素の性質が大きく変化する柔軟な酵素であることが分かった。また、95 番目アミノ酸残基は、基質に直接結合はしていないが、基質認識には重要なアミノ酸残基であることが示された。

第三章．環形動物タマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼの基質認識機構

環形動物タマシキゴカイのミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼは、ミトコンドリア型アイソザイムとして 2 番目にその存在が知られた。その酵素特性を探るために、様々なアミノ酸置換体を作成した。その結果、K95Y 変異体はタウロシアミンに対し基質阻害を示し、その K_m 値は 0.083 mM で、非常に強い親和性を示した。この基質阻害機構を解明するために更なる変異導入を行った結果、K69A/K95Y, V71A/K95Y において基質阻害が解除された。よって、K95Y における基質阻害は、主に K69, V71, Y95 によって引き起こされていると推測された。

また、ガラバゴスハオリムシ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼにおいても同様な変異を導入したが、基質阻害は起こらなかったため、この現象はタマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼに特有のものであることが分かった。

第四章．環形動物フォスファゲンキナーゼの基質特異性及び多様性について

第一章から三章までの結果を総合して考えると、環形動物のフォスファゲンキナーゼは、非常に柔軟であり、言葉を返せば酵素としては不完全な状態で存在していると考えられた。このことが、環形動物の進化の過程で多種多様なフォスファゲンキナーゼを生じる原動力となったのではないかと推測された。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物が一種類のフォスファゲンキナーゼ、即ちクレアチンキナーゼのみを持っているのに対し、環形動物には、これまで知られている六種類のフォスファゲンキナーゼの全てが存在している。何故、環形動物においてのみこのように多種多様なフォスファゲンキナーゼを持つようになったのか、また進化の過程で、それらの酵素はどのようにして様々な基質に対する特異性を獲得するに至ったのか、これらは生物学的に特に興味を引く問題である。田中久美子氏の研究では、環形動物フォスファゲンキナーゼ遺伝子の進化、環形動物シマミズ・ロンブリシンキナーゼの基質認識機構、環形動物タマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼの基質認識機構、環形動物フォスファゲンキナーゼの基質特異性と進化について焦点を合わせ、これらの問題解決を通じて上記の問題にアプローチしている。これらの実験結果の一部は、既に田中久美子氏を筆頭著者とする2報の論文として出版されており、更に数編の論文の投稿が計画されている。以下に、研究業績の概要を列挙する。

1. 環形動物フォスファゲンキナーゼ遺伝子の進化

シマミズ・ロンブリシンキナーゼとタマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼの遺伝子構造(エキソン/イントロン配置)を解析した。二つの遺伝子構造は酷似しており、更に、他の環形動物のフォスファゲンキナーゼ遺伝子とも相同であった。また、これをクレアチンキナーゼアイソザイムの遺伝子構造と比較すると、ミトコンドリア型クレアチンキナーゼと相同であった。以上のことから、環形動物フォスファゲンキナーゼの祖先型遺伝子は、ミトコンドリア型クレアチンキナーゼ様のものであると推測された。

2. シマミズ・ロンブリシンキナーゼの基質認識機構

基質特異性が広いロンブリシンキナーゼの酵素特性を解明するため、様々なアミノ酸置換体を作成し、その酵素活性を詳細に調べ、酵素パラメータを求めた。作成した変異体のうち、K95Y変異体は、基質ロンブリシンよりタウロシアミンの方に対する基質親和性が高くなった。またK95I変異体では、両基質に対して野生型より触媒効率が増加した。以上のことから、シマミズ・ロンブリシンキナーゼは1アミノ酸を置換するだけで、酵素の性質が大きく変化することが分かった。これらの結果は、95番目アミノ酸残基は基質結合に直接関与していないが、基質認識に重要な役割を果たしているアミノ酸残基であることを示している。

3. タマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼの基質認識機構

タマシキゴカイのミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼは、ミトコンドリア型アイソザイムとして、ごく最近その所在が明らかになった。この酵素の特性を探るために、様々なアミノ酸置換体を作成し、その酵素特性を調べた。その中で最も興味深いK95Y変異体は、タウロシアミンに対し典型的な基質阻害を示し、そのKm値は最も小さい値となった(タウロシアミンに対する親和性が増大した)。この基質阻害機構を解明するために更なる変異導入を行った結果、K69A/K95Y, V71A/K95Yにおいて基質阻害が解除された。したがって、K95Yにおける基質阻害は、主にK69, V71, Y95によって引き起こされていると推測された。また、ガラバゴスハオリムシ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼにおいても同様な変異を導入したが、基質阻害は起こらなかった。したがって、この現象はタマシキゴカイ・ミトコンドリア型タウロシアミンキナーゼに特有のものである事が裏付けられた。

4. 環形動物フォスファゲンキナーゼの基質特異性と進化について

上述した結果を総合すると、環形動物のフォスファゲンキナーゼは基質認識が柔軟であり、通常の酵素のように、基質特異性が高い状態で存在しているのではないと考えられた。おそらく、環形動物祖先型のフォスファゲンキナーゼは、その基質特異性がかなり低く多くの基質に対応できる酵素であり、それが徐々に鋭い基質特異性を持つように進化していったものではないかと推察される。

以上の結果は、学術的に非常に優れたものであり、田中久美子氏は博士の学位を取得するに値すると考えられる。