

Suppression Subtractive Hybridization を用いて、硬骨魚類で浸透圧ストレスに關与するOsmotic Stress Transcription Factorsを調べました

Diego F. Fiol, Ph.D. and Dietmar Kultz, Ph.D.

Physiological Genomics Group, Department of Animal Science, University of California, Davis, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA

広塩性硬骨魚類の鰓は、外部の水環境に直接接する重要なエフェクター組織であるため、浸透圧ストレスへの適応を研究するための優れたモデルとなっています。我々は淡水 (FW) 由来のテラピア (*Oreochromis mossambicus*) を海水 (SW) に順化させ、鰓から調製した mRNAs に Suppression Subtractive Hybridization (SSH) を行い、高浸透圧ストレス下で急速に一過性に誘導される2つの転写因子、浸透圧ストレス転写因子1 (OSTF1) および転写因子IIB (TFIIB) のテラピアホモログを同定しました。OSTF1およびTFIIBが、転写調節により浸透圧への適応を媒介する、広塩性硬骨魚類における浸透圧感知シグナル伝達の重要なエレメントであると結論します。

はじめに

広塩性硬骨魚類は主に腎外のNaCl輸送により血漿浸透圧の恒常性を維持する浸透圧調節を持つ生物です。広塩性硬骨魚類は海水中では能動的に塩 (NaCl) を排出し、淡水中では主に鰓上皮を通して塩を能動的に吸収します。広塩性魚は淡水から海水へ順化している間、イオン輸送および透過に必要な変化に対処するため、鰓上皮が大幅に再構築されます。再構築には、鰓上皮細胞の新陳代謝の変化、鰓上皮細胞の分化パターンの変化、および浸透圧調節に能動的に関与する多くのイオン輸送体の発現と活性の変化が含まれます (1)。塩分の変化に対する多くの適応反応は転写調節に基づいています (2-7)。しかし、硬骨魚類における浸透圧ストレスに特異的な転写因子は同定されていませんでした。本研究では、広塩性テラピア (*Oreochromis mossambicus*) の鰓上皮から単離したmRNAsについて Suppression Subtractive Hybridization (SSH) を行いました。この手法を用いて、2つの新しい転写因子、浸透圧ストレス転写因子1 (OSTF1) および一般的な転写因子IIB (TFIIB) のテラピアホモログを同定しました。

モル浸透圧濃度によって制御される2つの転写因子のクローニング

淡水から海水、または淡水から淡水 (ハンドリングの対照) へと移して4時間経過した魚の鰓からtotal RNAを単離しま

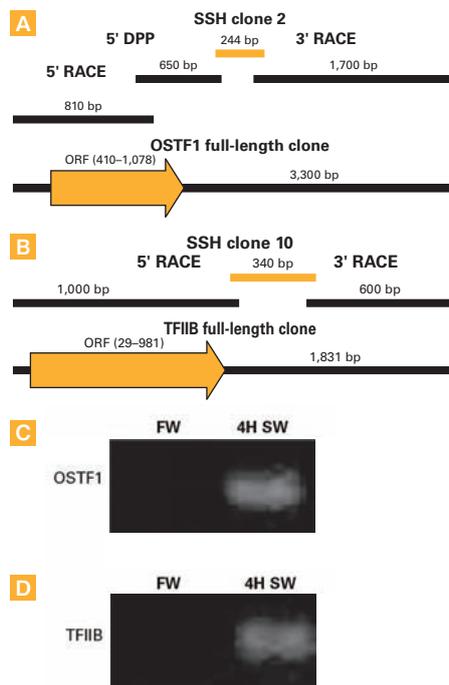


図1. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) によるOSTF1およびTFIIBの単離。

SSHクローン2 (パネルA) およびSSHクローン10 (パネルB) を、RACE (SMART RACE cDNA Amplification Kit) およびDPP (変性プライマーによるPCR) などのPCRベースの手法を用いて伸長させた。淡水 (FW) での魚 (対照) および海水 (SW) に4時間順化させた魚からの試料の半定量的なRT-PCR結果をパネルCおよびDに示しています。

した。さらにmRNAをNucleoTrap mRNA Purification Kitを用いて精製しました。海水条件の濃縮したcDNAのサブトラクテッドライブラリーを、ClontechのPCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Cat. No.637401) によるSSH-PCR法を用いて作製しました。オリジナルのSSHクローンの完全長コード配列を変性プライマーおよびClontechのSMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Cat. No.634914) を用いて得ました (図1パネルAおよびB)。淡水の魚および海水に4時間順化させた魚から採取した鰓上皮由来mRNA試料を用いた半定量的PCRにより、OSTF1およびTFIIBのmRNAが高浸透圧ストレス下で上方制御されることが確認されています (図1パネルCおよびD)。本研究のより詳細な報告は文献を参照してください (8)。

OSTF1およびTFIIBは高浸透圧ストレス下の前初期遺伝子である

SSHにより濃縮されたテラピアクローンは、主に3'UTR内に局在していました。SSHによって同定された配列が短く、またテラピアがモデル実験動物種でないにもかかわらず、Smart RACE技術を用いて、完全長配列を迅速に得ることが可能で、対応するクローンをOSTF1およびTFIIBであると同定することができました。定量的なリアルタイムPCR (qPCR) から、この2つの転写因子の浸透圧による誘導は一過性であり、同様な発現経過パターンが示されました (図2)。OSTF1およびTFIIBは高浸透圧ストレス下で同時に誘導され、前初期遺伝子 (IEGs) に特有の誘導速度を示します。特異的な抗体を用いた免疫ブロッキングにより評価した高浸透圧ストレス後のOSTF1およびTFIIBタンパク質の量の変化は、mRNA誘導の場合とわずかな遅延が認められましたが類似していました (図3)。このOSTF1およびTFIIBの高浸透圧によるタンパク質レベルでの発現の誘導は、これが機能的に重要であることを示しています。

2つの転写因子の誘導は、明らかに環境中の塩分の上昇の程度に依存しています (図4)。対照的に、魚の酸化ストレス (1mM H₂O₂) または熱ショック (36°C) への暴露により、OSTF1およびTFIIBのmRNA量は上昇しません (図4)。酸化ストレスおよび熱ショックが魚にとってストレスのある状態であることを確認するため、同じ試料中でHsp70の誘導を定量しました。データから、OSTF1およびTFIIBの誘導は浸透圧ストレスに極めて特異的であることが示されています。

OSTF1はリシンジッパー構造を有する転写因子TSC-22 / GILZ (トランスホーミング増殖因子TGFβで刺激したクローン22 / グルココルチコイド誘発性ロイシンジッパー) タンパク質ファミリーに属しています。これらのタンパク質は他のファミリーメンバーとホモ及びヘテロ二量体を形成します (少なくとも哺乳類では7種類、硬骨類では5 ~ 10種類)。TSC-22 / GILZファミリーメンバーの機能について認められていることから、OSTF1は高浸透圧ストレスに対する素早い応答において主要な役割を果たしているようです。OSTF1とは異なり、TFIIBは一般的な

Suppression Subtractive Hybridization を用いて、硬骨魚類で浸透圧ストレスに關与するOsmotic Stress Transcription Factorsを調べました …続き

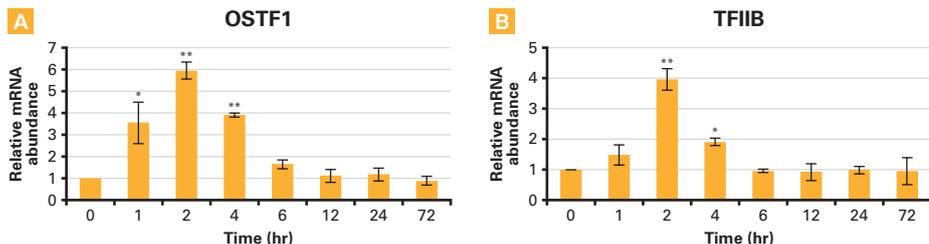


図2. OSTF1およびTFIIBのmRNAsの高浸透圧による誘導。
OSTF1 (パネルA) およびTFIIB (パネルB) の転写因子量を定量的RT-PCRを用いて分析しました。実験は4回実施しました (n=4)。データは平均値±SEMとして示しており、対照試料 (0hr = FW) と比較してp<0.05 (*) およびp<0.01 (**).

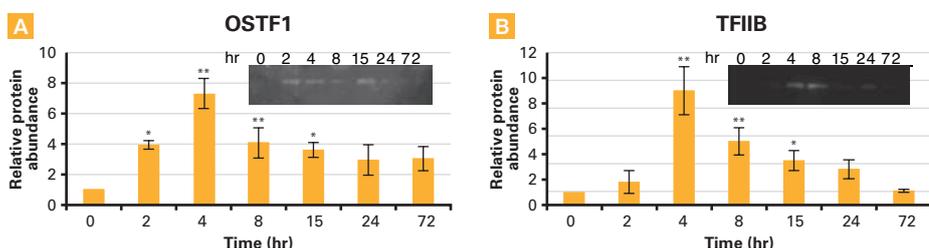


図3. OSTF1およびTFIIBタンパク質の量に関する高浸透圧による誘導の時間経過分析。
OSTF1 (パネルA) およびTFIIB (パネルB) タンパク質レベルをウェスタンブロットにより分析し、さらにデンストメトリーによって定量化しました。典型的なウェスタンブロットを挿入部分に示しています。実験は4回実施しました(n=4)。データは平均値±SEMとして示しており、対照試料(0hr = FW) と比較してp<0.05 (*) およびp<0.01 (**).

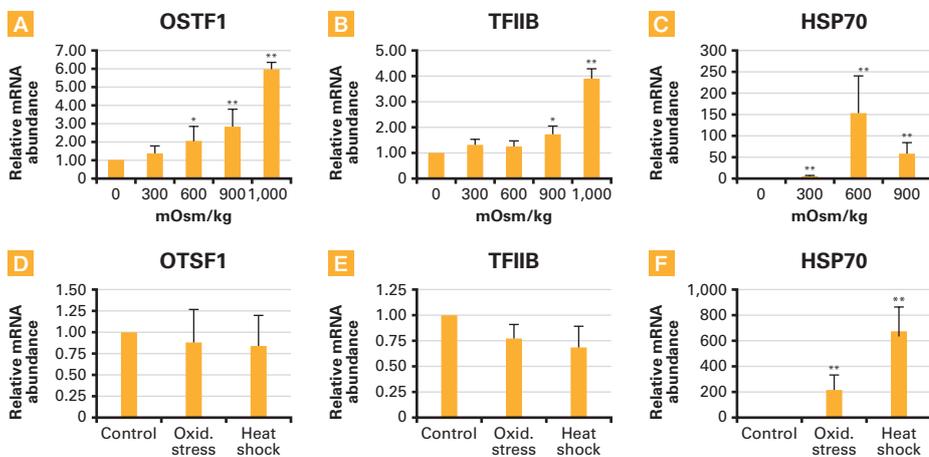


図4. 高浸透圧、酸化 (1mM H₂O₂)、および熱 (+10°C) ストレス下でのOSTF1、TFIIB、およびHsp70のmRNA発現の解析。

異なる塩濃度 (パネルA、B、C)、酸化ストレスまたは熱ショック (パネルD、E、F) に2時間暴露した魚のOSTF1 (パネルA、D)、TFIIB (パネルB、E)、Hsp70 (パネルC、F) の転写物の量を定量的RT-PCRにより測定しました。実験は4回実施しました (n=6)。データは平均値±SEMとして示しており、対照試料 (FW、26°C) と比較してp<0.05 (*) およびp<0.01 (**).

転写因子であり、その高浸透圧による誘導は予測されませんでした。高浸透圧によるTFIIB誘導に関しては、現在のところ解明されていませんが、高浸透圧スト

レス下でのクロマチン凝縮および転写効率の低下を補うために必要である可能性があります (9)。

結論

SSH法により、テラピアの浸透圧調節に關与する2つの新規の転写因子を同定することが出来ました。ストレス下におけるTFIIB mRNAの誘導は古細菌および酵母において以前すでに認められています (10,11)。テラピアの鰓においてTFIIBが同時に誘導されるのは、OSTF1がTFIIBを浸透圧保護に働く遺伝子として選択的に発現させているためと考えられます。この仮説と一致して、TFIIBはストレス下において、NF-κB、c-jun、およびp53等の他の転写因子と相互作用しますが、ストレス応答性遺伝子の転写を促進するためTFIIBがこれらの遺伝子を標的にしていることを示唆しています (12)。

参考文献

- Evans, D. H. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**(3):336-347.
- Tipsmark, C. K., et al. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**(2):106-118.
- Mistry, A. C., et al. (2001) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol* **281**(5):R1594-R1604.
- Takeuchi, K., et al. (2000) *Fish Physiol. Biochem.* **23**(2):173-182.
- Cutler, C. P. & Cramb, G. (2002) *J. Exp. Biol.* **205**(Pt 17):2643-2651.
- Kültz, D., et al. (2001) *J. Exp. Biol.* **204**(Pt 17):2975-2985.
- Mistry, A. C., et al. (2001) *Biochem. J.* **360**(Pt 1):107-115.
- Fiol, D. F. & Kültz, D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(3):927-932.
- Kültz, D. (2000) *Environmental Stressors and Gene Responses*, eds. Storey, K. B. & Storey, J. (Elsevier, pp. 157-179.
- Thompson, D. K., et al. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**(5):1081-1092.
- Hoopes, B. C., et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**(22):4435-4443.
- Espinosa, J. M., et al. (2003) *Mol. Cell* **12**(4):1015-1027.

Notice to Purchaser

Data reprinted from The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 102(3), D. F. Fiol & D. Kultz, "Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells," pages 927-932, ©2005. This work was supported by a grant from the National Science Foundation to DK (MCB 0244569). The Clontech PCR-Select™ legal statement. (27ページ参照)