

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 10 年度博士課程 進学
氏 名 船原 大輔
指導教官 渡部 終五

論文題目 Studies on the regulatory system for catch contraction
of mussel anterior byssus retractor muscle
(ムラサキイガイ前足牽引筋キャッチ運動の制御機構に関する研究)

イガイ類 *Mytilus edulis* 前足牽引筋 (anterior byssus retractor muscle, ABRM) は、低エネルギー消費で長時間にわたり張力を維持できる筋肉として古くからよく知られている。ABRM はアセチルコリンの刺激により収縮を開始し、この物質を除去しても張力は持続する。このキャッチ状態はセロトニンにより解除され、筋肉は弛緩する。その際、筋細胞内に cAMP が蓄積されることから、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (A キナーゼ) によるタンパク質のリン酸化が、キャッチ筋の弛緩に重要な働きをしていると考えられてきた。当該筋細胞内の A キナーゼ標的タンパク質として、ミオシン重鎖および軽鎖、さらにはパラミオシンが候補にあがってきたが、生体内での真の基質は永らく不明であった。ところが最近、Siegman ら (1997) は ABRM のキャッチ解除時に ~600 kDa のタンパク質がリン酸化することを *in vivo* で明らかにした。しかしながら、本タンパク質の詳細については不明のままとされてきた。

本研究は、このような背景の下、まず、ABRM ~600 kDa 成分の同定を試みた。次いで、本成分につき *in vitro* でのリン酸化を検討し、リン酸化アミノ酸および周辺領域のアミノ酸配列を調べた。さらに、リン酸化部位を特定するために、cDNA クローニングを行った。一方、ABRM から新規 45 kDa タンパク質を単離し、その同定と、アクトミオシンや上記 ~600 kDa 成分との反応性を調べたもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. ムラサキイガイ ABRM キャッチ運動制御タンパク質~600 kDa 成分の同定

ABRM ~600 kDa 成分はその分子量から、タイチン/コネクチンファミリー分子の twitchin であると予想された。そこで、既報のホタテガイ近縁種 *Placopecten magellanicus* 閉殻筋 twitchin の精製法を参考に、ムラサキイガイ *M. galloprovincialis* ABRM から~600 kDa 成分の精製を試みた。まず、陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、~600 kDa 成分を含む溶出画分を集めた。さらにこの画分をゲルろ過に供して精製を試みたところ、SDS-PAGE 分析で単一のバンドを示す標品が得られた。この標品につき、アミノ酸組成分析を行ったところ、線虫 *Caenorhabditis elegans* 体壁筋 twitchin のものとよく類似することが示された。次に、ABRM 精製標品のリシルエンドペプチダーゼ消化物を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写し、単離ペプチドの N 末端アミノ酸配列を分析した。その結果、VRTGTPKVDNYD KYYHDLVKKYVPQAVAV および PFDKPDFPGVPEINE の配列が得られ、それぞれ *C. elegans* twitchin キナーゼドメインの N 末端に隣接する配列、およびイムノグロブリン様モチーフの配列と高い相同性を示した。以上の結果から、ABRM ~600 kDa 成分を twitchin と同定した。

2. ムラサキイガイ ABRM twitchin の *in vitro* リン酸化

まず、ABRM twitchin 精製標品に、重量比 1/200 の市販の A キナーゼ触媒サブユニットを添加して、pH 7.5, 25°C, 1 mM ATP 存在下でリン酸化反応を行った。その結果、反応開始後わずか 1 分ほどで最大リン酸化量、twitchin 1 モルあたり 3 モルの取り込みが認められた。同様の反応を A キナーゼ非存在下で行ったところ、twitchin 1 モルあたり 0.5 モルのリン酸が取り込まれた。この反応は 10 μ M A キナーゼインヒビターで完全に阻害されたが、10 μ M wortmannin および 30 μ M ML-9 ではほとんど阻害されなかったことから、前述の自己リン酸化は精製標品に混入した A キナーゼによるものと考えられた。次に、リン酸化 twitchin を重量比 1/100 のトリプシンで 10°C 処理し、経時的に試料を採取して、リン酸化部位の挙動を調べた。その結果、分子量 1 万以下のリン酸化部位を含む消化断片は速やかに遊離したものの、大部分は高分子量のまま維持された。したがって、twitchin のリン酸化部位は分子の末端に局在することが示唆された。

次に、リン酸化 twitchin を 6 N HCl 存在下、110°C で 90 分間加水分解した後、セルロースプレートを用いた薄層電気泳動に付して分析したところ、リン酸化アミノ酸はセリンと同定された。さらに、リン酸化 twitchin に重量比 1/50 のトリプシンで 37°C, 24 時間反応させて twitchin を完全に消化した後、リン酸化ペプチドを ODS カラムを用いた HPLC 逆相クロマトグラフィーで単離した。得られたリン酸化ペプチドのアミノ酸配列は **RPS*LVDVIPD QPTLQHR** および **RPS*MSPAPEV** と決定され、下線で示した配列は A キナーゼの典型的な認識配列とよく一致した。なお S* はリン酸化セリンを表す。便宜上、これらペプチドをそれぞれ D1 および D2 とした。

3. ムラサキイガイ ABRM twitchin の cDNA クローニング

ムラサキイガイ ABRM から常法により調製した全 RNA を鋳型に、さらに第 1 節で得られた部分アミノ酸配列を参照して作成した縮合プライマーを用いて PCR を行った結果、キナーゼドメインをコードするクローンが得られた。塩基配列から演繹されたアミノ酸配列は、アメフラシ類 *Aplysia californica* 歯舌筋 twitchin のキナーゼドメインと約 80%、*C. elegans* twitchin のそれと約 70% の相同性を示した。次に、新たに決定した塩基配列をプライマーに 3' および 5' RACE を行った。3' RACE の結果、ポリ A テールを含む約 3 kbp のクローンが得られた。さらに、決定した領域の塩基配列を基に順次プライマーを作成して、連続的に 13 回の 5' RACE を行った結果、最終的に 4,536 アミノ酸残基のコード領域を含む 15.5 kbp の塩基配列が決定された。演繹アミノ酸配列につき Pfam ソフトウェアでモチーフ構造を解析したところ、キナーゼドメインのほかフィブロンネクチン様モチーフとイムノグロブリン様モチーフの繰り返し構造が明らかになった。前節でアミノ酸配列を決定したリン酸化ペプチド D1 および D2 は、それぞれ N 末端から 873-889 および 4,114-4,123 残基目に位置することが示された。さらに、808-814 残基目にも RRPSLVD の配列が存在し、リン酸化量が 3 モル/モル twitchin であることから、この領域もリン酸化することが示唆された。

4. ムラサキイガイ ABRM カルポニン様タンパク質の精製とその性状

ムラサキイガイ ABRM 筋原線維を二次元電気泳動に供したところ、約 45 kDa 付近に新規タンパク質成分のスポットが認められた。そこでまず、ABRM から 45 kDa 成分を陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、本標品に重量比 1/100 のキモトリプシンで 37°C、5 分間消化した。消化物を SDS-PAGE に供した後、PVDF 膜に転写して得られたペプチドにつき N 末端アミノ酸配列分析したところ、ASKGMTSFGAVRHH および GMDRALISKMGSK YDSGL の配列が得られ、いずれも他生物種由来のカルポニン関連タンパク質の相同領域と高いアミノ酸同一率を示した。また、本 45 kDa 成分は、市販の抗ニワトリ平滑筋カルポニン抗体と強く反応した。得られたアミノ酸配列を基にプライマーを作成し、PCR による cDNA クローニングを行った結果、全長 403 アミノ酸残基をコードする 1,840 bp のクローンが得られた。演繹アミノ酸配列は、既知のカルポニンおよびカルポニン様タンパク質と高い相同性を示したことから、ABRM 45 kDa タンパク質をカルポニン様タンパク質と同定した。

次に、ABRM カルポニン様タンパク質のアクトミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性に及ぼす影響を調べた。本タンパク質を ABRM アクトミオシンに対し重量比 1/10 および 1/1 加えたところ、 Mg^{2+} -ATPase 活性はそれぞれ 12 および 41% 阻害された。さらに、twitchin の D2 リン酸化部位を含む 3,997-4,227 残基の領域をグルタチオン S トランスフェラーゼ融合タンパク質として大腸菌で発現させてプローブとし、ABRM カルポニン様タンパク質を対象にウェストウェスタンを行った。その結果、当該リン酸化部位はカルポニン様タンパク質と結合することが示された。以上の結果から、ムラサキイガイのカルポニン様タンパク質が twitchin と共同してキャッチ運動を制御している可能性が示唆された。

以上、本研究により、ムラサキイガイ ABRM が弛緩する際にリン酸化されるタンパク質は twitchin と同定され、本 twitchin は *in vitro* で A キナーゼによって 1 モルあたり 3 モルのリン酸を取り込むことが示された。また、cDNA クローニングによって本 twitchin はフィブロネクチン様モチーフとイムノグロブリン様モチーフの繰り返し構造とキナーゼドメインから構成され、リン酸化部位を分子末端付近に含むことが明らかにされた。さらに、ABRM からカルポニン様タンパク質を同定し、本タンパク質がアクトミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性を阻害し、twitchin と相互作用することを示した。以上のように本研究は永らく不明であった軟体動物筋肉のキャッチ収縮機構につき、分子レベルからその一端を明らかにしたもので、これらの成果は筋生理学上および比較生化学上に資するところが大きいものと考えられた。