

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 船 原 大 輔

ムラサキイガイ前足牽引筋 (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キャッチ運動を行う。最近、ABRMのキャッチ解除時に~600kDaのタンパク質がリン酸化することが明らかになったが、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。そこで本研究は、ABRM~600kDa成分の同定を試み、さらに本成分につき *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るとともに、cDNAクローニングを行った。一方、ABRMから新規45kDaタンパク質を単離し、その同定と、アクトミオシンや上記~600kDa成分との反応性を調べた。

まず、ムラサキイガイ ABRM から陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過を用いて~600kDa成分を精製した。この標品のアミノ酸組成は線虫 twitchin のものとよく類似した。次に、精製標品の内部アミノ酸配列を分析した結果、VRTGTPKVDNYDKYYHDLVKKYVPQAVAV および PFDKPDFPGVPEINE の配列が得られ、それぞれ線虫 twitchin と高い相同性を示した。以上の結果から、ABRM~600kDa成分を twitchin と同定した。

次に、ABRM twitchin の A キナーゼによるリン酸化反応を行った。その結果、1 モルあたり 3 モルのリン酸が取り込まれた。また、本 twitchin に自己リン酸化能は認められなかった。次に、リン酸化 twitchin のトリプシンによる消化パターンを調べたところ、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。リン酸化アミノ酸はセリンと同定され、さらにリン酸化 twitchin のトリプシン完全消化物から単離したリン酸化ペプチドのアミノ酸配列は、RPSLV DVIPDQPTLQHR および RPSMSPAPEV と決定され、それぞれ 3 残基目のセリンがリン酸化していた。便宜上、これらペプチドをそれぞれ D1 および D2 とした。さらに、cDNA クローニングの結果、4,536 アミノ酸残基のコード領域を含む 15.5kbp の塩基配列が決定された。演繹アミノ酸配列の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。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 残基に位置した。

次に、ABRM 筋原線維を二次元電気泳動に供したところ、約 45kDa 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、本 45kDa 成分を陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。内部アミノ酸配列分析したところ、ASKGMTSFGAVRHH および GMDRALISKMGSKYDSGL 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と高い相同性を示した。また、本 45kDa 成分は、市販の抗カルポニン抗体と強く反応した。cDNA クローニングの結果、全長 403 アミノ酸残基をコードする 1,840bp 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、45kDa成分をカルボニン様タンパク質と同定した。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領域を大腸菌で発現させてプローブとし、カルボ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ボニン様タンパク質と結合することが示された。

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、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からカルボ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もので、学術上、応用上に寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。