

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 13 年度博士課程 入学
氏 名 黄 銘 志
指導教官 渡部 終五

魚類筋肉トロポミオシンの一次構造と熱安定性に関する研究

魚類の骨格筋においては哺乳類のものと同様に、ミオシンを主体とする太い繊維と、アクチンを主体とする細い繊維が交互に規則正しく配列している。細い繊維上に存在するトロポミオシンは、筋収縮の Ca^{2+} 制御に関わる調節タンパク質の一つである。トロポミオシンの分子量は約 33,000 で、分子のほぼ全長が α -ヘリックス構造をとり、さらに 2 つのサブユニットが特有のコイルドコイル構造を形成している。魚類筋肉のトロポミオシンについては、これまでに電気泳動分析によるアイソフォームの分離、また数魚種については cDNA クローニングによる一次構造解析が行われ、さらに熱安定性における種特異性についての報告がなされている。しかし、一次構造と熱安定性とを関連づけた報告は示されていない。

このような背景の下、本研究では まず、水産上重要魚種で、しかも比較生化学的に興味深い 2 魚種、すなわちスケトウダラ *Theragra chalcogramma* およびクロマグロ *Thunnus thynnus* につき、速筋(普通筋)のトロポミオシンをコードする cDNA をクローニングして塩基配列を決定し、アミノ酸配列を演繹した。さらに cDNA の配列が既知の数魚種の普通筋からトロポミオシンを調製し、示差走査熱量(DSC)分析および円二色性(CD)分析により、

加熱変性のパターンを比較し、構造安定性に重要なアミノ酸の同定を試みた。得られた成果の概要は以下のとおりである。

トロポミオシン cDNA のクローニングと一次構造解析

スケトウダラおよびクロマグロの普通筋から構築した cDNA ライブラリーを用い、シログチ *Pennahia argentata* および他種生物トロポミオシンの相同性の高い配列に基づいて作成した数種の縮重プライマーを用い、RACE 法によりトロポミオシン全長をコードする cDNA クローンを得た。両魚種のトロポミオシン cDNA は 855bp のコード領域を持ち、284 個のアミノ酸をコードしていた。しかし、5'および 3'側の非コード領域の長さには差が認められた。すなわち、スケトウダラ・トロポミオシン cDNA は 1,168 塩基からなり、5'側および 3'側非翻訳領域がそれぞれ 97 および 276 塩基であった。一方、クロマグロのものではそれぞれ 1,220、156 および 206 塩基であった。両者のコード領域の塩基配列の同一率は 93.5%、アミノ酸配列の同一率は 96.5%であった。データベース上の他動物種の演繹アミノ酸配列と比較すると、スケトウダラ・トロポミオシンは大西洋サケ *Salmo salar* のものおよびウサギ速筋 α 鎖に対してそれぞれ 95.8%および 94.0%、クロマグロ・トロポミオシンではそれぞれ 94.7%および 93.7% と高い同一率を示した。Head-to-tail 重合に必須な N 末端の 12 残基および C 末端の 8 残基、さらに 2 つのサブユニットの結合に重要な Cys190 は、いずれのトロポミオシンでも保存されていた。また、両魚種のトロポミオシンはグルタミン酸、リシン、アラニン、ロイシンに富み、フェニルアラニンは 1 残基のみで、トリプトファンは含まれなかった。疎水性残基はコイルドコイルの 7 残基($a - g$)繰り返し構造の a および d の位置に偏って存在し、疎水性コアの形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

脊椎動物各種のトロポミオシンのアミノ酸配列をもとに Clustal W を用い、近隣結合法によって分子系統樹を作成した。その結果、魚類のトロポミオシンは哺乳類のものからほぼ同程度離れており、一つのクラスターを形成した。スケトウダラ・トロポミオシンは大西洋サケのもの、クロマグロ・トロポミオシンはシログチのものと、それぞれ最も近縁であることが示された。

二次構造および三次構造の推定

GOR IV および SWISS-MODEL を用いて、演繹アミノ酸配列をもとに二次構造および三次構造の予測を行った。その結果、分子の骨格はほぼ α -ヘリックスで構成されており、他の脊椎動物のものと同様の構造をとることが示唆された。また、Kyte and Doolittle (1982) に従い hydrophathy plot を行ったところ、N 末端から 170 残基目付近に特に疎水性が強い部

分、220 残基付近に親水性が強い部分が認められた。そのほか、分子の両末端および分子内の 3 箇所短いランダムコイルが認められ、特に前者はトロポミオシン分子の head-to-tail 重合に必須の構造と考えられた。さらに、わずかに数残基の違いが三次構造に大きく影響することが示唆された。

トロポミオシンの精製と諸性状の比較

先に、cDNA クローニングを行ったスケトウダラおよびクロマグロ、さらにデータベース上で塩基配列が得られる大西洋サケ、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、トラフグ *Takifugu rubripes* およびシログチにつき、まず常法によりアセトンパウダーを調製した。ウサギ速筋も対照として用いた。トロポミオシンの抽出は 1 M KCl 存在下で行い、pH 4.5 における等電点沈殿、および硫酸分画 (50-60%飽和分画) を繰り返し、高純度の標品を得た。標品を α -キモトリプシンなどで限定分解し、生じたフラグメントについて N 末端アミノ酸配列を調べたところ、先に演繹したアミノ酸配列と一致したことから、クローン化された cDNA はトロポミオシン遺伝子由来のものであることが確認された。MALDI/TOF マススペクトロメトリーで分子量を測定した結果、スケトウダラおよびクロマグロ・トロポミオシンでそれぞれ、33,429 および 32,919 と、演繹アミノ酸配列から得られた計算値(それぞれ、32,588 および 32,649) よりも大きかったことから、いずれも翻訳後修飾を受けていることが示唆された。エドマン分解による N 末端アミノ酸の解読ができなかったことから、同末端のアセチル化などの可能性が考えられるが、分子量の差から他にも修飾部位がある可能性も高い。

一方、二次元電気泳動分析の結果、スケトウダラ・トロポミオシンでは主成分と同じ分子量で、等電点がわずかに酸性側の微量成分が認められ、リン酸化されたものであると考えられた。クロマグロの場合、分子量と等電点が接近したほぼ等モル比の 2 成分が確認された。哺乳類の場合に習い、便宜的に分子量の小さい方を α 成分、大きい方を β 成分と名づけたが、先にクローン化した cDNA は α 成分をコードするものであることが確認された。 β 成分の内部アミノ酸配列を調べたが、数残基を除き α 成分と同じであることを認めており、哺乳類の β 成分には相当しないことが示唆された。

トロポミオシンの熱力学的性状の比較

次に、トロポミオシン標品を 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, 10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0) に透析後、タンパク質濃度を 1 mg/mL に調製し、DSC 分析および CD 分析に供した。DSC 分析において、スケトウダラ・トロポミオシンでは転移温度 T_m が 43.9°C の単一の吸熱ピークを示し、カロリメトリーエンタルピー ΔH_{cal} は 424 kcal/mol であった。一方、クロマ

グロのものでは T_m が 29.3 および 41.5°C の 2 つの吸熱ピークが得られ、カロリメトリーエンタルピー ΔH_{cal} はそれぞれ 164 および 291 kcal/mol であった。しかし、低温側の吸熱ピークは同一試料について再度測定した場合は認められず、冷却後の refolding が不完全であることが示唆された。CD 分析の結果、いずれのトロポミオシンでも 222 および 208 nm において極小を示す、 α -ヘリックスに特異的なパターンが認められた。スケトウダラ・トロポミオシンの 4°C および 20°C における α -ヘリックス含量はそれぞれ 95.5% および 89.0% で、58°C まで加熱した後 21°C に冷却すると 82.4% にまで回復した。クロマグロ・トロポミオシンの場合はそれぞれ、80.3% (4°C)、70.3% (20°C) および 53.3% (21°C に冷却後) で、加熱、冷却後の refolding が不完全であるという DSC の結果を裏付けた。 α -ヘリックス含量の温度・減少率曲線と DSC パターンを重ねたところ、両者のピークが完全に一致した。このことは、熱変性におけるトロポミオシンの構造変化が疎水性コアの解離ではなく、ヘリックス構造の崩壊によるものであることを強く示唆している。他魚種のトロポミオシンも 40°C 付近に吸熱ピークを示したが、種により T_m 値や変性パターンに明確な相違が認められた。一次構造を比較したところ、27、83 および 135 番目（コイルドコイル上の位置はそれぞれ、 f 、 f および b ）のアミノ酸に種間変異が多く認められ、これらの位置のアミノ酸が構造安定性に大きく関わることを示唆された。

以上、本研究により魚類筋肉のトロポミオシンの一次構造が 2 魚種について新たに明らかにされ、数魚種のものについては熱力学的性状の一端が解明され、さらに熱安定性に関わるアミノ酸残基がほぼ同定できた。本研究は、魚類筋肉トロポミオシンの熱安定性を一次構造との関連性から初めて明らかにしたもので、その成果は比較生化学ならびに水産利用上、資するところが大きいと考えられる。