

[別紙2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 黄 銘 志

骨格筋は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が、筋収縮の  $\text{Ca}^{2+}$  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 (以下、TM と略記) は細い繊維上に存在する。魚類筋肉の TM については、一次構造と熱安定性とを関連づけた報告はこれまでにない。本論文では、まず水産上の重要種で、比較生化学的にも興味深いスケトウダラ *Theragra chalcogramma* およびクロマグロ *Thunnus thynnus* につき、速筋の TM 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ている。さらに cDNA の配列が既知の数魚種から TM を調製し、示差走査熱量 (DSC) 分析および円二色性 (CD) 分析により熱力学的特性を比較し、構造安定性に重要なアミノ酸の同定を試みている。

第1章では上記2魚種 TM の cDNA のクローニングと一次構造解析を行った。すなわち、両魚種の速筋から構築した cDNA ライブラリーを用い、RACE 法等により TM 全長をコードする cDNA クローンを得た。2つの TM の cDNA はともに 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。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。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、さらにサブユニット間の結合に重要な Cys190 は保存されていた。また、両魚種の TM は Glu、Lys、Ala、Leu に富み、Phe は 1 残基のみで、Pro と Trp 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 の位置に偏在し、疎水性コアの形成に重要な役割を担うことが示唆された。

脊椎動物各種の TM のアミノ酸配列をもとに Clustal W を用いて近隣結合法によって作成した分子系統樹において、魚類 TM は哺乳類 TM 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 TM は大西洋サケ TM と、クロマグロ TM はシログチ TM と、それぞれ最も近縁であることが示された。次に、演繹アミノ酸配列をもとに二次構造の予測を行ったところ、分子のほぼ全長が  $\alpha$ -ヘリックスで構成されており、他の脊椎動物 TM と同様の構造をとることが示唆された。Hydropathy plot では、N 末端から 170 残基目付近に特に疎水性が強い部分、220 残基目付近に親水性が強い部分が認められた。

第2章では、数種魚類から TM を精製し、諸性状の比較を行った。すなわち、先に cDNA クローニングを行った2魚種、および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、トラフグおよびシログチにつき、速筋のアセトンパウダーから 1 M KCl 存在下で TM を抽出し、pH 4.5 における等電点沈殿、および硫安分画 (50-60% 飽和分画) を繰

り返し、高純度の標品を得た。マスペクトルによる分子量がいずれの魚種でも演繹アミノ酸配列に基づいた計算値よりも 300 - 800 程度大きかったことから、翻訳後修飾を受けていることが示唆された。一方、クロマグロ TM では、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。便宜的に分子量の小さい方を $\alpha$ 成分、大きい方を $\beta$ 成分と名づけたが、先にクローン化した cDNA は $\alpha$ 成分をコードするものであることを確認した。

第 3 章では、上記魚種の TM の熱力学的性状を比較した。DSC 分析において、スケトウダラ TM は転移温度  $T_m$  が 43.9°C の単一の吸熱ピークを示したが、クロマグロ TM 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。一方、 $\alpha$ -ヘリックス含量の温度・減少率曲線と DSC パターンのピークは完全に一致し、熱変性における TM の構造変化がヘリックス構造の崩壊によるものであること強く示唆された。他魚種の TM 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。6 魚種の TM の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ということが示唆された。

以上、本論文では、魚類筋肉の TM 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 TM 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された。本論文は、魚類筋肉 TM 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、その成果は学術上、応用上資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。