

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on molecular mechanisms underlying high pressure adaptation of
α-actin from deep-sea fish
(深海魚 α-アクチンの高水圧適応の分子機構に関する研究)

氏名 森田 貴己

魚類には水深 6000 m にも及ぶ深海に生息している種が知られている。海洋は水深 10 m 毎に水圧が約 1 気圧上昇することから、水深 6000 m では約 600 気圧の水圧が生じていることになる。こうした高水圧は化学反応の法則のもとにある生物の様々な生体機能に悪影響することが知られている。深海魚といえども、その生体機能は浅海性魚類や陸上動物のそれと基本的に変わらないと考えられる。このため深海魚の高水圧適応機構については古くから関心が持たれ多くの研究が行われてきた。しかしながら、生体機能の根幹を成すタンパク質について構造と高水圧下での機能との関係を明らかにした報告はこれまでにない。

このような背景の下、本研究では深海性ソコダラ類のヨロイダラ *Coryphaenoides armatus* およびシンカイヨロイダラ *C. yaquinae* の骨格筋 α-アクチンを cDNA クローニングし、演繹アミノ酸配列から高水圧適応に関わるアミノ酸を推定した。そして、両深海魚から精製した α-アクチンの高水圧下での生化学的性状を調べて数種の動物から精製したものと比較し、高水圧適応に必須のアミノ酸を同定した。得られた成果の概要は以下の通りである。

ホカケダラ属 (*Coryphaenoides*) の分子系統樹の作成

ホカケダラ属のソコダラ類は、浅海から深海と幅広い水深に生息する同属種が存在することから、深海魚の特性を探る様々な研究に用いられている。本研究ではまず、比較生化学研究を行う対象魚を選択することを目的として本属の分子系統樹を作成した。ホカケダラ属の深海性ソコダラ類ヨロイダラおよびシンカイヨロイダラと、浅海性ソコダラ類イバラヒゲ *C. acrolepis*、カラフトソコダラ *C. cinereus*、ムネダラ *C. pectoralis*、ヒモダラ *C. longifilis* およびハナソコダラ *C. nasutus*、アウトグループとしてテナガダラ属テナガダラ *Abyssicola macrochir* とトウジン属オニヒゲ *Caelorinchus gilberti* の各魚種からミトコンドリア 12S rRNA および cytochrome oxidase subunit I (COI) 遺伝子の配列をそれぞれ 829 bp および 444 bp 決定した。次に、12S rRNA および COI 遺伝子の各配列から最大節約法、近隣接合法および最尤法の 3 描画法を用いて分子系統樹を作成した。12S rRNA の配列から得られた系統樹は 3 描画法とも同一の樹形を示したが、COI 遺伝子の配列では 3 描画法とも異なった樹形を示した。そこで 12S rRNA と COI 遺伝子の両配列を組み合わせ、系統樹を作成した。その結果、描画法によらず信頼性の高い一つの系統樹が得られ、本系統樹から深海性および浅海性ソコダラ類がホカケダラ属の進化の初期の段階で分岐したことが示された。形態的特徴やペプチドマッピングによるこれまでの系統樹では、深海性ソコダラ類がホカケダラ属の進化の最終段階で分岐されていた。本研究で用いた解析方法はこれまでのものより信頼性が高いことが既に知られている。以上の系統樹解析を参考に、深海性ソコダラ類であるヨロイダラおよびシンカイヨロイダラの比較対象魚として、浅海性ソコダラ類からイバラヒゲおよびカラフトソコダラを選択した。

深海性ソコダラ類 α -アクチンの高水圧下での性状変化

深海性ソコダラ類のヨロイダラおよびシンカイヨロイダラ、浅海性のソコダラ類イバラヒゲ、淡水魚のコイおよび陸上動物のニワトリの骨格筋から α -アクチンを精製し、高水圧下での性状を調べた。まず、アクチンの重合に要する時間を調べたところ、深海性ソコダラ類の α -アクチンは 60 MPa (600 気圧) で大気圧の 2.7 倍の時間を要した。これに対して、深海性ソコダラ類以外の α -アクチンは、圧力が 10 MPa を越えると重合に要する時間が急激に長くなり、60 MPa では大気圧の 5.6-7.3 倍にも達した。次に、各 α -アクチンの重合の臨界濃度を調べた結果、深海性ソコダラ類は 20 MPa 以下の圧力では他の生物よりも高い濃度を必要としたが、20 MPa を越えてもその濃度は、ほとんど変化しなかった。一方、深海性ソコダラ類以外の生物の α -アクチンは 20 MPa を越えると臨界濃度が上昇し、深海性ソコダラ類のそれより高い値となった。続いて、重合に伴

う α -アクチンの体積増加量を調べたところ、深海性ソコダラ類の α -アクチンは大気圧下においても増加量が少なく、圧力が上昇してもこの性質は変化しなかった。一方、浅海性ソコダラ類とニワトリの α -アクチンは圧力上昇に伴って体積増加量が減少し、この変化は重合アクチンの体積の減少によることが推定された。コイの α -アクチンは他とは異なり、圧力上昇に伴って体積増加量も上昇した。この変化は、単量体アクチンの体積の減少に基づくことが推定された。

深海性ソコダラ類 α -アクチンの cDNA クローニング

深海性ソコダラ類のヨロイダラおよびシンカイヨロイダラと浅海性ソコダラ類のイバラヒゲの骨格筋から cDNA ライブラリー法により、他の浅海性ソコダラ類カラフトソコダラの骨格筋からは PCR 法により α -アクチンの cDNA クローニングを行った。その結果、4 種類のソコダラからそれぞれ 2 タイプずつの α -アクチン cDNA が単離された。近隣接合法を用いて塩基配列をクラスター解析したところ、浅海性ソコダラ類の α -アクチンはアクチン-1 とアクチン-2a の 2 タイプに、深海性ソコダラ類の α -アクチンはアクチン-2a とアクチン-2b の 2 タイプに分類された。ノザンプロット解析および定量 RT-PCR 法によって、これら 3 タイプの α -アクチン mRNA はいずれも骨格筋中での発現が確認された。その存在比はアクチン-1/2a が 0.67、アクチン-2b/2a が 4.1-4.3 であった。2 次元電気泳動法によってアクチン-2b/2a のタンパク質重量比は 4.5-4.8 と測定され、mRNA の存在比とほぼ一致した。

深海性ソコダラ類 α -アクチンの高水圧適応に必須のアミノ酸の同定

演繹アミノ酸配列において、深海性ソコダラ類に特異的なアクチン-2b タイプは、浅海性ソコダラ類に特異的なアクチン-1 タイプと比べて Q137K、A155S および V54A または L67P の計 3 カ所にアミノ酸置換を示した。

既報の α -アクチンの立体構造から、N 末端から 155 番目のアミノ酸は ATP と、137 番目のそれは Ca^{2+} との結合に関与するアミノ酸であることが示された。なお、ATP とアクチンの結合には Ca^{2+} も関与する。そこでまず、Quin 2 および ϵ -ATP を用いて、 Ca^{2+} と ATP の α -アクチンからの解離に及ぼす圧力の影響を調べた。その結果、深海性ソコダラ類の α -アクチンは圧力の影響をほとんど受けなかったのに対し、浅海性ソコダラ類を含めた他生物種の α -アクチンでは 20 MPa を越えた時点から圧力の影響を受け、解離が促進された。これらの測定結果から、Q137K および A155S の両置換は深海性ソコダラ類の α -アクチン分子内に Ca^{2+} と ATP が高圧によって押し込まれるのを防ぎ、深海性ソコダラ類に高水圧適応を付与していることが示唆された。そのメカニズムとして、Q137K

の置換によりアミノ酸側鎖の電荷を負から正に変え Ca^{2+} との間に反発力を生じさせること、Q137K と A155S の両置換がアミノ酸側鎖を大きくする方向にあることなどが考えられた。

続いて、 α -アクチンのトリプトファンの自家蛍光を高水圧下で測定したところ、Ser-155 のみを持つ深海性ソコダラ類の α -アクチンは高水圧下においても蛍光量が変化しないのに対して、Ser-155 と Ala-155 を持つアイソフォームが混在する浅海性ソコダラ類の α -アクチンではその蛍光量が減少した。この結果から、深海性ソコダラ類の α -アクチンは浅海性ソコダラ類のそれに比べて高水圧に安定な構造を持つことが明らかになった。なお、Ala-155 のみを持つコイの α -アクチンの測定結果から深海性ソコダラ類の α -アクチンの高水圧下での構造安定性は A155S のアミノ酸置換によると推定された。

次に、サブドメイン 2 中に存在する V54A または L67P の置換の役割を調べた。サブドメイン 2 はアクチンが重合する際、他のアクチン分子と接触する領域の一つである。そこで、このサブドメイン 2 に結合することが知られている deoxyribonuclease I (DNase I) とアクチンの結合実験を高水圧下で行った。その結果、深海性ソコダラ類の α -アクチンは高水圧下においても DNaseI と結合することが示され、高水圧下で深海性ソコダラ類の α -アクチンが重合できるのは、サブドメイン 2 中の置換が重要であると推定された。以上のように深海性および浅海性ソコダラ類の特性の大きな違いが、数個のアミノ酸置換で説明できることは、ホカケダラ属における両系統が進化の初期の段階で分岐したことと関連するものと考えられる。

以上、本研究により深海性ソコダラ類の α -アクチンで高水圧適応に必須なアミノ酸が特定された。また、本研究ではホカケダラ属の信頼できる分子系統樹が作成され、深海魚が深海へ進出した道筋も示唆された。本研究は、深海魚のタンパク質の一次構造と高水圧適応の関係の一端を初めて明らかにしたもので、その成果は比較生化学上、資するところが大きいと考えられる。