

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 森田 貴己

---

ある種の深海魚は水圧が 600 気圧にも及ぶ深海に生息している。その高水圧適応機構については古くから関心が持たれてきたが、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。本論文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  $\alpha$ -アクチンを cDNA クローニングし、高水圧適応に関わるアミノ酸を推定した。さらに、両深海魚から精製した  $\alpha$ -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。本論文ではまず、比較生化学的研究を行う対象魚を選択することを目的として、ミトコンドリア 12S rRNA および cytochrome oxidase subunit I (COI) 遺伝子の部分配列を決定し、本属の分子系統樹を作成した。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。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。

次に、深海性ソコダラ類 2 種、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  $\alpha$ -アクチンを精製し、高水圧下で重合に要する時間、臨界濃度及び重合に伴う体積増加量を調べた。いずれの分析においても深海性ソコダラ類の  $\alpha$ -アクチンは、大気圧下とほぼ変わらぬ性状を示した。

さらに、深海性ソコダラ類と浅海性ソコダラ類の骨格筋から  $\alpha$ -アクチンの cDNA クローニングを行った。その結果、それぞれ 2 タイプずつの  $\alpha$ -アクチン cDNA が単離された。ノザンブロット解析、定量 RT-PCR 法および 2 次元電気泳動法から、これら  $\alpha$ -アクチン mRNA およびタンパク質のいずれも骨格筋中に存在していること、その存在量は高水圧に適応したタイプがいずれの形態でも多く存在していることが示された。

次に、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のタイプは、浅海性ソコダラ類に特異的なタイプと比べて 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  $\alpha$ -アクチンの立体構造から、155 番目のアミノ酸は ATP と、137 番目のそれは  $\text{Ca}^{2+}$  との結合に関与するアミノ酸であることが示された。そこでまず、Quin 2 および  $\epsilon$ -ATP を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$  と ATP の  $\alpha$ -アクチンからの解離に及ぼす圧力の影響を調べた。これらの測定結果から、Q137K および A155S の両置換は  $\alpha$ -アクチン分子内に  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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、 $\alpha$ -アクチンのトリプトファン自家蛍光を高水圧下で測定した結果、深海性ソコダラ類の  $\alpha$ -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。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るため、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  $\alpha$ -アクチンは高水圧下においても DNase I 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  $\alpha$ -アクチンが重合できるのは、V54A または L67P の置換が重要であると推定された。

以上、本論文により深海性ソコダラ類の  $\alpha$ -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、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。さらに本論文は、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、その成果は学術上、応用上貢献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。