

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻  
平成 16 年度博士課程 進学  
日下 美穂  
指導教員 渡部 終五

論文題目 ムラサキイガイのトイッチン・アイソフォーム遺伝子に関する研究

ムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* 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発生し続けることができ、その張力維持機構は「キャッチ」と呼ばれる。近年、このキャッチ機構には、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (A キナーゼ) によるトイッチンのリン酸化が関わっていることが明らかにされた。トイッチンは筋肉の弾性タンパク質タイチン/コネクチンファミリーに属する巨大タンパク質である。In vitro 実験により 3 つのリン酸化部位、D1 (Ser-1075)、D2 (Ser-4316) および DX が存在することが示された。また、1 次構造解析から D1 および DX は N 末端から 7 番目と 8 番目のイムノグロブリン (Ig) モチーフの間に、D2 は 21 番目と 22 番目の Ig モチーフの間に位置することが明らかにされた。一方、タイチン/コネクチンファミリーに属するコネクチンおよびプロジェクチンで、選択的スプライシングにより生成されるアイソフォームの存在が示されている。線虫 *Caenorhabditis elegans* トイッチンにもアイソフォームの存在が予測されており、新たに発現可能と予測されるエクソンは A キナーゼのリン酸化認識配列を含む。しかしながら、ABRM トイッチンにおいてアイソフォームの報告はなく、リン酸化部位の機能とキャッチ運動との関係は未だ充分には明らかにされていない。また、キャッチ収縮から弛緩した筋肉がアセチルコリンの刺激によって再び活性収縮を行うためには  $Ca^{2+}$  依存性ホスファターゼの関与が必要と考えられているが、未だ同定はされていない。

本研究は、このような背景の下、ムラサキイガイを主対象に、まず、ホスファターゼの

探索を行った。次に、トイッチン・アイソフォームの解析を目的に、リン酸化ペプチドおよびキナーゼドメインのコード領域の遺伝子発現解析を行ったもので、成果の概要は以下の通りである。

## 1. ムラサキイガイCa<sup>2+</sup>依存性ホスファターゼの探索

ムラサキイガイ ABRM のキャッチ収縮はトイッチンのリン酸化によって解除されるが、トイッチンがリン酸化されたままでは再び活性収縮およびそれに続くキャッチ収縮が起こらない。*In vitro* 実験で、ABRM トイッチンの脱リン酸化にはウシ脳由来 Ca<sup>2+</sup>依存性ホスファターゼのカルシニューリンが有効であることが示されているが、ムラサキイガイのトイッチン脱リン酸化酵素は未だ報告がない。そこでまず、ABRM から精製したトイッチンをリン酸化し、基質として用いることで、トイッチンの脱リン酸化酵素を精製することを試みたが、既報の精製トイッチンが 1 モル当たり 3 モルのリン酸を取り込むのに対して、本研究ではトイッチン 1 モルあたり 0.5 モルのリン酸しか取り込まず、基質として不相当と判断された。そこで、*p*-nitrophenyl phosphate を基質として実験を行った。ABRM 粗抽出画分において、SDS-PAGE 分析ではカルシニューリンの分子量に相当するバンドは認められなかったが、Ca<sup>2+</sup>依存性ホスファターゼ活性が認められた。そこで Q-Sepharose Fast Flow 陰イオン交換カラムに吸着させ、0.10-0.55 M NaCl の直線的濃度勾配により分画して本酵素の精製を試みたが、単離には至らなかった。別途、既報のウシ脳由来カルシニューリン、ホタテガイ精巢由来カルシニューリン様タンパク質のアミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いて cDNA クローニングを試みたが、ムラサキイガイ Ca<sup>2+</sup>依存性ホスファターゼの同定には至らなかった。

## 2. ムラサキイガイ・トイッチン遺伝子の構造および発現解析

D1/DX (D1 および DX は近接して存在) あるいは D2 を含むそれぞれのリン酸化ペプチド、さらには N 末端より 15 番目のフィブロネクチン (Fn) III モチーフと 21 番目の Ig モチーフの間に位置するキナーゼドメインのコード領域につき、遺伝子特異的プライマーを用い、ムラサキイガイおよび同族種 *M. edulis* ABRM から調製した first strand cDNA を鋳型に PCR を行った。その結果、D1/DX リン酸化ペプチドのコード領域を含む約 400bp で、42bp の挿入や 15bp の欠失がみられた。種類別および個体別に RT-PCR を行い、増幅産物をアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果、この 42bp の挿入は個体差や種の違いによるものではないことが示された。したがって、ムラサキイガイ ABRM トイッチンもコネクチンと同様のスプライシングアイソフォームが存在することが示唆された。一方、D2 リン酸化ペプチドをコードする領域の約 400bp の増幅産物では、バリンとイソロイシンの置換に基づく 2 種類のクローンがみられたが、これも種による違いではなく、個体差によるものであることが示された。また、キナーゼドメインをコードする約 850bp の領域では両種で演繹アミノ酸配列に差異がみられず、2 つのリン酸化ペプチドと比較して保存性の高いことが示された。

次に、ムラサキイガイ ABRM、後足牽引筋 (PBRM)、生殖腺、閉殻筋、外套膜、足、および唇弁についてパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色して組織観察したところ、ABRM、PBRM、および閉殻筋だけでなく、外套膜および足においても筋組織が見られた。そこで、既報の知見に基づき ABRM、PBRM および閉殻筋をキャッチ筋、外套膜および足を非キャッチ筋、生殖腺、および唇弁を非筋肉組織と分類し、トイッチン遺伝子の発現解析を行った。すなわち、各組織から調製した first strand cDNA を鋳型として、遺伝子特異的プライマーを用い、トイッチン遺伝子の 3 領域、すなわち D1/DX リン酸化ペプチド、D2 リン酸化ペプチド、およびキナーゼドメインのコード領域の発現解析を行った。その結果、非筋肉組織の生殖腺および唇弁ではトイッチン遺伝子の発現量は著しく低く、トイッチンは筋組織に存在するという既報の知見とよく一致した。さらに、D1/DX リン酸化ペプチドのコード領域約 400bp については、非キャッチ筋において予測サイズの約半分の DNA 断片がみられた。サブクローニングの結果、この短い増幅断片は D1 リン酸化部位を含む 62 アミノ酸をコードする 186bp の領域が欠失していることがわかった。この領域は最大でも 400bp と短いにも関わらず、42bp、15bp および 186bp 領域の有無の組み合わせにより 8 種類の転写産物の発現が認められ、極めて多様であった。なお、ABRM において D1 コドンを欠く転写産物は認められず、D1 リン酸化部位を含むトイッチン・アイソフォームはキャッチ筋に必須であることが明らかとなった。一方、D2 リン酸化ペプチドをコードする約 400bp の領域およびキナーゼドメインをコードする約 850bp の領域はよく保存されていた。

### 3. ムラサキイガイ・トイッチン遺伝子のエキソン・イントロン構造

D1/DX リン酸化ペプチドのコード領域約 400bp で、挿入や欠失がみられた 45bp、15bp および 186bp の配列を、便宜上それぞれ R1、R2 および R3 とした。ムラサキイガイ生殖腺から抽出した DNA を対象に、トイッチン遺伝子のゲノム DNA 解析を試みたところ、当該領域の読み取り枠 (ORF) は 10kbp 以上のゲノム DNA でコードされており、R1、R2 および R3 はそれぞれ一つのエキソンでコードされていた。したがって、前節でみられた 8 種類の転写産物は、選択的スプライシングにより発現することが強く示唆された。さらに、R1 エキソンは 2 個存在し、各 R1 エキソンを挟んだ前後のイントロン配列を含む 2223bp がタンデムに繰り返され、両配列の塩基同一率は 96.8% と高かった。両 R1 エキソンで、3' および 5' スプライシングサイトやブランチ配列に差はなく、D1 リン酸化部位の転写産物がいずれのエキソンに由来するものなのかは不明であった。R2 および R3 については、R1 でみられたような複数のエキソンが存在することはなかった。

また、D2 リン酸化ペプチドおよびキナーゼドメインのコード領域の一部についてもゲノム DNA 解析を行った。D2 リン酸化ペプチドのコード領域約 400bp の ORF は 4 つのエキソンでコードされていることがわかった。キナーゼドメインについては、およそ 4kbp の解読が終了したが、すべてのエキソン・イントロン構造は明らかにすることはできなかった。

以上、本研究において、ムラサキイガイ **ABRM** を対象に、トイッチンの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性ホスファターゼの精製を試みたが、単離には至らなかった。一方、トイッチンには選択的スプライシングによる組織特異的および非特異的アイソフォームが存在することが示された。このアイソフォームの一部は **D1** リン酸化部位の有無によるもので、この部位を含むアイソフォームはキャッチ筋特異的な発現がみられた。**D2** リン酸化部位およびキナーゼドメインは高度に保存されていた。これらの成果は比較生化学に資するとともに、二枚貝の代謝の特異性の一端を明らかとしたもので、食品化学的に資するところも大きいと考えられる。