

論文審査の結果の要旨

日下 美穂

申請者氏名

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。このキャッチ機構には 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、*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。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。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ある。

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、Ca²⁺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。

次に、D1/DX (D1 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 の欠失がみられたが、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。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かった。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なかった。

次に、ムラサキイガイ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、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チン遺伝子の発現量は著しく低く、トイチンは筋組織に存在した。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、非キナ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た。なお、ABRM において D1 コドンを欠く転写産物は認められなかった。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。

さらに、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、ムラサキイガイ生殖腺から抽出した DNA を対象に、トイチン遺伝子のゲノム DNA 解析を試みた。その結果、当該領域の 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。さらに、R1 エキソンは 2 個存在し、各 R1 エキシオ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。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は存在しなかった。

以上、本研究において、ムラサキイガイ ABRM を対象に、トイチンの 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ナ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く学術上、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。