

## 論文の内容の要旨

水 圏 生 物 科 学 専 攻  
平成 21 年度博士課程 進学  
氏 名 小澤 秀夫  
指導教員名 渡部 終五

論文題目 Studies on the structural stability of tropomyosins from fish and marine invertebrates (魚介類トロポミオシンの構造安定性に関する研究)

筋肉トロポミオシン(TM)は 284 残基からなる繊維状のタンパク質で、アクチンフィラメントの溝に沿って存在し、トロポニンとともに筋収縮を調節する。本タンパク質は二量体を基本単位とし、二量体は長さ 420Å、幅 25Å で、2 本の  $\alpha$  ヘリックス鎖がより合わさった  $\alpha$  ヘリカルコイルドコイル構造を形成する。低イオン強度下では TM の N 末端側と C 末端側が末端間相互作用し、多量体を形成する。脊椎動物では  $\alpha$  および  $\beta$  の 2 種類のアイソフォームが報告されているが、マグロ類を除くほとんどの魚類の筋肉 TM は、 $\alpha$  型のみが報告されている。従って、以下の TM は  $\alpha$  型を指すものとする。上記のコイルドコイル構造を形成するため、TM は *a-g* で表わされる 7 残基繰り返し配列を示し、*a* および *d* 部位には疎水性のアミノ酸残基が配置することが多い。しかし、これらの部位においても、酸性のアミノ酸残基が配置する部分(酸性コア)や、連続してアラニンが配置する部分(アラニン・クラスター)があり、それらの領域の構造安定性は低下し、屈曲していることが知られている。構造安定性は自身のアクチン結合能やアクトミオシン ATPase 活性に影響を及ぼすとされており、構造安定性の指標として、熱安定性を測定することが一般的に行われている。魚類 TM 間のアミノ酸同一率は 93%以上と高いが、種間で明確な熱安定性の違いが報告されている。一方、無脊椎動物筋肉 TM については熱安定性を含めて極めて知見に乏しい。

このような背景の下、本研究は、魚介類筋肉 TM のコイルドコイル構造の領域別熱安定性や種間の熱安定性の差異を評価することを目的として行われたもので、成果の概要は以下の通りである。

#### 1. 無脊椎動物 TM の熱安定性の種間差

クルマエビ腹部屈筋、スルメイカ外套膜筋、トコブシ足筋およびホタテガイ閉殻筋(横紋筋および平滑筋)から常法により調製したアセトンパウダーに中性の高塩濃度緩衝液を加えて TM を抽出し、等電点沈澱および硫酸分画に付した後、各種クロマトグラフィーにより TM を精製した。ただし、スルメイカおよびホタテガイ平滑筋 TM の調製に際しては、等電点沈澱を行う前に、パラミオシンを希釈沈澱で除去した。ホタテガイ平滑筋では TM をコードする 3 種類の mRNA が知られていなかったため、プロテアーゼ Arg-C により部分消化して得られた平滑筋 TM につき、N 末端アミノ酸配列を調べてアイソフォームの同定を行った。

次に、精製 TM につき、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、0.1 M KCl、0.1 mM ジチオトレイトール(DTT)、0.001 %  $\text{NaN}_3$  を含む溶液中、円二色性(CD)測定を 5-80°C で、示差走査熱量分析(DSC)を 5-90°C で行った。対照として後述する方法で精製したシログチ速筋 TM を用いた。まず、CD 測定により、みかけの転移温度( $T_{\text{Mapp}}$ )および 20°C における変性のみかけのギブス自由エネルギー( $\Delta G_{\text{app}}$ )を求めた。CD 測定では、 $T_{\text{Mapp}}$  が大きいほど熱安定性が高いとし、 $T_{\text{Mapp}}$  が同程度の場合、 $\Delta G_{\text{app}}$  が大きいほど熱安定性が高いとした。また DSC では、20°C における変性のギブス自由エネルギー( $\Delta G$ )を求め、 $\Delta G$  が大きいほど熱安定性が高いとした。

CD 測定により得られた  $T_{\text{Mapp}}$  はクルマエビ TM で 47.3°C と最も高く、次いでスルメイカ TM(43.5°C)、トコブシ TM(43.0°C)、シログチ TM(41.2°C)、ホタテガイ平滑筋 TM(36.0°C)、ホタテガイ横紋筋 TM(30.5°C)の順であった。次に、 $\Delta G_{\text{app}}$  はクルマエビ TM で 50.2 kJ/mol と最も高く、次いでホタテガイ平滑筋 TM(31.9 kJ/mol)、シログチ TM(24.1 kJ/mol)、トコブシ TM(23.9 kJ/mol)、スルメイカ TM(14.3 kJ/mol)、ホタテガイ横紋筋 TM(13.4 kJ/mol)の順であった。従って、熱安定性は、クルマエビ TM > トコブシ TM > シログチ TM > スルメイカ TM > ホタテガイ平滑筋 TM > ホタテガイ横紋筋 TM の順と結論した。DSC により得られた  $\Delta G$  は、クルマエビ TM(271 kJ/mol)で最も高く、次いでトコブシ TM(253 kJ/mol)、シログチ TM(139 kJ/mol)、スルメイカ TM(129 kJ/mol)、ホタテガイ平滑筋 TM(110 kJ/mol)、ホタテガイ横紋筋 TM(72 kJ/mol)の順であった。スルメイカ TM およびシログチ TM は同程度の  $T_{\text{Mapp}}$ 、 $\Delta G_{\text{app}}$  および  $\Delta G$  を示したため、熱安定性もほぼ等しいと考えられる。なお、GOR IV ソフトを用いた二次構造解析で、クルマエビ TM の高い熱安定性には 50 残基目付近の複数のアミノ酸残基

の置換が関与していることが示唆された。

## 2. 合成ペプチドを用いたスケトウダラ TM の領域別熱安定性の測定

スケトウダラ速筋 TM の配列を基に、30 残基の領域別ペプチド、すなわちペプチド Nterm (N 末端側 Met1-Lys30)、ペプチド Var (魚種間で変異の多い領域 Asp84-L113)、ペプチド Mid (分子中央部の V128-A157)、ペプチド Cys (Cys190 を中央に含む L176-K205)およびペプチド Cterm (C 末端側 D255-I284)を設計した。CD 測定は、ペプチド濃度 1 mg/mL、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)、0.1 M KCl、1 mM DTT、0.001 %  $\text{NaN}_3$ および 40 %トリフルオロエタノール (TFE)を含む溶液で行った。 $\alpha$ ヘリックス含量(%)は 222 nm におけるモル分子楕円率 $[\theta]_{222}$ から算出した。その結果、40% TFE 存在下、5°C における  $\alpha$ ヘリックス含量は、上記のペプチド順にそれぞれ、47.1%、65.3%、46.0%、48.4%および 71.6%と算定された。温度上昇とともに、 $\alpha$ ヘリックス含量は減少したが、完全長 TM にみられるような急激な構造変化は認められなかった。これは、ペプチドの構造変化に伴うエンタルピーが小さいためと考えられる。また、 $\alpha$ ヘリックス含量のペプチド濃度依存性も認められなかったため、これらのペプチドはコイルドコイルを形成していないと考えられる。

## 3. シログチ TM 断片の熱安定性

シログチ速筋 TM を、常法によりアセトンパウダーから高塩濃度の中性緩衝液で抽出し、等電点沈澱および硫酸分画により精製した。次に、脊椎動物 TM で保存されている Cys190 の N 末端側のペプチド結合を開裂させるため、1 M グリシンを含む 6 M 塩酸グアニジン水溶液(pH 9.0)に TM を溶解し、20 倍量のモル比の 2-ニトロ-5-チオシアナト安息香酸を加え、37°C で 4 時間インキュベートした。生成断片の精製は陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。TM 開裂断片の収率は 52%であった。次に、各標品につき、上述の方法で CD 測定を行った。 $T_{\text{Mapp}}$  は、対照の全長 TM では 41.1°C、N 末端側断片(Met1-Lys189)は 31.0°C、C 末端側断片(Cys190-Ile284)は 34.3°C であった。 $\Delta G_{\text{app}}$  は上記の順にそれぞれ、13.6 kJ/mol、6.9 kJ/mol および 11.7 kJ/mol であった。従って、C 末端側断片は N 末端側断片より熱安定が高いことが明らかとなった。また、二次構造解析ソフト GOR IV により、熱安定性の差異への寄与が大きいアミノ酸残基置換(ウサギ/シログチ)は、N 末端側断片では 83 残基目(Ala/Gly)、C 末端側断片では 247 残基目(Thr/Ala)および 252 残基目(Ser/Thr)と予測された。ウサギ TM では C 末端側の構造が不安定で、トロポニンとの相互作用との関連が示唆されている。シログチでは C 末端側断片の方が熱安定性は高いことが示されたが、その生物学的意義は不明である。

#### 4. 分子シミュレーションを用いた TM 断片の構造安定性の評価

ウサギ速筋およびシログチ速筋 TM の C 末端側断片の構造安定性を、Amber10 を用いる分子シミュレーションで評価した。鑄型として、ウサギ TM 当該領域の結晶構造(PDB ID: 2D3E)を用いた。鑄型構造に水分子 23,000 個を加え、0.1 M となるように K<sup>+</sup> および Cl<sup>-</sup> を加えた。系のエネルギー最小化を行い、温度(300 K) および圧力(1 bar)の平衡化を行った後、体積一定条件下でシミュレーションを 20 ns にわたって行った。シログチ TM 断片の評価においては、ウサギ TM 断片に 4 つのアミノ酸残基置換、すなわち Ala→Ser191、Ser→Thr229、Thr→Ala247、Ser→Thr252 を加えた。分子シミュレーションによる構造安定性の評価には、平均二乗揺らぎが用いられるのが一般的である。しかし、この指標は TM のような繊維状の構造安定性の低いタンパク質の構造安定性の評価には適していないことが判明した。そこで、ペプチド結合の二面角[ $\phi$ (C-N-C $\alpha$ -C)および  $\psi$ (N-C $\alpha$ -C-N)] のゆらぎ(FDA)を求めた。さらに、コイルドコイルの直径および屈曲を求めた。

FDA により、ウサギおよびシログチ両 TM 断片とも酸性コア付近 [Tyr214(*d*)-Glu218(*a*)-Y221(*d*)]の構造安定性が低いことが示された。また、シログチ TM 断片は 229 残基目の置換により構造安定性が低下しているが示された。さらに、シログチ TM 断片は 250 残基付近で構造が安定化しているのに対して、ウサギ TM 断片は同残基付近で大きく屈曲していることが示された。これらの差異は 247 残基目および 252 残基目の両方もしくは片方の置換によるものと考えられた。両 TM 断片はアラニン・クラスター [Ala235(*d*)-Ala239(*a*)-Ala242(*d*)]においてコイルドコイルの直径が減少しており、250 残基目付近において構造安定性が低下していた。この構造安定性の低下はアラニン・クラスターによる二つの影響、すなわちスタッガーと呼ばれるコイルドコイル軸方向のずれと、コイルドコイルの直径の拡大に伴う主鎖の水素結合距離の拡大、によるものと考えられた。

以上、本研究により、無脊椎動物 TM の熱安定性は、種類や筋肉部位により明確に異なることが明らかにされた。さらに、魚類 TM の構造安定性は分子内の領域で大きく異なり、C 末端側の安定性が高いことが示された。とくに、この結果は、ウサギ TM の結果と大きく相違した。さらに、TM 断片の分子シミュレーションにより、構造安定性が分子内の異なる領域で大きく相違することが認められた。これらの成果は比較生化学に資するのみなく、TM の構造安定性の相違は魚肉の加工特性にも大きな影響を及ぼすと考えられることから、応用面での貢献も少なくない。