

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小澤 秀夫

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、2本の α ヘリックス鎖がより合わさった α ヘリカルコイルドコイル構造を形成する。こ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。TMの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。そこで本研究は、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た。

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 TM を精製した。精製 TM につき、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。対照として精製シログチ速筋 TM を用いた。まず、CD 測定により、みかけの転移温度(T_{Mapp})が大きいほど熱安定性が高いとし、 T_{Mapp} が同程度の場合、20°C における変性のみかけのギブス自由エネルギー(ΔG_{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(ΔG)を求め、 ΔG が大きいほど熱安定性が高いとした。CD 測定の結果、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 の順となった。一方、DSC で測定した熱安定性は、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 の順であった。スルメイカ TM およびシログチ TM は同程度の T_{Mapp} 、 ΔG_{app} および ΔG を示したため、熱安定性もほぼ等しいと考えられる。

次に、スケトウダラ速筋 TM の配列を基に、30 残基のペプチド 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 測定による α 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、 α 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。また、 α 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。

次に、シログチ速筋 TM を精製し、Cys190 の N 末端側のペプチド結合を開裂させて CD 測定を行ったところ、 T_{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。 ΔG_{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。

さらに、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。鋳型として、ウサギ TM 当該領域の結晶構造 (PDB ID: 2D3E) を用いた。鋳型構造に水分子 23,000 個を加え、0.1 M となるように K^+ および Cl^- 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、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。その結果、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agger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示されたもので、これらの成果は学術上、応用上資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。