

学 位 論 文 題 名

cDNA クローニングおよび変異体作製によるホタテガイ類
トロポニンTとトロポミオシンの構造・機能の解析

学位論文内容の要旨

魚介類の筋肉の加工・利用方法の理論づけや新用途の開発のためには、筋肉タンパク質の構造と機能に関する多くの研究情報が必要である。軟体動物ホタテガイ類の筋肉はミオシンやアクチンが哺乳類のそれらと比較して、種々要因に対して不安定であるだけでなく、エネルギーをほとんど消費せずに長時間収縮状態を維持できるキャッチ機構を有したり、筋収縮調節機構として哺乳動物と同様のトロポニン (Tn)-トロポミオシン (Tm) 系に加え、ミオシン軽鎖系をも有するなど非常に特異的である。このようなホタテガイ類のTn-Tmもまた特異な性状をもっている。例えば、Tnの3種のサブユニットのうち、 Ca^{2+} を結合するTnCは4個の Ca^{2+} 結合部位のうち第4部位にただ1個 Ca^{2+} を結合し、ミオシン-アクチン相互作用を阻害するTnIは分子量52,000と19,000の2種(ウサギでは21,000)発見されている。さらにTnCおよびTnIのアミノ酸配列も解析されている。

一方、TnTは分子量が40,000(ウサギでは31,000)で、ウサギTnTとは異なり生理的塩濃度でも可溶性である。さらに、もう一方の調節タンパク質であるTmはウサギTmと同様に2本の分子量34,000のサブユニットから成るが、重合能が高く、アクトミオシンMg-ATPase活性を強く阻害することが分かっているにすぎない。その上、それらのタンパク質のアミノ酸配列は未解明であり、性質・機能についても不明の点が多い。

そこで、本研究ではアカザラガイとホタテガイのTnTおよびTmのcDNAクローニングと塩基配列解析によりアミノ酸配列を演繹するとともに、大腸菌によるそれらの変異体の発現と変異体を用いた性質・機能の検討を行った。

まず、アカザラガイ横紋筋の λ gt11・cDNAライブラリーを抗アカザラガイTnT抗血清でスクリーニングし、約15,000個の組み換えファージから16個の陽性クローン(AT-1~16クローン)を得た。それらのcDNAを、pBluescript II KS(+)プラスミドに組み込み、両端から各々

約400 bpの配列を解析した結果、2種のクローン、すなわちAT-3およびAT-16クローンが翻訳領域全体を含むことが判明した。そこで、AT-3クローンのcDNAをexo-deletion法により、末端から種々の長さの部分を除いた組み換えプラスミドを調製し、全塩基配列を決定した。そのcDNAは全長1,467 bpであり、その70-1,011番目の翻訳領域の塩基配列を決定し、以下の314アミノ酸配列(分子量 37,206)が演繹された。

```

      20      40      60
MDYDDEPRTGDGNEARLAMEEAARKKKKEKVESEIAEYEEMRREQREKEAEDLEQLRLKREQRK 63
      80     100     120
QERIEEDRRLLEIRKEEDKRRKAEEEEERKRKKQEDERKRIEAKKAKLKELEERKKMSKTPNFV 126
     140     160     180
ITKKGASNLEEASKDMAKSKEQLEEEKRAILLAQRIQPLTVDGLDLAALMEKATEFHNKIKSLA 189
     200     220     240
NEKYELEERFKSQQYDMIELAERARQMNKGKKRAVQVDDSYDPMAEKYGSCPPKVQMYSKYER 252
     260     280     300
HTDLRTYGTTRVDYFETKAKKIEAEMAIGRKKEEDNLLKTMEETEETSEAAPAEAEVAAEEEE 314

```

一方、AT-16クローンのcDNAは1,823 bpから構成され、51-1,016番目の翻訳領域から322アミノ酸の配列(分子量 38,091)が演繹された。この配列は、AT-3から演繹されたアミノ酸配列の8-9番目および305-306番目にそれぞれGlu-Glu-Thr-Gln-Glu-ThrおよびAla-Proを挿入し、²⁸⁷Asnを²⁸³Ileに置換したものであった。得られた16クローンのうち、AT-3と共通的配列をもつものが12クローン、AT-16と共通的なものが4クローンであった。このようにアカザラガイThTには、2種のアイソフォームが存在すると考えられ、AT-3およびAT-16がそれぞれコードするThTをThT-aおよびThT-bと称することとした。

次に、ホタテガイ横紋筋のThTのアミノ酸配列を解析するためにλgt11・cDNAライブラリーを抗体でスクリーニングすることにより、1個の陽性クローン(ET-1クローン)を、また、上記のAT-3クローンをプローブとして1個の陽性クローン(ET-2クローン)を得た。それらの部分塩基配列を解析した結果、ET-2クローンが翻訳領域全体を有することが判明したので全塩基配列(1,939 bp)を解析した。その結果、111-1,085番目の塩基配列がホタテガイThTの翻訳領域部分であることが分かり、325アミノ酸残基(分子量 38,438)が演繹された。

以上の配列から、アカザラガイとホタテガイのThT間の相同性は92-94%と判明し、ウサギThTとの相同性(24%)よりも非常に高かった。ホタテガイ類ThTの特異的な点は、ウサギThTよりもN端が27残基短く、C端が80-85残基長いことであった。一方、親水性度プロットを比較した結果、80-95番目のアミノ酸配列付近はウサギThTに比べて親水性度が高いが、

それ以外の領域は良く似ていた。さらに、予測二次構造もウサギTnTと類似していた。

次に、アカザラガイAT-3クローンのcDNAを用いて、大腸菌 BL21 (DE3)によりTnT-aの完全長、すなわち1-314番目のアミノ酸配列をもつタンパク質 (TnT1-314) の発現と精製を行うことができた。このTnT1-314を用いて再構成したTnは、天然のTnTを用いて再構成したTnとほぼ同等に、アクトミオシンMg-ATPase活性に対して Ca^{2+} -sensitivityを付与した。また、cDNAにPCR based mutagenesisにより変異を導入することにより、4種のTnT変異体 (TnT1-236, TnT33-236, TnT1-120, およびTnT33-120) を発現し、精製にも成功した。これらを用いた再構成Tnは、それぞれ66.1%, 68.0%, 9.1%, および13.0%の Ca^{2+} -sensitivityを与えた。このことからTnTのC端121-314番目の領域の存在が Ca^{2+} 調節に重要であることが分かった。さらに、これらの変異体を用いた固定化TmアフィニティークロマトグラフィーによりアカザラガイTnT-aの33-120番目の領域にTm結合部位が含まれることを明らかにした。

次に、2本のサブユニットから成るアカザラガイTmのサブユニットについてアミノ酸配列を解析した。まず、cDNAをクローニングするために、約8,000個の組み換えファージの抗体スクリーニングを行った。その結果、4個の陽性クローン (ATM-1~4クローン) を得たが、それらのうちATM-4クローンのcDNA (1,995 bp) が翻訳領域全体を含んでいることが分かった。次いで、27-878番目の翻訳領域全体の塩基配列を解析し、以下に示す284アミノ酸残基の配列 (分子量 32,540) を演繹した。

```
MDAIKKKMQAMKVDRENAQDLAEQMEQKLKDTETAKAKLEEDFNDLQKKLTTTENNFVDVANEQ 63
      20      40      60
LQEANTKLENSDKQITQLESVDVGALQRRQLLEEDFERSEEKLATTTEKLEEASKAADESERN 126
      80     100     120
RKVLEGRSNTAEERIDVLEKQLETAKNVATDADQKFDEAARKLAITEVDLERAEATRLEAADAK 189
     140     160     180
VHELEEELTVVGANIKTLQVQNDQASQREDSYEETIRDLSKNLKDAETRATEAERQLTKLQKE 252
     200     220     240
VDRLEDELLAEKERYKAISDELDQTFAEIAGY 284
     260     280
```

さらに、ホタテガイのTmのサブユニットについても約5,000個の組み換えファージを抗体スクリーニングし、1個の陽性クローン (ET-1クローン) を得た。挿入cDNAは986 bpから成り、107-958番目の塩基配列部分が翻訳領域であり、その配列から284アミノ酸残基 (分子量 32,596) が演繹された。その配列は、アカザラガイTmの配列中のアミノ酸残基を次のように変えたものであった。⁶⁹Thr→⁶⁹Val, ⁷⁵Asp→⁷⁵Glu, ¹⁰⁷Ala→¹⁰⁷Leu, ¹³⁷Ala→¹³⁷Ser, ¹⁴⁹Glu→

¹⁴⁹Asp, ¹⁵⁰Thr→¹⁵⁰Ser, ¹⁵³Asn→¹⁵³Thr, ¹⁶⁰Gln→¹⁶⁰Thr, ²²³Ser→²²³Thr, ²³⁷Thr→²³⁷Asn, ²⁴⁶Leu→²⁴⁶Val, ²⁴⁷Thr→²⁴⁷Val, ²⁶⁹Ala→²⁶⁹Gln.

ホタテガイ類TmとウサギTmのアミノ酸配列を比較した結果、配列相同性はアカザラガイとホタテガイのTm間では96%であり、ウサギTmとの間(46-47%)より著しく高かった。また、親水性度プロットを検討した結果、ウサギTmと比べて180-200番目付近は疎水性度が高く、250番目付近は親水性度が高かったが、その他は全般的に良く似ていた。二次構造予測では、ウサギTmは全体の約96%が α -ヘリックス構造を形成しているという結果になったが、ホタテガイ類Tmでは約83%であった。

次に、アカザラガイTmを大腸菌で発現させることを試み、全長のTmが発現されることが分かった。しかし、N末端はアセチル基によるブロックはされていなかった。また、ブロックの代用としてN末端に1アミノ酸残基(Ala)または2アミノ酸残基(Asp-Ala)を付加したTmを発現させた。これらの発現Tmは、極めて低い相対粘度を示したことから重合能を失っていると考えられた。さらに、アクチンとの親和性も天然のTmと比べて低かったことから、発現Tmは他種のTmで報告されているものと同様にN末端の数残基部分の機能が天然のTmと著しく異なっていると推察された。

最後に、ウサギThTとTmにおける構造と機能の知見に基づき、ホタテガイ類ThTとTmの一次構造から、それらの相互作用部位を検討した。その結果、ウサギThTの71-158番目の配列に相当する領域は、ウサギThTと同様に酸性および塩基性アミノ酸残基から成るクラスターを形成していることが示唆された。また、この領域はThT変異体を用いた実験結果からもTmとの結合に関与することが示された。一方、ホタテガイ類Tmの218-275番目のアミノ酸配列はウサギTmと相同性が66%と高く、しかも酸性および塩基性のアミノ酸残基が多く存在していたことから、ウサギThT-Tmと同様、ThTとの静電的相互作用に関与すると考えられた。さらに、ウサギThTの159-259番目に相当するThTの配列とウサギTmの150-180番目に相当するTmの配列には、いずれもcoiled-coil構造を形成するタンパク質に特徴的な疎水性アミノ酸の周期配列が認められたことから、ウサギのThT-Tm間で推定されているように、これらの領域が疎水的に相互作用すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 田 清 義
副 査 教 授 関 伸 夫
副 査 教 授 猪 上 徳 雄
副 査 助 教 授 尾 島 孝 男

学 位 論 文 題 名

cDNA クローニングおよび変異体作製によるホタテガイ類 トロポニンTとトロポミオシンの構造・機能の解析

軟体動物の筋肉はキャッチ機構や、二重の筋収縮調節機構すなわちトロポニン(Tn)-トロポミオシン(Tm)系とミオシン軽鎖系を有するなど非常に特異であり、そのタンパク質も特異な性質・機能を有している。それらのタンパク質の構造と機能の関係を解明することは、筋肉の比較生化学及び高度利用の見地から重要である。

本研究はアカザラガイ及びホタテガイの横紋閉殻筋TnのTnTサブユニットと、それに結合するTmの計5種のタンパク質についてcDNAクローニングとアミノ酸配列解析を行い、さらにアカザラガイのTnTとTmの変異体を大腸菌により作成し、それらを用いて性質・機能の検討を行っている。本論文について審査員一同が評価した点を以下に述べる。

(1)アカザラガイ横紋筋TnTの λ gt11・cDNAライブラリーを抗体スクリーニングし、16個の陽性クローンを得た。それらのcDNAをpBluescript II KS(+)に組込み、全翻訳領域を含む2種のクローンを得た。その一方のクローン(AT-3)についてexo-deletion法を適用しながら全長1,467 bpの全塩基配列を決定し、314アミノ酸配列(分子量37,206)を演繹した。

(2)他方のcDNAクローン(AT-16)の1,823 bpの塩基配列を同様に決定し、322アミノ酸の配列(分子量38,091)を演繹した。このようにアカザラガイTnTには2種のアイソフォームが存在することを明らかにし、AT-3およびAT-16がコードするTnTをそれぞれTnT-aおよびTnT-bと称した。

(3)ホタテガイ横紋筋のTnTの翻訳領域全体を有するクローンを得て、全塩基配列(1,939 bp)を解析し、325アミノ酸配列(分子量38,438)を演繹した。

(4)アカザラガイとホタテガイのTnT間のアミノ酸配列相同性は92-94%であり、それらはウサギTnTよりもN端が27残基短く、C端が80-85残基長かった。一方、80-95番目のアミノ酸配列付近はウサギTnTに比べて親水性度が高いが、それ以外の領域は良く似ていた。さらに、予測二次構造もウサギTnTと類似していた。

(5)アカザラガイAT-3クローンのcDNA及びPCR based mutagenesisにより変異を導入したcDNAを用いて、大腸菌 BL21 (DE3)によりTnT-a及び4種のTnT変異体 (TnT1-236, TnT33-236, TnT1-120, およびTnT33-120)を発現し、精製に成功した。これらを用いた再構成TnIは、それぞれ100%、66%、68%、9%、および13%のCa²⁺-sensitivityを与えた。このことからTnTのC端121-314番目の領域の存在がCa²⁺調節に重要であることを明らかにした。さらに、固定化TmアフィニティークロマトグラフィーによりアカザラガイTnT-aの33-120番目の領域にTm結合部位が含まれることを明らかにした。

(6)アカザラガイTmのサブユニットをコードするcDNAを約8,000個の組換えファージからクローニングし、翻訳領域全体を含むcDNA (1,995 bp) の塩基配列を決定し、284アミノ酸の配列 (分子量 32,540) を演繹した。さらに、ホタテガイTmのサブユニットをコードするcDNA1種類を約5,000個の組換えファージから得た。そのcDNAは986 bpから成り、翻訳領域は107-958番目の塩基部分にあった。その配列は284アミノ酸残基 (分子量 32,596) を演繹し、アカザラガイTmの配列と13残基の違いがあった。

(7)配列相同性はアカザラガイとホタテガイのTm間では96%、それらとウサギTm間で46-47%であった。また、ウサギTmと比べて180-200番目付近は疎水性度が高く、250番目付近は親水性度が高かったが、その他は全般的に良く似ていた。二次構造を予測した結果、ウサギTmは全体の約96%が α -ヘリックスを形成していたが、ホタテガイ類Tmでは約83%であった。

(8)アカザラガイTmを大腸菌で発現させることに成功したが、N末端はブロックはされていなかった。そこで、N末端に1アミノ酸残基 (Ala) または2アミノ酸残基 (Asp-Ala) を付加したTmを発現させた。これらの発現Tmは、重合能を失っていた。さらに、発現Tmは既報の結果と同様に、N端の数残基部分の機能が天然のTmと著しく異なっていた。

(9)ホタテガイ類TnTとTmの一次構造から、両者の相互作用部位を検討した結果、ウサギTnTとTmの場合と同様にTnTの酸性および塩基性アミノ酸残基のクラスター部分にTmとの結合領域が存在した。一方、ホタテガイ類TmにおいてTnTと静電結合と思われる領域を認めた。さらに、coiled-coil構造を形成するタンパク質に特徴的な疎水性アミノ酸の周期配列が認められ、これらの領域が疎水的に相互作用すると考えられた。

以上、本研究がcDNAクローニングによりアカザラガイ及びホタテガイの3種のTnTと2種のTmのアミノ酸配列を決定し、アカザラガイのそれら変異体を作成して相互作用部位を検討し、新たな知見を得たことを審査員一同は高く評価し、申請者が水産学博士の学位を授与するに適格であると判定した。