

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009 年度

課題番号：19380119

研究課題名（和文） 軟体類筋肉のフィラメント形成タンパク質に関する網羅的解析

研究課題名（英文） Exhaustive studies on filament forming proteins of molluscan muscle

研究代表者

落合芳博 (YOSHIHIRO OCHIAI)

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50160891

研究成果の概要（和文）：4種類の軟体動物（スルメイカ、ヤリイカ、コウイカ、マダコ）につき、筋肉のフィラメント形成タンパク質ミオシン（重鎖）、アクチンおよびトロポミオシンの性状の解明を行なった。トロポミオシンについては、さらに生物種を拡大して構造安定性に関する検討を行なった。cDNA クローニングによる一次構造解析、アミノ酸配列に基づいた系統解析、立体構造のシミュレーションによる機能および構造解析を行って、これらの生物が持つ収縮系タンパク質の特異性、特殊性について明らかにした。得られた結果は、軟体動物、とくに頭足類は特有の運動機能を保障するために、運動に関わるタンパク質群を独自に進化させてきたことが示唆された。また、ミオシンなどの性状は、軟体類の利用加工を考える上でも重要なデータであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Muscular filament-forming proteins, namely, myosin heavy chain, actin and tropomyosin from four species of mollusks (cephalopods) have been investigated. As for tropomyosin, those from other species were examined for their structural stability. Primary structure analysis based on cDNA cloning, phylogenetic analysis based on amino acid sequence, and functional and structural analysis based on tertiary structure simulation have revealed the specificity and uniqueness of those contractile proteins. The results obtained suggested that mollusks, especially cephalopods, have evolved protein related to muscle contraction to compensate for their specialized locomotion activities. On the other hand, the properties of myosin heavy chain, etc. would give important information for the effective utilization and processing of mollusks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：軟体類、筋肉、タンパク質、フィラメント、構造

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 無脊椎動物、とくに産業的に重要な軟体類については、その品質を大きく左右する筋肉タンパク質に関しての知見が乏しい。量的に多く存在するミオシンのロッド(尾部)やトロポミオシンなどの繊維状タンパク質では、 $\alpha$ ヘリックス構造の割合が90%以上と非常に高いことが知られている。 $\alpha$ ヘリックス構造はタンパク質の形状によらず、立体構造を形成する上で重要な役割を持つが、特にコイルドコイルは $\alpha$ ヘリックス構造を基礎として形成されるモチーフ構造で、繊維形成タンパク質や転写調節因子等に多く認められる。コイルドコイル構造はタンパク質の種類にもよるが、N末端側からC末端側まで均質なものではなく、安定の高い部分や低い部分が存在することが知られるようになったが、この知見は一次構造から予測されるものとは異なっており、一次構造からのアプローチには限界があることを意味している。また、分子内の安定性の不均質性はコイルドコイル、およびそれを含むタンパク質の機能と密接に関連していると考えられる。

(2) 筋肉食品の加工においては、コイルドコイルの安定性、ゲル形成能、フィラメント形成能は製品の品質を左右する重要な要素であり、本構造の制御は軟体類筋肉の有効利用にとってきわめて重要である。これに関連して、ミオシン自体は熱に対して不安定であるが、その一部分であるS2領域の熱安定性は高く、また、トロポミオシンの熱安定性が高いことも知られている。他方、ミオシンからは弾力のあるゲルが得られるが、トロポミオシンのゾルは加熱により粘稠なペースト状にはなるもののゲルは形成しない。これらの現象について、分子機構は明らかにされていない。

このような背景の下に、軟体類のフィラメ

ント形成タンパク質の性状や機能の特性を詳細に明らかにすることはとても重要と考え、本研究に着手することにした。

## 2. 研究の目的

(1) 軟体類筋肉の主要なフィラメント形成タンパク質（ミオシン重鎖、アクチン、トロポミオシン）を対象に、一次構造および高次構造との関係、系統解析、立体構造相同性解析等により、当該生物種がもつタンパク質群の特殊性について調べる。トロポミオシンについては、数種の生物について構造安定性に関する詳細な検討を行い、安定性に関わるアミノ酸残基の同定を試みる。

(2) 軟体類ミオシン重鎖に認められるスキップ残基の役割を調べるため、当該部分に相当する合成ペプチドを調製し、熱安定性について円二色性スペクトル測定により検討する。

## 3. 研究の方法

(1) スルメイカ、ヤリイカおよびコウイカの外套膜筋およびマダコ足筋から、定法によりミオシン重鎖をコードする遺伝子をクローニングし、コード領域の塩基配列からアミノ酸配列を演繹した。これに基づいて分子系統樹を作製し、分子進化の過程を推定した。

(2) 得られた配列に基づき ATP 結合部位、アクチン結合部位など機能ドメインの同定を行った。さらにフィラメント形成能とコイルドコイル構造との関連性について他生物種のミオシン重鎖との相違点を明らかにし、ミオシンが機能を発揮する上で必須な一次構造の特徴の解明を試みた。

(3) フィラメントを形成するミオシン重鎖のロッド領域に相当する 30 マーのペプチドを合成し、示差走査熱量分析および円二色性測定により測定し、軟体類ミオシンに特有な熱力学的性状の解明を試みた。

(4) 分子全長がコイルドコイルを形成するトロポミオシンについては、精製タンパク質の熱力学的性状の解明、ホモロジーモデリングによる立体構造の推定を行うことにより、一次構造の特徴、二次構造の配置と機能部位とを関連付けて詳細に検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 上記 4 種のみオシン重鎖について cDNA の塩基配列を明らかにし、アミノ酸配列を演繹した。アミノ酸配列の相同性は、例えばヤリイカとコウイカの間では 94% であった。系統解析の結果、頭足類のみオシン重鎖は独立したクレードを形成するが、他の軟体類のものに比較的近いことが明らかとなった (図 1)。

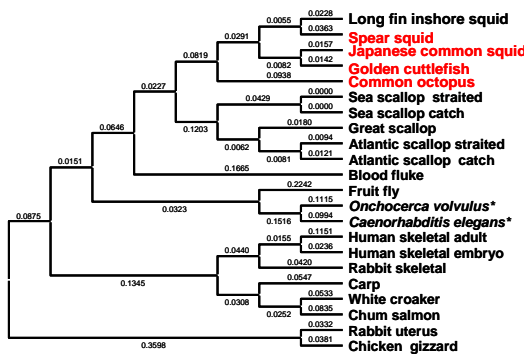
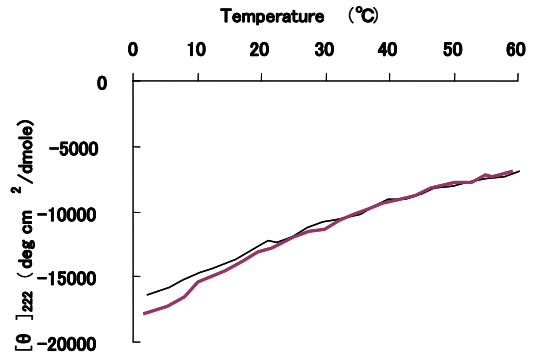


図 1. ミオシン重鎖のアミノ酸配列にもとづく分子系統樹。赤字は本研究で明らかにした生物種を示す。

(2) ミオシン重鎖についてはこれまで明らかにされたものに加えて、アイソフォームの存在を認めたため、さらに検討を進めた。その結果、マダコとヤリイカのものについて、尾部領域の構造が異なる (数残基長い) 2 種類の新規配列を明らかにした。両者について、コイルドコイル構造の 7 残基繰り返し配列など、二次ないし高次構造上の特性を明らかにした。しかし、各アイソフォームの機能につ



円率に及ぼす温度の影響。赤い線はスキップ残基を含むペプチド。

いては、現時点では不明である。

(3) 頭足類のみオシン重鎖では共通して、ロッド領域において「スキップ残基」とよばれる、コイルドコイル形成を妨げるアミノ酸が周期的に点在することを明らかにした。当該部分のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドについて、分子楕円率に及ぼす温度の影響を調べた結果、スキップ残基をもつペプチドの  $\alpha$  ヘルックス含量がやや低いことが認められ、このアミノ酸が尾部領域の構造を不安定化させていることが示唆された (図 2)。

(4) アクチン遺伝子のクローニングを上記と同様に行い、コード領域の塩基配列を決定し、全アミノ酸配列を演繹した。系統解析の結果

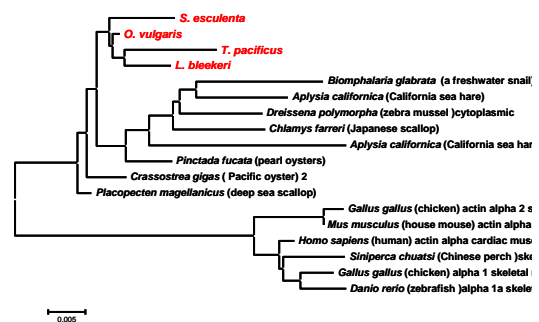


図 3. アクチンのアミノ酸配列にもとづく分子系統樹。赤字は本研究で明らかにした生物種を示す。

表1. ホタテガイ・トロポミオシンの2次構造予測

	ヘリックス傾向	疎水性	$\alpha$ -ヘリックス含量(%)	コイルドコイル形成率 (%)
横紋筋	1.14	2.05	87	86
平滑筋	1.15	1.97	91	87
シログチ(対照)	1.18	2.06	92	87

頭足類アクチンは独立したクレードを形成することが確認された(図3)。系統樹の形は上記のミオシン重鎖のものとは大きく異なっていた。これらの結果は、軟体類(頭足類)が特有の運動形態に適応する過程において、筋肉タンパク質が脊椎動物に見られないユニークな構造を獲得するに至った経緯を示唆するものである。

(5)トロポミオシンのアミノ酸配列が未知であったヤリイカについて、足筋から全RNAを調製し、cDNAに変換した後、クローニングを行い、全アミノ酸配列を演繹した。これで、上記4種類に関し、ミオシン重鎖、アクチン、トロポミオシンのすべての一次構造が判明した。そこで、得られた配列情報に基づき、分子系統樹を作製することにより各タンパク質の類縁関係や進化の過程を推定した。

(6)分類上離れたホタテガイ、スルメイカおよびトコブシの筋肉からトロポミオシンの精製を行った。熱変性過程におけるエンタルピー、エントロピーおよび変性における自由エネルギーの変化を求めた。さらにコイルドコイル構造の熱安定性について、示差走査熱量分析に基づきヘリックス含量の温度依存的な変化、その可逆性について円二色性測定および示差走査熱量分析により調べた。次に、構造安定性における温度依存性の相違についても検討した。このテーマについては、魚類筋肉由来のものとの比較検討を行い、熱変性における構造変化を明らかにするとともに、 $\alpha$ -ヘリックスの変化についても検討した

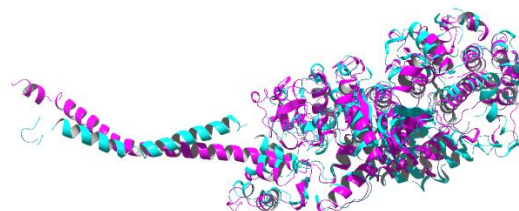


図4. ヤリイカおよびホタテガイのミオシンS1領域の立体構造の重ね合わせ。ヤリイカは青で、ホタテガイはピンクで示す。

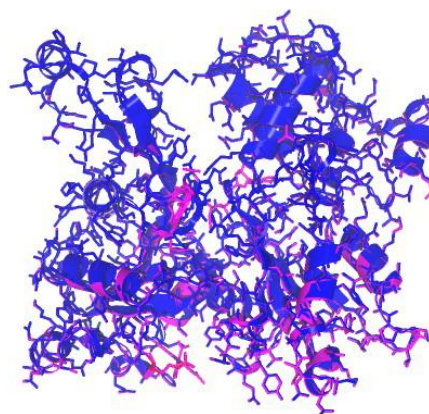


図5. スルメイカおよびウサギのアクチンの立体構造の重ね合わせ。スルメイカはピンク、ウサギは青で示す。

(表1)。得られた結果に基づき、各二次構造の安定性に関与するアミノ酸を特定した。

(7)これまで本研究課題で得られた各タンパク質につき、一次構造情報をもとにホモロジーモデリングにより立体構造を推定した(図4, 5)。いずれの場合も、全体的な構造は良く似るが、細部の構造については明確な違いが認められた。さらに、上記3種のタンパ

ク質間のインターフェースのモデル構造にもとづいて、軟体類筋肉の構造特性について考察した。

(8)これらの知見により、性状について不明の点が多かった軟体類、とくに頭足類の筋肉のフィラメント形成タンパク質について多くの構造情報を蓄積することができた。これらの結果は、軟体類(頭足類)が特有の運動形態に適応する過程で筋肉タンパク質が、脊椎動物に見られないユニークな構造を獲得するに至った経緯を考える上で貴重なものである。また、これらの生物の筋肉を貯蔵、加工する時、各タンパク質を安定化させる際に有用な情報になると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① H. Ozawa, S. Watabe, Y. Ochiai: Thermostability of striated and smooth adductor muscle tropomyosins from Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Journal of Biochemistry*, 査読有り Vol. 147, doi: 10.1093/jb/mvq018 (2010).

② Y. Ochiai, H. Ozawa, S. Watabe: Strategies of aquatic animals for adaptation to ambient temperatures as estimated from the thermal stability of myofibrillar proteins *Journal of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 査読有り Vol. 4 (Special Ed.), 9-15 (2009).

③ Y. Ochiai, G.F. Wang, H. Ozawa, S. Watabe: Characterization of molluscan muscle based on the properties of major myofibrillar protein components. *Asian Fisheries Science*, 査読有り Vol. 22(2): 403-414 (2009).

[学会発表] (計14件)

① Y. Ochiai, G.F. Wang, Y. Ono, S. Watabe: Characterization of decapodiformes myosin heavy chains: Structure, function and evolution International Conference of Comparative Biochemistry and Physiology, サルバドル (ブラジル) 2007年8月.

② G.F. Wang, S. Watabe, Y. Ochiai: cDNA cloning and complete primary structures of myosin heavy chains from spear squid and cuttlefish. 日本水産学会秋季大会 (函館), 2007年9月.

③ Y. Ochiai, G.F. Wang, S. Watabe: Evolution of muscle myosins as characterized by the sequence diversity of subfragment-1 regions. Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (Busan), 2008年11月.

④ Y. Ochiai, G.F. Wang, S. Watabe: Role of skip residues in myosin rod as revealed by synthetic peptides. 生物物理学会年会 (福岡), 2008年12月.

⑤ 落合芳博、王国峰、渡部終五: 軟体動物筋肉アクチンの構造上の特徴. 日本蛋白質科学会年会 (熊本), 2009年5月.

⑥ Y. Ochiai, G.F. Wang, S. Watabe: Characterization of myosin-actin interface of molluscan striated muscles. The 23rd Symposium of The Protein Society (Boston), 2009年7月.

⑦ G.F. Wang, S. Watabe, Y. Ochiai: Primary structure and phylogenetic analysis of tropomyosin from spear squid *Loligo bleekeri* arm muscle. 日本水産学会春季大会 (東京), 2010年3月.

ほか7件

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等          なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

落合芳博 (YOSHIHIRO OCHIAI)

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教

授

研究者番号：50160891

### (2) 研究分担者

渡部終五 (SHUGO WATABE)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40111489