

平成22年5月17日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780150  
 研究課題名 (和文) レバーアーム構造をもたない褐藻類ミオシン様タンパク質の機能解析

研究課題名 (英文) Study on the myosin like protein from brown alga *Laminaria japonica*

研究代表者  
 井上 晶 (INOUE AKIRA)  
 北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：70396307

研究成果の概要 (和文)：有用大型褐藻類であるマコンブから cDNA クローニング法により得られた 634 アミノ酸から構成されるミオシン様タンパク質 (以下 LjMPL と称する) の昆虫細胞発現系を構築し、その機能について調べた。その結果、LjMPL はマコンブ・カルモジュリンと共発現した場合には、アクチン非存在下、25℃では 0.26 1/sec の Mg-ATPase 活性を示し、その活性はアクチンにより増大し、40  $\mu$ M アクチン存在下では 0.68 1/sec で最大となった。さらに、*in vitro* motility assay により、LjMPL は 0.03  $\mu$ m/sec の速度でアクチンの滑り運動を示した。また、LjMPL 遺伝子の構造解析により LjMPL の翻訳領域は 3 つのイントロンで分断された 4 つのイントロンから構成されることが分かった。様々な時期に採取した藻体における発現パターンについて RT-PCR 法で調べた結果、LjMPL は採取時期に依存せずに藻体内で発現していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A cDNA encoding myosin-like protein (LjMPL) was cloned from brown alga *Laminaria japonica*. LjMPL consists of 634 amino acids, which showed the significant homology with sequences of other species myosin motor domain, but there is no region corresponding to loop-2, converter, neck, and tail domains of other myosins in LjMPL. Recombinant LjMPL (rLjMPL) was expressed in insect cells and purified in the absence or presence of *L. japonica* calmodulin (LjCaM). When rLjMPL was co-expressed with rLjCaM, purified rLjMPL showed that actin-activated Mg-ATPase and actin translocation activities. rLjCaM showed the highest Mg-ATPase activity (0.68 1/sec) at 25℃ in the presence of 40  $\mu$ M F-actin. Actin movement was observed with the velocity of 0.03  $\mu$ m/sec at 25℃ in *in vitro* motility assay. Genomic DNA analysis revealed LjMPL gene was comprised of four exons interleaved with three introns. According to RT-PCR analysis, mRNA of LjMPL was expressed independent of cultivated-season of *L. japonica*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：褐藻類、コンブ類、ミオシン、アクチン、ATP 分解酵素

## 1. 研究開始当初の背景

大型褐藻類であるマコンブ (*Laminaria japonica*) は有用海藻の一つであるが、細胞壁構成成分として他の植物や藻類には見られないアルギン酸やフコイダンなどの粘性多糖類を多量に含有するため、核酸やタンパク質の効率的な抽出は困難であり、その細胞機能に関わるタンパク質の研究はほとんど行われていない。

このように生化学および分子生物学の実験に必要な試料をコンブ類から得るためには粘性多糖類の除去技術の構築が必須であったが、我々はエゾアワビ由来アルギン酸リアーゼと市販のセルラーゼを利用した効率的なプロトプラスト化の方法を確立 (Inoue et al., 2008) し、得られたプロトプラストから高品質な mRNA を精製し cDNA を得た。

本研究では、我々がマコンブから cDNA クローニング法により得たミオシン様タンパク質 (以下 LjMPL と称する) に着目し、その性状を解明することとした。

## 2. 研究の目的

LjMPL をコードする cDNA から演繹されたアミノ酸配列は 634 残基から成り、BLAST 検索により他種のもイオシンのモータードメインと高い相同性を示した。例えば、*Arabidopsis thaliana* myosin XIF (GenBank accession number NM128748) の 1-609 番目のアミノ酸配列と最も高い相同性 (40%) を示した。しかしながら、既知のもイオシンがもつ Loop-2 以降に相当する配列は見出されなかった。一方、LjMPL の C 末端部には他のタンパク質と有意な相同性を示さないユニークな 28 アミノ酸が存在していた。

LjMPL の一次構造比較だけでなく、ホモロジーモデリング (図 1) の結果も LjMPL はレバーアーム構造に相当するアミノ酸配列をもたないもののもイオシンのモータードメ

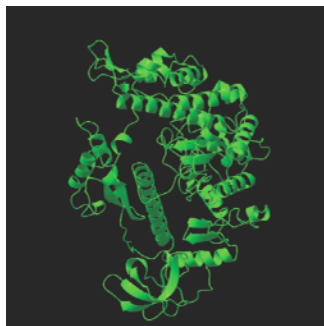


図 1. LjMPL のホモロジーモデリング

インの大部分に相当する配列 (ATP 結合部位や Loop-1 を含む) をもつタンパク質であることを示唆した。

このような特徴をもつタンパク質は他に見られないことから、本研究では LjMPL・cDNA を用いて昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を構築し、得られた組換え LjMPL の機能解析を行うこととした。また、LjMPL 遺伝子の構造解析と様々な時期に採取した藻体における発現様式についても調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換え LjMPL の発現と精製

LjMPL をコードする cDNA を pFastBac1 ベクター (Invitrogen) に導入し、C 末端部分に 8xHis-tag を融合するように変異を導入した。常法に従い組換えバキュロウイルスを作成し、昆虫細胞 Sf21 を用いて組換えタンパク質の発現を行った。

組換え LjMPL の精製は、細胞を回収後、非変性条件下で行い、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより精製した。

また、マコンブからカルモジュリン (LjCaM) の cDNA クローニングを RACE 法により行い、大腸菌発現系を構築した。さらに組換え LjCaM バキュロウイルスについても上記と同様の方法で発現系を構築した。得られた組換えウイルスは LjMPL との共発現に使用した。

### (2) 組換え LjMPL の性状解析

組換え LjMPL のアクチン活性化 Mg-ATPase 活性は、ウサギ骨格筋 F-アクチンを用いて、遊離したリン酸をマラカイトグリーン法により定量することで測定した。

*in vitro* motility assay は、ローダミンファロイジンにより標識したウサギ・F-アクチンを用いて蛍光顕微鏡下で観察、録画した後、解析を行った。

### (3) 組換えセルラーゼおよびアルギン酸リアーゼを用いたマコンブ細胞のプロトプラスト化と核酸の抽出

市販されているキットや常法ではマコンブ藻体からのゲノム DNA の効率的な調製が困難であったため、昆虫細胞発現系を用いてアワビ由来のセルラーゼ (HdEG66, Suzuki et al., 2003) とアルギン酸リアーゼ (HdAly, Shimizu et al., 2003) の各組換え酵素の分

泌発現系を構築した。そのために各酵素のシグナルペプチド部分をミツバチ・メリチンのシグナルペプチドとなるように変異を導入し、C末端部分には8xHis-tagを導入した。組換え酵素の発現は Sf9 細胞を用いて行い、培養液を回収後、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーに供した。

精製組換え酵素は、マコンブからのプロトプラスト細胞調製のために混合使用した。得られたプロトプラストは回収後、ISOHAIR キット (WAKO) を用いたゲノム DNA または RNeasy キット (Qiagen) を用いた RNA の抽出に使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組換え LjMPLP の機能解析

組換え LjMPLP ウィルスのみを感染させた昆虫細胞から、1 L の培養液あたり約 0.2 mg の組換え LjMPLP が得られた。このようにして調製された組換え LjMPLP は Mg-ATP の非存在下において超遠心共沈法および蛍光顕微鏡による観察でアクチンを結合することが確認された。しかしながら、生理的条件下では最大 5 mM Mg-ATP の存在下でもアクチンから解離しなかった。また、Mg-ATPase 活性測定を行った結果、このようにして得られた組換え LjMPLP は、ほとんど活性を示さなかった。

一般に非筋細胞のアンコンベンショナルミオシンは CaM を軽鎖として結合することが知られていることから、マコンブから同タンパク質をコードする cDNA のクローニングを行い、組換え LjCaM と LjMPLP の共発現系を構築した。また、抽出および溶出バッファーに常時 0.5 mg/ml となるように大腸菌発現により得られた精製 LjCaM を添加して、タンパク質の精製を行った。このようにして得られた組換え LjMPLP の収量は上記の場合と同等であったが、その性状には大きな違いが認められた。すなわち、LjCaM 存在下で調製された組

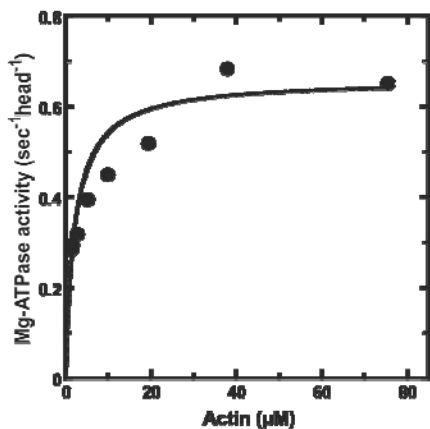


図2. rLjMPLPのアクチン活性化Mg-ATPase activity  
測定条件: 25 mM Imidazole (pH 7.4), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 1 mM EGTA, and 1 mM DTT, 25°C

換え LjMPLP (以下、rLjMPLP と称する)は、アクチン非存在下では、25°Cで 0.26 1/sec の Mg-ATPase 活性を示した。さらに、その活性はアクチンの添加により増大し、40 μM F-アクチン存在下で最大となった (0.68 1/sec) (図 2)。

また、同タンパク質を洗浄したガラス上に固定して蛍光標識されたアクチンを用いて *in vitro* motility assay を行った結果、1 mM Mg-ATP の添加によりアクチンの一方向への連続的な挙動が観察された (図 3)。アクチンの移動速度を解析した結果 (図 4)、その平均速度は約 0.03 μm/sec と算出された。

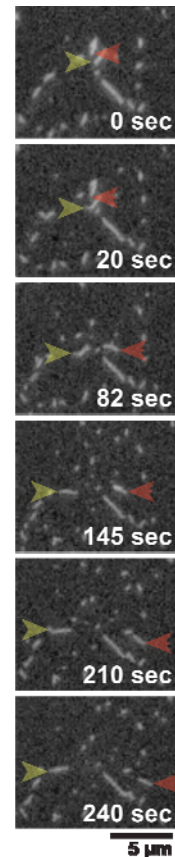


図3. rLjMPLP固定化ガラス上におけるアクチンフィラメントの移動  
各矢印はアクチンフィラメントの移動先端を示す

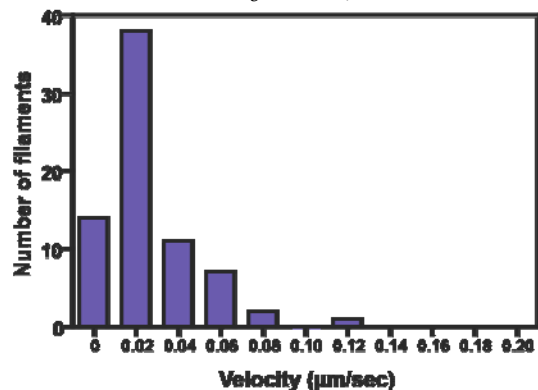


図4. rLjMPLPのアクチン滑り運動速度  
測定条件: 25 mM Imidazole (pH 7.4), 25 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25°C

また、ニトロセルロースを塗布したガラスに rLjMPLP を固定した場合には、F-アクチンの結合は観察されたものの ATP を添加してもアクチンの移動は観察されなかった。一方、rLjMPLP を抗 His-tag 抗体を介してガラス上に固定した場合には、上記と同等の平均速度でアクチンの滑り運動を示した。移動が観察されたアクチンの頻度も約 3 倍に増大していた。このようにアクチンの挙動はニトロセルロースでコートされたガラス上では観察されないが、抗体などのスペーサーを適切に配置することで改善された。ニトロセルロースのような疎水性度が高い物質に直接 LjMPLP を吸着させた場合には、様々な部位がガラス上に固定されたため、ATP 分解に伴う LjMPLP の構造変化が阻害されたためと考えられた。

以上の結果から、LjMPLP は典型的なレバー

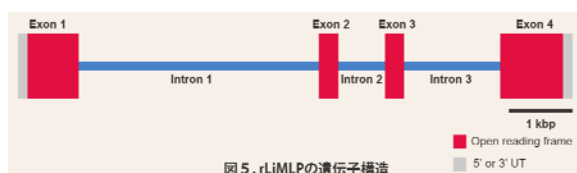
アーム構造をもたないと一次構造から予測されるものの、ミオシンとしての特徴、すなわちアクチン活性化 Mg-ATPase をもち、アクチンを滑り運動する能力をもつことが明らかになった。また、その機能発現のためには CaM の存在が必要であったが、LjMLP のアミノ酸配列には CaM 結合モチーフとして知られている IQ モチーフに相当する配列は見られない。LjMLP の C 末端部 28 アミノ酸は他のタンパク質と優れた相同性を示さない独特な配列であることから、同部分が CaM 結合に密接に関与している可能性が考えられた。また、マコンブ細胞内では本研究でクローニングされた LjCaM 以外の CaM アイソフォームや CaM 様タンパク質が真の結合タンパク質として機能している可能性が考えられた。

## (2) LjMLP の遺伝子解析

LjMLP の構造遺伝子を解析するために、マコンブからのゲノム DNA 抽出を常法により試みたが、適切なテンプレートとして使用可能な品質のゲノム DNA を得ることが困難であった。その理由としては、①粘性多糖類の存在、②市販のセルラーゼに混入しているセルラーゼ以外の酵素（ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなど）の存在の 2 点が考えられた。これらの問題を克服するため、藻食性軟体動物であるエゾアワビ由来のセルラーゼ (HdEG66) とアルギン酸リアーゼ (HdAlly) を利用することとした。既に我々はこれらの cDNA をクローニングしていたことから、これを用いて昆虫細胞を利用した分泌発現系を構築し、組換え酵素を得た。このようにして得られた各組換え酵素はいずれも天然のそれらと同等の酵素活性を示した。

細胞のプロトプラスト化を指標として、これらの組換え酵素を用いた核酸抽出法を構築した。すなわち、マコンブ藻体を細切後、精製プロテアーゼ (0.2 mg/ml Proteinase K (Roche)) で 17°C、15 分間インキュベートし、海水で藻体を良く洗浄後、5 U/mL 組換え HdEG66 と 100 U/mL 組換え HdAlly で処理することにより効率的にプロトプラストを作出することが分かった。得られたプロトプラストからは常法によりゲノム DNA の抽出が可能であり、ゲノミック PCR の鋳型として使用することができた。

LjMLP の 5' および 3' 側の非翻訳領域に対するプライマーを設計し、PCR を行った結果、約 7 kbp の DNA が増幅された。pTac-1 ベクター (Biodynamics) にサブクローニング後、全塩基配列解析を行った。その結果、LjMLP 遺



伝子の翻訳領域部分は 3 つのイントロンで分断された 4 つのエキソンから構成されていることが明らかになった (図 5)。他種のミオシンの相当部位の遺伝子構造は、より多くのイントロンで分断されていることを考えると、LjMLP はそれらよりも初期の進化により獲得されたものであると考えられた。

また、様々な時期におけるマコンブを函館沿岸 (2008 年 1 月から 2009 年 7 月) で採取し、葉状部から上記の方法で RNA の抽出と cDNA の合成を行った。これを鋳型として、LjMLP のプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、LjMLP をコードする遺伝子はいずれの時期の藻体を用いた場合にも増幅が確認された。また、成熟マコンブ (2009 年 7 月採取) を葉状部、茎部、根部に分け、各部位から得られた cDNA を用いて RT-PCR を行ったところ、いずれの部位の cDNA を用いた場合にも DNA の増幅が確認された。以上の結果から、LjMLP は藻体の時期や部位によらず発現しているタンパク質であることが分かった。

## 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 1 件)

井上 晶、間篠智恵子、児玉偵奈、尾島孝男  
Protoplast preparation from *Laminaria japonica* with recombinant alginate lyase and cellulase, Marine Biotechnology, 査読有、2010、印刷中

〔学会発表〕 (計 2 件)

井上 晶、尾島孝男  
褐藻類マコンブに存在する新規ミオシンの探索、日本水産学会、2010 年 3 月 28 日、日本大学 (神奈川県)

井上 晶、間篠智恵子、尾島孝男  
組換え多糖類分解酵素を利用した褐藻類プロトプラストの効率的な作出、マリンバイオテクノロジー学会、2008 年 5 月 24 日、京都大学 (京都府)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 褐藻類の核酸抽出方法、褐藻類の種別法および褐藻類核酸抽出キット

発明者: 井上 晶、清水健志、八十川大輔

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-029136 号

出願年月日：平成22年2月15日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 晶 (INOUE AKIRA)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授  
研究者番号：70396307

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：