

機関番号：14101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21780195  
 研究課題名（和文）二枚貝平滑筋トウITCHINの構造特性解析に基づいたキャッチ収縮分子モデルの構築  
 研究課題名（英文）The molecular mechanism of catch contraction based on the structural characteristics of twitchin of bivalve smooth muscle  
 研究代表者  
 船原 大輔（FUNABARA DAISUKE）  
 三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授  
 研究者番号：00335150

研究成果の概要（和文）：ムラサキイガイ・キャッチ筋・ミオシンのS1領域をコムギ胚芽抽出液発現系を用いて発現させることに成功した。トウITCHINのリン酸化部位周辺をアミノ酸配列を分割して作製したペプチドと、ミオシンループ2ペプチドを用いたITC解析によって、トウITCHINのミオシン結合部位を推定した。RNA干渉法を用いて、ムラサキイガイ・キャッチ筋ミオシンとパラミオシンのノックダウンに成功した。

研究成果の概要（英文）：Myosin S1 of catch muscle of mussel *Mytilus galloprovincialis* was expressed using a protein expression system using the wheat germ extract. The myosin binding regions on the twitchin molecule were predicted with the ITC analysis using the peptides designed according to the sequence of twitchin and the myosin loop 2 peptide. The expression of myosin and paramyosin genes in catch muscles of mussel was suppressed by the RNA interference methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生体高分子化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：キャッチ収縮，二枚貝，ミオシン，アクチン，トウITCHIN，リン酸化

#### 1. 研究開始当初の背景

二枚貝のキャッチ筋はエネルギーを消費しない持続的収縮を行う。これまでの研究によって、キャッチ収縮波は筋タンパク質の1つであるトウITCHINのリン酸化と脱リン酸化によって制御されているが、それはトウITCHINが収縮性タンパク質であるミオシンとアクチンの両方に結合することによって行われていることが示唆されている。

ミオシンとアクチンに対してトウITCHINがどのように結合してキャッチ張力を生

み出しているのかはよく分かっていない。トウITCHIN，ミオシン，アクチンの三者の関係について分子レベルで解析することがキャッチ収縮を分子レベルで明らかにするために必要である。

#### 2. 研究の目的

本研究では、トウITCHINを中心とするキャッチ収縮関連タンパク質がどのように相互作用しているかを分子レベルで明らかにすることを目的として、まずそのための基礎

的実験技術の確立を目指すとともに、トウイッチンとミオシンとの結合性について詳細に検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ムラサキイガイ・ミオシン S1 発現系の構築

ムラサキイガイ・ミオシンの S1 領域のどの領域がキャッチ収縮に関与しているのかを明らかにするために、その発現体を作製することにした。まずミオシン S1 の発現系を構築することを目指した。大腸菌発現系ではミオシン S1 を発現させることは極めて困難であることから、コムギ胚芽抽出液を用いた発現系で行った。

既に当研究室で単離していたムラサキイガイキャッチ筋のミオシン S1 のクローンを用いて、コムギ胚芽抽出液発現系用の発現ベクターを構築した。発現ベクターを鋳型として RNA を合成した後、翻訳反応を行った。反応終了後、反応液を SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析を行い、ミオシン S1 の発現の有無を確認した。

#### (2) トウイッチンのミオシン結合部位の同定

キャッチ収縮制御タンパク質であるトウイッチンは、アクチンのミオシン結合部位と、ミオシンのループ 2 領域がトウイッチンと結合することが分かっている。しかしながらトウイッチンのどの部位がアクチンおよびミオシンと結合するかは不明である。そこで、今回はトウイッチンのミオシン結合部位の同定を試みた。

トウイッチンのリン酸化部位とその両脇に存在するイムノグロブリンモチーフを含む領域を 12 分割し、それぞれのアミノ酸配列を基にペプチドを合成した。合成したペプチドとミオシンループ 2 ペプチドを等温滴定カロリメトリー (ITC) 解析に供し、結合性を確認した。

ITC 分析は VP-ITC calorimeter (MicroCal LLC) を用いて行った。測定条件は次の通り: total injections, 25 times; cell temperature, 25 °C; reference power, 10 mCal/s; initial delay, 600 s; syringe concentration, 400 mM; cell concentration, 10 mM; stirring speed, 300 rpm. インジェクションパラメーターは次の通り. volume, 10  $\mu$ l; duration, 20 s; spacing, 300 s; filter period, 2 s. 滴定は 25°C で 400  $\mu$ M ループ 2 ペプチドを 10  $\mu$ l ずつ 10  $\mu$ M トウイッチンペプチドが 1.5 ml 入ったセルにインジェクションすることにより行った。測定バッファーは 30 mM potassium phosphate (KPi) (pH 7.0), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP. 得られたデータは希釈熱補正した後、Microcal

Origin 6.0 software を用いてコンピュータ解析した。

#### (3) キャッチ筋構成タンパク質ノックダウンムラサキイガイ作出

キャッチ収縮におけるキャッチ筋構成タンパク質の in vivo における機能を明らかにするために、キャッチ筋構成タンパク質をノックダウンすることにした。二枚貝筋肉におけるノックダウン実験の前例がないために、まずの RNA 干渉実験方法の確立を目指した。

ムラサキイガイを対象として、主要なキャッチ筋タンパク質であるミオシンおよびパラミオシンのノックダウンを試みた。既にクローン化されていたミオシンおよびパラミオシン遺伝子を鋳型として、2 本鎖 RNA を合成した。RNA 投与の最適量を調べるために、0, 20, 40, 60  $\mu$ g の RNA を 3 個体ずつ投与することにした。それぞれの遺伝子に対して、ムラサキイガイを対照群, 20  $\mu$ g 投与群, 40  $\mu$ g 投与群, 60  $\mu$ g 投与群の 4 群に分け、RNA を投与した。投与後、1 週間ムラサキイガイを飼育したのち、キャッチ筋を採取し、ミオシンおよびパラミオシンのリアルタイム PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ムラサキイガイ・ミオシン S1 発現系の構築

ウェスタンブロット解析の結果、ミオシン S1 に相当する分子量のバンドが確認され、ミオシン S1 が発現していることが分かった。また、分解物と思われる低分子量のバンドも確認された (図 1)。

以上の結果から、コムギ胚芽抽出液発現系を用いることでミオシン S1 の発現に成功した。生化学的解析に必要な量が得られるようにするためには、系を大きくする必要がある。

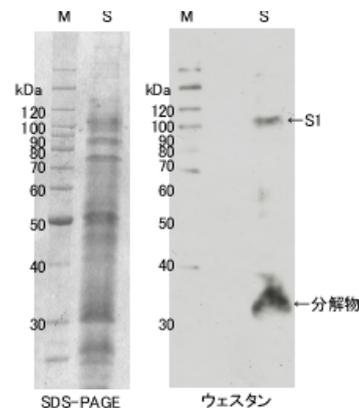


図1. コムギ胚芽抽出液発現系を用いたムラサキイガイ・ミオシン S1 の発現。発現誘導後の抽出液の SDS-PAGE パターン (左) と抗 HisTag 抗体を用いたウェスタンブロットイング (右)。ミオシン S1 の発現が確認された。M: 分子量マーカー; S: 発現後の抽出液。

(2) トウITCHンのミオシン結合部位の同定

トウITCHン D2 リン酸化部位領域を 12 分割した配列を有するペプチド (TW4197-4216, TW4217-4236, TW4237-4256, TW4257-4276, TW4277-4296, TW4297-4309, TW4310-4329, TW4330-4349, TW4350-4369, TW4370-4389, TW4390-4409, TW4410-4427) (数字はトウITCHン N 末端からのアミノ酸残基数を示す) を作製し, それらとミオシンループ 2 ペプチドとの結合について ITC による解析を行った. その結果, D2 リン酸化部位周辺に位置する 5 つのペプチド (TW4257-4276, TW4277-4296, TW4297-4309, TW4310-4329, TW4330-4349) が結合性を示した. この結果から, トウITCHンのミオシン結合部位はリン酸化部位周辺の二次構造を有さない領域であることが分かった (図 2).

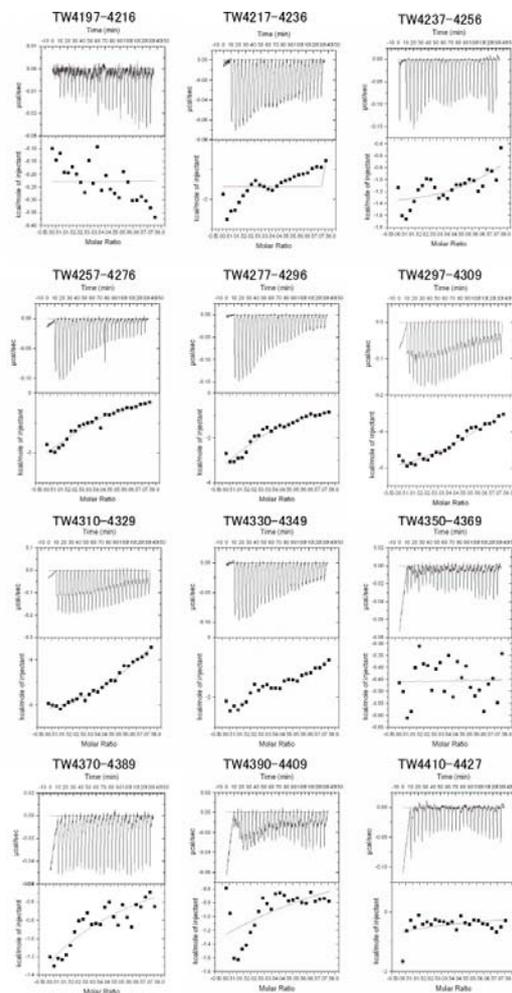


図3. トウITCHンリン酸化部位周辺のペプチド断片とミオシンループ2ペプチドとの等温滴定カロリメトリー解析の結果.

(3) キャッチ筋構成タンパク質ノックダウンムラサキイガイ作出

2 本鎖 RNA を投与し 1 週間飼育したムラサ

キイガイからキャッチ筋を採取し, 全 RNA を抽出後, cDNA を合成し, リアルタイム PCR によるミオシンおよびパラミオシンの発現解析を行った.

その結果, ミオシンおよびパラミオシンの RNA を投与した群において, 当該遺伝子の発現が抑制されていることが分かった (図 3). ミオシンについては, 1 個体当たり 40  $\mu$ g RNA を投与したものについて最も効果が高く, 55%の抑制が確認された. また, パラミオンについては, 1 個体当たり 40  $\mu$ g RNA を投与したものについて最も効果が高く, 75%の抑制が確認された. 以上の結果から, キャッチ筋タンパク質をノックダウンするには, 40  $\mu$ g RNA を投与すれば十分な効果が得られることが分かった. したがって, RNA 干渉法がムラサキイガイにも適用できることが明らかとなった. この手法を用いることによってキャッチ収縮に関与する遺伝子の機能解析を in vivo で行うことが可能となった.

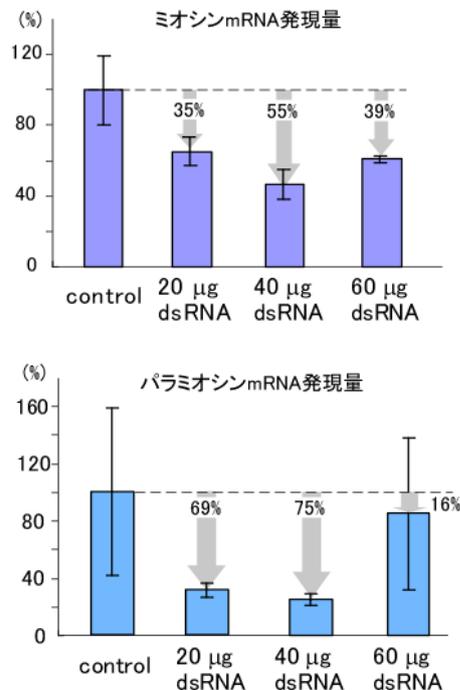


図2. RNA干渉法によるミオシンおよびパラミオシンの発現抑制.

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 2 件)

①船原大輔. 二枚貝キャッチ運動の分子メカニズム. 溶接学会誌 78, 25-29 (2009) (査読無).

②Daisuke Funabara, Rika Osawa, Miki Ueda, Satoshi Kanoh, David J. Hartshorne,

Shugo Watabe. Myosin loop 2 is involved in the formation of a trimeric complex of twitchin, actin and myosin. J. Biol. Chem. 284, 18015 - 18020 (2009) (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

①RNA 干渉法によるキャッチ筋タンパク質ノックダウン二枚貝作出の検討. 長尾知樹・六分一早希・船原大輔・加納 哲. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 平成 22 年 9 月 24 日. 京都大学 (京都府京都市).

②キャッチ筋トウITCHINの結合による F-アクチンの構造変化. 横谷沙季・船原大輔・渡部終五・加納 哲. 平成 22 年度日本水産学会春季大会. 平成 22 年 3 月 27 日. 日本大学 (神奈川県藤沢市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

船原 大輔 (FUNABARA DAISUKE)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号 : 00335150

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :