

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660166

研究課題名(和文)ATPを分解しないミオシンの機能と存在意義の解明

研究課題名(英文)Function and physiological role of myosin not having ATPase activity

研究代表者

井上 晶 (INOUE, AKIRA)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：70396307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： 褐藻類マコンブのプロトプラスト細胞に見出されたタンパク質であるSjMLPの一次構造は、他種ミオシンと高い相同性を示すが、コンバーター領域以後が欠損している特徴をもつ。SjMLPは、ATPの有無に関わらずアクチンと結合したが、ATPが存在する場合にはアクチンを束化した。また、SjMLPはプロトプラストに特異的に発現し、プロトプラスト化処理前の藻体には、SjMLPのC末端部が伸長した典型的なミオシン構造をもつタンパク質が発現することが示唆された。自然界でマコンブが生息する環境は、種々の要因により浸透圧が変動するが、SjMLPは細胞強度を高めて、そのような変化に適応するために存在すると考えられた。

研究成果の概要(英文)： The amino acid sequence of SjMLP, which was a novel protein found in protoplast cells of brown alga (*Saccharina japonica*), shows high homology to other myosins. Interestingly, it is deficient a series of sequence after the converter region of a typical myosin heavy chain. Recombinant SjMLP bound to F-actin regardless of the presence or absence of ATP, but F-actin was bundled only when ATP was present. In addition, it was suggested that SjMLP is expressed specifically in protoplasts, but a protein having a typical myosin structure, in which the C-terminal part of SjMLP is extended, was expressed in algal cells before protoplast preparation. Since the osmotic pressure surrounding habitat of *S. japonica* varies depending on various environmental factors, SjMLP is considered to adapt to such changes through increasing the cell strength by F-actin bundling.

研究分野：海洋細胞生物学

キーワード：褐藻類 モータータンパク質 ミオシン アクチン

1. 研究開始当初の背景

ミオシンは、ATPの加水分解により生じた化学エネルギーを運動エネルギーに変換し、F-アクチン上を移動するモータータンパク質である。これまでにミオシンは筋肉だけでなく非筋肉細胞にも広く存在することが知られており、機能が解析されたものはいずれも上記の機能を有する。先に我々は、大型褐藻類のマコンブ・プロトプラスト細胞由来cDNAライブラリーからミオシン様タンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングを行った結果、既知のミオシンと高い相同性を示す分子量約70,000のタンパク質(以後、SjMLPと称する)をコードするcDNAを取得した。SjMLPは、アクチン結合やATP分解に関わると予測されるアミノ酸配列をもっていたが、典型的なミオシンに共通してみられるコンバーター領域、軽鎖結合領域、および尾部領域のいずれも欠いており、これまでに知られていないユニークな一次構造をもつミオシン様タンパク質であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、SjMLPの細胞内での役割を明らかにするために、異種細胞により組換えタンパク質を生産し、生化学的手法により性状を調べた。

(2) 遺伝子レベルでの知見を得るために、天然で生育しているマコンブと高浸透圧下で調製されたプロトプラスト細胞について、それぞれトランスクリプトーム解析を進め、SjMLPまたはそれに類似した構造をもつmRNAについて調べた。また、遺伝子構造を明らかにするために、SjMLPがコードされている領域についてゲノミックPCRを行った。

(3) 以上の成果を総括することにより、ユニークな構造をもつSjMLPの機能を明らかにし、褐藻類における生理学的役割を解明することとした。

3. 研究の方法

(1) 組換えSjMLPの生産は、これまでに組換えミオシンの発現に有効であることが知られている昆虫細胞と一般的に組換えタンパク質の生産で使用される大腸菌発現系により行った。なお、いずれの発現系を用いた場合にも、発現タンパク質のC末端にはヒスチジンタグ(His-tag)を付加し、抗His-tag抗体を用いて目的タンパク質を精製した。機能解析は、初めにF-アクチンとの結合能を調べるためにATPの存在または非存在下で共沈実験を行った。次いで、SjMLPのアクチン活性化Mg-ATPase活性について常法により測定した。さらに、F-アクチンとの相互作用については、組換えSjMLPと蛍光標識したF-アクチンを混合し、蛍光顕微鏡下でATPの存在または非存在下で観察し、動画として記録、解析した。組換えSjMLPの構造につ

いては、電子顕微鏡を用いてロータリーシャドウイング法により観察した。

(2) マコンブ由来プロトプラスト細胞からのmRNAの調製は、既報の方法(井上ら、2007、2011)でプロトプラストを調製し、市販のmRNA抽出キットを使用した。藻体からのmRNAまたはゲノムDNAの調製は、代表者らが本研究で開発した方法により行った。得られたmRNAについては、次世代シーケンサーを用いて、トランスクリプトーム解析を行った。また、SjMLPをコードするcDNAの5'および3'非翻訳領域の配列を参照してプライマーを合成し、これらを用いてゲノミックPCRを行い、増幅されたDNAについては、DNAシーケンサーにより塩基配列を解析した。

4. 研究成果

(1) 組換えSjMLPは、昆虫細胞を用いた場合には、発現タンパク質は不溶化したため精製が困難であった。一方、大腸菌低温誘導発現系では、可溶性タンパク質として得られることが分かった。可溶化率は、特に低温で活性をもつシャペロンをコードする遺伝子をもつ大腸菌を使用した場合に最大となったため、以後の実験では本法を使用して精製した組換えタンパク質を使用することとした。なお、収率は1Lの培養液から約0.08mgであった。

(2) 精製した組換えSjMLPは、Mg-ATPの有無に関わらずF-アクチンと結合することが、共沈実験により明らかになった(図1)。

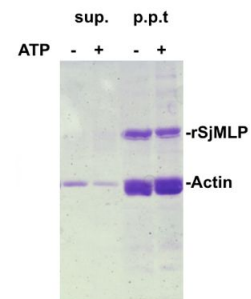


図1. SjMLPとF-アクチンの結合

(3) Mg-ATPase活性は極めて低く、反応の初期段階ではATP分解活性は検出されたが、反応時間の経過に伴ったATPの分解はみられなかった。この結果から、最大でSjMLPが1mol当たり約0.62molのATPを分解することが分

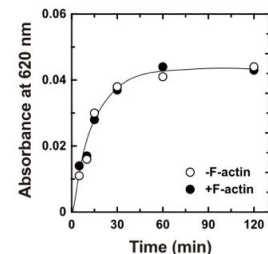


図2. SjMLPのMg-ATPase活性

かった。この分解活性は、F-アクチンの存在下でも活性化はみられず、同等の値であった(図2)。

(4) ニトロセルロースを塗布したガラス上に抗His-tag抗体を介して固定化したSjMLP

は、Mg-ATP の非存在下で F-アクチンの結合が観察されたが、Mg-ATP を加えても F-アクチンが解離または動く様子は見られなかった。一方、SjMLP と F-アクチンを Mg-ATP 非存在下で混合した後、ATP を 1 mM とするよう

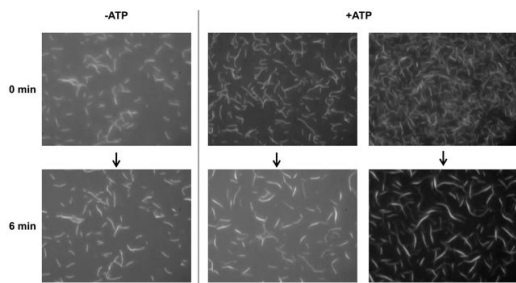


図3. SjMLPによるアクチンの束化に対するATPの影響

に加え、直ちに蛍光顕微鏡下で観察すると時間経過とともにF-アクチンが束化し、蛍光強度が増大することが分かった。ATP を加えなかった場合には、このような反応は観察されなかったことから、ATP 依存的にSjMLPはF-アクチンの束化を促進するタンパク質であることが明らかになった(図3)。

(5) ロータリーシャドウイング法で SjMLP を観察した結果、中空のリング状のタンパク質が観察された。この結果から、洋梨の形状をした2つのタンパク質が互いに向き合いリングの形状を示す可能性が考えられた(図4)。

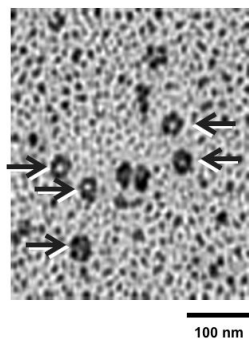


図4. 電子顕微鏡によるSjMLPの観察像

(6) 大型褐藻類は、アルギン酸やフコイダンなどの高粘性を示す酸性多糖を多量に含有するため、常法でゲノム DNA や mRNA を抽出することは困難であった。細胞壁を除去したプロトプラストを使用することでこの問題は回避できるが、プロトプラスト調製時に 0.8 M マンニトールを含む海水中で数時間処理するために、高浸透圧下で細胞内のタンパク質発現が変動する可能性が指摘されてきた。本研究では、代表者らが先に報告(井上ら、2014)したアルギン酸分解能に優れた HULK アルギン酸分解酵素を用いて、天然藻体から 1 時間以内に高純度の mRNA およびゲノム DNA を抽出する方法の開発に成功した。

(7) 天然のマコンブ藻体およびそれから調製したプロトプラストの cDNA ライブラリーを作成し、トランスクリプトーム解析を行い、SjMLP をコードする遺伝子について調べた。その結果、SjMLP をコードする遺伝子はプロトプラスト由来の cDNA には検出されたが、

天然藻体由来のものには完全に一致する配列は見出されなかった。しかしながら、天然藻体では、SjMLP と高い相同性を示すタンパク質(以後、SjMLP-Long と称する)をコードする 3,216 bp の cDNA の存在が確認された。この cDNA は、3'-末端の一部が欠損しており停止コドンは含まれていなかったが、演繹アミノ酸配列から、SjMLP の N 末端 606 アミノ酸と完全に一致する配列をもち、さらに SjMLP には存在しなかったコンバーター領域、軽鎖結合部位、尾部領域をもつ典型的なミオシンの構造をもつことが分かった。また、RT-PCR によっても SjMLP はプロトプラスト由来 cDNA を鋳型として使用した場合のみに増幅されることを確認した。

(8) 以上の結果から、SjMLP は ATP 依存的に F-アクチンの束化を促進し、細胞に浸透圧耐性を付与するタンパク質と考えられた。また、SjMLP の遺伝子は C 末端部が伸長した SjMLP-Long と同じゲノム DNA 領域から、選択的スプライシングによって生じるものと推定された。自然界でマコンブが生息する環境は、場所によっては潮汐や海水の蒸発などの自然現象により、浸透圧が変化する。SjMLP は、F-アクチンの束化により細胞強度を高め、そのような環境変化に適応するために存在するものと考えられた。

<引用文献>

井上 晶、加賀谷真由、尾島孝男、Preparation of protoplasts from *Laminaria japonica* using native and recombinant abalone alginate lyases、*J. Appl. Phycol.*、20 巻、2007、633-640

井上 晶、間篠智恵子、兒玉禎奈、尾島孝男、Protoplast preparation from *Laminaria japonica* with recombinant alginate lyase and cellulase、*Mar. Biotechnol.*、13 巻、2011、256-263

井上 晶、高殿晃平、西山竜士、田島健一、小林孝徳、尾島孝男、Characterization of an alginate lyase, FIAlyA, from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 and its expression in *Escherichia coli.*、*Mar. Drugs*、12 巻、2014、4693-4712

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、西山竜士、尾島孝男、The alginate lyases FIAlyA, FIAlyB, FIAlyC, and FIAlyX from *Flavobacterium* sp. UMI-01 have distinct roles in the complete degradation of alginate、*Algal Research*、査読有、19 巻、2016、355-362、DOI: 10.1016/j.algal.2016.03.008

〔学会発表〕(計2件)

井上 晶、加藤剛志、尾島孝男、褐藻類マ
コンブ由来のアクチン束化能をもつミオン
ン様タンパク質、平成 28 年度日本水産学会
春季大会、平成 28 年 3 月 27 日、東京海洋大
学(東京都・港区)

井上 晶、西山竜士、尾島孝男、Efficient
DEH production from alginate and its
conversion to KDG、The 5th International
Conference on Algal Biomass, Biofuels and
Bioproducts、平成 27 年 6 月 8 日、サンディ
エゴ(米国)

〔図書〕(計1件)

井上 晶 他、恒星社厚生閣、新技術開発に
よる東日本大震災からの復興・再生、2017、
総頁数 138、67-83

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

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：7 0 3 9 6 3 0 7

(2) 研究分担者

尾島孝男 (OJIMA, Takao)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：3 0 1 6 0 8 6 5

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()