

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23654153

研究課題名(和文)カルシウムイオン駆動収縮性蛋白質の結晶融解仮説の検証のための cDNA 作製

研究課題名(英文)Constructing cDNA for hypothesis verification of crystal melting of Ca²⁺-driven contractile protein

研究代表者

浅井 博 (Asai, Hiroshi)

早稲田大学・理工学術院・名誉教授

研究者番号：70063584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：琵琶湖の烏丸半島の湖岸において、原生動物ツリガネムシ種の *Zoothamnium arbuscula* Lake Biwa の大量採集を行った。Ca²⁺駆動収縮の本体タンパク質の *spaconnectin* の cDNA 分析用ペプチド一次構造解析のためである。最終年度の2014年にやっと大量採集に成功した。

ツリガネムシの採集が不可能な期間には、赤血球のCa²⁺依存膜変形、特に、収縮の研究を始めた。牛赤血球においては、顕著な収縮や変形は観察されなかった。しかし、より原始的なジェノバスの赤血球を用いたところ、Ca²⁺添加によって顕著な赤血球収縮が起きることを発見した。

研究成果の概要(英文)：1) In order to analyze peptide sequences of a putative protein of *spaconnectin* which is considered to have a co-operative contractile role with the another protein (*spasmin*), Thus, we intended to collect the peritrich ciliate (*Zoothamnium arbuscula* strain Lake Biwa) at the shallow water around the Karasuma Peninsula at Lake Biwa. The physiological role of this *spaconnectin* is supposed to be entropic contraction of *spasmoneme*. 2) In this year, we could get abundant amounts of the organisms. And We have also collected and incubated some amounts of green vorticella and other species for determining small subunit RNA genes in pure ethanol. 3) We intended to investigate if animal erythrocyte have properties of Ca²⁺-stimulative contraction similarly as vorticellae stalk. Cow erythrocyte was tested. Result of research was obscure so the the *Jenopus* erythrocyte was investigated. The result was successful. It means that the erythrocyte contracted at about 10 μmole amounts of Ca²⁺.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：生物物理

1. 研究開始当初の背景

生動物・繊毛虫類に属するツリガネムシは、虫体に細長い柄(ストーク)を持っている。ストーク内には2nm直径の超微細繊維の束(スパズモネーム)がある。収縮のためにはATP エネルギーを全く必要とせず、Ca²⁺(カルシウムイオン)の蛋白質への結合のみによって、収縮が起きるので、純物理的現象(ゴム弾性的、第三の生物運動)と云える。我々は、この特異的な運動機構とそれに直接的に関与する蛋白質の諸性質について研究してきた。その研究の集大成の概略は、Google でキーワードの「浅井博 ツリガネムシ」または「緑ツリガネムシ」で検索できる。レヴュー論文の原生動物学会誌 38、No.2 (2005)p133-152 に記載されている。いろいろな事情によりやっと最近になってゴム弾性的性質を示す蛋白質スパコネクチンの分子量が分かってきた。

2. 研究の目的

Ca²⁺が結合する蛋白質は、スパズミンと呼ばれよく知られたカルモディユリンのファミリーに属している。筋肉で発生するATP分解エネルギーと同じ程度のエネルギーがスパズミンのCa²⁺結合で発生するが、そのエネルギーのスパコネクチンへの移行のメカニズムもまだ未解明であった。

そこで、三種類のツリガネムシの大量培養または採集し、スパコネクチンの分離・精製を行う。分離・精製したスパコネクチンのペプチド断片のアミノ酸一次構造を明らかにして、cDNA の解明に処することを先ず研究の目的とした。cDNA が明らかにされれば、ベクターを作製して、スパコネクチンの大量精製は容易となり、スパズミンとの複合体の高純度作製も可能となる。

そこで、Ca²⁺存在下(約1マイクロモラー)でスパコネクチンがランダムコイル状態になっているかどうかを解明しようと試みた。さらに、無Ca²⁺下では、スパコネクチンが α -helix の状態をとるかどうかを検証した。

さらに、無Ca²⁺下では、スパコネクチンが α -helix の状態をとるかどうかを検証した。三種類のツリガネムシ類(ヴォルチケラ、カルケシウムとズーサムニウム)の夫々のcDNA 解明の必要性は、それらの分子量が50kDa、190kDa、90kDa と異なる。ヴォルチケラのスパコネクチンが単量体構造、カルケシウムのそれが四量体、さらにズーサムニウムのそれが二量体構造をとっている可能性が高いと考えたからである。

3. 研究の方法

手持ちのカルケシウム(ウエットペレットにして約1リッター)の部分的精製を行い、スパコネクチンのペプチド分析依頼への準備をした。カルケシウムのスパコネクチンを最初に研究する利点は、そのSH基アミノ酸

残基が蛍光性化学修飾剤によって化学修飾されることがわかっているからである(Jie Fang 君の博士論文、原生動物学雑誌 38(1)p101-102.(2005)、英文論文作成中)。

3種類のツリガネムシのスパズミンとスパコネクチンは塩および水に対して難溶性であるので、まず水溶性の蛋白質などを水洗いによって取り除く。ゴムで言えば、架橋剤に相当する蛋白質が2nm直径フィラメントに存在するためである。その後、7M尿素液でスパズミンが溶出してくる。続いて、尿素液を5Mグアニジン塩酸塩液に交換すると、スパコネクチンに相当する蛋白質が溶出してくる。一度溶出されたスパズミンとスパコネクチンは、尿素やグアニジン塩酸塩を透析で取り除いても比較的水溶液で安定して溶けたままになる。したがって、アルカリ電気泳動法が適用できる。勿論、一般の水溶性蛋白質類よりもやや疎水的であることを付記する。これらが、スパズミンとスパコネクチンの部分的精製のコツである。さらに、スパズミンと荒く精製したスパコネクチンとは、試験管内で結合することも分かっている。

カルケシウム(Carchesium polypinum)の大量培養と採集保存(グリセリン処理モデルの形として)を行った。餌としてのバクテリアは、その死骸が活性汚泥として貯まりにくいものを用いた。他にクラミドモナスを培養して餌の一部とした。このような、培養システムとすると、活性汚泥が少なく、餌としての生物を食ききった状態でのカルケシウムを比較的長期保存することが出来るからである。(Jpn.J.Protozool. 37<1>p61-62.p61-62.<2004>).

ヴォルチケラの研究には、Vorticella microstoma が将来もっとも重要になってくると推察される。この種にかぎりシスト(胞囊)を作るし、無菌培養も可能だからである(HE.Finley 等 J.Euka.Microb. 6.201-205<2007>). 現在までその培養経験もCa²⁺励起収縮性の研究経験はない。そこでそのスパコネクチンのcDNA 遺伝子を解析するための長期安定培養法を確立した。

カルケシウム(C.polypinum)の大量培養を行い、そのスパコネクチンの精製・ペプチド分析・cDNAの作成を行った。そのために、特定のバクテリアとクラミドモナスを餌として用いた。

琵琶湖の巨大ツリガネムシ(Z.arbuscula strain Biwa Lake)を大量採集・保存した。そのスパコネクチンの精製・ペプチド分析に供するためである。採集の時期は、水温が22-28 となる6-7月と9-10月であった。

1985年のことであるが、ドイツのハンブルグに半年間滞在したことがあった。しばしばコペンハーゲンの北方30キロのヒルラッド市を訪れることが出来た。その森林に囲まれた睡蓮沼に巨大ツリガネムシが生

息していることを確認できた。睡蓮の葉の裏側に巨大ツリガネムシ (*Zoothamnium geniculatum* strain Hillerrod) が生息していたからである。ちなみに、巨大というのは、幹部分のス Pazmonium の直径が 40 - 50 ミクロンと通常のス Pazmonium のその 30 - 40 倍もあるという意味である。外鞘を除いた分離ス Pazmonium の vs. 張力曲線の Ca²⁺ 濃度依存性を調べることが出来た。Ca²⁺濃度大のところと、小のところで、Hill パラメーター約 2 のアロステリック効果を発見したという記念的な研究成果も生れた (大域的には、W. Amos の結果と同じく ミハエリス・メンテン 的)。*V. geniculatum* を見つけ出す方法は、カナダ藻やイネ科植物に付着生息する川越産や琵琶湖産のものとは全く異なることに注意する必要がある。そこで、川越市および琵琶湖産の *V. arbuscula* とヒラ - ロッド産の *V. geniculatum* を ssrRNA 遺伝子を比較検討 (系統樹の枝分かれ度) した。また、岐阜県木曾川堤の溜池にも巨大ツリガネムシが見付かったということなので、それとの比較も行った。生息最適水温が異なっているので比較は、将来の研究試料候補の選定として重要である。ちなみに、英国のケンブリッジ周辺にも巨大ツリガネムシは生息するが、種が *Z. geniculatum* 的か *Z. arbuscula* 的かまったく不明である。W. Amos も答えられなかった。ドイツの Muenster 河川で見付かった種は、川越産のものに近いことを確認してある。ちなみに、北・中・南アメリカ大陸では、巨大ツリガネムシが発見されたという報告はまだ無い。

4. 研究成果

琵琶湖の烏丸半島の湖岸において、原生動物ツリガネムシ種の *Zoothamnium arbuscula* Lake Biwa の大量採集を行った。Ca²⁺駆動収縮の本体タンパク質の supaconnectin の cDNA 分析用ペプチド一次構造解析のためである。最終年度の 2014 年にやっと大量採集に成功した。

ツリガネムシの採集が不可能な期間には、赤血球の Ca²⁺ 依存膜変形、特に、収縮の研究を始めた。牛赤血球においては、顕著な収縮や変形は観察されなかった。しかし、より原始的なジェノパスの赤血球を用いたところ、Ca²⁺添加によって顕著な赤血球収縮が起きることを発見した。

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)

Moeto Nagai, Hiroshi Asai and Hiroyuki Fujita. "Non-Invasive Detachment of Vorticella from Calcium Alginate Membrane." *Journal of*

Surface Science and Nanotechnology, 査読有 11 巻, 2013 年, 2013-2015

[学会発表](計 6 件)

「心そこに有らざれば、見るとも観えず」の私の筋肉蛋白質体験記、生体運動合同班会議、2014 年 1 月、千葉大学

「ATP アーゼ運動系と Ca²⁺駆動運動系とで、どちらが生命起源的に先か」生体運動研究会合同班会議、2013 年 1 月、広島大学

「ス Pazmin Ca²⁺結合エネルギーのス Paz connectin への移行メカニズム」日本原生動物学会、2012 年 11 月、兵庫県立大学

「Ca²⁺駆動カルノーサイクルのタンパク質分子機構」基研研究会 2012 「非平衡系の物理 その普遍的理解を目指して」、2012 年 7 月、京都大学

「Ca²⁺駆動カルノーサイクルの分子機構」生体運動班合同会議、2012 年 1 月、筑波大学

「発散関数で表現するカントールの連続体仮説の証明」湯川記念会館研究会；非平衡の物理 マクロからミクロへ、2011 年 8 月、京都大学

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (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

6. 研究組織
(1) 研究代表者

浅井 博 (ASAI Hiroshi)
研究者番号 : 70063584

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
朝日 透 (ASAHI Toru)
研究者番号 : 80222595