

ホタテガイ(*Patinopecten yessoensis*)閉殻横紋筋

ミオシン重鎖の一次構造解析

○ 大澤沙織・木村メイコ・埜澤尚範・関伸夫・尾島孝男（北大院水）

キーワード：ミオシン重鎖・一次構造・架橋酵素・ホタテガイ

【目的】演者らはこれまで、ホタテガイ貝柱横紋筋の肉糊に 10mM 程度の CaCl_2 を添加すると内在性の架橋酵素トランスグルタミナーゼが活性化し、坐り効果によって弾力性のあるゲルが形成されることを報告してきた。しかし、ミオシン架橋部位をはじめ軟体動物肉のゲル化機構の詳細はよくわかっていない。そこで本研究では、ホタテガイミオシンの架橋重合機構を分子レベルで解明することを企図し、まず、これまで知見の得られていない貝柱閉殻横紋筋ミオシン重鎖(MHC)の全一次構造を明らかにした。

【方法】ホタテガイ閉殻横紋筋から cDNA ライブラリーを作製した。これを鋳型として、ヨーロッパホタテガイ(*Pecten maximus*)、アメリカイタヤガイ(*Argopecten irradians*)、マゼランツキヒガイ(*Placopecten magellanicus*)およびアメリカケンサキイカ(*Loligo pealei*)の MHC 間の保存性の高いアミノ酸配列を参考に設計した縮重プライマーと、増幅産物の塩基配列から合成した特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。得られた増幅産物はベクターに組み込み、大腸菌を形質転換させてサブクローニングを行い、サイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。また、ホタテガイ横紋筋から精製した mRNA から first strand cDNA を合成し、これを鋳型として 5'-RACE 法および、3'-RACE 法により 5'末端および3'末端側の cDNA 配列の分析を行った。

【結果および考察】得られたホタテガイ横紋筋 MHC cDNA から 6694 bp の塩基配列が明らかとなり、その翻訳領域 5820 bp の塩基配列から 1940 残基のアミノ酸配列が演繹され、推定分子量は 222,837 Da であった。このアミノ酸配列は相同性検索の結果、ホタテガイ外套膜筋 MHC および同じイタヤガイ科のヨーロッパホタテガイ、アメリカイタヤガイ、マゼランツキヒガイの各閉殻横紋筋 MHC のアミノ酸配列とそれぞれ 96.7%, 95.2%, 94.9%, 93.7%の相同性を示した。また、アメリカケンサキイカ、スケトウダラ、コイの MHC のアミノ酸配列とはそれぞれ 73.2%, 57.2%, 55.4%の相同性を示した。

ホタテガイ横紋筋 MHC と外套膜筋 MHC のアミノ酸配列を比較すると、S-1、S-2、LMM 各領域における相同性はそれぞれ 96.3%、94.4%、98.7%を示し、特に ATP 結合部位とアクチン結合部位の機能的領域においてアミノ酸配列が高度に保存されていた。一方、S-2 hinge 領域では 28 残基中 15 残基、すなわち S-2 hinge 領域の 54%のアミノ酸残基が置換(13 残基)または欠損(2 残基)により変異していた。またホタテガイ外套膜筋 MHC に見られる non-helical tail 領域の C 末端側 6 残基の伸長は、閉殻筋 MHC では見られず、組織の違いによる MHC の一次構造上の相違が確認された。

各種イタヤガイ科貝柱横紋筋 MHC 間でアミノ酸配列を比較すると、ATP 結合部位のコンセンサス配列である P-loop (GESGAGKT), switch I (NNNSSRF), switch II (DIAGFE)、また反応性 Lys 残基や反応性 SH 基の各領域でアミノ酸配列は完全に一致していた。一方、25-50 kDa junction (Loop-1), 50-20 kDa junction (Loop-2)は、Gly や Lys に富みフレキシブルな構造をとっていると考えられており、種間変異が大きいとされるが、イタヤガイ科の 4 種間のアミノ酸配列においても、Loop-1, Loop-2 ではアミノ酸の挿入や欠損、置換が多く見られた。rod 部分については、S-2 hinge 領域、C 末端領域も含めて全体に種間の相違はほとんど見られなかった。