ミニシンポジウム 魚貝類筋肉タンパク質の構造と機能の解析

cDNA クローニングによる一次構造解析^{*1}尾 島 孝 男^{*2}

北海道大学水産学部

はじめに

1970年代初頭に開発された DNA 組換え技術は生命科学の広範な分野を飛躍的に進歩させた。特に cDNA クローニング法^{1,2)}はタンパク質の一次構造解析において革命的な技術となった。この方法は、まず組織や細胞から抽出・精製した mRNA を鋳型として逆転写酵素により相補的 DNA (cDNA) を合成し、これを適当なベクター DNA (通常ファージ DNA かプラスミド DNA) に組み込み、いわゆる cDNA ライブラリーを作製する。ついで、そのライブラリーから適当なプロープと宿主菌とを用いて目的タンパク質をコードする組換え体を選び出す (クローン化する)。最後に、クローン化された cDNA の塩基配列を分析し、コドン対応表からアミノ酸配列を演繹するというものである。

我々はこれまで軟体動物筋肉タンパク質に関する比較生化学的研究を行い、ミオシン側の収縮調節が行われるホタテガイ類の筋肉にもアクチン側の調節タンパク質のトロポニン (Tn) が存在すること、さらに、それらの Tn は脊椎動物のものには見られない各種の特性を有することを明らかにした。^{3,4)} 本項では cDNA クローニング法によるアカザラガイ Tn サブユニットの一次構造の解析について概説する。

1. アカザラガイ横紋筋・cDNA ライブラリーの作製

高品質の cDNA ライブラリーを作製するためには、目的の組織 (筋肉) から分解されていない mRNA を調製する必要がある。そこで、RNA の調製は RNase の阻害条件下でできるだけ速やかに行う。我々は生きているアカザラガイから横紋筋 4g を切除し、直ちに 40 ml の 5.5 M グuanidiniチオシアン酸、0.5% サルコシル、および 2% 2-メルカプトエタノールを含むクエン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、ポッター型ホモジナイザーで磨砕した。このホモジネートからの全 RNA (rRNA, tRNA, および mRNA を含む) の調製は CsCl 密度勾配超遠心法または酸性フェノール処理法によった。全 RNA からの poly(A)⁺RNA (mRNA) の分離は oligo(dT) セルロースクロマトグラフィーによった。その結果、全 RNA 800

μg から約 2 μg の mRNA が得られた。mRNA からの cDNA の合成と cDNA ライブラリーの作製は、アマーシャム社製の cDNA 合成キットと λgt11 クローニングキット (RPN, 1256Y および 1280) によった。その結果 2 μg の mRNA から約 2 × 10⁶ pfu (プラーク形成単位) の λgt11-cDNA ライブラリーが得られた。

2. cDNA ライブラリーからの Tn サブユニット・cDNA のクローニング

λgt11 は代表的な λファージ発現ベクターで、isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside で誘導可能な β-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) をもち、その内部の *EcoRI* 切断部位に cDNA を組み込むように設計されている。そのため cDNA が *lacZ* の読み枠に合って組み込まれた場合には、cDNA のコードするタンパク質が β-ガラクトシダーゼの N 端部位との融合タンパク質として発現する。したがって、この融合タンパク質の目的タンパク質部分を認識する抗体をプロープとしてスクリーニングすれば目的の cDNA を持つファージを検出することができる。我々はアカザラガイ Tn の三つのサブユニット、すなわち、TnC, TnI, および TnT に対する特異抗体を用いて約 10⁴ pfu の組換え体をスクリーニングし、陽性クローンをそれぞれ 8, 17, 21 個得た。これらのクローン化ファージの DNA を調製し、制限酵素消化と 1% アガロースゲル電気泳動で cDNA のサイズを分析した結果、それらは 0.4~2.6 kilo-basepair (kbp) と概算された。

3. プラスミド DNA へのサブクローニングと塩基配列分析

λgt11 によりクローニングした Tn サブユニットの cDNA のうち、サイズの比較的大きいもの (1 kbp 以上) をストラタジーン社の pBluescript II プラスミドにサブクローニングし、塩基配列を分析した。配列分析には蛍光標識したプライマーと耐熱性ポリメラーゼを用いた ABI 社製サイクルシーケンスキットと DNA シーケンサー (ABI 社製, 373A 型) を用いた。また、プライマーから 250 塩基以上離れた部位の配列はエキソ III スクレアーゼと Mungbean スクレアーゼで作製した 5'-末端欠失ミュータントを用いて分析した。得られた cDNA の

^{*1} Analysis of Primary Structure of Proteins by cDNA Cloning.^{*2} Takao Ojima (Department of Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

```

GGCCTTCCAACTGCTGACGAATTCAGAGCGACAGAAAGCAGATCAGCGATGCCAAGC 60
      met S D E F R A T E K Q I S D A K
AGGCACTTTTGTAACTTTTGACAGAAAAGAGGGGAACAGTGTCAATGTAAGACTTAGGCG 120
      Q A F C N F D K K K E G T V S C K D L G
CCATATTTAAATCTCTCGGTCTGTGATGAAGGATGACAAAATCAAGGACTGGTCGGACG 180
      A I F K S L G L V M K D D K I K D W S D
AGGTGGACGAGGAAGCCTATGGAGATGTGAGTGTGAGCAATGGCTAAAACCTTTTGGAA 240
      E V D E E A C T G R L S C E Q W L K L F E
GGAGCTTTAAGAGGATTTGGACAGAAAGGAAGTGAAGGAGCCTTCGGAGTCTCTGACAG 300
      W K L K E D L D E R E L K E A F R V L D
AGGAGAGAGAGGAGTCAATTAAGGTGATGTATTAAAGATGGATCCTTAAGAGTTTAGGTG 360
      K E K K G V I K V D V L R W I L K S L G
ATGAATTAACAGAGATGAAGATAGAGAACATGATTGGGAAATCGACACCGAAGGAAGTG 420
      D B L T E D E I E N M I A E T D T D G S
GAACCTGTAGATTATGAAGAATTCAAATGCTGTGATGTCTCAGTGCAGCGCTGCAAGCTG 480
      G T V D Y E E F K C L M M S D A R C o p
GGGTGAGAGCGCGTCTGTGTTGGCCACTACTGCGACGATCTTGAATTCGAACATGTT 540
      T G A C T T T A A A T G T T G C G C A G G T T A C A C A T C A T A T A G A C A T T C T T A
      C C T A G T C A A A G T T T G C G C A G G T T A C C G G A T A O G A C T C C G C A G G T G C C C T A T T C C A
      T T G T A C A T G A A C A T A T A T T G T A G G T T C T C C C A T A C A T T A T T C A C C C A T C A T T A T T T T
      G T G T C T C C A T A A T T C C G T T T G T A T A A C A C T G C G C A C T A A C C T G C T T G C C C A G T A A T
      C T G C T A C T A G T G T T T A T T T G C T G T G C G T G A A A T A A T C A T T A C T C A T T T T C T T T
      A A A G G C G T A A G T G C T T G A T T T G T G T C A C C C G A T A A T G T T T C T A T C A A T T A C A
      G A A T T C A A G C T T T G A T G T G T G T G T T G A T T A G A A A C A C A A A A G C G T G T C A A T C
      A G A T T A G T T G T G C G C A C C T G C A G A G T A C A C T G G T A G C G T A T A T T A C A T A G C C
      A C G A G C C T T A A T A A T A A C A C A G A C T T A A C T C A A A A G G A T T A T C A T A A T A A T C A A
      C T C T G C A T G A A C A A T C A T A T A C A C A G C A C T C G T G T A T C A C T A C A T A C C C T T T T G C C T
      G C T G C A C T A A A G C A C T T G A T A C T A A A C C A G A G A C A C C G T A A G A T A C A C A A A T C A
      T T C C C T G A C T T T G T A T A T G C C A C C G G A T A A C C G A T T G C A C G T T G T G A C G T C A T C C
      T C T A A A G A G A G C A T C C A G C C T A C T T A T C T A C T A G T T G T G T G G A G C T T G C A C A A G
      C A T T G T A G C A A T G C T A C T A T A C C A C T A G T C C C T G T T G T G T C A T A T A T T A C A T A
      A G T T C T C C T A C C A G A G A G T A C A T T A C T A A A G A A G C A C T A G A C T A T A T A T T A T T
      T T A T A T A T G T A T A C A T A C T A C T A T T T T A T C A A T T A C T T T A T A C A T A A T A C A T T A
      T T T A T A T G A A T T A C C G A G T C T G T G C T T C C C A T A G T C T C A G G A C A A A G T G A T T C C G
      A T A T T G T A T T G A A A T A A T G A A A C A G C T G C A T A G A C A T A C A G T A T T T A T G T A T A G T G
      T T G T C T A C A C T C C C G A C A C T A C A G A T A T G C A T A T A A T T G C T C A G T C A T A A G C A C
      T A A G A C T T T T A C T A A T T A C A T T T T T C C A C G A C T A G C T G C A G G T T T C G T T C C G T A G A T
      T G A C C A G A C A C T A T A C C A C G C C C C T T A T A T A G C T A T A C A G A A A G A C A A T G A A T C T C T
      G T T T A C T C T T A C C G C T G T G A A G A G G A A A C A A C T A T T A C A C T G T T G T G A C A T T T
      A A A G A A T A A A T A G A T A A T T A T C T G T G C T T T T T G C A C T A A A A A T T G A A G C G A
      T A A A G G T T T T A T G C A A T A T A C A A T T A A A A A A G A C A A A A G T A A A A A A A A A A A A
      A A A A A A A

```

図1 アカザラガイ・トロポニンCのcDNAの塩基配列と演繹されたアミノ酸配列

塩基配列の下線部は5'末端側から翻訳開始コドン、停止コドン、およびポリアデニル化シグナル配列を示す。演繹されたアミノ酸配列と残基番号は塩基配列の下に示し、右端には塩基番号を示した。

塩基配列によって、Tnの三つのサブユニットのアミノ酸配列のほぼ全体を知ることができた。ここでは紙面の制約上、構造と機能に関する比較生化学的研究が最も進んでいるTnCのcDNA⁹⁾について述べる。

4. アカザラガイ・TnCのcDNA

我々が得た8個のTnC・cDNAクローンのうち、翻訳領域全体を含むのは約2 kbpのもの(AC2Kと称する)1個であった。AC2Kの全塩基長は1987 bpで、12~473番目の塩基部分が翻訳領域であった(図1)。翻訳開始コドン(ATG)をMetとすると153アミノ酸が演繹された。この開始コドン付近の配列(7~15番目の塩基)は従来知られている真核細胞生物mRNAの翻訳開始領域のコンセンサスシーケンス(CCAACATGT)⁷⁾と良く類似していた。一方、3'端には18塩基のpoly(A)⁺部位があり、その27および19塩基上流にはポリアデニル化シグナル配列と推定されるAATATAおよびAATTAAが認められた。

次に、このcDNAから演繹されたアミノ酸配列をこれまで報告された各種のTnCのアミノ酸配列と比較した。その結果、ホタテガイのTnC⁸⁾との相溶性が最も高く、約89%であったが、カブトガニ⁹⁾やザリガニ¹⁰⁾のような節足動物のものとの相溶性は比較的低く、35~40%であった。一方、アカザラガイとホタテガイのTnCのカルシウム結合能を一次構造および予測二次構造から推定した結果、4個あるカルシウム結合部位のうち、N末端側から3個目までがカルシウムの配位に必須な酸素含有アミノ酸の置換やEFハンドを構成する α -ヘリックス構造の崩れなどの原因で機能を失っていることが示された。これまでに報告されたTnCでは、すべてN末端側から1~2番目のカルシウム結合部位が収縮調節部位とされているので¹¹⁾ホタテガイ類のTnCは極めて特異的であり、二重調節系を有する筋肉であることとの関連性が注目される。1個のカルシウム結合による調節機構については今後、このcDNAをもとに変異TnCを作製し検討する予定である。

文 献

- 1) A. Efstratiadis, A. F. C. Kafatos, A. M. Maxam, and T. Maniatis: Enzymatic *in vitro* synthesis of globin genes. *Cell*, **7**, 279-288 (1976).
- 2) F. Rougeon and B. Mach: Stepwise biosynthesis *in vitro* of globin genes from globin mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3418-3422 (1976).
- 3) T. Ojima and K. Nishita: Troponin from akazara scallop striated adductor muscles. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16749-16754 (1986).
- 4) T. Ojima and K. Nishita: Biochemical characteristics of the M₂, 52,000 component of akazara scallop troponin. *J. Biochem.*, **104**, 207-210 (1988).
- 5) T. Ojima and K. Nishita: Akazara scallop troponin C: Ca²⁺-induced conformational change and interaction with rabbit troponin subunits. *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 344-349 (1992).
- 6) T. Ojima, H. Tanaka, and K. Nishita: Cloning and sequence of a cDNA encoding akazara scallop troponin C. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 272-276 (1994).
- 7) M. Kozak: Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 857-872 (1984).
- 8) K. Nishita, H. Tanaka, and T. Ojima: Amino acid sequence of troponin C from scallop striated adductor muscle. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3464-3468 (1994).
- 9) T. Kobayashi, O. Kagami, O. Takagi, and K. Konishi: Amino acid sequence of horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*, striated muscle troponin C. *J. Biochem.*, **105**, 823-828 (1989).
- 10) T. Kobayashi, T. Takagi, K. Konishi, and W. Wnuk: Amino acid sequences of the two major isoforms of troponin C from crayfish. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18247-18259 (1989).
- 11) J. H. Collins: Myosin light chains and troponin C: structural and evolutionary relationships revealed by amino acid sequence comparisons. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **12**, 3-25 (1991).