

アユのアルブミンcDNA塩基配列

誌名	中央水産研究所研究報告
ISSN	09158014
著者名	吉田,勝俊 浜野,かおる 芦田,勝朗
発行元	水産庁中央水産研究所
巻/号	11号
掲載ページ	p. 111-112
発行年月	1998年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



短報

アユのバルブアルブミンcDNA塩基配列

吉田勝俊, 浜野かおる, 芦田勝朗

Nucleotide sequence of cDNA for *Plecoglossus altivelis* parvalbuminKatsutoshi Yoshida*¹, Kaoru Hamano*¹, and Katsuro Ashida*²

ABSTRACT: Parvalbumin is a Ca²⁺ binding protein and rich in muscle tissues of fish. We isolated a parvalbumin cDNA clone from ayu *Plecoglossus altivelis* and determined its nucleotide sequence. The sequence contained 54 nucleotides of the 5'-untranslated region, 324 nucleotides of the coding sequence, and 271 nucleotides of the 3'-untranslated sequence.

Keyword: Ayu *Plecoglossus altivelis*, parvalbumin, nucleotide sequence

バルブアルブミンは分子量約1万の酸性タンパク質でEFハンドと呼ばれる構造を持つカルシウムイオン結合性タンパク質である。脊椎動物では神経系や腎臓あるいは筋肉等に含まれる。カルモジュリン, トロポニンC等のカルシウムイオン結合性タンパク質では, 細胞内情報伝達や筋収縮における機能が詳細に解明されているのに対し, バルブアルブミンはそのカルシウムイオン結合能から, 筋肉の弛緩, 神経系での細胞内カルシウムイオン濃度調整に関係していると考えられているがその機能は明確ではない(Heizmann et al., 1982; Ohsima, 1994)。魚類のバルブアルブミンは筋肉中に特に多く含まれており, これまでにそのアミノ酸配列および三次元構造に関する知見が得られている(Coffee and

Bradshaw, 1973; Krestinger and Nockolds, 1973)。しかし, アミノ酸置換バルブアルブミンの作製による機能部位の検討の基礎となるcDNAを単離解析した報告は大西洋サケ *salmo salar*のみである(Lindstrom et al, 1996)。本研究ではアユ *Plecoglossus altivelis* を材料としてバルブアルブミンcDNAの塩基配列を決定した。

氷冷した活アユより背側筋肉を採取し, 直ちに液体窒素凍結後-70℃に保存し実験に用いた。mRNAの調製はInvitrogen社 Fast Trackキット, cDNA合成とcDNAライブラリーの作製はアマシャム社cDNA合成システム・プラスおよびλgt11クローニングシステムアダプター法によった。ライブラリーのスクリーニングはシグマ社抗コイバルブアルブミンマウスモノクローナル抗体を用いた。得られた陽性クローンをストラタジーン社 pBLUESCRIPT 2にサブクローニングし, ヘルパーファージR408により得られる1本鎖DNAから塩基配列を解析した。塩基配列決定はUSB社 Sequenase シークエンスキットを使用し, リン32または硫黄35でラベルしたddCTPを用いサンガー法で行った。なお, 塩基配列, アミノ酸配列の解析, データベース検索にはソフトウェア開発株式会社製 GENETEX 遺伝情報処理ソフトウェアおよびGENETYX-CD バイオデータベースソフトウェアを使用した。

1996年6月30日受理 中央水産研究所業績A第65号

*¹ 中央水産研究所(National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa, 236-8648, Japan).

*² 養殖研究所(National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01)

1.5gの試料から約1.5 μ gのmRNAを得た。1 μ gのmRNAから 2×10^4 pfuの λ gt11 cDNAライブラリーを作製し 1×10^4 クローンをスクリーニングし6個の陽性クローンを得た。それぞれの挿入DNA鎖長は約500~650塩基対で、最も長いクローンの塩基配列を決定した。ラットパルブアルブミンcDNA(Epsein et al., 1986)および各種パルブアルブミンタンパク質アミノ酸配列との比較から、決定した塩基配列は5'非翻訳領域の一部、翻訳領域、3'非翻訳領域を含むアユパルブアルブミンcDNAであると推定した。

得られたクローンは108アミノ酸残基のパルブアルブミンをコードする部分を完全に含む649塩基対であった(Fig.1)。55~378塩基が翻訳領域で、3'端には22塩基のpoly(A)+部位があり、その20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AATAAAが認められた。このcDNAから演繹されたアミノ酸配列を既報の配列と比較するとカルシウムイオンに配位するアミノ酸残基はアユを含め多くの魚種で非常によく保存されていた(Fig.1 XYZおよび-X-Y-Z)。しかしアユのパルブアルブミンでは図中-X'で示したアミノ酸がカワカマス*Esox Lucius*と同様通常のリジンからメチオニンに置換されていた(Gerday, 1976)。カルシウムイオンに配位するアミノ酸残基の変異により、このドメインはカルシウムイオン結合能が低下している

可能性が考えられる。

本研究で新たにアユパルブアルブミンcDNAの塩基配列が明らかにされた。これによりアミノ酸置換タンパク質の作製による機能部位の検討が可能となり、未だ明確でないパルブアルブミンの機能解明に役立つと考える。

文 献

- Coffee C. J. and Bradshaw R. A., 1973: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3305-3312.
 Epsein P., Means A. R., and Berchtold M. W., 1986: *J. Biol. Chem.*, **261**, 5886-5891.
 Gerday C., 1976: *Eur. J. Biochem.*, **70**, 305-318.
 Heizmann C. W., Berchtold M. W., and Rowleson A. M., 1982: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7243-7247.
 Kretsinger R. H. and Nockolds C. E., 1973: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313-3326.
 Kretsinger R. H., 1980: *CRC Crit. Rev. Biochem.* **8**, 119-174.
 Lindstrom C. D-V., Van Do T., Hordvik I., Endresen C., and Elsayed S., 1996: *Scand. J. Immunol.*, **44**, 335-344
 Seto-Ohshima A., 1994: *Acta Histochemica et Cytochemica*, **27**, 93-106.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
ATCTTAGCGAATCCACTCGAGTCTTATCTTAGAGATAAACCTGAGCAAAAAATGGCAATTGSCCGGTGTTCTGAAGGAGATGACATCACTGCAGGCCCTGGGAGCTGCAAAAGCTGCTGACTCATTCAAGT
140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
ACAAGAGTATTCTGGCAAGGTTGGCCCTGGCCCTCCAAAGTCTGCTGACGATGTGAAGAAGGCTTTGGCATCATTGAOCAGGACAAAGAGTGCTCATTGAGGAGGAGGAGCTCAAGCTGTTCTCTGCAGAA
K D F F A K V G L A S K S A D D V K K A F G I I D G D K S G F I E E E E L K L F L Q N
270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
CTTTGCTGCTGGAGCCAGAGCCCTGACAGATGCTGAGACCAAGGCTTTCTGAAGGCGGAGATGCTGATGGTGGATGGCATGATGGCAATGGAGAGTTCGCTGCCCTGGTCAAGTCAATAATGAAC
F A A G A R A L T D A E T K A F L K A G D A D G D G M I G M D E F A A L V K S
400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
GCATAAAGCCAGCCGATGAATCTGAAGGACCTTCCCTCTCTCTCAAAATCAACACTTTATACACATGCTCTTGGCTTGTCCACAGATGCCCTCTCTGTCAOAGGTGATGAGTTTAGAAGTATGGCTGTG
530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640
TCACCTCCTCTGTTCTACTCCCTGAGGTTTGGTGATATTTTCAATCAATTGCACTTGTGAGGATATGGAAGGATGATAAGAAAAAGATAAATCTTTCTTTTCAGTAAAAA

```

Fig. 1. The complete nucleotide sequence of the parvalbumin cDNA clone from Ayu.

The deduced amino acid sequence of parvalbumin is indicated under the nucleotide sequence.

The initiation codon and the termination codon in the reading frame are indicated by the double underline. The putative polyadenylation signal is boxed. X, Y, Z and -X, -Y, -Z refer to the calcium-binding ligands established by Kretsinger(Kretsinger, 1980). X' is the variant site.