

# ホタテガイ・トロポニンCのCNBr-フラグメントの性質と部分アミノ酸配列

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	杉野, 英彦 小島, 直也 西田, 清義
巻/号	55巻2号
掲載ページ	p. 333-340
発行年月	1989年2月

ホタテガイ・トロポニン C の CNBr-フラグメントの  
性質と部分アミノ酸配列

杉野英彦, 小島直也, 西田清義, 尾島孝男

(1988年8月5日受付)

Characterization and Partial Amino Acid Sequence of CNBr-  
Fragments of Scallop Troponin CHidehiko Sugino,\* Naoya Kojima,\* Kiyoyoshi Nishita,\*  
and Takao Ojima\*

Troponin C of the striated adductor muscle of Ezo-giant scallop *Patinopecten yessoensis* was split with CNBr into 3 fragments named CB1, CB2 and CB3 which consisted of about 80, 50 and 4 amino acid residues, respectively. CB1 was shown to contain Ca<sup>2+</sup>-binding and TnI-binding domains. While CB2 is the N-terminal fragment which was incapable of binding of Ca<sup>2+</sup> though it was expected to contain at least one Ca<sup>2+</sup>-binding domain in view of the structural homology with other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. Amino acid sequence of the CB2 was determined as QFTEERSAK-QILNAKEAFDNLVCKLKEGTVSCKDLGAIKSLGLLVKSDAM. Thus the sequential homology was considerably low in the CB2 and the N-terminal regions of the other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins especially in the possible Ca<sup>2+</sup>-binding domains.

筋収縮における Ca<sup>2+</sup> 調節は、一般に筋肉の種類により次の 3 種の分子機構すなわち (1) 脊椎動物横紋筋におけるアクチンフィラメント上のトロポニン (Tn)-トロポミオン (Tm) 系<sup>1-3)</sup>, (2) 脊椎動物の平滑筋におけるミオン軽鎖のリン酸化と脱リン酸化系,<sup>4-7)</sup> (3) 軟体動物の筋肉におけるミオン分子の軽鎖系により行われると考えられている。<sup>8,7-10)</sup> しかし、Tn-Tm 調節系をもたないとされていた<sup>11)</sup> 軟体動物筋肉中にも最近 Tn の存在が報告され、<sup>12-15)</sup> さらに単離されるに至った。<sup>14,16)</sup> それらのうち、アカザラガイおよびホタテガイ横紋閉殻筋の Tn はウサギなど脊椎動物骨格筋の Tn と同様に 3 個の異なるサブユニットより構成されている。それらの分子量は 52,000, 40,000 および 20,000 であり、ウサギ骨格筋の Tn の各成分とは分子量や生化学的性質が異なるが、それぞれ TnI, TnT および TnC と同定されている。<sup>16)</sup> それらのサブユニットのうち、TnC は単一成分として筋肉から容易に得られ、いくつかのグループによって研究されており、すでに 1 分子当たり 1 分子の Ca<sup>2+</sup> しか結合しないことが明らかにされている。<sup>16-19)</sup> この性質はウサギ骨格筋 TnC の 1 分子当たり 4 分子の Ca<sup>2+</sup> を結合するという性質と大きく異なっている。本研究で

はこの違いが生じる原因を構造上の相違から検討するために、ホタテガイ横紋閉殻筋 TnC のペプチド・フラグメントの性質を検討し、さらにアミノ酸配列の分析を行った。

## 実験方法

**試料** 横紋閉殻筋は生きているホタテガイ *Patinopecten yessoensis* から採取して直ちに使用するか、または -40°C で凍結保存したものを 2 週間以内に使用した。

**TnC の調製とカルボキシメチル化** ホタテガイ横紋閉殻筋より Ojima and Nishita の方法<sup>16)</sup>により TnC を単離し、さらに DEAE-Toyopearl および Sephacryl S-200 を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。TnC の Cys 残基のカルボキシメチル化は、Crestfield らの方法<sup>20)</sup>により行った。

**CNBr 分解と精製フラグメントの分離** カルボキシメチル化した TnC 50 mg を 5 ml の 70% ギ酸に溶解し、250 mg の CNBr を加えた後、窒素置換して室温で 20 時間反応させた。次いで 10 倍量の水で希釈し、直ちに凍結乾燥を行った。

\* 北海道大学水産学部水産高分子化学講座 (Laboratory of Biopolymer Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

略語: EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; SDS, sodium dodecylsulfate; TFA, trifluoroacetic acid.

次に、この分解物を少量の 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  に溶解し、Toyopearl HW-50 (2×145 cm) でゲル濾過を行った。溶出したペプチド・フラグメントは 215 nm および 280 nm の吸光度の測定により検出した。各ピーク画分は集めて凍結乾燥し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

**ペプチド・フラグメントの酵素分解** トリプシン分解はペプチドを 50 mM モルホリン緩衝液 (pH 8.0) 100  $\mu\text{l}$  に溶解した後、トリプシン (Sigma Co.) をペプチドに対して 1/100 重量加え、 $30^\circ\text{C}$  で 16 時間行った。キモトリプシン分解はペプチドを 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8.0) 100  $\mu\text{l}$  に溶解した後、キモトリプシン (Sigma Co.) を 1/100 重量加え、 $30^\circ\text{C}$  で 2 時間行った。

リジレンドペプチダーゼ分解はペプチドを 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8.0) 100  $\mu\text{l}$  に溶解した後、リジレンドペプチダーゼ (和光純薬製) をペプチドに対して 1/100 重量加え、 $30^\circ\text{C}$  で 8 時間行った。

**ペプチドの分離** 酵素分解により精製したペプチドは TSK 120T-ODS カラム (4×250 mm) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、0.1% TFA を含む 0~40% アセトニトリルの直線濃度勾配で分離溶出した。ペプチドは 215 nm の吸光度測定により検出した。

**アミノ酸組成の分析** 凍結乾燥したタンパク質およびペプチドを 6 N HCl 中で  $110^\circ\text{C}$ 、24 時間加水分解し、アミノ酸自動分析機 (日立製 835 型) を用いて分析した。

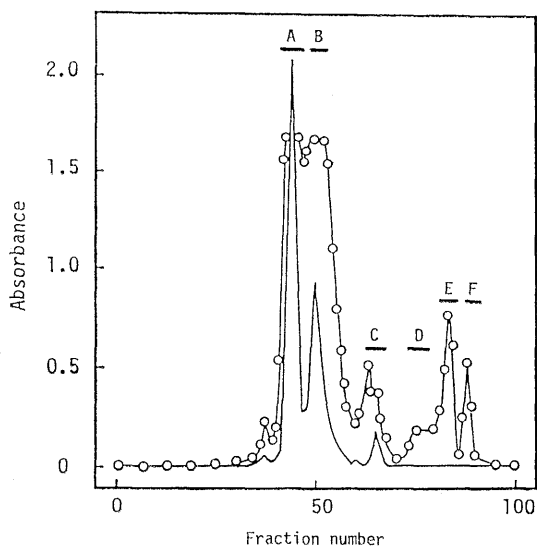
**アミノ酸配列の分析** アミノ酸配列の分析は Edman 分解法<sup>21,22)</sup> およびその岩永と鮫島による変法<sup>23)</sup> により行った。なお、得られた PTH-アミノ酸は、TSK 120T-ODS カラム (4×250 mm) を用い、39.5% アセトニトリル、0.02% SDS を含む酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) を溶媒として、流速 1 ml/min のイソクラティック法<sup>24)</sup> で分離溶出し、254 nm の吸光度測定により検出した。

**紫外差吸収スペクトルの測定** TnC またはそのフラグメントを 0.3 mg/ml になるように 0.1 M KCl, 20 mM ヒスチジン-KOH (pH 6.8), 0.2 mM EGTA に溶解し、その等容量を試料セルおよび対照セルに入れた後、試料セルには  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $10^{-7}$ ~ $10^{-2}$  M になるように  $\text{CaCl}_2$  溶液を加え、また対照セルにはそれと等容量の水を加えて分光光度計 (日立製 200-10 型) により差吸収スペクトルを測定した。なお、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度は Ca-EGTA 複合体の安定度定数を  $8.45 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  として計算した。<sup>25)</sup>

**濁度の測定** 試料セルに 0.06 M KCl に懸濁させた TnI (0.25 mg/ml) を入れ、次いで TnC またはそのペプチド・フラグメントを TnI に対してモル比で 0.5, 1.0 および 1.5 となるように加え、330 nm の吸光度を測定して濁度とした。

## 結果と考察

**TnC の CNBr 分解による生成フラグメントの分離**  
ホタテガイ TnC をカルボキシルメチル化した後、CNBr で分解し、Toyopearl HW-50 によりゲル濾過を行った。その溶出図を Fig. 1 に示した。それによると、280 nm と 215 nm の吸収を示す主要なピークは 3 つ得られ、それらを溶出順にピーク A, B および C とした。一方、215 nm においてのみ吸収を示すピークも 3 つ出現し、それぞれ D, E および F とした。これらの成分を HCl 分解してアミノ酸分析を行った結果、ピーク A, B および C の各成分からはアミノ酸が検出された。しかし、ピーク D, E および F の成分からは検出されず、これらは



**Fig. 1.** Separation of the cyanogen bromide (CNBr)-peptides of scallop striated adductor TnC on Toyopearl HW-50. The TnC (50 mg) was dissolved in 8 M urea, 0.3% EDTA, 0.36 M Tris-HCl (pH 8.6) and 0.15 mM 2-mercaptoethanol at room temperature, and then 0.145 M monoiodoacetic acid was added. After 50 min, the mixture was frozen and lyophilized. The carboxymethylated TnC thus obtained was dissolved in 10 ml of 70% formic acid and then 250 mg of CNBr was added. After stirring for 20 hours at room temperature and subsequent dilution with 10-fold volumes of water, the mixture was lyophilized. The CNBr-peptides thus obtained were applied to Toyopearl HW-50 (2×145 cm) and eluted with 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Each fraction contained 3 ml and peptide concentration was measured at 280 nm (—) and 215 nm (○). Peaks A, B and C contained fragments named CB1, CB2 and CB3, respectively.

Table 1. Amino acid compositions of scallop TnC and its CNBr-fragments

	Residues/mol of peptide			
	TnC* <sup>1</sup>	CB1	CB2	CB3
Aspartic acid* <sup>2</sup>	16.66	9.70	5.67	1.27
Threonine	6.98	2.65	2.82	0.22
Serine	6.39	2.46	2.29	2.00
Glutamic acid* <sup>2</sup>	20.29	14.42	5.56	N.D.* <sup>3</sup>
Glycine	6.78	3.63	2.78	0.14
Alanine	7.65	4.02	2.81	1.20
Proline	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cysteine	2.98	1.10	1.23	N.D.
Valine	6.10	3.86	2.05	N.D.
Methionine	3.03	—	—	—
Isoleucine	6.18	3.73	2.04	N.D.
Leucine	13.45	9.50	3.11	N.D.
Tyrosine	0.87	N.D.	0.66	N.D.
Phenylalanine	5.05	2.48	1.99	N.D.
Lysine	13.87	7.95	5.25	N.D.
Arginine	4.90	4.38	0.63	N.D.
Histidine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tryptophan	1.05	1.01	N.D.	N.D.
Homoserine* <sup>4</sup>	—	1.00	1.00	N.D.

\*<sup>1</sup> Average of three different preparations.

\*<sup>2</sup> Aspartic acid and glutamic acid including asparagine and glutamine, respectively.

\*<sup>3</sup> N.D.; not detected.

\*<sup>4</sup> Homoserine including homoserine lactone.

ギ酸塩に由来するものと考えられた。次に、ピーク A, B および C の各画分をそれぞれ集めて凍結乾燥し、それらを再クロマトグラフィーで精製した後、以下の実験に使用した。

まず、ピーク A, B および C に含まれるペプチド・フラグメントの純度を検定するために、Edman 分解法により N 末端アミノ酸の分析を行った。その結果、ピーク A および C の成分からは 1 種類の PTH-アミノ酸が検出され、さらに 4 残基目までの配列はそれぞれ、Asp-Glu-Glu-Thr および Ser-Ser-Asp-Ala であった。しかし、ピーク B の成分からは PTH-アミノ酸が得られず、N 末端アミノ酸が何らかの形で修飾されているためであると考えられた。しかも、ピーク B の成分は HPLC によっても単一のピークとして溶出されたので、この画分には単一のペプチド鎖が含まれているものと判断された。そこで、ピーク A, B および C に含まれるペプチド・フラグメントをそれぞれ CB1, CB2 および CB3 と命名し、アミノ酸組成を分析して Table 1 に示した。それによると、本研究で用いたホタテガイ TnC には Pro と His が認められなかったが、それら以外のアミノ酸組成は *Aequipecten* の場合に類似していた。<sup>18)</sup> CB1 と CB2 は各々約 80 と 50 残基を含んでいたが、CB3 は約

4 残基から成る非常に小さいフラグメントであることがわかった。また、CB1 と CB2 には Met 由来のホモセリンが検出されたのに対し、CB3 には検出されなかったため、このフラグメントは TnC の C 末端に位置すると考えられた。さらに、TnC の N 末端の同定を試みたところ、この場合も CB2 と同様に PTH-アミノ酸は得られなかったため、CB2 は TnC の N 末端に位置するペプチドであると考えられる。周知の通り、他の動物の TnC やカルモデュリンなどの Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質では N 末端アミノ酸がアセチル化されていることから、<sup>26,27)</sup> このホタテガイ TnC もまた、N 末端アミノ酸が何らかの形で修飾されている可能性が強い。

**CB1 および CB2 の Ca<sup>2+</sup> 結合性** 次に、主要なフラグメントである CB1 と CB2 について、TnC が有する性質である Ca<sup>2+</sup> 結合性について検討した。ホタテガイ TnC はウサギやアカザラガイのそれ<sup>16)</sup>と同様に Ca<sup>2+</sup> の結合により紫外差吸収スペクトルを示すことから、\* CB1 および CB2 についても同様の方法により Ca<sup>2+</sup> 結合性を検討した。その結果、CB1 もまた差スペクトルを示したが、そのスペクトルの形は異なり (Fig. 2), Ca<sup>2+</sup> 結合による構造変化が TnC と CB1 とでは異なるものと考えられた。一方、CB2 は 10 mM Ca<sup>2+</sup> の存在下でも

\* 徳光 浩: ホタテガイ横紋閉殻筋のアクチン連結の Ca<sup>2+</sup> 調節機構に関する研究, 修士論文, 北海道大学水産学部, 函館, 1988, pp. 10-54.

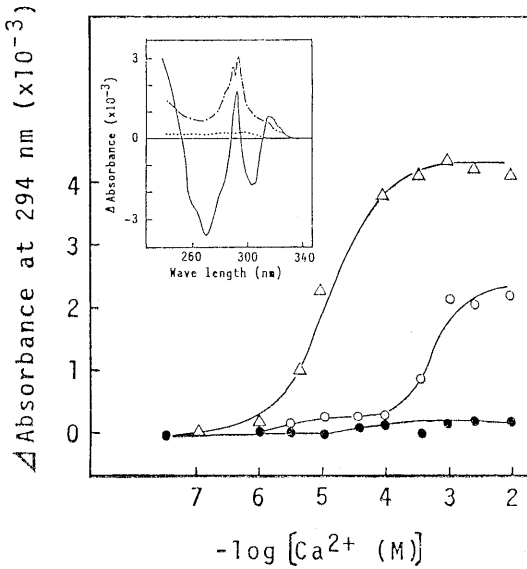


Fig. 2. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on difference UV absorption of CB1, CB2 and TnC. The absorbance of CB1 (○), CB2 (□) and TnC (△) at 294 nm was derived from the difference UV absorption spectrum and plotted as a function of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The spectrum was measured in a mixture containing 0.3 mg/ml TnC or its fragment, 0.1 M KCl and 20 mM histidine-KOH (pH 6.8), and 0.2 mM EGTA (reference cell) and EGTA with various concentrations of  $\text{CaCl}_2$  (sample cell).  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was calculated using  $8.45 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  as stability constant for Ca-EGTA complex. The inserted figure shows the difference UV absorption spectra observed upon addition of 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  for CB1 (---) and CB2 (---) and 0.1 mM for TnC (—).

差スペクトルを示さず、 $\text{Ca}^{2+}$  を結合しないと判断された。そこで、TnC および CB1 の 294 nm における差吸収の値を  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に対してプロットし、Fig. 2 に示した。それによると、差吸収の最大値の 1/2 を示すときの  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は TnC では  $9.55 \times 10^{-7} \text{ M}$  ( $\text{pCa}=6.02$ ) であり、CB1 では  $6.31 \times 10^{-4} \text{ M}$  ( $\text{pCa}=3.20$ ) であった。従って、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する CB1 の見かけの親和性は TnC のその約 1/600 であることが推定された。

**TnI に対する CB1 および CB2 の結合性** 水に難溶性の TnI に対してホタテガイ TnC を加えると、ウサギ<sup>20)</sup> やアカザラガイ<sup>30)</sup> の TnC を加えた場合と同様に、TnI と結合して可溶性の複合体を形成して濁度を減少させることが知られている。<sup>\*</sup> そこで CB1 および CB2 についても同様の検討を行い、その結果を Fig. 3 に示した。それによると、TnI に CB1 を加えていくと濁度は

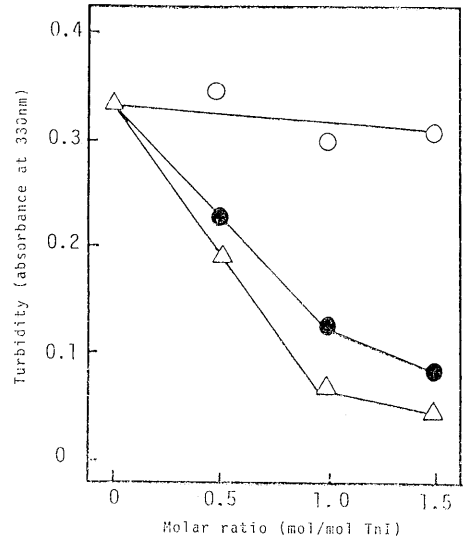
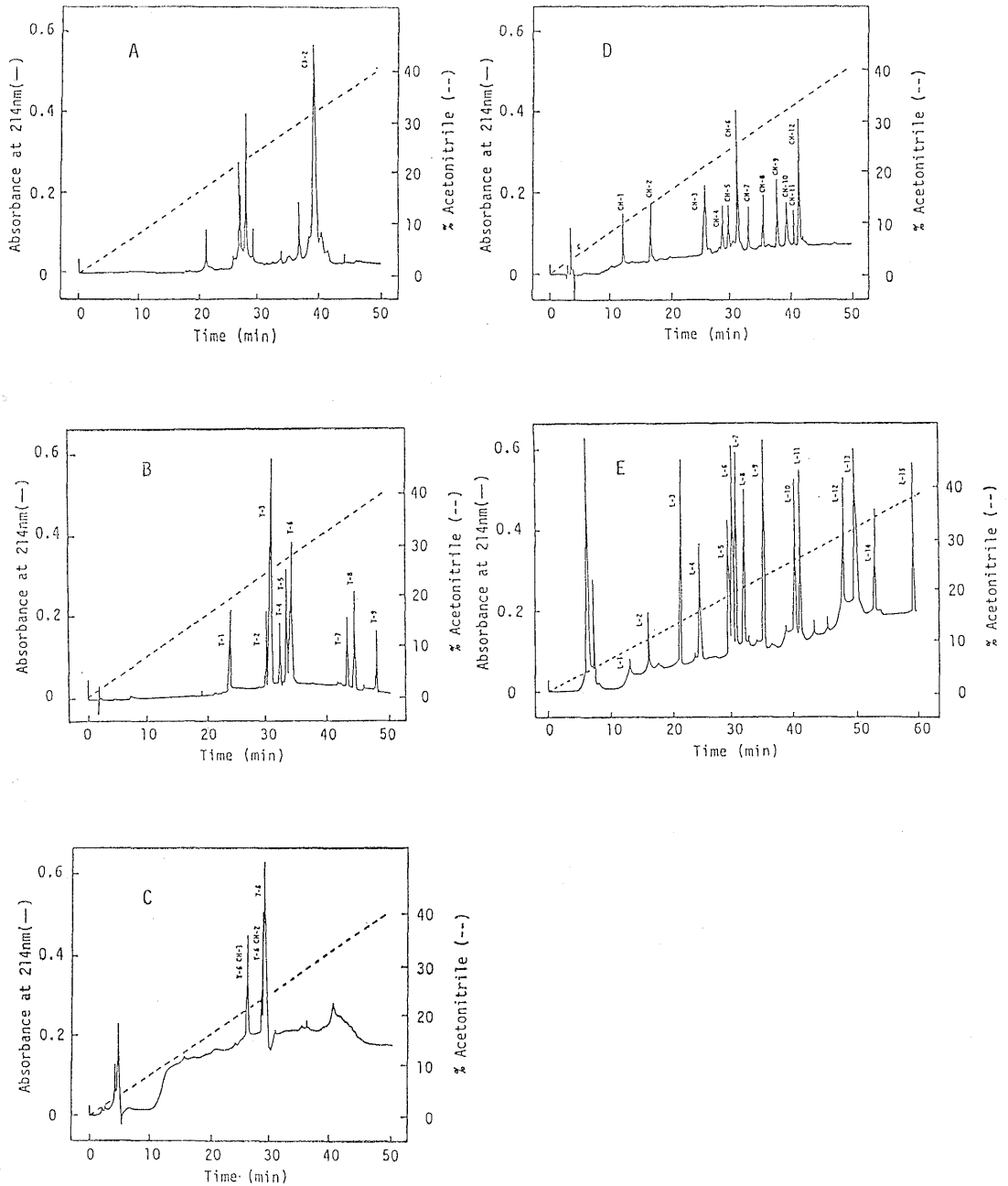


Fig. 3. Effect of CB1, CB2 and TnC on the turbidity of TnI. Turbidity was determined by measuring the absorbance at 330 nm in a solution containing 60 mM KCl, 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 mg/ml scallop striated adductor TnI (Mr 52,000), and plotted against the molar ratio of CB1 (●), CB2 (○) and TnC (△) to TnI.

次第に低下し、そのモル比が 1:1 に達したとき最低値に達した。しかし、CB2 の場合は TnI とのモル比が 1:1 になるまで加えても濁度はほとんど変化せず、TnI と結合することができないと推定された。

**CB2 のアミノ酸配列の分析** 前述したように CNBr 分解で得られた CB2 はホタテガイ TnC の N 末端に位置するフラグメントであると考えられ、そのアミノ酸残基数は約 50 である。従って、ウサギ骨格筋 TnC やカルモデュリンなどの  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の構造との相同性から判断すると、CB2 の中には  $\text{Ca}^{2+}$  と結合するドメインが少なくとも一つは存在していると考えられるが、差スペクトルの結果から  $\text{Ca}^{2+}$  を結合することができないことが示された。そこで、その理由をアミノ酸配列から検討するために、CB2 について分析を行った。まず、Fig. 4, A に示したように HPLC で精製した CB2 を、次にトリプシンで分解 (30°C, 2 時間) し、生成したペプチドを再び HPLC により分離した (Fig. 4, B)。得られたピークをそれぞれ T1~T9 と命名し、それらの一部をアミノ酸分析した。その結果を Table 2 に示したが、T2 にはアミノ酸は検出されなかった。また、T3 はホモセリンを有するので、CB2 の C 末端に由来するフラグメントであると判断された。次いで、各フラグメントのアミノ酸配列を手動 Edman 法により分析した。T6 から



**Fig. 4.** Separation of peptide-fragments of scallop TnC by HPLC. HPLC was carried out using TSK gel ODS-120T column (4×250 mm) equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid. A 50 min linear gradient of CH<sub>3</sub>CN concentration from 0 to 40% was used for elution. The flow rate was 1.0 ml/min. (A) Purification of CB2. (B) Separation of the tryptic peptides CB2. (C) Separation of the chymotryptic peptides of T6. T6 was the peptide-fragment obtained by tryptic digestion of CB2. (D) Separation of the chymotryptic peptides of CB2. (E) Separation of the lysyl endopeptidase-digested peptides of TnC.

は PTH-アミノ酸が得られなかったので、N 末端アミノ酸が修飾されていると考えられ、CB2 の N 末端に由来するペプチドであると推定した。この T6 をさらにキモ

トリプシンで分解してから HPLC で分離した結果、新たに T6-1 と T6-2 の 2 つのペプチドが得られた (Fig. 4, C)。このうち T6-1 は、アミノ酸組成およびキモトリ

Table 2. Amino acid composition of the tryptic peptides of CB2

	Residues/mol of peptide*4							
	T1	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Aspartic acid*2		1.60 (1)	1.10 (1)	2.02 (2)			1.09 (1)	1.00 (1)
Threonine	0.86 (1)*1				0.99 (1)			
Serine	0.78 (1)	0.80 (1)				0.97 (1)		
Glutamic acid*2	0.99 (1)	0.99 (1)	1.54 (1)	1.20 (1)	2.36 (3)			
Glycine	1.07 (1)					1.23 (1)	1.23 (1)	0.85 (1)
Alanine			1.27 (1)	1.07 (1)			1.11 (1)	
Valine	1.04 (1)			1.02 (1)		1.03 (1)		
Isoleucine			0.74 (1)				0.99 (1)	
Leucine			0.83 (1)			3.08 (3)	1.08 (1)	1.25 (1)
Phenylalanine				1.16 (1)	1.00 (1)		1.04 (1)	
Lysine	1.00 (1)		1.00 (1)	1.10 (1)		1.00 (1)	1.00 (1)	0.85 (1)
Arginine				1.00 (1)				
Cm-cysteine*3	0.68 (1)			1.00 (1)				
Homoserine		1.00 (1)						
Total	7	4	6	8	6	7	7	4

\*1 Values in parentheses are the number of residues determined by sequencing.

\*2 Aspartic acid and glutamic acid including asparagine and glutamine, respectively.

\*3 Carboxymethyl cysteine.

\*4 Amino acids were not detected in T2.

ブシンでの消化性から X-Glu-Phe と推定され、T6-2 は Thr-Glu-Glu-Arg と同定された。T6 以外の他のペプチドについてはそれぞれ N 末端から C 末端までアミノ酸配列を決定した。これらのトリプシン分解ペプチドの接続部の配列は、CB2 をキモトリプシンで分解して得られた 3 つのフラグメントおよび TnC をリジルエンドペプチダーゼで分解して得られた 2 つのフラグメントの配列より決定した。各酵素分解フラグメントの HPLC による分離はトリプシン分解フラグメントの場合と同様に行い、結果を Fig. 4, D および E に示した。以上の各種フラグメントのアミノ酸配列を総合して CB2 の配列を決定し、Fig. 5 に示した。それによると、CB2 の 14 残基目から 41 残基目までに  $Ca^{2+}$  結合に必要とされるいわゆる EF ハンド構造<sup>31)</sup>に相当する配列が存在していた。

次に、CB2 のアミノ酸配列よりその  $Ca^{2+}$  結合性について検討した。一般に情報伝達に関与している  $Ca^{2+}$  結合タンパク質は、EF ハンド型タンパク質であると考えられ、この EF ハンド構造は 9 残基よりなる  $\alpha$ -ヘリックス、12 残基よりなるループ、および 8 残基よりなる  $\alpha$ -ヘリックスで構成されている。<sup>31)</sup> そこで、CB2 中の EF ハンド構造をとっていると考えられる領域のアミノ酸配列と  $Ca^{2+}$  結合能との関係を Tufty and Kretsinger により提唱されたテストシークエンス<sup>32)</sup>を用いて検討した。このテストシークエンスは、EF ハンド構造を形成する N 端側ヘリックスに 5ヶ所、ループに 7ヶ所、そして C 端側ヘリックスに 4ヶ所の合計 16ヶ所に特定の

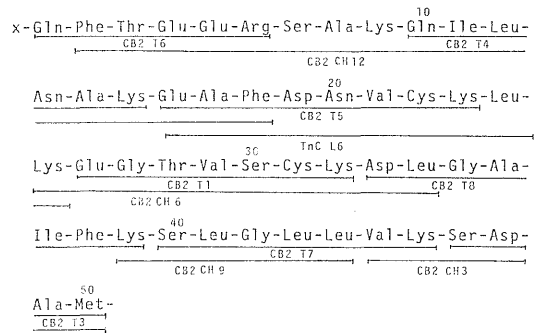


Fig. 5. Strategies for sequence analysis of CB2 of the TnC.

条件を定め、すべての条件を満たした場合にスコアを 16 点とし、最も  $Ca^{2+}$  が結合しやすいとしたものである。この方法を CB2 に適用した結果を Fig. 6 に示したが、N 端側ヘリックス 2 点、ループ 5 点および C 端側ヘリックス 4 点合計 11 点とやや低い値であった。さらに、ループ構造領域中に、テストシークエンスでは酸素含有アミノ酸となっている 2 残基が Cys と Leu で置換されている部位があり、 $Ca^{2+}$  結合性の消失と密接な関係があるものと推定された。

次に、CB2 と種々の  $Ca^{2+}$  結合タンパク質、すなわちウサギ骨格筋 TnC,<sup>27)</sup> ウン脳カルモデュリン,<sup>28)</sup> ホタテガイ横紋閉殻筋ミオシンの SH 軽鎖<sup>32)</sup> および調節軽鎖<sup>33)</sup> とのアミノ酸配列の相同性について検討した。それらのタンパク質の相同部位の検索は、CB2 の  $Ca^{2+}$  結合性ル

	Helix	Loop	Helix
		X Y Z -Y -X -Z	
Test sequence	E L L* - L L* - L* O - O - O G - L* O - - O L* - - L L* - - L*		
CB2	N A K E A F D N V	C K L K E G T V S C K D	L G A I F K S L
Score	2	5	4

Fig. 6. Prediction of Ca<sup>2+</sup> binding ability of scallop TnC by using Kretsinger model. X, Y, Z, -X, -Y and -Z indicate Ca<sup>2+</sup> binding residues. In the test sequence O is a residue containing an oxygen atom as a calcium ligand (D, aspartic acid; E, glutamic acid; N, asparagine; Q, glutamine; S, serine; T, threonine). L\* is a hydrophobic residue (L, leucine; V, valine; I, isoleucine; F, phenylalanine; M, methionine; W, tryptophan). G and E are glycine and glutamic acid residues, respectively. Underline shows a residue corresponding to the test sequence.

CB2		Q F T E E R S A K I Q I L N
Rabbit TnC	D T Q Q A E A R S Y L S E E M I A E	
Calmodulin	A D E L T E E Q I A E	
Scallop SH-LC	P K L S Q D E L I D D	
Scallop R-LC	A D K A A S G V L T K I L P Q E	

A K E A F D N V	C K L K E G T V S C K D	L G A I F K S L	G L L V K S D A	M
F K A A F D M F	D A D G G G D I S V K E	L G T V M R M L	G Q T P T K E E	L
F K E A F S L F	D K D G N G T I T T K E	L G T V M R S L	G Q N P T E A E	L
L K D V F E L F	D F W D G R D G A V D A F K	L G D V C R C L	G I N P R N E D	V
M K E A F S M I	D V D R D G F V N K D D	L K A T S E Q L	G R T P D D K E	L

Fig. 7. Comparison of the amino acid sequences of CB2, rabbit skeletal TnC, bovine barain calmodulin, and SH-light chain and regulatory light chain of scallop striated adductor myosin. Residues identical with those of CB2 are boxed.

ープ構造と考えられる領域のアミノ酸配列と他の Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質のループ構造の配列を一致させることにより行った。その結果を Fig. 7 に示した。それによるとホタテガイ TnC のアミノ酸配列の相同性はウサギ骨格筋 TnC に対して 33.3%, ウシ脳カルモデュリンに対して 30.9%, ホタテガイ・ミオシンの SH 軽鎖に対して 11.1%, 同調節軽鎖に対して 21% となり、いずれのタンパク質とも相同性はかなり低いことがわかった。従って、CB2 が Ca<sup>2+</sup> 結合ドメインと類似の領域を有しているにもかかわらず Ca<sup>2+</sup> を結合できない理由として、まず第一に Ca<sup>2+</sup> 結合ドメインのループ構造領域中の Ca<sup>2+</sup>-配位アミノ酸の置換の存在が考えられるが、さらに CB2 全体にわたり他の Ca<sup>2+</sup> 結合タンパク質とのアミノ酸配列の相同性が低いことも一因と考えられる。

参考文献

- 1) S. Ebashi and F. Ebashi: *J. Biochem.*, **55**, 604-613 (1964).
- 2) S. Ebashi, A. Kodama, and F. Ebashi: *J. Biochem.*, **63**, 465-477 (1968).
- 3) R. S. Adelstein and E. Eisenberg: *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 921-956 (1980).
- 4) S. Chacko, M. Conti, and R. S. Adelstein: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 129-133 (1977).
- 5) M. Ikebe, H. Onishi, and S. Watanabe: *J. Biochem.*, **82**, 299-302 (1977).
- 6) 渡辺静雄, 尾西裕文: 蛋白質・核酸・酵素, **23**, 1042-2055, 1123-1138 (1980).
- 7) J. Kendrick-Jones and M. Scholey: *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **2**, 347-372 (1981).
- 8) A. G. Szent-Györgyi, E. M. Szentkiralyi, and J. Kendrick-Jones: *J. Mol. Biol.*, **74**, 179-203 (1973).
- 9) A. G. Szent-Györgyi: *Biophys. J.*, **15**, 707-723 (1975).
- 10) J. Kendrick-Jones, A. G. Szent-Györgyi, and E. M. Szentkiralyi: *J. Mol. Biol.*, **104**, 745-775 (1976).
- 11) J. Kendrick-Jones, W. Lehman, and A. G. Szent-Györgyi: *J. Mol. Biol.*, **54**, 313-326 (1970).
- 12) A. Goldberg and W. Lehman: *Biochem. J.*, **171**, 413-418 (1978).
- 13) T. Tsuchiya, T. Kaneko, and J. J. Matsumoto: *J. Biochem.*, **83**, 1191-1193 (1973).
- 14) K. Konno: *J. Biochem.* **84**, 1431-1440 (1978).
- 15) W. Lehman: *Biochim. Biophys. Acta*, **668**, 349-356 (1981).
- 16) T. Ojima and K. Nishita: *J. Biol. Chem.*, **261**, 16749-16754 (1986).
- 17) T. Tsuchiya, J. G. Head, and W. Lehman: *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 507-509 (1982).
- 18) W. Lehman, J. F. Head, and P. W. Grant: *Biochem. J.*, **187**, 447-456 (1980).
- 19) Y. Shima, T. Tsuchiya, W. Lehman, and J. J. Matsumoto: *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**, 525-529 (1984).
- 20) A. W. Crestfield, S. Moore, and W. Stein: *J. Biol. Chem.*, **238**, 622-627 (1963).
- 21) P. Edman: *Arch. Biochem.*, **22**, 475 (1949).
- 22) P. Edman: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 277, 283 (1950).
- 23) 岩永貞昭, 鮫島勇次: 蛋白質・核酸・酵素, **15**, 1037-1054 (1970).
- 24) 戸田弘子, 池田徳治, 成田耕造: 化学, **102**, 23-39 (1984).
- 25) H. Harafuji and Y. Ogawa: *J. Biochem.*, **87**, 1035-1312 (1980).
- 26) W. Lehman and M. Ferrell: *FEBS Lett.*, **121**, 273-274 (1980).
- 27) J. H. Collins, M. L. Greaser, J. D. Potter, and



- M. J. Horn: *J. Biol. Chem.*, **252**, 6356-6362 (1977).
- 28) D. M. Watterson, F. Sharief, and T. C. Vaman: *J. Biol. Chem.*, **252**, 962-975 (1980).
- 29) M. L. Greaser and J. Gergely: *J. Biol. Chem.*, **248**, 2125-2133 (1973).
- 30) T. Ojima and K. Nishita: *J. Biochem.*, **104**, 207-210 (1988).
- 31) R. M. Tufty and R. H. Kretsinger: *Science*, **187**, 167-169 (1975).
- 32) T. Maita, K. Konno, S. Maruta, H. Norisue, and G. Matsuda: *J. Biochem.*, **102**, 1141-1149 (1987).
- 33) T. Maita, K. Konno, T. Ojima, and G. Matsuda: *J. Biochem.*, **95**, 167-177 (1984).