

アコヤガイの真珠および貝殻形成に關与する有機基質に關する研究

鈴木 道生 (東京大学大学院農学生命化学研究科)

amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

アコヤガイを用いた真珠生産は日本発祥の伝統ある養殖水産業である。真珠および貝殻は炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶を主成分とする、生体鉱物 (バイオミネラル) であり、その形成には炭酸カルシウム中に少量含まれる有機基質が重要な役割を果たすことが示唆されてきた。私はアコヤガイ貝殻の稜柱層および真珠層から新規タンパク質 *prismalin-14* および *Pif* をそれぞれ見出し、炭酸カルシウムとの相互作用実験などを行うことで、これらのタンパク質が貝殻の形成に重要な働きをする因子であることを示した。

はじめに

アコヤガイの貝殻は外側に稜柱層、内側に真珠層と 2 層の構造を持つ (図 1)。稜柱層では炭酸カルシウムのカルサイト結晶、真珠層では炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶と安定性の異なる結晶多形から構成される。常温常圧の状態ではカルサイト結晶が最も安定で、アラゴナイト結晶は準安定である。アコヤガイはこのように二つの結晶多形を、一つの貝殻内に作り分けることができる。この問題は“カルサイトーアラゴナイト問題”と呼ばれ、多くの研究者が注目するところである。

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、稜柱層および真珠層の構造を観察すると、稜柱層では有機膜に覆われた柱状の構造が見られ、一方、真珠層ではレンガが積み重なったような構造をしている。このような微細構造は有機基質と炭酸カルシウムの複合体構造を持ち、含まれる有機基質が炭酸カルシウム結晶の形態、多形、方位、成長などを制御して形成されると考えられている。有機基質は主にキチンとタンパク質から構成されると考えられているが、その詳細な構造や機能は未だ不明な点が多く解明が望まれている。

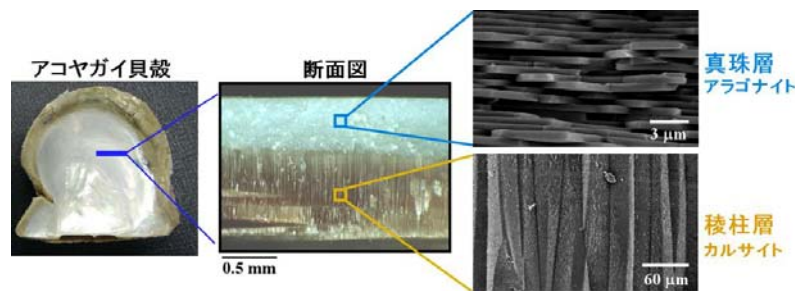


図1

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、稜柱層および真珠層の構造を観察すると、稜柱層では有機膜に覆われた柱状の構造が見られ、一方、真珠層ではレンガが積み重なったような構造をしている。このような微細構造は有機基質と炭酸カルシウムの複合体構造を持ち、含まれる有機基質が炭酸カルシウム結晶の形態、多形、方位、成長などを制御して形成されると考えられている。有機基質は主にキチンとタンパク質から構成されると考えられているが、その詳細な構造や機能は未だ不明な点が多く解明が望まれている。

稜柱層特異的基質タンパク質 *prismalin-14* の同定

稜柱層から酸不溶性-SDS/DTT 可溶性成分を抽出し、同様の真珠層抽出液と比較することで、稜柱層特異的基質タンパク質を明らかにした。これまでの研究から酸性分子が石灰化の制御に重要であることが示唆されていたため、酸性分子を青く染色する Stains-all 染色を行い SDS-PAGE 上で約 14 kDa 付近のバンドを稜柱層特異的酸性基質タンパク質として見出した。このタンパク質を精製し、トリプシンと Asp-N による酵素消化により得られた断片のペプチドの配列を決定することで全一次配列の決定を行った。この配列は相同性検索の結果、新規のタンパク質であることが分かり *prismalin-14* と命名した¹⁾。Prismalin-14 は全部で 105 アミノ酸から成るタンパク質であり、N 末端はピログルタミン酸でブロックされており、これによって分子の安定性を高めていると考えられる。N 末端と C 末端の領域にはアスパラギン酸が連続した酸性領域が存在した。ま

た、配列中央前半部には PIYR の繰り返し配列 (PIYR repeat) が配列中央後半部にはグリシンとチロシンに富む領域 (GY-rich region) が存在した (図 2)。



図2

prismalin-14 の機能解析

炭酸カルシウム結晶形成阻害実験により、prismalin-14 は炭酸カルシウム結晶と相互作用することが明らかとなった。さらに、prismalin-14 の N 末端および C 末端を欠損した変異組み換え体を作製し、活性を調べたところ N 末端と C 末端の酸性領域が炭酸カルシウム結晶との結合に重要だということが判明した。また稜柱層の酸不溶性-SDS/DTT 可溶性成分にはキチンが含まれることが明らかになったため²⁾、prismalin-14 のキチン結合活性の確認を行った。その結果、配列の中央部に存在する GY-rich region はキチンに結合する活性を有することが判明した。このことから prismalin-14 はキチンと炭酸カルシウムを仲介する分子であることが示唆された³⁾。

真珠層特異的基質タンパク質 Pif の同定

上記でも述べたが、真珠層 (および真珠) は炭酸カルシウムの準安定なアラゴナイト結晶から構成され、貝殻内における準安定なアラゴナイト結晶の形成メカニズムは古くから着目されていた。1960 年代に貝殻真珠層にアラゴナイト結晶形成誘導成分が含まれるという報告がなされて以来、多くの研究者によって貝殻真珠層成分とアラゴナイト結晶誘導メカニズムの関係が調べられてきた。これまで真珠層に含まれるタンパク質、特にアスパラギン酸を多く含有するものが β シート構造を形成し、アスパラギン酸のカルボキシル基の間隔がアラゴナイト結晶の {001} 面のカルシウムの間隔と一致することで、アラゴナイト結晶を誘導するというモデルが提案された。そこで、貝殻真珠層内にアスパラギン酸を多く有する高分子タンパク質の存在が示唆されるようになったが、具体的にどのような配列を有するタンパク質がこのような誘導を引き起こすのかは謎のままであった。

本研究においては、真珠層のアラゴナイト結晶形成能に着目し、スクリーニング法としてアラゴナイト結晶結合実験を考案した。真珠層からの酸不溶性-SDS/DTT 可溶性成分を用いてアラゴナイト結晶結合実験を行った。その結果、SDS-PAGE 上で約 80 kDa 付近のバンドがアラゴナイト結晶と強く結合している可能性が考えられた。この 80 kDa のバンドの N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列を解析し、その配列を元に cDNA クローニングを行った。cDNA クローニングの結果、約 80 kDa のバンドのタンパク質のさらに上流にもう一つ別のタンパク質がコードされていることが判明した。この上流のタンパク質は 80 kDa のバンドの高分子側、約 97 kDa 付近に泳動されるバンドであることが判明した。これら 2 つのタンパク質の間には Kex2 様プロテアーゼ切断認識配列である RMKR 配列が存在することから、翻訳後に切断されると考えられた。このタンパク質を Pif と命名し、切断後のそれぞれの大きさからそれぞれ Pif 80 および Pif 97 と命名した (図 3)^{4,5)}。Pif 80 は全部で 460 アミノ酸残基から成るタンパク質であり、配列の相同性を検索したところ、全体の配列として有意な相同性を持つものは存在しなかった。Pif 80 は親水性のアミノ酸残基としてアスパラギン酸残基 28.5% 含む親水性のタンパク質であった。Pif 97 は全部で 525 アミノ酸残基から成るタンパク質であり、相同性検索の結果、全体の配列として有意な相同性を持つものは存在しなかったが、保存されたドメインとして、von Willebrand factor type A

(VWA) domain、chitin-binding domain を持つことが判明した。VWA domain はタンパク質間の相互作用に働くと考えられている。



図3

以上の配列解析の結果、当初予想していたようにアラゴナイト結晶と相互作用する活性を有する Pif 80 がアスパラギン酸に非常に富む配列を有していた。さらに、その配列の上流にはタンパク質間相互作用とキチン結合能力を持つ Pif 97 が存在し、Pif 97 がキチンと Pif 80 や他のタンパク質との仲介を行い、Pif 80 がアラゴナイト結晶の形成を制御することが予想された。

Pif の機能解析

Pif 80 に特異的な抗体を作製し、免疫 SEM を用いて Pif の真珠層内での局在解析を行った。その結果、多数の金粒子が真珠層の全体に分布していたことから、Pif が真珠層の全体に存在すると考えられた。次に、生体内において実際に Pif がどのような機能を有しているかを明らかにするため、RNAi による Pif のノックダウン実験を行った。その結果、ネガティブコントロールである PBS および GFP dsRNA 30 μ g 投与の個体においては真珠層の整然とした階段状の成長構造が観察された。これに対し、Pif dsRNA 30 μ g 投与の個体においては、真珠層の層構造が乱れた様子が観察された。これらの結果は、キチンの基盤とアラゴナイト結晶の仲介を行う Pif の発現量が RNAi により減少したことにより、基盤となる有機基質を形成することができなくなり、真珠層の成長が止まったとも考えられた。さらに Pif が炭酸カルシウムの結晶成長に対し、どのような機能を有するかを直接確認するため、Pif を含む粗精製画分を用いてキチンを薄膜化させてガラス板上に *in vitro* での炭酸カルシウム結晶形成実験を行った。その結果、真珠層のアラゴナイト結晶と同様に基盤に対して垂直に成長しているアラゴナイト結晶が確認された。結晶の上層が薄いキチン膜で覆われていたことから、キチンの膜の中で結晶成長したものと推測された。

以上のことから、Pif 分子の働きを予想すると、まず Pif 分子が外套膜細胞内において転写翻訳され、dibasic site での切断、ジスルフィド結合の架橋もしくは VWA domain との結合により Pif 97 と Pif 80 が相互作用し、真珠層内に取り込まれる。真珠層内に入った Pif の複合体は Pif 97 の chitin-binding domain を介してキチンの有機基盤に結合する。そして Pif 80 がアラゴナイト結晶と相互作用することで真珠層を形成すると考えられた。

Pif の分子進化

Pif がアコヤガイだけではなく他の貝類の貝殻においても存在するか確認するために、アコヤガイの近縁種（クロチョウガイ、シロチョウガイ、マベガイ）および真珠層を持つ食用の貝類であるムラサキガイから Pif の相同分子の探索を行った。その結果、アコヤガイの近縁種およびムラサキガイにおいては Pif 97 に相当する部分が高い相同性を示したが、Pif 80 に相当する配列は、種が離れるに従って大きく変異をしていることが判明した⁶⁾。さらに巻貝である *Lottia gigantea* のゲノムデータベースから Pif の相同分子を探索し、それらの共通配列を探索し、炭酸カルシウムと相互作用する配列は Laminin G domain のカルシウム結合能力から分子進化した可能性が示唆された^{7,8)}。

おわりに

本研究では、真珠養殖に利用される貝類であるアコヤガイの貝殻微細構造から新規の基質タンパク質を明らかにし、その構造機能解析を行ってきた。これらの機能を調節することで、より高頻度で高品質の真珠養殖が可能になる可能性が考えられる。また炭酸カルシウムという無機物質と相互作用する有機基質は新規の高機能材料の創成にも利用されることが期待されている。今後も、真珠を始めとしたバイオミネラリゼーション現象における有機基質の分子メカニズムを追求し、様々な分野での産業利用に貢献したいと考えている。

謝辞

本研究は、主に東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生物有機化学研究室において行われたものです。ご指導頂きました長澤寛道名誉教授、作田庄平准教授、永田晋治准教授（現東京大学大学院新領域創成科学研究科）に深く感謝申し上げます。また、小暮敏博准教授（東京大学大学院理学系研究科）、加藤隆史教授（東京大学大学院工学系研究科）、西村達也助教（東京大学大学院工学系研究科）、青木秀夫主幹研究員（三重県水産研究所）など、多くの共同研究者の方々にも多大なご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。最後に、本研究を行うにあたり研究生生活を支えて頂きました研究室のメンバーおよび家族に深く感謝いたします。

引用文献

1. **Michio Suzuki**, Emi Murayama, Hiroataka Inoue, Noriaki Ozaki, Tohse Hidekazu, Toshihiro Kogure and Hiromichi Nagasawa. Characterization of a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochemical Journal*, **382**, 205-213, (2004).
2. **Michio Suzuki**, Shohei Sakuda and Hiromichi Nagasawa. Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 1735-1744, (2007).
3. **Michio Suzuki** and Hiromichi Nagasawa. The structure–function relationship analysis of Prismaticin-14 from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *FEBS Journal*, **274**, 5158-5166, (2007).
4. **Michio Suzuki**, Kazuko Saruwatari, Toshihiro Kogure, Yuya Yamamoto, Tatsuya Nishimura, Takashi Kato, and Hiromichi Nagasawa. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science*, **325**, 1388-1390, (2009).
5. **鈴木道生**、小暮敏博、長澤寛道 (2010) 「真珠形成におけるバイオミネラリゼーションー貝殻内タンパク質 Pif の発見とその役割ー」、バイオサイエンスとバイオインダストリー、**68** (2)、102-108
6. **Michio Suzuki**, Ai Iwashima, Naoaki Tsutsui, Tsuyoshi Ohira, Toshihiro Kogure and Hiromichi Nagasawa. Identification and characterization of a calcium carbonate-binding protein, Blue Mussel Shell Protein (BMSP), from the nacreous layer. *ChemBioChem*, **12**, 2478-2487, (2011).
7. **Michio Suzuki**, Ai Iwashima, Mariko Kimura, Toshihiro Kogure and Hiromichi Nagasawa. The molecular evolution of the Pif family proteins in various species of mollusks. *Marine Biotechnology*, **15**, 145-158, (2013).
8. **Michio Suzuki** and Hiromichi Nagasawa. Mollusk shell structures and their formation mechanism. *Canadian Journal of Zoology*, **91**, 349–366, (2013).