

軟体動物の殻体形成に関与するタンパク質 成分の構造と機能の解析

*Structural and functional analysis of the protein components involved in
molluscan shell formation*

佐俣哲郎, 其木茂則, 岸川正剛

麻布大学大学院環境保健学研究科

Tetsuro Samata, Shigenori Sonoki, Masayoshi Kishikawa

Graduate School of Environmental Health, Azabu University.

Abstract: Diverse hard tissue formation occurs commonly in mollusks in locations such as the shell, periostracum, ligament, radula, teeth, operculum, and therefore, they have been studied to a considerable extent to elucidate the mechanism of biomineralization. The Organic matrix (OM) of molluscan shell is one of the best studied of all CaCO_3 biomineral structures, and considerable information has been accumulated regarding the morphology, structure and histochemical property of it.

Recently, several genes encoding the matrix components have been isolated and their deduced amino acid sequences have been clarified. Other data was obtained via *in vitro* studies of crystallization in which matrix activities related to crystal formation were measured. However, results of various experiments were remarkably different among the methods used; therefore, the precise function of OM remains unclear even *in vitro*.

Crystal formation in a biological system is considered to occur by the activity of the OM components but the precise process remains still unclear. A hypothesis that was proposed by Addadi & Weiner (1989) took into account the possible effect of the two cooperating factors, β -sheet carboxylate-rich protein and sulfated polysaccharide. According to them, the sulfate create a flux of Ca ions towards the nucleation site and carboxylates, regularly arranged in a protein β -sheet domain, provide the structural organization necessary for nucleation.

Until now, all the information about the hypothesis was indirect, being inferred from *in vitro* experiments, while more direct information about initial mineralization of *Pinctada fucata* came from the gene analysis encoding the OM components and *in vitro* experiments. The results of these analyses will be described in this paper.

目 的

軟体動物には、殻体、歯舌、殻板などの多様な硬組織・バイオミネラルが体内・外に形成され、非常に変化に富んだバイオミネラリゼーション現象が見られる。このため、貝殻を中心とした軟体動物の研

究は、無脊椎動物のバイオミネラリゼーション研究の中で最も盛んに行われ、多くの情報が集積している。

近年のバイオテクノロジーの発達に伴い、軟体動物殻体中の有機基質成分をコードするcDNAが同定され、そこから有機基質タンパク質成分の全一次構

造も明らかにされた (Miyamoto *et al.*, 1996⁽¹⁾, Sudo *et al.*, 1997⁽²⁾, Shen *et al.*, 1997⁽³⁾, Sarashina and Endo, 1998⁽⁴⁾)。しかし、これらの研究では、不特定の有機基質中の主要成分の構造を明らかにすることが目的とされていて、同定されたタンパク質成分の殻体形成における役割にまで踏み込んだ検討は行われていない。これに対して、筆者らは、アコヤガイとシロチョウガイの真珠層形成に特異的に関与する有機基質タンパク質成分をコードする遺伝子とこの遺伝子によってコードされる N66, N16, N14 の3種類のタンパク質を発見するとともに、*in vitro*での結晶形成実験を通じてタンパク質成分の機能にまで踏み込んだ研究結果を報告した (Samata *et al.*, 1999⁽⁵⁾; Kono *et al.*, 2000⁽⁶⁾)。

本研究では、これらの分子レベルでの研究を基に、これまで大きな成果が上がっていない軟体動物殻体結晶核形成機構に関する検討を試みた。軟体動物で結晶核の形成が起こる、とう外液中のイオン濃度は周囲の海水と同程度で余り高くない。このため、結晶核形成が始まるためにはまず、 Ca^{2+} と CO_3^{2-} 濃度が部分的に上昇する必要がある。さらに、この過飽和状態の溶液中で不純物が鋳型となって結晶核形成が起こる。このため、イオン濃集のための concentrator 成分や鋳型 template を構成する nucleator 成分の存在が想定される。今回の研究では、この2種類の成分の検索を目的として実験を行った。

これまで最も強く支持されている CaCO_3 結晶核形成の仮説は、一部に酸性アミノ酸を含む β シート構造を持った分子に糖鎖が結合し、その末端部位に SO_4 が結合して、この SO_4 が作り出す Ca^{2+} の流れが酸性アミノ酸 (Asp) の側鎖のカルボキシル基に結合し、結晶核形成の template として機能するというものである (Addadi & Weiner, 1989⁽⁷⁾)。今回の実験では、この仮説を土台にして、得られたタンパク質の構造の検索を行った。

方 法

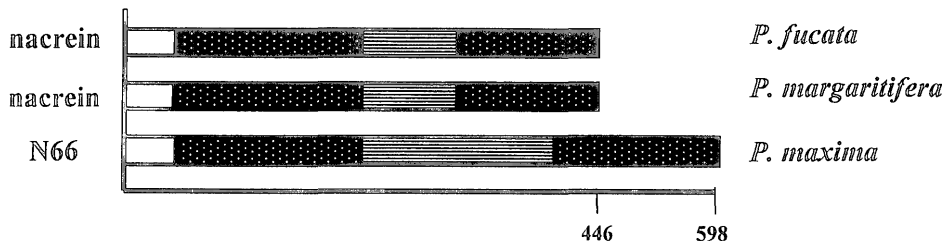
今回の分析では、これまでに3種類の真珠層形成遺伝子・タンパク質が同定されているアコヤガイに加えて、シロチョウガイの一部の分子とクロチョウガイの相同遺伝子・タンパク質の同定を試みた。まず、タンパク質の情報を得るために、シロチョウガ

イとクロチョウガイ殻体から真珠層のみを分離し、脱灰後、可溶性有機基質 (WSM) と不溶性有機基質 (WISM) とを分離した。さらに、WISM の希アンモニア水処理によりアルカリ可溶性有機基質 (ALSM) を抽出した。次に、SDS-PAGE で分離した WSM と ALSM の各成分について、プロテインシークエンサーにより N 末端アミノ酸配列分析を行った。一方、遺伝子解析用の試料については、養殖場から送られてきた2種の生体試料を開口し、真珠層構成成分を分泌する外とう膜背側部分を切り出して、直ちに液体窒素中で凍結した。この凍結試料から RNA を抽出後、逆転写酵素を用いて cDNA ライブラリーを構築した。次に、タンパク質成分の N 末端部分のアミノ酸配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、これを用いて 3' Race 法にて cDNA の増幅を行うとともに、アコヤガイの遺伝子のデータを基にプライマーを合成し、RT-PCR 法にて cDNA の増幅を行った。増幅 cDNA 断片をサブクローニング後、該当クローンの DNA 塩基配列分析を行い、cDNA の全塩基配列を決定した。また、引き続き、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、タンパク質の一次構造を決定した。

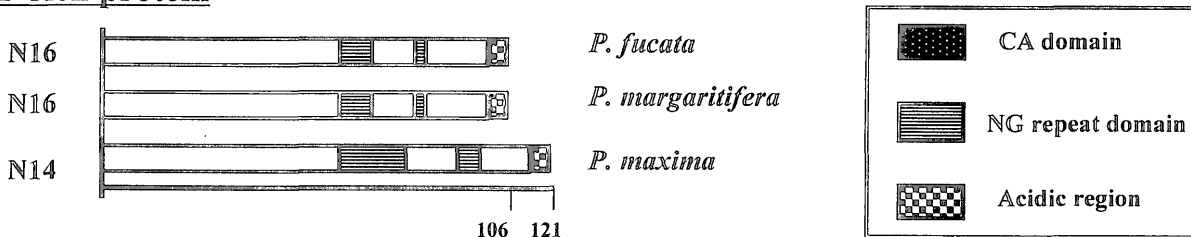
結果と討論

分析したシロチョウガイとクロチョウガイの試料から、標的とした4種類の遺伝子の全てについてその塩基配列が決定され、アミノ酸配列に翻訳された。この結果、アコヤガイ、シロチョウガイ、クロチョウガイの3種類のシンジュガイ真珠層中に相同の3種類の有機基質タンパク質が存在することが確認された。得られたタンパク質成分のアミノ酸配列の種間での比較模式図を Fig.1 に示す。まず、Fig.1-1 に示した CA-like protein は、アコヤガイではナクレイン、シロチョウガイで N66 として同定されたもので、NG-repeat ドメインが CA (炭酸脱水素酵素) ドメインによって挟まれた構造をしている。シロチョウガイの N66 では、NG-repeat ドメインが他の2種よりも長く、CA ドメインの配列もやや異なっていたが、クロチョウガイとアコヤガイの成分は高い相同性を示した。第2に、Fig.1-2 に示した C/Y-rich protein は、アコヤガイで N16、シロチョウガイで N14 と命名された低分子量タンパク質であり、Cys と Tyr を多く

CA-like protein



C/Y-rich protein



Fibroin-like protein

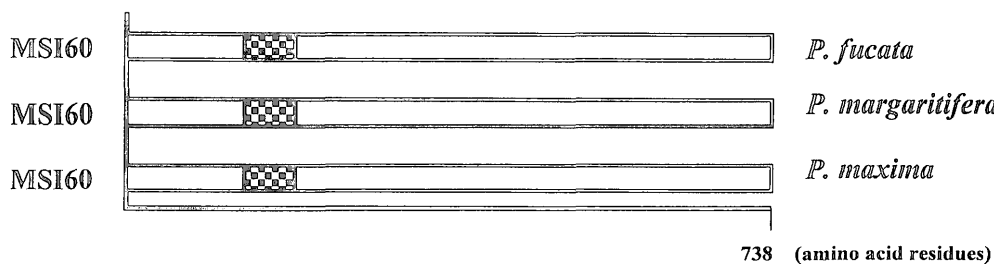


Fig.1 Schematic representation of the primary structures of the 3 components in the nacreous layer of *Pinctada*.

含み、分子の中央よりやや後半部に NG-repeat 配列を持つ。この成分の3種間での比較からは、シロチョウガイに含まれる N14のみが NG-repeat 配列が長く、他のものとやや異なっていたが、クロチョウガイとアコヤガイの成分は高い相同性を示した。第3に、Fig.1-3に示した fibroin-like protein は、poly-Ala, Poly-Gly に富む領域を多く含み、分子の多くの部位にβシート構造が存在すると推定される。この分子は、3種類の分析種間で配列の相違はほとんど認められなかった。

CA-like protein については、分子の構造中にβシート構造も酸性アミノ酸領域も含まれないため、Caイオンの濃集には関与していないと考えられる。この分子は、両側に存在するCAの酵素としての働きで、CO₃イオンの濃集に関与するCO₃-concentratorの可能性が示唆された。一方、C/Y-rich protein と fibroin-like protein には、前者のC末端側と、後者のN末端

側に酸性アミノ酸が濃集する領域が存在し、かつ、その配列間に高い類似性が認められた。アコヤガイでの2成分の当該部位の配列をFig-2に示す。本図より、当該部位のアミノ酸配列は、MSI60での欠落部位を除外するとほぼ完全に一致しており、この配列中に、2残基ずつの sulfation の可能性のある Tyr が存在することと、酸性アミノ酸が多い特徴を持っていた。これらの構造の特徴から C/Y-rich protein と fibroin-like protein の関係を推定し、それを模式的に示したのがFig.3である。ここでは、βシート構造を持つ MSI60分子が、Cysに富む N16分子によって架橋され、連続的に連なって大きな膜状複合体を構成すると推定した。膜中の N16分子の末端部分に結合した SO₄イオンがCaイオンの膜状への濃集に関与し、膜の一部に存在する酸性アミノ酸が、集められたCaイオンのトラップに関与する。一方、CA-like protein の持つ CA ドメインの働きで、CO₃イオンも

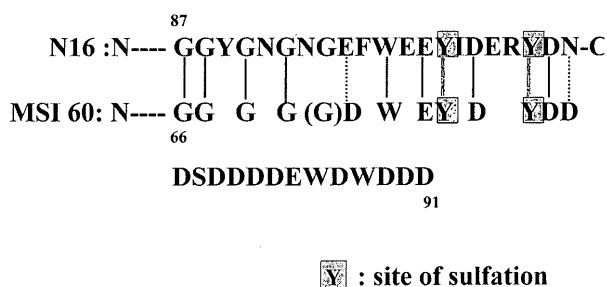


Fig.2 Partial alignment of the amino acid sequences of N16 and MSI60 in the nacreous layer of *Pinctada fucata*.

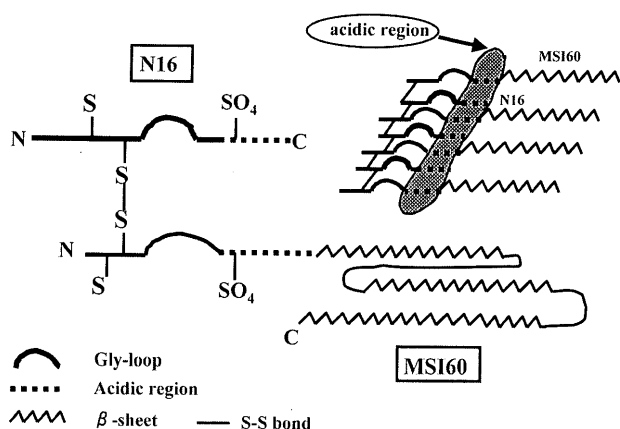


Fig.3 A model for the protein complex formed by N16 and MSI60 in the nacreous layer of *Pinctada fucata*.

膜上に濃集され、Caイオンと反応してCaCO₃結晶核形成が起きると考えた。

今回のデータは、Addadi & Weiner (1989) の炭酸カルシウム結晶核形成の仮説を分子レベルで実証するものであり、この点できわめて興味深い。

このような分子の組み合わせによって結晶核が実際に形成されるのかを次に証明する必要がある。通常、タンパク質の機能を解明するのは容易なことではないが、我々の研究室で開発した結晶形成実験という方法で、これらの成分の機能解析を進めている。この方法は、とう外液と同様の低飽和度の溶液中に、N16, MSI60あるいは、両成分の該当部位からなる合成ペプチドを加えて、炭酸カルシウム結晶が形成されるかどうかを判定するというものである。

まとめ

代表者は、これまでにアコヤガイを中心とした軟

体動物の殻体形成に関与する遺伝子と有機基質タンパク質の構造解析とタンパク質の機能を解析するための結晶形成実験を進めてきた。その結果、ナクレイン, N16, MSI60という3種類の有機基質タンパク質が互いに関連して殻体形成を行うことを明らかにした。しかし、これらのタンパク質の詳細な機能の解明、とくに殻体形成の最初の段階であるアラレ石結晶核形成へのこれらの成分の関与の機構に関しては不明のまま残されている。

今年度は、このアラレ石結晶核形成機構に関する分子レベルでの検討を行った。その結果、新しい仮説を提示するに至った。この仮説では、有機基質タンパク質成分のion concentratorとnucleatorの存在が仮定された。現在、この仮説の検証を結晶形成実験を通じて行っている。

以上の結果は、これまで不明であった軟体動物殻体中の有機基質タンパク質成分による炭酸カルシウム結晶核形成および結晶多形制御の分子機構の解明につながるものである。また、この成果は、軟体動物のみならず、高等動物の持つ硬組織である骨や歯の形成機構の解明にも結びつくと考えられる。

引用文献

- 1) Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro, A. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9657-9660 (1996).
- 2) Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K.: Structures of mollusc shell framework proteins. Nature 387, 563-564 (1997).
- 3) Shen, X., Belcher, A.M., Hansma, P.K., Stucky, G.D., Morse, D.E. Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. J. Biol. Chem. 272, 32472-32481 (1997).
- 4) Sarashina, I., Endo, K.: Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implications for calcium carbonate biomineralization. Amer. Mineralogist, 83, 1510-1515 (1998).
- 5) Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., Akera, S.: A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. FEBS Letters, 462, 225-229 (1999).
- 6) Kono, M., Hayashi, N., Samata, T.: Molecular

- mechanism of the nacreous layer formation of *Pinctada maxima*. *Bioch. Bioph. Res. Commun.* 269(1), 213-218 (2000).
- 7) Addadi, L. and Weiner, S.: Stereochemical and structural relationships between macromolecules and crystals in biominerals. In: S. Mann, J. Mann, J. Webb and R.J.P. Williams, Eds., *Biomaterialization, chemical and biochemical perspectives*, p.133-156. VCH Publishers, Weinheim, Germany.