

第23回麻布環境科学研究会 講演 B5

淡水産と海産軟体動物の持つ真珠層形成遺伝子の構造解析および比較

森 景太郎¹, 池田眞理子¹, 臼井 智美², 山村 奈帆²,
梶川 彩², 安部あき子², 近藤 美和², 佐俣 哲郎²

¹麻布大学 環境保健学研究科・細胞生物学専攻,

²麻布大学 環境保健学部・細胞生物学研究室

1. はじめに

軟体動物は炭酸カルシウムでできた殻体を持ち、海水中のCO₂の固定化を行う。殻体は方解石(calcite)とアラレ石(aragonite)の2種類の結晶形から構成され、それぞれの結晶形は、貝の外套膜組織より産生される有機基質タンパク質(organic matrix:以下OMとする)によって制御されている。OMは、殻体上皮組織の間の隙間に分泌され、体液などと混合されて外套膜外液となり、ここから殻体が形成される。近年、海生種においてはアラレ石の形成に関与するいくつかの遺伝子が同定され、OMの一次構造が決定されている。

海水種の外套膜外液中にはMg²⁺が豊富に含まれ、無機的にアラレ石を形成し易い環境になっている。このため、海生種のアラレ石殻体はOMの作用無しに形成される可能性もある。これに対し、淡水種の外套膜外液中にはMg²⁺がほとんど含まれていないため、無機的にはアラレ石が形成されにくいにもかかわらず、イケチョウガイなどの淡水生真珠貝はアラレ石から成る真珠層を形成する。このことから演者らは、淡水生真珠貝のOMはアラレ石を強く誘導する機能および構造が備わっていると考えた。

本研究では、イケチョウガイ真珠層中のアラレ石誘導成分をコードする遺伝子を発見し、その塩基配列を決定することを第一の目的とした。Samataら(in press)は、SDS-PAGEの結果から、本種のOM中の主要成分の一つとして16 kDaの可溶性低分子量成

分を分離し、このN末端アミノ酸配列を明らかにした。その分子量と配列は、アコヤガイから発見されたN16成分と相同性が認められた。このため、N16のアミノ酸配列のデータを基にプライマーを設計し、RT-PCR法とTAクローニング法により、遺伝子の塩基配列決定を試みた。得られた遺伝子の塩基配列をタンパク質のアミノ酸配列に翻訳し、N16の配列との比較を行った。

2. 試料および方法


- 1) イケチョウガイ(Hyriopsis shlegeli:茨城県牛久市明恒パールより提供)を用いた。外套膜上皮組織を切り取り、液体窒素で凍結乾燥させた後、AGPC法を用いてtotal RNAの抽出を行った。
- 2) cDNA合成を行い、PCR法により目的遺伝子のORFを含む約400 bpのcRNAを増幅させた。
- 3) QIAEX II Gel Extraction Kit(キアゲン)を用いPCR産物のアガロースゲルからの抽出および精製を行った。
- 4) pGEM-T & pGEM-Easy Vector System(Promega)を用いてサブクローニングを行い、目的遺伝子の断片が挿入されているコロニーを選択し、培養後、Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit(キアゲン)を用いてプラスミド抽出を行った。
- 5) DNAシーケンサーを用いて、全390bpの塩基配列を決定後、これらの配列よりアミノ酸の一次構造を推定し、これまでに報告された海生種

Fig.1 N16成分のアミノ酸配列の比較

①AVHYKCGRYS YCWIPYDIER DRYDNGDKKC CYCRKAWSPWQ CNEEERYEWL RCGNTFFY
 ②AYHKKCGRYS YCWIPYDIER DRYDNGDKKC CYCRKAWSPWQ CNEEERYEWL RCGNTFFY
 ③AYHKKCGRYS YCWIPYDIER DRRDNGGKKC CFORNAWSPWQ CKEDERYEWL RCGHKFFY
 ④AYHKKCGRYS YCWIPYDIER DRYDNGDKKC CFORNAWSPWQ CNEEERYEWL RCGMRFFY
 ⑤AYQ-RCSRYW YSWLPYDIER DRYDDGYRKC CYCRNAWTPWQ CREDEQFERW RCGSRYYT

CYTDDDNNG NGNG ——— NGFNLY KSLYGGYGNG NGEFWEEYID ERYDN
 CYTDDDNNG NGNG ——— NGFNLY KSLYGGYGNG NGEFWEEYID ERYDN
 CYTDDDNNG DGNG ——— NGFNLY KSLYGGYGNG NGEFWEEYID ERYDK
 CYTDDDNNG NGNG ——— NGLNLY KSLYGGYGNG NGEFREEYID ERYDN
 CYTDDDNNG NGNGNGYGNG NGNGNGNLY KYLFGGNGNG NGEFWEEYID ERYDK

①イケチョウガイ
 ②クロチョウガイ/ベニコチョウガイ
 ③日本産アコヤガイ
 ④中国産アコヤガイ
 ⑤シロチョウガイ

 : Sulfation 部位

アコヤガイのN16をはじめとするOMタンパク質成分の一次構造との比較を行った (Fig. 1)。

3. 結果と考察

イケチョウガイで発見された16 kDaタンパク質成分をコードする遺伝子は、アコヤガイN16遺伝子との間で90.7%の高いホモロジーを示し、その他の近縁種のN16成分との高いホモロジーを示した。この中で、特に注目すべきことは、sulfation領域が各種間で非常に高い保存性を持っていた点である。

この結果は、N16成分が海生種—淡水生種を通じて真珠層形成において基本的に重要な成分であるとともに、そのC末端近傍に存在するsulfation部位が海生種、淡水生種を通じて石灰化に深く関与していることを示唆している。

参考文献

- H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, and A. Matushiro., 1996: A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls: Proc. Nat. I. Acad. Sci. USA 93: 9657-9659
- M. Kono, N. Hayashi, and T. Samata., 2000: Molecular Mechanism of the Nacreous Layer Formation in Pinctada maxima: Biochemical and Biophysical Research Communications 269: 213-218
- I. Sarasina and K. Endo., 1988: Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implication for carbonate biomineralization. American Mineralogist., 83: 1510-1515
- T. Samata, N. Hayashi, M. Kono, K. Hasegawa, C. Horita, S. Akera., 1999: A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of Pinctada fucata: FEBS Letters 462: 225-229
- S. Sudo, T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, 1996: Nature vol. 387: 563-564