

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20340142

研究課題名（和文）カメ類の卵殻タンパク質の系統的・生体鉱物学的研究

研究課題名（英文）Phylogenetic positions and biomineralization of eggshell proteins of turtles

研究代表者

遠藤一佳 (ENDO KAZUYOSHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：80251411

研究成果の概要（和文）：スッポンとニワトリの卵殻中有機物に対する抗体を使って、爬虫類と鳥類について免疫反応の強さを調べ、カメ類よりも有鱗類が系統として外側に来るという結果が得られた。爬虫類と鳥類の卵殻の結晶形をラマン分光法により特定し、カメの卵殻はアラゴナイト、有鱗目、ワニ目、鳥綱の卵殻はカルサイトであることが確認された。ニワトリのメスの卵管内液を抽出し、そのイオン組成を測定した。その結果、カメ類の卵殻の鉱物多形のコントロールは卵殻内のタンパク質によるものであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We performed immunological assays on the extracts from eggshells of reptiles and birds. The results support that the archosaurian affinity of turtles. Raman measurements showed that eggshells of turtles are aragonite, whereas those of snakes, lizards, crocodiles and birds are calcite. We examined the ion composition in the secretions of the oviducts of soft-shelled turtles and hens. Under both the conditions, not aragonite but calcite is expected to be formed, suggesting that the switch between the polymorphs may be controlled by proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：分子古生物学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・層位・古生物学

キーワード：系統学、生体鉱物学、カメ類、卵殻タンパク質、爬虫類

## 1. 研究開始当初の背景

爬虫類の中でのカメの系統的的位置について、従来はトカゲ・ヘビ類の外側と考えら

えていた。しかし最近の分子系統学的研究では、カメ類の方が外側に位置することを支持していた。

また、爬虫類は一般にカルサイトの卵殻を持つが、カメ類のみがアラゴナイトの卵殻を持つ。そのアラゴナイトの形成はタンパク質にコントロールされているという論文が出版されたが、イオン組成によってコントロールされている可能性は検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

卵殻内有機物の免疫反応により、カメ類の系統学的位置の二説のどちらが正しいかを検討する。また、カメ類の卵殻のアラゴナイト形成がイオン組成によってコントロールされているかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) スッポン (*Pelodiscus sinensis*) およびニワトリ (*Gallus gallus*) の卵殻中に含まれる生体高分子の粗抽出物に対してポリクローナル抗体を作成した。その抗体を用いて免疫学的アッセイを行った。

(2) 爬虫類の卵殻の結晶形を確認するため、ラマン分光法により結晶形を特定した。

(3) 卵を体内に持っているスッポンおよびニワトリのメスを解剖して、卵管内液を抽出し、そのイオン組成を測定した。

(4) スッポン (*Pelodiscus sinensis*) のメスを解剖し、卵管の組織を摘出した。卵管組織から Isogen を使用して、トータル RNA を抽出した。このトータル RNA を鋳型にして、complementary DNA (cDNA) を合成した。PCR 法によって Pelovaterin 遺伝子を増幅するため、Pelovaterin のアミノ酸配列をもとにセンスプライマーを 2 種、アンチセンスプライマーを 1 種作成した。これらのプライマーを使用して PCR 法を行った。アニーリング温度などの条件を変えて、複数回 PCR 法を行った。増幅された PCR 産物を T ベクターに組み込み、大腸菌によってクローニングしたうえで、PCR 産物の塩基

配列を明らかにした。

## 4. 研究成果

(1) スッポンとニワトリの卵殻中に含まれる生体高分子に対する抗体を使って、カメ類 10 種、ワニ類 8 種、鳥類 5 種、トカゲ・ヘビ類 (有鱗類) 2 種の合計 25 種について免疫反応の強さを調べた。その結果、スッポン抗体はカメ類に次いで、鳥類とワニ類に強く反応し、有鱗類と一番弱く反応した。ニワトリ抗体は鳥類に次いで、ワニ類、カメ類の順に強く反応し、有鱗類と一番弱く反応した。これらの結果は、カメ類は有鱗類よりも鳥類やワニ類に近いことを示している。従って、系統学的位置としては、カメ類よりも有鱗類が外側に来るという最近の分子系統学的研究による系統仮説が支持されることを明らかにした。

(2) 爬虫類の卵殻の結晶形を確認するため、ラマン分光法により結晶形を特定した。対象としたのは、カメ目については 6 上科中 4 上科にわたる 4 種、有鱗目については 2 亜目両方にわたる 2 種、ワニ目については 3 科全てにわたる 3 種、鳥綱については 2 下綱両方にわたる 3 種である。その結果、カメ 4 種の卵殻は全てアラゴナイト、有鱗目、ワニ目、鳥綱の卵殻は全てカルサイトであることが確認された。

(3) 卵を体内に持っているスッポン (*Pelodiscus sinensis*) のメスを解剖して、卵管内液を抽出し、そのイオン組成を測定した。また、ニワトリ卵の卵殻はカルサイトできているので、スッポンと比較するため、ニワトリについても同様に卵管内液を抽出し、イオン濃度を測定した。 $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  の値はニワトリでは 0.51-0.56 であるのに対し、スッポンでは 0.78-1.17 と高

かった。しかしこの条件下ではともにカルサイトが沈殿するものと考えられるので、カメ類の卵殻のカルサイト/アラゴナイトの鉱物多形のコントロールは卵殻内のタンパク質によるものであることが示唆された。

(4) スッポンのメスの卵管の組織から抽出した RNA により cDNA を合成した。スッポンの卵殻に基質として含まれるタンパク質 Pelovaterin は、卵管から分泌されている可能性が高いため、この卵管組織由来の cDNA を使って、PCR 法により Pelovaterin の mRNA を増幅することを試みた。センスプライマーを 2 種、アンチセンスプライマーを 1 種作成し、アニーリング温度などの条件を変えて、複数回 PCR 法を行った。増幅された PCR 産物を T ベクターに組み込み、大腸菌によってクローニングしたうえで、PCR 産物の塩基配列を明らかにしたが、求める配列、つまり Pelovaterin をコードしている cDNA の配列を同定することはできなかった。理由としては、作成した cDNA の純度が低い可能性が考えられる。ポジティブコントロールとして EF-1 $\alpha$  遺伝子を増幅した場合、増幅はされるが、ほかのタンパク質も増幅されていた。したがって、(4) に関しては結果を得ることが出来なかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- (1) Nishizawa, A., Sarashina, I., Tsujimoto, Y., Iijima, M. and Endo, K. (2010) Artificial fertilization, early development and chromosome numbers in the brachiopod *Lingula anatina*. *Special Papers in Palaeontology*, Vol. 84, pp. 309-316..
- (2) 遠藤一佳・更科功 (2010) バイオミネ

ラリゼーションの起源と進化. 遺伝  
Vol. 64, No. 4, pp. 23-28.

- (3) Ando, H., Kunitomo, Y., Sarashina, I., Iijima, M., Endo, K. and Sashida, K. (2009) Intraspecific variations in the ITS region of Recent radiolarians. *Earth Evolution Sciences*, 3, 37-44.
- (4) Nishi, M., Sarashina, I., Iijima, M., Hirayama, R. and Endo, K. (2009) Phylogenetic position of turtles among reptiles: evidence from immunological comparisons of eggshell matrices. *Earth Evolution Sciences*, 3, 45-51.
- (5) Mito T, Nakamura T, Sarashina I, Chang CC, Ogawa S, Ohuchi H, Noji S (2008) Dynamic expression patterns of vasa during embryogenesis in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Genes Evol*, Vol. 218, No. 7, pp. 381-387.
- (6) Sarashina, I., Kunitomo, Y., Chiba, S., Iijima, M. and Endo, K. (2008) Preservation of the shell matrix protein Dermatopontin in 1500-year-old land snail fossils from the Bonin islands. *Organic Geochemistry*, 39, 1742-1746.
- (7) Iijima, M., Sarashina, I., Takeuchi, T. and Endo, K. (2008) Expression patterns of engrailed and dpp in the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Development, Genes and Evolution*, 218, 237-251.
- (8) Takeuchi, T., Sarashina, I., Iijima, M. and Endo, K. (2008) In vitro regulation of CaCO<sub>3</sub> crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein. *FEBS Letters*, 582, 591-596.
- (9) 更科功・遠藤一佳 (2008) 軟体動物の貝殻タンパク質の進化. 月刊地球号外 no. 59, 103-109.

(10)国友良樹・更科功・遠藤一佳(2008) 硬組織に含まれる基質タンパク質の in vivo における機能解析. 月刊地球号外 No. 59,96-102.

[学会発表] (計 24 件)

- (1)Isao Sarashina, Takashi Toyohuku, Kazuhiko Fujita, Masashi Tsuchiya, Kazuyoshi Endo and Hiroshi Kitazato 2011.5.26. Characterization of the shell matrix proteins of calcareous foraminifera. *Japan Geoscience Union International Symposium 2011* (Makuhari Messe, Chiba, Japan).
- (2)磯和幸延、更科功、遠藤一佳 2011.5.26. 翼形類(二枚貝)における貝殻基質タンパク質アスぺインの分子進化. 日本地球惑星科学連合 2011 年大会(幕張メッセ、千葉)
- (3)磯和幸延、更科功、遠藤一佳 2010.11.6. 翼形類(二枚貝)における貝殻基質タンパク質アスぺインの分子進化. 第 5 回バイオミネラリゼーションワークショップ(東京大学農学部、東京) .
- (4)清水啓介、更科功、遠藤一佳 2010.11.6. 巻貝の貝殻形成における BMP 2/4 の機能解析. 第 5 回バイオミネラリゼーションワークショップ(東京大学農学部、東京) .
- (5)Yukinobu Isowa, Isao Sarashina and Kazuyoshi Endo 2010.7.31-8.3. Molecular evolution of the shell matrix protein Aspein in pteriod bivalves. *International Symposium on Biodiversity Science 2010 "Genome, Evolution and Environment"* (Nagoya City University, Nagoya, Japan)
- (6)更科功、千葉 聡、遠藤一佳. 2010.6.12-13. 化石タンパク質によるカタツムリの系

統推定. 日本古生物学会 2010 年年会(筑波大学、つくば) .

- (7)更科功、豊福高志、藤田和彦、遠藤一佳 2010.6.12-13. 石灰質有孔虫の殻内タンパク質の検討. 日本古生物学会 2010 年年会(筑波大学、つくば) .
- (8)磯和幸延、更科功、遠藤一佳 2010.6.12-13. 翼形類(二枚貝)における貝殻基質タンパク質アスぺインの分子進化. 日本古生物学会 2010 年年会(筑波大学、つくば)
- (9)遠藤一佳、竹内猛、磯和幸延、更科功 2010.5. 「カルサイト-アラゴナイト問題」の一つの答. 日本地球惑星科学連合 2010 年大会(幕張メッセ、千葉)
- (10)清水啓介、更科功、遠藤一佳 2010.3.13. モノアラガイの貝殻形成における BMP2/4 の機能解析. 日本動物学会関東支部第 62 回大会(筑波大学、つくば)
- (11)Kazuyoshi Endo, Takeshi Takeuchi, Yukinobu Isowa and Isao Sarashina 2009.12.15-18. Structure, function and evolution of shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *International Symposium on Marine Genomics* (Hotel Southern Plaza Kaiho, Naha, Okinawa, Japan).
- (12)遠藤一佳・更科功 2009.5. 遺伝子配置による多細胞動物の系統復元：傾向と対策. 日本地球惑星科学連合 2009 年大会(幕張メッセ、千葉)
- (13)更科功・遠藤一佳 2009.5. 巻貝における新規炭酸脱水酵素と軟体動物の貝殻の進化. 日本地球惑星科学連合 2009 年大会(幕張メッセ、千葉)
- (14)磯和幸延・横尾直樹・更科功・遠藤一佳 2009.5. 翼形類における貝殻タンパク質アスぺインの分子進化. 日本地

球惑星科学連合 2009 年大会 (幕張メッセ、千葉)

- (15)磯和幸延、横尾直樹、更科功、遠藤一佳 2009.4. 翼形類 (二枚貝) における貝殻基質タンパク質 Aspein の分子進化、東京大学海洋研究所共同利用研究集会「バイオミネラリゼーションと石灰化 -遺伝子から地球環境まで-」(東京大学海洋研究所、東京)
- (16)安藤寛・国友良樹・更科功・飯島実・遠藤一佳・指田勝男 2009.3.20. 下田沖放散虫類の ITS 領域における種内変異。第 10 回放散虫研究集会 (山口大学)
- (17)西澤暁子・更科功・辻本善信・飯島実・遠藤一佳 2009.1.31. 腕足動物ミドリシヤミセンガイの染色体数と初期発生—人工授精法—。日本古生物学会第 158 回例会 (琉球大学)
- (18)西真樹子・更科功・遠藤一佳・平山廉 2009.1.31. 卵殻タンパク質を用いたカメ類の系統学的研究。日本古生物学会第 158 回例会 (琉球大学)
- (19)更科 功 2008.12.13. 軟体動物の貝殻タンパク質 Nacrein の進化。第 3 回バイオミネラリゼーションワークショップ (東京大学農学部、東京)。
- (20)磯和幸延・更科功・遠藤一佳 2008.12.13. 翼形類における貝殻基質タンパク質 Aspein の分子進化プロセス。第 3 回バイオミネラリゼーションワークショップ (東京大学)
- (21)Endo, K. and Sarashina, I.: Multiple origins of animal skeletons and dynamic adaptive evolution documented by molluscan shell matrix proteins. International Symposium "From Genome to Snowball Earth, Metazoan Evolution and Habitable Planets: Multidisciplinary Relations",

MIRAikan, Odaiba, Tokyo, 29

September -3 October 2008.

- (22)Endo, k., Takeuchi, T., Kunitomo, Y., and Sarashina, I.: Expression and function of the unusually acidic shell matrix protein Aspein. Gordon Research Conference on biomineralization, Colby-Sawyer College, New London, New Hampshire, USA, 10-15 August 2008. (ポスター)
- (23)遠藤一佳・更科功 2008.8.24. 貝殻基質タンパク質に見られるダイナミックな適応進化。日本進化学会第 10 回年会 (東京大学, 駒場, 東京)
- (24)遠藤一佳・更科功 2008.5.27. 貝殻基質タンパク質の分子進化。日本地球惑星科学連合 2008 年大会(幕張メッセ, 千葉)

[図書] (計 1 件)

- (1)サイモン・コンウェイ=モリス (著)、遠藤一佳、更科 功 (訳) 2010. 進化の運命 孤独な宇宙の必然としての人間 (講談社、東京) 724 頁。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤一佳 (ENDO KAZUYOSHI)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号: 80251411

### (2) 研究分担者

平山廉 (HIRAYAMA REN)  
早稲田大学・国際教養学術院・教授  
研究者番号: 00238396

### (3) 連携研究者

更科功 (SARASHINA ISA0)  
東京大学・大学院理学系研究科・研究員  
研究者番号: 90375444

