

平成21年4月15日現在

研究種目：基盤（B）
研究期間：2006-2008

課題番号：18380124

研究課題名（和文） クモ糸様タンパク質に注目した貝殻作りの分子機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanism of shell formation especially focusing on the silk-like proteins

研究代表者 豊原治彦 (TOYOHARA HARUHIKO)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90183079

研究成果の概要：

貝殻は炭酸カルシウムを主成分とする鉱物であるが、炭酸カルシウムの単純結晶である方解石やあられ石とはことなり、5%程度の有機物を含んでいる。貝殻形成の分子機構については長く不明のままであったが、本研究においては、申請者はマガキを用いて、貝殻中に新たに申請者らによって見出されたクモ糸様タンパク質の貝殻形成における機能ならびにこのタンパク質の産業応用について研究を行い、ナノテクノロジーや水質浄化剤への貝殻の応用の可能性を提示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2007年	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

研究分野：海洋生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：バイオミネラルリゼーション、マガキ、炭酸カルシウム、石灰化、クモ糸様タンパク質、凝集沈殿剤、貝殻

1. 研究開始当初の背景

貝殻などのバイオミネラルの研究の歴史は100年近くに及ぶが、その大半は鉱物学者による構造観察であった。1990年代以降、生化学者がバイオミネラル合成機構の研究に着手し始めたが、今日に至るまで、その研究は貝殻などの硬組織を酸などの化学処

理により分解し、残った微量成分を分析するという方法によっている。しかし、このような方法では、貝殻に含まれるほとんどの有機成分が酸処理などで変性・分解されてしまい、酸などに安定なために残った極微量の一部のタンパク質が分析の対象となっていたにすぎないと考えられる。

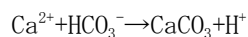
申請者らが外套膜に注目した研究を行った結果、クモの牽引糸及び粘着糸と同一のドメイン構造をもつタンパク質をコードする遺伝子の断片を得ることができた。牽引糸タンパク質はGPGDGDGPTGL/IGPDGGS GPYの繰り返し配列からなり、粘着糸タンパク質はGQNAという配列にはさまれた8-10個のアラニンからなるポリアラニンをもつ特徴的な構造をもつことが明らかとなった。また、貝殻の再生過程における両遺伝子のmRNAの発現誘導を詳細に検討した結果、両遺伝子とも、外套膜の中でも特に貝殻形成に重要な役割を果たすとされている外套膜辺縁部において、特に強く発現されることが明らかとなった。

さらに再生過程の外套膜辺縁部において、ブロック状の炭酸カルシウム結晶が結合・配向し、貝殻が形成される様子を始めて撮影する事に成功した。

しかし、これらのタンパク質の貝殻形成における役割や貝殻中での分布、oySLP2の全構造などは不明であった。

2. 研究の目的

細菌から植物、動物に至るまで、地球上の多くの生物は「バイオミネラル」と総称される硬組織を作る。たとえば、動物の歯や骨、卵の殻、造礁珊瑚、真珠、貝殻などは、身近なバイオミネラルである。これらのバイオミネラルの主要成分は炭酸カルシウムであり、その合成反応は次式で表される。



しかし、本研究で対象とする「貝殻」では、同じ炭酸カルシウムを主成分とするにもかかわらず種によってその形態は様々であり、また同一種でも貝殻の外側と内側で性状が大きく異なる。この原因は、炭酸カルシウム結晶の配向の違いにあることがわ

かっているが、結晶の配向を決定する因子については不明であった。

申請者は、マガキの貝殻の一部を破壊すると12時間以内に薄い透明なプラスチック状の貝殻を形成すること、その際、貝殻合成を行う外套膜が貝殻の直下に張り出してくることを見出した。そして、この観察から着想し、再生過程の貝殻直下の外套膜に特異的に発現している遺伝子の特定を試み、クモの牽引糸（命綱）タンパク質、及びクモの巣の粘着糸タンパク質の遺伝子とそれぞれ高い相同性を示す2種類の遺伝子断片（oySLP1とoySLP2）を得た。これまでのクモ糸に関する研究から、牽引糸タンパク質は粘着性に欠けるが強度に富む（直径1mmの牽引糸は1.5tの重量に耐える）一方、粘着糸タンパク質は強度では劣るが強い粘着性を持つことが知られている。クモと二枚貝という系統分類学上遠く離れた2種の生物が作り出す体外分泌物である「クモ糸」と「貝殻」に共通のタンパク質が用いられているという事実は、分泌性の体外組織を形成するメカニズムが生物種を超えて広く保存されている可能性を示唆する、きわめて重要な発見であったが、分子レベルの検討はなされていなかった。

一方、人工バイオミネラルの合成は、特に工学・医学分野において大きな関心を集めているが、いまだ成功には至っていない。それは、微小な炭酸カルシウムの結晶を適切に結合・配向するタンパク質因子が特定されていなかったことに起因する。申請者らはクモ糸様タンパク質がこの点で重要な役割を果たしていると考え、試験管内で人工的に貝殻様素材を合成する技術を開発し、軽量で強固、かつ生分解可能な新規工業素材への応用を図ることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子クローニング

RT-PCR ならびに RACE 法を用い、常法に従って、oySLP1 と oySLP2 の遺伝子のクローニングを行った。

(2) 組換え体の作製

oySLP1 の機能解析のために、N 末端、C 末端にそれぞれ GST タグ、6×His タグの融合した Front 領域から Silk 領域までの oySLP1 組換えタンパク質 (r-oySLP1) を作製した。ベクターには pGEX 6P-1 を、発現用大腸菌株には Rosetta gami B (DE3) をそれぞれ用いた。

(3) 合成ペプチド

oySLP1 のクモ横糸と高い相同性を示す領域内のアミノ酸配列を基にした oySLP1-peptide を委託合成し、これを用いて以下の実験を行った。

(4) 結晶形成への影響

① 走査型電子顕微鏡観察

oySLP1 ペプチドが炭酸カルシウム結晶の形態に与える影響を検討するために、oySLP1 ペプチドを用いて形成させた炭酸カルシウム結晶の形態を、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。95 μ l の 20 mM NaHCO₃ 溶液を 1.5ml tube に加えて、10 μ l の 10mM Tris/HCl (pH7.5) に各々の濃度で溶解した oySLP1 ペプチド溶液に加えた。その後 95 μ l の 20 mM CaCl₂ 溶液を加え、母液の入った 1.5ml tube を 20°C で 72 時間インキュベートした。インキュベートした後、母液を取り除き、空気乾燥させた炭酸カルシウム結晶を観察した。比較対象として、10 μ l の 10 mM Tris/HCl (pH7.5) に oySLP1-peptide と同じ質量で溶解させたポリアラニンを用いた。

② 濁度測定

oySLP1 ペプチドの炭酸カルシウム結晶形成における阻害能を測定するために以下の

実験を行った。95 μ l の 20 mM NaHCO₃ 溶液に 10 μ l の 10 mM Tris/HCl (pH7.5) に各々の濃度で溶解した oySLP1 ペプチド溶液に加えた。その後 95 μ l の 20 mM CaCl₂ 溶液を加えた。分光光度計を用いて吸光度 570 nm で、この溶液の濁度の変化を 1 分間隔で 5 分間測定した。比較対象として、10 μ l の 10 mM Tris/HCl (pH7.5) に oySLP1 と同じ質量で溶解させたポリアラニンを用いた。

4. 研究成果

(1) oySLP1

① 組換え体による検討

pGEX6P-1 ベクター及び菌株に Rosetta gami B (DE3) を用いて、oySLP1 の N 末端から flagelliform silk protein と高い相同性を示す Silk 領域までの組換えタンパク質を作製し、アフィニティー精製により r-oySLP1 を得た。

CaCO₃ の結晶形成に与える r-oySLP1 の影響を調べるために、飽和 CaCO₃ に r-oySLP1 を混和し、その溶液の濁度を経時的に測定した。飽和 CaCO₃ 溶液では CaCO₃ の結晶形成に伴って溶液の濁度は上昇したが、r-oySLP1 は濃度依存的に濁度上昇を抑制した。次に、⁴⁵Ca を用いて r-oySLP1 が Ca²⁺ 結合能を有するかを調べた結果、r-oySLP1 は Ca²⁺ と結合することが明らかとなった。以上のことから、oySLP1 は Ca²⁺ と結合することで CaCO₃ の結晶形成を抑制することが示唆された。

さらに、CaCO₃ の結晶形態に及ぼす r-oySLP1 の影響を調べるため、貝殻が形成される外套膜外液の組成を模した溶液中に r-oySLP1 を混和し、形成された CaCO₃ の結晶を走査型電子顕微鏡により観察した。その結果、r-oySLP1 は CaCO₃ の結晶形態を針状結晶から多角体結晶に変化させることが明らかとなった (図 1)。また、CaCO₃ の 2 つの結晶

多形であるアラゴナイトとカルサイトのうち、マガキの稜柱層はカルサイト結晶からできていることが知られているが、r-oySLP1の添加によって形成された結晶もX線結晶構造解析の結果カルサイト様の結晶であった。以上のことから、oySLP1はCaCO₃の結晶形態を制御し、稜柱層におけるカルサイト結晶の形成を誘導することが示唆された。

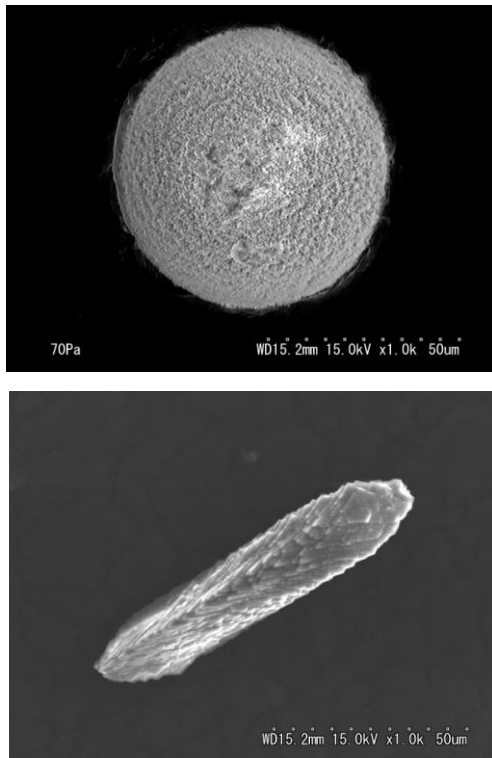


図1 上図はoySLP1の組換え体非存在下、下図は存在下で生成された構造体の走査型電子顕微鏡写真。X線結晶構造解析の結果、前者はアラゴナイト、後者はカルサイトであった。

この結果はoySLP1はカルサイト構造を誘導する活性を有することを示していた。

また、組換え体を抗原としてoySLP1の抗体を作製し、免疫走査型電子顕微鏡観察を行った。その結果、図2に示すようにoySLPは文字通りクモの巣のような網状構造で貝殻の最外殻を覆っていることが明らかとなった。

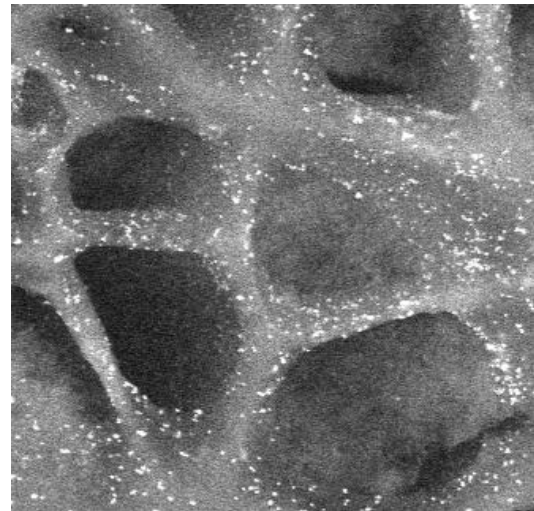


図2 oySLP1のマガキ貝殻における局在性を免疫走査型電子顕微鏡観察したもの。

②合成ペプチドを用いた検討

クモの横糸タンパク質と高い相同性を示す領域内において特徴的な繰り返し配列を形成する20アミノ酸からなるYGP GDGPGPYGLGPDGGSGPが炭酸カルシウム結晶形成に及ぼす影響を検討したところ、この合成ペプチドは炭酸カルシウム結晶形成を濃度依存的に抑制することが分光光度計による濁度測定により明らかとなった。この20アミノ酸からなるペプチド内においてアスパラギン酸はCa²⁺結合に重要であると推測されたので、アスパラギン酸を含む7アミノ酸からなるYGP GDGPGとさらに短い5アミノ酸からなるYGP GDについて検討した結果、いずれのペプチドも濃度依存的に炭酸カルシウム結晶形成を抑制することが明らかとなった。

さらに7アミノ酸からなるYGP GDGPGと5アミノ酸からなるYGP GDを用いて、炭酸カルシウム結晶の形態観察を行った結果、これらの

ペプチドはこれまでに例がない貝殻様構造の結晶形成を誘導する機能を示した。また YGPGD の活性部位を検討するため、YGPGA と AGPGD を用いて同様の実験を行った結果、AGPGD は貝殻様構造の結晶形成を誘導したが、YGPGA は貝殻様構造の結晶形成を誘導しなかった (図 3)。

以上の結果から、oySLP1 のクモ糸様配列中のアミノ酸配列 YGPGD は炭酸カルシウム結晶形成に影響を及ぼし、結晶構造の成長を抑制するとともに、その内部のアスパラギン酸が Ca^{2+} と反応して貝殻特有の層状構造形成に重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

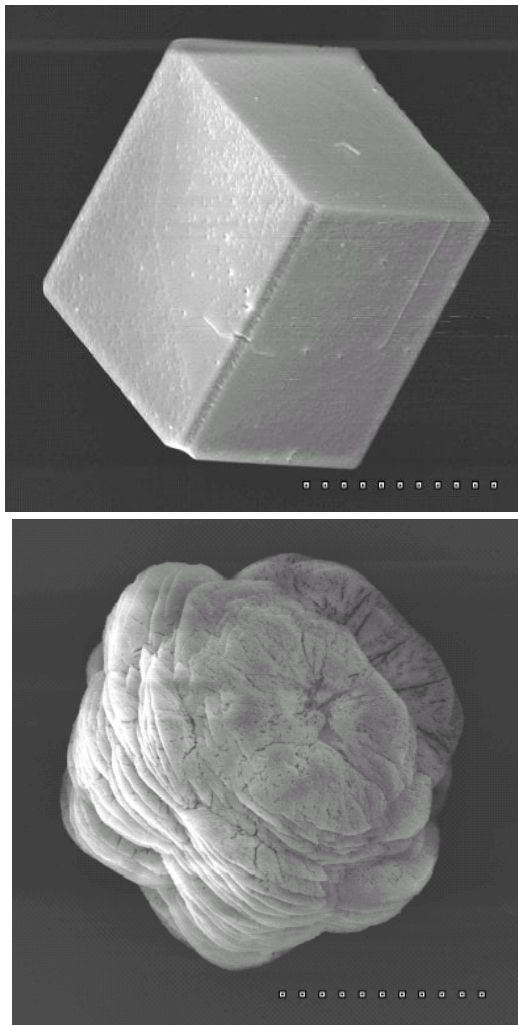


図 3 上図は YGPGA ペプチド、下図は AGPGD ペプチドの結果を示す。この結果から、花びら状の貝殻構造を誘導するためには、C 末端

のアスパラギン酸が重要であることがわかる。なお、5 残基のみのアミノ酸からなるペプチドでこのような複雑な構造を誘導することができたのは世界で初めてのことである。

研究計画に記したように、本研究においてはアコヤガイへの挿核実験を行った。A は対照としてポリアラニンを塗布した核を挿入した場合、B は YGPGD ペプチドを塗布した核を挿入した場合の結果を示す。それぞれ最も高品質な真珠光沢を示した真珠球と、反対に最も品質の悪い真珠球の結果を示している。この結果から YGPGD ペプチドを塗布した場合には、やや黄色を帯びた真珠光沢を示す傾向があること、また対象のように全く石灰化が起こらないという例はなかったことが特筆される。図 4 に YGPGD ペプチドを塗布した真珠の真珠層の走査型電子顕微鏡写真を示す。挿入した核の上に真珠光沢層が成長している様子がわかる。

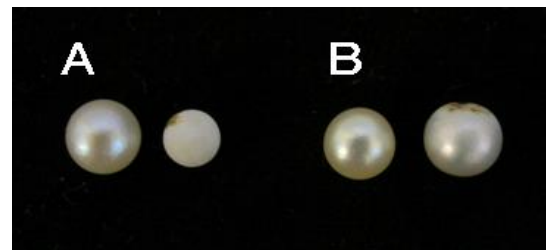


図 4 アコヤガイへの挿核実験。A は対照としてポリアラニンを塗布したもの、B は YGPGD ペプチドを塗布したもの。

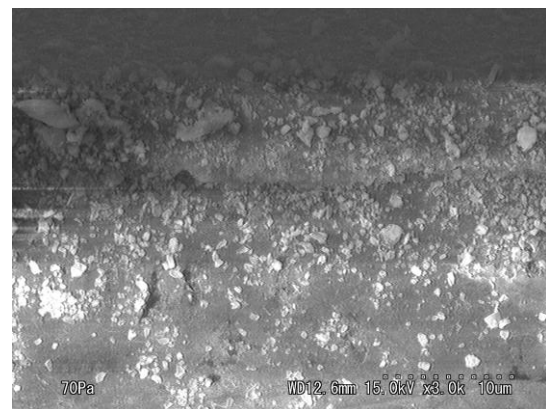


図 5 YGPGD ペプチドを塗布した真珠の真珠層の走査電子顕微鏡観察

(2) oySLP2

本研究の最大の成果は、長年の懸案であった oySLP2 の全長クローニングに成功したことである。得られた遺伝子の塩基配列から oySLP2 の中に、新規なアミノ酸モチーフが見つかった。それらはクモの糸などに多く見られる poly(Ala) 構造を有していたが、FASTA によるアミノ酸配列解析の結果、相同性のある配列についての報告はなかった。

軟体動物由来のタンパク質について、poly(Ala) 構造を有するものには「MSI60」が良く知られている。このタンパク質は、分子内に「高密度 Asp 領域」と、11 回の poly(Ala) の繰返しが存在している。しかし、今回我々が見つけた poly(Ala) タンパク質は、Sudo らにより発見されていたタンパク質と異なり、Ca との相互作用が疑われる高密度 Asp 領域は分子内に存在せず、8-10 回の poly(Ala) 配列の繰返しと、3 回の PYYGFNL 配列の繰返しから構成されていた。特徴的なことは、これらの poly(Ala) 配列が、主に 2 種類の配列；GS(A)_n および GQN(A)_n から成り立っていることで、これらの配列は交互に繋がることもあれば、タンデムまたは 3 つ以上連なっている場合もあった。いずれの配列も、poly(Ala) 領域は 8-10 個の Ala から構成されており、内部または C 末端側の Ala は Ser に置換されていることもあった。今後さらに、組換えタンパク質や合成ペプチドを用いて oySLP2 の機能を検討する計画である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 高橋潤, 上田能久, 竹尾圭, 高木雅哉, 岸田拓士, 東畑頭, 豊原治彦, マガキ由来のクモ糸様タンパク質の進化的解析、第 3 回 バイオミネラルゼーションワークショップ、2008/12/13、東京大学
- 2) J. Takahashi, M. Takagi, T. Tonooka, M. Kawamura, H. Toyohara, Biomineralization Mechanisms of Shell Formation of Pacific Oyster, IUMRS-ICA 2008, 2008/12/10、名古屋

屋国際会議場

- 3) H. Toyohara, Proteinous factors involved in biomineralization of the shell, アジア太平洋マリノバイオテクノロジー学会、2008/11/13、釜山国際会議場 (韓国)
- 4) 高橋潤, 高木雅哉, 外岡武士, 川村将郎, 豊原治彦, マガキ貝殻形成に関わるタンパク質の構造と機能、マリノバイオテクノロジー学会、2008/5/25、京都大学
- 5) 豊原治彦, 貝殻由来ペプチドによる炭酸カルシウム結晶の形成制御、けいはんな新産業創出・交流センター シーズフォーラム、2008/2/1、大阪
- 6) H. Toyohara, A novel silk-cement protein involved in shell formation, タイ拠点シンポジウム、2007/12/17
- 7) 豊原治彦, 高木雅哉, 外岡武士, 川村将郎, カキ由来のクモ糸様タンパク質の構造と機能、第 2 回 バイオミネラルゼーションワークショップ、2008/12/1、東京大学

[図書] (計 1 件)

A. Tassanakajon, T. Vatanavicharn, P. Supungul, S. Tang, P. Amparyup, K. Somboonwivat, S. Tharntada and H. Toyohara, Terra Scientific Publishing Company (Tokyo), "Fisheries for Global Welfare and Environment" "Biotechnology of Marine Invertebrates - Recent Advances in Shrimp and Shell Science", 2008, p. 222-239.

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- 1) 特願 2006-262120 「合成ペプチド及びその用」 豊原治彦・外岡武士、京都大学、2006. 9. 27
- 2) 特願 2007-302567 「合成ペプチド及びその利用」 豊原治彦・外岡武士、川村将郎、京都大学、2007. 11. 22
- 3) 特願 2007-306231 「凝集促進剤、凝集剤及び凝集促進剤の製造方法」 豊原治彦・大橋友孝、京都大学・(株) ハイドロワークス、2007. 11. 27
- 4) 特願 2007-306180 「攪拌装置」 豊原治彦・大橋友孝、京都大学・(株) ハイドロワークス、2007. 11. 27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊原 治彦 (京都大学・農学研究科・准教授、90183079)

(2) 研究分担者

三上 文三 (京都大学・農学研究科・教授、40135611)

鈴木 徹 (東北大学・農学研究科・教授、70344330)

井上 広滋 (東京大学・海洋研究所・准教授、60323630)