

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23654177

研究課題名(和文) 質量分析による化石タンパク質の一次構造解析

研究課題名(英文) Amino acid sequence analysis of fossil proteins using mass spectrometry

研究代表者

遠藤 一佳 (Endo, Kazuyoshi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80251411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：化石タンパク質のアミノ酸配列を決定する前段階として、現世腕足動物の殻体プロテオーム解析と外套膜トランスクリプトーム解析を *Laqueus rubellus* と *Coptothyris grayi* の2種について行った。その結果、74種の殻体タンパク質を同定し、これまでに他の動物門で知られる殻体タンパク質と相同ではない新規タンパク質が大部分を占めることを解明した。一方、約39万年前の *L. rubellus*、*C. grayi* の化石タンパク質の予察的解析も行い、殻体内の大部分のアミノ酸がペプチド内ではなく、遊離の状態で存在しており、アミノ酸配列を得るためには、化石抽出物の濃縮が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：As a first step toward determining amino acid sequences of fossil peptides, a combined proteome and transcriptome analysis of the shell and mantle of the terebratulide brachiopods *Laqueus rubellus* and *Coptothyris grayi* was carried out. As a result, a total of 75 shell matrix proteins were identified, and it was clarified that most of them are novel proteins not homologous with known skeletal matrix proteins. On the other hand, a preliminary analysis of fossil proteins of *L. rubellus* and *C. grayi* 0.39 Ma old was done, having revealed that most of the amino acids occluded in the fossil shells exist as free amino acids rather than as part of peptides, and that an extensive concentration of shell extracts will be needed to obtain amino acid sequences from these fossils.

研究分野：分子古生物学

キーワード：化石タンパク質、分子化石、腕足動物、分子古生物学、分子進化学、質量分析、硬骨格プロテオーム、バイオミネラリゼーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 化石中に残されたタンパク質の研究は、Abelson (1954)によるデボン紀の魚類化石からのアミノ酸の検出に始まる。1960年代に化石中のアミノ酸の研究は内外の研究者によって精力的に行われた。その後、1970年代には抗体を用いた化石ペプチドの検出が行われ、1980年代にはこの免疫学的方法を用いて絶滅生物の系統学的研究が行われた。1990年代にはエドマン法により、3600年前の化石骨中のオステオカルシンの一次構造解析が行われた。2000年代には質量分析計により、75000年前のネアンデルタール人のオステオカルシンや、60万年前のmastodonのコラーゲンの一次構造が解明された。さらに白亜紀の恐竜類からもコラーゲンの配列が報告されている。これらの研究により、微量な化石タンパク質の一次構造を分析する方法が開発された。

(2) しかし、これらの研究は、どちらかと言えば単発的、逸話的であり、進化生物学的な一般性、広がりを見せるに至っていない。その理由の一つは、従来の研究が脊椎動物を主な研究対象としてきたことにあるだろう。脊椎動物では連続的な化石記録が期待できない。また、脊椎動物の骨にはDNAが含まれるため、化石タンパク質よりも古代DNAから、より容易により多くの生物学的な情報が得られる場合があるという事情もある。一方、地質時代から現世まで豊富で連続的な化石記録を示すのは、軟体動物や腕足動物などの硬い骨格を持つ海生無脊椎動物である。これらの骨格の中にはDNAは含まれないが、タンパク質は含まれる。近年内外の研究グループにより、これらの現生種において基質タンパク質の一次構造が決定されるようになった。さらに、貝殻基質タンパク質は進化速度が極めて速く、過去100万年間にもアミノ酸配列が大きく変化している可能性が示唆され、その進化プロセスに大きな興味もたれるようになってきた。

2. 研究の目的

(1)化石としてよく保存される骨・歯・貝殻などの硬組織は、微量の基質タンパク質を含む。これらのタンパク質は、少なくとも100万年間はもとの一次構造(アミノ酸配列)を保持し得ることが知られている。本研究の目的は、これらの化石タンパク質のうち、軟体動物などの無脊椎動物の骨格化石に残されたタンパク質について、質量分析計によってそれらの一次構造を決定する方法を確立することである。また実際に絶滅種の化石タンパク質や、いくつか異なる層準から産出する同一種の化石タンパク質の一次構造を決定することにより、進化生物学的な問題を解決し、さらに分子進化的に全く新しい情報源を開拓することを目指す。

(2)具体的には、本研究計画では、以下の二つの課題に取り組む。(i)まずパイロットスタディとして、1000年前の小笠原諸島の陸生貝類絶滅種の貝殻化石に含まれる基質タンパク質ダーマトポンティンの一次構造の決定を行う。この課題を通して、小笠原諸島の陸生貝類の移住と分化という進化生物学的な問題を考究するとともに、無脊椎動物骨格に含まれる化石タンパク質の一次構造解析の方法を確立する。その上で、(ii)過去100万年間にいくつかの異なる層準から産出する腕足動物の同一種を用いて、それらの殻体に含まれる基質タンパク質の一次構造の決定を行い、分子進化のプロセスを直接化石記録から追跡する。

3. 研究の方法

(1)1000年前の陸貝化石について、その貝殻に含まれるダーマトポンティンの一次構造を質量分析計によって決定し、小笠原諸島における陸貝類の移住と分化のプロセスを考察する。この研究を通じて、化石タンパク質の調製・分析方法を確立する。

(2)過去100万年の異なる層準から産出した腕足動物の同一種の化石について、殻体タン

パク質のアミノ酸配列を決定し、その分子進化プロセスを化石タンパク質から直接辿る。

相模湾においてラクエウス上科に属する *Laqueus rubellus*、*Pictothyris picta* のドレッジによる採集を、敦賀湾においてラクエウス上科の *Coptothyris grayi* をスキューバダイビングによる採集を、函館湾においてラクエウス上科の *Terebratalia coreanica* のドレッジによる採集を行う。各現生種の外套膜サンプルより全RNA を抽出し、相補的DNA を合成する。これらを次世代シーケンサーによる配列決定に供し、トランスクリプトームを得る。

乾燥保存された現生種の殻体サンプルを脱灰し、基質タンパク質の粗抽出物を得る。ゲル電気泳動法にて殻体抽出物中のタンパク質の濃度、純度等を確認した後に、抽出物のトリプシン消化を行い、LC/MS/MSによるプロテオーム解析に供する。

トランスクリプトームデータを用いて、殻体タンパク質の同定を行い、データベースに登録されている配列との比較を行う。現生種で殻体タンパク質の配列が得られた後に、更新統の上総層群（坂畑層、市宿層、万田野層）と下総層群（地藏堂層、藪層、上泉層、清川層、木下層）の約147 万年前から約13 万年前に渡る各層準から得られた *Laqueus rubellus*、*Pictothyris picta*、*Coptothyris grayi*、*Terebratalia coreanica* の化石標本より殻体タンパク質の抽出を行う。

質量分析計を用いて、それぞれの化石タンパク質の一次構造解析を行い、各種の系統に沿った殻体タンパク質の進化プロセスを考察する。

4. 研究成果

(1)小笠原諸島のカタマイマイ化石については、その後サンプル入手が困難となり、解析を行うことは残念ながらできなかった。

(2)腕足動物現生種の殻体タンパク質の研究では、相模湾において採集されたホオズキチヨウチンガイ *Laqueus rubellus* の殻体プロテオームおよび、外套膜トランスクリプトームの解析を行い、合計74種の殻体タンパク質を同定することができた。これは、ゲル電気泳動による殻体抽出物の分画から推定されたタンパク質の種類数をはるかに越えるものであり、本種の殻体に含まれる主要な基質タンパク質については、網羅的に配列を得ることができたと考えられる。

(3)現世の *L. rubellus* より得られた配列についてblast検索を行ったところ、腕足動物で唯一見つかった殻体タンパク質である ICP-1 やウニの骨格形成に関わるタンパク質である MSP130 などが見つかった。また、タンパク質や脂質の分解酵素も殻体中に含まれていた。質量分析の結果から殻体タンパク質の中では ICP-1 の発現量が飛び抜けて大きいこともわかった。一方で45種のタンパク質は配列データベースに登録されていない新規タンパク質であり、多くの腕足動物の殻体タンパク質は他の分類群の硬骨格タンパク質とは異なる起源をもつことがわかった。また、タンパク質の構造中に含まれるドメインの予測を行ったところ、膜結合ドメイン、NAD(P)結合ドメイン、ABC型輸送体ドメイン、アスパラギン酸に富むドメインなどが一つのタンパク質配列の中に組み合わされた全く新しいタイプの殻体タンパク質が発見され、腕足動物が独自の殻体形成メカニズムをもつことが示唆された。

(4) また、*L. rubellus* と同じテレブラチュラ目に属する *Coptothyris grayi* の現生個体においても外套膜のトランスクリプトーム解析を行い、*C. grayi* も加えた新しいデータセットを用いて、既知のタンパク質やタンパク質ドメインとの類似性の検索を行った。その結果、これらの腕足動物が他の動物門とはタンパク質レベルではまったく異なる殻体タンパ

ク質を持っていること、一方でドメインレベルでは、分解酵素ドメインや分解酵素阻害ドメインなど、いくつか他の動物門の殻体タンパク質とも共通するドメインが見られることもわかった。さらに、ICP-1、MSP130などのほか、*L. rubellus*で見いだされた膜結合ドメインを持つ新規殻体タンパク質が*C. grayi*にも見いだされることから、これらが少なくともテレブラチュラ目の中で保存されている重要なタンパク質であることも明らかとなった。

(5) 化石に保存されているタンパク質の断片化の程度を評価するために、約39万年前の*L. rubellus*および*C. grayi*より抽出した化石タンパク質を完全に加水分解して抽出した際のアミノ酸量と加水分解せずに抽出した際のアミノ酸量をHPLCで測定し、比較した。その結果、これらの化石抽出物では、アミノ酸は大部分がペプチド中ではなく、遊離した状態で存在することがわかった。このことから、今後化石タンパク質のアミノ酸配列を決定するためには、これらの化石抽出物を濃縮してから分析する必要があることが明らかとなった。

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 4 件)

Alberto-Perez-Huerta, Anthony E. Aldridge, Kazuyoshi Endo, Teresa E. Jeffries, Brachiopod shell spiral deviations (SSD): Implications for trace element proxies, *Chemical Geology*, 査読有, vol. 374-375, 2014, pp.13-24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.03.002>

Endo, K. and Takeuchi, T., Annotation of the pearl oyster genome., *Zoological Science*, 査読無, vol. 30, 2013, pp. 779-780

H.Miyamoto, H.Endo, N.Hashimoto, K.limura, Y.Isowa, S. Kinoshita, T.Kotaki, T.

Masaoka, T.Miki, S.Nakayama, C.Nogawa, A.Notazawa, F.Ohmori, I.Sarashina, M.Suzuki, R.Takagi, J.Takahashi, T.Takeuchi, N.Yokoo, N.Satoh, H.Toyohara, T.Miyashita, H.Wada, T.Samata, K.Endo, and 3 others, The diversity of shell matrix proteins: genome-wide investigation of the pearl oyster *Pinctada fucata*., *Zoological Science*, 査読無, vol. 30, 2013, pp. 801-816
Isowa, Y., Sarashina, I., Setiamarga, D.H.E., and K. Endo, A Comparative Study of the Shell Matrix Protein Aspein in Pteriod Bivalves, *Journal of Molecular Evolution*, 査読有, vol. 7, 2012, pp.11-18, DOI:10.1007/s00239-012-9514-3

〔学会発表〕(計 4 件)

磯和幸延、更科功、大島健志朗、紀藤圭治、服部正平、遠藤一佳、腕足動物における殻体タンパク質の網羅的同定、第9回バイオミネラルイノベーションワークショップ、2014年12月12日、東京大学大気海洋研究所(千葉県柏市)

磯和幸延、更科功、大島健志朗、紀藤圭治、服部正平、遠藤一佳、腕足動物における殻体タンパク質の網羅的同定、日本地球惑星科学連合2014年大会、2014年5月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

磯和幸延、更科功、紀藤圭治、Beatrice Demarchi、Matthew Collins、遠藤一佳、腕足動物における殻体タンパク質及び化石タンパク質の同定、日本古生物学会年会、2013年6月28日~2013年6月30日、熊本大学(熊本県熊本市)

遠藤一佳、古代ゲノム学：研究史と今後の展開、日本地球惑星科学連合大会、2013年、5月19日、幕張メッセ(千葉県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://secure.eps.s.u-tokyo.ac.jp/jp/ember/index.php?_urid=3267&_lang=ja

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（辞退：H23.6.13）

高尾 敏文 (TAKAO, Toshifumi)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：10197048

(3) 連携研究者

()

研究者番号：