

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770046

研究課題名（和文） 被囊構成タンパク質分子の解析

研究課題名（英文） Proteomics of the tunic of the ascidian tunicate *Ciona intestinalis*

研究代表者

中島 啓介（NAKASHIMA KEISUKE）

京都大学・大学院理学研究科・研究員（科学研究）

研究者番号：10422924

研究成果の概要：被囊（ひのう）はホヤの仲間に特有の外皮組織であり、自然界で唯一の動物セルロースを含む組織である。カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*)の被囊の大半はタンパク質によって構成されているが、その分子的な実体は全くの不明であった。本研究では、最新のプロテオミクスの手法を導入して（LCタンデムマス法）、被囊を構成するタンパク質分子 50 種を初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	270,000	3,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：タンパク質 被囊 ホヤ カタユウレイボヤ セルロース プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

被囊は、ホヤの仲間（被囊動物：ホヤ・ヒカリボヤ・サルパ・ウミタル・オタマボヤ）に固有の器官であり、その実体は表皮外面に沿って個体を覆い包む結合組織である。被囊は表層のクチクラとスポンジ状の基質からなり、基質中にはセルロースを含んだ繊維（ツニシン）が認められる。これは自然界唯一の動物セルロースである。また、基質内には自由移動性の細胞が散在するとともに、管状に突出した表皮細胞により形成された被

囊内血管の中を多くの血球を含む体液が循環しており、これらの細胞が生体防御に関与している。このように被囊は特異的な構造と機能を持つ組織であるが、従来の研究はもっぱら観察に限られ、現象の理解が進んでいない研究題材であった。

その一方で、ホヤの一種であるカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の突然変異体の解析を通じて、被囊に含まれるセルロースを合成するために不可欠な分子であるセルロース合成酵素 (Ci-CesA と名づけた) の働きが抑制されると、幼生の被囊にひれが形成

されず膨張することや、成体の被囊の強度が劇的に低下するなど、形態上の表現型が現れることを明らかにしている。興味深いことに、この変異体には、遊泳性の幼生から固着性の成体へ体制が変化（いわゆる変態現象）が起こる際、一連のイベントの順序が乱れる異時的な表現型が現れる。本来、幼生の尾部が退縮したのちに成体の器官が成長するのだが、この変異体においては、幼生の尾部の退縮が起きる前に成体の器官が成長する。結果として、まるで幼生のように尾部で遊泳する成体が認められる。このように、セルロースは従来考えられていたような単なる構造要素ではなく、発生現象に関わる未知の役割を果たしているらしいことがわかってきた。

しかし、異時的な表現型の原因をセルロースに限定して求める必要性はなく、寧ろ、動物の発生において一般的にグリコサミノグリカンと分泌性のタンパク質分子の協調作用が果たす役割の重要性を考慮すると（例えば、ヘパリンと繊維芽細胞成長因子の協調作用）、セルロースと直接的あるいは間接的に協調作用するタンパク質分子を同定し、その機能を探ることが重要であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、カタユウレイボヤの被囊を構成するタンパク質分子を同定することを目的とする。より多くの分子種の同定を心掛け、分子レベルにおける被囊の構造モデルを提案し、上記の特異な現象を分子レベルで理解するための基盤を整備する。

## 3. 研究の方法

研究は以下に示すとおり、大きく4つの工程から構成される。目的とする分子を同定する3つの工程と同定した分子を解析する1つの工程である。

### 工程1. 組織の調製

舞鶴湾において人工養殖したカタユウレイボヤを採取し、実験室においてハサミとピンセットを用いて解剖し、被囊を50個体分集めた。

### 工程2. 成分の抽出

被囊を液体窒素中で破砕して粉末試料を調製した。水溶性タンパク質と難溶性タンパク質を分画する目的で、種々の界面活性剤を用い、イオン強度や温度などの反応条件を検討した。反応液をSDS-PAGE電気泳動法によりゲル上に展開し、染色バンドの状態

を評価することにより条件検討を行った。最終的に、50mM酢酸バッファ(pH5.0)中にて4°C12時間静置したのち遠心ろ過して得られた上清と、その残渣を先述のバッファおよび1%SDS条件下にて15分間煮沸したのち遠心ろ過して得られた上清を、それぞれ水溶性画分と難溶性画分として以後の解析の対象とした。

### 工程3. 成分の同定

両成分をSDS-PAGE法によりゲル上に展開し、プロテイング法によりナイロン膜に転写した。ボンソーSで軽く染色し、染色バンドを切り出した後、脱色し、エドマン法によりNアミノ末端ペプチド配列を決定した。以上のように、申請書に記載の過程に沿って研究を推進したが、アミノ酸配列の決定効率が異常に低く、その原因は、Nアミノ末端のプロッキングという解析試料に内在的な理由と、アミノ酸シーケンサーの機器的な不具合にあると理解された。そこで、共同研究者の山田力志博士(徳島大学)の強力な支援を受けて、最新のプロテオミクスの技術を導入し、状況の打破を図った。

導入した技術は上述のエドマン法に基づく同定法とは全く異なっている。試料タンパク質をSDS-PAGE法に供するまでは同じであるが、ゲル上に展開した試料は配列特異的なタンパク分解酵素を用いたゲル内消化に供されてペプチド化された。ペプチドは液体クロマトグラフィー法にて更に分画された後、スプレーガン方式にて電荷を帯びたイオンとして電場を飛行することにより、そのイオン化ペプチドの質量が極めて厳密に決定された。

次に、決定された膨大な量のペプチドの質量データを、カタユウレイボヤのゲノム・データベース上の分子情報とリンクする作業を行った。まず、ペプチド化作業に用いたタンパク分解酵素が配列特異的であることを利用して、仮想のペプチド化作業を行った。すなわち、カタユウレイボヤゲノム配列情報と発現RNA分子の配列情報に基づいて予測したタンパク質データを対象に、仮想のペプチドデータベースを構築した。この仮想ペプチド質量データを、実験を通じて得られた実際のペプチド質量データと比較することにより対応関係を決定した。

以上の作業を通じて、被囊に存在するタンパク質分子をゲノムデータベース上の特定の分子として同定した。

### 工程4. 同定した成分の解析

同定した成分がどの細胞に由来し、時間空間的にどのような遺伝子発現パターンを示すか明らかにする目的で、*in situ* ハイブリ

ダイゼーション解析を行った。データベース上で同定した分子について、対応するESTクローンの塩基配列を決定し、必要に応じて、個別に作成したcDNAプールを用いた末端増幅法により全長遺伝子をクローニングし、全長塩基配列を決定した。

クローニングした分子について、詳細な相同性検索およびドメイン解析を行い、機能を類推した。

RNAポリメラーゼ酵素を用いて、クローニングした配列からセンス鎖・アンチセンス鎖のRNAプローブを作成し、in situハイブリダイゼーションを行った。プローブの修飾にはジゴキシゲニンを用いた。

#### 4. 研究成果

##### 工程1.

通常、舞鶴にて採取されるカタユウレイボヤの被囊は、最外面に面する硬い被囊と、表皮細胞に裏打ちされるやわらかい被囊と区別されることが多いが、これは解剖時に副次的に生ずる区別であることが判明したため、両者は区別されることなく、1つの被囊として採取された。

##### 工程2.

種々の界面活性剤や糖タンパク質分解酵素による影響を検討したが、SDSによる煮沸がバンドの明瞭さ、多さともに優れていた。しかしながら、工程3で述べるように、分子の同定の効率に寄与したとは言いがたい結果であった。

##### 工程3.

新たに導入した液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析機システムにより、被囊基質を構成するタンパク質分子50を決定することに成功した。詳細なドメイン構造解析を行った結果、これらの分子は、細胞外マトリックスを構成する糖タンパク質群と補体系免疫タンパク質群に二分された。前者の糖タンパク質には、脊椎動物の外皮組織を構成するフィブリリンやマトリリンが含まれる一方、既知のタンパク質に類似しない新規の糖タンパク質が多数含まれており、それぞれ、脊索動物の外皮組織に共通な分子と、被囊というホヤの仲間に特異な外皮組織を特徴づける分子の候補であると考えている。また、後者の免疫タンパク質群は、固着生活を送るホヤの仲間が外界に接する場である被囊において、免疫作用が営まれていることを裏付けるものと理解している。

##### 工程4.

同定した分子のESTクローン全長配列

を決定した後、ジゴキシゲニンで修飾したRNAプローブを作成し、in situハイブリダイゼーション法により、遺伝子発現解析を行った。被囊を裏打ちする表皮細胞や、被囊内に存在する自由移動性の細胞に発現シグナルが認められたが、被囊そのものに非常に強いバックグラウンドが現れるため、結果の解釈が困難であった。そこで、バックグラウンドが現れない条件及び現れたバックグラウンドを除去する条件を検討し、大幅に改善することに成功した。

これらの成果は従来不明であった被囊の構造及び被囊に認められる免疫現象の分子実体に関する初めてのデータであり、今後の研究発展の基盤になると考えている。

#### 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1件)

KEISUKE NAKASHIMA, JUNJI SUGIYAMA, and NORI SATOH, A spectroscopic assessment of cellulose and the molecular mechanisms of cellulose biosynthesis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Marine Genomics* 1(1): 9-14. 2008.

[学会発表] (計4件)

中島 啓介、西野 敦雄、佐藤 矩行、被囊動物の共有派生形質はセルロース合成である、日本動物学会第78回大会、2007年9月20日、弘前

中島 啓介、ホヤにおけるセルロース合成、東京大学海洋研究所国際沿岸海洋研究センター研究集会・三陸の海：その魅力と生物学、2007年8月21日、大槌

KEISUKE NAKASHIMA, Tunicata (Lamarck, 1816) revisited in light of cellulose biosynthesis. The 4<sup>th</sup> Tunicate Meeting, 25 June 2007, Villefranche-sur-Mer, France.

中島 啓介、被囊動物ならではの特徴 セルロース合成、東京大学海洋研究所研究集会・脊索動物の進化と脊椎動物の起源、2007年1月25日、東京

[図書] (計1件)

中島 啓介、京都大学21COEプログラム「生物多様性研究の統合のための拠点形成」発行、生物多様性研究-その魅力と楽しみ-

2007 年、14-15 ページ、「動物がつくるセル  
ローズ」章

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 啓介 (NAKASHIMA KEISUKE)

京都大学・大学院理学研究科・研究員 (科  
学研究)

研究者番号 : 10422924

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :