

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657146

研究課題名(和文)メダカ耳石形成変異体を用いたバイオミネラルの結晶核形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of nuclear formation for calcium carbonate biomineralization: the analysis using a medaka mutant

研究代表者

武田 洋幸 (Takeda, Hiroyuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80179647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸カルシウムバイオミネラルは生物にとって重要な生理的役割を持っているだけでなく、サンゴ礁形成などを通して地球上の炭素、カルシウム循環サイクルにおいても重要である。我々は炭酸カルシウムバイオミネラルからできている耳石が形成されないメダカ変異体の原因遺伝子が新規のポリケチド合成酵素(OIPKS)の遺伝子であることを見出した。本研究の結果、OIPKSの産物がpolyketid様の性質をもつこと、それが耳石の核形成に必須であることを明らかにした。また動物界ではほとんど存在が知られていないPKS遺伝子は実は、サンゴ、棘皮動物を含む多数の動物に存在することも突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Calcium carbonate biominerals participate in diverse physiological functions and have impacts on global carbon and calcium cycles (e.g. coral reef). However, little is known about how mineralization is initiated in organisms. The medaka mutant lacks a trigger for otolith (calcium carbonate ear stone) mineralization, and the causative gene was found to encode polyketide synthase (OIPKS), a multifunctional enzyme mainly found in bacteria, fungi and plant including calcified algae. Subsequent experiments demonstrate that the products of OIPKS act as nucleation facilitators in otolith mineralization. The generality of this novel PKS function is supported by the essential role of echinoderm PKS in calcareous skeleton formation together with the presence of PKSs in a much wider range of animals from coral to vertebrates. The present study first links PKS to biomineralization and provides a genetic cue for biogeochemistry of carbon and calcium cycles.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成 バイオミネラル 耳石 ポリケチド合成酵素 メダカ

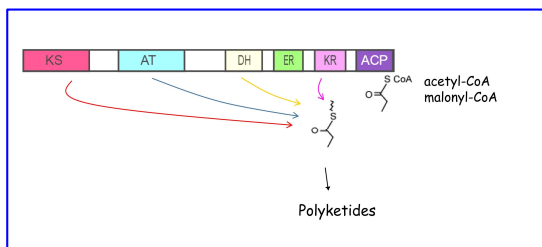
1. 研究開始当初の背景

炭酸カルシウムバイオミネラルは生物にとって重要な生理的役割を持っているだけでなく、サンゴ礁形成などを通して地球上の炭素、カルシウム循環サイクルにおいても重要である。耳石（平衡石、聴砂）は脊椎動物の内耳に存在し、傾斜や加速度の感知に必要なバイオミネラルであり、約9割の炭酸カルシウムとわずかな有機成分で構成されている。一般的にバイオミネラルの結晶化には、1) 結晶の有機成分：基質タンパク質、2) 無機環境、3) 構造的な足場、4) 結晶核の4要素が重要だと考えられている。

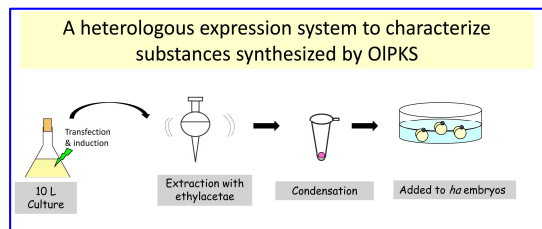
ニジマスなど比較的大きな耳石を持つ魚類の生化学的解析などから、基質タンパク質、構造的足場、無機環境を調節するチャネルなどの因子が同定されてきた。一方で、結晶核の実態や結晶化の機構はほとんどわかっていない。そこで、耳石の結晶化に関連する新規遺伝子の単離を目的として、私はメダカ ha 変異体に着目した。ha はその表現型から、耳石の結晶化機構に異常がある可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

耳石が欠損するメダカ変異体 ha の原因遺伝子が、脊椎動物では初めてとなるポリケチド合成酵素の遺伝子 PKS であることが同定され、表現型の解析より、ha 変異体では、耳胞内で炭酸カルシウム結晶を促進する核物質が欠損していると考えられた。従って、PKS の合成産物が耳石形成の核形成に関与することが期待される。本研究では、PKS が合成する産物の性状とその機能を、遺伝子工学、分析化学を用いて明らかにする。



3. 研究の方法



(1) 異種発現系を用いて PKS の産物の性状解析

A.Oryzae (ニホンコウジカビ) での異種発現 1

導入株の菌体と培養上清を酢酸エチル抽出・濃縮したサンプルを用いて、メダカアッセイを行う。

A.Oryzae での異種発現 2

と同様に得られたサンプルについて、(アッセイの結果を元に) 活性ベースで分離分析した。活性のある分画と HPLC のクロマトを比較する。

(2) 動物界における PKS の分布とその機能解析

ゲノムデータベースの詳細なサーチ登録されている動物ゲノムに対して、PKS の全シークエンスを TBLASTN または BLASTP で検索。得られた遺伝子が活性ドメイン KS と AT を持つか、また追加的な DH, KR, ER, ACP ドメインを持つのかも検索。

ウニ胚における発現と機能解析

バフンウニを用いて、骨片形成細胞で発現する PKS の遺伝子配列を決定。その情報を元に MO をデザインして、受精卵に顕微注入を行った。

4. 研究成果

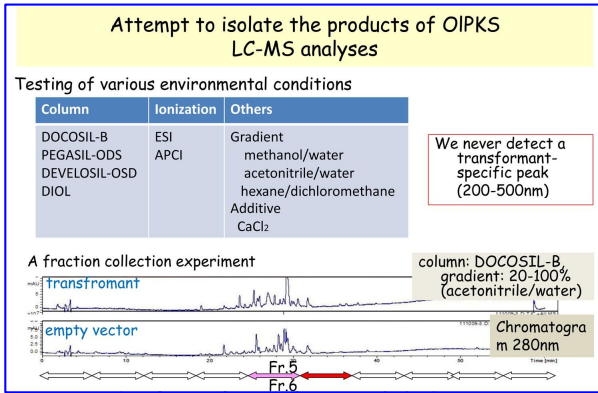
(1) 異種発現系を用いて PKS の産物の性状解析

mPKS の産物の性質を調べるため、ポリケチドの研究に適し、大量培養が可能な *Aspergillus Oryzae* を利用した。mPKS を導入し、発現を誘導した *A.Oryzae* の菌体と培養上清をそれぞれ酢酸エチルで液液抽出し、脂溶性の画分を得た。これらの抽出物をリンガー液に少量添加し、ha 変異体を飼育すると、耳石形成がレスキューされた。これにより、

酢酸エチル抽出物		レスキュー個体数
mPKS導入株	菌体	8/10
	培養上清	3/12
ベクター導入株	菌体	0/10
	培養上清	0/12

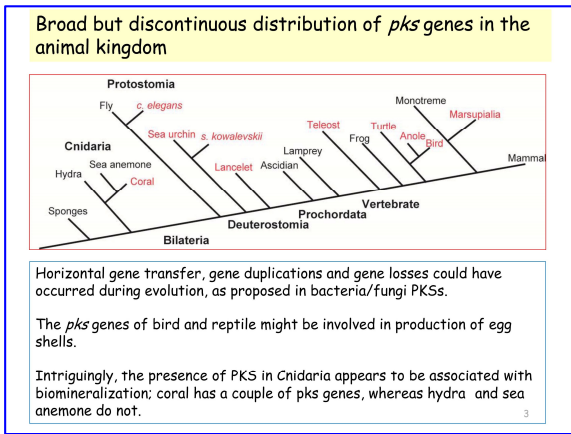
PKS 産物は酢酸エチルで抽出される脂溶性の産物であることが示された。

このバイオアッセイ系をもちいて、活性フラクションの HPLC による分画を試みた。しかしいずれのフラクションもレスキュー活性が得られず、PKS の産物を同定することはできなかった。

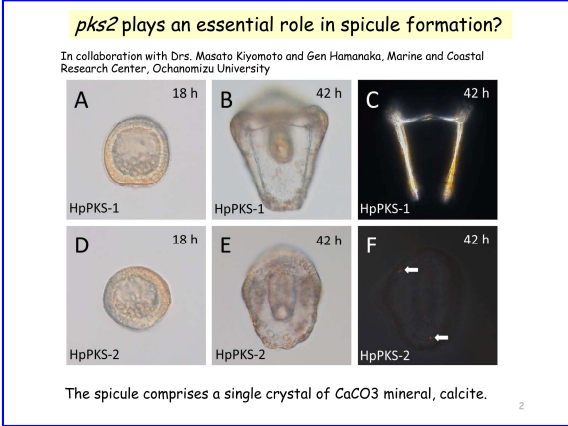


(2) 動物界における PKS の分布とその機能解析

動物界における PKS
 これまで PKS は主にバクテリア、菌類、植物で単離され、その産物が薬品や健康食品に利用されてきた。しかし動物界での PKS の存在はウニ、ゼブラフィッシュ、ニワトリで報告があるが、きちんと調べられていこなかった。メダカ PKS の配列を元に、これまでに公開されたゲノムをサーチしたところ、サンゴ、線虫、ウニ、ナメクジウオ、魚、鳥類、爬虫類など、動物界に広く、PKS 遺伝子が分布していることが明らかとなった。一方モデル動物として使われている、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、マウスなどには PKS 遺伝子が存在しないことも判明した。



ウニにおける PKS の機能
 動物では唯一ウニで PKS の機能解析が行われている。ウニは PKS1 と PKS2 が存在し、PKS1 は色素細胞、PKS2 は骨片形成細胞で発現する。ウニ胚の骨格である骨片は炭酸カルシウムバイオミネラルであるので、PKS の機能が耳石の場合と共通している可能性が高い。そこで、パフンウニの PKS1 と PKS2 を単離して、アンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) をデザインして、顕微注入を行った。その結果、PKD2-MO 注入胚のみ、特異的に骨片形成が完全に阻害された。



以上の結果より、ウニ胚での PKS2 は炭酸カルシウムバイオミネラルである骨片の形成の初期の段階で機能していることが判明した。

本研究により、メダカ耳石形成変異体から得られた動物の新規 PKS は、脂溶性の産物を合成し、炭酸カルシウムバイオミネラルである耳石の核形成過程に機能することが判明した。

動物界での PKS はこれまで十分に検索されてこなかったが、本研究により多くの動物種で PKS 遺伝子がみつきり、そのうちの一つである、ウニの PKS2 も炭酸カルシウムバイオミネラルである骨片形成の初期段階で機能することも判明した。これらの結果より、動物界に広く存在する PKS の保存された機能として、炭酸カルシウムバイオミネラル形成の初期段階での関与が強く示唆された。サンゴや炭酸カルシウムバイオミネラルである殻をつくる円石藻 (Coccolith) も PKS 遺伝子をもつことから、これらの生物の PKS も炭酸カルシウムバイオミネラル形成に関与している可能性がある。サンゴや円石藻は、地球上の炭素、カルシウム循環サイクルにおいても重要であることから、本研究は地球科学分野の研究にも寄与するものと思われる。

今後、異種発現系を改良して大量にポリケチドを産生し、ポリケチドの化学構造を決定する。また、耳石形成の核であることを証明するために耳石におけるポリケチドの存在部位の解析や、*in vitro* で結晶化の誘発能力の検証を行う予定である。骨の石灰化の過程では、結晶核の形成にリン脂質が重要な働きを持つと言われている。耳石においては脂質に代わってポリケチドが寄与しているということになれば、耳石と骨との共通性を考察する上で、大変興味深い。また、これまで高等生物の PKS は報告されておらず、mPKS の研究成果が天然物化学の分野に与える影響も大きいと考えられる。

本研究の成果は、現在、下記論文としてまと

められ、投稿・査読中である。

Calcium carbonate biomineralization
requires polyketide synthase

Motoki Hojo, Ai Omi, Gen Hamanaka,
Kazutoshi Shindo, Atsuko Shimada, Mariko
Kondo, Takanori Narita, Masato Kiyomoto,
Yohei Katsuyama, Yasuo Ohnishi, Naoki Irie
and Hiroyuki Takeda

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)

[学会発表](計 3件)

(1) 武田洋幸 「New insight into
biomineralization from the medaka
mutant, ha」 UTOKYO FORUM2013
2013.11.7 サンチャゴ(チリ)

(2) 武田洋幸 「メダカ耳石変異体からバイ
オミネラル形成の謎に迫る」東北大学大学院
生命科学研究科附属浅虫海洋生物学教育研
究センター秋の浅虫研究会 2013.10.19
浅虫海洋生物学教育研究センター(青森)

(3) 武田洋幸 「メダカ耳石変異体からバイ
オミネラル形成の謎に迫る」京都産業大学総
合生命科学部バイオフォーラム 2013
2013.9.6 京都産業大学(京都)

[その他]

ホームページ

<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 洋幸 (TAKEDA, Hiroyuki)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号: 80179647

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大西 康夫 (OONISHI, Yasuo)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授
研究者番号: 90292789

近藤 真理子 (KONDO, Mariko)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号: 70372414

清本 正人 (KIYOMOTO, Masato)
お茶の水女子大学・人間文化創成科学
研究科・准教授
研究者番号: 70251692

(4) 研究協力者

濱中 玄 (HAMANAKA, Gen)
お茶の水女子大学・人間文化創成科学
研究科・講師