

軟体動物殻形成遺伝子の RNA 干渉法を用いた機能解析の試み

野川ちひろ*・西田卓馬*・大原 勝*・馬場博子*・日高祐輔*・佐俣哲郎*

Elucidation of function of the genes responsible for molluscan shell formation using RNA-interference

NOGAWA, Chihiro*, NISHIDA, Takuma*, OOHARA, Masaru*, BABA, Hiroko*, HIDAKA, Yuusuke*
and SAMATA, Tetsuro*

要旨

RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) は、二本鎖 RNA によって引き起こされる転写後遺伝子サイレンシング機構で、それを応用した発現抑制実験が近年盛んに行われている。RNAi を利用した発現抑制実験は、ターゲット mRNA の配列と、その相補鎖からなる二本鎖 RNA を用いるが、長さ約数百 bp の二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA), あるいは 20bp 前後の低分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) のいずれかを選択する。とくに、軟体動物殻形成遺伝子での RNA 干渉実験では、その結果が殻の形態に直接反映されることから、解析が容易であり、今後、軟体動物殻形成過程の解析に有効であると思われる。

本報告では、予察的に siRNA を注入した生体での殻形成の検索を行った。siRNA の殻形成への影響については、殻再生実験における再生殻体について確認した。その結果、mRNA の発現量の減少が確認できたこと、および再生殻形成不全が認められたことなどから、アコヤガイ殻形成遺伝子について、siRNA による RNA 抑制効果が確認できた。本実験に用いた PrismaLin-14 および Shematrin-2 は、従来より共に稜柱層形成への関与が示唆されていたが、本研究から、それを裏付ける結果を得ることができた。

このような軟体動物殻形成遺伝子の発現抑制実験への siRNA の適用は、その特異性の点から dsRNA の使用が適さないものに対して非常に有用であり、本研究は、軟体動物殻形成機構解明への一つの新しい手段を示したものと考えられる。

キーワード： 軟体動物殻形成、殻形成遺伝子、*in vivo* 実験、RNA 干渉

1. まえがき

生物石灰化機構は、材料創製や医療分野等、様々な分野への応用の可能性を秘めることから、大いに脚光を浴びている研究分野である。近年では、その二酸化炭素固定能や殻に含まれる成分の薬理活性などに注目が集まり、炭酸カルシウム殻をもつ海生軟体動物の石灰化について、水産学・農学・考古学・古生物学・鉱物学など、様々な方面から研究が行われている。

軟体動物の殻を形成する炭酸カルシウム結晶は、アラレ石と方解石という 2 つの多形を取ることが知られている。Mg²⁺ イオンの豊富な海洋環境中ではアラレ石、Mg²⁺ イオンがほとんど含まれない淡水環境中では方解石が形成されやすい。

しかしながら、海生であるにもかかわらず方解石を、あるいは、淡水生でありながらアラレ石を形成する軟体動物も存在する。

また、軟体動物の殻を形成する炭酸カルシウム結

2010年9月8日受付, 2010年11月30日受理

* 〒252-5201 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71 麻布大学環境保健学研究科細胞科学研究室

Laboratory of Cell Science, Graduate School of Environmental Science, Azabu University

1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara-Shi, Kanagawa-Ken 252-5201 Japan

Correspondence to : C. Nogawa, E-mail : de0802@azabu-u.ac.jp

晶は、規則正しく厳密に配列しており、この配列構造は殻体の微細構造と呼ばれる。並び方によって、真珠構造、稜柱構造、葉状構造、均質構造、交差板構造などに分類される。結晶多形と微細構造の組み合わせによって種々の異なる外観の殻体が形成される。

この軟体動物殻体の結晶多形と微細構造は、タンパク質を主成分とする有機基質が制御していると考えられており、軟体動物石灰化機構の解明のために殻体有機基質成分についての解析が盛んに行われている。

2. 軟体動物の殻体形成成分の *in vitro*, *in vivo* での解析

軟体動物の殻体形成機構に関する研究は、SEM、TEM 等による殻体の微細構造の観察やアミノ酸組成分析を中心とした有機基質タンパク質の解析から開始された。その後、アコヤガイ真珠層の主要な有機基質成分である Nacrein をコードする遺伝子が同定されて以降 (Miyamoto *et al.*, 1996)、新規殻体形成遺伝子の同定を中心として、分子レベルで発展してきた。分子レベルでの分析は、タンパク質の N 末端配列分析や LC/MS 解析などから得られたアミノ酸配列情報と、cDNA クローニングとを組み合わせる手法を中心に進められて来ている。これらの研究の結果、アコヤガイについては、その真珠層や稜柱層中の主な有機基質成分およびそれらをコードする遺伝子の構造が明

らかにされている。ただし、これまでの分析対象はアコヤガイに集中しており、アコヤガイ以外の種や真珠層と稜柱層以外の殻層に含まれる、分析がより困難な成分の解析が残されている。また、新たに、サブトラクション法や EST 解析などの網羅的な cDNA 解析が行われ始めている。

一方、同定された有機基質タンパク質の機能解析に関しては、人工的な炭酸カルシウム結晶形成母液に殻体から抽出したタンパク質を添加し、それらの成分の結晶形成への関与を結晶形態や結晶形の検索から推定するという、*in vitro* 結晶形成実験が進められている (図 1)。しかし、この系では、生体内で起きている現象をそのまま再現するには至っておらず、その結果、有機基質タンパク質の機能に関する情報はきわめて限定されたものにとどまっているのが現状である。

これに対して、軟体動物の生体に遺伝子操作を加えて生体内での有機基質タンパク質の発現を人為的に促進あるいは抑制することにより、その殻体形成過程での働きを推定する *in vivo* での実験系が開発されている。これらの実験系は、種々のモデル動物などですでに盛んに行われている遺伝子導入法を用いた過剰発現実験や、RNAi 法を用いた発現抑制実験などである。このうち RNAi 法は、実験結果が殻体の形態に直接反映されるため、殻体形成過程の解析にとくに有効であると思われる (図 2)。

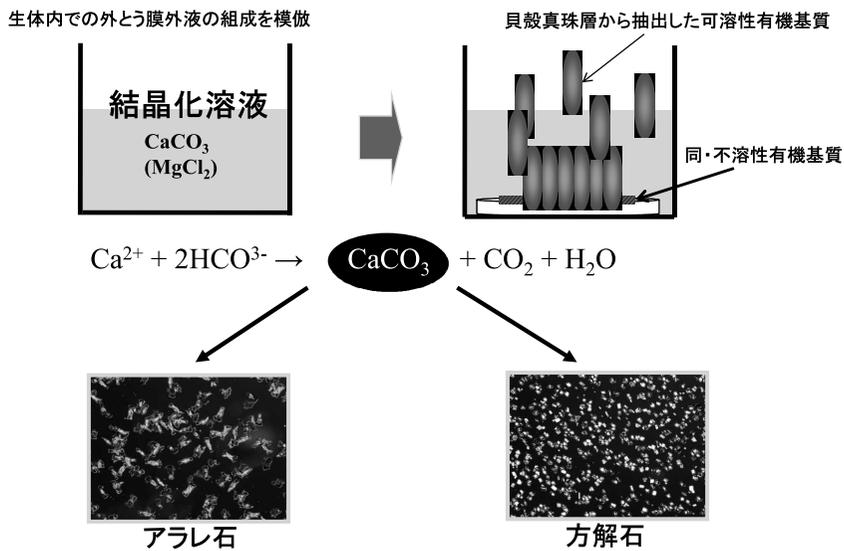


図 1 : 殻体形成タンパク質の機能解析 1 *in vitro* 結晶形成実験

3. RNAi の原理

RNAi は、二本鎖 RNA によって引き起こされる転写後遺伝子サイレンシング機構で、それを応用した発現抑制実験が近年盛んに行われている。この実験は、導入遺伝子の種類、一本鎖 RNA および二本鎖 RNA などの様々な因子により発現抑制効果に違いが認められる。Fire ほか (1998) が二本鎖 RNA が最も効果的に発現抑制したことを示して以来、現在では、主に二本鎖 RNA による RNAi 干渉実験系が普及している。

発現抑制は、転写後、核外に出た mRNA を標的と

して二本鎖 RNA が作用することにより引き起こされる。まず、生体中に存在するダイサー (Dicer) と呼ばれる酵素が二本鎖 RNA を認識・切断して、約20塩基対 (bp) 前後の siRNA を生成する。その後、RISC と呼ばれる RNA を切断するタンパク質複合体と siRNA が結合する (図 3)。RISC と結合後の siRNA はアンチセンス鎖のみになるとされており、このアンチセンス siRNA がガイド役となって、それと相補の配列をもつ mRNA に RISC が結合する。RISC が結合した mRNA は、この結合部位で切断され、その後分



貝殻の形成に関わるタンパク質

- ・MPP
- ・Nacrein
- ・Prismalin-14
- ・Aspein
- ・Shematrin
- ・・・etc

- もしタンパク質が作られなかったら
- 特定のものだけ多かったら

➔ 貝殻はどうなってしまうのだろうか？



RNA干渉を用いた発現阻害
遺伝子導入法による過剰発現

貝殻の形態変化からタンパク質の働きを予想する

図 2 : 殻体形成タンパク質の機能解析 2 *in vivo* 機能解析実験

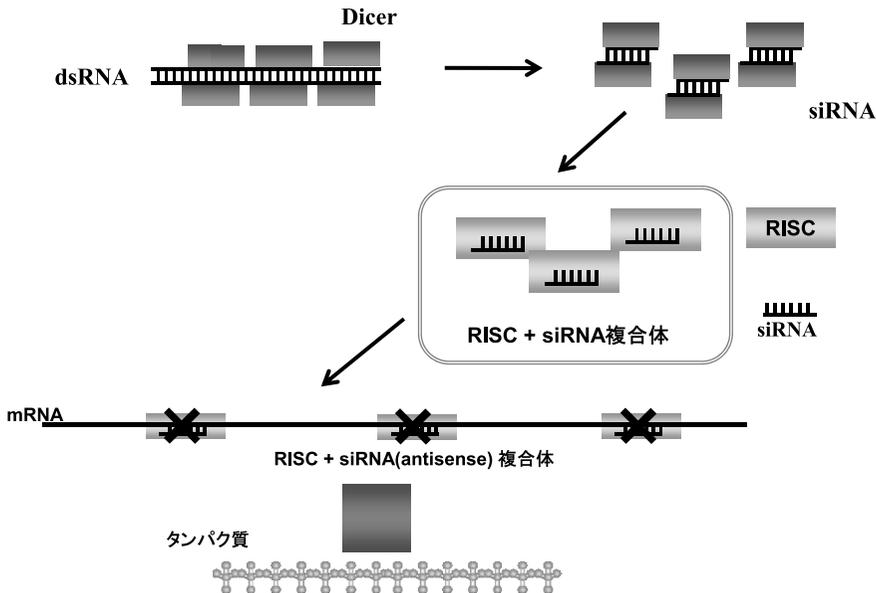


図 3 : RNA 抑制の原理

解される。以上のような機構でタンパク質の発現が阻害される。この過程で、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが新たに dsRNA を生成する。その際に、二本鎖 RNA の mRNA に相同な配列を持つ側（mRNA への結合に関与しない方の鎖）も新たな dsRNA 合成に寄与するため、一本鎖 RNA よりも二本鎖 RNA による発現抑制効果の方が大きいとされている。RNAi を用いた発現抑制実験では、ターゲット mRNA の配列とその相補鎖からなる人工合成二本鎖 RNA を生体に注入することから開始される。注入した二本鎖 RNA は細胞内に取り込まれ、上記の反応が起こる。人工合成する二本鎖 RNA には、長さが約数百 bp の dsRNA、あるいはダイサーに切断された後の二本鎖 RNA を模した 20bp 前後の siRNA のいずれかを選択する（図 4）。長鎖の dsRNA を用いた場合、1 種類の dsRNA から複数の siRNA が生成されるため、そのうちのいずれかがターゲットに作用すると考えられることから、抑制効率の面での利点がある。これに対して、siRNA を用いた RNA 抑制実験は、dsRNA 注入によりインターフェロン応答が起きてしまう哺乳類などの高等生物を対象に開発された手法である。RNAi 分子のサイズの小ささにより、インターフェロン応答を誘起しないことが本来の利点であり、その配列によってはターゲット mRNA に結合しづらいこともあるので、用いる siRNA の塩基配列の選択を慎重に行う必要があることや siRNA を数か所設定する必要があるなどの不利な点も存在する。

4. 二枚貝の殻形成遺伝子の発現抑制実験

近年、Suzuki ほか（2009）により dsRNA を用いた RNAi による殻形成遺伝子の発現抑制実験が行われた。真珠層形成に関与すると推定される Pif 遺伝子をターゲットとした dsRNA を注入したアコヤガイの殻体では、通常真珠層の表面に比べて結晶表面の溶解あるいは異常形成を示す真珠層が形成された。また、RNA 抑制を行ったアコヤガイ殻体の殻体断面をストロンチウム層をマーカーとして観察し、殻層の形成が阻害されていることを確認した。

塩基配列上の相同性が高い遺伝子間では、dsRNA の利点である標的部位の広さが欠点となり、対象外の成分まで発現抑制されることも多い。とくに、軟体動物の殻形成タンパク質では、グリシン、セリン、アラニンなど特定のアミノ酸に偏った組成、特定のアミノ酸からなる繰り返し配列などが多くの成分に共通に存在する特徴があり、そのため、殻形成タンパク質をコードする殻形成遺伝子の塩基配列における部分的な相同性も高くなりがちである。例えば、アコヤガイの稜柱層形成に関与する Prismaticin14 遺伝子はコーディング領域が 363bp と短く、ほぼ全長を用いて dsRNA を設計せざるを得ない。しかし、図 5 に示すように、Prismaticin14 遺伝子の塩基配列には、Aspein 遺伝子と相同性をもつ部分が多く、dsRNA から無作為に作られた siRNA では、Aspein の発現をも抑制してしまう可能性が高い。同様のことが、Prismaticin14 遺伝子と Shematrin 遺伝子の間でも言える。これに対して siRNA は、そのサイズが小さいために、

人工二本鎖 RNA を導入する

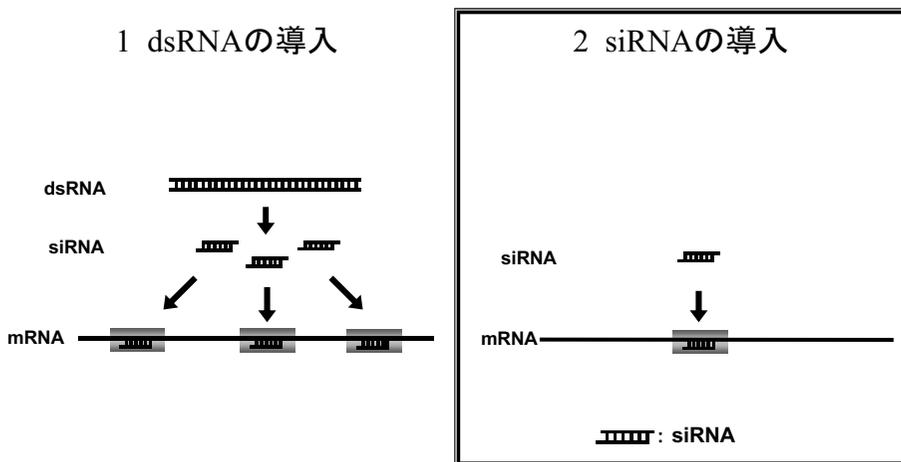


図 4 : RNAi を用いた発現抑制実験

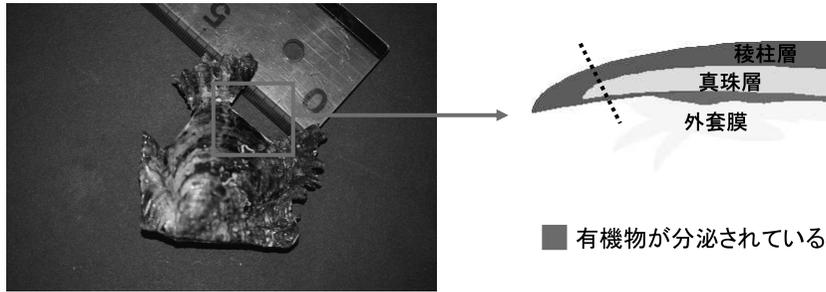


図6：実験方法 殻体の切断方法

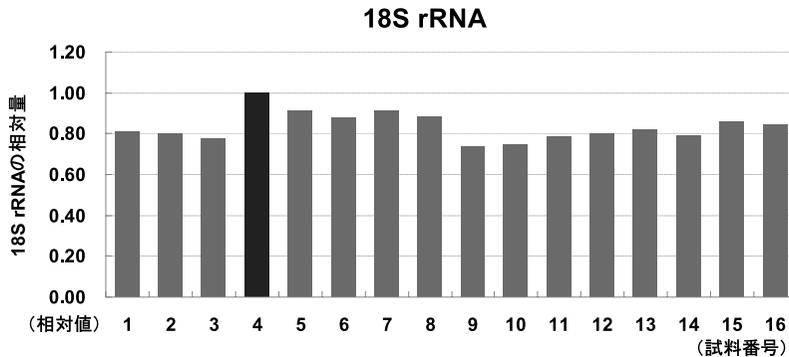


図7：リアルタイムPCRにおける内在性コントロール

アミノ酸と、グリシンからなる繰り返し配列をもつ7種類のタンパク質からなるファミリー成分である (Yano *et al.*, 2006). 本研究では、そのうちで最も発現量の多い, Shematin-2 を選択した.

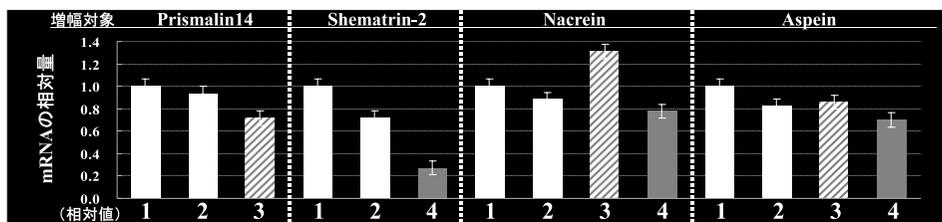
また, siRNA の標的 2 成分以外の殻体形成成分への影響を確認するために, 稜柱層形成に関与するとされる Nacrein 遺伝子と Aspein 遺伝子を比較対象とした. Nacrein はアコヤガイ真珠層から同定された可溶性タンパク質で, 後に稜柱層中にも存在することが明らかとなっている (Miyamoto *et al.*, 1996). Carbonic anhydrase (CA) II の活性部位モチーフと, NG 繰り返しドメインからなり, CA ドメインで CO_3^{2-} を濃集すると同時に, NG 繰り返しドメインが結晶表面に吸着することにより結晶成長を制御するとされている. また, 近年, シアル酸を持つ N 型糖鎖の存在が明らかとなっており, この部分でのカルシウムイオンの濃集が推測されている (Takakura *et al.*, 2008). Aspein は, アコヤガイ稜柱層から同定された Asp が分子全体の60%以上を占める強酸性タンパク質であり, Asp のカルボキシル基が Ca^{2+} を引き寄せると推定されている (Tsukamoto *et al.*, 2004).

siRNA のコントロールとしては, オワンクラゲの GFP をターゲットとして設計した siRNA を用いた.

アコヤガイからは GFP のホモログは報告されていないため, 配列に依存せず, 異物として影響を与えるのか否かを確認するために用いた. また, リアルタイム PCR の際の個体間の誤差の影響を減らすため, 発現量の増減が少ないとされる 18S rRNA の量で各サンプル間の補正を行った. 図7は, 18S rRNA 量をリアルタイム PCR で確認し, 16 個体間の相対比で示したもので, 縦軸は最も遺伝子量の多い 4 番目のサンプルを 1 とした時の相対値である. すべてのサンプルにおいて 4 番目のサンプルの 18S rRNA 量の 70% 以上の範囲に収まっており, 18S rRNA は個体間の誤差の補正に使用するのに妥当であるということを示している.

6. siRNA を用いたアコヤガイの殻体形成遺伝子の RNA 抑制実験結果

コントロールとして, 1) 溶媒である蒸留水を注入した個体群と, 2) GFP 遺伝子を対象とした siRNA を注入した個体群を用い, 実験試料として siRNA-Prismalin14, siRNA-Shematin-2 をそれぞれ注入した個体群, 各 8 個体ずつを使用し, それぞれの発現 mRNA 量を計測した. まず, これらの外套膜から抽出した RNA とターゲットである Prismalin14, Shematin-2, 標的成分以外の発現抑制を確認するた



再生殻体への影響

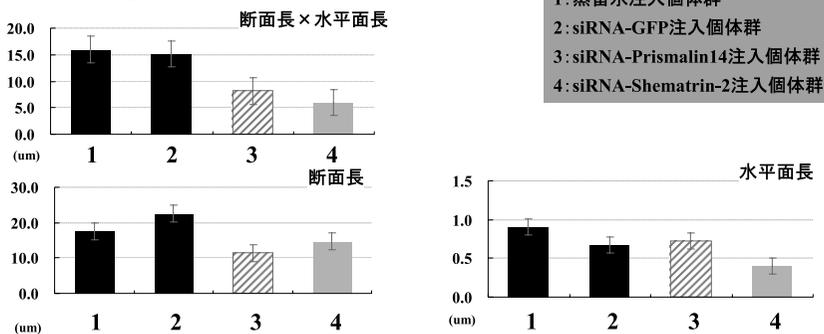


図8：siRNA注入による遺伝子発現の抑制効果

めのNacreinとAspein、補正のための18sRNAの配列をもとに設計したプライマーセットを用いてリアルタイムPCRを行った。

リアルタイムPCRによる各遺伝子の発現量を図8上段に示す。このグラフは、全て18s rRNAの値で補正後の各個体群の平均値を、蒸留水注入個体群の値を1とした場合の相対値で示している。第一に、蒸留水注入個体群と比較してsiRNA-GFP注入個体群では発現量にほとんど変化が認められないのに対して、Prismalin14のmRNA量は、蒸留水注入個体群と比較して標準誤差を超えて、顕著な減少を示した。また、Shematrin-2のmRNA量にも顕著な減少が認められた。これに対して、siRNA-Prismalin14、siRNA-Shematrin-2注入個体でのNacreinとAspeinのmRNA量には、標的成分のmRNAで認められたような大きな減少は確認されなかった。この結果は、siRNA-Prismalin14とsiRNA-Shematrin-2が、それぞれ特異的に各々のターゲットを抑制している可能性が高いことを示している。

再生殻体への影響は、図8下段に示す。断面長については、siRNA-Prismalin14と、siRNA-Shematrin-2注入個体群について、コントロール群である蒸留水、あるいは、siRNA-GFP注入個体群よりも有意に薄くなっていることが観察された。siRNA-Prismalin14注入個体群での水平面長はsiRNA-GFP注入個体群より大きく、抑制作用が認められなかったが、断面長につ

いては有意の減少が認められた。これに対して、siRNA-Shematrin-2注入個体群では、水平面長には有意の減少が認められたが断面長については有意の減少が認められなかった。このため、断面長と水平面長をかけた数値について比較検討したところ、2種類の殻体形成成分の抑制個体群で、コントロール群に比べてこの数値が明らかに低下していた。

7. 考察とまとめ

mRNAの発現量の減少が確認されたことと再生殻形成不全が認められたことは、アコヤガイ殻体形成遺伝子についてsiRNAによるRNA抑制効果が認められたことを示している。従来より、Prismalin14およびShematrin-2は共に、稜柱層形成への関与が示唆されていたが、本研究から、それを裏付ける結果を得ることができた。

本研究では、siRNAの効果が明瞭に確認された試料群の結果のみを示したが、siRNAの配列によっては、試料中の標的成分以外のmRNA量も低下したもののや標的mRNA量に低下が認められないものも含まれていた。このように十分に機能しないsiRNAがある一方で、その効果が明瞭に確認されるsiRNAも存在したことは、siRNAの配列による抑制効果の違いが存在することを示している。長鎖のdsRNAでは、siRNAをこのように何種類も個別に作成することが不可能なため、siRNAは殻体形成成分の解析法とし

て非常に有用であると思われる。

以上より、軟体動物殻体形成遺伝子の発現抑制実験への siRNA の適用は、その特異性の点から dsRNA の使用が適さないものに対して非常に有用であり、本研究は、軟体動物殻体形成機構解明への一つの新しい手段を示したものと考えられる。今後は、さらに、試料生体の個体差や飼育環境の影響などの考察も検討課題として考慮する必要がある。

引用文献

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- 日高裕輔 (2009) 殻体再生実験によるアコヤガイの石灰化過程の解明。麻布大学卒業論文。1-20. (*Pinctada fucata*)
- Li, C., Hu, Y., Liang, J., Kong, Y., Huang, J., Feng, Q., Li, S., Zhang, G., Xie, L. and Zhang, R. (2009) Calciceurin plays an important role in the shell formation of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Mar. Biotech.* **12**, 100-110.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T. and Matsushiro, A. (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **93**, 9657-9660.
- Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T. and Nagasawa, H. (2009) An acidic matrix protein Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* **325**, 1388-1390.
- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T. and Nagasawa, H. (2004) Characterization of Prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical J.* **382**, 205-213.
- Takakura, D., Norizuki, M., Ishikawa, F. and Samata, T. (2008) Isolation and Characterization of the N-linked Oligosaccharides in Nacrein from *Pinctada fucata*. *Mar. Biotech.* **10**, 290-296.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I. and Endo, K. (2004) Structure and expression of unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1175-1180.
- Wada, K. (1970) Initiation of mineralization in bivalve mollusks. In: Omori, M. and Watabe, N. (eds) *The mechanism of Mineralization in Animals and Plants. Proceedings of the third International Biomineralization Symposium*, pp.79-92, Tokai Univ Press, Tokyo.
- Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K. and Miyamoto, H. (2006) Shematrin, a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comp. Bioch. Physiol. B*, **144**, 254-262.