

無脊椎動物の硬組織中のタンパク質とその進化

更科 功*

Structures and evolution of skeletal matrix proteins of invertebrates

SARASHINA, Isao

Abstract

Biominerals are a composite material of inorganic crystals and organic matrices. The organic matrices including proteins are known to play important roles in controlling over biominerization. The complete primary structures have been determined for about 80 skeletal matrix proteins in five animal phyla of invertebrates, and presence of repeated sequences and prevalence of acidic nature have been recognized as common features among those proteins. From the morphological viewpoint, skeletons of many metazoan phyla appear to have evolved independently. These independent origins of skeletons are supported by the information on C-type lectin-like domains recognized in molluscs and deuterostomes and the Rebers-Riddiford consensus sequence found in arthropods as well as the primary structures of skeletal matrix proteins. Those similarities such as the repeated sequences and the acidic nature, therefore, are interpreted as convergence. Dermatopontin, a molluscan shell matrix protein, is inferred to represent a cooption for biominerization after molluscs diverged from other metazoan groups based on the molecular phylogenetic analysis, and this inference is also harmonized with the independent origins of biominerization.

Key words: biominerization, Dermatopontin, invertebrates, matrix proteins, primary structures

1. はじめに

分子生物学的な手法を使用して古生物学の研究を行う分野を分子古生物学と称するが、事実上それは化石中に含まれる生体分子（DNA やタンパク質などの高分子や炭化水素）を扱う分野を意味していた。化石 DNA の研究で最もインパクトが強く、追試も行われていて信頼できるものは、ネアンデルタール人の DNA の研究であろう (Krings *et al.*, 1997; Green *et al.*, 2006; Noonan *et al.*, 2006)。これは数万年前と化石としては比較的新しい時代のサンプルを研究対象とし、ピロシークエンス法など特殊な技術を使用しているが、塩基の種類によって組成の程度が異なるなど、化石 DNA の確実な解析の難しさを感じさせる。百万年以前の古い時代の化石高分子の研究で、追試に耐えうる確かな成果は現在のところ皆無ではないだろう

か。

一方、現生生物において硬組織の形成機構を分子レベルで解明し、それを化石の解釈に応用して進化を探求していく研究は、分子古生物学の新しい分野である。その影響範囲は、カンブリア紀の爆発における硬組織の獲得についての考察も可能なほど広い。そこで本稿では、現生の無脊椎動物の硬組織にはどんなタンパク質が含まれるかを概観し、それを進化の考察に応用した研究例を紹介する。

2. 無脊椎動物の硬組織中のタンパク質の構造

硬組織中のタンパク質の全アミノ酸配列が決定されている無脊椎動物は、海綿動物、刺胞動物、節足動物、軟体動物、棘皮動物で、タンパク質としては約80に及ぶ (Sarashina and Endo, 2006)。脊椎動物に比べ

2007年2月28日受付、2007年6月11日受理

*〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学大学院 生命環境科学研究所

Department of Earth Evolution Sciences, Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan. E-mail: sarashina@geol.tsukuba.ac.jp

れば遅れているとは言え、かなりのデータが蓄積されつつある。

海綿動物は最も原始的と考えられている多細胞動物であるが、その硬組織で最初に全アミノ酸配列が決定されたタンパク質はシリカテインである (Shimizu *et al.*, 1998)。これはシリカの重合を触媒する酵素として働いているらしい。また、コラーゲンも同定されており、骨針形成に関与していると考えられている。

刺胞動物はサンゴ礁という非常に巨大な生体鉱物を作る重要な分類群であるが、全アミノ酸配列が決定されている硬組織中のタンパク質はガラクシンだけである (Fukuda *et al.*, 2003)。サンゴの外骨格から同定されたガラクシンは、強固なジスルフィド結合を作るアミノ酸であるシステインを4残基を含む。ガラクシン同士がシステインを介して結合し、高分子のネットワークを作ることが予想されている。

刺胞動物や軟体動物では、硬組織に含まれる有機質のアミノ酸組成の分析から、酸性（つまり生理的な条件下で負に荷電する）アミノ酸が多いことが知られていた。そのため、酸性アミノ酸を多く含む酸性タンパク質が負に荷電して、正に荷電したカルシウムイオンと相互作用することが、硬組織の形成に重要だと予想されていた。軟体動物では、硬組織中のタンパク質が約20種類同定され、その中にはMSP-1、アスペイン、アスピリッチの3種類の強酸性タンパク質が含まれる (Sarashina and Endo, 2001; Tsukamoto *et al.*, 2004; Gotliv *et al.*, 2005)。特にアスペインは、今日までに知られている全てのタンパク質の中で最も強酸性である。酸性のアミノ酸にはアスパラギン酸とグルタミン酸の2種類があるが、これら3つのタンパク質はアスパラギン酸の方を圧倒的に多く使っている。その理由はまだ分からない。

全アミノ酸配列が決定された無脊椎動物の硬組織中のタンパク質の内、ほぼ半数は節足動物の甲殻類のものである。甲殻類の強酸性タンパク質は、アスパラギン酸の方が多くのタンパク質もあるがグルタミン酸の方が多くのタンパク質もあり、全体的に見て特にどちらかに偏っている傾向はない。これは、アスパラギン酸のみをほぼ独占的に含む軟体動物の強酸性タンパク質とは対照的である。また、甲殻類の硬組織中の9種類のタンパク質は、キチンと結合するリーバーズ・リディフォード配列を持つ。この配列は節足動物の上皮に特有であることから、この9種類のタンパク質は、他の動物門と分かれた後に節足動物の中で固有に進化したクチクラタンパク質が、新たに硬組織の形成に使い回されたものと推測される。

棘皮動物のウニの骨片から同定されたSM50は、最初に全アミノ酸配列が明らかになった無脊椎動物の硬

組織中のタンパク質である (Sucov *et al.*, 1987)。このタンパク質の最も顕著な特徴はC型レクチンに似た配列 (C-Type lectin-like domain: CTLDと略す) を持つことである。C型レクチンは糖に結合するタンパク質として知られているが、SM50のCTLDには糖結合能はないと考えられており、その機能は現在のところ不明である。しかし、棘皮動物の硬組織から同定された10種類のタンパク質全てがCTLDを持っていて、何らかの重要な機能を担っていることが予想される。一方、軟体動物でもCTLDを持つ硬組織中のタンパク質、パールシンが報告されているが、これは糖結合能を持ちCTLDの中の別のファミリーに属するので、棘皮動物とは独立に硬組織の形成に使われるようになったと考えられる。

無脊椎動物の硬組織中のタンパク質には、分類群をこえて共通の特徴がある。主な特徴は、強酸性タンパク質があることと、繰り返し配列が多いことである。前者はカルシウムイオンとの相互作用が硬組織の形成に重要なためであると考えられ、後者は硬組織を作る結晶の規則的な繰り返し構造を反映している可能性がある。多細胞動物の硬組織はほぼ動物門ごとに独立に獲得されたと考えられており、上述したリーバーズ・リディフォード配列やCTLDの知見も、その考え方を支持するように見える。したがって、無脊椎動物の硬組織中のタンパク質に共通の特徴があるのは、進化における収斂現象と考えられる。

3. 軟体動物の殻内タンパク質・ダーマトポンティン (Dermatopontin) の起源と進化

軟体動物の殻内タンパク質の中には、相同的なタンパク質が軟体動物以外の動物門にも見出されるものがある。そのようなタンパク質は、軟体動物と他の動物門との共通祖先がすでに持っていたことを意味する。軟体動物が他の動物門から分岐したのはカンブリア紀よりも前と考えられているので、カンブリア紀に生きていた軟体動物はそのタンパク質を持っていたはずである。カンブリア紀の爆発（あるいはその少し前）の時期に軟体動物は硬組織形成システムを獲得したと考えられるので、そのタンパク質は軟体動物の硬組織形成システム獲得に関与したタンパク質の候補となる。ダーマトポンティン (Dermatopontin) はそのようなタンパク質の一つである。

ダーマトポンティンはヒラマキガイ（有肺亜綱基眼目）の主要殻内タンパク質である (Marxen *et al.*, 2003)。多細胞動物に広く分布する細胞外基質タンパク質で、細胞接着や細胞外基質の凝集に関与する。ダーマトポンティンの殻内タンパク質としての起源を考察するため、軟体動物腹足綱有肺亜綱の基眼目（モ

ノアラガイ等)と柄眼目(ヒタチマイマイ等)計8種の外套膜(殻形成に関わる器官)からダーマトポンティン遺伝子を同定した。その結果、有肺類には少なくとも2種類のダーマトポンティン遺伝子(タイプ1とタイプ2)が存在することが明らかになった。RT-PCR及び定量PCRによって外套膜を含む各組織での発現を調べた結果、タイプ1のみが殻内タンパク質であることが示唆された(図1、図2)。

ダーマトポンティン分子の類縁関係を調べるために、ベイズ法及び最尤法により系統解析を行った(図3)。その結果、基眼目と柄眼目が各々大きなクレードとしてまとまり、さらにその中でタイプ1とタイプ2が小さなクレードとしてまとまる。この結果は、基眼目と柄眼目の最終共通祖先はダーマトポンティンを1種類だけ持つておらず、基眼目と柄眼目が分岐(これは化石記録により、中生代以降と思われる)した後に各系統で独立に遺伝子重複が起きたことを示唆する。基眼目と柄眼目の最終共通祖先が持っていたダーマトポンティンは、外群比較およびア・ブリオリな生

理学的的前提(一般的な機能を持ち、多くの組織で発現しているハウスキーピング的なタンパク質が失われるることは考えにくいこと)から、殻内タンパク質ではなく、他の分類群で一般的に見られるような細胞外基質タンパク質であった可能性が高い。従って、遺伝子重複で生じた2つのタイプのダーマトポンティンのうちの片方が、硬組織形成システムに関与するようになつたと解釈される(図4)。すなわちダーマトポンティンが殻内タンパク質として使われるようになったのは、従来の予想(カンブリア紀)とは異なり、基眼目と柄眼目の系統が分岐した後、つまりおそらく中生代以降であること、さらにこのような使い回しが少なくとも2回独立に起きたことが示唆された(Sarashina et al., 2006)。

以上より、カンブリア紀の軟体動物は基質タンパク質ダーマトポンティンを持ってはいたが、当時は硬組織の形成に関与する機能はなかったと思われる。おそらくダーマトポンティンは有肺類の系統で独自に硬組織の形成に関与するようになったのであろう。

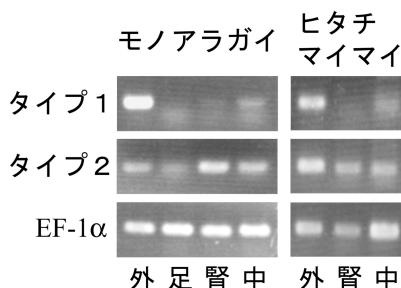


図1 RT-PCRによるダーマトポンティンmRNAの発現量。モノアラガイ(基眼目)でもヒタチマイマイ(柄眼目)でも、タイプ1が殻形成に関わる外套膜のみで強く発現している。EF-1 α はポジティブコントロール。外：外套膜、腎：腎臓、中：中腸腺。

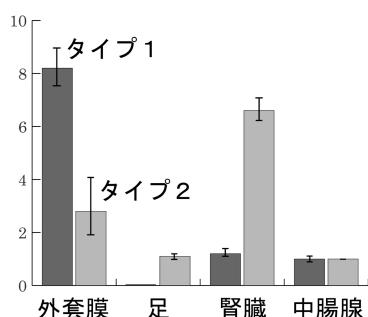


図2 定量PCRによるモノアラガイのダーマトポンティンmRNAの発現量。縦軸は腎臓における発現量を1とした場合の相対的発現量。エラーバーは標準偏差差。

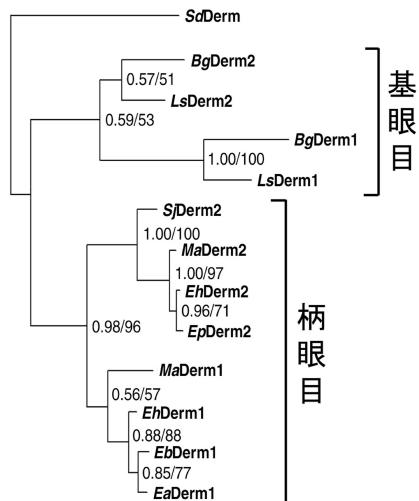


図3 基眼目と柄眼目のダーマトポンティン分子のベイズ法による系統解析。数字は左側がベイズ法(MrBayes)による事後確率、右側が最尤法(ProtML)による尤度。
Bg:ヒラマキガイ, Ls:ヨーロッパモノアラガイ, Sj:ニッポンマイマイ, Ma:コガネカタマイマイ, Eh:タカチホマイマイ, Ep:ミスジマイマイ, Eb:ヒタチマイマイ, Ea:クチベニマイマイ, Sd(*Suberites domuncula*)は海綿動物で、外群とした。Derm(ダーマトポンティン)の右の数字はタイプを示す。

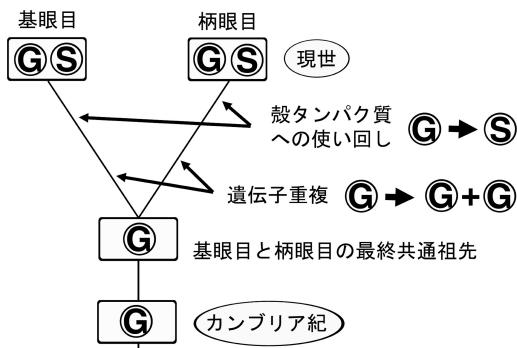


図4 ダーマトポンティンの分子進化のシナリオ。基眼目と柄眼目が分岐した後に各系統で独立に遺伝子重複が起き、そのうちの一つが殻形成に関与するようになった。G:一般的な細胞外基質タンパク質のダーマトポンティン、S:殻形成に関与するダーマトポンティン。

謝辞

筑波大学の遠藤一佳博士から、本稿に関する貴重なご意見を頂いた。厚くお礼申しあげる。

引用文献

- Fukuda, I., Ooki, S., Fujita, T., Murayama, E., Nagasawa, H., Isa, Y. and Watanabe, T. (2003) Molecular cloning of a cDNA encoding a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 11-17.
- Gotliv, B.-A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L. and Weiner, S. (2005) Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *Chem. Bio. Chem.* **6**, 304-314.
- Green, R. E., Krause, J., Ptak, S. E., Briggs, A. W., Ronan, M. T., Simons, J. F., Du, L., Egholm, M., Rothberg, J. M., Paunovic, M. and Paabo, S. (2006) Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* **444**, 330-6.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M. and Paabo, S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* **90**, 1-3.
- Marxen, J. C., Nimtz, M., Becker, W. and Mann, K. (2003) The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochem. Biophys. Acta* **1650**, 92-98.
- Noonan, J. P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., Alessi, J., Chen, F., Platt, D., Paabo, S., Pritchard, J. K. and Rubin, E. M. (2006) Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* **314**, 1113-1118.
- Sarashina, I. and Endo, K. (2001) The complete primary structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Biotech.* **3**, 362-369.
- Sarashina, I. and Endo, K. (2006) Skeletal matrix proteins of invertebrate animals: Comparative analysis of their amino acid sequences. *Paleo. Res.* **10**, 311-336.
- Sarashina, I., Yamaguchi, H., Haga, T., Iijima, M., Chiba, S. and Endo, K. (2006) Molecular evolution and functionally important structures of molluscan Dermatopontin: Implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. *J. Mol. Evol.* **62**, 307-318.
- Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G. D. and Morse, D. E. (1998) Silicatein α : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6234-6238.
- Sucov, H. M., Benson, S., Robinson, J. J., Britten, R. J., Wilt, F. and Davidson, E. H. (1987) A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. II. Structure of the gene and derived sequence of the protein. *Dev. Biol.* **120**, 507-519.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I. and Endo, K. (2004) Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1175-1180.