

[原著]

## アコヤガイ真珠層と稜柱層の形成に關与する 新規タンパク質の一次構造

野川ちひろ\*・小原万美\*\*・小澤めぐみ\*\*・佐俣哲郎\*\*\*

Primary structure of a novel protein involved in formation of the  
nacreous and prismatic layers of *Pinctada fucata*

NOGAWA, Chihiro\*, OBARA, Mami\*\*, OZAWA, Megumi\*\* and SAMATA, Tetsuro\*\*\*

### Abstract

Molluscan shell comprises two types of crystals, aragonite or calcite, which are arranged to form various shell microstructures. Shell of *Pinctada fucata* is divided into two microstructures, an aragonitic nacreous layer and a calcitic prismatic layer. It is widely believed that organic matrix (OM) is involved in regulation and control of both the crystal polymorphism and shell microstructure (Watabe and Wilbur, 1960; Lowenstam, 1981; Weiner, 1984). Analyses of genes encoding OM-proteins have been carried out those in nacreous layer of pearl oyster because of its industrial value, and as a result, Nacrein, N 16, MSI60 have been identified. Meanwhile, in recent years, MSI31 and Plismalin 14 have been identified in prismatic layer. The mechanism of molluscan shell formation is still unclear, even in case of *P. fucata*. Particularly, the mechanism about the crystallization of aragonite or calcite in the alternative is left unsolved.

Based on preliminary biochemical analyses of OM proteins in both the nacreous and prismatic layers in the *P. fucata* shell, Samata (unpublished data) identified and characterized the N-terminal amino acid sequences of several components unknown to date. Present study is conducted in order to identify primary structure of one of these components with approximate size of 35 kDa by cDNA cloning.

Consequently, approximately 2 kb nucleotide fragment estimated as a part of an open reading frame (ORF), was amplified and sequenced. Amino acid composition of the novel protein was rich in glycine and alanine and scarce in acidic amino acids. These features have not been reported in other OMs in molluscan shells.

Further analyses of gene expression and protein function will open a new insight into shell formation mechanism of pearl oyster.

キーワード：アコヤガイ，殻体形成，殻体微細構造，結晶多形，グリシンリッチ

---

2007年2月28日受付，2007年6月11日受理

\* 麻布大学大学院環境保健学研究科細胞生物学研究室

Laboratory of Cell Biology, Graduate School of Environmental Health, Azabu University

\*\* 麻布大学環境保健学部細胞生物学研究室

Laboratory of Cell Biology, Environmental Health Sciences, Azabu University

\*\*\* 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71 麻布大学大学院環境保健学研究科細胞生物学研究室

To whom correspondence should be addressed. Laboratory of Cell Biology, Faculty of Environmental Health, Azabu university, Sagamihara 229-0006, Japan; Tel: 04277692560, Fax: 04277692560. E-mail: samata@azabu-u.ac.jp.

## 1. 序言

軟体動物の殻体は、主に炭酸カルシウム結晶と、タンパク質や脂質、糖などから成る有機基質で形成されている。殻体中の炭酸カルシウム結晶にはアラレ石、方解石の2種類の結晶多形があり、それらが様々な微細構造をとることにより、種や層によって多様な形状の殻体が作られる。この結晶多形や、微細構造の決定・制御に有機基質が関与していると考えられている (Watabe and Wilbur. 1960; Lowenstam, H.A. 1981; Weiner. 1984)。これまで、殻体形成有機基質の解析は、産業価値のあるアコヤガイ真珠層中の成分を中心に行なわれており、これまでに Nacrein (Miyamoto, H. 1996), N16 (Samata, T. 1999), MSI60 (Sudo, S. 1997) などの有機基質タンパク質が同定されている。一方、近年、方解石からなるアコヤガイ稜柱層中の成分についても研究が進み、MSI31 (Sudo, S. 1997) や Prismaticin14 (Suzuki, M. 2004) などの有機基質タンパク質が発見されてきている。しかし、それらの多くは可溶性成分であり、不溶性成分としては真珠層から発見された MSI60 と稜柱層から発見された MSI35 のみである。不溶性成分は殻体中からの単離、解析が困難ということもあり、依然として未知の成分の存在が示唆される。また、近年新たに報告された成分には、殻体からの抽出中に一致する成分が確認されていないものも多い。一方、殻体中から単離されており、既知成分との一致が見られず、構造解析のされていない成分 (佐藤, 未発表) も多数存在する。

このように、最も研究の進んでいるアコヤガイ殻体中の成分についてさえも、さらなる研究をする余地が依然として残されている。とくに、多くの微細構造特異的あるいは異なる構造間での共通成分の構造解析を進める必要がある。本論文は、すでに多数の成分の存在が明らかにされているアコヤガイ殻体中からの新規不溶性成分の解析の報告である。

## 2. 試料および実験方法

### 試料

三重県志摩市賢島・若狭大月真珠(株)より送付された、日本産アコヤガイ、*Pinctada Fucata martenshii* 生体試料の外套膜外側を切り出し、すぐに液体窒素で凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### Total RNA 抽出

200mgのアコヤガイ外套膜外縁部の組織から、ISOGEN (NIPPONGENE, Tokyo, Japan) を用いて Total RNA 抽出を行った。RNA 収量は、分光光度計 (GeneQuant, Pharmacia Biotech., Stockholm, Sweden) を用いて測定し、RNA100ug を、Promega SV RNA

Isolation System で精製した。

### RT

精製済み Total RNA 4.5 ug を SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて逆転写した。逆転写用のプライマーとして、(dT)<sub>17</sub> にアダプター配列 (AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGG GTAC) を付加したアダプタープライマーを用いた。

### 3' RACE

フォワードプライマーには、アコヤガイ稜柱層35 kDa 成分の N 末端アミノ酸配列を基に作成した Degenerate primer (TTYGAYACNAAYAAAYCCNGG) を用い、リバースプライマーには、逆転写の際に付加したアダプター配列 (AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGG GTA C) を用いた。PCR 反応は、 $98^{\circ}\text{C}$  2 分、その後35サイクルの  $98^{\circ}\text{C}$  15 秒、 $51^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $74^{\circ}\text{C}$  3 分で、サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, California, USA) を用いて行った。

### TA クローニング

Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) でゲル抽出を行い、その後 Taq-polymerase1unit を用いて平滑末端への A-tailing を行った。その後、p-GEM T easy vector System (Invitrogen) を用いて Ligation 反応を  $4^{\circ}\text{C}$  で16時間行い、その後 JM109high-efficiency competent cells (Promega, Wisconsin, USA) に形質転換した。アンピシリンセレクションと青/白カラースクリーニングによって選別したポジティブクローンをシーケンス解析に用いた。

### DNA シークエンス解析

アンピシリンセレクションとカラースクリーニングにより選別されたポジティブクローンについて、さらに M13forward, reverse プライマーを用いた PCR によりインサートチェックを行い、インサートが確認されたクローンについて、アルカリブレップ法でプラス

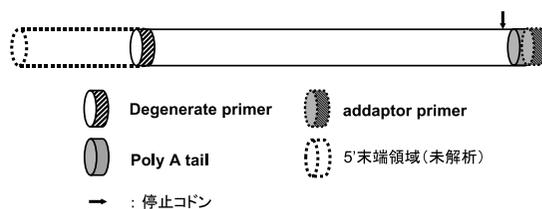


図1 Primer 設計

ミド精製を行った。Thermo Sequence Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Tokyo, Japan) で蛍光標識し, DNA auto Sequencer DSQ-1000L (SIMADZU, Kyoto, Japan) で DNA シークエンス解析を行った。

### 3. 結果

#### 3' RACE 法

3' RACE の結果, 約900bp, 1500bp, 2000bp の 3 種類のヌクレオチド断片が増幅された。また, 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR の結果, 約500b と配列1000bp の 2 種類のヌクレオチド断片が増幅された。

#### シーケンス解析

1500bp ヌクレオチド断片の配列解析からは, 1532 bp の新規の塩基配列が決定された。この配列には, 停止コドン, ポリ A シグナル, ポリ A の存在が確認されたため, このヌクレオチド断片が, 新規のタンパク質をコードするものであることが推定された。

一方, 900bp ヌクレオチド断片の配列解析から, この断片が, 既知成分である shematin2 (Yano *et al.*, 2006) をコードするものであることが明らかになった。

#### 推定一次構造

1500bp ヌクレオチド断片がコードするタンパク質成分の推定アミノ酸配列の特徴の第一は, 分子全体にわたって, グリシン, アラニンおよび不溶性アミノ酸に富む点であった。この特徴は, 既知の不溶性有機基質であり, 真珠層と稜柱層から発見された MSI60お

よび MSI31に共通に認められるものである。一方, これらの成分と比較して, 酸性と塩基性のアミノ酸, すなわち親水性のアミノ酸含有量が極端に低い点がこの成分の第二の特徴であった。さらに, この成分は, グリシン, アラニン, ロイシンのみから成る配列, プロリン, メチオニン, グリシンをランダムに繰り返す部分, プロリン, グリシン, セリン, フェニルアラニンからなる特徴的な繰り返し配列を有していた。

#### Homology 検索

BLAST により NCBI データベース内で, 1532bp のヌクレオチド断片のホモロジー検索を行った結果, フィルター (Low-complexity) を使用した場合は, この成分と高いホモロジーを有する成分は検索されなかった。Filter を用いない検索の結果, このヌクレオチド断片によりコードされる成分と高いホモロジーを有する成分は検索されなかったが, 一定のホモロジーを有する成分として以下のものが検索された。

すなわち, まず, collagen-like protein の一種である pericardine [*Drosophila melanogaster*]: Length = 1729 とは, ほぼ全長にわたって 27-29% の相同性を示したが, 配列上の類似性ではなく, 構成アミノ酸に共通するものが多い点での類似性を示した。第二に, 不溶性の構造タンパク質である keratin やクモの糸のタンパク質ともこの成分の配列の一部が 30% 以上の高いホモロジーを示した。さらに, 炭酸カルシウムから成るウニの棘の構成成分である HSM41, SM50 との間でも, プロリン, グリシン, メチオニンのみからなる配列の存在や繰り返し配列の間にグルタミンが点在する点での類似性が示された。

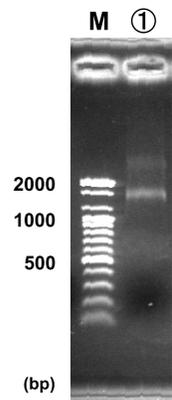


図2 Total RNA 電気泳動像

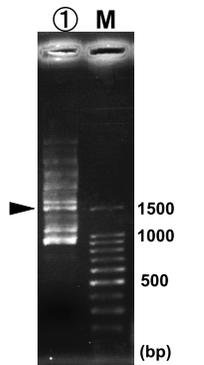


図3 PCR 産物電気泳動像

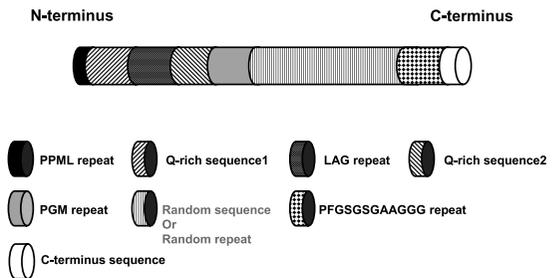


図4 推定アミノ酸配列模式図

#### 4. 考察

今回決定した1532bpのヌクレオチド断片の塩基配列は、開始コドンを含む部分の塩基配列は得られていないものの、停止コドン、ポリAシグナル、ポリAの存在が確認されたことから、タンパク質をコードするcDNAの一部である可能性が高いと考えられる。また、この塩基配列がコードするタンパク質成分のホモロジー検索の結果、高い一致を示す成分が検索されなかったことから、この成分が新規成分であることが強く示唆された。ホモロジー検索の結果から、この成分と、アコヤガイ不溶性有機基質構成成分であるMSI60、MSI31を始めとしたいくつかの不溶性タンパク質やウニの棘形成タンパク質との相同性が認められたことから、今回得られた成分は、アコヤガイの殻体形成に關与する新規の不溶性成分である可能性が示唆される。

今後の課題として、5'RACE法による5'末端部位の解析、上皮組織中でのこの遺伝子の特異的発現と殻体中でのこのタンパク質の存在の確認、発現タンパク質を用いた結晶形成実験等が残されている。この新規成分の全構造を明らかにすることにより、軟体動物の殻体形成における不溶性有機基質の役割の解明が進展することが期待される。

#### 引用文献

- Brandhorst, B. P. and Davenport, R. (2001) Skeletogenesis in sea urchin interordinal hybrid embryos. *Cell Tissue Res.* **305**, 159-167.
- Katoh-Fukui, Y., Noce, T., Ueda, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, N., Higashinakagawa, T., Killian, C. E., Livingston, B. T., Wilt, F. H. and Benson, S. C. (1991) The corrected structure of the SM 50 spicule matrix protein of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **145**, 201-202.
- Lowenstam, H. A. (1981) Minerals formed by organisms. *Science* **211**, 1126-1131.
- 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. U.S.A.* **93**, 9657-9660.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C. and Akera, S. (1999) A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett.* **462**, 225-229.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K. and Takahashi, T. (1997) Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564.
- 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*). *Biochem. J.* **382**, 205-213.
- Weiner, S. (1984) Organization of Organic Matrix Components in Mineralized Tissues. *Integrative and Comparative Biology* **24**, 945-951.
- 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. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **144**, 254-262.