

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

# Studies on molecular mechanism of otolith formation in salmonids (サケ科魚類における耳石形成の分子機構)

氏名 村山 英未

魚類の内耳小囊に存在する耳石は、炭酸カルシウムを主成分とする硬組織であり、骨や歯と同じく生体内で作られるバイオミネラルの一例である。耳石は日々成長することが知られ、その結果として日周輪と呼ばれるリングを形成する。また、骨のように成長と吸収を繰り返す例とは異なり、非常に保存性の高い組織であることから、耳石は水産学の分野において魚類の日齢査定や履歴情報解析などに幅広く用いられてきた。このように有効利用されているにも関わらず、耳石の形成過程に焦点を当てた研究例は数少ない。

耳石には、主成分の炭酸カルシウムの他に微量の有機物が含まれており、これが耳石形成に重要な役割を果たしていると示唆されてきた。しかしながら、これまでに行われてきた耳石における生化学的研究は、アミノ酸組成の解析や可溶性タンパク質の混合物を扱ったものなどが殆どであった。これでは個々のタンパク質がどのような一次構造をしているのか、またどのように耳石形成に関与するのか、という疑問を解くことは難しい。本研究の目的は、耳石に含まれる基質タンパク質を単離し、その構造および機能を明らかにすることによって、最終的には耳石形成の分子機構を解明することである。

そこで、まず第1部、第2部において耳石を構成する二つの主要な基質タンパク質、OMP-1 (otolith matrix protein-1)および otolin-1 の全一次構造の決定ならびに発現解析を

行い、第 3 部では、免疫組織化学的手法を用いて、耳石および内耳小囊におけるこれら二つの基質タンパク質の局在を明らかにした。また、耳石が最初に出現する時期に焦点を当て、胚を用いた観察も同時に行った。最後に第 4 部では、耳石基質タンパク質の機能を包括的に把握するために *in vitro* における機能解析を行った。

### 耳石基質タンパク質のキャラクタリゼーション (第 1 部、第 2 部)

材料としてサケ科魚類に属するニジマス *Oncorhynchus mykiss* およびシロサケ *O. keta* の耳石を用いた。耳石を EDTA 溶液で脱灰すると、可溶性および不溶性の成分に分けることができる。後者は無色透明のゲル状物質で脱灰前の耳石の形をほぼ完全に保つことが特徴である。

EDTA 可溶性基質タンパク質の主要成分は分子質量約 55 kDa の糖タンパク質であり、OMP-1, otolith matrix protein-1 と命名した。OMP-1 はヒトのメラノトランスフェリン(メラノーマ細胞の表面に存在する鉄輸送タンパク質) の C 末端側半分の領域と約 40% の相同性を有することがわかった。また存在位置は異なるものの、両者ともに亜鉛結合モチーフを有していた。耳石、すなわち、炭酸カルシウムからなる硬組織から得られた OMP-1 において、カルシウムではなく鉄または亜鉛と結合する可能性が示唆されたことは非常に興味深い。また、発現解析の結果から OMP-1 mRNA は小囊特異的に発現しており、さらにその発現レベルは一日を通してほぼ一定であることがわかった。このことは、日周輪の形成、つまり有機物の沈着リズムを考える際に OMP-1 がその制御因子である可能性は低いこと示唆している。

一方、EDTA 不溶性のゲル状物質を両性界面活性剤である CHAPS を用いて可溶化したところ、分子質量約 100 kDa のコラーゲン様タンパク質の抽出に成功した。otolin-1 と名付けたこのタンパク質は、meshwork-forming collagen に分類されるタイプ VIII および X コラーゲンの C 末端側非コラーゲン領域と非常に高い相同性を有していた。もし otolin-1 が、これらタイプ VIII および X コラーゲンと類似の性質を有しているならば、otolin-1 は 3 次元の編み目構造を形成することにより耳石の枠組みを形成する可能性が予想される。タイプ VIII および X コラーゲンは基底膜や成長軟骨に存在するコラーゲンであり、耳石のような高度に石灰化した硬組織において確認されたという報告はこれまでなされていない。また、コラーゲンは骨や歯を構成する主要なマトリックス分子であることが知られているが、これらは両者ともにリン酸カルシウムから構成されるものであり、炭酸カルシウムからなる硬組織においてコラーゲン様タンパク質が同定されたのは本研究が初めての例である。また、コラーゲンは動物の体を構成する主要な構造タンパク質である。しかしながら、otolin-1 mRNA の発現は主要なコラ

ーゲン性組織である表皮や鱗においても認められず、小囊においてのみ確認されたことから、otolin-1 は内耳小囊という限られた組織においてのみ存在するコラーゲン様タンパク質であることが示唆された。

### OMP-1 および otolin-1 の局在 (第3部)

OMP-1 および otolin-1 の耳石内における微細分布を把握することは、両タンパク質の機能を推測する上で非常に重要である。そこで OMP-1 および otolin-1 にそれぞれ特異的な抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、OMP-1 は小囊の扁平上皮細胞に最も多く存在することがわかった。扁平上皮細胞は耳石の anti-sulcus 面に位置しており、この部分の成長は遅いといわれている。一方、耳石内における反応は均一ではなかったが、日周輪に沿った免疫反応が認められる部分も存在した。また、otolin-1 は感覚細胞の端に位置する限られた細胞のみに存在することがわかった。この部分は耳石の成長速度の最も早い部分に面している(図 1)。つまり、otolin-1 が積極的に耳石に沈着することによって新しい枠組みが提供され石灰化が促進される可能性が示唆される。

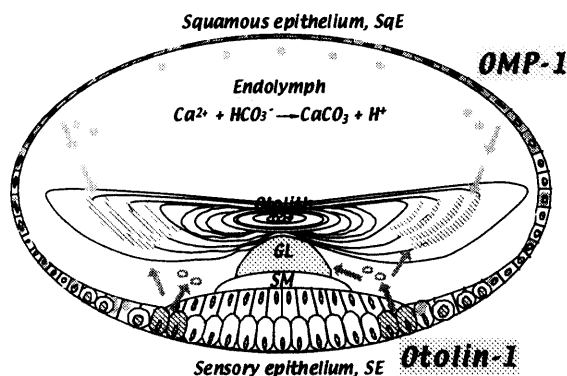


図 1) 耳石形成における基質タンパク質の関与。 OMP-1 は耳石の anti-sulcus 面(滑面)側に位置する扁平上皮細胞(SqE)で合成された後、内リンパ液中に分泌され耳石に沈着する。一方、otolin-1 は耳石内において最も成長速度の速い sulcus 面(凹凸面)側付近の限られた細胞群においてのみ合成され、分泌されたのち耳石および耳石膜のゼラチン層(GL)に沈着する。

また、魚類の耳石は発生学的に最も初期に形成される硬組織であることが知られている。胚における耳石形成の始まりはゲル状の有機物であるとされ、この有機物が結晶形成のテンプレートになると考えられる。そこで、このテンプレートに成りうる物質の同定を行うために胚を用いた免疫組織化学を行った。10°C の飼育水でニジマス卵を発生させたところ、受精後 13-14 で耳胞が形成され、その直後、つまり受精後 14-15 日において実体顕微鏡下で耳石核の存在が確認された。この時期既に、OMP-1 および otolin-1 は耳石核に存在していることがわかった。発生が進むにつれ、耳石核は成長し、受精後 17 日目には耳石核の中心部において両抗体に反応しない部分を有する耳石核も数多く見られた。この結果は核の中心部において OMP-1 および otolin-1 以外の有機物の存在を示唆するものであるが、もう一方で、免疫反応を妨害する物質、つまり炭酸カルシウム結晶の存在も否定できない。今後、免疫電顕などを用いたより詳細な解析

が必要とされる。

#### ***in vitro* における OMP-1 および otolin-1 の機能の推定 (第4部)**

耳石は炭酸カルシウムからなる硬組織であるゆえに、そこに含まれるタンパク質の機能としてはカルシウム結合能が期待される。しかしながら、OMP-1 を含む EDTA 可溶性基質タンパク質の構成成分は非変性条件下においてもカルシウム結合能を有していないことがわかった。これに対し、otolin-1 を主成分とする EDTA 不溶性のゲル状物質はカルシウムを結合することが示唆された。実際、otolin-1 と相同性を有するタイプ X コラーゲンはカルシウム結合能を有することが報告されている。これらのことから、耳石形成における otolin-1 の役割は、枠組みを形成して結晶形成の場を提供し、かつ結晶形成に必要とされるカルシウムイオンを引き寄せることであると推測することが可能かもしれない。

また、炭酸カルシウム結晶の沈殿を阻害する抗石灰化実験の結果から、OMP-1 は石灰化阻害の方向に働くことが強く示唆された。このことは免疫組織化学によって得られた結果とも矛盾しないものである。このように OMP-1 および otolin-1 はそれぞれ相反する機能を持ち、これらが互いに調節しあうことによって石灰化速度が制御されているのかもしれない。

さらに、耳石基質タンパク質が *in vitro* において炭酸カルシウムの結晶形態を変化させることがわかった。有機物の存在しない状態の炭酸カルシウムの飽和溶液からは、菱面体形をした側面の滑らかな結晶が得られる。これに対して、EDTA 不溶性成分を結晶形成のテンプレートとして加えた場合、若干角のとれた結晶が多数認められた。最も大きな形態変化は EDTA 可溶性成分および不溶性成分が同時に存在した場合に認められた。角は完全に消失し、襞のよった布のような形態を示す例が多く確認された。これらのことは、複数の有機物が結晶形態に影響を与え得ることを示唆している。今後は単なる炭酸カルシウム飽和溶液を用いるのではなく、人工内リンパ液の利用など、反応溶液の組成なども考慮に入れて検討を行う必要がある。

以上に示した一連の結果から、耳石はコラーゲン性のタンパク質をテンプレートにして石灰化が行われること、また耳石には石灰化を抑制する方向に働く OMP-1 と促進する方向に働くと推測される otolin-1 が共存し、これらは互いに影響しあいながら石灰化を制御している、と考えられる。本研究は個々のタンパク質に対する具体的な機能解析を行うまでには至らなかったが、今後、より詳細な耳石タンパク質の機能解析や耳石の周辺環境を作っている内リンパ液を含めた網羅的研究などを行うことにより、耳石形成の分子機構の解明により近づけるものと期待している。