

論文審査結果の要旨

氏名 村山英未

本論文は7章から成る。

第1章では、これまでの耳石に関する情報をまとめ、本研究の背景を詳しく述べている。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、平衡感覚や聴覚を担う重要な組織である。耳石は日々成長し、日周輪と呼ばれる輪を形成し、生息環境をそのまま耳石に取り込むことから、魚類の日齢査定や履歴解析等に利用されてきた。耳石には、炭酸カルシウム結晶の他に微量の有機物を含み、これが結晶化および結晶成長を制御していると考えられてきたが、その有機物の構造は不明であった。論文提出者はこの有機物の実体を明らかにすることによって分子レベルで耳石形成のメカニズムに迫ろうとした。

第2章では、ニジマスおよびシロサケを用いて、耳石をEDTAで脱灰した脱灰液中の主要なタンパク質（見かけの分子質量約55 kDa, otolith matrix protein-1, OMP-1 と命名）を電気泳動によって精製し、アミノ末端配列解析および酵素消化断片の配列を解析することによって複数の内部部分配列を得ている。これらの配列を基にプライマーを設計し、PCRによって増幅したcDNA断片を用いてcDNAライブラリーをスクリーニングすることによってOMP-1のcDNAをクローニングすることに成功した。塩基配列からこのcDNAは344アミノ酸からなるタンパクをコードしており、3ヵ所にN結合型糖鎖付加共通配列を有していることがわかった。実際、エンドグリコシダーゼでこのタンパク質を消化すると分子質量が約10 kDa減少したことから、糖鎖が付加しているものと考えられた。ホモロジー検索の結果、このタンパク質はヒトのメラノトランスフェリンと約40%の相同性があることがわかった。ノーザンブロット解析の結果、このタンパク質の遺伝子は耳石小囊に限って発現していたが、その発現には1日を通して明確な日周性は認められなかった。

第3章では、耳石の脱灰した残りのゲル状不溶物から界面活性剤で可溶化された主要なタンパク成分（見かけの分子質量約100 kDa, otolin-1 と命名）について、部分アミノ酸配列情報からcDNAをクローニングし、演繹アミノ酸配列を提出した。otolin-1は分子中央部にコラーゲン様の配列を有し、既知のタイプVIIIおよびタイプXコラーゲンに類似していることがわかった。したがって、otolin-1は耳石中で網目構造を形成し、耳石の枠組み形成に重要な役割を果たしていることが推定された。

第4章では、OMP-1およびotolin-1の組織内、耳石内局在性を調べるための道具として、それぞれに対する抗体を作製するために、組み換え体を作製してその抗原とした。組み換え体は大腸菌および酵母の発現系を利用した。発現タンパクを精製した後、ウサギに免疫し、ポリクローン抗体を作製した。

第5章では、第4章で作製した抗体を用いて、免疫染色によって両タンパク質の局在性を調べた。その結果、OMP-1は主に耳石小囊の扁平上皮細胞で、otolin-1は感覚細胞の周辺に限られた細胞でのみ合成されていると推定された。また、いずれのタンパク質も耳石内に不均一に存在し、ある部分では日周輪に一致すると考えられる分布も見られた。さらに胚の時期の耳石形成の開始時点での両タンパク質の存在を調べた結果、両タンパク質とも極めて初期の時期から存在しており、耳石形成の核形成および結晶粒の融合、結晶成長に関わっていることが示唆された。

第6章では、両タンパク質を含む有機基質の機能を *in vitro* 結晶形成実験を用いて解析した。その結果、不溶物にはカルシウム結合能が、OMP-1には結晶形成阻害活

性が認められ、また耳石有機基質存在下ではいびつな形をした結晶ができることがわかった。これらの結果はいずれも有機基質が結晶形成に深く関わっていることを示唆した。

第7章では、本論文で得られた結果を基に耳石形成のメカニズムを考察している。本研究によって始めて、2つの分子プローブを用いて耳石形成のメカニズムの一端が明らかになった。耳石研究における方法論の開発、特に分子レベルでの解析を可能にした功績は大きいと評価できる。

なお、本論文第2章―第6章は大平剛、奥野敦朗、都木靖彰、長澤寛道との共同研究あり、また第6章の一部は Dr. Mark I. Greene および Dr. James G. Davis との共同研究であるが、すべてにわたって論文提出者が主体となって分析および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。