

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

**Molecular analysis of calcification in the crustacean exoskeleton**

(甲殻類外骨格における石灰化の分子生物学的解析)

氏名 遠藤 博寿

### 第一部：序説

脊椎動物の骨や貝殻等の硬組織における無機カルシウム結晶の沈着は石灰化と呼ばれ、動物界において広く見られる現象である。その分子機構の詳細は明らかになっていない部分が多いが、近年、硬組織の有機基質に含まれるタンパク質などの高分子が石灰化の過程に関与していることを示唆する報告が増えつつある。本研究では、甲殻類の外骨格における石灰化の分子機構を解析するため、クルマエビを用いて、石灰化に関与するタンパク質の同定及び解析を行うことを目的とした。

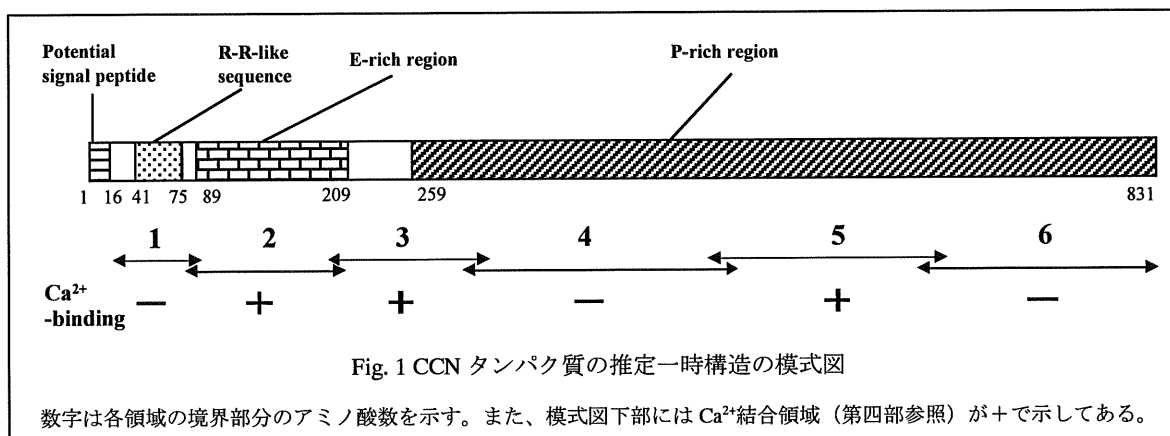
クルマエビの外骨格の石灰化は、脱皮の後の限られた時期（脱皮後期）に特異的に起こる。そのため、脱皮後期にのみ特異的に発現している遺伝子のうちのいくつかは、石灰化の過程に関与していると予測される。そこで、本研究に先立ち、当研究室の Watanabe らは Differential Display 法およびノザン解析を用いて、この時期にのみ特異的に発現する mRNA を 4 種類同定した。その内の一つである遺伝子 *crustocalcin(CCN)* は、542 残基のアミノ酸をコードする ORF を含んでいた。しかし、のちに述べる Western blot 解析の結果（第三部）から、この遺伝子の ORF はさらに 5'側に続いていることが予測された。そこで、私は 5'RACE 法を用いてこの遺伝子の未知領域を同定することから研究を開始した。

### 第二部：CCN の配列解析

5'RACE の結果から、CCN の 5'側にはさらに 289 残基のアミノ酸をコードする ORF が存在することがわかった。その結果、この遺伝子は、831 残基から成るタンパク質をコードしていることが明らかになった(Fig. 1)。同遺伝子にコードされるタンパク質 (CCN と命名) は、N末にシグナルペプチドと予想される配列をもち、推定される分子質量及び等電点はそれぞれ約 86

kDa, 3.7 であった。シグナルペプチドの下流には、R-R-like sequence と名付けたキチン結合に関与する可能性のある配列が存在した。さらにその下流には E-rich region と名付けた 121 残基から成る領域があり、この部分は約 48% がグルタミン酸(E)であるという特殊な一次構造を有していた。このようにグルタミン酸に富む配列は、脊椎動物の骨に含まれる bone sialoprotein(BSP) というタンパク質においても見られる。さらに、この BSP に含まれるグルタミン酸に富む領域は、リン酸カルシウムの結晶核形成を促進することが確認されている。このことから、CCN の E-rich region も外骨格の石灰化において結晶核形成に関与している可能性が考えられた。また、C 末側の約 2/3 を占める部分はプロリン(P)を始めとする疎水性の残基に富んでいた。この領域 (P-rich region と命名) はショウジョウバエの  $Ca^{2+}$  結合タンパク質であるカルフォチンとアミノ酸組成および配列において類似が見られた。カルフォチンは、視細胞中において、カルシウムの貯蔵や輸送に関与していると考えられている。そのため、CCN の P-rich region も、外骨格の石灰化において、同様な役割を果たしている可能性が示唆された。

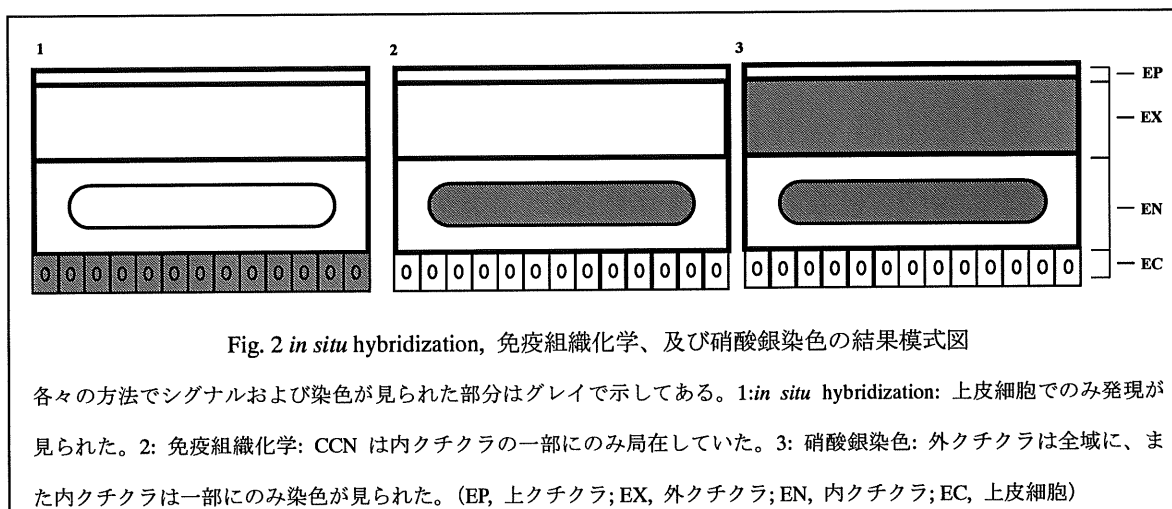
私は、これらの配列解析の結果を受け、さらにこの遺伝子の発現およびタンパク質の分布について解析を進めた。



### 第三部：CCN の発現解析

クルマエビの外骨格は、上クチクラ、外クチクラ、内クチクラの3層に分かれており、さらにその内側には上皮細胞が存在する(Fig. 2)。in situ hybridization を用いて遺伝子 CCN の発現細胞を検出した結果、発現はクチクラ直下の上皮細胞においてのみ確認された (Fig. 2-1)。これらの細胞は、クチクラ中に有機基質やタンパク質を分泌し、外骨格の形成に関与している。この結果および CCN がシグナルペプチドを有することから、同タンパク質は上皮細胞で生成され外骨格中に分泌されることが予想された。そこで、外骨格中から抽出したタンパク質を用いて、Western blot 解析を行った。その結果、約 165 kDa のバンドが検出された。この値は配列解析から得られた理論値 (約 86 kDa) を大きく上回る。しかし、CCN にはリン酸化等の修飾を受ける可能性がある箇所が多く含まれること、また、pI の低いタンパク質は SDS-PAGE 上では移動速度が低くなる傾向があることから、理論値と見かけの分子量に相違が生じたと考えられる。

次に、免疫組織化学により CCN の分布を調べると同時に、硝酸銀染色を用いて外骨格の石灰化領域の詳細を調べ、タンパク質の分布領域との比較を行った(Fig. 2-2, 3)。下記模式図に示したように、上クチクラには顕著な石灰化は見られなかったが、外クチクラのほぼ全領域および内クチクラの中央の一部に強い石灰化が確認された。また、CCN の分布は内クチクラの石灰化領域とほぼ一致していた。そのため、このタンパク質は、内クチクラの中央の一部の石灰化に関与している可能性が示唆された。しかしながら、CCN の石灰化への関与が促進的なものであるのか、抑制的なものであるのかは不明であったため、RT-PCR を用いて脱皮後期における石灰化の進捗と遺伝子の発現時期との関係について調べた。その結果、遺伝子 CCN は、内クチクラの石灰化が起こる前である、脱皮後 2 時間以内にすでに発現が始まっていることがわかった。この結果から、CCN は石灰化の過程に促進的に関与していることが示唆された。



#### 第四部：CCN の機能解析

上記の配列解析および発現解析の結果を受け、私はさらに CCN の機能解析を行うこととした。しかし、このタンパク質は、Western blot のシグナルが比較的弱いことから、外骨格中に少量しか存在しないこと、また、配列解析の結果から、不溶性画分に多く含まれることが推測されたため、生体内から十分量のタンパク質を単離／精製することは困難であると予想された。そこで、以下の解析にはいずれも大腸菌で発現させた CCN タンパク質のフラグメントを用いた。

まず、CCN が  $\text{Ca}^{2+}$  と相互作用する可能性を調べるため、以下の方法で  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を調べた。CCN を 6 つのフラグメント(Fig. 1 下部)に分けて発現させた後、SDS-PAGE を用いて大腸菌由来のタンパク質から分離した。さらにそれらを PVDF 膜に転写し、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を含むバッファ中でインキュベートし、膜上のタンパクに結合した  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の放射線を測定した。その結果、3 つのフラグメント(Fragment 2, 3, および 5)に  $\text{Ca}^{2+}$  結合能が確認された(Fig. 1 下部)。

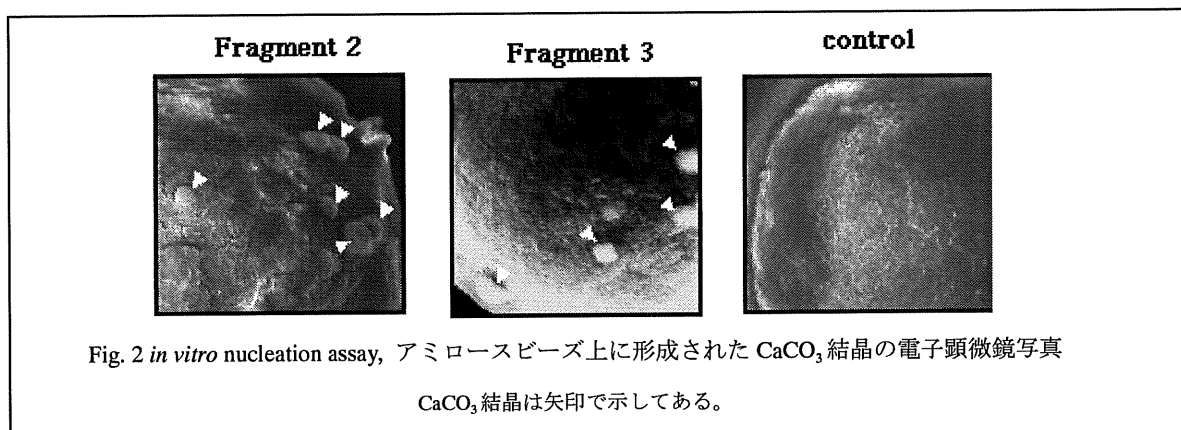
次に、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{HCO}_3^-$  を含む溶液中での CCN の機能について調べた。現時点では、CCN が生体

内において溶解した状態で存在するのか、それともキチン等の不溶性の基質に結合した状態で存在するのかは不明であるため、両方の可能性を想定し、次の二通りの実験を行った。

(1)pH-drop assay:Ca<sup>2+</sup>と HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を含む溶液中で CaCO<sub>3</sub> が形成されると pH が低下する。このことを利用し、この溶液中に CCN の2つの Ca<sup>2+</sup>結合フラグメント (Fragment 2, 3) を溶解させ、pH 低下に対する影響を調べたところ、E-rich region を含む領域 (Fragment 2) に顕著な pH 低下抑制能 (結晶成長抑制能) が確認された。

(2)*in vitro* nucleation assay:Fragment 2 および 3 をマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパクとして発現させた後、アミロースビーズに結合した状態のまま Ca<sup>2+</sup>と HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を含む溶液中でインキュベートし、ビーズ上に形成された結晶を SEM で観察した。また、対照実験としては MBP と lacZ の融合タンパクを用いた。ビーズ上に形成された結晶の数をカウントし、ビーズに結合したタンパク質の量で標準化した結果、CCN の二つのフラグメントの存在下で形成された結晶の数はコントロールよりも有意に多いという結果が得られた。

(1)と(2)の結果により、CCN は溶液に溶解している状態と基質に固定された状態とで結晶形成に関して全く相反する働きをすることが示された。では、CCN は生体内中ではどのような状態で存在しているのだろうか？このことを直接的に示すデータは現在のところ得られていないが、(1)CCN のC末側 2/3 の部分は疎水性アミノ酸を多く含むこと、(2) キチン結合に関与する可能性のある領域(R-R-like sequence)を含むことから、生体内 (外骨格内) において、CCN は不溶性の基質に結合した状態で存在していると考えられる。よって、CCN は生体内においては結晶形成を促進していると推測される。



## 第五部：総括

以上に述べた結果から、私は CCN の石灰化への関与に関して次のようなモデルを考えている。脱皮直後に遺伝子 CCN は上皮細胞において発現され(第二部参照)、翻訳されたタンパク質は外骨格中へ分泌され、内クチクラへと移動する (第三部参照)。そして、キチンを主成分とする不溶性の基質に結合し、固定された状態で CaCO<sub>3</sub> の結晶形成を誘導する (第四章参照)。本研究で得られた様々な結果はいずれも以上のモデルを支持している。