

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 道生

生物は無機鉱物を硬組織として利用している。無機硬組織（バイオミネラル）は、原核生物から高等動物に至る多くの生物に見られ、体の保持、外敵からの防御、ミネラルの貯蔵などに利用されている。バイオミネラルに含まれる少量の有機基質が結晶の形態、多形、配向、核形成の制御を行っていると考えられてきたが、詳細な形成メカニズムは未だ不明な点が多い。本論文はアコヤガイ (*Pinctada fucata*) を研究対象としている。アコヤガイの貝殻は内側が炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶がレンガ状に積層した構造である真珠層、外側が炭酸カルシウムのカルサイト結晶を含む稜柱層の二層構造をしている。本論文は、アコヤガイの貝殻形成メカニズムを解明することを目的にしたもので、序論と4章から成る。

序論で背景を述べた後、第1章では、稜柱層特異的基質タンパク質 Prismaticin-14 の構造活性相関研究を行っている。Prismaticin-14 は N および C 末端にアスパラギン酸に富む酸性領域、配列中央付近に PIYR repeat および GY-rich region の4つのドメインから構成されている。そこで、4つのドメインのうち1つあるいは2つを欠失した変異体を調製し、炭酸カルシウム結晶形成阻害活性およびキチン結合活性を測定した結果、N 末端と C 末端領域が炭酸カルシウム結晶との相互作用に重要であり、GY-rich region がキチンとの結合に重要であることが示された。

第2章では、貝殻内のキチンの同定およびキチン合成酵素のクローニングを行っている。まず、脱灰後の稜柱層を Calcofluor 染色したところ、枠組み全体が蛍光染色された。次に、稜柱層由来不溶性成分の IR スペクトルを測定したところ、標品キチンのスペクトルとほぼ一致した。さらに、稜柱層由来不溶性成分の加水分解産物の ¹H NMR スペクトルを測定したところ、キチン標品の加水分解産物およびグルコサミン塩酸塩のスペクトルと一致した。以上の結果から、稜柱層にキチンが存在することが示された。

アコヤガイのキチン合成酵素 (PfCHS1)cDNA をクローニングしたところ、*pfchs1* の全長は約 7.7 kbp であり、N 末端には myosin head domain を有し、活性に重要と考えられている QRRRW 配列は保存されていた。発現解析の結果、*pfchs1* は貝殻外側に面する外套膜および筋肉に発現していることが判明した。

第3章では、真珠層特異的基質タンパク質の構造・機能解析を行っている。まず真珠層から抽出した不溶性有機基質をアラゴナイト結晶とインキュベートし、上清を SDS-PAGE で分析したところ、80 kDa のバンドがアラゴナイト結晶に特異的に結合することが判明した。このタンパク質をコードする cDNA をクローニングしたところ、新規であることがわかったので、Pif と命名した。Pif は、上述の 80 kDa のアラゴナイト結晶結合タンパク質 (以下 Pif 80) の上流に、Pif97 をコードしていた。Pif 97 はタンパク質相互作用ドメインである

VWA domain とキチンに結合する chitin-binding domain を有していた。

Pif 分子の機能を知るため、まず、免疫 SEM による Pif の局在解析を行った結果、Pif が真珠層形成を誘導し真珠層の重要な構成成分になっていることが示唆された。次に RNAi を用いた Pif のノックダウンを行ったところ、Pif の mRNA が有意に減少していることが確認された。その個体の真珠層表面を SEM 観察したところ、正常な個体に比べて表面が乱れ、真珠層の成長が停止していた。さらに、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて粗精製した Pif を含む画分をキチン薄膜上に添加し、炭酸カルシウム過飽和溶液内で結晶形成させたところ、*c* 軸が基盤に対して垂直なアラゴナイト結晶が観察された。

第 4 章では貝殻基質タンパク質の相同分子を近縁の貝で探索している。Pif の相同分子をクロチョウガイ (*Pinctada margaritifera*)、マベガイ (*Pteria penguin*) において探索した結果、その存在が確認された。アコヤガイと同属であるクロチョウガイでは Pif 80、Pif 97 ともに非常によく似ていたが、近縁ではあるが属が異なるマベガイでは Pif 80 の配列がかなり異なっていることがわかった。

以上、本論文はアコヤガイ貝殻から有機基質を同定し、その構造・機能解析を行い、貝殻形成メカニズムの一端を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。