

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	高橋 潤
論文題目	貝殻形成における二種類のクモ糸相同タンパク質の機能		
(論文内容の要旨)			
<p>貝殻形成のメカニズム、種間による貝殻の形態の多様性が生じる理由はほとんど理解されていない。先行研究によりマガキの外套膜辺縁部で特異的に発現している2つの遺伝子が同定され、この遺伝子産物はクモの巣を構成するタンパク質中のポリアラニンモチーフと相同性の高いドメイン構造を持つことから、Shelk1、Shelk2と命名された。本論文では、Shelk1とほぼ同時に発見されたもののほとんど解析が進んでいない Shelk2 タンパク質の構造の解明と、<i>shelk1</i> 遺伝子および <i>shelk2</i> 遺伝子のノックダウンによりそれぞれのタンパク質発現を抑制することで、これら二種類のタンパク質の貝殻形成における機能の解明を試みたものであり、以下のように要約される。</p>			
<p>1. <i>shelk2</i> 遺伝子の全長配列および演繹アミノ酸配列を決定した。Shelk2 は297アミノ酸からなるタンパク質であり、分泌シグナル配列を有する点、イントロンを持たない遺伝子から転写・翻訳されるという点で、Shelk1と共通していた。また、Shelk2 に特徴的な構造として、10残基以下のアラニンが連続するポリアラニンモチーフが、タンパク質全体にわたり計12か所に存在した。マガキのゲノムDNAの制限酵素断片のサザンブロット解析により少なくとも8本のバンドが確認され、複数の <i>shelk2</i> 遺伝子、または相同遺伝子の存在が示唆された。</p>			
<p>2. Shelk1、Shelk2 共に、マガキの近縁種であるイワガキで相同遺伝子が見つかったものの、興味深いことに、両者は非常に近縁種にもかかわらず、Shelk1 や Shelk2 に特徴的なモチーフ構造の数や分布は大きく異なった。マガキとイワガキの貝殻を比較すると、イワガキの右殻の比重のみが、イワガキの左殻やマガキの左右の殻と比較し有意に大きいことが明らかとなった。貝殻の走査型電子顕微鏡観察の結果、イワガキの右殻はマガキの右殻に比べ稜柱がより細く、数多く密集していたため、この違いが比重の差に表れていると考えられた。マガキとイワガキの貝殻の形状の違いに、これら近縁種間のクモ糸相同タンパク質の違いのみが影響するのかは未解明だが、二枚貝の貝殻形状の多様性の原因は、このような近縁種間で少しずつ異なるタンパク質構造の違いにあることが示唆された。Shelk2 の全長配列との相同な配列は、近縁種で同じ <i>Crassostrea</i> 属のイワガキ、シカメガキ、バージニアガキ以外には見出されなかったが、ポリアラニンモチーフは他の軟体動物の他、クモやガなどの昆虫や哺乳動物に於いても相同配列が見いだされ、このポリアラニンモチーフが生物活性を保持し、保存されていることが示唆された。</p>			
<p>3. Shelk1 および Shelk2 それぞれのタンパク質の貝殻形成における機能を調べるため、遺伝子ノックダウンによるマガキ貝殻形成への影響について検討した。それぞれ開始コドンを含む5'側の領域で dsRNA を調製した後、マガキ個体の閉殻筋へ注射し、貝殻を一部切り取り、貝殻の新生を観察した。7日目の新生貝殻原器を走査型電子顕微鏡により観察した。<i>shelk1</i> 遺伝子のノックダウンでは貝殻の稜柱構造の断面が丸みを帯び、また稜柱同士が融合したような境界が不明瞭となる箇所も確認できた。一方、<i>shelk2</i> 遺伝子のノックダウンでは、稜柱の断面はさらに丸みを帯</p>			

び、また稜柱の断面積が対照と比較し小さくなり、稜柱の数も増加する変化が確認された。これらの結果から、**Shelk1** および **Shelk2** はマガキ貝殻の稜柱層形成においてそれぞれが異なる機能を担っていることが示唆された。

本研究により、**Shelk1** および **Shelk2** が、共に貝殻の稜柱層の形成において重要な役割を担うことが判明した。極めて近縁な種においてのみ、これらの相同タンパク質の存在が確認されたが、分子内の特徴的なモチーフ構造の数や分布に違いが見られることから、この違いが異種の貝殻形状の多様性に寄与していると推察される。また、節足動物門と軟体動物門という、系統分類学上離れた動物門に属する生物が作り出すそれぞれの体外分泌タンパク質において、その一部に共通するアミノ酸配列モチーフ（ポリアラニンモチーフ）が用いられているという点も非常に興味深く、このモチーフを有するタンパク質を持つ共通祖先の存在が示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

貝類の貝殻形成機構はほとんど解明されていない。また貝類の貝殻の形態は種間で非常に多様であるが、この多様性を生む理由もほとんど理解されていない。従来の貝殻タンパク質の研究では、貝殻中に存在するタンパク質に関する研究がほとんどであり、貝殻の形成に重要な働きをする外套膜周辺部のタンパク質に関する研究はほとんど行われていなかった。本論文では、マガキ外套膜周辺で発現が高い遺伝子に注目し、その遺伝子産物である *Shelk1* および *Shelk2* タンパク質の構造の解明と、貝殻形成への寄与を検討したものであり、成果として評価できる点は以下の通りである。

1. *shelk2* 遺伝子の全長配列および演繹アミノ酸配列を決定し、10残基以下のアラニンが連続するポリアラニンモチーフが、タンパク質全体にわたり計12か所に存在することを明らかにした。マガキのゲノムDNAの制限酵素断片のサザンブロット解析により少なくとも8本のバンドが確認され、複数の *shelk2* 遺伝子、または相同遺伝子の存在を示した。

2. *Shelk1* および *Shelk2* の相同タンパク質は共に、*Crassostrea* 属のイワガキ、シカメガキ、バージニアガキ以外には見出されなかったが、ポリアラニンモチーフは軟体動物および節足動物にも存在することを示した。このポリアラニンモチーフが大概分泌タンパク質の機能に重要な働きを持つことが示唆された。マガキの近縁種であるイワガキにおいても *Shelk1* や *Shelk2* に特徴的なモチーフ構造の数や分布は異なり、この違いが貝殻の種間の比重や形態の差へ寄与している事が示唆された。

3. *shelk1* および *shelk2* 遺伝子のノックダウンにより貝殻再生時の新生貝殻原器の稜柱構造の形態がそれぞれ対照と異なり、*Shelk1* および *Shelk2* はマガキ貝殻の稜柱層形成においてそれぞれが異なる機能を担っていることが示唆された。

以上のように、本研究は海洋生物機能学、水産無脊椎動物学、比較生化学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)