

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

高橋 潤

(2020年)

目次

序論	・・・	1
第1章 二種類のクモ糸相同タンパク質の構造比較	・・・	6
第1節 マガキ <i>shelk2</i> 遺伝子配列およびその演繹アミノ酸配列の決定	・・・	6
第2節 マガキ Shelk2 タンパク質の相同配列検索	・・・	12
第3節 Shelk1 および Shelk2 の一次構造比較	・・・	16
第2章 マガキ近縁種におけるクモ糸相同タンパク質の探索	・・・	19
第1節 マガキ近縁種における <i>shelk2</i> 遺伝子のクローニング	・・・	20
第2節 クモ糸相同タンパク質と貝殻構造の関連性	・・・	24
第3章 二種類のクモ糸相同タンパク質の機能解析	・・・	29
総括	・・・	41
引用文献	・・・	42
謝辞	・・・	49
本論文に関する公表済み文献	・・・	50

序論

軟体動物門は二番目に大きい後生動物の分類群であり、その多くはバイオミネラリゼーションによって形成された硬組織を持つ。バイオミネラリゼーションには有機物が関与し、生物が常温常圧の下、溶液からの析出反応により鉱物のような無機結晶を生み出すという特徴がある。バイオミネラルは、その 90%以上が炭酸カルシウムやリン酸カルシウムなどの結晶で構成される無機成分と、多糖類やタンパク質を含む 10%以下の有機マトリックス成分とで構成されている (渡部, 1997)。

最も広く研究されているバイオミネラルに、巻貝や二枚貝の貝殻やカタツムリの殻が挙げられる。中でも二枚貝は、殻皮層、葉状層、チョーク層 (または層板層やクロスラメラ構造とも呼ばれる)、稜柱層、真珠層などのさまざまな種類の層構造で構成されることが従来研究により明らかとなっている (Mann, 2001; Marin *et al.*, 2008; Wilt *et al.*, 2003)。これらの層構造は、軟体動物に特有の組織である外套膜の上皮細胞により形成され維持されているが、貝殻の炭酸カルシウム結晶形成とその制御には様々な有機マトリックスが関わり、それら有機マトリックス成分が貝殻層構造や貝殻形状の多様性に影響を与えていると考えられている。

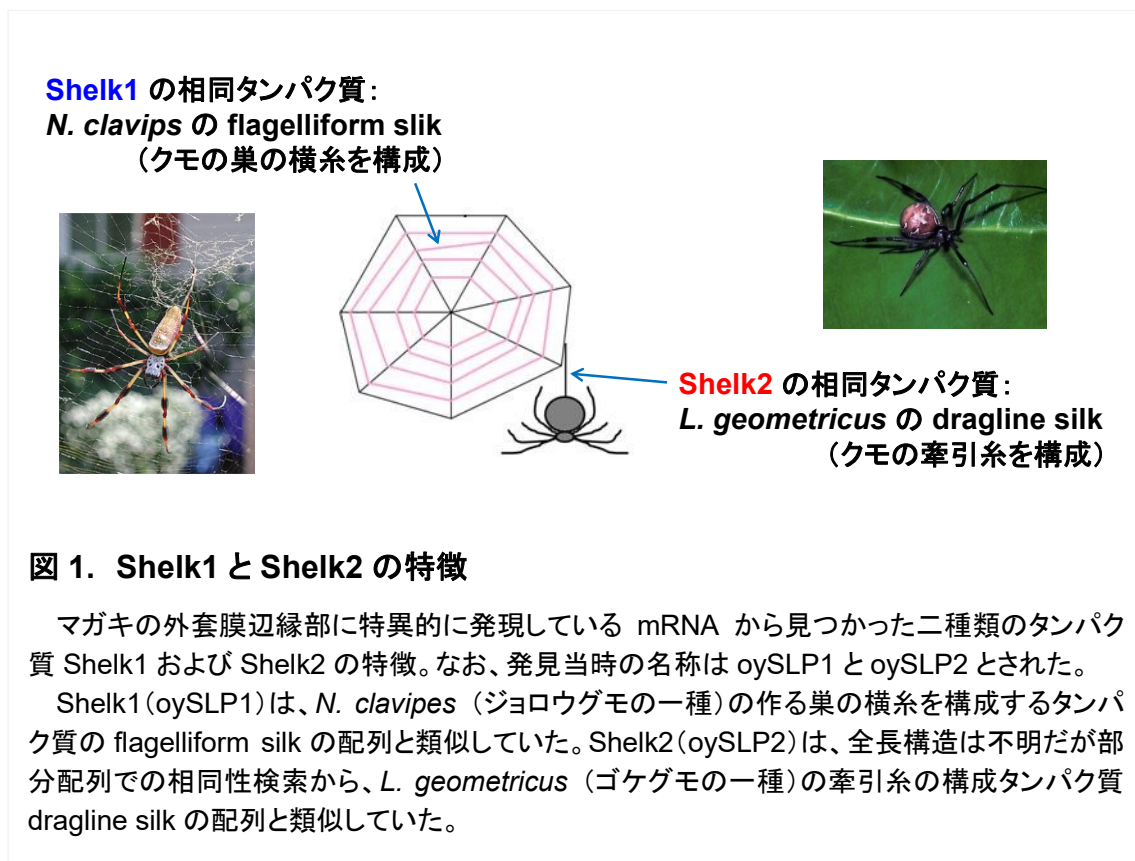
これまでに様々な有機マトリックスが、貝殻の結晶化および／または貝殻骨格の形成に関係していると報告されている。代表的な有機マトリックスとしては、ACLS40 (Pokroy *et al.*, 2006)、AP7 および AP24 (Michenfelder *et al.*, 2003)、AP8 (Fu *et al.*, 2005)、Aspein (Tsukamoto *et al.*, 2004)、Asprich (Gotliv *et al.*, 2005)、

caspartin および calprismmin (Marin *et al.*, 2005)、KRMP (Zhang *et al.*, 2006b)、Lustrin A (Shen *et al.*, 1997)、MPSPS (Lee *et al.*, 2006)、MSI31 および MSI60 (Sudo *et al.*, 1997)、MSI7 (Zhang *et al.*, 2003)、MSP-1 (Sarashina and Endo, 1998)、MSP-SC (Noguchi *et al.*, 2007)、MPP1 (Samata *et al.*, 2008)、Mucoperlin (Marin *et al.*, 2000)、N16 (Samata *et al.*, 1999)、N14 および N66 (Kono *et al.*, 2000)、nacrain (Miyamoto *et al.*, 1996)、p10 (Zhang *et al.*, 2006a)、Pearlin (Miyashita *et al.*, 2000)、perluctin および perlustrin (Weiss *et al.*, 2000)、perlwapin (Treccani *et al.*, 2006)、Pif (Suzuki *et al.*, 2009)、並びに Prismarin-14 (Suzuki *et al.*, 2004; Suzuki and Nagasawa, 2007)などが挙げられる。また、これらのうち Aspein、Asprich、caspartin、calprismmin、KRMP、MSI31 および Prismarin-14 は稜柱層形成に関与していると考えられている。一方、これまでに報告されたほとんどの貝殻由来タンパク質は、興味深いことに一部を除いて生物種間で相同性がほとんど無く、いまだその理由は判明していない。

これらほとんどの有機マトリックスの同定は、主にキレート剤または酸を使用した貝殻炭酸カルシウム結晶の脱灰の後、残存する成分からの特定の溶液による抽出によって行われてきた。しかしながら、この方法は比較的豊富なタンパク質の同定には適している一方で、抽出に使用される溶液への溶解度や当該溶液中での安定性が原因で、特定の重要なタンパク質が得られていない可能性が考えられる。

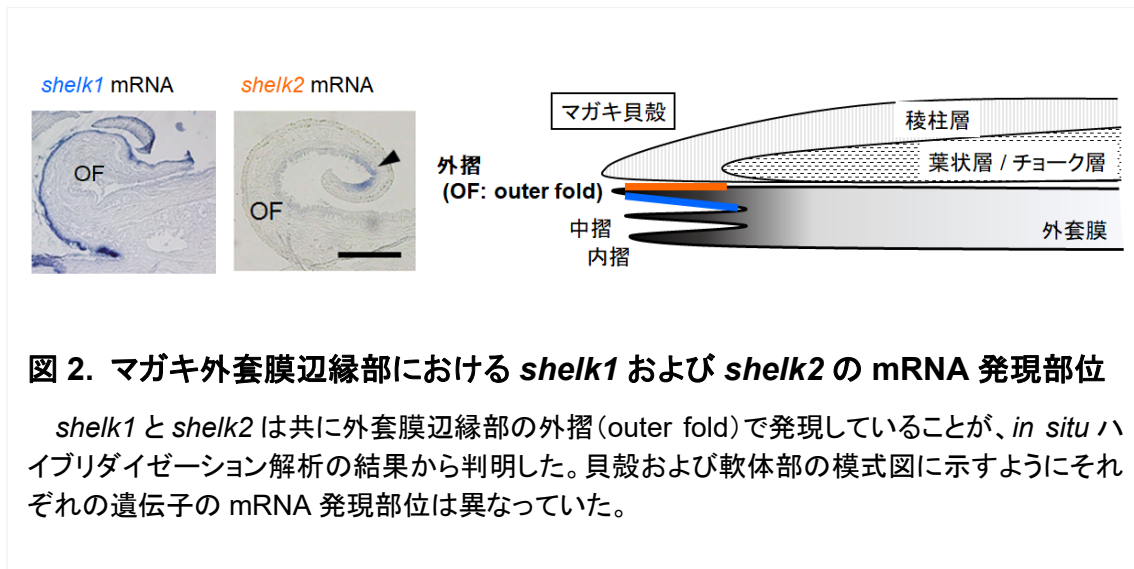
そこで、貝殻形成に関与する他の必須タンパク質を特定するために、Takagi (2007) はマガキ (*Crassostrea gigas*) を対象に、貝殻ではなく軟体部である外套膜に注目した研究を行った。外套膜は、貝殻の稜柱層形成に関与することが既に

報告されている (Miyamoto *et al.*, 1996)。Takagi は、外套膜に発現しマガキ貝殻の稜柱層形成に関与するタンパク質の探索を、外套膜辺縁部 (mantle edge) と外套縁膜 (mantle pallial) との間のサブトラクティブ・ハイブリダイゼーションにより行った結果、外套膜辺縁部に特異的に発現する数十種類の mRNA から cDNA がクローニングされた。得られた cDNA の配列情報から、その少なくとも二種類は新規遺伝子に由来すると考えられ、また興味深いことに、それらの演繹アミノ酸配列は節足動物が作り出すシルクタンパク質 (またはシルク・フィブロインや、単にフィブロインとも呼ばれる) と比較的高い相同性を持つことが判明した (図 1)。



そのうち片方の演繹アミノ酸配列は、ジョロウグモの一種である *Nephila clavipes* の作る巣の横糸を構成する flagelliform silk タンパク質の配列と類似しており、もう一方は、全長構造は不明だったが予想される断片配列での相同性検索から、ゴケグモの一種である *Latrodectus geometricus* の牽引糸の構成タンパク質 dragline silk の配列と類似していることが判明した。

これら二種類の遺伝子はその後、「貝殻中のシルクタンパク質」の遺伝子という意味でそれぞれ *shelk1*、*shelk2* と名付けられた (Takahashi *et al.*, 2012)。これまでに、*shelk1* はその遺伝子の全長配列が決定され、外套膜辺縁部での mRNA 発現が確認された (図 2; Takagi, 2007)。また、貝殻稜柱層内部における Shelk1 タンパク質の局在もその後の研究により確認された (Takagi, 2007; 竹村, 2008)。しかしながら、Shelk1 タンパク質の機能については、その部分配列ペプチドや断片タンパク質による炭酸カルシウム結晶形成への影響についての解析が進められたのみであり (川村, 2009; 外岡, 2009)、貝殻形成に対する Shelk1 タンパク質の機能全容は未だ判明していない。



一方で、断片情報ではあるが *shelk2* も外套膜辺縁部での mRNA 発現が実験的に示唆されたものの (図 2; 沖花, 2006)、遺伝子全長が未解明であり、貝殻形成における Shelk2 タンパク質の機能は一切分かっていなかった。

そこで本研究では、*shelk1* とほぼ同時に発見されたものの殆ど解析が進んでいない *shelk2* 遺伝子およびそのタンパク質の構造を決定し、その詳細な解析を行った。また、*shelk1* 遺伝子及び *shelk2* 遺伝子のノックダウンにより、それぞれのタンパク質 Shelk1、Shelk2 の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を明らかにした。

第1章 二種類のクモ糸相同タンパク質の構造比較

本章では、*shelk1* とほぼ同時に発見されたものの殆ど解析が進んでいない *shelk2* について遺伝子の全長配列の決定を行い、*shelk2* がコードするタンパク質 Shelk2 の演繹アミノ酸配列について詳細に解析した。さらに、Shelk1 と Shelk2 を比較し、それぞれのクモ糸相同タンパク質と実際のクモ糸構成タンパク質との配列相同性について検討した。

第1節 マガキ *shelk2* 遺伝子配列およびその演繹アミノ酸配列の決定

1.1.1. 材料と方法

すべての操作は一般的な分子クローニングの手法に基づくか、またはキット商品付属の操作指示プロトコルに従って行った。

マガキのゲノム DNA は、Takagi (2007) により抽出され保存されていたサンプルをそのまま用いた。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 用のサーマルサイクラーには、主に T-Gradient Thermoblock (Biometra) を用いた。また PCR 用の酵素には Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech) または TaKaRa Ex Taq (TAKARA) を使用し、標準的な反応条件により PCR 産物を得た。PCR 産物は外部サービス (Fasmac) を利用して配列情報の決定を行った。

アミノ酸配列の一次構造解析において、シグナル配列の予測にはウェブ公開プログラム SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を使用した。

shelk2 cDNA のクローニングと *shelk2* 遺伝子全長の決定

Rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR による *shelk2* cDNA のクローニングには、SMART RACE cDNA 増幅キット (Clontech) を使用した。5' RACE-PCR および 3' RACE-PCR に用いた配列特異的プライマー情報を表 1 に示す。

ゲノムウォーキング法による *shelk2* 遺伝子のクローニングには、得られた *shelk2* cDNA 配列に基づいて設計したプライマーを用い(表 1)、マガキのゲノム DNA (250 ng) を鋳型として GenomeWalker Universal Kit (Clontech) により *shelk2* 遺伝子を取得した。配列を決定後、公的データベースに配列情報を登録した (GenBank ID: AB474183)。

表 1 各プライマー配列.

cDNA cloning (RACE-PCRs)

5' -CTAATGGTCCATACGGTTTGTGATAATAG-3'

5' -CGTCATACTTGGAAATAGTGACTATAAGTG-3'

5' -GATCACCCGACCAAGTCCAGTGACAC-3'

5' -GTTCTATAAAAACCAAGCAAAAGACGAC-3'

shelk2 cloning

5' -ATGCTGAAGCTTGTCTCCATCGTTTGCCTT-3'

5' -TTAATAGGTCTTTTTATGTCTGATGCCACC-3'

Southern blotting

5' -GTCATTGGAGGACTCGTCGG-3'

5' -TGGGACTGATCCGAATCCAC-3'

ゲノムサザンブロットティング

マガキのゲノム DNA は、3 種類の制限酵素 *Bam*H I、*Eco*R I および *Hind* III (TOYOBO) で切断したものをそれぞれ用いた。Digoxigenin UTP で標識されたサザンブロットティング用の DNA プローブ は、*shelk2* cDNA の部分配列 (231 bp; 図 3) を基にデザインし、表 1 に示すプライマーおよび alkali-labile DIG-11-dUTP (Roche) を用いて PCR により調製した。DNA の転写・固定用メンブレンには Biotin Plus 0.45 μ m (PALL) を用い、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) によりサザンブロットティングを行った。なお、洗浄条件はキットの標準プロトコルに従った。検出には、CDP-star (GE Healthcare)、Hi-RENDOL (FUJIFILM) および Hi-RENFIX (FUJIFILM) を用いた。

1.1.2. 結果と考察

shelk2 の完全長 cDNA 配列は、オープンリーディングフレーム (ORF) が 891 bp で構成され、想定される Shelk2 タンパク質の演繹アミノ酸配列は 297 残基であった (図 3)。RACE-PCR およびゲノムウォーキングの結果から、*shelk2* の cDNA はすべて単一のエクソンにマッピングされ、イントロンレスであることが判明した。

Shelk2 の一次構造のうち N 末端の 16 残基の配列 (MLKLVSIVCLFACTFA) はシグナルペプチドと予想され、これらは分泌シグナルであると考えられた。また、Shelk2 の演繹アミノ酸配列には合計 12 か所の反復ポリアラニン (poly-Ala) モチーフが認められた。これらの poly-Ala モチーフは、どれも単独では存在せず、2 つ以上のモチーフ単位で Shelk2 の全体に渡って分布していた。

```

1  GAT CAC CCG ACC AAG TCC AGT GAC ACC CAT TCA AAC GAA GAG AAA ATG CTG AAG CTT GTC
                                     M L K L V
61  TCC ATC GTT TGC CTT TTT GCC TGT ACA TTC GCA GGT GAT TAT AAC ACT TAT AGT CAC TAT
    S I V C L F A C T F A G D Y N T Y S H Y
121 TCC AAG TAT GAC GAC TAT TAT CAC AAA CCG TAT GGA CCA TTA GGT GGA GTC GGT GGA GTA
    S K Y D D Y Y H K P Y G P L G G V G G V
181 GGC TCA GGA ATT GTT GGC TCT GGT GGT GTC ATT GGA GGA CTC GTC GGT CTG GGT GGT GGA
    G S G I V G S G G V I G G L V G L G G G
241 TCT GCA ACT GCT AGT GCC GCC GCT GCA GGA AAT AGC GCA GCA GCA GCT GCT GCT GCT GCA
    S A T A S A A A A G N S A A A A A A A
301 GCT GGT CGA AAT GCT GCC GCC GCT GCT GCA GCT GCT GTA GGA CAA AAT GCT GCC GCC GCC
    A G R N A A A A A A A A V G Q N A A A
361 GCT GCA GCT GCC GCC GCT GGA CAA AAT GCT GCT GCC GCC GCT GCT GCT GCA TCT GCA AGT
    A A A A A A G Q N A A A A A A A S A S
421 GGA TTC GGA TCA GTC CCA ACC TTT CCA TAC TAT GGT ACT CCC TAC TAT GGA TTC AAT TTA
    G F G S V P T F P Y Y G T P Y Y G F N L
481 GGA GGA GGA TCA GCT GCT GCC GCC GCT GCT GCT GCA AGC AGT GGC TCA GCT GCC GCC GCT
    G G G S A A A A A A A A S S G S A A A A
541 GCC GCC GCC GCT GCA TCT GCC AGC GGA CTT GGA TCA TTC CCA ACG TTT CCA TAC TAT GGT
    A A A A A S A S G L G S F P T F P Y Y G
601 GTC CCC TAC TAT GGA TTC AAT CTG GGA GGA GGA TCA GCT GCT GCT GCC GCC GCT GCT GCC
    V P Y Y G F N L G G G S A A A A A A A
661 AGT GGT GGT TCT GCT GCT GCC GCT GCT GCT GCA TCT GCC AGT AGA TTT GCA TCA TTC CCC
    S G G S A A A A A A A S A S R F A S F P
721 TAT TAT TAT GGA AAC CAA GTT AGC TTT CCT TAC TAT GGA TTC AAT CTA GGA GGT GGA TCG
    Y Y Y G N Q V S F P Y Y G F N L G G G S
781 GCT GCT GCA GCC GCC GCT GCC GCT GCT GGA CAA AAT GCT GCC GCT GCC GCT GCC GCC GCC
    A A A A A A A A A A G Q N A A A A A A A
841 GCT GGA CAA AAC GCC GCT GCT GCC TCC GCT GCT GCT GCA TCC GGA AGT ATA TTC AAC GGA
    A G Q N A A A A S A A A A S G S I F N G
901 CCT ATT TTT GGT GGC ATC AGA CAT AAA AAG ACC TAT TAA AGA AAA GTG ACG TCG TCT TTT
    P I F G G I R H K K T Y *
961 GCT TGG TTT TTA TAG AAC TTA TAA AAA ATA AAA CTG ATT AAT GCT AAA AAA AAA AAA AAA
1021 AAA AAA AAA AAA
    
```

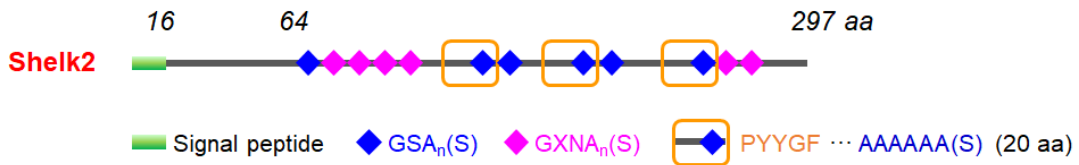


図 3. *shelk2* の cDNA 配列および Shelk2 タンパク質の演繹アミノ酸配列

シグナルペプチドと推定される N 末端の 16 残基のアミノ酸 (1 文字表記) を斜体で示す。またストップコドンの位置はアスタリスクで示す。矢印で示す配列部分は、ゲノムサザンブロットティングに使用したプライマーの結合部位を表す。

模式的に表した Shelk2 の 1 次構造と、その特徴的なモチーフの分布図に示すとおり、合計 12 か所の poly-Ala モチーフが存在し、それらは GSA_n(S)と GXNA_n(S)の 2 種類に大別できる (X=Q, R, none)。

各 poly-Ala モチーフは、GSA_n(S) および GXNA_n(S) (X = Q, R, none) の 2 群に大別でき、いずれも 6-10 個の連続したアラニン残基で構成されていた。また

その連続アラニン配列部分 (A_n) の一部は他のアミノ酸で置換されている場合もあり、その多くはセリン (S) やスレオニン (T) であった。さらに、 $GSA_n(S)$ モチーフのうち 3 か所には、その N 末端側に PYYGFNLGG という特徴的な別のモチーフが確認できた。

マガキのゲノム DNA における *shelk2* の存在を確認するため、サザンブロッティングを行った結果、どの制限酵素で切断したゲノム DNA においても少なくとも 8 本のバンドが得られた (図 4)。このことから、マガキゲノム中には複数の *shelk2* 遺伝子またはその相同遺伝子の存在と分布が示唆された。また、マガキのゲノム DNA に対しあらためてゲノムウォーキングを行った結果、1-12 塩基が置換された 7 つの異なる *shelk2* 様の遺伝子をクローニングすることができた (GenBank ID: AB526832-AB526838)。

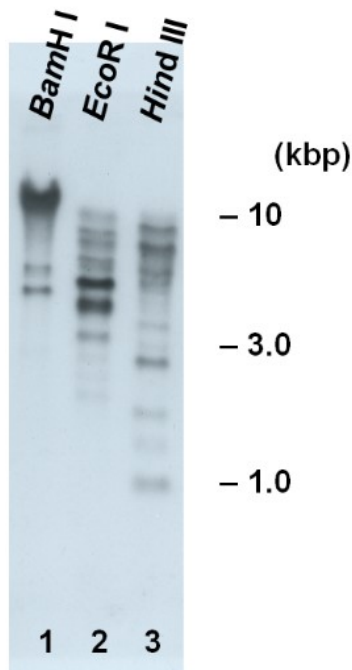


図 4. サザンブロッティングの結果

マガキのゲノム DNA をいずれの制限酵素で切断した場合にも、複数のバンドが確認された。

これまでの報告によると、*shelk2* mRNA は外套膜辺縁部に常に発現が認められるほか、貝殻を破損させた場合にはその修復期において経時的に発現量が増加することが確認されており（沖花, 2006）、マガキにおいて *shelk2* 遺伝子は常に一定量以上の発現が必要な遺伝子であると予想されていた。実際、サザンブロットティングの結果および Shelk2 がイントロンレスのタンパク質であるという事実からも、*shelk2* 遺伝子および Shelk2 タンパク質がマガキにとって重要な因子であるという可能性が示唆された。

第2節 マガキ Shelk2 タンパク質の相同配列検索

マガキ *shelk2* 遺伝子の全長が特定され、コードする Shelk2 のタンパク質配列が判明したことから、データベースを用いて相同性タンパク質を探索することとした。

1.2.1. 方法

データベースによる相同性タンパク質の探索

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および初期分岐後生動物のタンパク質に特化した Compagen (<http://compagen.zoologie.uni-kiel.de/>) の両ウェブサイトにて、初期設定の検索条件 (期待閾値 $E \leq 10$) でマガキ Shelk2 のタンパク質配列相同性検索を実施した。対象データベースは利用可能なすべての非冗長タンパク質データベース (all non-redundant GenBank coding sequence translations, RefSeq proteins, PDB, SwissProt, PIR および PRF) とした。また、マガキ Shelk2 の典型的な poly-Ala モチーフについては、protein blast (BLASTP 2.2.26+) および pattern-hit initiated (PHI)-BLAST の両アルゴリズムを用い、アラニン連続配列長は 8 残基 (A_8) として検索を実施した (Altschul *et al.*, 1990, 1997)。

1.2.2. 結果と考察

マガキにとって Shelk2 は重要なタンパク質だと考えられたが、タンパク質データベースによる検索では、Shelk2 の全長配列と相同な既知の配列は特に何も見つからなかった。一方、poly-Ala モチーフによる検索では、クモやガなどの昆

虫のタンパク質や哺乳動物の HOXA13 などにおいて、アラニンの連続配列の存在が確認された (表 2)。

表 2 poly-Ala モチーフを有するタンパク質のデータベース検索結果.

Description	Organism	Species	Protein ID	DB	Reference
Elastin,	Cattle	<i>Bos taurus</i>	AAA30498	GenBank	Cicila et al (1985)
Tropoelastin	Human	<i>Homo sapiens</i>	P15502	Swiss-Prot	Indik et al (1987)
	Mouse	<i>Mus musculus</i>	AAA80155	GenBank	Wydner et al (1994)
	Rat	<i>Heterocephalus glaber</i>	EHB08298	GenBank	Kim et al (2011)
		<i>Rattus norvegicus</i>	AAA42269	GenBank	Pierce et al (1990)
Silk,	Bee	<i>Bombus terrestris</i>	ABW21697	GenBank	Sutherland et al (2007)
Fibroin,	Hornet	<i>Vespa simillima xanthoptera</i>	BAF95003	GenBank	Sezutsu et al (2007)
Spidroin	Moth	<i>Actias selene</i>	ADA59934	GenBank	Cao et al (Unpublished)
		<i>Antheraea mylitta</i>	AAN28165	GenBank	Datta et al (2001)
<i>Antheraea pernyi</i>		AAC32606	GenBank	Sezutsu and Yukuhiro (2000)	
<i>Cricula trifenestrata</i>		AEC46903	GenBank	Suriana et al (2011)	
<i>Hepialus californicus</i>		ADE58103	GenBank	Collin et al (Unpublished)	
<i>Rhodinia fugax</i>		BAG84270	GenBank	Sezutsu et al (2008)	
Spider	Spider	<i>Araneus diadematus</i>	AAC47009	GenBank	Guerette et al (1996)
		<i>Araneus ventricosus</i>	AEV46833	GenBank	Lee et al (Unpublished)
		<i>Argiope amoena</i>	AAR13812	GenBank	Pan et al (Unpublished)
		<i>Argiope aurantia</i>	AAK30591	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Argiope trifasciata</i>	AAK30595	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Avicularia juruensis</i>	ACF71408	GenBank	Bittencourt et al (Unpublished)
		<i>Bothriocyrtum californicum</i>	ABW80566	GenBank	Garb et al (2007)
		<i>Deinopis spinosa</i>	ABD61593	GenBank	Garb et al (2006)
		<i>Diguetia canities</i>	ADM14315	GenBank	Garb et al (2010)
		<i>Dolomedes tenebrosus</i>	AAK30599	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Euagrus chisoseus</i>	AAK30600	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Euprosthenoops australis</i>	CAJ00428	GenBank	Stark et al (2007)
		<i>Gasteracantha cancriformis</i>	AAK30601	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Latrodectus geometricus</i>	AAK30602	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Latrodectus hesperus</i>	AAY28936	GenBank	Garb and Hayashi (2005)
		<i>Nephila clavata</i>	AAL32472	GenBank	Ma et al (Unpublished)
		<i>Nephila clavipes</i>	P46804	Swiss-Prot	Hinman and Lewis (1992)
		<i>Nephila inaurata madagascariensis</i>	AAK30607	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Nephila senegalensis</i>	AAK30608	GenBank	Gatesy et al (2001)
		<i>Nephilengys cruentata</i>	ABR37275	GenBank	Bittencourt et al (2007)
<i>Plectreurys tristis</i>	AAK30610	GenBank	Gatesy et al (2001)		
<i>Tetragnatha kauaiensis</i>	AAK30614	GenBank	Gatesy et al (2001)		
<i>Uloborus diversus</i>	ABD61596	GenBank	Garb et al (2006)		
HOXA13	Cat	<i>Felis catus</i>	AAD54640	GenBank	Mortlock et al (2000)
	Dog	<i>Canis lupus familiaris</i>	AAD54641	GenBank	Mortlock et al (2000)
	Echidna	<i>Tachyglossus aculeatus</i>	ABR32178	GenBank	Lehoczkzy and Innis (2008)
	Human	<i>Homo sapiens</i>	AAC50993	GenBank	Mortlock and Innis (1997)
	Opossum	<i>Monodelphis domestica</i>	AAD54642	GenBank	Mortlock et al (2000)
Peroxidase	Cuttlefish	<i>Euprymna scolopes</i>	AAA16244	GenBank	Tomarev et al (1993)
		<i>Sepia officinalis</i>	CAA72331	GenBank	Gesualdo et al (1997)
MSI60	Pearl oyster	<i>Pinctada fucata</i>	BAA20466	GenBank	Sudo et al (1997)

序章でも述べたように、先行研究において Shelk2 との類似性が予想されていた *L. geometricus* (ゴケグモの一種) の dragline silk タンパク質や (Gatesy *et al.*, 2001)、*Antheraea pernyi* (ヤマユガ科サクサン) のフィブロイン (Sezutsu and Yukihiro, 2000) も poly-Ala モチーフとの相同性検索でヒットすることから、これらのタンパク質との類似性は主に poly-Ala モチーフの存在と相同性によるものと考えられた。これら検索結果で見つかった対象の poly-Ala モチーフの多くは、Shelk2 に見られる 6-10 残基よりも多いアラニンを含んでいる一方で、poly-Ala モチーフの長さが Shelk2 に最も類似するものは、ジョロウグモの一種である *N. clavipes* の Spidroin2 (GenBank ID: M92913) であることが判明した (図5)。

軟体動物における poly-Ala 配列は他に、アコヤガイ (*Pinctada fucata*) のタンパク質である MSI60 に存在が確認された (Sudo *et al.*, 1997)。MSI60 と Shelk2 のアミノ酸配列の相同性は高くはないものの、MSI60 の分子内にも計 13 か所の poly-Ala モチーフ様の配列が認められた。そのうち 4 つは Shelk2 にも存在する $GSA_n(S)$ モチーフと類似したものだったが、Shelk2 で見つかった $GXNA_n(S)$ ($X = Q, R, \text{none}$) というモチーフと類似したものは MSI60 には見つからなかった。また、各 poly-Ala モチーフ内で連続するアラニンの数も、MSI60 では 9-13 個と Shelk2 の 6-10 個よりも多いことから、MSI60 と Shelk2 の poly-Ala モチーフはそれぞれ異なる機能を有している可能性も考えられる。


```

Spidroin2  348  GPGSASAAAAAAGPGQOGPGGYGPGQOGPSGPGSASAAAAAAGPGGY
(M92913)    * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Shelk2     146  GGSAAAAAASS-----GSAAAAAASAS---

Spidroin2  397  GPGQOGPGGYAPGQOGPSGPGSASAAAAAAGPGGYGPGQOGPGGYAP
* *      *      *      * ** * ** * ** * ** * ** *
Shelk2     174  GLGSFPTFPYYGVYYGFNLGGSAAAAAASG-----

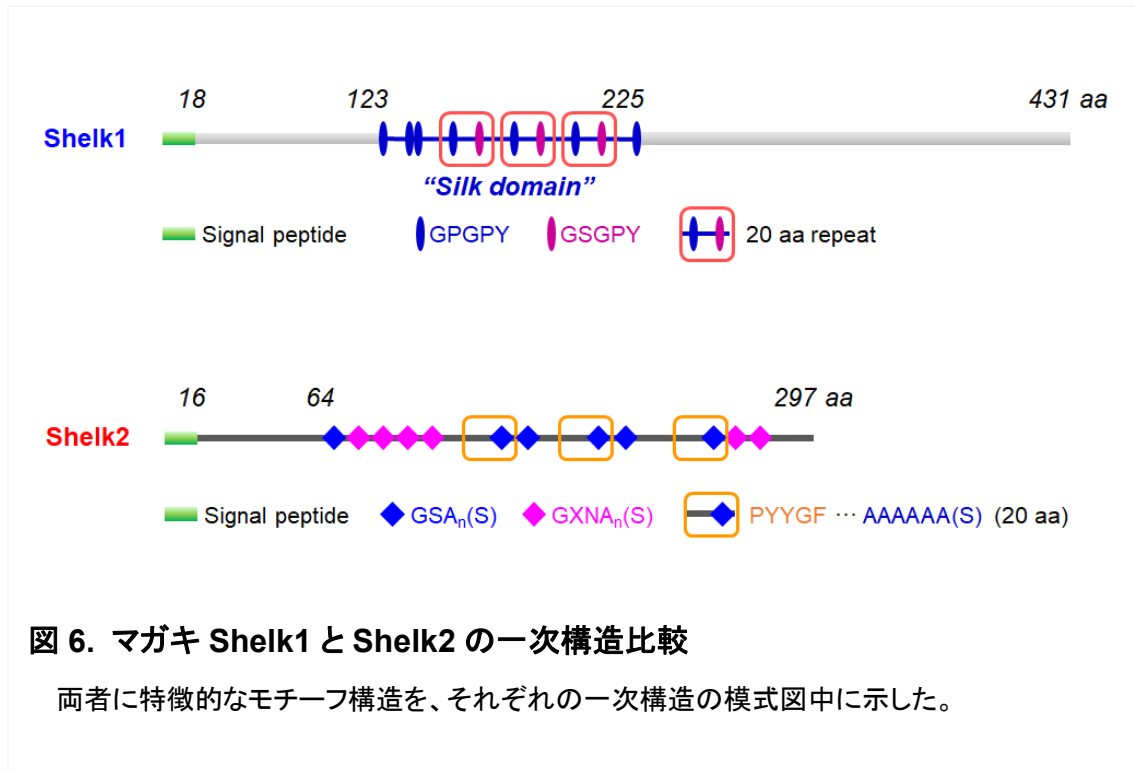
Spidroin2  446  GQOGPSGPGSAAAAAAGPGGYGPAQQ
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Shelk2     208  -----GSAAAAAASASRFASFPYY
    
```

図 5. Shelk2 と Spidroin2 の poly-Ala モチーフを含む部位のアライメント比較

N. clavipes (ジョロウグモの一種) の Spidroin2 (GenBank ID: M92913) と、マガキの Shelk2 とのアライメント結果を示す。poly-Ala モチーフの長さが両者でほぼ一致する箇所を複数確認できた。

第3節 Shelk1 および Shelk2 の一次構造比較

図6に、Takagi (2007) により解析された Shelk1 の一次構造と、本研究により新たに同定した Shelk2 の一次構造を模式的に比較する。



Shelk1 と Shelk2 は、共にイントロンレスの遺伝子に基づくタンパク質である点、分泌シグナルと想定されるシグナル配列を N 末端に保有する点、それぞれ特徴的なモチーフを持ちそれらがクモ糸構成タンパク質との相同性に寄与している点で共通していた。また、両クモ糸相同タンパク質において、それぞれに特徴的なモチーフ構造は、Shelk1 では GPGGY と GSGPY、Shelk2 では $GSA_n(S)$ と $GXNA_n(S)$ ($X = Q, R, \text{none}$) というように、僅かな配列の違いで 2 群ずつに分類できるという点でも類似していた。

Shelk1、Shelk2 共に上記とは別の特徴的なモチーフを含む 20 残基のアミノ酸の繰り返し配列が、いずれも分子内に 3 か所確認されたという点も興味深い。これら 20 残基の分子内 3 回繰り返し配列に着目した Shelk1、Shelk2 それぞれの分子進化的な解析検討は、本研究と同時期に行われた研究において既に実施され、分子内でどの順番に遺伝子複製が起きた可能性が高いのか考察されている(竹尾, 2007; 上田, 2010)。また、クモ糸タンパク質に見られるモチーフ構造との比較により、軟体動物のマガキと節足動物のクモという離れた動物門の生物間で収斂的に進化しそれぞれで獲得したものだとは結論付けられている。

一方で、両タンパク質で異なる点としては、Shelk1 はクモ糸タンパク質と相同性の高い領域が「シルクドメイン」と名付けられた 124-225 残基の位置に集中しているのに対し (Takagi, 2007)、Shelk2 ではクモ糸タンパク質と相同な poly-Ala モチーフが配列のほぼ全体に渡って存在することが挙げられる。また、Shelk1 の GPGGY または GSGPY モチーフは 1 か所を除いてそれぞれ独立して分布しているのに対し、Shelk2 の各 poly-Ala モチーフは最低 2 つ以上が隣接して存在するという違いも認められた。

さらに異なる点として、Shelk1 の内部にはシルクドメインを中心にアスパラギン酸 (D) やグルタミン酸 (E) といった酸性官能基を側鎖に持つアミノ酸が分子内に点在し、おそらくそれらの酸性アミノ酸が Ca^{2+} イオンと相互作用することで炭酸カルシウム結晶形成に影響していると考えられているが (Takagi, 2007)、一方で Shelk2 は酸性アミノ酸に乏しくアスパラギン酸が N 末端側付近の領域に僅か 3 残基存在するのみであった (図 3)。

これらの事実から、Shelk1 と Shelk2 はそれぞれ別々の機能を有しているものと予想された。Shelk1 に類似したクモ糸タンパク質である flagelliform silk と、Shelk2 に類似したクモ糸タンパク質である dragline silk とが、それぞれクモの巣における横糸とクモの牽引糸という別々の役割を担っているのと同様に、Shelk1 と Shelk2 が貝殻（稜柱層）の形成において異なる機能を担っている可能性が考えられた。

第2章 マガキ近縁種におけるクモ糸相同タンパク質の探索

現在知られている牡蠣は世界中に60種以上あり、その43種以上が *Ostrea* 属、*Crassostrea* 属、*Saccostrea* 属のいずれかに分類されている(飯塚と荒西, 2008)。マガキとイワガキ (*Crassostrea nippona*) は、共に日本の漁業と文化において特に重要であるが、どちらも *Crassostrea* 属に分類される種である。マガキは、北極圏と南極圏を除く河口を含む沿岸地域に世界的に広く分布しているのに対し(Matthiessen, 2000)、イワガキは日本近海で潮間帯より深い岩礁に着生して生息することが確認されているのみで、他の地域での報告例は見られない。

前章で述べたとおり、*shelk2* の相同タンパク質のデータベース検索を行ったものの何も見つからなかった。序論でも触れたとおり、貝殻形成に関わる有機マトリックスだと考えられているタンパク質の多くは生物種間で配列が殆ど保存されておらず、一部を除き相同の遺伝子やタンパク質が見つかっていないという事実を踏まえると、この結果は妥当なのかもしれない。しかしながら一方で、*shelk1* は先行研究によりマガキの近縁種であるイワガキでも相同遺伝子が報告されている(竹尾, 2007)。そのため、イワガキや他のマガキ近縁種であれば *shelk2* の相同遺伝子も見つかることを期待し、マガキと同じ *Crassostrea* 属の近縁種を対象に *shelk2* の探索を行った。

第1節 マガキ近縁種における *shelk2* 遺伝子のクローニング

2.1.1. 材料と方法

マガキ *shelk2* の cDNA がイントロンレスであることから、マガキ *shelk2* の ORF 全長のクローニングが可能なプライマーを用いることで、マガキ近縁種のゲノム DNA から *shelk2* 遺伝子が見つかることを期待し、マガキ *shelk2* 遺伝子の全長プライマー (*shelk2* のクローニングに用いたものと同じもの / 表 1 参照) を用いて近縁種のゲノム DNA に対し PCR を行うこととした。

マガキおよびイワガキのゲノム DNA は、先行研究において調製され保存されていたサンプルをそのまま用いた (Takagi, 2007; 竹尾, 2007)。バージニアカキ (*Crassostrea virginica*) は市場で購入し、シカメガキ (*Crassostrea sikamea*) は熊本県水産研究センターの荒木氏から稚貝を提供いただき、それぞれ実験に供した。シカメガキとバージニアカキのゲノム DNA は、先行研究に倣い抽出した (Asahida *et al.*, 1996)。

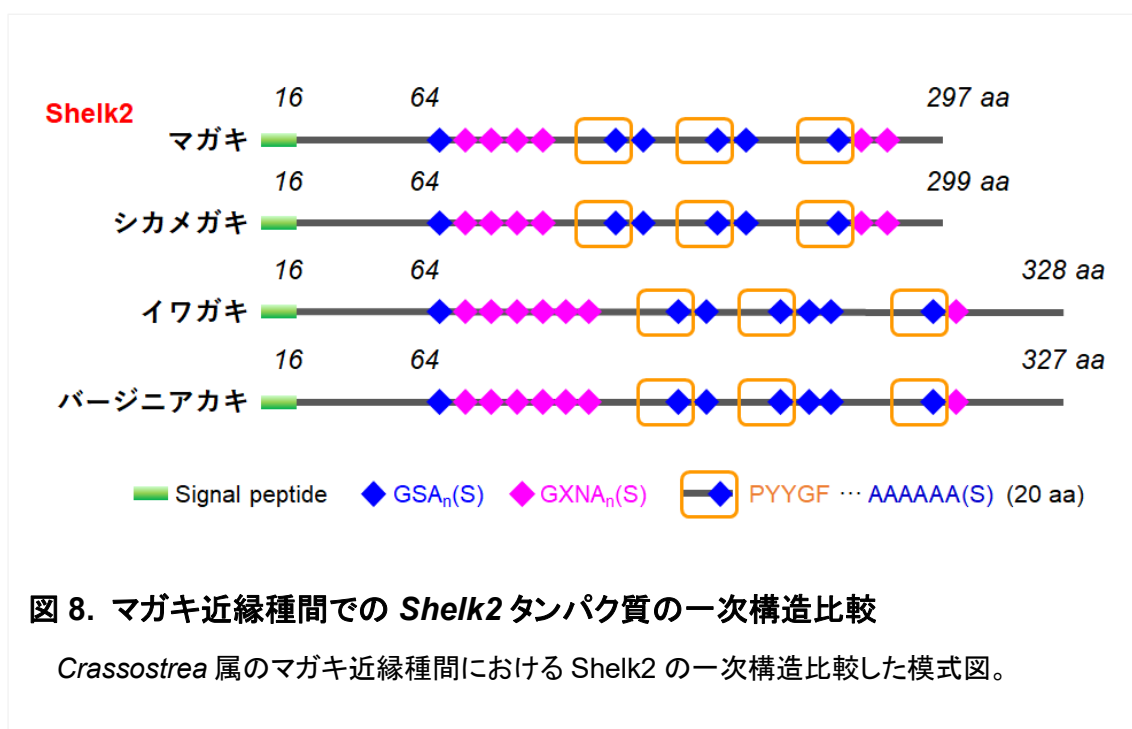
各マガキ近縁種由来の *shelk2* 遺伝子を得た後、外部サービス (Fasmac) を利用して遺伝子配列情報の決定を行った。

2.1.2. 結果と考察

シカメガキの *shelk2* 遺伝子と予想される ORF 領域の長さは、マガキとほぼ同じ長さの 897 bp であり、またイワガキおよびバージニアカキの予想される ORF 領域の長さも非常に類似しており、それぞれ 984 bp と 981 bp であった。

得られた各 *shelk2* 遺伝子の情報から、マガキとその近縁種での演繹アミノ酸

各 poly-Ala モチーフ部分における特徴として、モチーフの数の違いには近縁種間で差があるものの、モチーフ内部にはアミノ酸置換の変異が非常に少ないことが分かった。逆に、poly-Ala モチーフ構造ではない部分には相対的にアミノ酸が置換される変異が多く認められた。このことから、Shelk2 タンパク質にとって poly-Ala モチーフの保存と維持が特に重要であると推察された。



さらに詳細な情報を得るために、各マガキ近縁種の Shelk2 の poly-Ala モチーフに用いられているすべてのアラニン残基のコドン使用頻度を比較した (表 3)。アラニンは GCT、GCC、GCA、GCG の 4 種類のコドンによりコードされるが、各マガキ近縁種の Shelk2 における poly-Ala モチーフでは生物種によらず GCT の使用頻度がおよそ半分を占めていた。一方で、GCG コドンはマガキとシカメガキの poly-Ala モチーフでは全く用いられておらず、イワガキとバージニアカキでも 1 か所でしか使用されていなかった。

図 7 および表 3 から明らかなように、イワガキとバージニアカキの poly-

Ala モチーフを比較した際、イワガキに 1 か所のアラニンの挿入が認められるのみで他はすべて相同であるが、マガキとシカメガキ poly-Ala モチーフ内のアラニンのコドンには多くの変異が入っていることが分かる。このことから、やはり Shelk2 にとっては poly-Ala モチーフ中のアラニンのアミノ酸置換は好ましくなく、アミノ酸変化を伴わない変異のみが許容されていると考えられる。

表 3 マガキ近縁種 Shelk2 の各 poly-Ala モチーフに含まれるアラニンのコドン.

<i>C. gigas</i>						<i>C. sikamea</i>					
	Ala num.	Ala codons					Ala num.	Ala codons			
		GCT	GCC	GCA	GCG			GCT	GCC	GCA	GCG
GSATASAAAA	6	2	2	2	0	GSAAASAAAA	7	3	2	2	0
GNSAAAAAAAA	9	5	0	4	0	GNSAAAAAAAA	9	5	0	4	0
GRNAAAAAAAA	8	5	2	1	0	GRNAAAAAAAA	8	5	2	1	0
GQNAAAAAAAA	10	4	5	1	0	GQNAAAAAAAA	10	3	6	1	0
GQNAAAAAAAAASA	9	5	2	2	0	GQNAAAAAAAAASA	9	5	2	2	0
GSAAAAAAAAAS	8	5	2	1	0	GSAAAAAAAAAS	8	6	1	1	0
GSAAAAAAAAASA	10	3	6	1	0	GSAAAAAAAAASA	10	3	6	1	0
GSAAAAAAAA	8	5	3	0	0	GSAAAAAAAA	8	5	3	0	0
GSAAAAAAAAASA	8	5	2	1	0	GSAAAAAAAAASA	10	7	2	1	0
GSAAAAAAAA	9	5	3	1	0	GSAAAAAAAA	9	5	3	1	0
GQNAAAAAAAA	9	3	6	0	0	GQNAAAAAAAA	9	4	5	0	0
GQNAAAASAAAA	8	5	2	1	0	GQNAAAASAAAA	8	5	2	1	0
Average	8.5	4.3	2.9	1.3	0.0	Average	8.8	4.7	2.8	1.3	0.0
Frequency		0.51	0.34	0.15	0.00	Frequency		0.53	0.32	0.14	0.00

<i>C. nippona</i>						<i>C. virginica</i>					
	Ala num.	Ala codons					Ala num.	Ala codons			
		GCT	GCC	GCA	GCG			GCT	GCC	GCA	GCG
GSAAASAAA	6	3	2	1	0	GSAAASAAA	6	3	2	1	0
GNSAAAAAAAA	9	5	1	3	0	GNSAAAAAAAA	9	5	1	3	0
GQNAAAAAAAA	9	6	2	1	0	GQNAAAAAAAA	9	6	2	1	0
GQNAAAAAAAA	9	3	4	1	1	GQNAAAAAAAA	9	3	4	1	1
GRNAAAAAAAA	8	5	0	3	0	GRNAAAAAAAA	8	5	0	3	0
GQNAAAAAAAA	9	3	5	1	0	GQNAAAAAAAA	9	3	5	1	0
GRNAAAAAAAAASA	9	4	2	3	0	GQNAAAAAAAAASA	9	4	2	3	0
GSAAAAAAAA	9	5	3	1	0	GSAAAAAAAA	8	5	2	1	0
GSAAAAAAAAASA	10	4	5	1	0	GSAAAAAAAAASA	10	4	5	1	0
GSAAAAAAAA	9	4	4	0	1	GSAAAAAAAA	9	4	4	0	1
GSAAAAAAAA	9	5	4	0	0	GSAAAAAAAA	9	5	4	0	0
GSAAAAAAAAASA	9	4	4	1	0	GSAAAAAAAAASA	9	4	4	1	0
GSAAAAAAAA	9	5	4	0	0	GSAAAAAAAA	9	5	4	0	0
GQNAAAASAAAA	8	5	2	1	0	GQNAAAASAAAA	8	5	2	1	0
Average	8.7	4.4	3.0	1.2	0.1	Average	8.6	4.4	2.9	1.2	0.1
Frequency		0.50	0.34	0.14	0.02	Frequency		0.50	0.34	0.14	0.02

第2節 クモ糸相同タンパク質と貝殻構造の関連性

Shelk1 は、既に先行研究によりイワガキにも存在することが確認されているが、マガキ Shelk1 で見られた GSGPY モチーフはイワガキ Shelk1 では確認されず、また GPGPY モチーフも減少し、シルクドメイン全体ではクモ糸タンパク質に類似したモチーフが半減することが判明している（竹尾, 2007）。また、本章第1節で述べたように、Shelk2 にとって poly-Ala モチーフの保存・維持が重要であることが示唆された一方で、マガキとイワガキの poly-Ala モチーフの数と分布は大きく異なっていた。

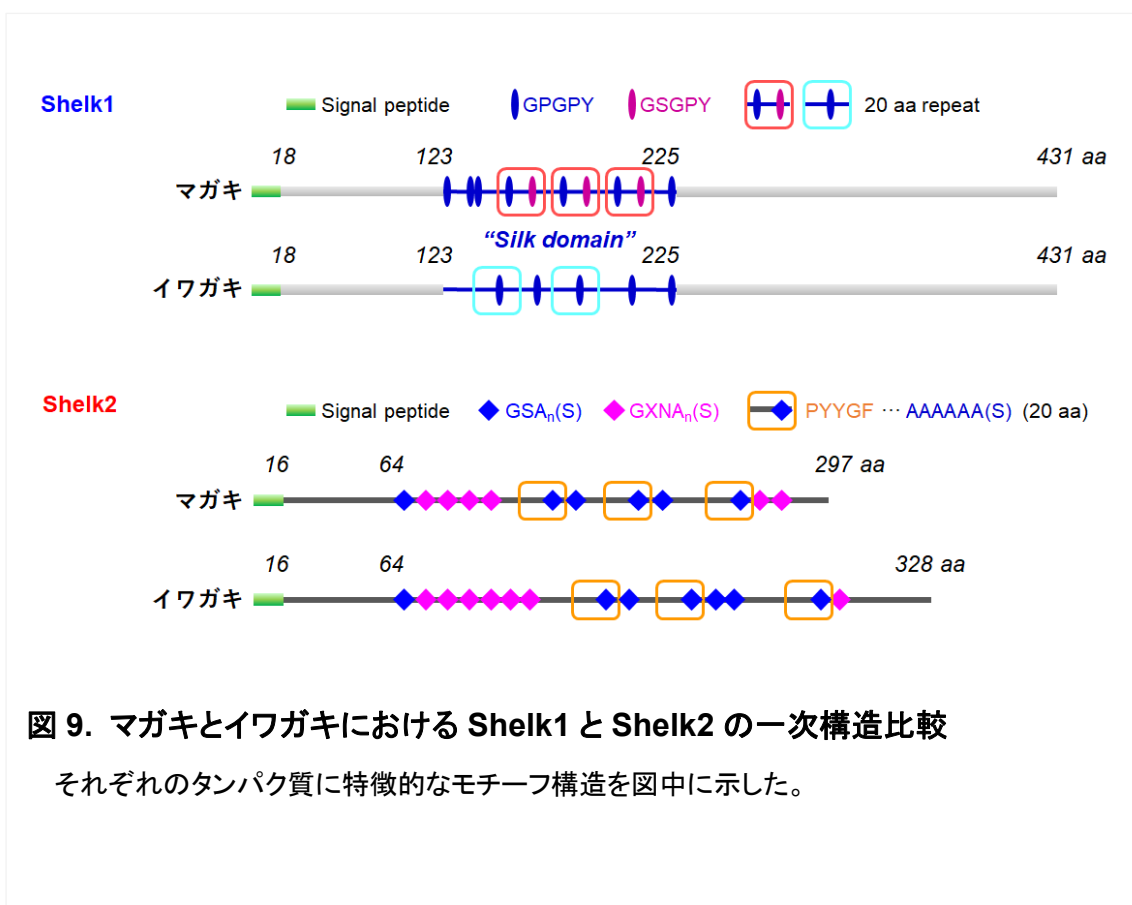


図 9. マガキとイワガキにおける Shelk1 と Shelk2 の一次構造比較

それぞれのタンパク質に特徴的なモチーフ構造を図中に示した。

マガキとイワガキの Shelk1 と Shelk2 の一次構造および特徴的なモチーフの情報を図9に模式的に示す。クモ糸タンパク質の持つモチーフに類似した Shelk1 または Shelk2 に特徴的な各モチーフ構造の数や分布の差が、わずかな違いとなってマガキとイワガキの貝殻形成に影響し、それが両者の貝殻の形状や物理特性に反映されている可能性を考慮し、まずマガキとイワガキの貝殻（特に稜柱層）の構造や物理特性に差が見られないか検討した。

2.2.1. 材料と方法

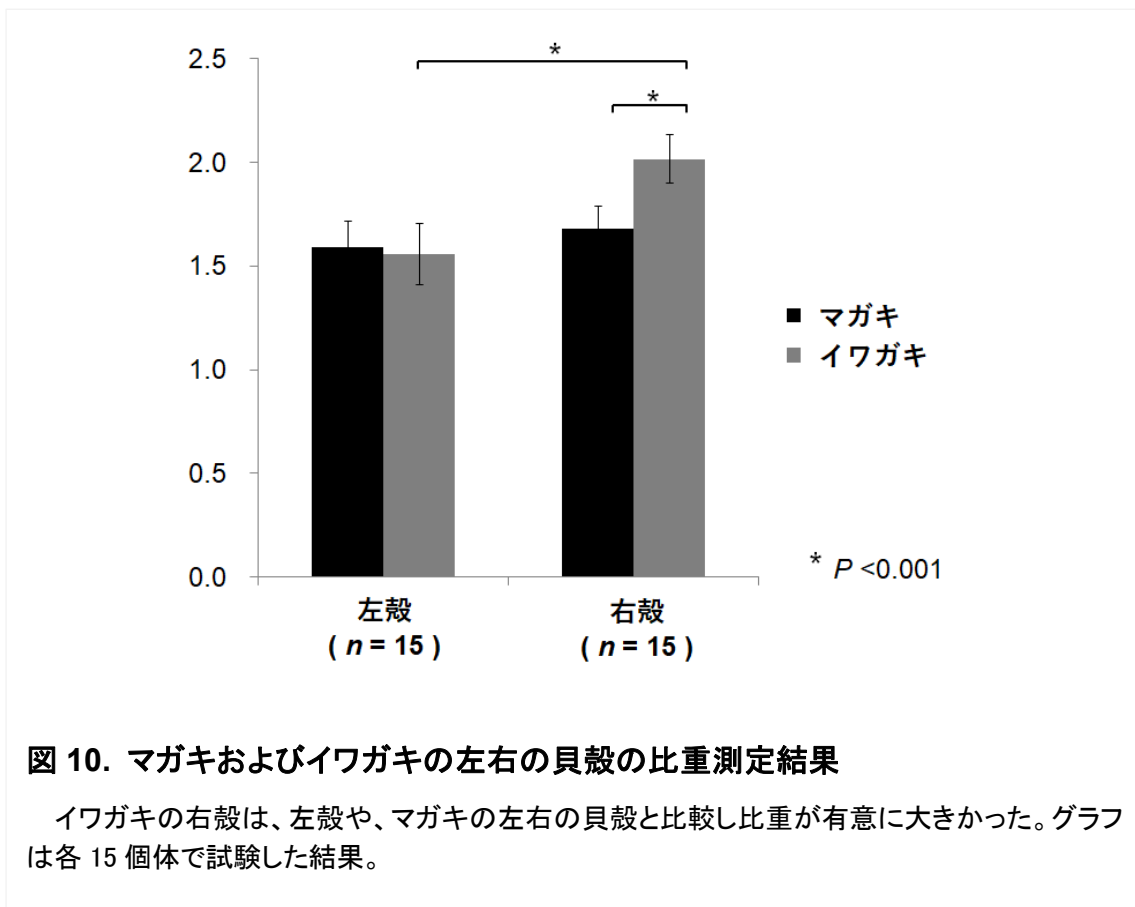
市販のマガキおよびイワガキを各 15 個体ずつ購入し、それぞれの貝殻を右殻と左殻に分けた上で、それぞれの空気中および水中での重さを SANKO 500-g バネ式手秤（三光精衡所）で秤量した。貝殻の比重は以下の計算式により求めた。なお、水の密度は 1.0 g/mL として計算した。

$$\text{比重} = \frac{\text{貝殻の質量}}{\text{貝殻の体積と同じ量の水の質量}} = \frac{\text{空気中での重量}}{\text{空気中での重量} - \text{水中での重量}}$$

秤量したマガキとイワガキの左右の殻は、ダイヤモンドカッターを有する岩石切断機 Bench Saws 8L（ニチカ）により切断し、走査型電子顕微鏡（SEM）での観察に用いた。各貝殻断面の SEM 観察は Miniscope TM3000（日立ハイテクノロジーズ）により行った。

2.2.2. 結果と考察

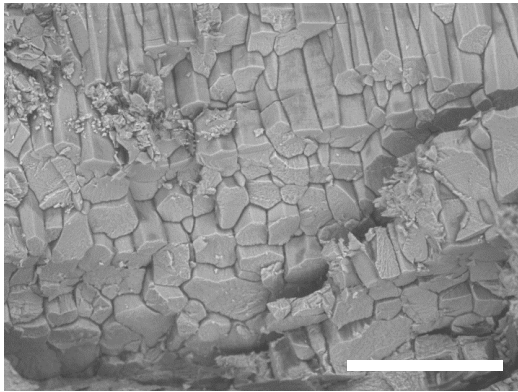
マガキおよびイワガキの左右の殻の比重を比較した結果、マガキは左殻の比重が 1.59 ± 0.12 、右殻が 1.68 ± 0.11 、イワガキは左殻の比重が 1.56 ± 0.15 、右殻が 2.02 ± 0.12 となり、興味深いことにイワガキの右殻のみ他と比べて有意に比重が大きかった (図 10)。



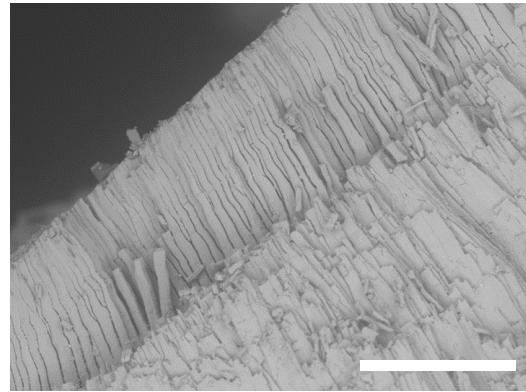
この結果は予想していなかったが、おそらくは生息環境の違いが影響しているものと考えられる。すなわち、マガキは主に泥地の上に生息しているため、泥に埋もれないよう貝殻全体を軽くする必要があると考えられる。一方、イワガキは岩礁や沖合に生息するため、波に流されないようにマガキとは逆に貝殻が重くなるように進化したものと考えられる。マガキもイワガキも左殻は他の貝殻

や岩礁などに固定し生息するため、固定化される左殻よりも蓋の役割を兼ねる右殻の重量を制御する必要性が生じ、イワガキでは右殻の比重が他と比べて大きくなったのではないかと予想される。

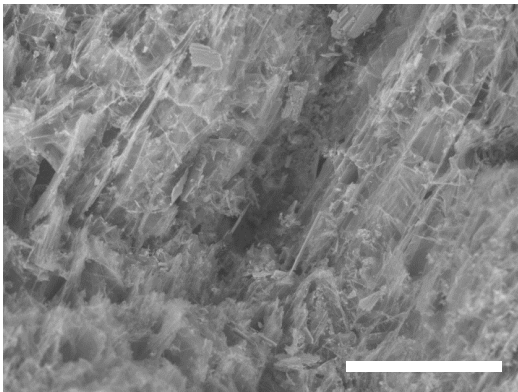
マガキ:稜柱層



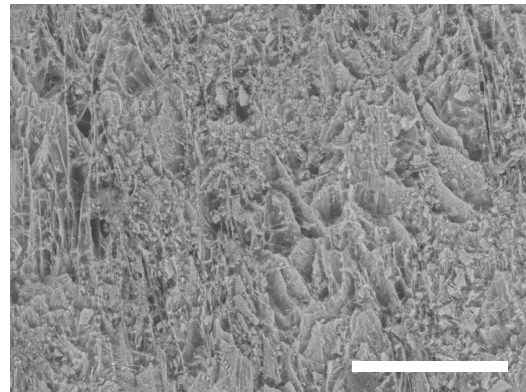
イワガキ:稜柱層



マガキ:チョーク層



イワガキ:チョーク層



Bar: 100 μ m

図 11. マガキおよびイワガキの右殻断面の SEM 観察結果

イワガキの稜柱層とチョーク層は共に、マガキと比較し密な構造であることが観察された。スケールバーは 100 μ m を表す。

マガキとイワガキの左右の貝殻断面の SEM 観察の結果、それぞれの左殻同士に顕著な差は見られなかったが、右殻では明らかにイワガキの方がマガキよりも密な構造が観察された。それらは稜柱層とチョーク層において顕著であり、特に稜柱層はイワガキの方が個々の稜柱が細く、数が多かった (図 11)。

Shelk1 も Shelk2 も、外套膜辺縁部に発現する遺伝子がコードするタンパク質であるため、どちらも稜柱層形成に関わっている可能性が高い。比重測定と SEM 観察の結果から、マガキとイワガキの右殻の物理特性の差に稜柱層の構造の違いが少なからず影響していることは明らかであり、この違いにマガキとイワガキにおける Shelk1 や Shelk2 の機能の差が影響しているのかもしれない。もちろん、貝殻形成に関わる他の有機基質がより強く影響していることも考えられるため一概には言い切れないが、非常に近縁な 2 つの生物種で見つかった相同タンパク質の僅かな構造と機能の違いが、このような近縁種間の貝殻の物理特性の差に影響している可能性は十分に考えられる。

第3章 二種類のクモ糸相同タンパク質の機能解析

クモ糸相同タンパク質 Shelk1 および Shelk2 の有無または増減が貝殻形成にどのような影響を与えるのかを直接的に調べるために、貝殻の一部を人為的に損傷させた状態でマガキの *shelk1*、*shelk2* 遺伝子発現をそれぞれノックダウンし、貝殻形成への影響を SEM 観察により確認した。

3.1. 材料と方法

市販のマガキ成体（殻長 5-7 cm、殻高 7-11 cm）は、実験に使用する前に人工海水で 1 日間馴化した。なお、二枚貝を用いた RNA 干渉 (RNAi) 実験の手法は先行研究を参照した (Suzuki *et al.*, 2009; Funabara *et al.*, 2014)。

RNAi 実験用の二本鎖 RNA (dsRNA) の調製

shelk1 および *shelk2* それぞれの全長 dsRNA 合成、並びに対照実験用となるマガキとは無関係な緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の遺伝子（以下、本論文では *EGFP* と記載）の全長 dsRNA 合成には、T7 RiboMAX Express RNAi System (Promega) を使用した。dsRNA 合成用の PCR プライマーは、マガキ *shelk1* および *shelk2* の cDNA 配列と、*EGFP* の配列に基づいて設計した (表 4)。また、それぞれの dsRNA 合成用の鋳型となる各二本鎖 DNA (dsDNA) は、*shelk1*、*shelk2* および *EGFP* の各遺伝子を TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa) または PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR で増幅させ、それぞれの PCR 産物を予め pTAC-2 プラスミドベクター (BioDynamics

Laboratory) にクローニングし調製したものを用いた。なお、PCR には、サーマルサイクラーT-Gradient Thermoblock (Biometra) を主に用いた。

表 4 RNAi 実験用の dsRNA 調製および qPCR に用いたプライマー.

<i>shelk1 dsRNA synthesis</i>	
S1-201 Fw	5'-ATGTCGTTACTGTGGTTCTGTG-3'
S1-202 Rv	5'-TTATTGGTAGGTGGTCACTGTG-3'
T7 S1-203 Fw	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGTCGTTACTGTGGTTC-3'
T7 S1-206 Rv	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTATTGGTAGGTGGTCACTGTGGG-3'
<i>shelk2 dsRNA synthesis</i>	
S2-101 Fw	5'-ATGCTGAAGCTTGTCTCCATCGTTTGCCTT-3'
S2-102 Rv	5'-TTAATAGGTCTTTTTATGTCTGATGCCACC-3'
T7 S2-117 Fw	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGCTGAAGCTTGTCTCC-3'
T7 S2-121 Rv	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTAATAGGTCTTTTTATGTCTGATGCC-3'
<i>EGFP dsRNA synthesis</i>	
EGFP-903 Fw	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'
EGFP-904 Rv	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
T7 EGFP-901 Fw	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
T7 EGFP-902 Rv	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTACTTGTACAGCTCGTC-3'
<i>qPCR analysis</i>	
S1-681 Fw	5'-TGGGCTAAGTGGATCTGGAC-3'
S1-835 Rv	5'-GACCACCGAAATCACCAAAC-3'
S2-126 Fw	5'-CTCCATCGTTTGCCTTTTTTG-3'
S2-127 Rv	5'-AGTCCTCCAATGACACCACC-3'
Cg_EF1a-802 Fw	5'-AAGTCTTGGGAAGAGGCACCA-3'
Cg_EF1a-803 Rv	5'-CAGCCTTCTCAACCTCCTTG-3'

マガキ成体を用いた RNAi による遺伝子ノックダウン

shelk1 および *shelk2* 遺伝子をノックダウンするため、調製した各 dsRNA (10 μ g または 30 μ g) を溶解させた PBS 溶液 (200 μ L) 用意した。対照実験用の EGFP dsRNA は、PBS 200 μ L に対し 30 μ g 溶解させたものを用いた。マガキの殻の閉殻筋の近くの腹側部分をニッパーにより約 3 cm の幅で切断し、その切断部位から注射針を差し込み、閉殻筋内に準備した各濃度の dsRNA の PBS 溶液を注射した。例外的に 1 個体だけ、ニッパーで貝殻を切断しただけのものも準

備した。なお、ロックダウン実験に用いたマガキ成体は dsRNA 溶液 1 種類あたり対照実験用のものは 3 個体、*shelk1* 用には 2 個体ずつ、*shelk2* 用には 10 個体ずつを用いた。処置したマガキは直ちに人工海水中に戻し、無給餌の状態で 7 日間飼育した。その後、新たに再生した貝殻原器と外套膜を回収し (図 12)、それぞれ定量 PCR (qPCR) 実験と SEM 観察に供した。

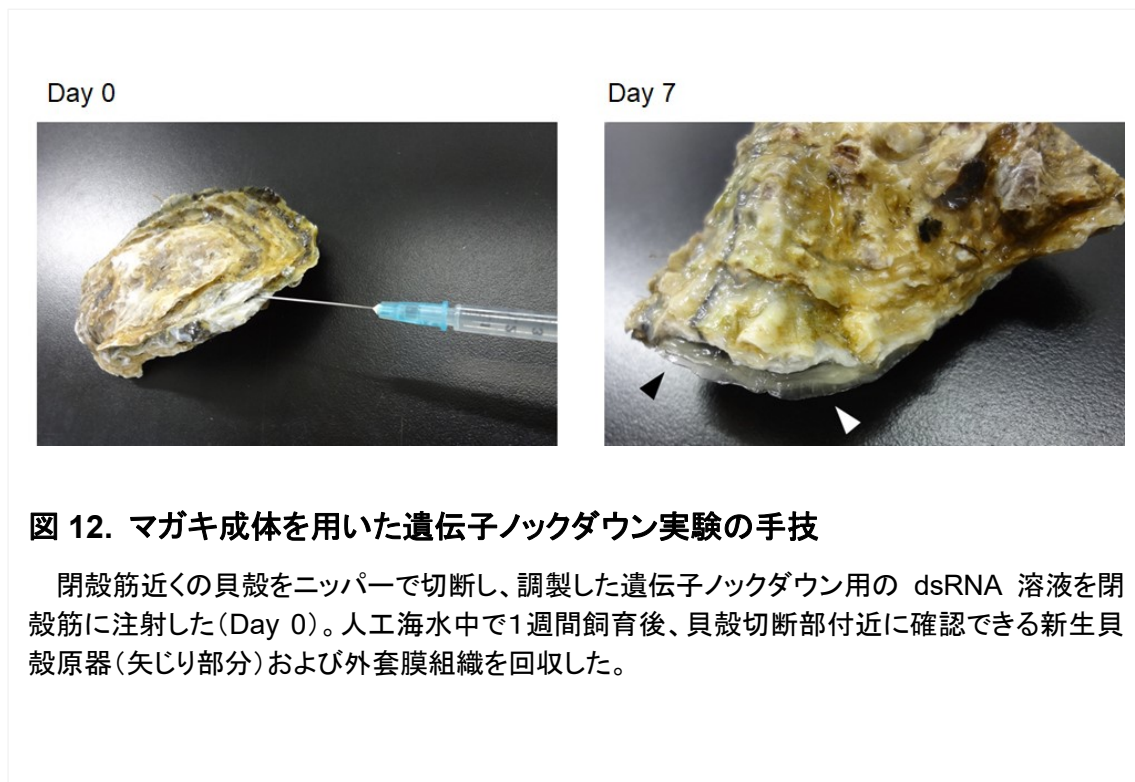


図 12. マガキ成体を用いた遺伝子ロックダウン実験の手技

閉殻筋近くの貝殻をニッパーで切断し、調製した遺伝子ロックダウン用の dsRNA 溶液を閉殻筋に注射した (Day 0)。人工海水中で 1 週間飼育後、貝殻切断部付近に確認できる新生貝殻原器 (矢じり部分) および外套膜組織を回収した。

新生貝殻原器の SEM 観察

新生した貝殻原器の SEM 観察には、第 2 章と同様に Miniscope TM3000 を使い、2 種類の倍率 (500 倍および 2,000 倍) で観察した。

外套膜組織での *shelk1* および *shelk2* mRNA 発現量の確認

Handy Sonic UR-20P (トミー精工) を用いてサンプリングした外套膜組織を

ホモジナイズした後、Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク) を用いて total RNA を抽出した。PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa) および gDNA Eraser (TaKaRa) を使用し、逆転写反応および 1 本差 cDNA の合成を行った。qPCR 用のプライマーは、*shelk1*、*shelk2* および内部標準として用いたマガキの伸長因子 EF-1 α (GenBank ID: AB122066) の配列に基づいて設計した (表 4)。qPCR 反応には、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、StepOnePlus Real Time PCR System (Life Technologies Japan) を用いた比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) を使用した。

3.2. 結果と考察

新生貝殻原器の稜柱層部位の SEM 観察結果

新生貝殻原器の稜柱層部位 (より正確には、これから炭酸カルシウム結晶が沈着して稜柱層となる部分だが、特に断りのない限り本論文では以降も同様に表記する) の SEM 観察結果を以下に示す。

貝殻を切断し何も注射しなかった場合 (Natural) の 500 倍観察像では、偶然にも稜柱層の最先端部分が形成されつつある様子が観察できた (図 13 a)。すなわち、図 13 a において視野の左下が最先端部で、最も新しく稜柱の初期構造が形成されている部位であり、視野の右上付近は少し時間が経過して稜柱断面が成長し隣接する稜柱にまで達した状態が観察できた。視野の左下から右上にかけて、稜柱同士の隙間を埋めるように徐々に成長し稜柱が太く「成熟」していくものと思われる (図 13 b は図 13 a の視野の左下部分を拡大したもの)。

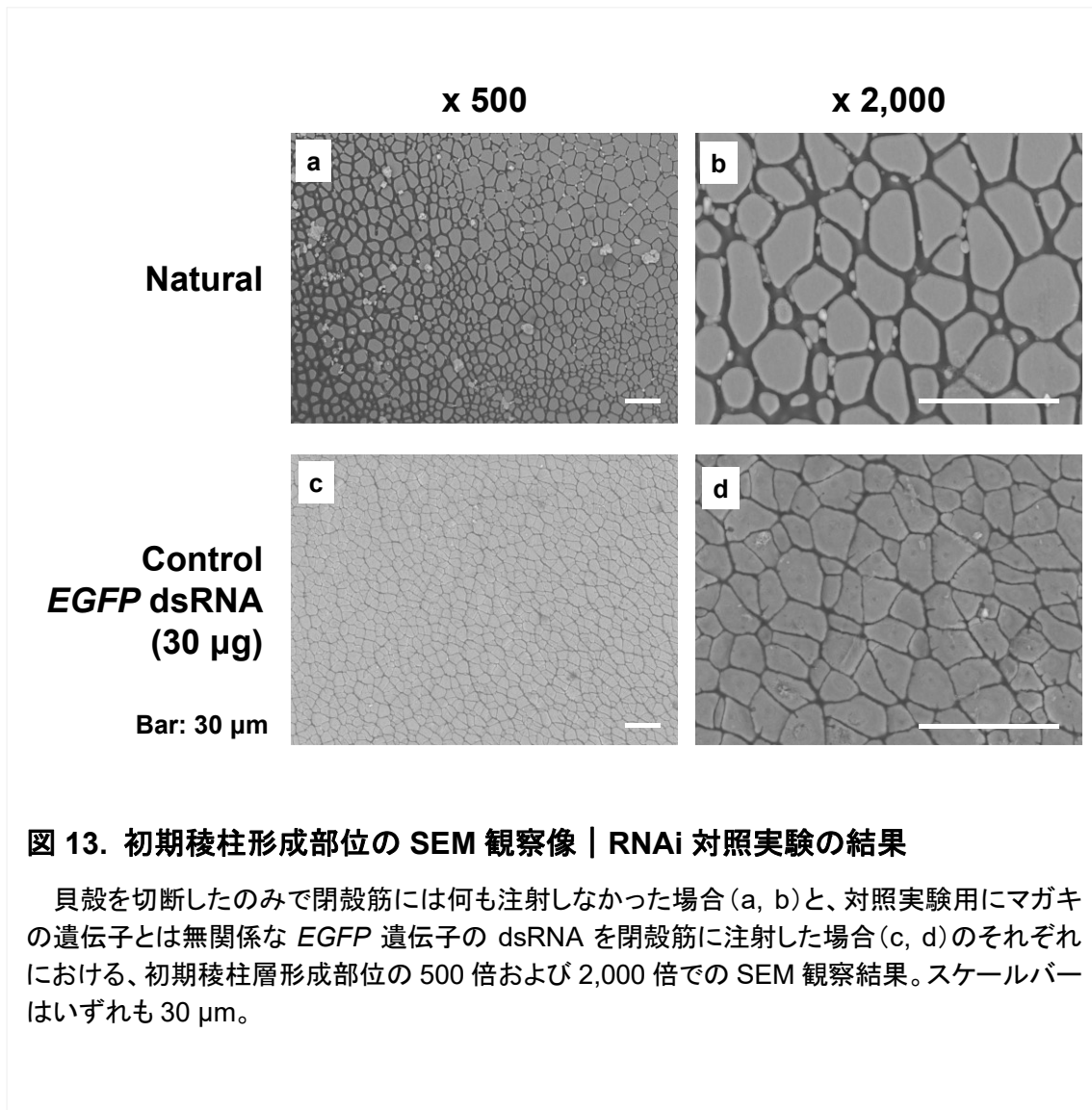


図 13. 初期稜柱形成部位の SEM 観察像 | RNAi 対照実験の結果

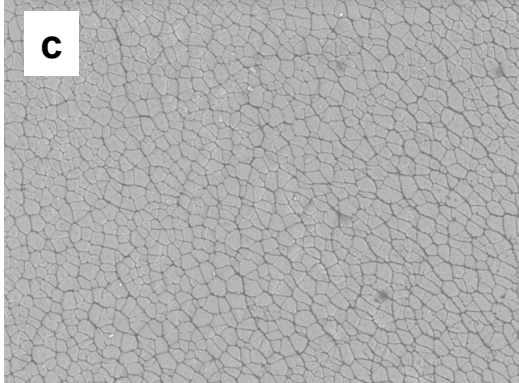
貝殻を切断したのみで閉殻筋には何も注射しなかった場合 (a, b) と、対照実験用にマガキの遺伝子とは無関係な *EGFP* 遺伝子の dsRNA を閉殻筋に注射した場合 (c, d) のそれぞれにおける、初期稜柱層形成部位の 500 倍および 2,000 倍での SEM 観察結果。スケールバーはいずれも 30 µm。

対照として、マガキの遺伝子とは無関係な *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注射した場合 (Control) では、Natural と同様に正常な稜柱が新たに形成されたと考えられる (図 13 c, d)。

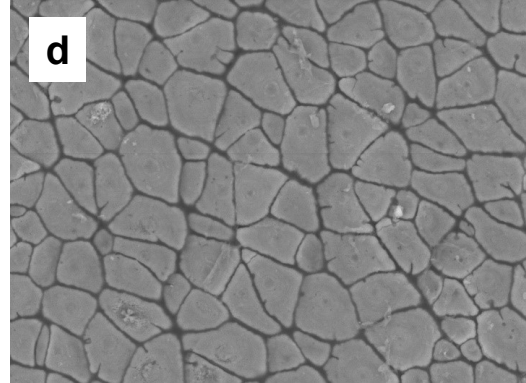
一方、*shelk1* および *shelk2* の dsRNA を閉殻筋に注射した場合、初期の稜柱の観察結果は対照実験の結果と比較して著しく異なった (図 14, 15)。いずれも遺伝子ノックダウンが成功した結果だと考えられるが、まずは *shelk1* のノックダウンの効果について詳述する。

EGFP dsRNA (30 μ g): Control

x 500

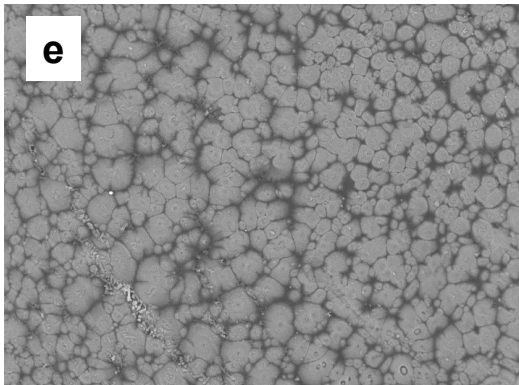


x 2,000

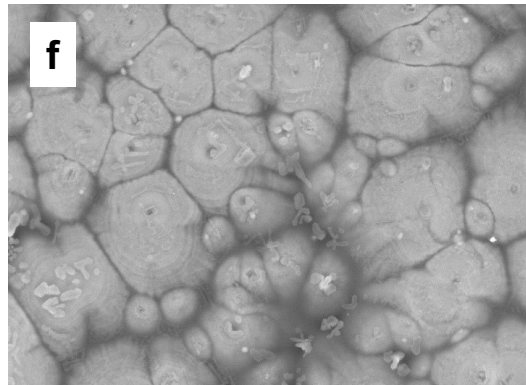


shelk1 dsRNA (30 μ g)

x 500



x 2,000



Bar: 30 μ m

図 14. shelk1 遺伝子ノックダウン後の稜柱層形成部位の SEM 観察像

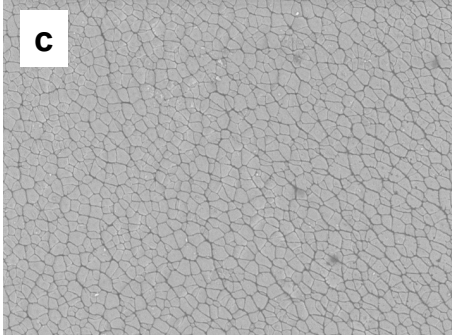
shelk1 遺伝子ノックダウンによる稜柱層形成部位への影響の SEM 観察像。対照実験の結果の SEM 画像は、図 13 c, d と同一のもの。スケールバーはいずれも 30 μ m。

shelk1 遺伝子をノックダウンした場合には、初期稜柱の形状が対照と比べて大きく変化した。具体的には、稜柱の一部で角がとれて丸みを帯び、その結果として正常な稜柱形成時のように稜柱同士が密に接することが出来ていない様子が観察された (図 14 e, f)。また、稜柱の断面積も対照と比較して大小様々なものが形成されている様子が観察された。さらに、稜柱の上面部分の粗さも対照より増しているようにも観察された。先行研究において、貝殻を酸で脱灰し、金コロイド粒子で標識した抗 Shelk1 抗体による免疫電子顕微鏡法の結果、Shelk1 は稜柱を取り囲むように分布していることが報告されているが (竹村, 2008)、遺伝子ノックダウンにより Shelk1 の発現が抑制された結果、稜柱の成長制御に支障が出て大きくなりすぎる稜柱が形成された可能性が考えられる。また、その結果として相対的に大きく成長できずに稜柱断面が小さいままの稜柱が観察されたのかもしれない。

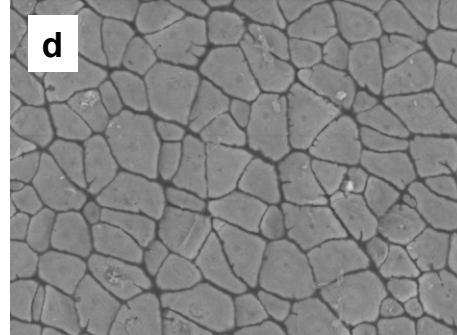
一方、*shelk2* のノックダウンの結果としては、各稜柱の初期構造の断面が対照実験の結果と比較して著しく小さくなった (図 15)。その断面積の縮小度合は注射した dsRNA の量に依存するようで、10 μg よりも 30 μg の場合の方がより断面が小さくなる明らかな傾向が確認できた (図 15 g, h, i, j)。加えて、*shelk1* の場合と同様に稜柱の初期構造の断面は丸みを帯び、その結果として稜柱同士が密に接することが出来ていない様子が観察された。しかしながら、*shelk1* のノックダウンでは一部の初期稜柱構造にその影響が確認できたのに対し、*shelk2* のノックダウンでは稜柱層の全体に渡って影響し稜柱の断面が小さくなるという結果が観察された。

EGFP dsRNA (30 μ g): Control

x 500

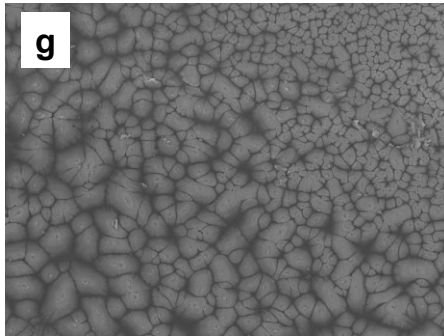


x 2,000

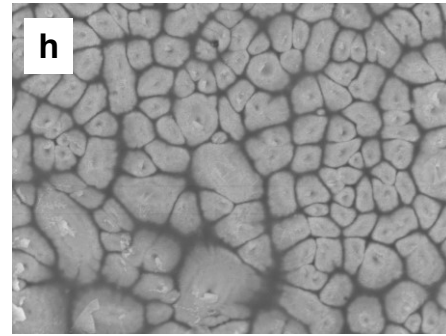


shelk2 dsRNA (10 μ g)

x 500

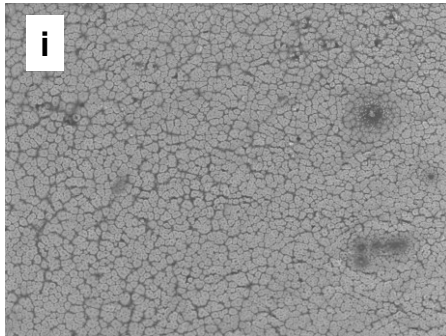


x 2,000

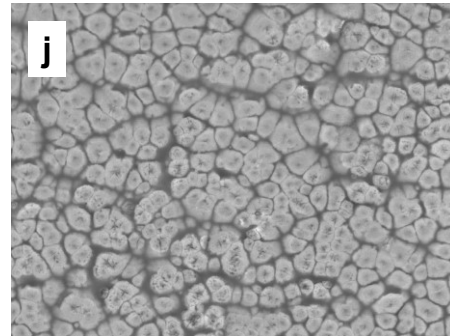


shelk2 dsRNA (30 μ g)

x 500



x 2,000



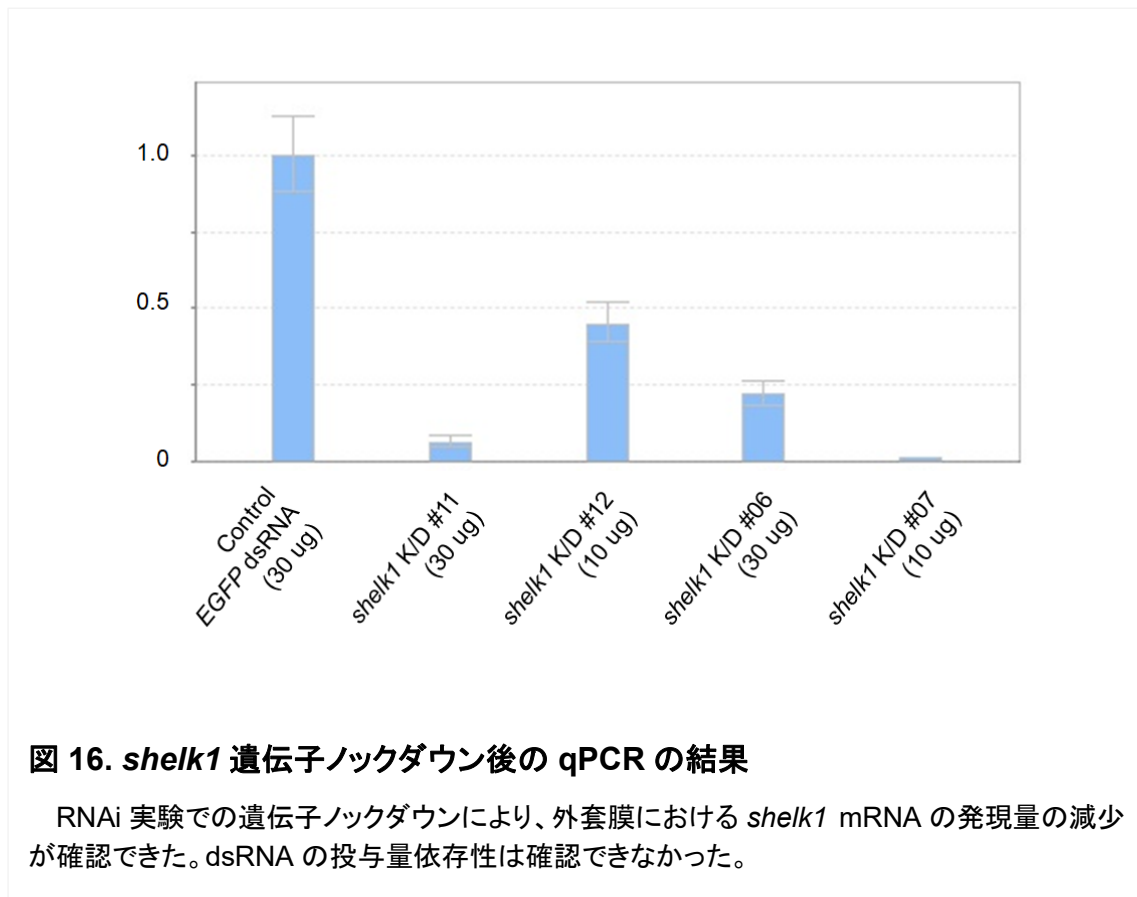
Bar: 30 μ m

図 15. Shelk2 遺伝子ノックダウン後の稜柱層形成部位の SEM 観察像

shelk2 遺伝子ノックダウンによる稜柱層形成部位への影響の SEM 観察像。対照実験の結果は、図 13 c, d と同一のもの。スケールバーはいずれも 30 μ m。

外套膜組織での *shelk1* および *shelk2* mRNA 発現量の定量

ノックダウン実験の結果、稜柱層形成のフェノタイプに影響が見られたことから、実験そのものは成功したと考えられるが、念のため外套膜組織における *shelk1*、*shelk2* の mRNA 発現量についても qPCR により検討した。



遺伝子ノックダウンの結果、*shelk1* をノックダウンした個体群の外套膜ではいずれも、*shelk1* mRNA の発現量が減少していたが、投与した dsRNA の量依存性があるかどうかは確認できなかった (図 16)。今回、*shelk1* のノックダウン実験は 2 個体ずつの結果であるため考察は難しいが、さらに詳細に追試することで量依存性の有無についても判明する可能性はあると思われる。

一方で、*shelk2* をノックダウンした個体群の外套膜では、予想に反していずれも *shelk2* mRNA の量が極端に増加していた (図 17)。

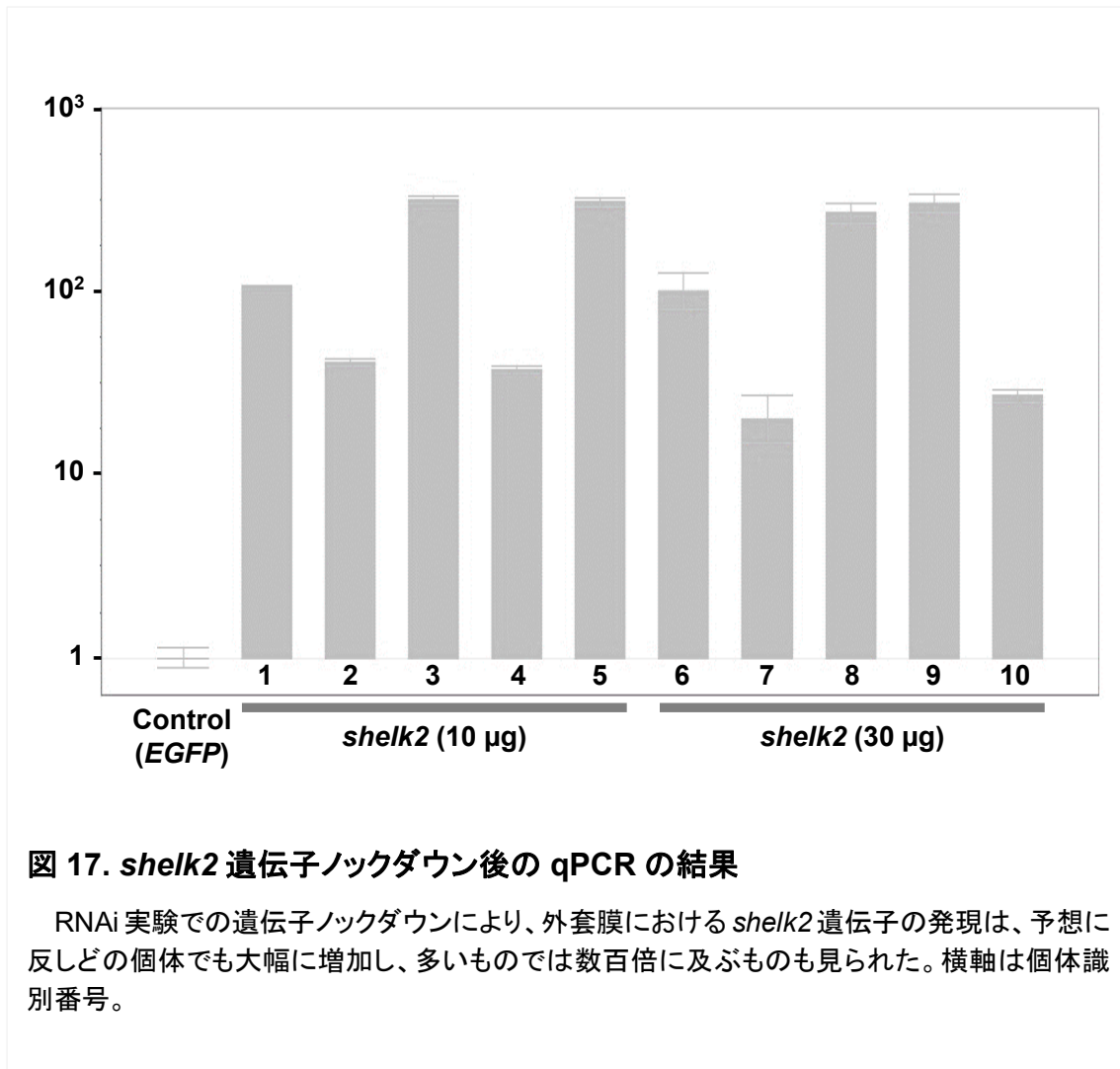


図 17. *shelk2* 遺伝子ノックダウン後の qPCR の結果

RNAi 実験での遺伝子ノックダウンにより、外套膜における *shelk2* 遺伝子の発現は、予想に反してどの個体でも大幅に増加し、多いものでは数百倍に及ぶものも見られた。横軸は個体識別番号。

個体差はあるものの、対照実験である EGFP の遺伝子の dsRNA を注射した場合の *shelk2* mRNA と比較し、驚くべきことに多いものでは 100 倍以上も mRNA の発現量が増加していた。一般的には、ノックダウン実験が成功した場合は標的遺伝子の mRNA 発現量は減少すると考えられる。アコヤガイのタンパク質である Pif や Nacrein のノックダウン実験でも、本研究と同じくノックダウン用の dsRNA を投与後 7-8 日後の組織で確認しているが、対象遺伝子の mRNA

発現量は減少していた (Suzuki et al., 2009; Funabara et al., 2014)。実際、*shelk1* も mRNA 発現量は減少していることから、実験操作上のミスではないと考えられ、おそらく *shelk2* mRNA の発現量も一般的なノックダウン実験のように一度は減少し、その後に過剰発現された可能性が考えられる。しかしながら、dsRNA 注射の数日後や、あるいは注射数時間後の組織での mRNA の発現量の確認はできていない。

このような結果となった理由として、*Shelk2* がヒストンなどの重要タンパク質と同じくイントロンレスである点や、サザンブロットイングの結果から判明したマルチコピーの遺伝子である点から、*Shelk2* は貝殻形成にとって非常に重要なタンパク質であり、*shelk2* 遺伝子のノックダウンにより過剰にレスキューされた結果として mRNA の発現量が増加した可能性が考えられる。

shelk2 のノックダウンにより、マガキは貝殻損傷部位の修復のために *shelk2* mRNA の発現量を著しく増加させた結果、*Shelk2* タンパク質も大量に合成されたと考えられる。そして、その大量の *Shelk2* が初期貝殻の稜柱層形成において稜柱断面が小さくなった要因である可能性が高いと考えられる (図 15)。先行研究により、*Shelk1* は個々の稜柱を取り囲むように存在することが報告されているが (Takagi, 2007; 竹村, 2008)、*Shelk2* の分布も同様だと仮定すると、本来は稜柱同士の僅かな隙間に存在するタンパク質があまりに大量に発現したことで、稜柱の断面方向の成長が抑制され、各々の稜柱断面積が小さくなったと考えられる。あるいは、*Shelk2* が炭酸カルシウム結晶形成の核になるようなタンパク質であった場合には、それら大量の核ごとに非常に多くの稜柱形成が生じた結果、稜柱が断面方向に成長しようとしても隣接する稜柱同士ですぐに接触

してしまい、そのまま融合することもなく断面方向に大きく成長できていない結果という可能性も考えられる。

これらの予想の裏付けのために、Shelk2 タンパク質の発現量やその経時変化について検証したかったが、残念なことに抗 Shelk2 抗体の調製を試みたものの未だにそれを得ることはできていない。抗体取得が難しい理由には、Shelk2 のアラニンに富む配列が原因だと考えられ、poly-Ala モチーフを含まない領域での抗体調製も試みたが、ウェスタンブロッティングにより Shelk2 の同定が可能な抗体も取得できなかった。もしかすると Shelk2 は、翻訳後修飾により断片化されて存在するのかもしれない、いつの日か Shelk2 について研究が進み、その貝殻中での局在やさらなる機能の詳細が解析されることを期待する。

総括

本研究を通じて、マガキの *shelk1*、*shelk2* 遺伝子は共に、ノックダウンされることで貝殻新生時の稜柱層形成に影響することが判明した。*Shelk2* については考察が予想の域を出ない部分はまだあるものの、これまで機能が未解明だった *Shelk1*、*Shelk2* という二種類のクモ糸相同タンパク質が、貝殻の稜柱層形成に重要な役割を担っていることが実験的に示された。

マガキで見つかったこれらのタンパク質は、その極めて近縁な種においても存在が確認された一方で、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、この違いが稜柱層形成に影響し、さらには近縁な種においても形状の異なる貝殻の多様性に寄与している可能性があるかと推察された。

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が用いられているという点も非常に興味深い点であり、これらのモチーフを有するタンパク質を持った共通祖先の存在が示唆された。

引用文献

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., Nakayama, I., 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* 62, 727–730.
- Bittencourt, D., Souto, B.M., Verza, N.C., Vinecky, F., Dittmar, K., Silva, P.I. Jr., Andrade, A.C., da Silva, F.R., Lewis, R.V., Rech, E.L., 2007. Spidroins from the Brazilian spider *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 147, 597–606.
- Cicila, G., May, M., Ornstein-Goldstein, N., Indik, Z., Morrow, S., Yeh, H.S., Rosenbloom, J., Boyd, C., Rosenbloom, J., Yoon, K., 1985. Structure of the 3' portion of the bovine elastin gene. *Biochemistry* 24, 3075–3080.
- Datta, A., Ghosh, A.K., Kundu, S.C., 2001. Differential expression of the fibroin gene in developmental stages of silkworm, *Antheraea mylitta* (Saturniidae). *Comp. Biochem. Physiol., B.* 129, 197–204.
- Fu, G., Valiyaveetil, S., Wopenka, B., Morse, D.E., 2005. CaCO₃ biomineralization: acidic 8-kDa proteins isolated from aragonitic abalone shell nacre can specifically modify calcite crystal morphology. *Biomacromolecules* 6, 1289–1298.
- Funabara, D., Ohmori, F., Kinoshita, S., Koyama, H., Mizutani, S., Ota, A., Osakabe, Y., Nagai, K., Maeyama, K., Okamoto, K., Kanoh, S., Asakawa, S., Watabe, S. 2014. Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference knockdown. *PLoS One* 9: e84706.
- Garb, J.E., Hayashi, C.Y., 2005. Modular evolution of egg case silk genes across orb-weaving spider superfamilies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11379–11384.
- Garb, J.E., Dimauro, T., Vo, V., Hayashi, C.Y., 2006. Silk genes support the single origin of orb webs. *Science* 312, 1762.

- Garb, J.E., DiMauro, T., Lewis, R.V., Hayashi, C.Y., 2007. Expansion and intragenic homogenization of spider silk genes since the Triassic: evidence from Mygalomorphae (tarantulas and their kin) spidroins. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2454–2464.
- Garb, J.E., Ayoub, N.A., Hayashi, C.Y., 2010. Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *BMC Evol. Biol.* 10, 243.
- Gatesy, J., Hayashi, C., Motriuk, D., Woods, J., Lewis, R., 2001. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science* 291, 2603–2605.
- Gesualdo, I., Aniello, F., Branno, M., Palumbo, A., 1997. Molecular cloning of a peroxidase mRNA specifically expressed in the ink gland of *Sepia officinalis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 111–117.
- Gotliv, B.A., Kessler, N., Sumerel, J.L., Morse, D.E., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S., 2005. Asprich; a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBioChem* 6, 304–314.
- Guerette, P.A., Ginzinger, D.G., Weber, B.H.F., Gosline, J.M., 1996. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* 272, 112–115.
- Hinman, M.B., Lewis, R.V., 1992. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *J. Biol. Chem.* 267, 19320–19324.
- Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J.C., Peltonen, L., Rosenbloom, J., 1987. Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5680–5684.
- Kim, E.B., Fang, X., Fushan, A.A., Huang, Z., Lobanov, A.V., Han, L., Marino, S.M., Sun, X., Turanov, A.A., Yang, P., Yim, S.H., Zhao, X., Kasaikina, M.V., Stoletzki, N., Peng, C., Polak, P., Xiong, Z., Kiezun, A., Zhu, Y., Chen, Y., Kryukov, G.V., Zhang, Q., Peshkin, L., Yang, L., Bronson, R.T., Buffenstein, R., Wang, B., Han, C., Li, Q., Chen, L., Zhao, W., Sunyaev, S.R., Park, T.J., Zhang, G., Wang, J., Gladyshev, V.N., 2011. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 479, 223–227.
- Kono, M., Hayashi, N., Samata, T., 2000. Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 213–218.

- Lee, S.W., Kim, Y.M., Choi, H.S., Yang, J.M., Choi, C.S., 2006. Primary structure of myostracal prism soluble protein (MPSP) in oyster shell, *Crassostrea gigas*. *Protein J.* 25, 288–294.
- Lehoczy, J.A., Innis, J.W., 2008. Expanded HOXA13 polyalanine tracts in a monotreme. *Evol. Dev.* 10, 433–438.
- Mann, S. (2001): *Biom mineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*, Oxford University Press, New York, 198 pp.
- Marin, F., Corstjens, P., Gaulejac, B., Jong, E.V.D., Westbroek, P., 2000. Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorphia). *J. Biol. Chem.* 275, 20667–20675.
- Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C., Westbroek, P., 2005. Caspartin and calprismin, two new proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.* 280, 33895–33908.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80, 209–276.
- Matthiessen, G.C. (2000): *Oyster Culture*. Fishing News Books Series, Blackwell Publishing Professional, Ames. 176 pp.
- Michenfelder, M., Fu, G., Lawrence, C., Weaver, J.C., Wustman, B.A., Taranto, L., Evans, J.S., Morse, D.E., 2003. Characterization of two molluscan crystal-modulating biom mineralization proteins and identification of putative mineral binding domains. *Biopolymers* 70, 522–533.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro, A., 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9657–9660.
- Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., Matsushiro, A., 2000. Complementary DNA cloning and characterization of Pearlins, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* 2, 409–418.
- Mortlock, D.P., Innis, J.W., 1997. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat. Genet.* 15, 179–180.

- Mortlock, D.P., Sateesh, P., Innis, J.W., 2000. Evolution of N-terminal sequences of the vertebrate HOXA13 protein. *Mamm. Genome* 11, 151–158.
- Noguchi, T., Torita, A., Hasegawa, Y., 2007. Purification and characterization of a matrix shell protein from the shell of scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fish. Sci.* 73, 1177–1185.
- Pierce, R.A., Deak, S.B., Stolle, C.A., Boyd, C.D., 1990. Heterogeneity of rat tropoelastin mRNA revealed by cDNA cloning. *Biochemistry* 29, 9677–9683.
- Pokroy, B., Zolotoyabko, E., Adir, N., 2006. Purification and functional analysis of a 40 kD protein extracted from the *Strombus decorus persicus* mollusk shells. *Biomacromolecules* 7, 550–556.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., Akera, S., 1999. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett.* 462, 225–229.
- Samata, T., Ikeda, D., Kajikawa, A., Sato, H., Nogawa, C., Yamada, D., Yamazaki, R., Akiyama, T., 2008. A novel phosphorylated glycoprotein in the shell matrix of the oyster *Crassostrea nippona*. *FEBS J.* 275, 2977–2989.
- Sarashina, I., Endo K., 1998. Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. *Am. Mineral.* 83, 1510–1515.
- Sezutsu, H., Yukuhiro, K., 2000. Dynamic rearrangement within the *Antheraea pernyi* silk fibroin gene is associated with four types of repetitive units. *J. Mol. Evol.* 51, 329–338.
- Sezutsu, H., Kajiwar, H., Kojima, K., Mita, K., Tamura, T., Tamada, Y., Kameda, T. 2007. Identification of four major hornet silk genes with a complex of alanine-rich and serine-rich sequences in *Vespa simillima xanthoptera* Cameron. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2725–2734.
- Sezutsu, H., Tamura, T., Yukuhiro, K. 2008. Leucine-rich fibroin gene of the Japanese wild silkworm, *Rhodinia fugax* (Lepidoptera: Saturniidae). *Eur. J. Entomol.* 105, 561–566.
- Shen, X., Belcher, A.M., Hansma, P.K., Stucky, G.D., Morse, D.E., 1997. Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* 272, 32472–32481.

- Stark, M., Grip, S., Rising, A., Hedhammar, M., Engstrom, W., Hjalm, G., Johansson, J., 2007. Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* 8, 1695–1701.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., Takahashi, T., 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* 387, 563–564.
- Suriana, Solihin, D.D., Noor, R.R., Thohari, A.M., 2011. Characterization of partial coding region fibroin gene on wild silkmoth *Cricula trifenestrata* Helfer (Lepidoptera: Saturniidae). *Media Peternakan* 34, 23–29.
- Sutherland, T.D., Weisman, S., Trueman, H.E., Sriskantha, A., Trueman, J.W., Haritos, V.S., 2007. Conservation of essential design features in coiled coil silks. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2424–2432.
- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T., Nagasawa, H., 2004. Characterization of prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. J.* 382, 205–213.
- Suzuki, M., Nagasawa, H., 2007. The structure-function relationship analysis of Prismalin-14 from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*, *FEBS J.*, 274, 5158–5166.
- Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, Y., Kato, Y., Nagasawa, H., 2009. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325, 1388–1390.
- Takagi M, 2007. Studies on the shell formation mechanism of Pacific oyster. 博士論文 (京都大学).
- Takahashi, J., Takagi, M., Okihana, Y., Takeo, K., Ueda, T., Touhata, K., Maegawa, S., Toyohara, H., 2012. A novel silk-like shell matrix gene is expressed in the mantle edge of the Pacific oyster prior to shell regeneration. *Gene* 499, 130–134.
- Tomarev, S.I., Zinovieva, R.D., Weis, V.M., Chepelinsky, A.B., Piatigorsky, J., McFall-Ngai, M.J., 1993. Abundant mRNAs in the squid light organ encode proteins with a high similarity to mammalian peroxidases. *Gene* 132, 219–226.
- Treccani, L., Mann, K., Heinemann, F., Fritz, M., 2006. Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophys. J.* 91, 2601–2608.

- Tsukamoto, D., Sarashina, I., Endo, K., 2004. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1175–1180.
- Wilt, F.H., Killian, C.E., Livingston, B.T., 2003. Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation* 71, 237–250.
- Weiss, I.M., Kaufmann, S., Mann, K., Fritz, M., 2000. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 17–21.
- Wydner, K.S., Sechler, J.L., Boyd, C.D., Passmore, H.C., 1994. Use of an intron polymorphism to localize the tropoelastin gene to mouse chromosome 5 in a region of linkage conservation with human chromosome 7. *Genomics* 23, 125–131.
- Zhang, C., Li, S., Ma, Z., Xie, L., Zhang, R., 2006a. A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO₃ crystal formation and mineralogenic cells. *Mar. Biotechnol.* 8, 624–633.
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Liu, X., Zhang, R., 2006b. A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 735–740.
- Zhang, Y., Xie, L., Meng, Q., Jiang, T., Pu, R., Chen, L., Zhang, R., 2003. A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 135, 565–573.
- 飯塚祐輔, 荒西太士, 2008. 九州に分布するイタボガキ科カキ類の DNA 鑑定. *LAGUNA (汽水域研究)* 15, 69–76.
- 上田能久 2010. カキ目におけるクモ糸牽引糸様遺伝子のゲノム構造解析と保存性の探索. 修士論文(京都大学).
- 沖花裕美子 2006. 貝殻形成におけるクモ牽引糸様遺伝子の発現様式の解析. 修士論文(京都大学).
- 川村将郎 2009. 貝殻形成におけるクモ糸様タンパク質の機能に関する研究—組換えタンパク質を用いた解析—. 修士論文(京都大学).
- 竹尾圭, 2007. マガキにおけるクモ粘着糸様遺伝子のゲノム構造解析. 修士論文(京都大学).
- 竹村匡弘, 2008. 貝殻形成過程におけるクモ糸様タンパク質の発現解析. 修士論文(京都大学).

引用文献

外岡武士 2009. 貝殻形成におけるクモ糸様タンパク質の機能に関する研究－合成ペプチドを用いた解析－. 修士論文(京都大学).

渡部哲光 1997. バイオミネラリゼーション. 東海大学出版会.

謝辞

本研究を通じ、多数のご助言と多大なるご協力を賜りました皆様にご感謝申し上げます。特に、研究全般をご指導いただいた京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻の豊原治彦先生（海洋生物機能学分野）、並びに同分野の佐藤健司先生、木下正人先生および卒業生を含む同分野在籍者の皆様にご心よりお礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり様々なご助言を賜りました京都大学の教員・職員の皆様と、私の研究活動と論文執筆に寛大な理解と激励をいただきました両親と弟、およびテックマネッジ株式会社の同僚・関係者の皆様にも、心からの感謝を申し上げます。

本研究は、日本学術振興会より以下の研究助成を受け実施されました。

<日本学術振興会 特別研究員奨励費>

研究期間 : 平成22年度～平成23年度

研究機関 : 京都大学（機関番号：14301）

課題番号 : 22・742

研究課題名 : マガキの新規なクモ糸様タンパク質の機能解析および制御

研究代表者 : 高橋 潤（職名：特別研究員 | DC2）

本論文に関する公表済み文献

Takahashi, J., Takagi, M., Okihana, Y., Takeo, K., Ueda, T., Touhata, K., Maegawa, S., Toyohara, H., 2012. A novel silk-like shell matrix gene is expressed in the mantle edge of the Pacific oyster prior to shell regeneration. *Gene* 499, 130–134.

Takahashi, J., Kishida, T., Toyohara, H. 2013. Poly-alanine protein Shelk2 from *Crassostrea* species of oysters. In: Watabe, S., Meyama, K., Nagasawa, H. (eds) *Recent Advances in Pearl Research*. Terrapub (Tokyo), 167-181.

Takahashi, J., Yamashita, C., Kanasaki, K., Toyohara, H. 2018. Functional Analysis on Shelk2 of Pacific Oyster. In: Endo K, Kogure T, Nagasawa H. (eds) *Biom mineralization — From Molecular and Nano-structural Analyses to Environmental Science*. SpringerOpen (Singapore), 333–339.