

氏 名	たかぎまさや 高 木 雅 哉
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1622 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON THE SHELL FORMATION MECHANISM OF PACIFIC OYSTER (マガキの貝殻形成機構に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 助教授 豊 原 治 彦 教 授 田 中 克 教 授 永 尾 雅 哉

論 文 内 容 の 要 旨

貝類は、その軟体部を保護するために、貝殻というバイオミネラル(生鉱物)を形成する。貝殻は主に炭酸カルシウムから成るが、同じ炭酸カルシウムから成るにもかかわらず、生物種によって全く異なった貝殻を形成する。また、一枚の貝殻でも部位ごとに異なった性質や構造を備えている。例えば、マガキの貝殻は、柱状の結晶構造をとる稜柱層や、板状の結晶構造をとる葉状層、結晶がランダムに配置されているチョーク層などから構成されている。このように複雑な構造を作り分けている貝殻形成の分子機構はほとんど不明である。

貝殻作りは大きく二つの過程に分けられる。一つは、カルシウムイオン及び炭酸イオンの吸収・濃縮など貝殻の材料収集の過程であり、もう一つは、炭酸カルシウム結晶の形態制御や接着などの貝殻構築の過程である。

本研究では、材料収集の過程に関して二価金属輸送体 Divalent Metal Transporter (DMT) という金属輸送体に注目し、カルシウムイオン取り込み機構の解明を行った。また、貝殻構築の過程に関して、新規な有機基質である oyster Silk Like Protein (oySLP) 遺伝子をクローニングし、その機能解析を行った。論文内容の要旨は以下のとおりである。

第一章では、マガキのカルシウムイオン取り込み機構を解明するため、oyster DMT (oyDMT) 遺伝子をクローニングした。その結果、oyDMT は526アミノ酸残基からなる膜タンパク質であり、12回膜貫通構造を持つことを明らかにした。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系による機能解析を行った結果、oyDMT はカルシウムイオンのほかに、鉄、銅、マグネシウムイオンなどを輸送すること、及び既知の DMT と同じく、プロトン勾配を駆動力とすることを明らかにした。また、mRNA 発現解析により、oyDMT は鰓において強く発現していることを明らかにした。これらの結果から、マガキは鰓において oyDMT を介して海水からカルシウムイオンを取り込み、貝殻形成に利用している可能性が示唆された。

第二章では、新規な有機基質の同定を目的として、貝殻形成の場である外套膜辺縁部に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法によりクローニングした。その結果、アメリカジョロウグモのクモの巣の横糸タンパク質 (flagelliform silk) と高い相同性を示すタンパク質である oySLP をコードする遺伝子を同定した。すなわち、oySLP にはクモの巣の横糸タンパク質と高い相同性を示す GPGGX (Gly-Pro-Gly-Gly-X) の5残基からなる繰り返し構造が認められた。このことから、貝殻とクモの巣の形成に共通の分子機構が存在する可能性が示唆された。

第三章では、上記にてクローニングした oySLP 遺伝子の mRNA 及びタンパク質レベルにおける発現解析を行った。RT-PCR 及び *in situ* ハイブリダイゼーション法により同遺伝子の mRNA の発現部位を調べたところ、外套膜辺縁部の外摺に特異的に発現していることが確認された。このことから、oySLP は貝殻の特に稜柱層形成に関与すると推測された。また、ウェスタンブロット分析及び免疫染色法により貝殻における oySLP のタンパク質レベルでの局在性を調べたところ、oySLP の稜柱層中における存在が確認された。

第四章では、oySLP の組換え体及びクモ糸領域に相当する合成ペプチド (oySLP ペプチド) を用いて機能解析を行った。濁度検定法により炭酸カルシウム結晶形成に与える影響を調べたところ、oySLP ペプチドは濃度依存的に炭酸カルシウム

結晶形成を抑制することが確認された。また、oySLP ペプチド中のアスパラギン酸をアラニンに置換したところ、抑制効果が失われたことから、アスパラギン酸が結晶形成の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、形成された炭酸カルシウム結晶を走査型電子顕微鏡で観察したところ、oySLP の組換え体及び oySLP ペプチドの存在下では、層状構造を持つ特有の炭酸カルシウム結晶を生じることが明らかとなった。これらの結果より、oySLP が貝殻構築の過程において重要な役割を担っていると結論づけた。

論文審査の結果の要旨

これまでの貝殻形成機構に関する研究において、その主要材料であるカルシウムイオンの輸送機構についてはほとんど研究がなされていない。また、貝殻形成において炭酸カルシウム結晶の形態を決定するとされる有機基質に関しても、そのごく一部が同定されているのみであり、貝殻形成機構の全容解明には程遠い。本研究は、有用水産生物であるマガキを用いて、カルシウムイオンの輸送機構を解明するとともに、新規な有機基質を同定し、その機能解析を行ったものであり、多くの知見を得ている。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 貝殻の材料であるカルシウムイオンの輸送に関わる oyDMT の遺伝子をクローニングし、それが526アミノ酸残基からなる膜タンパク質であり、12回膜貫通構造を持つことを明らかにした。さらにアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験から、この輸送体が、カルシウムイオンの他、鉄、銅、マグネシウムなどの金属イオンを輸送することを示した。また、mRNA 発現解析により、oyDMT は鰓において強く発現することを明らかとした。これらの結果から、マガキは鰓において oyDMT を介して海水からカルシウムを取り込み、貝殻形成に利用している可能性を示唆した。

2. 貝殻そのものではなく貝殻形成を行う外套膜辺縁部に注目することにより、従来の貝殻そのものを利用した研究では同定できなかった新規有機基質（oySLP）を同定した。また、oySLP とクモの巣の横糸タンパク質に共通の構造（GPGGX repeat）の存在を指摘し、貝殻とクモの巣の形成過程に共通の分子機構が存在する可能性を指摘した。

3. RT-PCR 法および *in situ* ハイブリダイゼーション法による mRNA 発現解析により、oySLP mRNA が外套膜辺縁部の外摺においてのみ発現することを確認し、特に貝殻中の稜柱層の形成に関与する可能性を指摘した。また、ウェスタンブロット分析及び免疫染色法により、稜柱層における oySLP の存在をタンパク質レベルにおいて確認した。

4. oySLP の組換え体及びクモ糸領域に相当する合成ペプチドが、炭酸カルシウムの結晶構造の形成を制御することを明らかにした。また、ペプチド中のアスパラギン酸をアラニンに置換すると結晶構造の制御能が失われることから、炭酸カルシウム結晶形成における本タンパク質中のアスパラギン酸残基の重要性を指摘した。これらの結果より、特定の配列を持つペプチドを用いた人為的な炭酸カルシウム結晶の構造制御の可能性を示した。

以上のように本論文は、分子生物学的手法を駆使して、これまで未知であったマガキの貝殻形成について、カルシウムイオンの取り込み機構を明らかにするとともに、貝殻中の稜柱層形成に関わる新規有機基質の機能を解明したものであり、海洋生物学の分野に寄与するところが大きい。

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、平成19年2月21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。