

1. 研究課題名：アコヤ貝殻真珠層のタンパク質の解析
2. 研究機関名：長崎県工業技術センター (misoka@tc.nagasaki.go.jp)
3. 研究者名：晦日房和
4. 共同研究者：なし
5. 研究期間：平成9年～11年
6. 要約：

真珠形成機構を解明するための一環として、真珠に含まれるタンパク質の性質を調べた。真珠とアコヤ貝殻真珠層中の有機基質成分は同じと言われているので、材料はその真珠層をパウダー状にして用いた。アミノ酸分析の結果、2.0 % (w/w) のタンパク質が存在し、グリシン、アラニン、アスパラギン酸を多く含むことが明らかとなった。次に、0.05N HCl で脱灰後、酸可溶性および酸不溶性画分を得た。両画分を SDS - PAGE で調べたところ、分子量 15~70 kDa の範囲に合わせて 10 種類ほどのタンパク質が確認された。そこで、酸可溶性画分を直接 2 次元電気泳動に供し PVDF 膜へ Blotting した。アミノ酸配列を調べた結果、酸可溶性の分子量約 60 kDa タンパク質について N 末端から 23 残基までのアミノ酸配列がわかった。この配列は、真珠に含まれるタンパク質として、初めて報告された Nacrein のものと一致した。一方、酸不溶性画分について、8 M 尿素で抽出したところ分子量 16kDa のタンパク質が多く存在していることがわかったので、陰イオン交換クロマトグラフィーで粗精製した。さらに、PVDF 膜へ Blotting した 16kDa タンパク質のバンドを切り出しプロテインシーケンサーで調べたところ、N 末端は単一アミノ酸として同定できた。しかしながら、2~4 残基では 2 種類以上の異なるアミノ酸が検出されたことから、16kDa タンパク質には分子量及び等電点が等しい複数のタンパク質の混在が示唆された。

7. 研究目的：

真珠は石灰化現象に代表される生物性宝石の 1 つである。特に長崎県の真珠生産額は全国 3 位 (平成 6 年) とその占める割合は多い。真珠は、アコヤ貝などの母貝に核と外套膜の断片を挿入し、外套膜殻側上皮細胞から炭酸カルシウムとタンパク質などの有機物が分泌されて形成される。しかしながら、良質の真珠は 10 % 程度と収穫割合は低く、大部分は着色、シミが付くという問題があった。さらに、アコヤ貝の選別には勘と経験に頼ることが多く、生産量にもバラツキが生じやすい。アコヤ貝の育種を含めこれらの問題を解決するためにも、細胞レベルでの真珠形成メカニズムの解明が望まれる。

真珠形成メカニズムを調べる上でも外套膜殻側上皮細胞の培養技術等の開発が必要となるが細胞を同定するための生化学的知見はあまり知られていない。そこで、本研究は真珠形成に關与するタンパク質の役割を明らかにすることを目的に、その性質を調べるための基礎的研究を試みた。

8. 材料と方法

(1) アコヤ貝殻真珠層からタンパク質の調製

真珠とアコヤ貝殻真珠層の有機基質成分は同一なので (佐保ら未発表データ)、材料はア

コヤ貝殻真珠層を用いた。粉碎した真珠層 20 g を透析チューブに入れ冷 1 N HCl を 10 ml を徐々に加えた。発泡するので透析チューブの口を少し空け、外液 0.05 N HCl に対し 4 で透析した。1日に2回外液を交換し、透析を5～7日行った。遠心して酸可溶性及び酸不溶性画分に分け、中和後脱塩して試料とした。

(2) 酸不溶性タンパク質の粗精製

酸不溶性タンパク質を 8 M 尿素を含む 20 mM トリス酸緩衝液 (pH 8.0) で抽出した上清を同じ緩衝液で平衡化した Super Q Toyopearl 650S (東洋ソーダ社) カラムを用いた HPLC に供した。塩化ナトリウムの濃度を直線的に上げることにより溶出し、フラクションを集めた。

(3) アミノ酸組成分析

ピコタグワークステーション (Waters 社) を用いて、窒素置換後 1% フェノールを含む 6 N HCl で 110℃、22 時間加水分解し、アミノ酸分析計に供した。

(4) アミノ酸配列の分析

1次元として変性条件下でイモビライジング (ファルマシア社) 等電点電気泳動を行い、2次元のトリストリンゲルに展開した。電気泳動後、CAPS 緩衝液を用いた系で PVDF 膜に (3 mA/cm²) Blotting し CBB 染色を行った。スポットを切り出し、プロテインシーケンサーに供した。但し、この方法ではシステインの同定は出来ないため、切り出した膜を以下の方法でピリジリエチル化してシーケンスした。1.5 ml のエッペンチューブに 0.2 ml の 6M Guanidine-HCl, 1mM EDTA, 20mM DTT, 100mM Tris-HCl, pH 8.0 を加え、メタノールで浸した膜を入れ、窒素置換し 37℃、2 時間還元した。次に、2 µl の 4-ビニルピリジンを加え窒素置換後 37℃、2 時間 反応させピリジリエチル化した。膜を 50% メタノールで 5 回洗いシーケンサーに供した。

9. 結果

真珠形成にタンパク質が果たす役割を解明するため、タンパク質の性質を調べた。パウダー状にしたアコヤ貝殻真珠層を塩酸加水分解し、アミノ酸含量から真珠層に含まれるタンパク質は 2% (w/w) であることが明らかとなった。別法として、総窒素の定量からもこの値と一致した。

希塩酸による脱灰を行い、酸可溶性及び不溶性画分を得た。両画分を加水分解し、そのアミノ酸組成を真珠層のものと比較した。その結果、いずれもグリシン、アラニン、アスパラギン酸を多く含むことがわかった (表 1)。ジスルフィド結合に関与するシステイン含量はいずれも少なく、グルタミン酸だけは酸不溶性画分に多く存在していた。また、酸不溶性タンパク質が全体の約 8 割ほど占めていることもわかった。次に、両画分の 8 M 尿素抽出物を SDS-PAGE で調べた。その結果、酸不溶性タンパク質は分子量 15~70 kDa の範囲に 7 種類、一方、酸可溶性のものは分子量 18~60 kDa に 3 種類ほどのバンドが確認できた (写真 1、

レーン2、3、)。

アミノ酸	真珠層	酸抽出上清	酸抽出沈殿
Asp	11.6	11.5	9.2
Thr	1.1	1.6	2.8
Ser	6.1	5.4	6.4
Glu	3.4	5.0	9.2
Pro	1.8	2.2	2.8
Gly	35.5	27.4	22.4
Ala	15.8	17.6	13.3
Cys	1.3	2.3	N.D.
Val	2.1	2.6	5.1
Met	1.5	1.9	1.8
Ile	1.3	1.9	3.2
Leu	6.7	6.4	7.4
Tyr	2.4	3.0	2.7
Phe	2.3	2.4	3.2
Lys	2.3	3.0	4.3
His	0.4	0.9	1.4
Trp	N.D.	0.3	N.D.
Arg	4.4	4.6	4.8

表1. アコヤ貝殻真珠層タンパク質のアミノ酸組成分析
数値は mol % で示している。

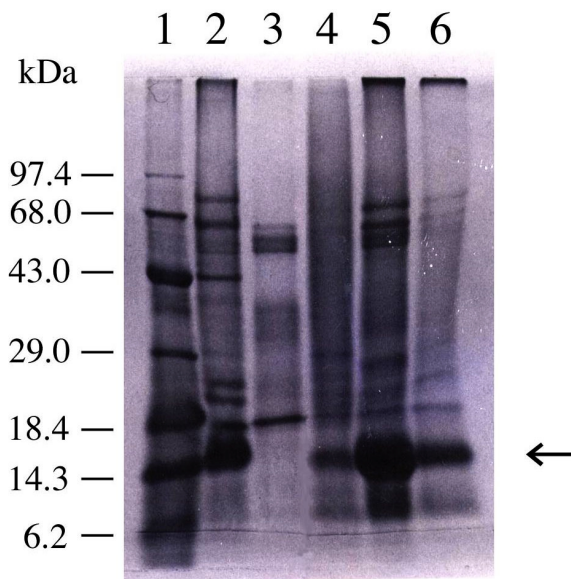


写真1. アコヤ貝殻真珠層タンパク質の解析および精製

レーン1: サイズマーカー

レーン2: 酸不溶性タンパク質

レーン3: 酸可溶性タンパク質

レーン4: イオン交換後、約0.15 M塩化ナトリウム濃度での溶出画分

レーン5: イオン交換後、約0.3 M塩化ナトリウム濃度での溶出画分

レーン6: イオン交換後、約0.45 M塩化ナトリウム濃度での溶出画分

そこで、これらのタンパク質のアミノ酸配列を調べることにした。まず、酸可溶性のタンパク質は量的に少なかったため直接2次元電気泳動に供した。PVDF膜に転写したスポットをプロテインシーケンサーで調べた結果、酸可溶性で分子量約60 kDaタンパク質のN末端から23残基のアミノ酸配列が決定できた(図1)。この配列を基にホモロジー検索を行ったところ、真珠に含まれるタンパク質として初めて報告されたNacreinのN末端の配列と完全に一致した[1]。一方、酸不溶性タンパク質において、分子量16kDaのタンパク質が濃いバンドとして確認された。そこで、酸不溶性タンパク質を8M尿素で抽出し陰イオン交換カラムを用いたHPLCに供した。塩化ナトリウムの濃度を直線的に上げることにより溶出を行ったところ、目的の16kDaのタンパク質は0.3Mをピークとして広い範囲で溶出された。それらのフラクションには、高分子量のタンパク質も含まれていた(写真1、レーン4~6)。さらに逆相カラムを用いて精製を試みたが、結果的に分離できなかった。8M尿素という変性剤存在下では他のカラムクロマトによる精製も難しいと考えられた。そこで、陰イオン交換から溶出された粗精製のものを、変性剤を含む1次元の等電点電気泳動に供し、さらに、2次元電気泳動へと展開した。PVDF膜に転写してCBB染色を行ったところ、16kDaタンパク質は酸性側で少しブロードなスポットとして検出できた。プロテインシーケンサーで調べた結果、N末端はきれいな単一アミノ酸のピークとして同定できた。ところが、2~4残基では明らかに異なる複数のアミノ酸のピークが検出された。この結果から16kDaタンパク質には分子量及び等電点の等しいタンパク質が2種類以上混在している可能性が示唆された。

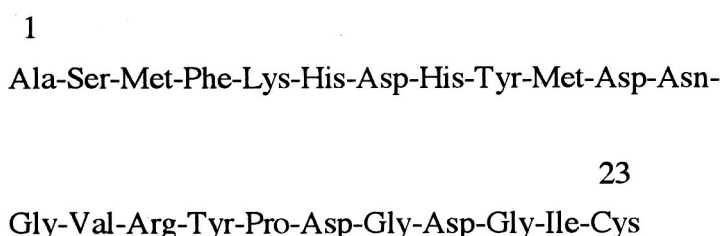


図1. アコヤ貝殻真珠層由来の酸可溶性60 kDaタンパク質のN末端のアミノ酸配列

10. 考察

真珠貝を含め貝殻のカルシウム結合タンパク質のアミノ酸組成についてはいくつか報告があり[1,2]、いずれの場合にもグリシンとアスパラギン酸に富んでいる。今回の研究はカルシウム結合能を指標にした訳ではないが、2つのアミノ酸の含有量が多いと言う点は一致している。これまで、真珠形成におけるタンパク質の役割はほとんど知られていなかった。最近、宮本らにより真珠中のタンパク質 Nacrein の cDNA が cloning され、このタンパク質の1次構造が明らかにされた [3]。それによるとこのタンパク質は分子量6万で中央部分に Gly-X-Asn (X は Asp, Asn) の繰り返し配列が存在し、彼らはその部分がカルシウム結合部位であることを示唆した。さらに、Nacrein は炭酸脱水素酵素の活性を持つことから炭酸イオンの生成に関与しており、Nacrein -Ca²⁺ が Nacrein - CaCO₃ を形成するモデルを提唱している。また、Nacrein は真珠から EDTA 可溶性タンパク質として精製されたものであり、真珠層のタンパク質として著者が調べたアミノ酸配列と一致すると言う事実は、佐俣らに言われている真珠と真珠層有機基質成分は同一というデータをより支持することとなった。その後、須藤らはアコヤ貝殻真珠層をぎ酸中で臭化シアン処理して得たペプチドのアミノ酸配列を基に、2種類の cDNA を単離した [4]。cDNA からコードされるタンパク質の分子量は6万と3.1万であり、前者は Nacrein と分子量は同じであるが性質は異なっている。須藤らの単離した2つの遺伝子は外套膜の異なる部位で発現されていることが明らかにされたが、タンパク質としての役割は不明のままである。

これまで、アコヤ貝殻真珠層から酸可溶性タンパク質では Nacrein を、酸不溶性のうち16kDa タンパク質の精製と1次構造の解明を試みてきた。特に後者では8M尿素などの変性剤存在下でないとタンパク質の抽出ができず、さらにカラムクロマトの使用もかなり制限されたため精製までに至らなかった。2次元電気泳動に続いて PVDF 膜への転写は可能であったが、プロテインシーケンサーの結果から複数のタンパク質の混在が示唆され、その1次構造については課題として残されている。

11. 今後の展開

真珠及び真珠層から同定されたタンパク質はまだ3種類と少ない。本研究でそれらとは別に16kDa タンパク質の存在はわかったが、今後さらに詳細に調べ cDNA のクローニングを行い1次構造を明らかにしたい。最近、アコヤ貝外套膜殻側上皮細胞の培養法が検討されており[5]、その確立も必要になるものと思われる。それらが可能となれば真珠形成メカニズムが遺伝子レベルで解明され、良質な真珠の生産に貢献できるものと考えられる。

12. 参考文献

- [1] Tetsuro Samata : *Venus*, **47** (2), 127 - 140, 1988.
- [2] Tetsuro Samata : *The Veliger*, **33** (2), 190 - 201, 1990.
- [3] H. Miyamoto, T. Miyasita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita and A. Matushiro : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9657-9660, 1996.
- [4] S. Sudo, T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima and T.

Takahashi : Nature, **387**, 563-564 ,1997.

[5] M. Awaji and T. Suzuki : In Vitro Cell dev. Biol., **34**, 486-491, 1998.

13. 研究業績

13-1. 原著論文 なし

13-2. 総説など なし

13-3. 国際学会発表 なし

13-4. 国内学会発表 なし

13-5. 新聞など なし

13-6. 特許 なし

14.

(1) Title: Characterization of proteins contained in the nacreous layer
of *Pinctada fucata*

(2) Institute : Industrial Technology Center of Nagasaki Prefecture
2-1303-8 Ikeda, Omura, Nagasaki, 856-0026, Japan.

(3) Name : Fusakazu Misoka

(4) Contributor : Nobody

(5) Project term : 1997 ~1999

(6) Abstract :

To understand how pearl is generated, the author analyzed the composition of proteins contained in pearl. Since the organic matrix in pearl is known to be the same as that in the nacreous layer of *Pinctada fucata*, the latter material, crushed to powder, was used to analyze protein composition. Total protein contents in this material was 2%. Analysis of the amino acid composition showed that Gly, Ala and Asp were contained at higher levels than other amino acids. The author obtained the acid soluble- and insoluble- fractions by decalcification of the nacreous layer of *Pinctada fucata* with 0.05 N HCl. Both fractions were found to contain 10 kinds of protein having the molecular mass in the 15-70 kDa range. A 60 kDa-protein, isolated from the acid soluble fraction, was transblotted onto a PVDF membrane to determine its N-terminal amino acid sequence. The N-terminal sequence, determined until 23 amino acid residues, was identical to that "Nacrein", which is a protein contained in pearl. When the acid insoluble fraction was treated with 8 M urea, a large amounts of a 16 kDa protein were extracted. To determine the primary structure, the 16-kDa protein was partially purified from the urea-treated fraction by a column chromatography with an anion-exchange resin. The purified protein was subjected to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transblotted onto a PVDF membrane. The N-terminal amino acid sequence analysis of the transblotted-16 kDa protein showed that it was the single amino acid. However, a few amino acids was observed in the second (residual) position from N-terminus, suggesting that the transblotted protein sample contains a few contaminant which is physico-chemically similar to the 16 kDa protein.