



生体鉱物形成に関わるタンパク質に関する研究

岡山大学学術研究院環境生命科学学域 根本理子

はじめに

生物は、環境中から無機イオンを濃縮し、細胞内外で鉱物を形成することで骨や歯、細胞壁や磁気センサー等として利用している。生物が行う鉱物形成作用はバイオミネラリゼーションと呼ばれる。生物が形成する鉱物（バイオミネラル）は、その構造や組成に由来する優れた性質（強磁性、耐摩耗性、フォトニック結晶特性など）を持ち、多くの材料科学者から注目されてきた。生物は、様々なタンパク質を使って、金属の濃縮や酸化還元を制御することで、生体内の穏和な条件下で、優れた性質を持つ鉱物を形成することができる。生体鉱物の形成を制御するタンパク質を明らかにすることができれば、生体鉱物を模倣した新規機能性材料の開発や、環境に優しい材料合成プロセスの開発につながる事が期待される。

筆者はこれまで生体鉱物の中でも、軟体動物であるヒザラガイの磁鉄鉱 (Fe_3O_4) の歯形成に関わるタンパク質や微細藻類である珪藻のシリカ (SiO_2) 被殻形成に関わるタンパク質について研究を行ってきた。

1. ヒザラガイの磁鉄鉱歯形成に関わるタンパク質の同定

ヒザラガイは世界各地の海岸部に生息する、硬い岩礁上に付着して生活している貝類であり、“歯舌”と呼ばれる摂食器官を使って、岩礁表面に付着している藻類を削り捕食している。歯舌はリボン状の有機膜に歯が数十列並んだ構造をしており、歯舌上の個々の歯の歯冠部に磁鉄鉱が沈着している(図1)。最近の研究から、磁鉄鉱が沈着したヒザラガイの歯は、生物が形成する鉱物の中で最大の硬度と剛性を持つ耐摩耗性材料であることが示されている。そのため、ヒザラガイの歯は生物由来の磁鉄鉱というだけでなく、超硬質材料としても、材料科学の分野において着目されている。ヒザラガイによる磁鉄鉱形成機構を明らかにするため、筆者らはこれまで世界最大のヒザラガイであるオオバンヒザラガイ(学名: *Cryptochiton stelleri*) を用いて研究を行ってきた。ヒザラガイは、通常、歯舌の前方の数列の歯のみ摂餌に利用しており、歯が欠けると、新しく形成された歯が後方から前に押し出されることにより歯が新生される。そのため、歯舌上では常に新しい歯が形成されており、異なる成熟化ステージの歯をひとつの歯舌上に観察することができる(図2)。

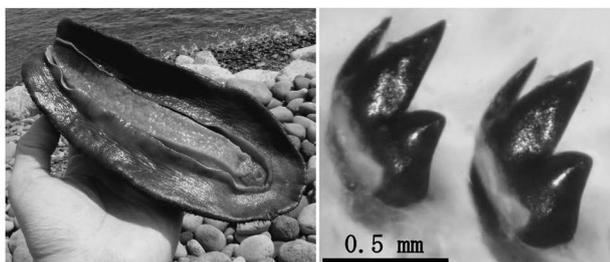


図1. オオバンヒザラガイ(左)と磁鉄鉱の歯(右)

本研究では、ヒザラガイの磁鉄鉱形成機構を明らかにするため、シンクロトロン X線回折および電子顕微鏡を用いて、歯の成熟化にともない酸化鉄の組成および構造がどのように変化していくかを調べた。シンクロトロン X線回折を行った結果、まず非晶質の酸化鉄であるフェリハイドライトが形成された後、数列かけて磁鉄鉱に変化していくことが確認された。電子顕微鏡を用いて解析したところ、歯の基盤を形成しているキチン繊維上にフェリハイドライト粒子の凝集塊が沈着した後、歯の成熟化にともない、凝集塊のサイズが増大していく様子が確認された。また凝集塊のサイズが大きくなるほど、キチン繊維の径が小さくなる事が観察された。キチン繊維の密度及び沈着する酸化鉄粒子凝集塊のサイズから、キチン繊維が、形成される磁鉄鉱結晶の直径を規定していることが示唆された¹⁾。

筆者らのこれまでの観察結果に基づき、歯冠部への酸化鉄沈着やフェリハイドライトから磁鉄鉱への結晶化はタンパク質によって制御されている可能性があると考えた。そこで磁鉄鉱形成に関わるタンパク質を明らかにするため、まずオオバンヒザラガイ歯舌組織のトランスクリプトーム配列を取得した。次に、トランスクリプトーム配列のリード数をカウントすることで非鉄物化領域、鉄物化領域で高発現している遺伝子を調べた結果、非鉄物化領域では鉄の蓄積・輸送に関わるフェリチンの遺伝子が高発現していた。この結果より、フェリチンが鉄物化に必要な多量の鉄の輸送に関与していることが示唆された。鉄物化領域では、高発現していた上位20遺伝子の約3割がミトコンドリアの電子伝達系酵素だった。これらのタンパク質は、鉄イオンの輸送や結晶化の際に必要なエネルギーを供給していると考えられた²⁾。さらに、トランスクリプトーム配列を利用してプロテオーム解析を実施し、磁鉄鉱の歯に含まれるタンパク質を同定した。筆者の以前行った研究において、歯冠部と有機膜部分のタンパク質を抽出し、ナノ LC-MS で解析した³⁾。上記研究で得られたスペクトルデータと新たに取得したトランスクリプトーム配列を用いて、MS/MS イオンサーチを行い、タンパク質を同定した。歯冠部と有機膜部分から同定されたタンパク質を比較し、歯冠部のみから同定されたタンパク質を22個の歯冠部特異的タンパク質とした。その中には、酸素運搬に関わるグロ

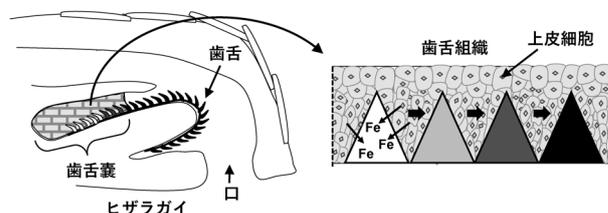


図2. 歯舌上では常に新しい歯が形成されており、異なる成熟化ステージの歯がひとつの歯舌上に存在する。

ピンタンパク質, 細胞外基質形成に関わるタンパク質, 酸化還元タンパク質, 鉄を酸化するフェロキシダーゼの他に, 特定のアミノ酸が連続したユニークな配列を持ち, 既知のタンパク質に相同性を示さない機能未知の新規タンパク質が含まれていた。歯冠部特異的タンパク質のうち, 細胞外基質形成に関わるタンパク質, フェロキシダーゼ, 新規タンパク質を含む複数のタンパク質は細胞外分泌のためのシグナル配列を有していた。これらのタンパク質は, 歯を覆う上皮細胞から細胞外へ分泌された後, 歯内部で磁鉄鉱形成に関与している可能性が示唆された。

2. 珪藻のシリカ被殻形成に関わるタンパク質の同定

珪藻はシリカ (SiO_2) から成る被殻を細胞壁として持つ真核藻類である (図3)。珪藻が形成する被殻は, 現在の微細加工技術では合成困難な微細構造を持ち, フォトニック結晶特性や優れた多孔質性を示す機能性材料としても注目されている。珪藻の被殻形成機構を明らかにできれば, ナノテクノロジー分野への応用が可能な新しいセラミックス材料を開発できる可能性がある。珪藻のシリカ被殻中にはタンパク質が存在しており, その形状を制御していると考えられている。珪藻のシリカ被殻局在タンパク質は, セリン, リシンを多く含有する (Scheffel et al. 2011) という先行研究の報告に基づき, 本研究ではこれまで解析されてきた珪藻とは全く異なる微細構造を有する *Fistulifera* 属の珪藻のゲノム情報からアミノ酸組成に基づき, セリン, リシンを30%以上含有する7個のタンパク質を同定した。同定したタンパク質は, 他の珪藻に見られない新規のアミノ酸配列モチーフを有していた。GFP融合タンパク質を用いた局在解析により, 同定したタンパク質が被殻に局在することが示された。また, 被殻の中でも特にシリカが多く沈着している領域に局在していた。上記結果より, 同定したタンパク質がシリカ沈着に関わっている可能性が示された。また, *Fistulifera* 属のみに見られるアミノ酸モチーフが *Fistulifera* 属特異的な形状を制御している可能性が示唆された⁴⁾。

これまでに報告されている珪藻のシリカ被殻形成関連タンパク質の多くは, 互いに配列相同性を示さない種特異的タンパク質であることが示されている。そこで, 珪藻間で普遍的に保存された被殻形成関連タンパク質を同定することを目的とし, 次世代シーケンサーを用いて3種の非モデル珪藻のトランスクリプトーム配列を新たに取得後, ゲノムが解読された5種の珪藻とともに珪藻間における初めての大規模な遺伝子比較解析を行った。その結果, 珪藻のみに保存された新規のメチルトランスフェラーゼファミリーを見出すことに成功した。同定されたメチルトランスフェラーゼファミリーは, 被殻形成に伴いその発現量が上昇したことから, シリカ被殻形成への関与が示された。これまで, 珪藻の被殻形成関連タンパク質として同定・報

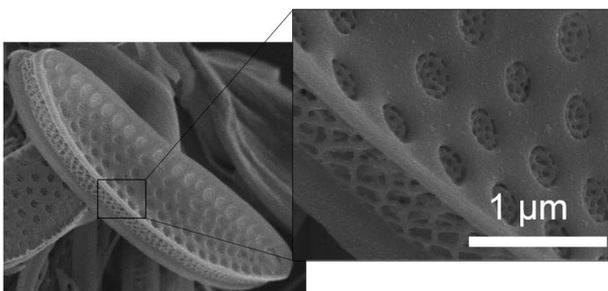


図3. 珪藻のシリカ被殻

告されたタンパク質はジメチル化およびトリメチル化されたリジン残基を持つことが知られており, シリカ形成におけるメチル化修飾の重要性が示唆されていたが, 珪藻の被殻形成関連タンパク質をメチル化する酵素は見つかっていなかった。本研究により同定された珪藻特異的新規メチルトランスフェラーゼは, 被殻形成関連タンパク質をメチル化することで, 珪藻のシリカ形成を制御するタンパク質であることが示唆された⁵⁾。

おわりに

本研究により初めて作製されたオオバンヒザラガイ歯舌組織の網羅的なトランスクリプトーム配列に基づき, 歯の形成過程で高発現している遺伝子, および磁鉄鉱の歯に特異的なタンパク質が同定された。本研究で得られた結果は, 今後のヒザラガイの磁鉄鉱形成機構解明に向けた研究の基盤となると考えられる。ヒザラガイによる磁鉄鉱形成機構の解明は, 磁鉄鉱の新しい低温合成法や新規耐摩耗性材料の開発につながる可能性があり, 材料科学の発展に貢献すると考えられる。また, 筆者らは, 珪藻のシリカ被殻形成関連遺伝子に着目した, 初めての大规模な珪藻間遺伝子比較解析を行った。その結果, 新規のメチルトランスフェラーゼファミリーを新たに見出すことができた。今後, これらのタンパクの基質の特定や細胞内局在解析により, 被殻形成における役割が明らかになることが期待される。

(引用文献)

- 1) Wang Q.†, Nemoto M.†, Li D., Weaver J. C., Weden B., Stegemeier J., Bozhilov K. N., Wood L. R., Milliron G. W., Kim C. S., DiMasi E., Kisailus D.*, Phase transformations and structural developments in the radular teeth of *Cryptochiton stelleri*, *Advanced Functional Materials*, Vol. 23, p 2908-2917, (2013) (†Equal contribution)
- 2) Nemoto M.*, Ren D., Herrera S., Pan S., Tamura T., Inagaki K., Kisailus D.*, Integrated transcriptomic and proteomic analyses of a molecular mechanism of radular teeth biomineralization in *Cryptochiton stelleri*, *Scientific Reports*, Vol. 9, p 856, (2019)
- 3) Nemoto M., Wang Q., Li D., Pan S., Matsunaga T., Kisailus D.*, A Proteomic analysis from the mineralized radular teeth of the giant pacific chiton, *Cryptochiton stelleri* (Mollusca), *Proteomics*, Vol. 12, p 2890-2894, (2012)
- 4) Nemoto M., Maeda Y., Muto M., Tanaka M., Yoshino T., Mayama S., Tanaka T.*, Identification of a frustule-associated protein of the marine pennate diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580, *Marine Genomics*, Vol. 16, p 39-44, (2014)
- 5) Nemoto M.*, Iwaki S., Moriya H., Monden Y., Tamura T., Inagaki K., Mayama S., Obuse K., Comparative gene analysis focused on silica cell wall formation: Identification of diatom-specific SET domain protein methyltransferases, *Marine Biotechnology*, Vol. 22, p 551-563, (2020)

謝辞 筆者は東京農工大学の松永是先生(現国立研究開発法人海洋研究開発機構理事長)の研究室で, 生体鉱物に関する研究に出会いました。学生時代に研究の面白さや, 研究に対する姿勢を温かくご指導下さいました松永先生に心より感謝申し上げます。また, 本研究に関しましてご指導頂きました先生方, 多大なご協力を頂きました岡山大学農学部微生物遺伝子化学研究室内の学生の方々に厚く御礼申し上げます。筆者が岡山大学に着任後, 自由に研究を行う機会を与えていただいた岡山大学農学部教授稲垣賢二先生に厚くお礼申し上げます。最後に, 本賞にご推薦下さいました岡山大学農学部教授田村隆先生に厚く御礼申し上げます。