

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		ENDO KAZUYOSHI					
①研究代表者氏名		遠藤 一佳		②所属研究機関・部局・職 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教授			
③研究課題名	和文	貝殻形成に関わる遺伝子の網羅的探索：軟体動物ゲノムプロジェクトに向けて					
	英文	An exhaustive exploration of the genes involved in molluscan shell formation: a primer for a genome project					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		44,900	9,200	9,200	9,200	9,200	81,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）		
遠藤 一佳		筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教授		古生物学	研究計画全体の総括、貝殻形成に関わる遺伝子の構造・発現・機能解析 EST解析、発生遺伝学的アイディアの提供		
倉谷 滋		理化学研究所神戸・発生再生科学総合研究センター（CDB）・チームリーダー（研究職）		進化発生学			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究は、軟体動物の殻体（貝殻）形成—すなわち(1)殻体分泌細胞の分化、(2)殻体の分泌（石灰化）、そして(3)殻体の形態形成—に関与する遺伝子および遺伝子産物の機能を網羅的に探索し、軟体動物における殻体形成機序を解明するとともに、古生物学・進化学的な知見と合わせて殻体発生プログラムの進化過程を考究し、さらに軟体動物ゲノムプロジェクトの日本における研究拠点を形成することを目的とする。研究対象として、淡水生の巻貝であるモノアラガイ <i>Lymnaea stagnalis</i> を選定し、本種の貝殻形成への関与が疑われる全ての遺伝子のリストアップを行う。また、上記(1)から(3)に示した殻体形成の3つの局面それぞれで鍵となる主要な遺伝子群、すなわち(1)殻体形成のマスター遺伝子（それが機能しないと巻貝がナメクジのようになってしまうもの）、(2)殻体結晶の沈着、阻害、結晶多形制御などの結晶成長制御因子、そして(3)殻体の左右非対称性の制御因子（巻貝が立体等角らせんで正確に巻くことをコントロールしている因子）については、本研究計画期間中における単離・同定を特に目指し、詳細な発現・機能解析、殻体進化との関連の考察を行う。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

これまでに研究目的に掲げた3種類の遺伝子群[(1)殻体形成のマスター遺伝子、(2)殻体の結晶沈着の制御因子、(3)巻貝の巻きの制御因子]の単離・同定を中心に以下の研究を行ってきた。

(1) 殻体形成のマスター遺伝子

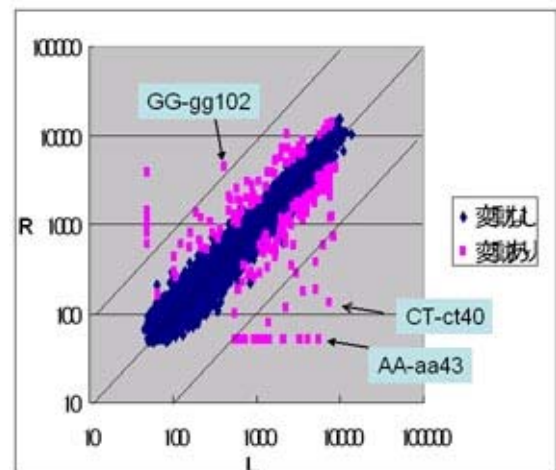
当該遺伝子の探索法として、(a)貝殻形成への関与が知られている遺伝子(*engrailed*, *BMP*, *Hox*)のホモログ探索と(b)EST解析による探索を計画した。*Hox* 遺伝子については、軟体動物を代表する7種の *Hox* 遺伝子を PCR 法により増幅し、遺伝子組成を推定することにより、軟体動物の最終共通祖先が最低12個の *Hox* 遺伝子を持っていたこと、体制の複雑さと *Hox* 遺伝子の数は相関しないこと、そして貝殻形成に関連するとされた *Hox4* の有無と貝殻の有無が対応していないことを明らかにした (Development, Genes and Evolution 誌投稿中)。一方 *engrailed* と *BMP* については殻体形成期の幼生での cDNA の増幅が認められないことから、モノアラガイでは殻体形成に関与していない可能性が示唆された。(b)については幼生段階での cDNA ライブラリーの作成を試みたが、必要量の RNA を得ることができなかった。後述のように、殻体形成のマスター遺伝子の探索については、今後変異体の作出によるアプローチに方向転換する予定である。

(2) 殻体の結晶沈着の制御因子

当該遺伝子に関しては、今回の主たる研究対象であるモノアラガイ (巻貝) と同時に、真珠産業との関連で貝殻形成の研究が進んでいるアコヤガイ (二枚貝) についても解析を行っている。モノアラガイについては、近縁のヒラマキガイにおいて構造が決定されている殻体基質タンパク質 *Dermatopontin* の遺伝子ホモログの単離と発現解析を行った。その結果、モノアラガイの *dermatopontin* には最低3種類のパラログがあり、そのうちの一つのタイプのみが殻体基質タンパク質として機能しており、このタイプのみが糖鎖結合モチーフを持つことから、このモチーフが殻体基質タンパク質としての機能上重要な可能性が高いことを明らかにした (Journal of Molecular Evolution 誌投稿中)。一方、アコヤガイにおいては、著しくアスパラギン酸に富んだ新規の可溶性殻体基質タンパク質 *Aspein* の構造を明らかにした (特記事項の項で後述)。また、これを含めた6種類の貝殻基質タンパク質の遺伝子の発現解析を行い、外套膜全体で発現する炭酸脱水酵素の *nacrein* を除く5種類の遺伝子が、外套膜の外側 (*aspein*, *MSI31*, *prismalin 14*) と内側 (*N16*, *MSI60*) にきれいに分かれて発現していることを明らかにし、それぞれが稜柱層と真珠層の作り分けに関与している可能性が高いことを示した (Marine Biotechnology 誌投稿中)。

(3) 巻貝の巻きの制御因子

巻貝の殻が等角らせんで規則的に巻くのは、体の左右で殻の分泌量に規則的な偏りがあるためであり、殻を分泌する外套膜の左側と右側で発現している何らかの遺伝子の発現量に偏りがあると予想できる。そこで、モノアラガイの左巻き個体の外套膜の左側と右側で非対称的に発現している遺伝子を HiCEP (high-coverage expression profiling) 法を用いて網羅的に探索した (右図)。合計11588個の遺伝子の発現を比較し、そのうち左側と右側のそれぞれで特異的に発現している遺伝子で最大の変動幅を示すものについて RACE 法による相補的 DNA の単離と配列の決定と同定を行った。その結果、左巻きの個体の左側と右側でそれぞれ特異的に発現している遺伝子として、それぞれ銅イオン受容体のホモログ (*ctct40*) と発生・分化への関与が知られる *galectin* のホモログ (*gggg102*) を同定した。現在 RNA 干渉法による機能解析の準備を行っている。



図の説明: HiCEP 法によるモノアラガイの外套膜の左側 (L:横軸) と右側 (R:縦軸) での遺伝子発現量の包括的な比較。一つの点が一遺伝子に対応し、縦軸横軸の数字はそれぞれの発現量に対応する。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

これまでの研究において単離・同定されたアコヤガイの殻体基質タンパク質 **Aspein** は、その配列の 60% が酸性アミノ酸のアスパラギン酸で構成され、これまでに知られているすべてのタンパク質の中で最も低い等電点(1.45)を示す非常に特異な酸性タンパク質である。このタンパク質は少なくとも 2 つの理由で大きな学問的インパクトを持つ。

一つは、これが 1970 年代より 30 年以上に亘って生体鉱物学で重要性が指摘されてきた高度にアスパラギン酸に富む軟体動物の殻体基質タンパク質について、そのアミノ酸一次配列を世界で始めて決定した例であるということ。貝殻の基質タンパク質にアスパラギン酸が多く含まれていることは貝殻抽出物のアミノ酸組成分析によって 1960 年代より知られていた。さらに 1970 年代には、負に荷電したアスパラギン酸 (の側鎖のカルボキシル基) がカルシウムイオンと相互作用し、またベータシート構造に折りたたまれた仮想的なタンパク質においてこれらアスパラギン酸が一つおきに配置し、それによって炭酸カルシウム結晶沈着の鋳型として働いているのではないかという理論が提唱された (炭酸カルシウム結晶内のカルシウムイオン間の距離とタンパク質内のカルボキシル基間の距離はうまく対応する)。その後、世界の複数の研究室でこのタンパク質を精製し、構造を決定しようという試みが精力的に行われてきたが、その特異な電氣的性質ゆえにタンパク質の単離がなされることはなかった。研究代表者の実験室では、1990 年代後半に貝殻抽出物の脱塩方法を改良するなどの工夫によりアスパラギン酸を約 20% 含む酸性殻体基質タンパク質 **MSP-1** を単離・精製してアミノ酸配列を決定することに世界に先駆けて成功し、さらに今回この **MSP-1** の配列をもとに分子生物学的な手法を用いることで **Aspein** 遺伝子を単離した。配列を読むことによって初めてタンパク質分子内でのアスパラギン酸の (必ずしも一つおきになっていない) 配置が明らかとなり、鋳型説の理論的予想が覆される結果となった。

もう一つの理由は、**Aspein** が少なくとも 1920 年代より 80 年以上に亘って研究者を悩ませてきた生体鉱物学上最大の難問の一つ、「カルサイト-アラゴナイト問題」の解決の重大な鍵を握っていると考えられること。生体鉱物としてよく知られる炭酸カルシウムにはカルサイト (方解石) とアラゴナイト (あられ石) という大きく二つの (組成は同じだが結晶構造が違う) 結晶多形が存在する。これら二つの結晶多形を生物は作り分けており、しかも同一個体の隣接した領域で作り分けている場合すら知られる (たとえば、アコヤガイ殻体の外側の稜柱層はカルサイトから、内側の真珠層はアラゴナイトからできている)。この作り分けのメカニズムが数十年來の謎であった。1996 年には貝殻に含まれる可溶性の殻体基質タンパク質がこの作り分けに直接的に働いていることを示す実験結果が世界的な複数の研究室から相次いで報告されたが、その殻体基質タンパク質の実体は不明であった。今回、本研究で行った発現解析の結果とすでに行われているポリアスパラギン酸 (人工物) を使った実験の結果を合わせ考えると、**Aspein** がその作り分けをしているタンパク質そのものである可能性がきわめて高いと思われる。最終的な解明は、現在進行中のリコンビナント **Aspein** (組換え体) を用いた *in vitro* の結晶合成実験の結果と、現在計画中の RNA 干渉法を用いた *in vivo* での機能解析の結果を待たなければならないが、もし確認されれば、学問的にインパクトがあるのみならず、産業面での応用など社会的な影響、将来性も小さくないであろう。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (掲載が確定しているものを含む。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

<論文>

- Yamaguchi, S. and Endo, K. (2003) Molecular phylogeny of Ostracoda (Crustacea) inferred from 18S ribosomal DNA sequences: implication for its origin and diversification. *Marine Biology*, 143, 23-38.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I. and Endo, K. (2004) Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(4), 1175-1180.
- Endo, K., Sarashina, I., and Asami, T. (2004) *Lymnaea stagnalis* as a Model Organism for Studies of Calcium Carbonate Biomineralization, In Kobayashi, I. (ed.) *Biomineralization: formation, diversity, evolution and application*, Tokai Univ. Press., pp. 172-175.
- Endo, K., Noguchi, Y., Ueshima, R., Jacobs, H. T. (2005) Novel Repetitive Structures, Deviant Protein-encoding Sequences and Unidentified ORFs in the Mitochondrial Genome of the Brachiopod *Lingula anatina*. *Journal of Molecular Evolution* (in press)
- Oka, A., Endo, K. and Sashida, K. (2005) Molecular phylogeny of Acantharea (Actinopodea: Protista) based on small subunit rRNA gene sequences. *Sci. Rep. Univ. Tsukuba.* (in press)
- Kuratani, S. (2003). Evolution of the vertebrate jaw – homology and developmental constraints. *Paleontol. Res.* 7, 89-102.
- Kuratani, S. (2003). The heterotopic shift in developmental patterns and evolution of the jaw in vertebrates. In: Sekimura, T., Noji, S., Ueno, N., and Maini, P.K. (eds.), *Morphogenesis and Pattern Formation in Biological Systems: Experiments and Models*, Springer-Verlag Tokyo, pp. 119-125.
- Takio, Y., Pasqualetti, M., Kuraku, S., Hirano, S., Rijli, F.M., and Kuratani, S. (2004). Lamprey *Hox* genes and the evolution of jaws. *Nature* 429, 1 p following 262.
- Kimura, Y., Inoue, N., Fukui, A., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Nonaka, M., Kuratani, S., Fujita, T., Nonaka, M., and Seya, T. (2004). A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of lamprey that participates in cleavage of lamprey complement 3. *J. Immunol.* 173, 1118-1128.
- Kuratani, S. (2004). Evolution of the vertebrate jaw: comparative embryology reveals the developmental factors behind the evolutionary novelty. *J. Anat.* 205, 335-347.
- Nagashima, H., Uchida, K., Yamamoto, K., Kuraku, S., Usuda, R., and Kuratani, S. (2005). Turtle-chicken chimera: an experimental approach to understanding evolutionary innovation in the turtle. *Dev. Dyn.* 232, 149-161.
- Kuratani, S. (2005). Craniofacial development and evolution in vertebrates: the old problems on a new background. *Zool. Sci.* 22, 1-19.
- Shigetani, Y., Sugahara, F., and Kuratani, S. (2005). Evolutionary scenario of the vertebrate jaw: the heterotopy theory from the perspectives of comparative and molecular embryology. *BioEssays.* 27, 331-338.
- Kuraku, S., Usuda, R., and Kuratani, S. (2005). Comprehensive survey of carapacial ridge-specific genes in turtle implies co-option of some regulatory genes in carapace evolution. *Evol. Dev.* 7, 3-17.
- Narita, Y., and Kuratani, S. (2005). Evolution of the vertebral formulae in mammals - a perspective from the developmental constraints. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 304B, 91-106.
- Ohya, Y.K., Kuraku, S., and Kuratani, S. (2005). *Hox* code in embryos of Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis* correlates with the evolutionary innovation in the turtle. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 304B, 107-118.

<著書>

- (分担) 遠藤一佳 シャミセンガイは貝の親戚? 東京大学海洋研究所編「海の生き物 100 不思議」 pp.186-187. 東京書籍 (2003)
- (分担) 遠藤一佳 生体高分子と歴史情報, 小沢智生・瀬戸口烈司・速水格 (編)「古生物の科学 4. 古生物の進化」, 朝倉書店 (2004)

- (分担) 遠藤一佳 分子化石, 分子古生物学, 古代DNA, アストロバイオロジー, バイオミネラリゼーション, カンブリア紀の爆発, 「科学大辞典 第2版」, 丸善 (2005)
- (共訳) 遠藤一佳・更科功 サイモン・コンウェイモリス著: 生命の選択肢, 講談社 (2005) (印刷中)
- (分担) 倉谷 滋 エピジェネティック発生システムと進化: 脊椎動物類成立の研究から、五条堀孝編「ゲノムから見た生物の多様性と進化」シュプリンガー・フェアラー東京、pp. 143-150 (2003)
- (分担) 佐藤矩行、野地澄晴、倉谷 滋、長谷部光泰 シリーズ進化学・第4巻「発生と進化」(担当: 第2章・動物の発生と進化、部分; 第4章・発生と進化の研究史) 岩波書店 (2004)
- (単著) 倉谷 滋 「動物進化形態学」東京大学出版会 (2004)

<和文総説>

遠藤一佳 (2003) 「40億年生命全史」書評. 日経サイエンス 2003年6月号p.120.

遠藤一佳・南澤 究・掛川 武・犬伏和之 (2004) 微生物学と地球科学の密接なる関係-第16回国際環境生物地球化学シンポジウム報告 科学, vol.74, no. 2, 166-169.

倉谷 滋、長谷部光泰、三浦 徹 (2003)かたちと遺伝子 12 「発生学・生態学・進化学の融合」遺伝 vol. 57, no. 6, 23-31.

倉谷 滋 (2003)進化発生学はジュラシックパークを可能にするか? 「発生学・生態学・進化学の融合」遺伝 vol. 57, no. 6, 67-71.

倉谷 滋 (2003)分子発生学的機構から見た進化的新形態の起源: 顎と甲羅. 環境と健康, 16, 210-221.

倉谷 滋 (2003)顎顔面形成の進化 - 分子発生学の視点から Evolution of Craniofacial Development. 矯正臨床 (Monograph of Clinical Orthodontics) Vol. 25, 3-20. (付) 対談: 生物の多様性、複雑性における機能・形態・構造の関わりについて pp. 29-43.

倉谷 滋 (2004)ゲノムが語る進化の謎 (2) 「生き物の形はどのように決まったのか」、日経サイエンス 2004年2月号、30-37.

工樂樹洋、瀧尾陽子、倉谷 滋 (2004)Hox 遺伝子とボディプランの相同性. 実験医学. 23, No. 1 (増刊), 58-63.

倉谷 滋 (2005,印刷中)顎と顎骨弓とヴァイオリン-進化発生学的考察とは何か.上野直人・八杉貞雄・野地澄晴編 蛋白質・核酸・酵素別冊「発生システムのダイナミクス」

<国際会議>

Yamamoto, A., Kato, Y. and Endo, K., Microbial structures from Pliocene sedimentary iron deposits in Kawatana and Sonogi Mines, Nagasaki, southern Japan, 16th International Symposium on Environmental Biogeochemistry, Oirase (Aomori), Japan, 1-6 September 2003.

Kuratani, S. (2005) Craniofacial pattern and the vertebrate evolution. In: *CDB Symposium 2005: Origin and Development of the Vertebrate Traits.*, Kobe, 2005.4.11.

Kuratani, S. (2005) Developmental bases for the evolution of vertebrate traits. In: *Symposium: Life as a Complex System: Constructive and Dynamic Approach to Cell and Developmental Biology*(21世紀 COE 企画会議)Tokyo University, Tokyo, 2005.3.06.

Kuratani, S. (2005) Developmental studies of the lamprey and evolution of the jaw. In: the Symposium: *Craniofacial development - "Making faces" in: The Anatomical Society of Great Britain and Ireland*, St Anne's College, Oxford, 5th-7th January 2005.1.06.

Kuratani, S. (2004) Developmental factors that brought about the turtle shell. In: *International Mammalian Symposium 2 International Symposium about the Development of Limbs and Epithelial Appendages* (四肢・上皮性付属器の発生進化に関する国際シンポジウム). 東京工業大学 2004.9.22.

Kuratani, S. (2004) Evolutionary innovations in vertebrates from viewpoints of molecular developmental biology. In: *16th IFAA: Molecular Understanding towards craniofacial development and evolution*. Kyoto, 2004.8.23.

Kuratani, S. (2004) Development of the vertebrate pharyngeal arch and evolutionary origin of the jaw. In: *2004 JSPS Core-to-Core Workshop on "Organogenesis of the thymus" in TOKUSHIMA* August 14-15, 2004.

Kuratani, S., Shigetani, Y., Nagashima, H. and Kuraku, S. (2004) Molecular Bases for Evolutionary Novelty- Vertebrate Jaw and Turtle Shell. In: *the symposium MOLECULAR AND MORPHOGENETIC EVOLUTION OF SPECIFIC ORGANS' in ICVM7*, Florida, USA, 2004・8.01.

- Kuratani, S. (2004) Homology of the Trabecula in the Vertebrate Cranium. In: *ICVM7* Florida, USA, 2004・7.29.
- Kuratani, S. (2004) Craniofacial development of the lamprey and vertebrate evolution. In: 学術創成研究国際シンポジウム, Kyoto, 2004・2.27.
- Kuratani, S. (2004) Evo-Devo study of the mammalian middle ear. In: *Mammalian Symposium*, Hayama, 2004・2.20.
- Kuratani, S. (2004) Evolutionary Developmental Biology of Vertebrate Traits. In: 基生研 *Symposium*, 岡崎国立共同研究機構 職員会館会議室 Okazaki, 2004.2.16.
- Kuratani, S. (2004) What do we learn from the lamprey? – evolution of jaw, hypophysis and the neural crest. In: *Mini symposium "Beauty in Embryology" Organizer: Yoshiko Takahashi (CDB)*, Kobe, 2004.2.04.
- Kuratani, S. (2003) Developmental basis for the carapace evolution in turtles. In: *Symposium on Turtle Origins, Evolution, and Systematics*, St. Petersburg, Russia, 2003・8.18.
- Kuratani, S. (2003) lamprey Development and evolution of the vertebrate jaw. In: 第108回解剖学会総会日米シンポジウム2003・4.02.

<その他の発表>

- 遠藤一佳「ゲノムに刻まれた地球システム進化の歴史」地球惑星科学関連学会 2003 年合同大会ジョイントセッション「惑星地球システムの安定性と不安定性」, 2003 年 5 月 27 日, 幕張メッセ
- 飯島実・秋場夏美・更科功・倉谷滋・遠藤一佳「軟体動物の形態の多様性とHox遺伝子群との関連」日本進化学会第6回大会, 2004 年 8 月 4 日-7 日, 東京大学・駒場キャンパス
- 倉谷滋「分子発生学的機構から見た進化的新形態の起源:顎と甲羅」2003・1.18 京都京大会館山岸先生健康指標研究会演題発表
- 倉谷滋「脊椎動物顎顔面形態の発生と進化」2003・4.21 与五沢研究会・福岡県福岡市ホテルオークラ福岡シンポジウム
- 倉谷滋「Evolutionary Developmental Biology of Vertebrate Traits 脊椎動物の形質をめぐる進化発生学」2004・2.16 基生研大進化連続セミナー
- 倉谷滋「顎の進化と発生」2004.9.25. 歯科基礎医学会: シンポジウム広島『咀嚼システムの系統・個体発生から再生医療を考える』広島国際会議場、コスモスの間
- 倉谷滋「ヤツメウナギから見た脊椎動物の進化」2004.12.14シンポジウム・境界動物の生物学、東京大学海洋研究所講堂